



Technische Universität München

Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie

Merkmale und Taxonomie brauereispezifischer Laktobazillen

Ingrid Bohak

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. T. Becker
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Back (i. R.)
2. Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Die Dissertation wurde am 29.04.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 01.07.2015 angenommen.

Im Vergleich zum Menschen und zu anderen sogenannten „höheren“ Organismen ist die Anpassungsfähigkeit und Vielseitigkeit der Mikroorganismen so groß, dass sie zweifellos noch dann die Welt besiedeln und deren Gesicht verändern werden, wenn wir längst von der Bühne abgetreten sind. Mikroben - und nicht „Makroben“ - regieren die Welt.

*aus: Der Pilz, der John F. Kennedy zum Präsidenten machte.
Bernard Dixon, 1994*

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Werner Back für die Bereitstellung des Themas bedanken. Sein stetes Interesse an meiner Arbeit sowie die anregenden Gespräche trugen erheblich zum Gelingen der Arbeit bei.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Thomas Becker, der mir als Nachfolger von Herrn Prof. Back den Abschluss der Arbeit ermöglichte und mich dabei in jeder Hinsicht unterstützte.

Herrn Prof. Matthias Ehrmann möchte ich für seine kompetente und tatkräftige Hilfe bei molekularbiologischen Fragestellungen, bei der Stammbaumkonstruktion und bei der Korrektur der Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Mitautoren Frau Dr. Karin Thelen, Frau Dr. Claudia Beimfohr, Herrn Prof. Schleifer, Herrn Prof. Karel Kersters, Herrn Dr. Bruno Pot, Herrn Dr. Wolfgang Ludwig und Herrn Dr. Lothar Richter für ihre wertvollen Beiträge zu den vorliegenden Publikationen danken. Auch Herrn Dr. Reiner Springer, Herrn Dr. Martin Zarnkow, Herrn Dr. Joachim Tretzel, Herrn Dr. Hubert Kollmannsberger und Herrn Dr. Mathias Hutzler gebührt für ihre jederzeit vorhandene Unterstützung mein Dank.

Für den reibungslosen Ablauf von bürokratischen Formalitäten bin ich Frau Daniela Schulte und Frau Adriana Brunner zu großem Dank verpflichtet. Erwähnen möchte ich hier auch alle Kollegen des Lehrstuhls und im Besonderen die Mitarbeiter der Mikrobiologie, deren freundschaftlicher Umgang stets für ein unbeschwertes Arbeiten sorgte.

Meinem Lebensgefährten Hermann Kronawitter gilt ein besonders inniger Dank für seine Unterstützung während des ganzen Entstehungszeitraums dieser Arbeit. Sein Verständnis und seine Geduld gaben mir die nötige Sicherheit und Rückhalt für die Fertigstellung.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung und das große Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben, danken. Ihre finanzielle und menschliche Unterstützung während all der Jahre bildeten den Grundstein für eine erfolgreiche Ausbildung. Aus diesen Gründen widme ich die vorliegende Arbeit meiner Mutter Christa Bohak und meinem verstorbenen Vater Otto Bohak, in memoriam.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungen	V
Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Zur Einteilung der Laktobazillen.....	5
1.1.1 Taxonomie.....	5
1.1.2 Einteilung nach brauereispezifischen Gesichtspunkten.....	12
1.2 Bakterien im Brauereibereich.....	17
1.2.1 Laktobazillen der biologischen Säuerung	19
1.2.2 Laktobazillen mit bierschädlichem Charakter	25
1.3 Nachweis- und Identifizierungsmethoden in der Brauerei.....	32
1.3.1 Kulturelle Methoden.....	33
1.3.2 Alternative Methoden unter dem Aspekt Schnellnachweis	35
1.3.2.1 Unspezifische und chemotaxonomische Methoden.....	35
1.3.2.2 Molekularbiologische Methoden	38
1.3.2.3 Kommerziell erhältliche Schnellnachweiskits für Brauereien	42
2 Ergebnisse	44
2.1 Eigene Arbeiten	46
2.2 Neubeschreibungen.....	48
2.2.1 <i>Lactobacillus lindneri</i> (ex Bergey et al. 1923) Back, Bohak, Ehrmann, Ludwig and Schleifer nom. rev.....	48
2.2.2 <i>Lactobacillus amylolyticus</i> Bohak, Back, Richter, Ehrmann, Ludwig and Schleifer sp. nov.	50
2.2.3 <i>Lactobacillus perolens</i> Back, Bohak, Ehrmann, Ludwig, Pot, Kersters and Schleifer sp. nov.	51
2.2.4 <i>Lactobacillus backi</i> Bohak, Thelen and Beimfohr sp. nov.....	53
3 Originalveröffentlichungen (Original Papers)	55
4 Diskussion	76
4.1 Taxonomie der neubeschriebenen Arten.....	76
4.2 Kritische Punkte beim Einsatz genbasierter Schnellnachweismethoden .	85
4.3 Ausblick: Trends in der Forschung	88
5 Literaturverzeichnis.....	93

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abger.	abgerufen (im Internet)
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AfG	Alkoholfreie Getränke
Anm. d. Verf.	Anmerkung des Verfassers
ATP	Adenosintriphosphat
bez.	bezüglich
bp	Basenpaare
bs	bierschädlich
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DMSZ	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DNS	(=DNA) Desoxyribonukleinsäure
<i>et al.</i>	et alteri (lat. für, und andere)
EBC	European Brewery Convention
EBC BU	EBC Bittereinheiten (engl.: bitterunits)
ELISA	enzymgebundener Immunoabsorptionstest (enzym linked immunosorbent assay)
EMA	Ethidiumbromid-Monoazid
FAME	Whole cell fatty acid analysis
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FT-IR	Fourier transform infrared
g	Gramm
G+C	mol% Guanin und Cytosin der DNS
GU	genetic units
h	Stunde(n), hekto (hundert)
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point (Gefahrenanalyse und kritische Kontrollpunkte)
hpts.	hauptsächlich

http	hypertext transfer protocol (Hypertext-übertragungsprotokoll)
IJSEM	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
KBE	Kolonie bildende Einheit
Konz.	Konzentration
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LAB	lactic acid bacteria
lag	engl. Verzögerung
lag-Phase	Anlaufphase
lat.	Lateinisch
log	Logarithmus zur Basis 10
log-Phase	exponentielle Vermehrungsphase
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
m	Milli (1 Tausendstel); Meter
M	Molar (mol/l)
MAb	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit)
max.	maximal
μ	Mikro (1 Millionstel)
MO	Mikroorganismus, Mikroorganismen
mol%	Stoffmengenprozent
mRNS	messenger RNS
MRS	<i>Lactobacillus</i> -Medium nach de Man, Rogosa und Sharpe
MS	Massenspektrometer (-metrie)
MSB	Milchsäurebakterien
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NALFIA	Nucleic acid lateral flow immuno assay
NASBA	Nucleic acid sequence based amplification
NBB	Nährmedium zum Nachweis bierschädlicher Bakterien
nm	Nanometer
o. g.	oben genannt

o. V.	ohne Verfasser
PAGE	Polyamid-Gelelektrophorese
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Py-MS	Pyrolysis mass spectrometry
qPCR	quantitative PCR
RAPD	zufällig amplifizierte polymorphe DNS (randomly amplified polymorphic DNA)
rDNS	DNS kodierend für ribosomale Ribonukleinsäure
REP	Repetitive element palindromic
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion auch: Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies / Art
spp.	Plural von sp., mehrere Spezies / Arten
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
T _m	Schmelzpunkt der DNS
u. a.	unter anderem/n
URL	Uniform resource locator (einheitlicher Quellenanzeiger)
VBNC	viable but non-culturable lebensfähig aber nicht kultivierbar
Vol%	Masse/Volumen
VTT	Technical Research Center of Finland
www	world wide web (weltweites Netz)
z. B.	zum Beispiel
z. Z.	zur Zeit

Zusammenfassung

Bei Studien an Milchsäurebakterien aus Sauergut, Bieren und alkoholfreien Getränken unterschiedlichster Herkunft kristallisierten sich einige Laktobazillen-Stämme heraus, welche auf physiologisch-biochemischer Ebene Abweichungen von den bereits bekannten Arten aufwiesen. Der separate Status dieser Stämme als eigene Spezies in der bakteriellen Systematik wurde mittels vergleichender 16S und falls erforderlich 23S rRNS Gensequenzanalysen (im Folgenden bezeichnet als 16S und 23S rDNS) und teilweise durch SDS-PAGE whole-cell protein Analyse (Proteinpatterns) bestätigt. Dies führte zu den Neubeschreibungen von *Lactobacillus lindneri* (als Revival), *L. backii*, *L. perolens* und *L. amylolyticus* und der Bestimmung ihrer phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen.

Während *L. lindneri* und *L. backii* ausschließlich aus verdorbenen Bieren isoliert werden und als obligate Bierschädlinge zu betrachten sind, wurde *L. perolens* erstmals aus alkoholfreien Erfrischungsgetränken (AfG) isoliert. In Bierpassagen wurde er als bierschädlich erkannt und schließlich in Weißbieren und Bierwürzen nachgewiesen, so dass ihm neben seiner Rolle als obligat schädlicher Keim in alkoholfreien Getränken auch der Status eines potentiellen Bierschädlings zukommt.

L. lindneri wurde bisher nahezu ausschließlich im Brauereimilieu gefunden. Er tritt zunächst als Primärkontaminant im Gär- und Lagerkellerbereich auf. Aufgrund seiner teilweise nahezu kokkoiden Zellmorphologie passiert er unter Umständen die Filter und wird dann in abgefüllten Bieren, meist in der Form von Spurenkontaminationen, nachgewiesen. Da er hohe bierspezifische Nährstoffansprüche stellt und außerdem sehr lange lag-Phasen aufweist, gestaltet sich sein Nachweis auch mit bierspezifischen Selektivmedien schwierig. Die Detektion und Identifizierung wird deshalb unterstützt durch den Einsatz artspezifischer rDNS Gensonden oder Primer. Die Sequenz des Primers für *L. lindneri* wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und validiert. Die Hinterlegung der 16S rDNS Sequenzen in der EMBL Datenbank erfolgte unter den Accession numbers X95421, X95422 und X95423.

Als weiterer obligater Bierschädling wurde *L. backii* in Bieren mit 12 bis 32 EBC BU in verschiedenen Brauereien Deutschlands und Italiens nachgewiesen und bisher fast ausschließlich nur im Biermilieu gefunden. Er führt zu starken Trübungen, Bodensätzen und Säurebildung in den betroffenen Bieren. Diese Art bildet

homofermentativ DL-Laktat. Zur taxonomischen Zuordnung wurden die 16S rDNS Sequenzen von drei Stämmen analysiert und die Sequenzen von zwei Stämmen bei GenBank unter den Nummern DQ406860 bis DQ406862 hinterlegt. *L. backii* wurde früher offensichtlich mit seinem nahen Verwandten *L. coryniformis* verwechselt. *L. backii* und sein phylogenetisch nächster Verwandter *L. iwatensis* sind der *L. coryniformis*-Gruppe zugeordnet.

Die potentiell bierschädliche Art *Lactobacillus perolens* ist fakultativ heterofermentativ und zeichnet sich durch die Produktion großer Mengen Diacetyl aus. SDS-PAGE whole-cell protein Analysen bestätigten den Status von *L. perolens* als eigenständige Art zunächst innerhalb der *L. casei*-Pediokokken-Gruppe. Eine Neugruppierung der Laktobazillen im phylogenetischen Stammbaum weist nun *L. perolens* der *L. perolens*-Gruppe zu. Dieser Gruppe am nächsten phylogenetisch verwandt sind *L. composti*, gefolgt von *L. dextrinicus* (ehemals *Pediococcus dextrinicus*). *L. perolens* selbst steht in nächster Verwandtschaft zu *L. harbinensis* und *L. shenzhenensis*. Die 16S rDNS Sequenzen von zwei *L. perolens*-Stämmen finden sich unter den Nummern Y19176 und Y19168 in der EMBL.

Bei *L. amylolyticus* handelt es sich um ein homofermentatives Milchsäurebakterium, welches originär aus vermälztem Getreide und aus ungehopften Bierwürzen (Vorderwürzen) isoliert wurde. Es wird in vielen Brauereien großtechnisch bevorzugt als Starterkultur zur biotechnologischen Gewinnung von Milchsäure zur Maische- und/oder Würzesäuerung eingesetzt. Diese Bakterienart zeichnet sich dadurch aus, dass sie nur im ungehopften Substrat bei einem Temperaturoptimum von 47–48 °C wächst und demzufolge keinerlei bierschädigende Eigenschaften aufweist. Sie trägt aufgrund ihrer DL-Laktat-Bildung zur qualitativen Stabilisierung des Bieres bei. Für die phylogenetische Zuordnung wurden die 16S rDNS und die 23S rDNS des Typstamms von *L. amylolyticus* sequenziert und in der EMBL unter den Nummern Y17361 und Y17360 hinterlegt. Diese Sequenzen bilden die Basis für molekulare Diagnostiktechniken zur Reinheitskontrolle der als Kulturstämme eingesetzten Sauergutstämme. *L. amylolyticus* ist zusammen mit seinem nächsten Verwandten *L. intestinalis* phylogenetisch der *L. acidophilus*-Gruppe zugeordnet, welche nun einen Teil der *L. delbrueckii*-Gruppe darstellt.

Summary

During the investigation of *lactobacilli* from acidified mashes or worts, beer, and non-alcoholic beverages from different sources, new strains of *lactobacilli* with different behavior in respect to physiological-biochemical characteristics compared to already known strains, emerged.

Sequencing und comparison of the ribosomal DNA of the 16S and if necessary the 23S subunits, and SDS gels of the bacterial whole cell proteins confirmed the notion of new lactobacilli strains. The results obtained, using those techniques, led to the description of *Lactobacillus lindneri*, *L.backii*, *L. perolens*, and *L.amylolyticus* as new species within the genus *Lactobacillus*. Furthermore a new insight of their phylogenetic relationship was achieved.

L. lindneri and *L. backii* could almost exclusively be isolated from spoiled beer and can be considered as obligatory beer spoilage microorganisms. In contrast *L. perolens* was first isolated from alcohol free soft drinks, but later on it was shown that this bacterium by exposing it to beer during culturing, gets harmful to beer too and evidence was provided of its existence in wheat beer und wort. This means *L.perolens* is not only an obligatory spoilage bacterium of alcoholic free beverages, but in addition it can be considered to be potentially harmful to beer.

L. lindneri is almost exclusively rooted in brewery environments. This bacterium at first occurs as a primary contamination during the fermentation and maturation process, however with its coccoid cell morphology it can pass through filters and may be found as trace contamination in bottled beer. The detection of *L. lindneri*, even by the use of selective culture media, is complicated by the facts of its high beer specific nutrition requirement and the long lag phase. An exact detection and identification of this bacterium can be supported by using geneprobess and/or specific primers. A part of this work here was to develop and validate primers for *L. lindneri*. Their 16S rDNA sequences are deposited in the EMBL gene data bank under the accession numbers X95421, X95422, and X95423, respectively.

In addition *L. backii* was identified as harmful to beers from different breweries in Italy and Germany that contained 12 to 32 EBC bitter units. The effected beers became very turbid, sediments were formed and the acidity increased. In a homofermentative

manner DL-lactate is formed. For the taxonomic classification 16S rDNA of 3 strains were sequenced and the sequence of two of them were deposited in the EMBL gene data bank under the accession numbers DQ406860 and DQ406862.

L. backii was obviously earlier confused with its close relative *L. coryniformis*. *L. backii* and its closest relative from a phylogenetic point of view, *L. iwatensis*, are assigned to the group of *L. coryniformis*.

The potentially harmful strains of *L. perolens* are facultatively heterofermentative and show a high production of diacetyl. SDS-PAGE of the cell proteins confirmed first the classification of *L. perolens* as a unique strain to the *L. casei-Pediococcus* group. A new assessment of the phylogenetic tree, however, moved *L. perolens* to the *L. perolens* group. The next phylogenetic relatives of the *L. perolens*-group are *L. composti* followed by *L. dextrinicus* (formerly known as *Pediococcus dextrinicus*). The immediate phylogenetic neighbours are *L. harbinensis* and *L. shenzhenensis*. The 16S rDNA sequences of two strains can be found in the EMBL gene data bank under the accession numbers Y19176 and Y19158, respectively.

L. amylolyticus is a homofermative *lactobacilli* strain that was originally isolated from malted grain and unhopped wort. This bacterium is preferred in breweries as a starter for the production of lactic acid used to acidify mash and/or wort. Its specific trait to grow only in unhopped medium at a temperature optimum of 47-48 °C prevents therefore spoilage of beer. Evidently the production of lactate is beneficial to the qualitative stabilization of beer. For the phylogenetic classification both 16S and 23S rDNA of *L. amylolyticus* were sequenced and deposited in the EMBL gene data bank under the accession numbers Y17361 and Y17360. These sequences are used as a base for the quality control of starter cultures of the biological acidification. *L. amylolyticus* is phylogenetically assigned to the *L. acidophilus*- group that now is part of the *L. delbrueckii*-group. Its nearest neighbor is *L. intestinalis*.

1 Einleitung

Milchsäurebakterien der Brauerei beeinflussen die Bierqualität in zweierlei Hinsicht. So finden thermophile Laktobazillen bei der biologischen Säuerung von Maischen und Würzen Anwendung und zählen damit zu den Nutzorganismen. Alle anderen Milchsäurebakterien sind unerwünscht, da sie als Bierschädlinge zum gefürchteten „Umschlagen“ der Biere führen. Die industrielle Verwendung der Laktobazillen bei der Bierbereitung und deren Fähigkeit zum Bierverderb legten deshalb bereits seit Mitte des 19ten Jahrhunderts nahe, sich intensiv mit deren Eigenschaften, Klassifizierung und Diagnostik zu befassen. Diese Forschungen haben bis heute nichts von ihrer Relevanz eingebüßt.

Grundlage der vorliegenden Arbeit war die Sichtung und Würdigung der Laktobazillen unter brauereispezifischen Gesichtspunkten und ihre Betrachtung im modernen taxonomischen Kontext. Dazu wurden systematisch Laktobazillen aus Praxisproben gesammelt und mit klassischen Methoden charakterisiert. Dies führte zum Erkennen von vier *Lactobacillus*-Spezies, die von den bekannten Identifizierungsmustern abwichen. Ihre Neuartigkeit wurde über die Analysen der DNS kodierte 16S ribosomalen RNS Sequenzen (16S rDNS) als Teil der Standardbeschreibung von Spezies bestätigt und findet ihre aktuelle wissenschaftliche Berücksichtigung bei der Konstruktion phylogenetischer Stammbäume. Diese Beschreibungen bilden mit die Grundlage zur Entwicklung molekularer Diagnostiktechniken zum Schnellaufweis von Bierschädlingen bzw. zur Reinheitskontrolle bei Kulturstämmen. Besagte Schnelltests sind damit ein wichtiges Instrumentarium zur Sicherstellung der Qualität des Produktes Bier.

1.1 Zur Einteilung der Laktobazillen

1.1.1 Taxonomie

Die Taxonomie befasst sich mit der Einordnung von Lebewesen in Kategorien oder Klassen. Die Klassifizierung der Milchsäurebakterien beruhte dabei ursprünglich auf Methoden zur Beschreibung ihrer phänotypischen Eigenschaften (Mohania *et al.*, 2008). Der exklusive Einsatz dieser traditionellen Methoden resultiert jedoch in einem unklaren Bild über die taxonomische Stellung der Mikroorganismen. Daher wird in

der heutigen Bakterientaxonomie ein sogenannter Mehrphasenansatz („polyphasic approach“) favorisiert, der die Resultate mehrerer Methoden (genotypische, chemotaxonomische und phänotypische) mit unterschiedlicher Aussagekraft und Differenzierungsvermögen zur weiteren Abklärung des Status kombiniert, was ein zuverlässiges Konzept zur Identifizierung bzw. Charakterisierung von Bakterien darstellt (Vandamme *et al.*, 1996; Schleifer, 2009; Vandamme *et al.*, 2014).

Die **taxonomische Beschreibung** oder auch **Systematik** umfasst

- die Klassifizierung: systematische Gruppeneinteilung von Organismen auf der Basis ihrer Ähnlichkeit,
- die Nomenklatur: standardisierte wissenschaftliche Namensgebung zur Gewährleistung der internationalen Einheitlichkeit,
- die Identifizierung: der Prozess zur Entscheidungsfindung, ob ein unbekannter Organismus einer bereits definierten Gruppe angehört.
(Vandamme *et al.*, 2014).

Hierzu sind neben den Angaben von Herkunft und Habitat diverse phänotypische, chemotaxonomische und genetische Merkmalsanalysen erforderlich.

Zu den **phänotypischen** Bestimmungen zählen z. B. Gramverhalten, Zell- und Kolonienmorphologie, Anreicherungsmedium, Verhalten gegenüber Sauerstoff, DL-Laktatbestimmung, Spektrum der Kohlenhydratverwertung, Bestimmung der Fermentationsprodukte aus Glukose und Voges-Proskauer Test. **Chemotaxonomische** Kriterien sind z. B. der Peptidoglycantyp der Zellwand, das zelluläre Gesamtproteinprofil (SDS-PAGE whole cell protein pattern), die elektrophoretische Enzymmobilität, das Fettsäuremuster und Analysen mit MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight Massenspektrometrie). Zu den **genotypischen** Kriterien zählen in erster Linie die Basenzusammensetzung der DNS (G+C Gehalt in Molprozent), DNS-DNS-Homologien und die Bestimmung der Ähnlichkeit phylogenetischer Markergene – standardmäßig die 16S rDNA – als Basis für die Aufklärung evolutionsbedingter Verwandtschaftsverhältnisse, was als Phylogenetik bezeichnet wird. Des Weiteren werden u. a. noch auf Plasmid-Profiling oder verschiedene Techniken des genomischen Fingerprinting, wie amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplification of polymorphic DNA (RAPD) und repetitive element palindromic (REP)-PCR zurückgegriffen (Mattarelli *et al.*, 2014).

Taxonomische Gruppen, gleich welcher Kategorie oder Rangstufe, werden Taxa (sing. Taxon) genannt. Ein Taxon sollte auf allen Ebenen eine gemeinsame entwicklungsgeschichtliche Herkunft beinhalten. Ein solches Taxon wird als *monophyletisch* bezeichnet. Gehören zu einem allgemein anerkannten Taxon zwei oder mehr Gruppen, die durch konvergente Evolution viele gemeinsame Eigenschaften haben, obwohl sie zu unterschiedlichen Abstammungslinien gehören, spricht man von einem *polyphyletischen* Taxon. In der Regel wird dann versucht das Taxon neu zu definieren, so dass es monophyletisch wird. Paraphyletische Taxa schließlich umfassen einige, aber nicht alle Abkömmlinge einer einzigen Gruppe, sowie diese Gruppe selbst. Diese Art des Taxons wird jedoch mitunter auch nach Aufklärung der jeweiligen Verwandtschaftsverhältnisse von Taxonomen beibehalten, um bestimmte auffällige Gruppen besonders zu betonen (www.springer.com/cda/-content/document/cda_downloaddocument/25-07.pdf?SGWID=0-0-45-753333-0 Polyphyletischer Taxon; geladen 01/2015).

Unter Klassifizierung wird schließlich die geordnete Einordnung definierter taxonomischer Einheiten (z. B. Spezies) in Gruppen (z. B. Genus) verstanden (Ludwig und Schleifer, 1994).

Milchsäurebakterien (MSB) werden als grampositive, Katalase-negative, fakultativ anaerobe, nicht-sporulierende, meist unbewegliche und säuretolerante Mikroorganismen definiert. Als Hauptstoffwechselprodukt aus der Fermentation von Zuckern entsteht Laktat (Fuchs, 2007). Taxonomisch gesehen gehören sie zur Klasse der *Bacilli*, welche im bakteriellen Phylum der *Firmicutes*, deren Vertreter G+C-Gehalte der DNS von 55 mol% und weniger aufweisen, angesiedelt sind. Den *Bacilli* gehört die Ordnung *Lactobacillales* mit sechs Familien an. Eine davon ist die Familie *Lactobacillaceae*, welche wiederum drei Gattungen enthält, nämlich die Gattung *Pediococcus* (MSB mit kokkoider Zellform), sowie die Gattungen *Paralactobacillus* und *Lactobacillus* (MSB mit stäbchenförmiger Zellausbildung), wobei die letztere Gattung die meisten Spezies aufweist (Holzapfel und Wood, 2014a). Für *Paralactobacillus*, der nur aus der Art *Paralactobacillus selangorensis* besteht, wurde aufgrund naher phylogenetischer Verwandtschaft ein Transfer in die Gattung *Lactobacillus* vorgeschlagen (Haakensen *et al.*, 2011). Eine Validierung dieses Vorschlags erfolgte bereits auf der offiziellen Webseite der LPSN (<http://www.bacterio.net/paralactobacillus.html>; abgerufen 01/2015), so dass die Familie *Lactobacillaceae*

nach endgültiger Revision der Gattung *Lactobacillus* nur noch aus den Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* bestehen wird. Diese Änderung findet bereits bei der Konstruktion phylogenetischer Stammbäume allgemeine Berücksichtigung.

Die Mitglieder der Familie ***Lactobacillaceae*** sind sehr anspruchsvolle Mikroorganismen und in kohlenhydrathaltigen nährstoffreichen Substraten, z. B. Milchprodukten, Sauerteig, Bier, Wein und Fruchtsaft, in der Erde, im Abwasser, aber auch z. B. im Mund oder Intestinalbereich von Menschen und einigen Tieren anzutreffen (Hammes und Hertel, 2006 und 2009). Ihr G+C-Gehalt der DNS liegt zwischen 32 bis 59,2 mol% und das Zellwandpeptidoglycan kann Lys-D-Asp, Orn-D-Asp, meso-Diaminopimelinsäure und Lys-Ala und manchmal auch L-Lys-L-Ser-L-Ala₂ enthalten (Felis und Pot, 2014). Wie das Dendrogramm in Abb. 1 zeigt, bildet die Gattung *Pediococcus* ein Cluster inmitten der Laktobazillen und zeigt zu den ihr am nächsten verwandten *Lactobacillus*-Arten 85 bis 94 % 16S rDNS Sequenzähnlichkeit (Felis und Pot, 2014).

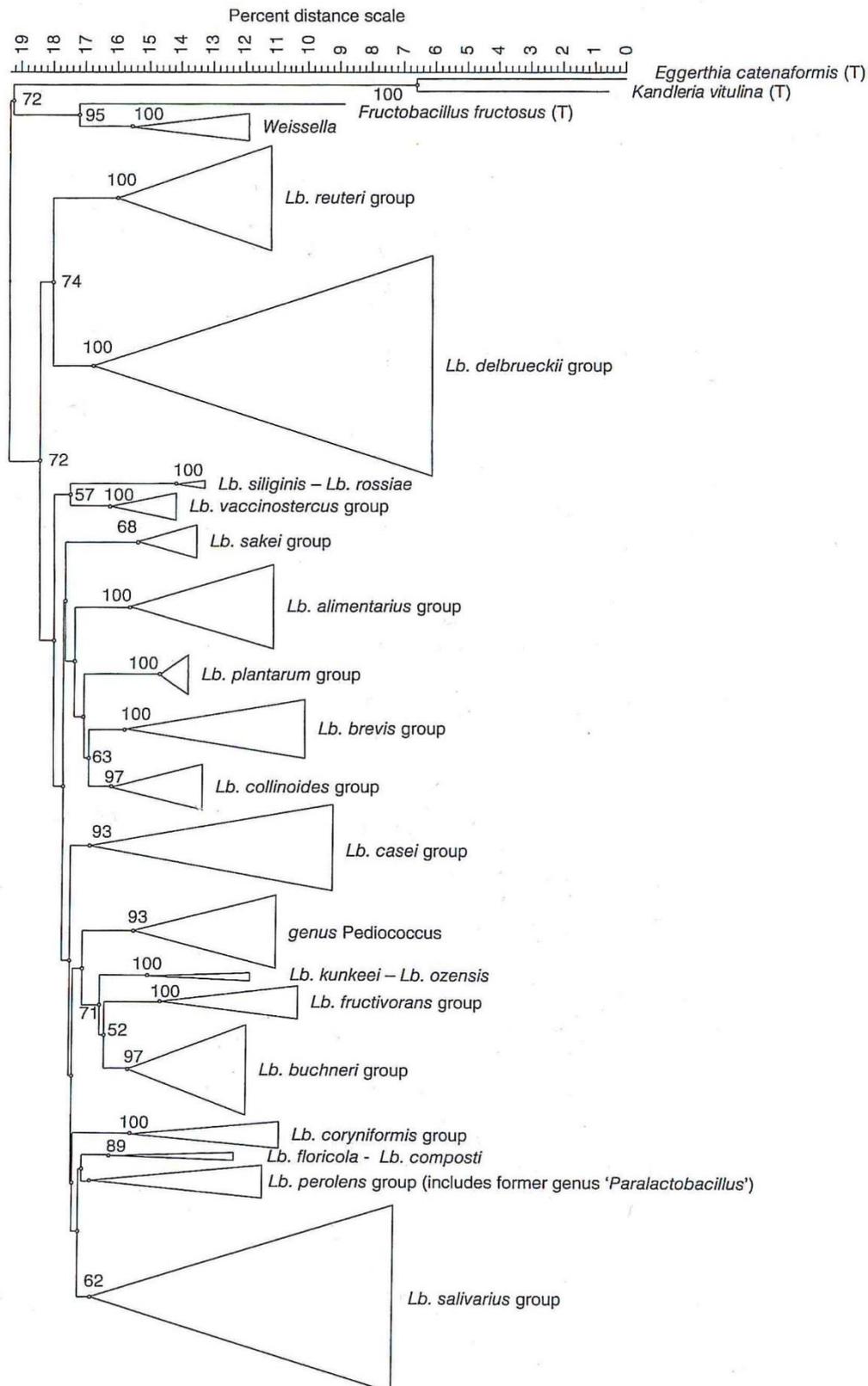


Abb. 1: 16S rDNS Sequenz-basierter phylogenetischer Stammbaum für die Familie *Lactobacillaceae*: Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Arten der Gattung *Lactobacillus* (17 Gruppen) und *Pediococcus*. „*Paralactobacillus*“ ist in die *L. perolens*-Gruppe integriert (aus Felis und Pot, 2014).

Die Mitglieder der für die vorliegende Arbeit relevanten Gattung ***Lactobacillus*** werden als fakultativ anaerob oder aerotolerant, nicht-sporulierend, meist unbeweglich und im Allgemeinen stäbchenförmig, wobei manchmal auch kokkoide Formen auftreten, beschrieben. Die Zellen liegen häufig in Ketten vor. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt 30 bis 40 °C. Generell kann Wachstum zwischen 2 bis 53 °C in pH-Wert-Bereichen von 3 bis 8 stattfinden, wobei da pH-Optimum bei 5,5 bis 6,2 liegt (Hammes und Hertel, 2009).

Eine grundlegende **phänotypische Gruppeneinteilung** der Laktobazillen basiert auf den von ihnen genutzten Stoffwechselwegen als Schlüsselmerkmale. So sind in der Gruppe A) obligat homofermentative, in B) fakultativ heterofermentative und in C) obligat heterofermentative Laktobazillen zusammengefasst (Hammes und Vogel, 1995). Die Schlüsselmerkmale für diese Gruppierungen sind in Tabelle 1 dargestellt. Wie hier zu sehen ist, hängt die Klassifikation nach homo- und heterofermentativ mit dem Vorhandensein der Schlüsselenzyme 1,6-Biphosphat-Aldolase und Phosphoketolase zusammen. Das Potenzial zur CO₂-Bildung aus Glukose und/oder Gluconat wird nicht nur für taxonomische Zwecke genutzt, sondern ermöglicht zudem jedem Routinelabor eine erste Charakterisierung der nachgewiesenen MSB durch die einfach durchzuführende Überprüfung der Kohlensäurebildung aus Glukose und Gluconat. Bei Gasbildung aus Glukose und meist Gluconat handelt es sich um obligat heterofermentative Mikroorganismen. Wird nur das Gluconat unter Gasbildung verwertet, liegen fakultativ heterofermentative MO vor. Fehlt die Gasbildung gänzlich, wurde ausschließlich der Weg der Glycolyse beschritten. Es handelt sich dann um obligat homofermentative MO (Dicks und Endo, 2009; Dittrich *et al.*, 2008).

Tab. 1: Gruppeneinteilung der Milchsäurebakterien nach ihren metabolischen Eigenschaften der Hexosen- und Pentosenverwertung (Hammes und Vogel, 1995; Dittrich *et al.*, 2008; Hammes und Hertel, 2009)

<p>Gruppe A: obligat homofermentativ</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hexosenverwertung über den Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Weg (Glycolyse) zu > 85 % Laktat • 1,6 Biphosphat-Aldolase ist vorhanden, Phosphoketolase fehlt → keine Gluconat- und Pentosenverwertung • Keine Gasbildung • Beispiele: <i>L. amylovorus</i>, <i>L. amylolyticus</i>, <i>L. acidophilus</i>
<p>Gruppe B: fakultativ heterofermentativ</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hexosenverwertung wie Gruppe A • Bei Glukosemangel: heterofermentative Bildung von Laktat, Acetat, Ethanol und Ameisensäure durch manche Stämme • Neben Aldolase auch Phosphoketolase vorhanden → zusätzliche Fermentation von Pentosen und häufig Gluconat im 6-Phosphogluconat-Weg (1. Phase des Pentosephosphat-Weges) • CO₂-Bildung oft aus Gluconat (London, 1990), aber nicht aus Hexosen • Bei Anwesenheit von Glukose → Repression der Enzyme des 6-Phosphogluconat-Weges • Beispiele: <i>L. casei</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. perolens</i>
<p>Gruppe C: obligat heterofermentativ</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hexosenverwertung (und ähnliche Verbindungen) über den 6-Phosphogluconat-Weg • Laktat, Acetat und/oder Ethanol, CO₂ aus Hexosen • Pentosenfermentation zu Laktat und Acetat über den Pentosephosphatweg • meist Gas aus Gluconat • Phosphoketolase vorhanden, keine Aldolase • Beispiele: <i>L. brevis</i>, <i>L. fermentum</i>

Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen von Laktobazillen werden standardgerecht über den Ähnlichkeitsvergleich ihrer 16 S rDNS Sequenzen ermittelt und in Form von Dendrogrammen dargestellt. Das von Felis und Pot erstellte Dendrogramm (Abb. 1) weist insgesamt 14 große Gruppen mit insgesamt 167 *Lactobacillus*-Arten aus, nämlich die *L. reuteri*-, *L. delbrueckii*-, *L. vaccinostercus*-, *L. sakei*-, *L. alimentarius*-, *L. plantarum*-, *L. brevis*-, *L. collinoides*-, *L. casei*-, *L. fructivorans*-, *L. buchneri*, *L. coryniformis*-, *L. perolens*- und *L. salivarius*-Gruppe. Drei kleinere Cluster werden durch *L. siliginis* – *L. rossiae*, *L. kunkeei* – *L. ozensis* und *L. floricola* – *L. composti* gebildet. Die Gruppenbenennung erfolgt nach den jeweils erstbeschriebenen Spezies. *L. selangorensis* ist hier in der *L. perolens*-Gruppe zu finden (Felis und Pot, 2014). Die *L. acidophilus*-Gruppe (Schleifer und Ludwig, 1995a und b) ist jetzt ein Teil der *L. delbrueckii*-Gruppe. Die *Lactobacillus*-

Spezies der sehr heterogenen *L. casei*-Pediokken-Gruppe (Schleifer und Ludwig, 1995a und b) sind jetzt auf die *L. buchneri*-, *L. casei*-, *L. plantarum*-, *L. reuteri*- und die *L. salivarius*-Gruppe verteilt (Pot *et al.*, 2014). Ein aktueller phylogenetischer Stammbaum wird auch von Sun *et al.* (2014) wiedergegeben, der aus dem Datenvergleich von 169 bekannten *Lactobacillus*-Spezies errechnet wurde. Es ergeben sich hier 15 große phylogenetische Gruppen (Bezeichnungen wie oben; zusätzlich die *L. manihotivorans*-Gruppe), sieben Paargruppen mit je zwei Spezies und sieben einzelne Spezies mit einzelständigen Abstammungslinien. Diese Stammbaumkonstruktion weist zwar kleine Unterschiede zu Felis und Pots (2014) Dendrogramm auf, aber prinzipiell besteht eine gute Übereinstimmung. Abweichungen bei der Gruppeneinteilung könnten mit Unterschieden bei der Erkennung des Anfangs oder des Endes der analysierten rRNS-Gene erklärt werden (Wassehaar und Lukjancenko, 2014).

Die sich auf den Metabolismus der Milchsäurebakterien beziehende Gruppeneinteilung (Tab. 1) spiegelt nicht unbedingt deren auf Basis der 16S rDNS errechneten phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse wieder (Hammes und Hertel, 2009). So sind in der eher homofermentativen *L. delbrueckii*-Gruppe mit beispielsweise *L. acetotolerans* und *L. hamsteri* auch fakultative heterofermentative Laktobazillen vorhanden, oder umgekehrt in der vornehmlich fakultativ heterofermentativen *L. casei*-Gruppe auch homofermentative Vertreter, wie *L. manihotivorans* oder *L. sharpeae* zu finden (Pot *et al.*, 2014). Die Laktobazillen bilden also phänotypisch eine sehr heterogene Gruppe. Zur weiteren Abklärung ihrer evolutionären Verkettung könnte möglicherweise das Studium der für die maßgebenden Stoffwechselwege der Glycolyse und des Pentosephosphatweges zuständigen Gene einen Beitrag leisten, wie Salvetti *et al.* (2013) vorschlagen.

1.1.2 Einteilung nach brauereispezifischen Gesichtspunkten

Die Taxonomie von Mikroorganismen ist für den Brauer zunächst von untergeordneter Bedeutung. Im Brauereibereich erfolgt die Einteilung – eher nach praktischen Aspekten – zum einen nach der Herkunft der Mikroorganismen (primär/sekundär) und zum anderen nach ihrem Schädigungspotenzial für das fertige Produkt (Schädlichkeitskategorien). Die Einteilung nach Primär- und Sekundärkontamination erleichtert die Auffindung des Kontaminationsherdes, so dass gezielte Gegenmaß-

nahmen ergriffen und damit eine Keimverschleppung vermieden werden kann. Bei der Forderung nach der Lokalisation der Gefahrenquelle erweist sich die Identifizierung des Kontaminanten als hilfreich. Dasselbe gilt auch für die Schädlichkeitsbeurteilung.

Einteilung in Primär- und Sekundärkontamination

Unter Primärkontaminanten werden Mikroorganismen verstanden, welche hauptsächlich über die Brauereirohstoffe (Hefe, Wasser, Würze, Hopfen) und Produktionshilfsmittel (z. B. Kieselgur, Polyvinylpolypyrrolidon, Kieselgel) ins Bier gelangen. Bierschädliche Mikroorganismen setzen sich dann im Prozessbereich vor den Filtern, d. h. im Hefe-, Lager- und Gärkellerbereich, oder in den Filtern selbst fest. Hier findet bei tiefen Temperaturen gewöhnlich kein Wachstum statt. Die Keime können aber sehr lange überdauern und sich dabei an das Biermilieu adaptieren. Eine Verschleppung in die abgefüllten Gebinde kann bei Unregelmäßigkeiten auf dem Prozessweg (z. B. Druckstöße am Filter, mangelhafte Reinigung und Desinfektion) jederzeit stattfinden.

Sekundärkontaminationskeime sind im Abfüllbereich beheimatet. Bierschädliche Laktobazillen und gramnegative Mikroorganismen (*Pectinatus* spp., *Megasphaera* spp.) bilden hier mit harmlosen Begleitorganismen und Indikatorkeimen in Schmutznischen Biofilme. Sie werden über Luftströmungen und rotierende Anlagenteile über Aerosole in einzelne Flaschen geschleudert, wo sie Spurenkontaminationen verursachen (Back, 1994b).

Eine Übersicht über die Entwicklung von Primär- und Sekundärkontaminationen im Zeitraum 1992 bis 2008 zeigt Abb. 2 (interne Erhebung basierend auf Isolaten aus reklamierten Bieren).

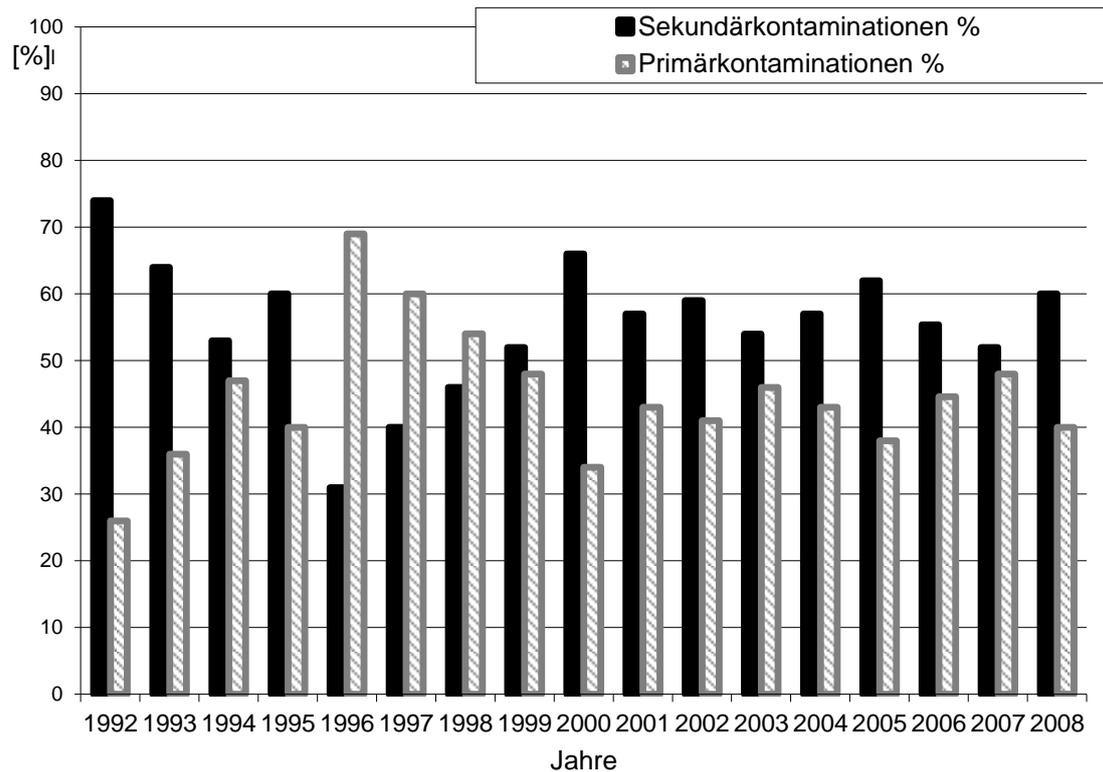


Abb. 2: Verlauf der durch bierschädliche Mikroorganismen verursachten Kundenreklamationen von 1992 bis 2008. Prozentuale Gegenüberstellung von Primär- und Sekundärkontaminationen. Interne Erhebung basierend auf Isolaten aus reklamierten Bieren.

Die ab 1992 beobachtete Abnahme der Sekundärbefunde von über 70 % auf annähernd 30 % im Jahr 1996 im Vergleich zu den Primärbefunden ist vermutlich dem Umstand geschuldet, dass die Sensibilität der Brauer hinsichtlich der Bedeutung der Kontrolle der Umfeldhygiene im Abfüllbereich zunächst zunahm. Ab 1999 pendelte sich das Verhältnis Primär- zu Sekundärkontamination auf etwa 1:1 ein, mit einem leichten Überhang seitens der Sekundärkontaminationen.

Einteilung in Schädlichkeitskategorien

Der Schädlichkeitsbeurteilung der relevanten Mikroorganismen liegt deren mehr oder weniger ausgeprägte Fähigkeit des Bierverderbes zugrunde und erlaubt nach Back (1994a) die Einteilung in die Schädlichkeitskategorien I: obligat bierschädlich (bs), II: potentiell bs, III: indirekt bs, IV: Indikatorkeime und V: Latenzkeime (Tab. 2). Ein Vorkommen der Keime der Kategorie I zieht immer einen Bierverderb nach sich, das der Kategorie II hingegen nur in Bieren mit verminderter Selektivität. Die Symptome des Bierverderbs sind Trübung, Bodensatzbildung, mehr oder weniger ausgeprägter

Säuerung, in selteneren Fällen Schleimbildung, sowie je nach Keimart auch Geschmacksfehler. Eigene Beobachtungen zeigten, dass aus dem Brauereiumfeld isolierte *L. brevis*-Stämme nach kurzem Adaptationsprozess im Weißbier, jedoch nicht in normal gehopftem untergärigen Bier wuchsen, weshalb der Kategorie I-Keim *L. brevis* auch in der Kategorie II vermerkt wurde. Über ähnliche Erfahrungen berichten auch Preissler *et al.* (2010). Schädigungen der Vorsubstrate, wie sie von Mikroorganismen der Kategorie III verursacht werden, sind in den letzten Jahren selten anzutreffen. Dies ist der fortschrittlichen Anstelltechnologie geschuldet, die verhindert, dass die empfindlichen nährstoffreichen Würzen und die Hefe-suspensionen vor dem Anstellen über längere Zeiträume gelagert werden und damit dem Verderb durch latent vorliegende Mikroorganismen ausgesetzt sind. Die vielfach praktizierte Technik der Würzesäuerung trägt überdies zur Stabilisierung bei. Die Mikroorganismen der Kategorien IV und V haben keine Bedeutung für die Bierqualität. Jedoch dienen insbesondere die schnell wachsenden und damit schnell nachweisbaren Essigsäurebakterien mit Kontaktmöglichkeiten zu Bier oder anderen sauren Getränken als Indikatoren für Schmutznischen im Produktionsprozess. Ihre Detektion ist deshalb ein wichtiges Hilfsmittel der Betriebskontrolle zur Einschätzung der hygienischen Situation, insbesondere da sie häufig mit bierschädlichen Mikroorganismen vergesellschaftet sind. Den Latenzkeimen (ubiquitär verbreitete Keime) schließlich ist nur bei massivem Auftreten über längere Zeiträume Beachtung zu schenken, da dies ein allgemeines Anzeichen für eine Verschlechterung der Umfeldsituation sein könnte.

Tab. 2: Kategorien der Bierschädlichkeit und Spezifikationen (nach Back, 1994a; modifiziert)

Kategorie	Beschreibung
<p>I Obligat bierschädlich</p>	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Toleranz gegenüber den selektiven Biereigenschaften • hohe Kältetoleranz • keine Adaptationszeiten • spontanes Wachstum in Bier • Vertreter: z. B. <i>Lactobacillus brevis</i>, <i>L. lindneri</i>, <i>Pediococcus damnosus</i>, <i>Megasphaera</i> spp., <i>Pectinatus</i> spp., <i>Saccharomyces diastaticus</i>
<p>II Potentiell bierschädlich</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Wachstum im Bier und Annahme eines bierschädlichen Charakters nur bei verminderter Selektivität: niedriger Alkoholgehalt, geringe Hopfengabe, erhöhter pH-Wert, hoher Sauerstoffgehalt, niedriger Vergärungsgrad • meist Adaptationsphase erforderlich • Vergesellschaftung mit obligaten Bierschädlingen • Vertreter: z. B. <i>Lactobacillus brevis</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. casei</i>, <i>L. perolens</i>, <i>Micrococcus kristinae</i>, <i>Zymomonas mobilis</i> (nur in gezuckerten Bieren), <i>Saccharomyces pastorianus</i> (Fremdhefe)
<p>III Indirekt beirschädlich</p>	<ul style="list-style-type: none"> • kein Wachstum in Bier • Vermehrung in Würze und während des 1. Stadiums der Angärphase; in Hefe bei ungünstiger Lagerung • Irreversible Vorschädigungen: Phenole, DMS, Acetoin, Proteinasen; evtl. Gärstörungen • Vertreter: z. B. <i>Pantoea agglomerans</i>, <i>Enterobacter cloacae</i>, <i>Serratia marcescens</i>, <i>Obesumbacterium proteus</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Candida kefyr</i>, <i>Pichia anomala</i>
<p>IV Indikatorkeime</p>	<ul style="list-style-type: none"> • keine Beeinträchtigung der mikrobiologischen Haltbarkeit • Auftreten bei mangelhaften Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen • Indikation schlechter hygienischer Zustände • leichter Nachweis, deshalb wichtig für die Betriebskontrolle • häufig Vergesellschaftung mit Bierschädlingen • Vertreter: z. B. Essigsäurebakterien (<i>Acetobacter pasteurianus</i>, <i>Gluconobacter frateurii</i>), <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Pantoea agglomerans</i>, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Debaryomyces hansenii</i>, Sacch.-Fremdhefen
<p>V Latenzkeime</p>	<ul style="list-style-type: none"> • zufälliger, sporadischer Auftritt, nur von kurzer Dauer • gelangen über verschiedene Produktionswege ins Bier • in der Natur weit verbreitet • keine Bedeutung im Bier, aber relativ robust → lange nachweisbar (unspezifische Kulturverfahren) • Vertreter: z. B. Bazillen, Mikrokokken, Schimmelpilze

1.2 Bakterien im Brauereibereich

Bier weist aufgrund seiner selektiven Eigenschaften (Hopfeninhaltsstoffe, tiefe pH-Werte, Alkohol, Anaerobiose aufgrund des CO₂-Gehalts bzw. geringer O₂-Anteil, Mangel an Wuchsstoffen nach Hefegärung), ähnlich wie Wein oder auch viele alkoholfreie Erfrischungsgetränke, einen sehr guten Eigenschutz vor mikrobiellem Verderb auf. Insbesondere pathogene Keime (z. B. Salmonellen oder Shigellen) überleben im Biermilieu nicht, wie eine gemeinsame unveröffentlichte Studie mit der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Freising-Weihenstephan, ergab und auch durch Menz *et al.* (2009) bestätigt wird. Lediglich acidophile oder acidotolerante und fakultativ anaerobe, mikroaerophile oder anaerobe Mikroorganismen können als Verderborganismen in Erscheinung treten. Die Anzahl der bierschädlichen Mikroorganismen beschränkt sich demnach auf einige wenige Gattungen und Arten. Dies sind zum einen übervergärende Hefen (z. B. *Saccharomyces*-Fremdhefen, *Dekkera/Brettanomyces*-Hefen) und zum anderen Bakterien. Hier spielen neben den gramnegativen Keimen *Pectinatus* spp., *Megasphaera* spp., *Selenomonas lactificex* und *Zymomonas mobilis* (nur in Saccharose haltigen Bieren) besonders Milchsäurebakterien (*Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp.) die Hauptrolle.

Statistische Erhebungen durch Koob *et al.* (2014) über Kontaminationsfälle in Praxisproben aus unterschiedlichen Bereichen der Brauereiumgebung zeigen die anteilmäßige Beteiligung der jeweiligen Bakterien in den Jahren 2012 und 2013 (Tab. 3). Wieder sind, wie schon vorher berichtet (Hutzler, 2011; Hutzler *et al.*, 2013), auch 2012 und 2013 von allen Mikroorganismen *L. brevis*-Stämme am häufigsten vertreten (ca. 45 % der Kontaminationsfälle). Leider geben die Daten in der Tabelle 3 keinen weiteren Aufschluss über den jeweils tatsächlich stattgefundenen Bierverderb.

Tab. 3: Absolute Werte und prozentuale Verteilung der einzelnen, in der Brauerei nachgewiesenen, Bakterienspezies und -gruppen in den Jahren 2012 und 2013 (aus: Koob *et al.*, 2014)

	2012		2013		2012 → 2013
	Summe	%	Summe	%	Veränderung
<i>Lactobacillus brevis</i>	58	42,0	44	44,9	+ 7 %
<i>Lactobacillus lindneri</i>	4	2,9	0	0,0	- 100 %
<i>Lactobacillus backi</i>	15	10,9	9	9,2	- 16 %
<i>Lactobacillus (para-)casei</i>	17	12,3	5	5,1	- 59 %
<i>Lactobacillus-Gruppe (pot. BS) *</i>	4	2,9	12	12,2	+ 321 %
<i>Lactobacillus (para-)collinoides</i>	5	3,6	1	1,0	- 72 %
<i>Lactobacillus (para-)buchneri</i>	1	0,7	15	15,3	>+ 1000 %
<i>Lactobacillus rossiae</i>	0	0,0	1	1,0	+ 100 %
<i>Lactobacillus perolens/harbinensis</i>	2	1,4	4	4,1	+ 193 %
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	2	1,4	0	0,0	- 100 %
<i>Pectinatus-Gruppe **</i>	11	8,0	0	0,0	- 100 %
<i>Pediococcus damnosus</i>	18	13,0	6	6,1	- 53 %
<i>Pediococcus inopinatus</i>	1	0,7	1	1,0	+ 43 %
<i>Pediococcus claussenii</i>	0	0,0	0	0,0	± 0 %
<i>Pediococcus-Gruppe (pot. BS) ***</i>	0	0,0	0	0,0	± 0 %
Summe	138	100,0	98	100,0	

(* = *Lb. (para-)plantarum*, *Lb. coryniformis*; ** = *P. frisingensis*, *P. cerevisiae*, *P. haikarae*;
*** = *Pd. pentosaceus*, *Pd. parvulus*, *Pd. acidilactici*; BS = Bierschädlinge)

Prinzipiell führen mikrobiologisch bedingte Bierfehler häufiger zu Kundenreklamationen als chemisch-physikalische Probleme oder technologische Fehler. Die Verbraucher neigen meist zu Überreaktionen, lassen sich ärztlich behandeln oder schalten im schlimmsten Fall Gesundheitsämter ein. Dadurch können solche Fälle nicht nur zu verschärften Kontrollen durch die Untersuchungsämter führen, sondern auch an die Presse gelangen und nachhaltige Imageverluste bewirken. Dies ist in jedem Fall verbunden mit entsprechenden wirtschaftlichen Folgen. Deshalb ist es für die Qualitätssicherung außerordentlich wichtig, mikrobiologische Kontaminanten schnell und sicher zu erkennen, sie zu klassifizieren und, vor allen Dingen, deren Schädlichkeitspotenzial richtig zu beurteilen. Die genaue Bestimmung des Verderbnis erregenden Mikroorganismus lässt häufig bereits Rückschlüsse darauf zu, in welchen Produktionsbereichen er zu suchen ist, d. h., ob die Kontaminationsquelle eher im Primärbereich oder im Sekundärbereich lokalisiert ist.

In der Brauerei nehmen Laktobazillen, neben ihrer Rolle als häufigste bierschädliche Gruppe (Tab. 3), auch als Nutz-(Kultur-)Organismen eine zentrale Bedeutung ein und werden gezielt als Starterkulturen eingesetzt. So sind z. B. bei der Herstellung der Berliner Weisse *L. brevis*, *L. casei* und *L. delbrueckii* beteiligt (Wackerbauer und Methner, 1988). Die weitaus bedeutendere Funktion kommt jedoch den Laktobazillen der biologischen Säuerung zu. Diese dem Reinheitsgebot konformen thermophilen Bakterien der Säuerung von Maische und Würze können meist homofermentativ Stärke fermentieren. Sie führen zu technologischen Verbesserungen und beeinflussen die Bierqualitäten positiv im Hinblick auf Produktstabilisierung (pH-Erniedrigung, Bacteriozine), ernährungsphysiologische Aspekte sowie Image und Sensorik (Back, 1988, 1994a, 2008; Lowe und Arendt, 2004; Vaughan *et al.*, 2005; Kern *et al.*, 2008). Diese positiven, durch Laktobazillen erzielten Effekte finden sich übrigens auch in vielen anderen Lebensmitteln, wie z. B. in probiotischen Produkten, Bäckereiprodukten, alkoholfreien Erfrischungsgetränken und Mayonnaisen, aber auch in Produkten anderer Branchen, wie z. B. in Kosmetika, wieder (Leroy und De Vuist, 2004; Reddy *et al.*, 2008).

Die möglichst vollständige Kenntnis der Merkmale und Taxonomie, sowohl der Starterkulturen (Ehrmann und Pavlovic, 2010a) als auch der bierschädlichen Milchsäurebakterien, ist als Grundvoraussetzung für effiziente praxistaugliche Nachweis- und Identifizierungsmethoden zu sehen. Sie ist darüber hinaus essentiell für die Garantie einer konstanten Produktqualität.

In den folgenden Abschnitten soll ein chronologischer Überblick über die Kenntnisse zu den Laktobazillen der biologischen Maische- und Würzesäuerung und zu schädlichen Laktobazillen in der Brauerei gegeben werden, angefangen bei Pasteur 1857 bis zum Jahr 2014.

1.2.1 Laktobazillen der biologischen Säuerung

Damals wie heute spielen die thermophilen Laktobazillen der biologischen Säuerung von Maische und Würze eine große Rolle in der Brauereipraxis (Narziß und Heiden, 1971; Narziß und Kieninger, 1973; Narziß *et al.*, 1989; Back, 1988, 1994a; Bohak und Back, 2008; Vriesekoop *et al.*, 2012).

Unter den thermophilen Bakterien sind diejenigen zu verstehen, welche oberhalb von 40 °C mit maximaler Rate wachsen können (Fuchs, 2007), im Gegensatz zu den schädlichen Milchsäurebakterien, die im Bereich zwischen 20 °C und 30 °C ihr Optimum haben und damit zu den mesophilen Bakterien zählen.

Die biologische Säuerung von Biermaischen und/oder Bierwürzen wird in der Praxis noch heute, unter Verwendung thermophiler Laktobazillen, technologisch ähnlich durchgeführt, wie es Joergensen 1909, allerdings für die Brennerei, beschrieb. Die zur Säuerung in der Brennerei eingesetzte Kulturmilchsäurebakterie war „*Bacillus Delbrücki*“ [Leichmann 1896]. Dieses Bakterium ist schon 1896 von Lafar und Leichmann fast gleichzeitig als Reinzucht erhalten worden. Lafar nannte ihn „*Bacillus acidificans longissimus*“, Leichmann „*Bacillus Delbrücki*“. Beide Bakterienarten wurden schließlich als eine Art erkannt (Henneberg, 1901 und 1905) und im weiteren „*Bacillus Delbrücki*“ genannt. Nach seiner Isolierung und Reinkultivierung wurde „*B. Delbrücki*“ seit 1896 gezielt als säuerndes Bakterium den Brennereimaischen zugesetzt, um das Wachstum schädlicher Bakterien auszuschließen (Maerker, 1898). Die Brauer hingegen hatten gegenüber dem Einsatz von Milchsäure Vorbehalte. Es war zwar bekannt, dass die Milchsäure der Maische im Verlauf der Gärung verschwindet. Ob sie aber auch zu Alkohol vergoren wird, war noch nicht klar (Utz, 1870). Man hatte auch festgestellt, dass der Säuregehalt bei längerem Verweilen des Maischgutes bei Temperaturen bis 40 °C stark zunahm. Dies war hauptsächlich deswegen gefürchtet, weil man der Milchsäure, vor allem in höherer Konzentration, einen negativen Einfluss auf die Diastase zuschrieb (o. V., 1880). „... Für die Praxis dürfte ein Hauptnachteil vermehrten Säuregehaltes der Maische in der dadurch bedingten Herabsetzung der vergärbaren Substanz liegen. ...“ (o. V., 1880, S. 639). Dies steht allerdings im Widerspruch zu den Angaben in einer Tabelle in einer Mitteilung der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München, nämlich dass bei mittleren Milchsäurekonzentrationen und hellen Malzen die Extrakt- und Maltoseausbeute erhöht waren und der gelöste Stickstoff sogar deutlich erhöht war (o. V., 1880). Prior beschrieb als einen Zweck des Maischprozesses: „... einen Theil der extrahirten gelösten Stoffe durch Enzyme (Glukase und Peptase) und Mikroorganismen (Säurebakterien) umzuwandeln. ...“ (Prior, 1896, S. 273). Er hatte auch erkannt, dass geringe Mengen Säure die Wirkung der Enzyme begünstigten, indem die unlöslichen Phosphate in primäre umgewandelt wurden, und dass die Säure in gewisser Menge die Haltbarkeit des Bieres erhöhte, da die nachträgliche Entwicklung

von Bakterien in Würze und Bier bis zu einem gewissen Grad gehemmt wurde (Prior, 1896). Es war bekannt, dass die Peptidasen ihre Optima im sauren Bereich bei einer Temperatur von 45 bis 50 °C haben. Prior nannte sie „Peptase“. Über ihre genaue Wirkung war man sich jedoch noch im Unklaren. Man nahm an, dass durch sie „... beim Maischprozeß Eiweißmoleküle abgebaut und hierdurch in Peptone und Amidverbindungen überführt werden. ...“ (Prior, 1896, S. 280).

Allgemein wurden die Milchsäurebakterien in der Brauerei weiterhin als schädlich eingestuft und Maischesäuerung fand nur zufällig, keinesfalls aber gezielt, statt. Sämtliche Autoren der damaligen Zeit bezogen ihre Arbeiten über den *Lactobacillus delbrueckii*, der unter dem Namen „*Bacillus Delbrücki*“ bekannt war, nur auf die Brennerei und die Presshefefabrikation. Erst Windisch, der sich ab 1910 mit dem Problem der Azidität von Brauwässern, in Verbindung mit der damals konstatierten Abnahme der Azidität von hellen Malzen, beschäftigte, erkannte in der Verwendung von Milchsäurebakterien ein Mittel zur Erhöhung und Regulierung des Säuregehaltes der Würze (Windisch und Klein, 1913). Um nähere Auskünfte über den Einfluss der Säuerung auf die Zusammensetzung der Würze, auf den in der Brennerei noch nicht näher eingegangen worden war, zu erhalten, stellte er mehrere Versuchsreihen auf. Deren Ergebnisse waren: Die Verzuckerung wurde nur relativ unbedeutend beeinflusst, die Ausbeute stieg um bis zu zwei Prozentpunkte, die Stickstofflösung stieg ebenfalls, je nach Länge der Säuerung, deutlich an, der Endvergärungsgrad blieb bei mäßiger Säuerung unverändert. Diese positiven Effekte waren nur bei Säuerung vor der Verzuckerung festzustellen. Windisch schloss aus seinen Versuchen, dass sich der „*Bacillus Delbrücki*“ in der Brauerei zur Maischesäuerung sehr gut verwenden ließe. Als Mengenangabe gibt er „... einen Liter Sauergut auf den Zentner Malz ...“ (Windisch und Klein, 1913, S. 504) an. Er erwähnte auch noch die Problemlosigkeit der Weiterzüchtung der Bakterien und veröffentlichte diese Ergebnisse 1913 (Windisch und Klein, 1913). Später im gleichen Jahr beschäftigte er sich in einem weiteren Artikel mit der geschmacklichen Problematik. Er betrachtete vier weitere Möglichkeiten, den Säuregehalt des Brauwassers zu heben (Das Wasser zu kochen, um die Karbonate auszuscheiden; Zusatz von Kalk oder Gips zum Brauwasser; die Neutralisation der Karbonate durch Mineralsäuren). Die vier Möglichkeiten waren entweder zu zeitraubend und kostenintensiv, nicht ausreichend oder gesetzlich nicht gestattet, wie z. B. die Neutralisation der Karbonate. Bei diesem Verfahren sah Windisch zwar deutliche Verbesserungen im Verlauf der Bier-

bereitung, aber geschmacklich ließen die Biere zu wünschen übrig. Er führte dies auf den erhöhten Gehalt an „mineralsauren Salzen“ zurück (Windisch, 1913). Da der Gesetzgeber dem direkten Einsatz von technischer Milchsäure auch damals schon einen Riegel vorschob, war die Erzeugung der Milchsäure auf bakteriologischem Weg die logische Konsequenz seiner Versuche. Auch lag die Verwendung von „*Bacillus Delbrücki*“ nahe, welcher sich in der Brennerei ja schon zu diesem Zweck durchgesetzt hatte und in Reinzuchten angewandt wurde. Für die Brauerei schien er ihm auch deswegen sehr geeignet, weil er ein starker Säurebildner ist und auch noch bei Temperaturen arbeitet, bei denen die übrigen Malzbakterien absterben, und weil die gesäuerten Maischen von großer geschmacklicher Reinheit waren. Als Ergebnis der praxisbezogenen Versuche legte er dar, dass „... man nach dem Säuerungsverfahren arbeiten kann, ohne große Änderungen in der üblichen Arbeitsweise und den Einrichtungen zu treffen und daß, was die Hauptsache ist, bezüglich des Endproduktes Ergebnisse erzielt werden, die das Interesse unserer Praxis entschieden in Anspruch nehmen müssen. ...“ (Windisch, 1913, S. 524).

1920 veröffentlichte Lüers, verzögert durch den 1. Weltkrieg, die Ergebnisse seiner 1913 angestellten praktischen Studien. Er bestätigte hierin die Ergebnisse von Windisch, insbesondere die Mehrlösung von Eiweiß, legte aber Wert auf möglichst eiweißarme Würzen und Biere. Er stellte also Versuche an, die hauptsächlich die Würzesäuerung zum Inhalt hatten, im Gegensatz zu Windisch, der sein Hauptaugenmerk auf die Maischesäuerung gelegt hatte. Zuerst beschrieb er die technische Einrichtung. Sie bestand aus zwei gut isolierten Bottichen im Sudhaus von jeweils 12 hl Inhalt, versehen mit einer Dampfschlange und einem Thermometer. In dem einen Bottich versetzte er 8 hl Vorderwürze bei 50 °C mit einer Reinkultur von „*Bacillus Delbrücki*“ zur Säuerung. Weitergeführt wurde die Säuerung, indem er 30–50 l Sauergut im Bottich ließ und dazu frische Vorderwürze gab. Der zweite Bottich diente nur als Reserve. Also entstand eine kontinuierliche Kultur. Mit der Würzesäuerung bezweckte er eine möglichst vollständige Ausscheidung des koagulierbaren Eiweißes, um nachträglichen Trübungen vorzubeugen. Er stellte pH-Verhältnisse fest, die den heutigen durchaus vergleichbar waren. Außerdem kam er zu dem Schluss, dass die mit Würzesäuerung hergestellten Biere denen geschmacklich weit überlegen waren, die ohne Säuerung hergestellt worden waren. Am Schluss seines Artikels nannte er aber zwei Gründe, die gegen das Verfahren sprechen: „... Einmal ist es von der Steuerbehörde verboten worden, ... und zum anderen ist es mit

namhaften Kosten verbunden. Bedenkt man, daß zur Säuerung von etwa 200 hl 12 proz. Würze 8 hl Vorderwürze nötig sind, von denen etwa 5 bis 6 % Extrakt bei Bildung der Milchsäure verbraucht werden, so kann man sich daraus die jährlichen Kosten leicht berechnen. ... “ (Lüers, 1920, S. 61) Außerdem war mittlerweile die billigere Wasserenthärtung mit Kalk gestattet und wegen des gerade beendeten Krieges waren die Rohstoffe teuer (Lüers, 1920). Schnegg (1922) berichtete über verschiedene Milchsäurestäbchen in natürlich gesäuerten Biermaischen und vermutete, dass ihr Eintrag in die Maischen über Gersten- und Malzstaub erfolgte. Als wichtigste Arten nannte er den „*Bacillus Delbrücki*“ und den „*Bacillus lactis acidii*“, welche sehr lange Zellen ausbildeten. Daneben war auch der kurzellige „*Bacillus acidii lactii*“ anzutreffen, welcher jedoch im Gegensatz zu den Langstäbchen nur schwach säuerte. Außerdem war festzustellen, dass sich die Milchsäurebakterien der Maische in Bierwürze „... wenigstens in der gewöhnlichen gehopften Würze ...“ nur schlecht vermehrten, jedoch in ungehopfter Würze besser gediehen (Schnegg, 1922, S. 411). 1925 publizierte Poulsen seinen 1924 in Kopenhagen gehaltenen Vortrag „Über die Säuerung der Maische“, in dem er zu den gleichen Ergebnissen wie die beiden vorgenannten Autoren kam. Bei karbonatreichen Wässern verbesserte die biologische Säuerung Geschmack, Farbe und Viskosität. Er erwähnte auch, dass das Verfahren in den Carlsberger Brauereien seit 1912 dauerhaft mit großem Erfolg angewandt wurde. Er ging ebenso auf die Übertragbarkeit dieses Verfahrens in andere Brauereien ein und kam zu dem Schluss, dass es überall da, wo helles Bier aus karbonatreichen Wässern hergestellt werden soll, kein einfacheres und billigeres Verfahren gäbe (Poulsen, 1925).

1935 beleuchtete Schütza die theoretischen Hintergründe der biologischen Säuerung, um sie auch in damit unerfahrenen Betrieben einführen zu können, und berichtete hierin, dass die biologische Säuerung in den Brauereien Deutschlands ein bekannter Begriff geworden sei. Im selben Jahr berichteten auch Kolbach und Mitarbeiter von ihren Versuchen, die auf die Unterschiede zwischen Maischesäuerung, Würzesäuerung und gemeinsame Anwendung beider Säuerungen eingingen (Kolbach *et al.*, 1935). In Hennebergs „Handbuch der Gärungs-bakteriologie“ (1926), sowie Lindners „Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben“ (1930) ist davon allerdings noch nichts erwähnt, obwohl diese Werke als Standardliteratur des damaligen Fachmannes gelten müssen. Allerdings beschrieb Henneberg (1926) für Hefemaischen und Brennerei-

maischen sehr ausführlich das Verhalten des „Milchsäurepilzes“ „*Bacillus Delbrückii*“ gegenüber Temperaturen und erkannte dessen Adaptationsfähigkeit an Säure. Joergensen erwähnte schließlich in „Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie“ (1940) nützliche Milchsäurebakterien in der Brauerei und den „*Bacillus Delbrückii*“. Ab diesem Zeitpunkt wird über die Keime der biologischen Säuerung in der Brauereiliteratur nur noch sporadisch berichtet.

Erst ab Anfang der 60er Jahre wird das Thema wieder verstärkt aufgegriffen. So berichtet z. B. Vaitl über „*L. delbrückii*“: „ ... Die Anreicherung erfolgt in ungehopfter Würze bei ca. 47 °C. Das eigentliche Temperaturoptimum liegt etwas darunter, doch wählt man die höhere Temperatur, um das Wachstum fremder Organismen, vor allem von Buttersäurebakterien, auszuschalten. ... “ (Vaitl, 1961, S. 285). Ault lokalisierte „*L. delbrückii*“ in Biermaischen. Er betonte seine Hopfenempfindlichkeit, sein unglaublich schnelles Säuerungsvermögen und seine Temperaturtoleranz bis 54 °C (Ault, 1965). Eschenbecher fand in *L. delbrueckii* Betriebskulturen immer Mischungen mit anderen, teils bierschädlichen, Bakterien. Tatsächlich konnte er aus keiner der untersuchten Kulturen *L. delbrueckii* isolieren, sondern er fand stattdessen *L. casei*. Er mahnt deshalb „ ... zur besonderen Vorsicht bei der Auswahl der Säuerung dienenden *delbrueckii*-Stämme, sowie bei der Temperaturwahl und der biologischen Sammlungskultur Überwachung. Denn einmal kann es nicht gleichgültig sein, mit welchen Stoffwechselprodukten die Würze und dadurch möglicherweise das Bier infolge der Verwendung ungeeigneter Bakterienarten belastet ist. ... “ (Eschenbecher, 1969, S. 15). Eher als Infektionskeim denn als nutzbringend, wird *L. delbrueckii* von McMurrough und Palmer betrachtet, die ihn zusammen mit *Bacillus coagulans* in der Guinness Brauerei in Dublin als säuerndes Bakterium aus „süßer“ Würze (Vorderwürze; Anm. d. Verf.) isolierten. Allerdings stuften sie die Schädlichkeit des *Lactobacillus* aufgrund seiner Hopfenempfindlichkeit, zu der sie eine Reihe von Versuchen durchführten, als gering ein (McMurrough und Palmer, 1978).

Als für die biologische Säuerung am besten geeignete Art nennt Back zunächst *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*. Allerdings ergab seine Untersuchung zahlreicher „*Delbrueckii*-Kulturstämme“, dass es sich noch um andere Arten oder um Mischkulturen handelte. Am häufigsten fand er hier *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Weiss et al., 1983 [*L. leichmannii*]), *L. casei* subsp. *rhamnosus*, *L. fermentum*,

L. amylovorus und gelegentlich auch *L. helveticus* (Back, 1988). Im Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie wird *L. amylovorus* als am häufigsten vorkommende Art genannt. *L. fermentum* und *L. delbrueckii* finden sich eher seltener (Back, 1994a). Nummer (1996) gibt als häufigste *Lactobacillus*-Arten der biologischen Säuerung ebenfalls *L. delbrueckii* und *L. amylovorus* an, und Bokulich und Bamforth (2013) nennen *L. delbrueckii*, *L. fermentum* und *L. buchneri* als häufigste Arten in gesäuerten Biermaischen.

Physiologisch-biochemische und darauf folgende genotypische Untersuchungen einer Auswahl von Starterkulturen aus verschiedensten Brauereien zeigten schließlich, dass fast 80 % alle Stämme nicht mit den genannten Arten übereinstimmen, und führten zur Neubeschreibung von *L. amylolyticus* (Bohak *et al.*, 1998), einer in hohem Grade stärkeverwertende Art und damit prädestiniert für die industrielle Sauergutherstellung.

Mittlerweile wurde *L. amylolyticus* auch in anderen Habitaten detektiert. So wurde er z. B. in Schnapsbrennereien in Weizenschlempen mittels Gensonden neben *L. pontis* als am häufigsten anzutreffender fermentierender Mikroorganismus nachgewiesen. Eine Überprüfung auf probiotische Eigenschaften (zur Verwendung bei Schweinemasten) blieb negativ (Pedersen *et al.*, 2004). Des Weiteren erfolgte der Nachweis von *L. amylolyticus* als dominierende Spezies neben drei weiteren Arten, mittels REP-PCR, auch in französischen Sauerteigen. Im Besonderen wird auch hier die Fähigkeit der Stärkeverwertung vermerkt, die *L. amylolyticus* einen ökologischen Wettbewerbsvorteil gegenüber anderen Laktobazillen verschaffen könnte (Vera *et al.*, 2012).

1.2.2 Laktobazillen mit bierschädlichem Charakter

Milchsäurestäbchen stellen die gefährlichste Gruppe von Kontaminanten in der Brauerei dar. Sie sind mikroaerophil oder fakultativ anaerob, weshalb eine Kontamination während des gesamten Produktionsweges auftreten kann. Sie trüben das Bier, bilden teilweise unerwünschte Stoffwechselprodukte und führen durch die Bildung von Milchsäure zum sogenannten Umschlagen, welches bereits im Jahr 1857 von Pasteur in „Mémoire sur la fermentation appelée lactique“ behandelt wurde. Hierin bezeichnete er die gefundenen Bakterien als „Milchsäure-Hefe“. 1878

(„Études sur la bière“) veröffentlichte er dann die ersten Zeichnungen der stäbchenförmigen Bakterien (Joergensen, 1909).

Die erste Reinzucht eines *Lactobacillus*-Stammes gelang Henry van Laer 1892 aus belgischem obergäurigem Bier. Er nannte ihn „*Saccharobacillus pastorianus*“ (van Laer, 1892). Dieser Name wurde von den ihm folgenden Wissenschaftlern übernommen. Henneberg untersuchte diesen Organismus ab 1901 eingehender, nannte ihn „*S. pastorianus* [van Laer]“ und glaubte im Berliner Weißbier eine Variation gefunden zu haben, die er „*S. pastorianus* var. *berolinensis*“ nannte, welche im Weißbier erwünscht sei. Sie sei u. a. für den charakteristischen säuerlichen Geschmack verantwortlich. Aus belgischem Bier isolierte er auch Kulturen, die sich morphologisch von dem ersten unterschieden. Sie bestanden nur aus Kurzstäbchen. Er nannte sie „*S. pastorianus* var. α “. Die erstere der beiden Bakterien und deren kleinere Form sind laut Henneberg dem Hopfen gegenüber recht unempfindlich, die zweite entwickelte sich z. B. in stark gehopftem Bier gar nicht (Henneberg, 1901). Diese und weitere Untersuchungen in seiner 1903 veröffentlichten, ausführlicheren Arbeit über die Milchsäurebakterien ließen Henneberg annehmen, es mit zwei wirklich verschiedenen Subspezies zu tun zu haben (Henneberg, 1903).

Schönfeld und Rommel (1902) beschrieben einen im (gehopften) Lagerbier vorkommenden „*Bacillus fasciformis*“. Dieser ist laut Henneberg wiederum eine Varietät des Bazillus des Berliner Weißbieres: „*S. pastorianus* var. *berolinensis fasciformis*“. Er erwähnte aber auch, dass Stämme existieren, die gegen Hopfen empfindlich seien (Henneberg, 1909). Diese Erwähnung deutet darauf hin, es generell mit nur einer Spezies zu tun zu haben, die in verschiedenen Stämmen auftritt und je nach Kulturmedium unterschiedliche Gestalt besitzt. Die Unterscheidung fand damals ja hauptsächlich nach morphologischen und physiologischen Gesichtspunkten statt. So ist laut Rogosa und Hansen (1971) auch „*Betabacterium breve*“ [Orla-Jensen 1916], welches nach Henneberg (1926) in Sauerteig und altem Käse vorkommt, mit den oben genannten Bakterien identisch. Die von van Laer 1892 als „*Saccharobacillus pastorianus*“ beschriebene und laut Bergey *et al.* (1923) in „*Lactobacillus pastorianus*“ umbenannte Art galt lange als die fast ausschließlich vorkommende bierverderbende Stäbchenform. Dies wurde so auch von Shimwell angenommen. Jedoch vertrat dieser gleichzeitig die Meinung, dass auch andere Milchsäurebakterien im Bier wachsen könnten, welche noch zu klassifizieren wären (Shimwell,

1948). Eine Bestätigung dieser Annahme erfolgte durch den Nachweis von *L. malefermentans* und „*L. parvus*“ (Russell und Walker, 1953a und 1953b), „*L. frigidus*“ (Bhandari und Walker, 1953), und später dann *L. brevis* (Moore und Rainbow, 1955). „*L. frigidus*“, ein Isolat aus Hefe, zeigte optimales Wachstum bei 22 bis 23 °C, erwies sich jedoch als sehr hopfenempfindlich. Bhandari und Walker (1953) konstatierten, dass van Laers „*L. pastorianus*“ „*L. frigidus*“ am nächsten käme. „*L. pastorianus*“ besitze jedoch ein deutlich höheres Temperaturoptimum und fermentiere andere Zucker. Bhandari gibt 1954 einen guten Überblick über die bis zu diesem Zeitpunkt als Kontaminanten in Würze, Bier und Hefe aufgefundenen Laktobazillen: Die Arten *L. delbrueckii*, „*L. leichmannii*“, „*L. pastorianus*“ (und Varietäten von diesem [ebenda, S. 29]), „*L. bifidus*“, *L. buchneri*, „*L. parvus*“, *L. malefermentans*, „*L. frigidus*“ und *L. plantarum* wurden als bierschädlich eingestuft, wobei „*L. leichmannii*“ und *L. plantarum* auch in Würze wuchsen. Außerdem wurde vermerkt, dass „*L. brassicae fermentatae*“, *L. helveticus*, *L. casei* und „*L. pentoaceticus*“ sich an ungehopftes Bier gewöhnen ließen (Bhandari *et al.*, 1954).

Viele der oben genannten Bakterien wurden später schließlich von Rogosa und Hansen (1971) in ihrer „Nomenclatural Considerations of Certain Species of *Lactobacillus* Beijerinck“ *L. brevis* zugeordnet.

Ob „*L. pastorianus*“ überhaupt als Bierschädling einzustufen ist, wurde durch Arbeiten von Carriere (1959) angezweifelt, der feststellte, dass alle von ihm untersuchten Stämme zu zwei Drittel *L. brevis* und der Rest *L. plantarum* zuzuordnen waren. Dies wurde auch durch Rogosa und Sharpe (1959) bestätigt, die „*L. pastorianus*“ niemals nachweisen konnten, jedoch *L. brevis* und gelegentlich *L. buchneri* fanden.

Eschenbecher berichtet 1966: „ ... Als Ergebnis der kritischen jüngsten Entwicklung ist festzustellen, daß die Biermilchsäurestäbchen im wesentlichen denselben *Lactobacillus*-Arten angehören wie die Weinschädlinge: *L. brevis* (dominierend), *L. buchneri* und *L. plantarum* (ebenfalls häufig). ... “ (Eschenbecher, 1966, S. 244).

Zusammenfassend kam Eschenbecher 1968 und 1969 zu folgenden Schlüssen:

- 1) „*L. pastorianus*“ soll nicht länger als existent betrachtet werden, da diese Art aus keiner einzigen Bierprobe isoliert werden konnte.
- 2) Die bierschädlichen Milchsäurestäbchen gehören folgenden Arten an:
 - *L. casei* (42,7 % der untersuchten Mikroorganismen) mit den Subspezies *casei* und „*fusiformis*“
 - *L. coryniformis* (9,1 %) mit den Subspezies *coryniformis* und *torquens*
 - *L. plantarum* (0,9 %)
 - *L. buchneri* (7,3 %)
 - *L. brevis* (37,9 %)
 - „*L. brevis* var. *lindneri*“ (2,1 %).

Interessant ist ein Blick auf den Stand der Forschung über die bierschädliche Flora in Großbritannien bis zur Mitte der 60er Jahre. In seinem Review bemängelt Ault, dass die letzten 10 bis 15 Jahre kaum ein Fortschritt bei der Kenntnis der Bierschädlinge zu vermerken sei, und stellt fest: „ ... It would be a very great mistake to assume, however, because little further work is apparently being carried out on spoilage bacteria, that they no longer present any problems. ... “ (Ault, 1965, S. 377). Nach Ault handelt es sich bei den Hauptverderborganismen in englischen Bieren um „*L. pastorianus*“ [van Laer] und dessen Varietät „*L. pastorianus* var. *braunii*“, eine schleimbildende „Mutante“. Beide treten bereits in der Anstellhefe und im Lagerkellerbier auf. Außerdem wird von einem hopfen- und alkoholtoleranten „*L. diastaticus*“ berichtet, der sich nur in seiner Fähigkeit der Stärkeverwertung von „*L. pastorianus*“ unterscheidet. Schließlich finden noch zwei nicht näher identifizierte homofermentative *Lactobacillus*-Stämme sowie ein Diacetyl bildender Laktobazillen-Stamm Erwähnung. (Ault, 1965)

Neuere Untersuchungen zu van Laers Stamm „*Lactobacillus pastorianus*“, der als *Lactobacillus* sp. DSM 20197, *L. brevis* ATCC 8291, „*L. pastorianus*“ CECT5926, *L. brevis* JCM 1113 und „*L. pastorianus*“ LMG 11990 hinterlegt ist, belegen, dass dieser Stamm *Lactobacillus paracollinoides* entspricht (Ehrmann und Vogel, 2005).

Lactobacillus casei war bis in die 30er Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts noch nicht als Bierschädling identifiziert worden. Entdeckt wurde er, wie viele Milchsäurebakterien, von Orla-Jensen 1916. Er nannte ihn „*Bacterium casei* α “, reihte ihn 1919 unter die Gattung „*Streptobacterium*“ ein und nannte ihn von da ab „*Streptobacterium*

casei (LPSN, abgerufen Dez. 2014). Sein Fundort war Käse und Kefir (Henneberg, 1926). Ähnlich verhält es sich bei *L. plantarum*. Orla-Jensen nannte ihn 1919 „*Streptobacterium plantarum*“ (LPSN, abgerufen 12/2014), sein Fundort war Milch und Sauerkohl (Henneberg, 1926). *L. plantarum* wurde von Shimwell 1948 als Bierbakterium aus Würze oder Maische erkannt, aber nicht als bierschädlich angesehen. Die Erstnennung von *Lactobacillus coryniformis* erfolgte im Jahr 1965 (Abo-Elnaga und Kandler). Die von Eschenbecher 1969 als „*L. casei* ssp. *fusiformis*“ bezeichnete Art findet übrigens keinerlei Erwähnung mehr in der weiteren Literatur.

Die erstmalige Beschreibung von *Lactobacillus lindneri* erfolgte durch Henneberg 1901 als „*Bacillus lindneri*“. Diese Art wurde aus hellem Lagerbier isoliert, wo sie Trübungen hervorrief und das Umschlagen bewirkte. Auch im Berliner Weißbier wurde sie, vergesellschaftet mit „*Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis*“, gefunden. „*Bacillus lindneri*“ wurde hier aber nicht als Schädling betrachtet (Henneberg, 1901). Lindner beschrieb das Temperaturoptimum (21 °C) und das Temperaturmaximum (35 °C) (Lindner, 1905, 1909). *L. lindneri* kann in den unterschiedlichsten Formen auftreten, was auch Henneberg schon 1926 vermerkte. In Hefeextraktlösungen fand er z. B. fast runde, kokkoide Formen, in Bier hingegen langgestreckte Zellen oder Zellfäden. Henneberg nannte *Lactobacillus lindneri* allerdings „*Bacterium lindneri*“ (Henneberg, 1926). Gute Übereinstimmung besteht zu den von Eschenbecher unter dem Namen „*Lactobacillus brevis* var. *lindneri*“ (Eschenbecher, 1968) beschriebenen bierschädlichen Isolat. Kulturen aus Sauerteig, die von Spicher als *L. lindneri* bezeichnet wurden (Spicher *et al.*, 1978), sind „*L. sanfrancisco*“ zuzuordnen (Weiss *et al.*, 1984), der zu *L. sanfranciscensis* korrigiert wurde (Trüper *et al.*, 1997). Auch Schillinger (1985) erkannte *L. lindneri* als eigenständige Art und beschrieb ihn sowohl aufgrund seiner physiologisch-biochemischer Merkmale als auch mit DNS-DNS-Hybridisierungsstudien, als eine in sich homogene Gruppe von Bierisolaten. Die valide Beschreibung von *L. lindneri* als Revival erfolgte durch Back *et al.* (1996) und stellt einen Teil dieser Arbeit dar.

Eine weitere obligat bierschädliche Art wird von Back „*L. brevisimilis*“ genannt (Back, 1987), wobei aber keine Validierung erfolgte. Diese Art ist aufgrund hoher Nährstoffansprüche nur schwer kultivierbar und wächst langsam (Back, 1987). In der DSMZ ist sie unter der Nr. 6265 als *Lactobacillus* sp. L215 hinterlegt. Eine Wiederbelebung von *L. malefermentans* (Russell und Walker, 1953a), mit gleichzeitiger Zuordnung

von „*L. parvus*“ (Russell und Walker, 1953b) zu *L. malefermentans*, erfolgte durch Farrow *et al.* (1988). In derselben Veröffentlichung beschreiben diese Autoren auch die neue Art *L. parabuchneri*, der sie nunmehr auch „*L. frigidus*“ (Bhandari und Walker, 1953) zuordneten. *L. malefermentans* hat in der Brauerei nur eine untergeordnete Bedeutung (Hutzler *et al.*, 2013) und es lassen sich auch keine neueren Berichte über sein Vorkommen im Bier finden.

Laut Back sind bis 1994 nur insgesamt sieben *Lactobacillus*-Arten als Bierschädlinge relevant: *L. brevis* als häufigster Bierverderber, „*L. brevisimilis*“, „*L. frigidus*“, *L. lindneri*, *L. casei*, *L. coryniformis* und *L. plantarum*, wobei letztere drei Arten als potentiell bierschädlich gelten (Back, 1994a). Damit wird *L. curvatus*, der von Back 1981 noch als Bierschädling eingestuft wurde, nicht mehr als solcher berücksichtigt. Backs „*L. frigidus*“ steht in keinem direkten Bezug zu dem 1953 durch Bhandari *et al.* beschriebenen „*L. frigidus*“. Nach Back ist „*L. frigidus*“ obligat heterofermentativ und unterscheidet sich von *L. brevis* insbesondere durch Kapselbildung (Schleimbildung) und positiver Melezitose-Vergärung (Back, 1994a). „*L. frigidus*“ findet sich wieder als Synonym für *L. parabuchneri* (Farrow *et al.*, 1998) mit der DSM Nr. 5707^T, wird aber auch in der Historie von *L. brevis* DSM Nr. 6235 als von Back hinterlegter „*L. frigidus*“-Stamm D13 aufgeführt. Die aus dem Brauereiumfeld isolierte und schwer kultivierbare Art *L. paracollinoides* wird im Gegensatz zu *L. collinoides* von Suzuki als obligat bierschädlich gewertet (Suzuki *et al.*, 2004a und b) und ergänzt damit die Liste der bierverderbenden Laktobazillen. Des Weiteren wurde auch die aus Sauerteig isolierte und von Corsetti *et al.* (2005) als „*L. rossii*“, dann im gleichen Jahr korrigiert zu *L. rossiae*, beschriebene Laktobazillen-Art in Weißbieren als schleimbildender Schadorganismus detektiert. Diese Spezies ist dem „*Bacillus viscosus I* und *II*“ [van Laer] nicht unähnlich, welcher schwach gehopfte, obergärige belgische Biere „Langwerden“ ließ (Lindner, 1930). Aus chinesischen Bieren wurden erstmals von Qian Stämme von *L. acetotolerans* mit bierschädlichem Charakter isoliert (Qian, 2009) und später von Deng *et al.* (2014) als solche bestätigt. Hutzler findet *L. acetotolerans* auch in deutschem, normalem und alkoholfreiem Weizenbier als potentiellen, langsam wachsenden Bierschädling (Hutzler, 2011). *L. paucivorans* wurde von Ehrmann *et al.* im Lagerkellerbier gefunden. Sie stuften dessen Bierschädlichkeit als ziemlich schwach ein (Ehrmann *et al.*, 2010b). Im Gegensatz dazu befindet Hutzler *L. paucivorans* als obligat bierschädlich (Hutzler *et al.*, 2013). Zu den bierschädlichen Laktobazillen zählen außerdem die im Rahmen dieser Dissertation

neu beschriebenen Arten *L. perolens* (Back *et al.*, 1999) und *L. backii* (Bohak *et al.*, 2006; Tohno *et al.*, 2013). Ersterer wurde zuerst als obligater Verderborganismus in alkoholfreien Getränken entdeckt und dann als potentieller Bierschädling in Weißbieren wiedergefunden. Die Erstbeschreibung von *L. backii* erfolgte durch die Promovendin als „*L. backi*“ (Bohak *et al.*, 2006), der später unter Namenskorrektur als *L. backii* validiert wurde (Tohno *et al.*, 2013). *L. backii* wächst als obligater Bierschädling ohne längere Adaptationsphase auch in stark gehopften Bieren. Schließlich wird noch vom Auffinden von *L. parabrevis* (Vancanneyt *et al.*, 2006) in einer untergärigen Lagertankprobe sowie einer abgefüllten Flasche berichtet. *L. parabrevis* verursachte hier leichte Trübungen (Hutzler, 2014). Nähere Angaben zum Schädlichkeitspotenzial dieser Art werden jedoch nicht getroffen.

Die aktuell als bierschädlich bekannten *Lactobacillus*-Arten, unter Angaben ihres Bierschädlichkeitspotenzials bei Berücksichtigung der Hopfen- und Alkoholtoleranz, sowie die Einstufung als Primär- oder Sekundärkontamination sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Aktuelle Übersicht über bierschädliche Laktobazillen und ihre Eigenschaften (Ausschnitt aus: Hutzler *et al.*, 2013). Die durch die Promovendin beschriebenen Arten sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Bakterien	Stäbchen/ Kokken	gram	Katalase	Potenzial Bier- schädlich- keit	Hopfen- toleranz	Ethanol- toleranz	Wachstum bei pH = 4.3	Primär-/ Sekundär- kontamina- tion	Schleimbil- dungspoten- zial (Brau- ereisolate)
<i>L. acetotolerans</i>	S	+	–	+	+/-	+	+	s>p	–
<i>L. backi</i> ★	S	+	–	++	++	++	+	p>s	–
<i>L. brevis</i>	S	+	–	++	++	++	+	s>p	+
<i>L. (para-)buchneri</i>	S	+	–	+	+	+	+	p>s	+
<i>L. (para-)casei</i>	S	+	–	+	+/-	+	+	s>p	–
<i>L. coryniformis</i>	S	+	–	+	+/-	+	+	s>p	–
<i>L. (para-)collinoides</i>	S	+	–	++	++	++	+	s>p	–
<i>L. lindneri</i> ★	S	+	–	++	++	++	+	p>s	–
<i>L. perolens</i> ★	S	+	–	+	+/-	+	+	s>p	–
<i>L. paucivorans</i>	S	+	–	++	++	++	+	p	–
<i>L. plantarum</i>	S	+	–	+	+/-	+	+	s>p	–
<i>L. rossiae</i>	S	+	–	+	+/-	+	+	s>p	+

Abkürzungserklärungen zur Tabelle 4:

++ = sehr hoch/stark, + = stark/hoch oder positiv, +/- = positive Tendenz oder die überwiegende Anzahl der Stämme oder Adaptation erforderlich, v = variabel, -/+ = negative Tendenz oder wenige Stämme oder starke Adaptation erforderlich, – = negativ oder kein Wachstum, p = Primärkontamination, s = Sekundärkontamination, s>p = mehr Fälle als Sekundärkontamination beobachtet, p>s = mehr Fälle als Primärkontamination beobachtet

1.3 Nachweis- und Identifizierungsmethoden in der Brauerei

Nachweismethoden für Mikroorganismen müssen je nach Anwendungsbereich verschiedenen Anforderungen gerecht werden. Dazu gehört neben der Überwachung der Reinheit und des Wachstums von Produktionsstämmen (Nutz-/Kulturstämmen) auch eine gezielte Detektion und Identifizierung unerwünschter Mikroorganismen. Dies stellt eine besondere Herausforderung dar, da zum einen meist zunächst nur eine Spurenverkeimung vorhanden ist, und zum anderen bierschädliche Mikroorganismen im hefehaltigen Bereich mit Kulturhefen in direkter Konkurrenz um Nährstoffe und Suppline stehen. Für die Qualitätssicherung im Getränkebetrieb ist es zunächst wichtig, dass Aussagen über die mikrobielle Belastung der Rohstoffe und des Produktes während der einzelnen Prozessschritte sicher getroffen werden können, da hier im Befundfall vor der Abfüllung auf Flaschen oder Kegs noch relativ leicht Einfluss auf das Produkt genommen werden kann. Der Zeitfaktor spielt in diesen Stadien der Produktion keine große Rolle und die Nachweismethoden basieren im Allgemeinen auf qualitativen Anreicherungen. Ab dem Prozess der Bierfiltration oder Zentrifugation, über die Zwischenlagerung in Drucktanks, bis hin zur Getränkeabfüllung muss allerdings ein Nachweis im Spurenbereich und eine Keimidentifizierung sehr rasch erfolgen, da vor der Getränkeauslieferung kaum mehr Zeit für effektives Agieren bleibt. Deshalb ist hier der Einsatz von Schnellnachweismethoden sinnvoll, ebenso wie hier eine Quantifizierung der vorhandenen Keime für die Einschätzung der Dauer der Produktstabilität hilfreich sein kann.

Neben der Produktkontrolle spielt unter dem Aspekt von Sekundärkontaminationen, die meist von Biofilmen ausgehen (Back, 1994b), die Kontrolle der Betriebshygiene, insbesondere im Abfüllbereich, eine große Rolle und gehört ebenso wie erstere im Rahmen von HACCP-Konzepten zu den Sorgfaltspflichten jedes Getränkebetriebes. Biofilme stellen im natürlichen Milieu die bei weitem wichtigste Lebensweise vieler Mikroorganismen dar. Durch die oft enge räumliche Nähe bestimmter Bakterien können sich Gemeinschaften entwickeln, die in komplexer Weise kooperieren und interagieren (Szewzyk und Szewzyk, 2003). Ein Beispiel für die Interaktion von Bakterien in Biofilmen ist die Entwicklung der streng anaeroben Bierschädlinge *Pectinatus* und *Megasphaera* in Schmutznischen im Abfüllbereich von Brauereien (Back, 1994b und 1994c; Mamvura *et al.*, 2011; Beckmann, 2012). Die in Biofilmen

vorliegenden Mikroorganismen bilden Mikrokonsortien und geben sich gegenseitig Schutz vor ungünstigen Umweltbedingungen. Sie sind dadurch um ein Vielfaches schwieriger abzutöten als planktonisch vorliegende Keime (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Daher gilt der Überwachung bez. der Entstehung und der Bekämpfung von Biofilmen im Betrieb besondere Aufmerksamkeit (Back *et al.*; 1998a und 1999a; O'Rouke, 2000; Storgårds, 2000; Back, 2003; Storgårds und Priha, 2009; Bohak *et al.*, 2011a; Bohak und Back, 2011b; Schropp *et al.*, 2013; Mortensen, 2014; Schnick *et al.*, 2014). In diesem sekundärkontaminationsgefährdeten offenen Brauereibereich reicht gewöhnlich die Erfassung unspezifischer Verkeimungen, wie z. B. Essigsäurebakterien, oder organischer Ablagerungen als Hinweis auf mangelnde Hygiene und auf das Vorhandensein potentieller Schwachstellen. Hier spielt neben der Anwendung von Abstrichtupfern (Back, 2003) auch die ATP-Messung eine gewisse Rolle (s. Kap. 1.3.2.1).

Für einen Getränkeproduzierenden Betrieb dient der Nachweis von relevanten Mikroorganismen letztlich der Aufrechterhaltung der Produktqualität. Dazu sind zum einen die Dauer der Nachweisverfahren und die Nachweiszuverlässigkeit von großer Bedeutung und zum anderen die Beurteilung der Schädlichkeit der nachgewiesenen Keime, die meist Keimidentifizierungen erforderlich macht.

Im Folgenden wird ein Überblick über Verfahren zur Keimdetektion und Keimidentifizierung mit **Fokus auf bierspezifische Mikroorganismen** gegeben.

1.3.1 Kulturelle Methoden

Klassische Nachweisverfahren finden in Verbindung mit einer mikroskopischen Endkontrolle, aufgrund der einfachen Handhabung und umfangreicher Erfahrungen, in der Brauereipraxis weiterhin verbreitete Anwendung. Als kulturelle Methoden kommen am häufigsten Plattenkulturen (Guss-, Ausguss- und Membranfilterkulturen) zum quantitativen und Flüssiganreicherungen (Produktproben, Wischproben) zum qualitativen Keimnachweis zum Einsatz, wobei im Brauereibereich vor allem NBB-Medien verwendet werden (Back, 1994a, 2005). Die Wahl geeigneter Anreicherungsmedien bzw. deren Optimierung/Modifizierung sowohl im Hinblick auf die Evaluierung des bierschädlichen Charakters der Bakterien als auch auf die notwendigen Voranreicherungen für molekularbiologische Schnellnachweismethoden, beeinflussen dabei

den Nachweis von bierschädlichen Mikroorganismen bedeutend. Diesbezüglich wurde und wird regelmäßig referiert (Nishikawa und Kohgo, 1985; Jespersen und Jacobsen, 1996; Storgårds et al., 1998; Suzuki et al., 2008; Haakensen *et al.*, 2009b; Hutzler, 2010; Taskila *et al.*, 2010 und 2011; Bohak *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2014). Um die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von Mikroorganismen im Spurenbereich zu verbessern (Birkenstock, 2010), ist im Vorfeld der Probenverarbeitung auch eine Erhöhung der zu untersuchenden Probenvolumina sinnvoll (Strachotta, 2004; Kötke, 2012). Hierzu haben sich in der Brauerei- und im Getränkebetrieb Dauerprobennahmesysteme etabliert, die, kontinuierlich oder getaktet, über komplette Chargen einen Probendurchschnitt aus den produktführenden Rohrleitungen entnehmen (Molzahn und Portno, 1975; Birkenstock, 1980; Back und Pöschl, 1998b und 1999b; Pöschl, 2000; GEA-Tuchenhagen, 2014; Schütt, 2014). Eine mechanische Aufkonzentrierung von Keimen wird bei klaren Bierproben vor der Anreicherung im Normalfall über Membranfiltrationen (0,45 µm) erzielt. Da diese Möglichkeit im Hefebereich und bei trüben Bieren nicht gegeben ist, werden diese gewöhnlich mit Flüssigmedien versetzt, wobei manchmal im Vorfeld eine Sedimentation oder Zentrifugation erfolgt (Back, 1994a).

Nach dem kulturellen Nachweis stehen zur Identifizierung bestimmter Keimgruppen kommerzielle Test-Sets (z. B. API-Systeme, BioMerieux, Frankreich) zur Verfügung, in denen Schlüsseltests kombiniert vorliegen. Zur Vermeidung von Fehldiagnosen sollte eine Identifizierung auf mindestens 20 physiologisch-biochemischen Merkmalen basieren (Back, 1994a). Es ist anzumerken, dass eine Identifizierung von getränkespezifischen Mikroorganismen mit diesen Test-Sets allerdings häufig zu schwer interpretierbaren oder irreführenden Resultaten führt, da sie oft auf die Erfassung klinischer Isolate ausgelegt sind und den Ansprüchen von Isolaten aus Getränken nicht genügen (Anm. d. Verf.). Kulturelle Anreicherungen können, je nach Höhe der Ausgangskeimzahl, nach Keimart und dem physiologischen Keimzustand drei bis sieben (zehn) Tage in Anspruch nehmen. Anschließend Identifizierungsverfahren, basierend auf physiologisch-biochemischen Tests, benötigen denselben Zeitaufwand. Für eine Echtzeiterfassung („real-time-monitoring“) oder eine schnelle Prozesskontrolle kommen sie also nicht in Frage. Hier ist der Einsatz von Schnellmethoden wünschenswert.

1.3.2 Alternative Methoden unter dem Aspekt Schnellnachweis

Nach Zschaler sind mikrobiologische Schnellmethoden definiert als „ ... 1. sehr schnelle Verfahren, d. h. Verfahren, deren Ergebnisse bereits in weniger als einer Stunde vorliegen, 2. Schnellverfahren, deren Ergebnisse innerhalb von vier bis acht Stunden vorliegen, und 3. länger dauernde Verfahren, die die Resultate nach 12, 48 oder auch erst nach 72 Stunden anzeigen. ... “ (Zschaler, 2004, S. 305). Ideal wäre eine Analysenmethode, welche einfach, sensitiv, spezifisch, nicht-destruktiv, quantitativ, leicht in den Produktionsprozess integrierbar, billig und womöglich ohne aufwendigen Reagentieneinsatz schnelle zeitnahe Ergebnisse liefert (Ellis und Goodacre, 2001; Brandl, 2006).

Im Folgenden wird ein Überblick über die brauereirelevanten Methoden gegeben, welche diesen Definitionen zumindest in Teilen nahe kommen.

1.3.2.1 Unspezifische und chemotaxonomische Methoden

Eine direkte Bestimmung von Bakterien mittels Thoma-Zählkammer oder automatisierten Zellzahlmessgeräten kommt für die Qualitätskontrolle in der Brauerei nicht in Frage, da hier Aussagen erst ab ca. 100.000 Zellen/ml möglich sind und aufgrund fehlender Selektivität keine Keimzuordnung erfolgen kann. Dies gilt auch für das DEFT-Verfahren (Direkte Epifluoreszenz Filter Technik) (Schmidt, 1992). Allerdings eignet sich das DEFT-Verfahren zur Detektion lebensfähiger, aber nicht kultivierbarer Mikroorganismen (VBNC-Status: viable but non-culturable), da diese Keime weiterhin Esteraseaktivität aufweisen und fluoreszenzmarkierte Ester hydrolysieren (Millet und Lonvaud-Funel, 2000). Hutter berichtet von einer direkten Einfärbung von auf Membranfiltern gesammelten Bakterien mit Fluoreszenzfarbstoffen und anschließender automatisierter bildanalytischer Datenverarbeitung mittels Auflichtfluoreszenzmikroskopie („Kontaminationsscreening“). Die Klassifizierung erfolgt hier über die Zellmorphologie (Hutter, 2000). Bei dem AFT-Verfahren (Anreicherungs-Fluoreszenz-Test) und bei der MMCF-Methode (Membranfilter-Mikrokolonie-Fluoreszenz Methode) werden Bierproben filtriert und ein bzw. zwei Tage inkubiert. Allerdings ist der Nachweis unspezifisch und setzt Mindestzellzahlen von 5×10^3 voraus (Rinck und Wackerbauer, 1987; Rusch und Krämer, 1990). Noch höhere Zellzahlen werden für Methoden benötigt, die auf der Erfassung von Stoffumsetzungen durch

Mikroorganismen, wie z. B. gaschromatographische Bestimmung von organischen Säuren (Forster und Andersen, 1999) oder pH-Wert-Veränderungen (Schmidt, 1992) beruhen. Das gilt auch für das Impedanzverfahren, welches mikrobiell bedingte Leitwertänderungen in nicht-selektiven und damit unspezifischen Anreicherungsmedien online erfasst (Vogel und Bohak, 1990). Eine weitere Methode zur Erfassung der metabolischen Aktivitäten von *L. brevis* Stämmen direkt in Bier und ihre Zuordnung zu Schädlichkeitskategorien beschreiben Preissler *et al.* (2010). Hier wird NADH₂ mittels des Redoxindikators Resazurin aufgezeigt und kann optisch über Farbumschlag ausgewertet werden. Asano *et al.* verfeinerten die Mikrokoloniemethode durch Einfärbung lebenden Zellmaterials mit Carbofluoresceindiacetat (CFDA) und schlossen eine Identifizierung mittels Gensonden an (Asano *et al.*, 2009). Das Prinzip der MMCF-Methode wurde noch einmal von Valton-EI Khoury *et al.* (2012) mit der Betonung auf Entwicklung eines „Nicht destruktiven Schnellnachweises“ aufgegriffen, der auf der Verwendung nicht-zellschädigender Fluoreszenzmarker beruht und mittels der Milliflex® Quantum-Plattform durchgeführt wird.

Die ATP-Biolumineszenz-Methode dient in erster Linie zur unmittelbaren Auffindung unspezifischer mikrobieller und/oder organischer Verunreinigungen. Deshalb wird dieses Verfahren insbesondere für das direkte Hygienemonitoring von Spülwasserproben und Oberflächen im Produktions- bzw. Abfüllbereich eingesetzt (Werlein *et al.*, 1997; Grünwälder und Laaff, 1998; Quain, 1999; Odebrecht *et al.*, 2000; Satoh *et al.*, 2004;). Schwill-Miedaner und Eichert (1998) testeten die Biolumineszenz-Methode auf ihre Tauglichkeit zur Schankanlagenkontrolle. Dowhanick *et al.* (1995), Takahashi *et al.* (1999 und 2000), Sakakibara *et al.* (2002) und Denoya *et al.* (2011) setzen sie für Sterilitätsbestimmungen zur Produktfreigabe ein. Bei der Überprüfung von möglichen Energieressourcen für bierschädliche Milchsäurebakterien entdeckten Suzuki *et al.*, dass ein Wachstum mit der Freisetzung nicht unerheblicher Mengen ATP einherging. Sie schlugen deshalb ein ATP Screening vor, vermerkten aber, dass auch nicht bierschädliche Mikroorganismen zur ATP-Produktion fähig seien (Suzuki *et al.*, 2005a). Dass das ATP-Verfahren zum Nachweis von relevanten Bakterien direkt im Bier nicht geeignet ist, wird in der Arbeit von Zarnkow *et al.* (2000) explizit dargestellt.

Chemotaxonomische Methoden, wie die Py-MS (pyrolysis mass spectrometry), die FAME (whole cell fatty acid analysis) (Beverly *et al.*, 1997) und die FT-IR (Fourier transform infrared) Spektroskopie (Curk *et al.*, 1994) ermöglichen schnelle und gute Identifizierungen von Milchsäurebakterien auf Spezies-Ebene. Die Methoden zeichnen sich durch ihre Nachweisschnelligkeit aus. Allerdings sind hohe Keimzahlen erforderlich. Zudem sind kostenintensive Anschaffungen nötig, und es wird ausgebildetes Personal für die Datenauswertung und für die Interpretation der Resultate vorausgesetzt (Ellis und Goodacre, 2006). Die SDS-Page Ganzzellproteinanalyse erlaubt ebenfalls die Identifizierung auf Spezies-Ebene, allerdings ist die Auftrennung sehr nah verwandter Stämme nicht immer fehlerfrei (Gancheva *et al.*, 1999). Auch für diese Analysenmethoden werden hohe Zellzahlen (ca. 10^7) benötigt, und die Vor- und Aufbereitung der Proben ist aufwendig (Pot *et al.*, 1994). Ebenfalls eine gute Keimidentifizierung auf Spezies-Ebene erlaubt das Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry Verfahren (MALDI-TOF MS). Bei dieser, erst seit wenigen Jahren zur bakteriellen Diagnostik hinzugezogenen Analysenmethode, werden die ribosomalen Proteine und Peptide der Bakterien mit Laser beschossen, ionisiert und im elektrischen Feld beschleunigt. Die Flugzeit, auf die sowohl die Masse als auch der Ionisierungsgrad der Proteine Einfluss nehmen, wird im Vakuum exakt gemessen. Damit lassen sich Gesamtspektren als Spezies-spezifische „Fingerabdrücke“ von Bakterien erstellen. Die Dauer der Analyse wird mit 5 bis 15 Minuten angegeben, wobei ca. 10^4 bis 10^6 Bakterien vorhanden sein müssen (Schubert und Wieser, 2010). Wieme *et al.* (2014) gelangen gute Differenzierungen von brauereispezifischen Laktobazillen auf Spezies-Level mittels MALDI-TOF MS. Sie halten die Analyse mit MALDI-TOF MS für eine schnelle und spezifische Methode zur Identifizierung von bierspezifischen Bakterien und, auch aufgrund des hohen Probendurchsatzes, durchaus geeignet für einen routinetauglichen Einsatz in der Brauerei. Allerdings sind die Kosten für die instrumentelle Ausstattung hoch und ein Spurennachweis ist nicht gegeben (Wieme *et al.*, 2014). Ein großes Potenzial der MALDI-TOF MS Methode sehen Kern *et al.* (2014a), denen im Falle von *Pectinatus* spp. eine Differenzierung auf Stammebene gelang, bez. der Rückverfolgbarkeit und Lokalisation von Kontaminationen. Dieselbe Forschergruppe beschreibt außerdem eine gute Keimzuordnung verschiedener nicht-bierschädlicher und bierschädlicher *L. brevis*-Stämme auf Stammebene. Sie berichtet darüber hinaus, dass sich in den MALDI-TOF Profilen Clusterbildungen

ausmachen lassen, die in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Bierschädlichkeitspotenzialen der analysierten Stämme stehen (Kern *et al.*, 2014b). Schumann *et al.* (2013) bestätigen die Möglichkeit der Stammdifferenzierung in bestimmten Fällen, weisen aber darauf hin, dass hierzu sehr komplexe Evaluierungen der Massenspektren erforderlich sind. Die Methode erweist sich auch als geeignet für eine schnelle Zuordnung von Milchsäurebakterien, die als Starterkulturen bei der Fermentation von Zerealien dienen (Sora-Yao *et al.*, 2014). Für die Anwendung der MALDI-TOF MS Methode ist speziell geschultes Personal erforderlich und die Investitionskosten für das Analysensystem bewegen sich im sechstelligen Eurobereich (Kruska und Schneegans, 2010).

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die genannten Nachweise teilweise hohe bis sehr hohe Ausgangskeimzahlen, verbunden mit entsprechend langen Anreicherungszeiten, voraussetzen. Zum Teil sind die Kosten für die instrumentelle Ausstattung sehr hoch. Die Anwendung ist nur durch professionelles Personal möglich, womit ein praxistauglicher Einsatz nur in Sonderfällen möglich ist. Manche dieser Verfahren sind sehr unspezifisch und besitzen damit keine Relevanz für die Taxonomie und die Beurteilung der Schädlichkeit, sind aber als Screeningmethoden in Sonderfällen einsetzbar. Als praxistaugliche Schnellmethoden zum Nachweis von Bierschädlingen sind die genannten Verfahren nur bedingt geeignet, zeichnen sich aber in machen Fällen (z. B. MALDI-TOF MS) als zuverlässiges Instrumentarium für Identifizierungen aus.

1.3.2.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Verfahren liefern schnelle, zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse im Hinblick auf Keimklassifizierungen. Sie erlauben mitunter sogar Identifizierungen auf Subspezies- oder Stammebene (Singh *et al.*, 2009). Diese Verfahren basieren entweder auf immunologischen Methoden oder zielen unter Anwendung von PCR-basierten Techniken und/oder von Nukleinsäure-Hybridisierungsmethoden direkt auf die Erbinformation der Mikroorganismen ab. Generell werden auch für diese Verfahren Mindestzellzahlen an Bakterien benötigt, weshalb der eigentlichen Analyse meist kulturelle Anreicherungen vorgeschaltet werden. Die Voranreicherungen sind zudem bei der Überwindung der lag-Phasen behilflich und unterstützen die „Wiederbelebung“ (Resusztation) eventuell subletal geschädigter

Keime, wie sie z. B. nach Verfahren der thermischen Produktstabilisierung auftreten könnten (Roszak und Colwell, 1987; Back, 1994b und 2000; Suzuki *et al.*, 2006).

Immunologische Verfahren

Immunoassays basieren auf dem Prinzip der spezifischen Antigen-Antikörperreaktion. Nachweise für Brauereien mittels fluoreszenzkonjugierter Antikörper werden u. a. von Hutter (1991), Eger *et al.* (1993) und Eger (1995) als sehr empfindlich und schnell dargestellt. Eger (1995) räumt allerdings die Notwendigkeit von unspezifischen Voranreicherungen in Kombination mit spezifischen Anreicherungen mittels magnetisierbarer, immunreaktiver Mikropartikel ein und berichtet von Problemen bei der Nachweissicherheit aufgrund von Kreuzreaktionen und des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens der bierschädlichen Milchsäurebakterien. Yasui und Yoda (1997) berichten über ein für bierschädliche *L. brevis*-Stämme spezifisches Antigen und lokalisierten dieses in der Bakterienzellwand. Unter Aufnahme dieser Idee entwickelten Tsuchiya *et al.* (2000) unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper (MAbs) ein Nachweiskit auf der Basis von ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay), das ihren Angaben nach Aussagen über die Bierschädlichkeit bestimmter Laktobazillenstämme erlaube. Zeitgleich mit Tsuchiya sprechen auch Ziola *et al.* (2000) dem Arbeiten mit monoklonalen Antikörpern ein Potenzial bez. Schnellnachweismethoden für Bierschädlinge zu. Zur schnellen Quantifizierung lebender bierschädlicher Milchsäurebakterien entwickelten March *et al.* (2005) ein ebenfalls auf MAbs basierendes Enzym-Immunoassay unter Verwendung einer Spezialkamera zur Erfassung freigesetzter Chemilumineszenz (Immunochemiluminescence Assay). Diese Methode benötigt zwei bis drei Tage Vorinkubation auf festen Nährmedien. Sie ist nicht für eine genaue Identifizierung einzelner Keime ausgelegt, sondern eher als Screeningmethode zu betrachten (March *et al.*, 2005). Die Verwendung von ELISA in Kombination mit PCR wurde von Walker *et al.* (2003) beschrieben.

Donhauser gibt 2011 noch einmal einen Überblick über die Anwendbarkeit von immunologischen Methoden für die Brauereianalytik, muss aber konstatieren, dass sich diese Technik in der Brauereimikrobiologie nicht etablieren konnte. Die Gründe hierfür liegen wohl generell in der mangelnden Sensitivität (hohe Detektionsgrenzen), da Mindestzellzahlen von 10^4 pro ml benötigt werden (Gracias und McKillip, 2004).

Adams und Moss (2008) nennen sogar Mindestzellzahlen von 10^5 bis 10^6 , allerdings bezogen auf den Listeriennachweis in Lebensmitteln.

Genbasierte Verfahren

Ein umfassender Überblick über Nukleinsäuretechniken zur Taxonomierung und Identifizierung prokariotischer Mikroorganismen wird von Ludwig (2008) gegeben. Genbasierte Identifizierungsmöglichkeiten für ökologisch bedeutsame Laktobazillen werden von Singh *et al.* (2009) vorgestellt. Eine ausführliche Beschreibung der klassischen und der quantitativen real-time PCR (qPCR) und ihrer Applikationen finden sich bei Fillion (2012). Martínez *et al.* befassen sich mit der Bedeutung dieser Technik für die Auffindung lebensmittelverderbender Mikroorganismen und geben einen Überblick über für Lebensmittelmatrixen in Frage kommende qPCR-Assays (Martínez *et al.*, 2011). Schleifer *et al.* (1992a und 1992b), Amann und Fuchs (2008) sowie Rohde *et al.* (2015) richten den Fokus auf Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungstechniken. Van der Vossen und Hofstra (1996) sowie Giraffa und Carminati (2008) und Cocolin *et al.* (2013) beschreiben die Prinzipien und Applikationen der verschiedenen nukleinsäurebasierten Techniken, erstere Autoren allgemein im Hinblick auf lebensmittelverderbende Mikroorganismen, die beiden letzteren Autorengruppen unter Fokussierung auf Fermentationen im Nahrungsmittelbereich. Ehrmann und Pavlovic (2010a) beschreiben Methoden für die Überprüfung verschiedenster Starterkulturen der Lebensmittelindustrie. Das aktuelle Methodenspektrum zur Identifizierung von probiotischen Laktobazillen wird von Herbel *et al.* (2013) vorgestellt.

Eine Übersicht über gentechnische Methoden für brauereispezifische bakterielle Nachweise und Identifizierungen geben Storgårds *et al.* (2006), Juvonen (2009) und Kötke (2012). Ein Überblick über PCR-Anwendungen für Brauereien findet sich auch bei Brandl (2006), Comi und Manzano (2008) und Hutzler (2009), wobei letztgenannter Autor Einsatzgebiete der PCR für die Hefeidentifizierung aufzeigt.

Ergänzend sollen noch weitere interessante brauereirelevante Forschungsansätze über den Nachweis bierschädlicher Bakterien aufgegriffen werden.

Hutzler (2014) berichtete über die Entwicklung eines Multiplex-PCR-basierten qualitativen „Schwangerschaftstestformates“, mit dem in Form von Teststreifen eine Identifizierung bereits angereicherter bierschädlicher Bakterien innerhalb von zwei

Stunden möglich ist. Heidebrecht (2012) versuchte, einen real-time Multiplex-PCR-Nachweis für Multiplexkapillarelektrophoresen zu validieren, was aber aufgrund von Kreuzreaktionen und dem Auftreten unspezifischer Signale bei der Auswertung nur bedingt gelang (Heidebrecht, 2012). Ebenfalls mit real-time Multiplex-PCR arbeiteten Haakensen *et al.* Ausgehend von der Tatsache, dass alle bierspezifischen Bakterien den *Firmicutes* angehören, konstruierten sie *Firmicutes*-spezifische rDNS basierte Hydrolysierungssonden und entsprechende Primer. Mit diesem Screening-Verfahren war die Detektion von 2,5–10 KBE pro Gebinde Bier (100 und 341 ml) möglich (Haakensen *et al.*, 2008a). Im selben Jahr stellte die Forschergruppe um Haakensen eine weitere Multiplex-PCR Anwendung („Hopfen-Multiplex-PCR“) zur Detektion von Laktobazillen und Pedikokken vor, bei der mit den als Markergene für Bierschädlichkeit in Erwägung gezogenen Genen *horA*, *horC* oder *hitA* in Kombination mit 16 rDNS gearbeitet wurde (Haakensen *et al.*, 2008b). Menz *et al.* (2010) charakterisierten zunächst die *Lactobacillus*-Arten in australischen Mikrobrauereien mittels RAPD (random amplified polymorphic DNA)-PCR und überprüften im Anschluss deren tatsächliche Bierschädlichkeit mittels des von Haakensen *et al.* vorgeschlagenen Hopfengradienten-Kulturmediums (Haakensen *et al.*, 2009b). Weber *et al.* entwickelten einen Mikroarray Prototyp, bei dem nach Durchführung einer Reversen Transkription (RT)-PCR und anschließender Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotidsonden eine Speziesidentifizierung innerhalb der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Megasphaera* und *Pectinatus* möglich war. Gleichzeitig erfolgte eine Unterscheidung von lebensfähigen und toten Zellen im selben Ansatz. Für „reale“ Proben müssten allerdings die RNS Extraktion und die RT-PCR Bedingungen angepasst werden (Weber *et al.*, 2008). Die DNS-Fingerprinttechnik PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) wurde von Takahashi *et al.* (2014) eingesetzt, um die Vielfalt der während des Brauprozesses vorhandenen Mikroorganismen aufzuzeigen. Bokulich und Mills (2012) berichten von der Entwicklung des LAB-TRFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) Assays. Auch mit dieser Technik war es möglich, in Mischkulturen, wie sie bei der Wein- und Bierherstellung während der Fermentationsprozesse auftreten, Milchsäurebakterien zu detektieren und bis auf Spezies-Ebene zu identifizieren. Mit der Entwicklung eines Lipase-basierten elektrochemischen DNS/RNS-Hybridisierungsassays gelang unter Umgehung eines PCR-Schrittes der Nachweis von *L. brevis* im Detektionsbereich von 400 KBE pro 100 ml Bier in 3,5 Stunden. Die Lipase-

induzierte Änderung des elektrochemischen Signals an Goldelektroden entsprach dabei dem Umfang der erfolgten Hybridisierungen (Shipovskov *et al.*, 2012). Schließlich sei noch die PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) genannt, mit der die Identifizierung der mikrobiellen Flora in Brauereien vor und nach Reinigungsprozessen durchgeführt wurde, was eine Aussage über die Effektivität der durchgeführten Maßnahmen zuließ (Manzano *et al.*, 2011). Dieser Methode bedienten sich auch Pérez-Martín *et al.* (2014), allerdings zur Bestandaufnahme von Laktobazillen in der Winzerei und zur Abklärung, inwieweit Mikroorganismeneintrag über die Luft erfolgt. Der DGGE wird allgemein ein großes Potenzial für die Erforschung mikrobieller Transformationsprozesse in der Ökologie von Nahrungsmitteln zugeschrieben (Cocolin *et al.*, 2013).

1.3.2.3 Kommerziell erhältliche Schnellnachweiskits für Brauereien

Von den von oben genannten Autoren aufgeführten und beschriebenen Techniken fand nur eine begrenzte Anzahl in der Form von Testkits ihren Niederschlag in der mikrobiellen Routineanalytik von Brauereien. Die zum jetzigen Zeitpunkt kommerziell erhältlichen automatisierten Schnellnachweissysteme, die jeweils angewandte Methode, das erfasste Keimspektrum, die jeweiligen zur Detektion benötigten Mindestzellzahlen (falls bekannt) und der analytische Zeitaufwand sind in der Tabelle 5 zusammengestellt. Die Angaben entstammen den Informationsmaterialien der jeweiligen Hersteller. Außerdem gibt die Tabelle Auskunft über entsprechend spezifisch beschreibende Literatur, sowohl für die Testkits als auch für die verwendeten Methoden. Die angeführten Schnellnachweise unterscheiden sich untereinander in ihrer instrumentellen Ausstattung, den PCR-Bedingungen, der Spezifität der Primer und der Sonden, der Sensitivität und der Detektionsmethode. Sie basieren auf der FISH-Technik, dem Ribotyping, der rRNA-Sandwich-Hybridisierung oder auf den PCR-basierten TaqManTM- bzw. modifizierten Taq-Polymerase-Techniken sowie der LightCycler®-Technik. Das einzige Kit, das die PCR mit einer immunologischen Methode verknüpft, ist das Veriflow®brewPAL. Da sich das Veriflow®brewPAL-Kit noch in seiner Validierungsphase befindet, sind z. Z. keine weiteren brauereispezifischen Angaben erhältlich.

Alle diese Methoden erfüllen bez. der Analysendauer die Grundforderung nach Schnelligkeit (Zschaller, 2004), wobei allerdings für alle Methoden von den

Herstellern eine spezifische Voranreicherung von einem bis drei Tagen empfohlen wird (unbekannt für Veriflow®/brewPAL). Von diesen Methoden erlauben nur das VIT®-Kit und der HybriScan® den ausschließlichen Nachweis lebensfähiger Bakterien, da hier die rRNS die Zielsequenz darstellt.

Eine kritische Betrachtung der Schnellnachweise erfolgt in Kapitel 4.2.

Tab. 5: Kommerziell erhältliche Schnelldiagnostik-Kits für bierschädliche Bakterien unter Angabe des Zeitbedarfs (für die Analysendurchführung und Auswertung), sowie der Nachweisgrenzen der einzelnen Methoden (Stand 01/2015)

Kit	Zielorganismen	Methode	Zeit [h]	Nachweisgrenze [Zellen pro ml]	Hersteller	Quellen/Methoden
VIT® Bier plus L. brevis VIT®Bier Megasphaera/ Pectinatus	<i>Lactobacillus</i> <i>L. brevis</i> <i>Pediococcus</i> <i>Pectinatus</i> <i>Megasphaera</i> <i>cerevisiae</i> .	FISH Mikroskopie Nur lebende Zellen	2,5	10 ³	Vermicon GmbH	<a href="http://www.vermicon.com/de/de/products/MIT_Bier_plus_L_brev
is_-57">http://www.vermicon.com/de/de/products/MIT_Bier_plus_L_brev is_-57 <a href="http://www.vermicon.com/de/de/products/MIT%C2%AE%20Bier
MegasphaeraPectinatus-58">http://www.vermicon.com/de/de/products/MIT%C2%AE%20Bier _MegasphaeraPectinatus_-58 (abger. 01/15) Asno <i>et al.</i> , 2009; Thelen, 2009; Thelen <i>et al.</i> , 2001, 2002 und 2006; Snaidr und Beimfohr, 2003; Yasuhara <i>et al.</i> , 2001
HybriScan®	<i>Lactobacillus</i> +sp. <i>Pediococcus</i> <i>damnosus</i> <i>Pectinatus</i> sp. <i>Megasphaera</i>	rRNS- Sandwich- Hybridisierung Nur lebende Zellen	2-2,5	1–5 × 10 ³	Scanbec GmbH (Sigma- Aldrich)	<a href="http://www.sigmaa1drich.com/analytical-
chromatography/microbiology/identification-tests/HybriScan-
Rapid-Test-de.html#kits">www.sigmaa1drich.com/analytical- chromatography/microbiology/identification-tests/HybriScan- Rapid-Test-de.html#kits (abger. 01/15) Fabienke und Siegrist, 2009; Huhtamella <i>et al.</i> , 2007; Taskila <i>et</i> <i>al.</i> , 2010
Riboprinter®	<i>Lactobacillus</i> +sp. <i>Pediococcus</i> +sp. <i>Pectinatus</i> +sp. <i>Megasphaera</i> +sp. Datenbankausbau	Ribotyping	8	keine Daten	Du Pont Qualicon	<a href="http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/assets/downloads/RP
%20app%20profile%201-189-2-0609.pdf">http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/assets/downloads/RP %20app%20profile%201-189-2-0609.pdf (abger. 01/15) Barney <i>et al.</i> , 2001; Juvonen und Suihko., 2006; Motoyama <i>et</i> <i>al.</i> , 1998 und 2000; Schumann und Pukali, 2013; Suihko und Haikara, 2001; Soro-Yao <i>et al.</i> , 2014; Storgårds <i>et al.</i> , 1998; Suzuki <i>et al.</i> , 2004a; Yansanjav <i>et al.</i> , 2003
foodproof® Beer Screening	<i>Lactobacillus</i> +sp. <i>Pediococcus</i> +sp. <i>Pectinatus</i> <i>Megasphaera</i> <i>Megasphaera</i> <i>cerevisiae</i> .	qPCR LightCycler®	1– 1,5	10 ¹ –10 ³	Biotecon Diagnostics GmbH (Roche)	<a href="http://www.bc-diagnostics.com/products/kits/real-time-pcr/spoilage-
organisms/foodproof-beer-screening-kit/#detail">www.bc-diagnostics.com/products/kits/real-time-pcr/spoilage- organisms/foodproof-beer-screening-kit/#detail (abger. 01/15) Berghof, <i>et al.</i> , 2003; Hein, 2010; Homann <i>et al.</i> , 2002; Hutter <i>et al.</i> , 2003; Kiehne, 2001 u. 2009; Martinez <i>et al.</i> , 2011; Methner <i>et al.</i> , 2004
Veriflow® brewPAL™ (im Validie- rungsprozess)	<i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i>	PCR-NALFIA	3	10	Invisible Sentinel	<a href="http://invisible sentinel.com/wp-
content/uploads/2015/01/Invisible-Sentinel_Veriflow_brewPAL-
Brochure.pdf">http://invisible sentinel.com/wp- content/uploads/2015/01/Invisible-Sentinel_Veriflow_brewPAL- Brochure.pdf Blažková <i>et al.</i> , 2009; zu NALFIA: Dzantiev <i>et al.</i> , 2014

Tab. 5 (Fortsetzung): Kommerziell erhältliche Schnellnachweis-Kits für bierschädliche Bakterien unter Angabe des Zeitbedarfs (für die Analysendurchführung und Auswertung), sowie der Nachweisgrenzen der einzelnen Methoden (Stand 01/2015)

Kit	Zielorganismen	Methode	Zeit [h]	Nachweisgrenze [KBE pro ml]	Hersteller	Quellen/Methoden
First-Beer Screening Kits First-Beer Species Identification Kits Screening and Identification Panel Strips	<i>Lactobacillus</i> +sp. <i>Pediococcus</i> +sp. <i>Pectinatus</i> +sp. <i>Megasphaera</i> + <i>M. cerevisiae</i> Essigsäurebakterien	qPCR FRET TaqMan™	2	$2 \times 10^1 - 1 \times 10^2$	Gen-ial (r-Biopharm)	http://downloads.german-pavilion.com/downloads/pdf/exhibitor_20969.pdf (abger. 01/15) www.gen-ial.de/index.php/en/products/pcr-detection-kits/spoilage-bacterial/ (abger. 01/15) Breitsschneider, 2003; Homann <i>et al.</i> , 2002; Hutzler <i>et al.</i> , 2008; Mücher und Schönling, 2000
Pika Weihenstephan™ SO Detection Kit B LP Screening und Identification	<i>Lactobacillus</i> +sp. <i>Pediococcus</i> +sp. <i>Pectinatus</i> <i>Megasphaera</i>	qPCR TaqMan™	2	10^3	Pika Weihenstephan	https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0009361.pdf (abger. 01/15) Hutzler <i>et al.</i> , 2008; Vogeser <i>et al.</i> , 1995; Vogeser und Geiger, 1998
GeneDisk®	<i>Lactobacillus</i> +sp. <i>Pediococcus</i> +sp. <i>Megasphaera</i> +sp. <i>Pectinatus</i> +sp.	qPCR 5' Nuclease Multitargetmessung	1– 1,5	25–100 GU	PALL Corporation	http://www.pall.de/main/Food-and-Beverage/Product.page?id=20120717150059 (abger. 01/15) Beutin <i>et al.</i> , 2009 (für <i>E. coli</i>); Gerhards <i>et al.</i> , 2014; Knoll <i>et al.</i> , 2012

qPCR: quantitative PCR

KBE: Kolonienbildende Einheit

GU: Genetische Einheiten

FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung

FRET: Fluoreszenz Resonanz Energy Transfer

NALFIA: Nucleic Acid Lateral Flow Immuno Assay

LightCycler®: Beschreibung: https://dna.utah.edu/LightCycler/Top_LightCycler.html und <https://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/qpcr/> (abger. 01/15)

TaqMan™: Beschreibung: <http://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480obj/sdsman/view> (abger. 01/15)

Lactobacillus, *Pediococcus*, *Pectinatus*, *Megasphaera*: Erfassung auf Gattungsebene (spp.)

sp.: Gruppen- und/oder Spezies-Erfassung innerhalb einer Gattung

2 Ergebnisse

2.1 Eigene Arbeiten

Die Grundvoraussetzungen für die vorliegenden Neubeschreibungen war das Sammeln von Milchsäurebakterien aus mikrobiologisch verdorbenen Bier- und AfG-Proben sowie Umfeldproben aus der Industrie bzw. die Überprüfung von Industrie-proben auf schädigende Mikroorganismen (ab dem Jahr 1990). Parallel erfolgte die Aufnahme der Hintergrunddaten bez. Habitat und Herkunft. Diese Arbeiten gingen einher mit dem systematischen Aufbau einer Kulturensammlung am Lehrstuhl. Die Zahl der getränkeschädlichen bzw. im Getränkeumfeld isolierten MSB in der lehrstuhleigenen Kulturensammlung beläuft sich bis dato auf nahezu 1000 Stämme.

Die Getränkeproben wurden zunächst, falls erforderlich nach Voranreicherungen, für eine grobe Keimbestimmung mikroskopiert. Anschließend wurden zum Ausschluss von Mischkulturen in dreifachen Isolierungsschritten mittels Ausstrichverfahren auf geeigneten Selektivmedien Reinkulturen gewonnen und deren Kolonie- und Zellmorphologien notiert. Die Konservierung der Isolate erfolgte nach weiterer Zellvermehrung in Flüssigmedien, in Glycerin (20 bis 40 % Zellmaterial) bei -20 °C. Von den frisch angereicherten Reinkulturen wurden als Vortests das Gramverhalten, die Katalaseaktivität und die Cytochrom c-Oxidaseaktivität sowie der Sauerstoffbedarf ermittelt, als auch auf Sporenbildung und Beweglichkeit geachtet. Bei grampositiven, Katalase- und Oxidase-negativen, asporogenen und unbeweglichen, stäbchenförmigen Mikroorganismen wurde das Vorliegen von Laktobazillen angenommen.

Im Folgenden wurden alle Isolate zur Evaluierung oder Bestätigung ihres bierschädlichen Charakters und zur Zuordnung in eine Schädlichkeitskategorie (Kap. 1.1.2) bzw. zur Überprüfung der Adaptationsfähigkeit an Biermilieu einer Bierpassage unterzogen. Hierzu kamen als Testsubstrate jeweils ein A) steriles untergäriges helles Standardbier (ca. 21 EBC BU, ca. 5 Vol% Alkohol), B) dasselbe Bier mit Alkoholzusatz (auf ca. 7 Vol%), C) untergäriges Standard-Pilsbier (ca. 32 EBC BU, ca. 5 Vol% Alkohol) und D) ein obergäriges filtriertes Standard-Weizenbier (= Kristallweißbier) (ca. 15 EBC BU, Alkoholgehalt ca. 5,5 Vol%) zum Einsatz. Der Kohlensäuregehalt der untergärigen Biere lag bei ca. 4,5 g/l und der Weizenbiere bei ca. 7 g/l. Diese Biere wurden mit ca. 100 Zellen des gewaschenen Testkeims pro ml

beaufschlagt und dabei sorgfältig darauf geachtet, Lufteinschlag zu vermeiden. Um dem Verlust einer möglichen Bierschädlichkeit vorzubeugen, wurden die Kulturen im Vorfeld der Tests so wenig wie möglich mit Nährmedien in Kontakt gebracht.

Die inokulierten Testansätze wurden über einen Zeitraum von maximal zwei Wochen bei 28 °C inkubiert und täglich auf Opaleszenz, Trübungs- und/oder Bodensatzbildung hin beobachtet. War ein Befund in den Ansätzen A) bis D) gegeben, erfolgte eine Zuteilung des Testkeims in die Schädlichkeitskategorie I. Bei einem positiven Ergebnis im Ansatz D) und eventuell leichtem Wachstum in Ansatz A) handelte es sich um einen Keim der Schädlichkeitskategorie II. Bei Laktobazillen ohne spontanes Wachstum fanden zur Überprüfung ihres Adaptationsvermögens drei nacheinander geschaltete Bierpassagen mit sinkendem NBB-Bouillon-Zusatz statt (1. Passage: Bier + 20 % Medium, 2. Passage: Bier + 5 % Medium, letzte Passage: Bier ohne NBB-B). Die Beobachtung, Auswertung und Zuweisung in Schädlichkeitskategorien erfolgte wie beschrieben.

Die Laktobazillen der biologischen Säuerung wurden bei 48 °C inkubiert. Die Bierpassagen aller getesteten Stämme waren negativ.

Parallel zu den Bierpassagen wurden zur weiteren Charakterisierung der Reinkulturen folgende physiologisch-biochemischen Identifizierungsansätze durchgeführt (Back, 2000; modifiziert):

Voges-Proskauer-Test aus MRS-B zum Nachweis der Stoffwechselprodukte Acetoin, 2,3-Butandiol und Diacetyl, Argininspaltung, Vergärung verschiedener C-Quellen (Pentosen, Hexosen, Disaccharide, Trisaccharide, Polysaccharide, Alkohole, Glycoside, organische Säuren), Gasbildung aus Glukose, Maltose und Gluconat. Als Basismedium wurde Sharpe-Medium auf einen pH-Wert von 5,8 eingestellt (Ausnahme organische Säuren: pH-Wert 6,5) und als Säureindikator Chlorphenolrot zugesetzt (Ausnahmen: Arginin-, Äsculin-, Voges-Proskauer-Medium). Da einige Bier- und AfG-spezifische Stämme besondere Wuchsstoffansprüche stellten und in o. g. Testmedien nicht wuchsen, wurde diesen ca. 10 % des Standardmediums A) zugesetzt bzw. der pH-Wert durch Zusatz von 0,1 molarer HCl auf 4,8 bis 5,0 abgesenkt. Die enzymatische Bestimmung von D(-)- und L(+)-Laktat wurde photometrisch bei 340 nm durchgeführt (Testkombination von Boehringer/R-Biopharm).

Die Identifizierung der Laktobazillen erfolgte anhand von Merkmalsvergleichen nach den Aufstellungen von Back (1994a) und Hammes und Vogel (1995).

Die in den Tests als bierschädlich bestätigten Isolate bzw. Isolate der biologischen Säuerung, die über ihre phänotypischen Merkmale nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurden im Rahmen von Forschungsaufenthalten in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU-München (ehem. Prof. Schleifer), dem Laboratorium voor Microbiologie and BCCMTM/LMG Bacteria Collection, Universität Gent (ehem. Prof. Kersters), Belgien, und der Firma Vermicon, München, folgenden chemotaxonomischen und genotypischen Charakterisierungen unterzogen:

SDS-Page Gel-Elektrophorese zur Ermittlung der Whole-cell Proteinpatterns (bei *L. perolens*), G+C-Gehalt der DNS, 16S rDNS Sequenzierung für vergleichende Sequenzanalysen bzw. zusätzlich 23S rDNS Sequenzierung bei *L. amylolyticus* zur Bestätigung seines separaten Status als Spezies und Entwicklung artspezifischer Oligonucleotidsonden sowie DNS-DNS Hybridisierung bei *L. amylolyticus*. Mit der Analyse des Peptidoglycantyps der Zellwand und des Nachweises von Teichonsäuren wurden externe Labors beauftragt.

Die Beschreibung dieser Analysenverfahren bzw. entsprechende Quellvermerke, und Angaben zu den mathematischen Berechnungen zur Erstellung der phylogenetischen Stammbäume sind den Publikationen in Kapitel 3 zu entnehmen.

Im Rahmen dieser Arbeiten wurden vier neue für Brauereien hochrelevante *Lactobacillus*-Arten, nämlich *Lactobacillus lindneri*, *L. perolens*, *L. backi* (jetzt *L. backii*) und *L. amylolyticus*, erkannt und, wie folgt, neu beschrieben.

(Anmerkung: Die Beschreibungen entsprechen den Inhalten der Veröffentlichungen, die neuesten taxonomischen Zuordnungen sind deshalb nicht berücksichtigt).

2.2 Neubeschreibungen

2.2.1 *Lactobacillus lindneri* (ex Bergey et al. 1923) Back, Bohak, Ehrmann, Ludwig and Schleifer nom. rev.

Lactobacillus lindneri (Revival of the Species *Lactobacillus lindneri* and the Design of a Species Specific Oligonucleotide Probe; s. Kap. 3)

Physiologisch-biochemische und chemotaxonomische Studien mit aus verdorbenen Bieren isolierten Laktobazillen-Stämmen zeigten, dass manche Stämme taxonomisch nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Die Physiologie und Morphologie stimmte mit den zuvor von Henneberg (1901) als „*Lactobacillus lindneri*“, von Lindner (1909) als „*Bacillus lindneri*“ und 1926 nochmals von Henneberg als „*Bacterium lindneri*“ beschriebenen Mikroorganismen überein. Der spezielle Status dieser Stämme konnte nun mittels 16S rRNA Gensequenz-Analysen bestätigt werden, so dass *L. lindneri* als eigene Spezies in der Gattung der Laktobazillen eingestuft werden darf. Der Typ-Stamm von *L. lindneri* ist unter DSM 20690^T in der DSMZ hinterlegt.

L. lindneri kann folgendermaßen beschrieben werden:

L. lindneri (lind`neri. L. gen. n. lindneri von Lindner, beziehend auf Lindner, Deutscher Bakteriologe).

L. lindneri ist ein obligater Bierverderber, der leichte Trübungen, leichte Sedimente und leichte pH-Wert Absenkungen bewirkt. Er ist deshalb gefürchtet, weil er neben Ethanolkonzentrationen bis zu 8 Vol% auch hohe Hopfenkonzentrationen (bis 45 EBC BU) toleriert. Aufgrund seiner Kleinzelligkeit kann er, obwohl zunächst als Primärkontaminant eingestuft, Filter passieren und im Filtratbereich und im abgefüllten Bier nachgewiesen werden. Zudem ist er extrem langsam wachsend und schwierig zu detektieren.

Die Zellen sind stäbchenförmig und treten paarweise oder in verwinkelten Ketten (je nach Nährmedium) auf. Die Bakterien sind grampositiv, nicht beweglich, mikroaerophil, Katalase negativ und heterofermentativ. Wachstum findet zwischen 15 °C und 30 °C mit einem Optimum zwischen 22 °C und 25 °C statt. Das pH-Optimum liegt zwischen 4,6 und 5,2. Kein Wachstum findet über pH-Werten von 6,5 statt.

Es werden Säure und Gas aus Glukose und Maltose gebildet, manchmal auch aus D-Fruktose. Amygdalin, L-Arabinose, Cellobiose, Dextrin, D-Galaktose, Gluconat, Laktose, D-Mannit, D-Mannose, Melezitose, Melibiose, Raffinose, L-Rhamnose, D-Ribose, Saccharose, D-Sorbit, Salicin, Trehalose und D-Xylose werden nicht verwertet, ebenso Äskulin und Gelatine. Arginin-Decarboxylase ist nicht vorhanden. Es werden weder Urease noch H₂S produziert und eine Nitratreduzierung findet nicht statt. Alle Stämme produzieren DL-Laktat. *L. lindneri* hat den Peptidoglycan-Typ

Lysin-D-*iso*-Asp und die Zellwände enthalten keine Teichonsäuren. Der G+C Gehalt (mol%) der DNS liegt bei 35 % (T_m)

2.2.2 *Lactobacillus amylolyticus* Bohak, Back, Richter, Ehrmann, Ludwig and Schleifer sp. nov.

Lactobacillus amylolyticus (*Lactobacillus amylolyticus* sp. nov., Isolated from Beer Malt and Beer Wort; s. Kap. 3)

Einige Stämme, die in Brauereien zur biologischen Säuerung eingesetzt werden, wurden zunächst den thermophilen Stämmen aus der Gruppe der Laktobazillen, nämlich *L. delbrueckii* (mit Subspezies) und *L. fermentum* zugeordnet. Bereits Henneberg (1901, 1905) hat Stämme aus Sauergut folgendermaßen beschrieben: Diese Stämme kommen zunächst auf gekeimtem Getreide, Grünmalz und gedarrtem Malz vor. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie in ungehopfter Bierwürze bei Optimumtemperaturen von 47 bis 48 °C gut wachsen und D(-)-Laktat bilden. Die Laktatbildung steigt unter anaeroben Inkubationsbedingungen signifikant an.

Später wurden diese Stämme hauptsächlich *L. amylovorus* zugeordnet (Back, 1988). Unsere genotypischen Studien zeigten allerdings, dass die Mehrheit der Laktobazillen der biologischen Säuerung, wie sie heute als Starterkulturen angewendet werden, Unterschiede zum Typstamm von *L. amylovorus* aufweist und einer neuen Laktobazillen-Spezies zugeordnet werden muss. Die Bestimmung erfolgte mittels DNS-DNS-Hybridisierungen und der Sequenzierung der 16S und 23S rDNS. Die neue Art wird *L. amylolyticus* genannt und wurde als Typstamm bei der DSMZ unter DSM 11664^T hinterlegt.

L. amylolyticus wird folgendermaßen beschrieben:

L. amylolyticus (a.my.lo.ly`ti.cus. Gr. n. *amylum* starch, Gr. ad *lyticus* able to loose; M.L. adj. *amylolyticus* starch-digesting).

Es handelt sich um ein homofermentatives, grampositives, unbewegliches, nicht-sporulierendes Stäbchen mit optimalem Wachstum unter mikroaerophilen Bedingungen. Wachstum auf MRS ist positiv. In Bier, gehopfter Würze sowie in NBB-Medien findet kein Wachstum statt, da diese Art eine sehr ausgeprägte Hopfenempfindlichkeit aufweist. Das Wachstum ist optimal bei 45 °C bis 48 °C. Wachstum bis 52 °C ist kurzfristig möglich.

Der optimale pH-Wert liegt bei 5 bis 5,5, Wachstum findet bei pH-Werten unter 3,5 oder über 6 nicht mehr statt. *L. amylolyticus* bildet DL-Laktat (L(+)-Laktat Anteil ca. 70 %). Säure ohne Gas wird gebildet aus: Dextrin, D-Fruktose, D-Galaktose, Glukose, Maltose, D-Mannose, Saccharose und manchmal aus Salicin, Amygdalin, Raffinose und Melibiose. Weder Gas noch Säure wird gebildet aus L-Arabinose, Cellobiose, Laktose, D-Mannit, Melezitose, L-Rhamnose, D-Ribose, D-Sorbit, Trehalose und D-Xylose. Äsculin wird manchmal verwertet. Arginin-Decarboxylase ist nicht vorhanden. Nitratverwertung findet nicht statt. Der Peptidoglycantyp besteht aus L-Lysin-D-iso-Asp. Die Zellwände beinhalten Teichonsäuren. Der G+C Gehalt (mol%) beträgt 39 (T_m).

2.2.3 *Lactobacillus perolens* Back, Bohak, Ehrmann, Ludwig, Pot, Kersters and Schleifer sp. nov.

Lactobacillus perolens (*Lactobacillus perolens* sp. nov., a Soft Drink Spoilage Bacterium; s. Kap. 3)

Lactobacillus perolens wurde zunächst aus alkoholfreien Getränken (AfG) isoliert und dann auch in Bierwürze und Weißbieren als potentieller Bierschädling nachgewiesen. Im Unterschied zur Wein- und Bierherstellung werden alkoholfreie Getränke (AfG) meist nicht auf biotechnologischem Wege hergestellt, weshalb das Auftreten von Mikroorganismen normalerweise als Kontamination zu werten ist. Tatsächlich weisen AfG einen sehr guten Eigenschutz auf, obwohl sie je nach Getränketypus in Abhängigkeit von Zucker- und Fruchtsaftanteilen hohe Nährstoffmengen enthalten können und damit ein ideales Substrat für Mikroben darstellen. Als Faktoren des Eigenschutzes stellen sich dar:

1. Tiefe pH-Werte (2,5–3,7 (4,5))
2. Anaerobiose in karbonisierten Getränken
3. Ölhaltige Essenzen
4. Nährstoffmangel in Getränken auf Essenzenbasis und süßstoffgesüßten AfG

Insbesondere aufgrund der hohen Säuregehalte können lediglich nur wenige acidotolerante oder acidophile Bakterien der Gattungen *Alicyclobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* und *Weissella* als Verderbsorganismen in Erscheinung treten (Yamazaki *et al.*, 1996; Kusano *et al.*, 1997). Nach

Back (2000, 2008) handelt es sich bei den Milchsäurebakterien hauptsächlich um *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Weissella confusa*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* und insbesondere um Vertreter der *L. casei/L. paracasei*-Gruppe. Als obligat getränkeschädlich erwies sich zudem *L. perolens*, der insbesondere durch massive Diacetylbildung (bis zu 7,5 ppm) zum nachhaltigen Verderb alkoholfreier Getränke sowie von Weißbieren führte. Auf dieser Eigenschaft beruht seine Namensgebung. *L. perolens* weist morphologisch große Ähnlichkeit mit den Vertretern der *L. casei/L. paracasei* Gruppe auf, wächst aber auf MRS-Agar etwas langsamer und bildet längere und etwas schlankere Stäbchen. Wie diese bildet er auf fakultativ heterofermentativem Weg L(+)-Laktat, unterscheidet sich jedoch durch positive Melibiose- und negative Mannitverwertung. Die Zellwände enthalten Glycerin-Teichonsäuren und der G+C-Gehalt der DNS beträgt zwischen 49 bis 53 mol%. Molekularbiologisch erfolgte die Analyse von *L. perolens*-Isolaten mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese zur Bestimmung der Ganzzellproteine und durch vergleichende 16S rDNS Sequenzanalyse. Die elektrophoretische Bestimmung der Ganzzellproteine ergab für *L. perolens*-Stämme, im Vergleich zu nahezu allen bis 1999 bekannten Laktobazillen-Arten, sowie zu repräsentativen Vertretern der Gattungen *Pediococcus*, *Leuconostoc* und *Weissella*, eine eigene Einheit mit einer nur 65 %igen Ähnlichkeit zum nächsten Nachbarcluster (*P. inopinatus*, *P. damnosus*). Die Eigenständigkeit von *L. perolens* wurde durch die Sequenzierung der kompletten 16S rDNA bestätigt. Hier betrug die Ähnlichkeit zu allen bis 1999 in der 16S rDNS Datenbank vorhandenen Milchsäurebakterien weniger als 93 %.

L. perolens wird folgendermaßen beschrieben:

L. perolens (per.o`lens, Latin prefix *per* through, penetrating; L. part. adj. *olens* having an odor; M.L. part. adj. *perolens* offensive smelling).

Es handelt sich um fakultativ anaerobe grampositive, Katalase-negative, nicht sporulierende, unbewegliche Stäbchen mit runden Enden und einer Durchschnittsgröße von 0,7 bis 2,5 µm. Die Stäbchen treten einzeln, zu zweit oder in kurzen Ketten auf. Die Kolonien auf MRS-Agar sind flach oder leicht erhaben, wellig oder gezahnt, mit matter Oberfläche und beiger bis schmutzig-weißer Farbe und einem durchschnittlichen Durchmesser von 2,5 mm. Wachstum findet bis 42 °C statt, mit Optimum von 28 bis 32 °C, kein Wachstum unter 15 °C.

Der Stoffwechsel ist fakultativ heterofermentativ unter Bildung von L(+)-Laktat. Säure wird gebildet aus Melezitose, Melibiose, Amygdalin, D-Fruktose, D-Galaktose, Cellobiose, Glukose, Maltose, D-Mannose, Raffinose, Saccharose, Trehalose und manchmal aus L-Arabinose, D-Xylose, Dextrin, Laktose, Salicin, und D-Sorbit. Weder Säure noch Gas werden gebildet aus: D-Ribose, D-Mannit und L-Rhamnose. Äsculin wird verstoffwechselt und es erfolgt keine Reduktion von Nitrat und keine Hydrolyse von Gelatine. Arginin-Decarboxylase-Aktivität ist nicht nachweisbar. Urease und H₂S werden nicht produziert. Die Zellwände enthalten Glycerin-Teichonsäuren. Der mol% G+C Gehalt der DNS beträgt 49 bis 53 (T_m), der des Typstammes 51 (T_m).

Der Typ-Stamm von *L. perolens* ist unter DSM 12744^T in der DSMZ hinterlegt (LMG 18396).

2.2.4 *Lactobacillus backi* Bohak, Thelen and Beimfohr sp. nov.

Lactobacillus backi (Description of *Lactobacillus backi* sp. nov., an Obligat Beer-Spoiling Bacterium; s. Kap. 3)

Lactobacillus backi wächst ohne Adaptationsphase in stark gehopften Bieren mit bis 32 EBC BU unter pH-Wert Absenkungen von 0,1 bis 0,2 Einheiten. Damit ist er den obligat bierschädlichen Laktobazillen zuzurechnen, zu denen bislang in erster Linie *L. lindneri* und Stämme von *L. brevis* gehörten. Er unterscheidet sich von diesen zellmorphologisch ganz klar und ähnelt *L. coryniformis*, da er unregelmäßige herz-, keulen- und tropfenförmige Stäbchen bildet, die einzeln, in Paaren oder in kurzen gezackten Ketten mit 5 bis 10 Gliedern vorliegen. *L. backi* hat homofermentativen Charakter, auf den aufgrund fehlender CO₂-Bildung aus Glukose, Maltose und Gluconat geschlossen wurde. Das Zuckerspektrum ist begrenzt: Säure wird nur aus D-Fruktose, Glukose, D-Mannit, D-Mannose, Salicin und D-Sorbit gebildet. Der G+C-Gehalt liegt bei 37 mol% (*L. coryniformis*: 45 mol%, Back, 1994a). Die Analyse der 16S rDNS Sequenzen (1483 bp, 1419 bp und 1428 bp) zeigt für die drei sequenzierten *L. backi* Stämme untereinander eine Ähnlichkeit von 99,3 % und ergibt eine enge monophyletische Gruppe. Die Ähnlichkeit zu seinen phylogenetisch nächsten Verwandten *L. coryniformis* ssp. *coryniformis* und *L. coryniformis* ssp. *torquens* ist 96,2 bis 96,6 % bzw. 95,8 bis 96,3 %. Alle anderen Spezies sind

entfernter verwandt, so dass *L. backi* als neue Art in der Gattung *Lactobacillus* anzusehen ist.

Lactobacillus backi wird folgendermaßen beschrieben:

Lactobacillus backi (ba.cki N.L. gen. n. of Back, named in honor to Werner Back, who contributed to the general classification of beer-spoiling bacteria and brewing microbiology).

Es handelt sich um grampositive, Katalase-negative, nicht sporulierende, meist unregelmäßige Stäbchen mit runden Enden und einer Durchschnittsgröße von 0,7 bis 2,0 µm. Zellmorphologisch ist große Ähnlichkeit mit *L. coryniformis* gegeben. Die Zellen treten einzeln, paarweise und gelegentlich in kurzen Ketten auf. Die Kolonien auf NBB-Agar sind klein (1 bis 2 mm), flach oder leicht erhaben, weiß und glatt. *L. backi* wächst gut unter fakultativ anaeroben Bedingungen bei einem Temperatur-optimum von 28 °C. Das Temperaturmaximum liegt bei 36 °C. Wachstum unter 15 °C wurde nicht festgestellt. Wachstum findet bei pH-Werten von 4,5 bis 6,5 statt (kein Wachstum über pH 8,0). Der Stoffwechselweg ist homofermentativ unter Produktion von DL-Laktat. Säure wird nur gebildet aus D-Fruktose, Glukose, D-Mannose, Salicin und manchmal aus D-Sorbit und D-Mannit. Es wurde keine Gasbildung aus Glukose und Gluconat festgestellt. Äsculin wird nicht verwertet und Gelatine wird nicht hydrolysiert. Arginin-Decarboxylase Aktivität ist nicht nachweisbar. Urease und H₂S werden nicht produziert und es erfolgt keine Nitratreduktion. Der G+C Gehalt der DNS beträgt 37 mol% (T_m). Der Typstamm, hinterlegt bei der DSMZ, hat die Nummer DSM 18080^T (LMG 23555^T).

3 Originalveröffentlichungen (Original Papers)

Der jeweilige Beitrag der Promovendin bestand im Isolieren, Erkennen der Neuartigkeit der Isolate und der Durchführung der notwendigen Experimente zur taxonomischen Beschreibung der neuen Arten.

- I. BACK, W., BOHAK, I., EHRMANN, M., LUDWIG, W., and K. H. SCHLEIFER. **1996**. Revival of the Species *Lactobacillus lindneri* and the Design of a Species Specific Oligonucleotide Probe. System. Appl. Microbiol. 19, 322–325
- II. BOHAK, I., BACK, W., RICHTER, L., EHRMANN, M., LUDWIG, W., and K. H. SCHLEIFER. **1998**. *Lactobacillus amylolyticus* sp. nov., Isolated from Beer Malt and Beer Wort. System. Appl. Microbiol. 21, 360–364
- III. BACK, W., BOHAK, I., EHRMANN, M., LUDWIG, W., POT, W., KERSTERS, K., and K. H. SCHLEIFER. **1999**. *Lactobacillus perolens* sp. nov., a Soft Drink Spoilage Bacterium. System. Appl. Microbiol. 22, 354–359
- IV. BOHAK, I., THELEN, K., and C. BEIMFOHR. **2006**. Description of *Lactobacillus backi* sp. nov., an Obligate Beer-Spoiling Bacterium. Monatsschrift für Brauwissenschaft (60), 78–82

System. Appl. Microbiol. 19, 322–325 (1996)
 © Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · Jena · New York

Revival of the Species *Lactobacillus lindneri* and the Design of a Species Specific Oligonucleotide Probe

WERNER BACK¹, INGRID BOHAK¹, MATTHIAS EHRMANN², WOLFGANG LUDWIG³,
 and KARL HEINZ SCHLEIFER³

¹ Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Technische Universität München, D-85350 Freising

² Current address: Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Technische Universität München, D-85350 Freising

³ Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, D-80290 München

Received February 12, 1996

Summary

Chemotaxonomic studies were performed on strains of lactobacilli of uncertain taxonomic position isolated from spoiled beer. Five strains were found to be distinct from other *Lactobacillus* species. Their morphology and physiology agree with that of a *Lactobacillus* species which was previously designated "*Lactobacillus lindneri*". The separate species status of these strains was confirmed by comparative 16S rRNA gene sequence analysis. We propose *L. lindneri* as a valid species of the genus *Lactobacillus*. Strain DSM 20690 is proposed as the type strain. An rRNA targeted oligonucleotide probe allows a reliable identification of *L. lindneri*.

Key words: *Lactobacillus lindneri* – Oligonucleotide probe – Taxonomy

Introduction

The first mention of "*Lactobacillus lindneri*" was made in 1901 by Henneberg as "*Bacillus lindneri*" (Henneberg, 1901). Further specifications of these organisms were given by Lindner (1909) ("*Bacillus lindneri*") and 1926 by Henneberg ("*Bacterium lindneri*"). In these publications the strains have already been recognized as typical spoiling organisms of "hopped lager beer". They were characterized by an optimal growth temperature of 21 °C to 23 °C, with a maximum at 33 °C, a narrow range of carbohydrate fermentation as well as a relatively high ethanol tolerance (9%). Cultivation in beer results in a remarkable increase of cell length (up to 20 µm) whereas on the other hand very short or almost coccoid cells forming chains comparable to those of streptococci have been observed under optimal growth conditions. The physiological properties were typical for that of beer spoiling bacteria (Back, 1981). Organisms with very similar properties were also described by Eschenbecher as *Lactobacillus brevis* var. *lindneri* (Eschenbecher, 1968). In the present study typical beer spoiling lactobacilli, whose cell morphology resembles that of "*Bacterium lindneri*" (Henneberg, 1926), were

physiologically and genotypically characterized to clarify their taxonomic status.

Material and Methods

Organisms and growth conditions. The bacterial strains studied and reference strains used for evaluating the probe specificity are listed in Table 1. Strains L2, L182, L40 and L23 were isolated from spoiled beer bottles or brewing yeast. The typical beer spoiling organisms were cultivated on NBB-media (Back, 1980) and the other lactobacilli on MRS-Medium (De Man et al., 1960) at the optimum temperature of 25 to 27 °C. Cultures were incubated with a CO₂ overlay. Pure cultures were stored in glycerol at –20 °C.

Physiological and biochemical tests. The physiological and biochemical tests were carried out as previously described (Back, 1978). DNA base composition was determined by the thermal denaturation method according to Huss et al., (1983). Cell walls were prepared and analysed by the method of Schleifer and Kandler (1972). Methods used to extract and detect teichoic acid were described by Fiedler et al. (1981) and Albertsheim et al.

Table 1. Origin of strains studied and reaction of membrane bound nucleic acids with probes

Species	Strain ¹	Reaction with probe	
		Lbl	universal
<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM 20690 ^T	+	+
<i>Lactobacillus lindneri</i>	WS L2	+	+
<i>Lactobacillus lindneri</i>	WS L40	+	+
<i>Lactobacillus lindneri</i>	WS L182	+	+
<i>Lactobacillus lindneri</i>	WS L23	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 20079 ^T	-	+
<i>Lactobacillus collinoides</i>	DSM 20515 ^T	-	+
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 20054 ^T	-	+
<i>Lactobacillus buchneri</i>	DSM 20057 ^T	-	+
<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 20052 ^T	-	+
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	DSM 20203 ^T	-	+
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSM 20176 ^T	-	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 20174 ^T	-	+
<i>Lactobacillus pentosus</i>	DSM 20314 ^T	-	+
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM 20016 ^T	-	+
<i>Lactobacillus sanfrancisco</i>	DSM 20451 ^T	-	+

¹ DSM, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; WS, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Technische Universität München, Weihenstephan, Germany

(1967). The electrophoretic mobility of L-LDH and D-LDH was examined by the method of Hensel et al. (1977).

16S rRNA sequence analysis. Genomic DNA was extracted and purified as described by Lewington et al. (1987).

In vitro amplification of 16S rRNA genes and direct sequencing of the amplified DNA-fragments were done as previously described (Springer et al. 1993).

Data analysis. The total 16S rRNA sequences of *L. lindneri* DSM 20690^T (T = type strain), *L. lindneri* L2 and *L. lindneri* L40 were determined and deposited in the EMBL sequence data bank. Accession numbers are X95421, X95422, and X95423, respectively.

The 16S rRNA primary structure was added to an alignment of more than 4000 homologous bacterial sequences. Similarity matrix (Table 2) and parsimony analyses of a set of relevant sequences including all available 16S rRNA sequences from gram-positive bacteria with low DNA G+C contents (Van de Peer et al., 1994; Maidak et al., 1994) were performed by using

the ARB program package (Strunk et al., submitted for publication).

In addition the program fast DNAm1 (Maidak et al., 1994) was used for maximum likelihood analysis of a smaller data set including 16S rRNA sequences of selected representatives of lactobacilli (Fig. 1).

Design and evaluation of a rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for *Lactobacillus lindneri*. Probe design, dot blot hybridizations with radioactively labeled probes and evaluation of specificity were performed as previously described (Ehrmann et al., 1992). The sequence of the oligonucleotide used as specific probe for *L. lindneri* (Lbl) was 5'TCG GTC AGA TCT ATC GTC 3'. The sequence of the universal probe (606R) used for control hybridizations was 5'GGT GTG ACG GGC GGT 3'. For each probe the hybridization temperature was 40 °C, whereas the temperature for specific washing was 50 °C for Lbl and 46 °C for the universal probe.

Table 2. Matrix of overall 16S rRNA sequence similarity values for *Lactobacillus* spp.

Species	% rRNA sequence similarity with						
	<i>E. coli</i> strain K12	<i>L. buchneri</i> DSM 20057 ^T	<i>L. hilgardii</i> LMG 11696	<i>L. fructivorans</i> DSM 20203 ^T	<i>L. kefir</i> DSM 20587 ^T	<i>L. lindneri</i> DSM 20690 ^T	<i>L. sanfrancisco</i> DSM 20451 ^T
<i>E. coli</i> strain K12	100						
<i>L. buchneri</i> DSM 20057 ^T	76.91	100					
<i>L. hilgardii</i> LMG 11696	77.67	97.28	100				
<i>L. fructivorans</i> DSM 20203 ^T	77.81	93.68	93.79	100			
<i>L. kefir</i> DSM 20587 ^T	77.44	97.96	96.10	94.16	100		
<i>L. lindneri</i> DSM 20690 ^T	76.43	91.54	92.30	96.16	93.06	100	
<i>L. sanfrancisco</i> DSM 20451 ^T	77.09	91.71	92.06	94.64	93.26	96.71	100

¹ DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; LMG, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium; T, type strain

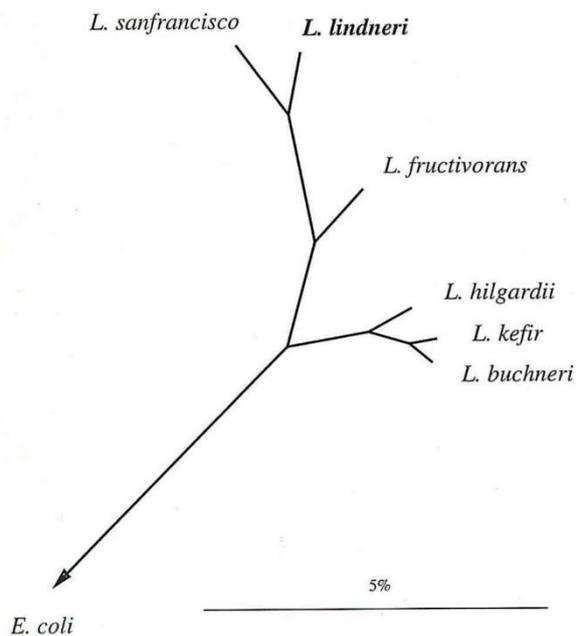


Fig. 1. Phylogenetic tree showing the relationships of *L. lindneri* and related lactobacilli. The tree was constructed by using a maximum-likelihood approach as implemented in the fastDNAmI program of Olsen (Maidak et al., 1994). The tree was based on a data set of sequences that included only positions which are shared by individual residues in at least 50% of all available *Lactobacillus* 16S rRNA sequences. The bar indicates 5% estimated substitutions per sequence position.

Results and Discussion

Morphological, physiological and biochemical properties

The studied beer spoiling bacteria showed changes in their cell morphology depending on strain and cultivation methods. In beer the cells grew to very long regular rods occurring singly or in pairs. In media like NBB, which allow optimal growth, cells were either pleomorphic rods with sharp-edged ends or coccoid, sometimes occurring in chains (Back, 1994). All strains studied spoiled beers usually by causing turbidity, sedimentation as well as acidification. Their natural habitat in breweries were fermentation rooms, storage cellars and yeast stores. The capability of beer spoilage of the strains studied, mainly depended on the nutrient supply of the media.

In beer ethanol concentrations up to 7% and a relatively high hop content (45 bitter units) were tolerated. Growth was significantly enhanced by the presence of so far unidentified products from yeast metabolism (data not shown).

The strains studied can be clearly distinguished from other beer spoiling bacteria by a narrow range of carbohydrate utilization. Only glucose, maltose and in some cases fructose are fermented. Gas is produced from glucose but

not from gluconate. Ammonia is not formed from arginine. As expected from their spoiling potential low pH-values (3.8 to 3.9) are tolerated in beer.

The low G+C content of 35 mol% distinguishes them from other known beer spoiling species of lactobacilli containing G+C compositions of 39 to 46 mol% (Back, 1994). The strains contain no teichoic acid (Schillinger, 1985).

All strains isolated from beer clearly differ from strains isolated from sourdough which have been described by Spicher and Schröder (1978) and designated "*L. brevis* var. *lindneri*". Chemotaxonomic and DNA-DNA hybridization studies clearly indicate that the latter strains are more closely related to *L. sanfrancisco*. (Weiss and Schillinger, 1984; Schillinger, 1985). DNA of strains of "*L. brevis* var. *lindneri*" isolated from sourdough showed high similarity values (97–101%) to DNA of *L. sanfrancisco* DSM 20451 and their cell wall contain the same type of murein (Lys-DAla) whereas the peptidoglycan of *L. lindneri* described in this publication is of the Lys-DAsp type. In this context a separate species status of *L. lindneri* has already been recognized by Schillinger but no valid species description has been published so far (Schillinger, 1985).

Phylogenetic relationship

The 16S rRNA sequences of the strains *L. lindneri* DSM 20690^T, L2 and L40 were determined and deposited in the EMBL sequence data bank.

Thy phylogenetic tree (Fig. 1) shows a close relationship to *L. sanfrancisco* originally isolated from sourdough.

Probe design and hybridization studies

Comparative analysis of 16S rRNA gene sequences revealed a region that can be used as a specific target site. The specificity of the probe was checked by dot blot hybridization to membrane-bound crude nucleic acids of 16 different *Lactobacillus* strains. No cross-hybridization to nucleic acids of 11 different *Lactobacillus* species used as controls could be detected. Apart from *L. lindneri* DSM 20690^T, nucleic acids from four additional strains of *L. lindneri* reacted with the probe (Table 1).

Description of *Lactobacillus lindneri* (ex Bergey et al. 1923) nom. rev.

L. lindneri (lind'neri. L. gen. n. lindneri of Lindner, referring to Lindner, a German bacteriologist).

Cells are rod-shaped (0.9 to 5 µm depending on the media), occurring singly, in pairs or in chains. Dependent on the medium some strains show a strong tendency to alter their cell length and chain length. Colonies are usually small (2mm), smooth, low convex and flat with white colour on NBB-agar. Cells are gram-positive, non-motile; microaerophilic, catalase negative and heterofermentative. Growth occurs at 15 °C to 30 °C but not above, optimum at 22 °C to 25 °C; growth occurs at initial pH values of 5.8, some strains at 5.4; optimum at pH 4.6 to 5.2; no growth at or above pH 6.5.

Acid and gas are produced from glucose and maltose

and in some cases from fructose. Neither acid nor gas are produced from amygdalin, arabinose, cellobiose, dextrin, galactose, gluconate, lactose, mannitol, mannose, melezitose, melibiose, raffinose, rhamnose, ribose, sucrose, sorbitol, salicin, trehalose, xylose. Aesculin and gelatine are not hydrolysed; arginine decarboxylase was not detected. Urease and H₂S are not produced; nitrate is not reduced to nitrite. All strains produce DL-lactate. The peptidoglycan is of the lysine-D-iso-asparagine (Lys-DAsp) type and cell wall do not contain teichoic acid. Electrophoretic mobility of L-LDH and D-LDH is 1.15 and 1.61, respectively (Back, 1987).

The mol% G+C content of DNA is 35 mol% (T_M);

Habitat: isolated from spoiled beer;

The type strain is DSM 20690.

References

- Albersheim, P., Nevins, D. J., Englis, P. D., Karr, A.: A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 5, 340–345 (1967)
- Back, W.: Zur Taxonomie der Gattung *Pediococcus*. Phänotypische und genotypische Abgrenzung der bisher bekannten Arten sowie Beschreibung einer neuen bierschädlichen Art: *Pediococcus inopinatus*. *Brauwissenschaft* 31, 237–250 (1978)
- Back, W.: Bierschädliche Bakterien. Nachweis und Kultivierung bierschädlicher Bakterien im Betriebslabor. *Brauwelt* 120, 1562–1569 (1980)
- Back, W.: Bierschädliche Bakterien. Taxonomie der bierschädlichen Bakterien. Grampositive Arten. *Monatsschrift für Brauerei* 34, 267–276 (1981)
- Back, W.: Neubeschreibung einer bierschädlichen Laktobazillen-Art: *Lactobacillus brevisimilis* spec. nov. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 12, 484–488 (1987)
- Back, W.: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil 1. Kultivierung/Methoden, Brauerei, Winzerei, Hans Carl Verlag, Nürnberg (1994)
- Bergey, D. H., Harrison, F. C., Breed, R. S., Hammer, B. W., Huntoon, F. M.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Baltimore, The Williams & Wilkins Co. (1923)
- De Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E.: A medium for cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.* 23, 130–135 (1960)
- Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K. H.: Species specific oligonucleotide probe for the identification of *Streptococcus thermophilus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 453–455 (1992)
- Eschenbecher, F.: Zur Kenntnis der biersäuernden Laktobazillen. *Brauwissenschaft* 21, 424–437 (1968)
- Fiedler, F., Schäffler, M. J., Stackebrandt, E.: Biochemical and nucleic acid hybridization studies on *Brevibacterium linens* and related strains. *Arch. Microbiol.* 129, 85–93 (1981)
- Henneberg, W.: Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien der Brenneimaische, der Milch, und des Bieres. *Wochenschrift Brau* 18, 381–384 (1901)
- Henneberg, W.: *Handbuch der Gärungs bakteriologie*, 2. Aufl., Bd. II. Spezielle Pilzkunde. Unter besonderer Berücksichtigung der Hefe-, Essig- und Milchsäurepilze. Verlagsbuchhandlung, Paul Parey, Berlin (1926)
- Hensel, R., Mayr, U., Stetter, K. O., Kandler, O.: Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. I. Purification and kinetics of the allosteric L-lactic acid dehydrogenase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* and *Lactobacillus curvatus*. *Arch. Microbiol.* 112, 81–93 (1977)
- Huss, V. A. R., Festl, H., Schleifer, K. H.: Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 184–192 (1983)
- Lewington, J., Greenaway, S. P., Spillane, G. J.: Rapid small scale preparation of bacterial genomic DNA, suitable for cloning and hybridization analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 5, 51–53, (1987)
- Lindner, P.: *Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben*. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, 5. Auflage, Berlin (1909)
- Maidak, B. L., Larsen, N., McCaughey, M. J., Overbeek, R., Olsen, G., Fogel, K., Blandy, J., Woese, C. R.: The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* 22, 3485–3487 (1994)
- Schillinger, U.: Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Milchsäurebakterien, PhD-thesis, Ludwigs-Maximilian Universität München (1985)
- Schleifer, K. H., Kandler, O.: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bact. Rev.* 36, 407–477 (1972)
- Spicher, G., Schröder, R.: Die Mikroflora des Sauerteiges. IV. Mitteilung Untersuchungen über die Art in "Reinzuchtsauern" anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 167, 342–354 (1978)
- Springer, N., Ludwig, W., Amann, R., Schmidt, H. J., Görtz, H. D., Schleifer, K. H.: Occurrence of fragmented 16S rRNA in an obligate bacterial endosymbiont of *Paramecium caudatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9892–9895 (1993)
- Strunk, O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Hermann, S., Stuckmann, N., Nonhoff, B., Lenke, M., Ginhart, A., Vilbig, A., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K. H., Ludwig, W.: ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* submitted.
- Van de Peer, Y., Van den Broeck, I., De Rijk, P., De Wachter, R.: Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res.* 22, 3488–3494 (1994)
- Weiss, N., Schillinger, U.: *Lactobacillus sanfrancisco* nov. spec., nom. rev. *Syst. Appl. Microbiol.* 5, 230–232 (1984)

Prof. Dr. Karl Heinz Schleifer, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, D-80290 München

Lactobacillus amylolyticus sp. nov., Isolated from Beer Malt and Beer Wort

INGRID BOHAK¹, WERNER BACK¹, LOTHAR RICHTER², MATTHIAS EHRMANN², WOLFGANG LUDWIG², and KARL HEINZ SCHLEIFER²¹Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany²Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München, Germany

Received May 5, 1998

Summary

Some of the strains used for the biological acidification in breweries belong to *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* or *L. fermentum*. However, more recent studies showed that most strains isolated are physiologically different from the above mentioned species and were tentatively allocated to *Lactobacillus amylovorus*. Genotypic studies of 25 strains exclusively isolated from beer malts and beer worts, showed, that there were differences to the type strain of *L. amylovorus* concerning DNA-DNA similarities and the sequences of their 16S and 23S rRNA genes. Therefore, we propose to combine these strains in a new species of the genus *Lactobacillus*, namely *L. amylolyticus*. Strain DSM 11664 is proposed as the type strain. An rRNA targeted oligonucleotide probe was designed that allows a fast and reliable identification of *Lactobacillus amylolyticus*.

Key words: *Lactobacillus amylolyticus* – Thermophilic lactobacilli – Acidification of beer malt and beer wort – Oligonucleotide probe – Taxonomy

Introduction

The natural development of thermophilic lactic acid bacteria in malt mashes had already been examined by LINDNER (1887). In 1896 LEICHMANN described lactic acid forming rods producing lactic acid in distillery-mashes used for the acidification of yeast. He called them “*Bacillus Delbrücki*” (LEICHMANN, 1896). LAFAR also isolated from acidified yeast mashes a lactic acid forming bacterium that he referred to as “*Bacillus acidificans longissimus*” (LAFAR, 1896). Later on, it was found to be identical with “*Bac. Delbrücki*” (HENNEBERG, 1901). The main characteristics of representatives of this species are according to HENNEBERG (1901, 1905) as follows: They occur predominantly on germinated barley, green malt and cured malt. They grow well in unhopped beer wort at an optimum temperature of 47 °C to 48 °C. They form D(-)-lactic acid, whereby in the presence of air the lactate production was significantly lower than under anaerobic growth conditions.

The so called “biological acidification” of beer mashes and/or beer worts considerably improves the quality of beer (NARZISS and HEIDEN 1971, NARZISS and KIENINGER 1973, BACK 1994). It is still carried out, as originally described by JOERGENSEN (1909), by applying thermophilic lactobacilli. The strains used for the biological acidifica-

tion in breweries are known under the name “Delbrueckii-cultures”. Indeed, some of these strains may belong to *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* and *L. fermentum*. However, more recent studies showed that most strains isolated are physiologically different from the above mentioned species. They were tentatively allocated to *Lactobacillus amylovorus* (Back, 1988).

During the last years genotypic studies of strains of *L. amylovorus* exclusively isolated from beer malts and worts, showed, that there were differences to the type strain of *L. amylovorus*. However on the basis of physiological and biochemical properties it is very difficult to distinguish them from strains of *L. amylovorus*. Therefore in the present study a polyphasic approach was used to clarify their taxonomic status.

Material and Methods

Organisms and growth conditions. The bacterial strains studied and reference strains for evaluating the probe specificity are listed in Table 1. The strains named LA were isolated exclusively from acidified beer malts

Table 1. Origin of strains studied and reaction of membrane bound nucleic acids with rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for *L. amylolyticus*.

Species	Strain	Reaction with probe
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	LA 5	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 1-4	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 6	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 8	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 10	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 13-19	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 20	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 25-27	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 29	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 31-32	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 34	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 37	+
<i>Lactobacillus</i> species	LA 39	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 20079 ^T	-
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	LMG 9187 ^T	-
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	LMG 99188t2	-
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	LMG 9189	-
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	LMG 9496t2	-
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	DSM 20552	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	LMG 9479 ^T	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	BMF sie 38 45e	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	LA 11	-
<i>Lactobacillus gallinarium</i>	LMG 9435	-
<i>Lactobacillus gasserii</i>	DSM 20243	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	WS 176	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	LMG 9436	-

BMF	- Bundesanstalt für Ernährung, Karlsruhe, Germany
DSM	- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany
LA	- Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, TU München, Freising-Weihenstephan
LMG	- Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium
WS	- Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel, TU München, Freising-Weihenstephan

and acidified beer worts. These typical thermophilic bacteria were cultivated on MRS-Medium (DEMAN et al., 1960) at their optimum temperature of 48 °C. Cultures were incubated in the presence of CO₂. Pure cultures were stored both in glycerol at -20 °C and in unhoped wort at 4 °C. The latter storage method required a transfer to fresh medium every second week.

Physiological and biochemical tests. The physiological and biochemical tests were carried out as previously described (BACK, 1978). The only difference was the incubation temperature of 36 °C for carbohydrate fermentation tests and arginine cleavage. The determination of D- and L-lactate acid was carried out enzymatically as described in Boehringer's Manual (BOEHRINGER, 1984). DNA base composition was determined by the thermal denaturation method according to HUSS et al. (1983).

Cell walls were prepared and analysed by the method of SCHLEIFER and KANDLER (1972). Methods used to extract and detect teichoic acid were described by FIEDLER et al. (1981) and ALBERSHEIM et al. (1967).

DNA-DNA hybridization. DNA-DNA hybridization was done as filter hybridization as described by OWEN and PITCHER (1985) for the organisms listed in Table 2 with *L. amylolyticus* LA 5 - DNA as probe DNA. The probe DNA was labeled with the Random Primed DNA Labelling Kit from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany) and [α -³²P]-CTP (NEN DuPont de Nemours GmbH, Dreieich, Germany) with a specific activity of 111 Tbq/mmol as radiolabelled nucleotide.

Phylogenetic analysis. The total 16S rRNA and 23S rRNA gene sequences of *L. amylolyticus* (LA 5) DSM 11664^T (T = type strain) were determined as well as the total 16S rRNA gene sequence of *L. crispatus* DSM 20584^T and deposited in the EMBL sequence data bank. Accession numbers are Y17361, Y17360 and Y17362, respectively.

In vitro amplification and direct sequencing of 16S as well as 23S rRNA encoding DNA fragments were done as described earlier (SPRINGER et al., 1992; LUDWIG et al., 1992). The new 16S and 23S rRNA sequences were fitted into alignments of about 8000 and 200, respectively, homologous full and partial primary structures available in public databases (LUDWIG, 1995). Distance matrix,

Table 2. DNA-DNA hybridization studies under optimal (25 °C below melting temperature of DNA) and and stringent (10 °C below melting temperature of DNA) conditions. DNA of *Lactobacillus* sp. LA 5 was used as probe DNA.

Species	Strain	Hybridization conditions	
		optimal	stringent
<i>Lactobacillus</i> species	LA 5	100	100
<i>Lactobacillus</i> species	LA 3	89,8 ± 10	89,0 ± 10
<i>Lactobacillus</i> species	LA 29	79,9 ± 2	78,2 ± 2
<i>Lactobacillus</i> species	LA 39	109,2 ± 2	95,3 ± 4
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 20079 ^T	28,4 ± 10	n.d.
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	DSM 20531 ^T	17,7 ± 2	n.d.
<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSM 20584 ^T	20,7 ± 3	n.d.
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	DSM 6629 ^T	21,0 ± 2	n.d.

n.d.: not determined

maximum parsimony and maximum likelihood methods were applied for tree reconstructions as implemented in the ARB software package (STRUNK et al., 1997). Different data sets varying with respect to included outgroup reference organisms (sequences) as well as alignment positions were analyzed.

Results

Phenotypic properties

The studied thermophilic obligately homofermentative lactobacilli used for acidification of beer wort and/or beer mash showed during growth in the exponentially phase long, regular rods with rounded ends occurring singly, in pairs or in chains. In older cultures the cells were significantly shorter.

All strains studied grew well in unhoped beer worts and decreased the pH in these media from 5,7–5,5 to 3,3–2,9 within 24–48 h while producing 0,9–1,7% lactic acid (refer to worts containing extracts of 10% (w/w) and 16% (w/w), respectively). The capability of acidification power depended on the nutrient supply of worts. As the strains could neither grew in hoped wort (also in wort containing only traces of hop) nor in beer, they have no-beerspoiling character. The strains are used in the brewing process as pure cultures to decrease the pH of wort before the onset of the yeast fermentation with the effect of lower end-pH in beer (up to 4,1–4,4).

Dextrin, fructose, galactose, glucose, maltose, mannose, sucrose and in some cases salicine, esculin, amygdalin, melibiose and raffinose were fermented. Gas was neither produced from glucose, maltose nor gluconate. Ammonia was not formed from arginine. All strains produced DL-lactic acid. The peptidoglycan was of the L-lysine-D-iso-asparagine (L-Lys - D-Asp) type and cell walls contained teichoic acid. The G+C content of the DNA is 39 mol%.

16S rRNA sequence analysis

16S and 23S rRNA encoding DNA from *Lactobacillus amylolyticus* as well as 16S rDNA from *L. crispatus* were amplified *in vitro* and directly sequenced. A comparative database analysis revealed highest overall 16S rRNA sequence similarities (95.4–98.9%; Table 3) for both organisms with *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. intestinalis* and *L. helveticus*. These six species represent a monophyletic subcluster of the so-called *L. acidophilus* group (SCHLEIFER and LUDWIG, 1995). The phylogenetic structure of the group is shown in Figure 1. The 23S rRNA sequence was compared with the corresponding primary structure of *L. delbrueckii*. The overall 23S rRNA similarity of *L. amylolyticus* and *L. delbrueckii* (89.6%; Table 3) is somewhat lower than the corresponding value for their 16S rRNAs (92.5%; Table 3) demonstrating the higher content of variable positions within bacterial 23S rRNA primary structures (LUDWIG and SCHLEIFER, 1994).

Design and evaluation of a rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for *L. amylolyticus* and hybridization studies

Probe design, dot blot hybridizations with radioactive labeled probes and evaluation of specificity were performed as previously described (EHRMANN et al., 1992). Comparative analysis of the 16S rRNA gene sequence revealed a region that can be used as a specific target site. The sequence of the oligonucleotide used as specific probe for *L. amylolyticus* was 5'-CCGAAGTAGATCT-GTTAG-3'. The sequence of the universal probe (97K) used for control hybridizations was 5'-CTGCTGCCTC-CCGTA-3'.

The hybridization temperature for the specific probe was 50 °C and for the universal probe 40 °C, whereas the temperature for specific washing was 51 °C for the specific probe and 44 °C for the universal probe.

Table 3. Overall 16S (lower left part) and 23S rRNA (upper right) sequence similarities of *L. amylolyticus* and other members of the *L. amylophilus* group. *L. sake* was included as an outgroup representative. Abbreviations: ace, *L. acetotolerans*; aci, *L. acidophilus*; ami, *L. amylophilus*; amo, *L. amylovorus*; amy, *L. amylolyticus*; cri, *L. crispatus*; del, *L. delbrueckii*; gas, *L. gasseri*; hel, *L. helveticus*; int, *L. intestinalis*; jon, *L. johnsonii*; L, *Lactobacillus*.

Organism	Overall rRNA sequence similarity (%)											
	amy	int	aci	amo	cri	hel	del	ace	gas	john	ami	
<i>L. amylolyticus</i>							89.6					
<i>L. intestinalis</i>	96.1											
<i>L. acidophilus</i>	96.0	94.9										
<i>L. amylovorus</i>	96.8	95.5	98.1									
<i>L. crispatus</i>	96.4	95.4	98.3	98.9								
<i>L. helveticus</i>	95.7	96.0	98.4	98.2	98.6							
<i>L. delbrueckii</i>	92.5	91.7	92.8	92.6	92.9	93.9						
<i>L. acetotolerans</i>	93.0	92.6	93.5	93.9	93.7	95.3	91.8					
<i>L. gasseri</i>	91.9	91.3	91.8	91.8	91.8	94.0	90.9	91.7				
<i>L. johnsonii</i>	91.9	91.4	91.8	91.4	91.8	93.7	91.0	91.8	99.4			
<i>L. amylophilus</i>	89.4	89.5	88.7	89.2	89.4	91.1	88.4	90.8	90.6	90.7		
<i>L. sake</i>	87.0	86.5	86.9	87.0	87.2	88.5	87.0	87.6	88.3	88.3	90.0	

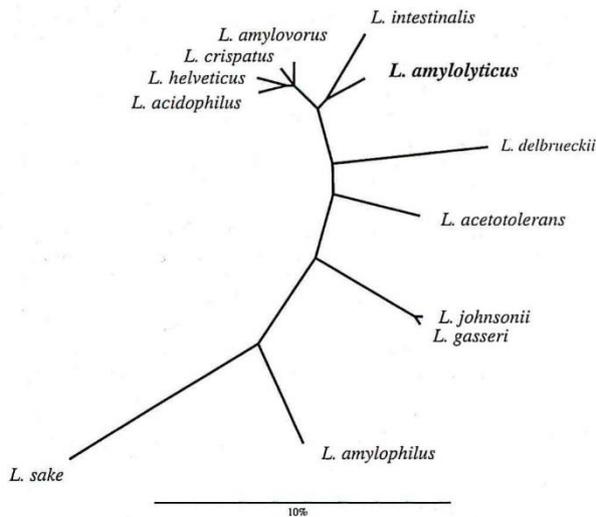


Fig. 1. 16S rRNA based tree reflecting the relationships of *Lactobacillus amylolyticus* and its closest relatives among the members of the *L. acidophilus* group of lactobacilli. The topology of the tree is based on the results of a maximum likelihood analysis. Only sequence positions which share identical residues among 50% of all available (almost) complete 16S rRNA sequences from the *L. acidophilus* group were included for tree reconstruction. Multifurcations indicate that a common relative branching order was not supported by the results obtained performing different treeing methods. The bar indicates 10% estimated sequence divergence.

The specificity of the probe was checked by dot blot hybridization to membrane bound crude nucleic acids of 38 different *Lactobacillus* strains (Table 1). No cross-hybridization to nucleic acids of 13 different *Lactobacillus* species used as controls could be detected. Apart from *L. amylolyticus* LA 5, nucleic acids from 24 additional strains of *L. amylolyticus* reacted with the probe.

DNA-DNA hybridization was done under optimal and stringent hybridisation conditions. The calculated similarity values are given in Table 2.

Discussion

According to comparative 16S rRNA sequence analysis, *L. amylolyticus* clearly is a member of the *L. acidophilus* group of lactobacilli (Schleifer and Ludwig, 1995). The phylogenetic relationships among the representatives of this group are shown in Figure 1. A common origin of *L. amylolyticus* and *L. intestinalis* is supported by the majority of phylogenetic analyses performed by applying alternative treeing methods. However, the significance of a common root of these two species is low as indicated by the (in relation to the overall branch lengths of the tree) short common branch.

relative intracluster branching order could not be unambiguously resolved. These species share a narrow range of 16S rRNA sequence similarity (98.1–98.9%; Table 3). The separate species status of *L. amylolyticus* is clearly supported by comparative 16S rRNA sequence analysis and DNA-DNA similarity studies. The overall 16S rRNA sequence similarities with the closest related *Lactobacillus* species are less than 97% and DNA-DNA similarity are below 70% justifying a separate species status (Wayne et al., 1987).

Description of *Lactobacillus amylolyticus* Bohak, Back, Richter, Ehrmann, Ludwig and Schleifer sp. nov.

L. amylolyticus (a.my.lo.ly'ti.cus. Gr. n. *amyllum* starch, Gr. ad. *lyticus* able to loose; M.L. adj. *amylolyticus* starch-digesting

Gram-positive, non spore-forming rods with rounded ends, generally 0,7–0,9 μm by 5–20 μm , occurring single, in pairs or short chains, catalase-negative. Non-motile. Colonies on MRS flat, rough, dull surface, beige to dirty-white colour; diameter 2–3 mm. Microaerophilic; growth in agar stabs occurs throughout the stab but not up to the surface. Can grow up to 52 °C; optimum at 45 °C to 48 °C; no growth at 20 °C. Optimum at pH 5 to 5,5, no growth below pH 3,5 or above pH 6. Obligately homofermentative, producing DL-lactic acid. Acid is produced from dextrin, fructose, galactose, glucose, maltose, mannose, sucrose and in some cases from salicine, amygdaline, raffinose and melibiose. Neither acid nor gas are produced from arabinose, cellobiose, lactose, mannitol, melezitose, rhamnose, ribose, sorbitol, trehalose and xylose. Esculin is hydrolysed in some cases; arginine decarboxylase was not detected. Urease and H_2S are not produced; nitrate is not reduced to nitrite. The peptidoglycan is of the L-lysine-D-iso-asparagine (L-Lys - D-Asp) type. Cell walls contain teichoic acid. The mol% G+C content of DNA is 39 (T_M).

Habitat: Brewery, unhopped wort, malt-mash, malt
The type strain is DSM 11664.

Acknowledgements

The technical assistance of F. Kultzen is highly acknowledged.

References

- ALBERSHEIM, P., NEVIS, D. J., ENGLIS, P. D., KARR, A. (1967) A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 5, 340–345.
- BACK, W. (1978) Zur Taxonomie der Gattungen *Pediococcus*. Phänotypische und genotypische Abgrenzung der bisher bekannten Arten sowie Beschreibung einer neuen bierschädlichen Art: *Pediococcus inopinatus*. *Brauwissenschaft* 31, 237–250.
- BACK, W. (1988) Biologische Säuerung. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 4, 152–156.
- BACK, W. (1994) Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil 1, Hans Carl Verlag, Nürnberg.

- Boehringer Mannheim Biochemica. (1984) Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik, Arbeitsanleitung. 57–59.
- DE MAN, J.C., ROGOSA, M., SHARPE, M.E. (1960) A medium for cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.* 23, 130–135.
- EHRMANN, M., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. (1992) Species specific oligonucleotide probe for the identification of *Streptococcus thermophilus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 453–455.
- FIEDLER, F., SCHÄFFLER, M. J., STACKEBRANDT, E. (1981) Biochemical and nucleic acid hybridization studies on *Brevibacterium linens* and related strains. *Arch. Microbiol.* 129, 85–93.
- HENNEBERG, W. (1901) Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien der Brennereimaische, der Milch und des Bieres. *Wochenschrift für Brauerei* 18, 381–384.
- HENNEBERG, W. (1905) Bakteriologische Untersuchungen an säuernden und gärenden Hefemaischen. (Ein Beitrag zur Kenntnis des Verhaltens des *Bacillus Delbrücki* bei verschiedenen Temperaturen.). *Zeitschrift für Spiritusindustrie* 28, 26–29.
- HUSS, V. A. R., FESTL, H., SCHLEIFER, H. K. (1983) Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridisation from renaturation rates. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 184–192.
- JOERGENSEN, A. (1909) Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie. 5. Aufl., Paul Parey, 123–124.
- LAFAR, F. (1896) Die künstliche Säuerung des Hefegutes in Brennereien. *Zentralblatt für Bakteriologie Abt. 2*, 2, 194–196.
- LEICHMANN, G. (1896) Über die im Brennereiprozeß bei der Bereitung von Kunsthefe auftretende spontane Milchsäuregärung (Bac. Delbrücki). *Zentralblatt für Bakteriologie Abt. 2*, 2, 281–285.
- LINDNER, P. (1887) Über ein neues in Malzmaischen vorkommendes Milchsäure bildendes Ferment. *Wochenschrift für Brauerei* 4, Nr. 23, 437–440.
- LUDWIG, W. Sequence databases. pp. 1–22. In: *Molecular microbial ecology manual*. (Akkermans, A.D.L., Ed.) Amsterdam, Kluwer, 1995.
- LUDWIG, W., KIRCHHOF, G., KLUGBAUER, N., WEIZENEGGER, M., BETZL, D., EHRMANN, M., HERTEL, C., JILG, S., TATZEL, R., ZITZELSBERGER, H., LIEBL, S., HOCHBERGER, M., LANE, D., WALLNÖFER, P.R., SCHLEIFER, K.H. (1992) Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 487–501.
- LUDWIG W., SCHLEIFER, K.H. (1994) Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 155–173.
- NARZISS, L., HEIDEN, L. (1971) Über die Anwendung von Sauermais und Sauerwürze beim Sudprozeß. *Brauwelt* 111, 435–440.
- NARZISS, L., KIENINGER, H. (1973) Über die Anwendung von Milchsäure beim Sudprozeß. *Brauwelt* 113, 53–55.
- OWEN, R. J., PITCHER, D. Current Methods for Estimating DNA Base Composition and Levels of DNA-DNA Hybridization. pp. 67–93. In: *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. (M. Goodfellow, D.E. Minnikin, eds.). Society for Applied Bacteriology Technical Series 20, London, Academic Press, 1985.
- SCHLEIFER, K. H., KANDLER, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36, 407–477.
- SCHLEIFER, K. H., LUDWIG, W. (1995) Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* 18, 461–467.
- SPRINGER, N., LUDWIG, W., DROZANSKI, V., AMANN, R., SCHLEIFER, K.H. (1992) The phylogenetic status of *Sarcobium lyticum*, an obligate intracellular parasite of small amoebae. *FEMS Microbiol. Lett.* 96, 199–202.
- STRUNK, O., GROSS, O., REICHEL, B., MAY, M., HERMANN, S., STUCKMANN, N., NONHOFF, B., LENKE, M., GINHART, A., VILBIG, A., LUDWIG, T., BODE, A., SCHLEIFER, K.H., LUDWIG, W. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* submitted.
- WAYNE, L.G., BRENNER, D.J., COLWELL, R.R., GRIMONT, P.A.D., KANDLER, O., KRICHEVSKY, M.I., MOORE, L.H., MOORE, W.E.C., MURRAY, R.G.E., STACKEBRANDT, E., STARR, M.P., TRÜPER, H.G. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846–849.

Corresponding author:

INGRID BOHAK, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Technische Universität München, D-85350 Freising-Weihenstephan, Germany

Lactobacillus perolens sp. nov., a Soft Drink Spoilage Bacterium

WERNER BACK¹, INGRID BOHAK¹, MATTHIAS EHRMANN^{2*}, WOLFGANG LUDWIG², BRUNO POT^{3**}, KAREL KERSTERS³, and KARL HEINZ SCHLEIFER²

¹ Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Technische Universität München-Weihenstephan, Freising, Germany

² Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München, Germany

³ Laboratorium voor Microbiologie and BCCMTM/LMG Bacteria Collection, Universiteit Gent, Gent, Belgium

Received June 10, 1999

Summary

Lactic acid bacteria that are able to spoil soft drinks with low pH comprise a limited number of acidotolerant or acidophilic species of the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella*. Various Gram-positive rods causing turbidity and off-flavour were isolated from orange lemonades. Physiological and biochemical studies including SDS-PAGE whole-cell protein analysis showed a homogeneous group of organisms. The 16S rRNA gene sequence analysis of two representatives revealed that they formed a phylogenetically distinct line within the genus *Lactobacillus*. All strains were facultatively heterofermentative, producing L-lactic acid. Based on the data presented a new species *L. perolens* is proposed. The name refers to the off-flavour caused by high amounts of diacetyl. The type strain of *L. perolens* is DSM 12744 (LMG 18936).

A rRNA targeted oligonucleotide probe was designed that allows a fast and reliable identification of *L. perolens*.

Key words: *Lactobacillus perolens* – Spoilage of soft drinks – Oligonucleotide probe – Protein patterns – Taxonomy

Introduction

In contrast to beer and wine soft drinks are not necessarily produced by microbiological processing. Therefore the appearance of microorganisms normally has to be rated as an undesirable contamination. Indeed soft drinks though usually containing a lot of nutrients (according to the type of beverage and the rate of juice) show a very good self protection against spoilage by microorganisms. This is attributed to (1) low pH (2.5 to 4.5) caused by high concentrations of fruit acids, (2) anaerobic conditions in carbonated soft drinks, (3) essential oils (especially in citrus lemonades) and (4) lack of nutrients (only in bright lemonades without juice). As a result of these properties only a limited number of acidotolerant or acidophilic bacteria of the genera *Alicyclobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* are able to grow in soft drinks (KUSANO et al., 1997; YA-

MAZAKI et al., 1996). Among the lactic acid bacteria relevant organisms belong to *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. plantarum* and representatives of the *L. casei* – *L. paracasei* group as most prevalent bacteria (BACK, 1993; 1999).

FUNAHASHI et al. (1998) isolated three facultatively heterofermentative *Lactobacillus* strains with a weak beer-spoilage activity from Japanese brewery environment. Moreover, phenotypic and genotypic analysis revealed that these strains were not related to any known *Lactobacillus* species, so far.

This paper describes the physiological and biochemical characteristics of various strains isolated during the last years from spoiled lemonades from European origin.

Comparative sequence analysis of 16S rDNA showed significant similarity to the 16S rRNA gene of a representative strain LA-6 of the above mentioned beer spoilage lactobacilli from Japanese breweries. On the basis of the data presented a new species *Lactobacillus perolens* is proposed.

* Present address: Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Technische Universität München-Weihenstephan, Freising, Germany

** Present address: Science Department, Yakult Belgium SA/NV, Brussel, Belgium

Materials and Methods

Organisms and growth conditions: The origin of the *L. perolens* strains studied is given in Table 1. Reference strains for evaluating the probe specificity are listed in Table 2. The *L. perolens* strains were cultivated on MRS-medium (DE MAN et al., 1960) at their optimum growth temperature (28 °C). Cultures were incubated in the presence of CO₂. Pure cultures were stored in glycerol at -20 °C.

Physiological and biochemical tests: The physiological tests were carried out as described by BACK (1999). The determination of D- and L-lactic acid was carried out enzymatically according to the manufacturer's instructions (Boehringer, Mannheim). Diacetyl was determined by the method of MEBAK (PFENNINGER, 1996). DNA base composition was determined by the thermal denaturation method according to HUSS et al. (1983).

Cell walls were prepared and analysed by the method of SCHLEIFER and KANDLER (1972) with the exception that ascending thin layer chromatography on cellulose sheets instead of paper chromatography was used. Methods used to extract and detect teichoic acid were described by FIEDLER et al. (1981) and ALBERSHEIM et al. (1967).

SDS-PAGE of whole-cell proteins: All strains were grown on MRS agar at 30 °C for 48h. Whole-cell protein extracts were prepared and SDS-PAGE analysis was performed as described previously (POT et al., 1994). Registration of the protein electrophoretic patterns, normalization of the densitometric traces, grouping of the strains by the Pearson product moment correlation coefficient (*r*) and UPGMA cluster analysis were performed by the techniques described by POT et al. (1994) using the software package GelCompar (Version 4.2; Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Phylogenetic analysis: The total 16S rRNA gene sequences of *L. perolens* L 532 and L 534 were determined. *In vitro* amplification and direct sequencing of 16S rRNA genes encoding DNA fragments were done as described earlier (SPRINGER et al., 1992; LUDWIG et al., 1992). The total 16S rDNA sequences were fitted into alignments of about 16.000 homologous full and partial primary structures available in public databases (LUDWIG, 1995). Distance matrix, maximum parsimony and maximum likelihood methods were applied for tree reconstructions as implemented in the ARB software package (LUDWIG and STRUNK, 1997). Different data sets varying with respect to included out-

Table 2. Reactions of hybridizations of different crude nucleic acids isolated from lactobacilli with DNA probe (Lbcp) specific for *L. perolens*.

Species	Strain ^a	Reaction with probe	
		Lbcp	universal
<i>L. perolens</i>	L 533	+	+
<i>L. perolens</i>	L 534	+	+
<i>L. perolens</i>	L 532 ^T	+	+
<i>L. perolens</i>	L 48	+	+
<i>L. perolens</i>	L 50	+	+
<i>L. perolens</i>	L 592	+	+
<i>L. perolens</i>	L 426	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.	L 394	-	+
<i>Lactobacillus</i> sp.	L 636	-	+
<i>L. kefiranoformis</i>	WS 2465	-	+
<i>L. crispatus</i>	LMG 11440	-	+
<i>L. amylovorus</i>	LMG 9496t2 ^T	-	+
<i>L. amylovorus</i>	DSMZ 20552	-	+
<i>L. acidophilus</i>	DSMZ 20079 ^T	-	+
<i>L. johnsonii</i>	LMG 9436 ^T	-	+
<i>L. helveticus</i>	WS 176	-	+
<i>L. gasserii</i>	DSMZ 20243	-	+
<i>L. delbrueckii</i>	Sie J845e	-	+
<i>L. alimentarius</i>	LMG 9187 ^T	-	+
<i>L. gallinarum</i>	LMG 9435	-	+

^a DSMZ – Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; LMG – BCCMTM/LMG Bacteria Collection, Laboratorium voor Microbiologie, Gent, Belgium; WS – Weihenstephan, Germany.

group reference organisms (sequences) as well as alignment positions were analyzed.

Probe design, dot blot hybridizations: Comparative analysis of the 16S rRNA gene sequence revealed a region that can be used as a specific target site. The sequence of the oligonucleotide used as specific probe for *L. perolens* was 5' - GGTAATTGGTGATG-CAAG - 3'. The sequence of the universal probe (97K) used for control hybridizations was 5'- CTGCTGCCTCCCGTA - 3'.

Table 1. Origin of *L. perolens* strains.

Species	Strain ^a	Source	Year	Geographic area
<i>Lactobacillus perolens</i>	DSMZ 12744 ^T (L 532) (LMG 18936 ^T)	Orange lemonade (Ol)	1987	Germany (G)
<i>L. perolens</i>	L 48 (LMG 18937)	Ol	1985	G
<i>L. perolens</i>	L 50	Ol	1987	G
<i>L. perolens</i>	DSMZ 12745 (L 533) (LMG 18938)	Ol	1985	Netherlands
<i>L. perolens</i>	L 534	Ol	1988	G
<i>L. perolens</i>	L 426 (LMG 18939)	Beer wort	1991	G
<i>L. perolens</i>	L 592 (LMG 18940)	Wheat beer	1992	G

^a DSMZ – Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; LMG – BCCMTM/LMG Bacteria Collection, Laboratorium voor Microbiologie, Gent, Belgium

Probe design and hybridizations assays were performed by using radioactive labeled probes as previously described (EHRMANN et al., 1992). The hybridization temperatures for the specific probe was 50 °C and for the universal probe 40 °C, whereas the temperature for specific washing was 51 °C for the specific probe and 44 °C for the universal probe.

Results

Phenotypic properties

The studied soft drink spoiling facultatively heterofermentative lactobacilli showed somewhat longer and more slender regular rods than *L. casei*, with rounded ends occurring singly, in pairs or in short chains. All strains (also the non-beer spoiling strains from brewery environment) grew well in orange lemonade and bright citrus lemonade and spoiled these beverages, specially the latter one, by causing turbidity and sedimentation. Due to the strong formation of diacetyl up to an amount of 7,5 ppm soft drinks got completely undrinkable. Diacetyl formation occurred independently of cultivation media. The spoiling characteristics of *L. perolens* in comparison to the other relevant strains of *Weissella*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* are summarized in Table 3. The strains studied can be clearly distinguished from the other relevant soft drink bacteria by a different carbohydrate fermentation pattern. The main characteristics are the fermentation of D(+)-melezitose and melibiose but never of D(-)-ribose, D(-)-mannitol and L(+)-rhamnose. Further esculin, amygdalin, D(-)-fructose, D(+)-galactose, cellobiose, glucose, maltose, D(+)-mannose, raffinose, sucrose, trehalose and in some cases L(+)-arabinose, D(+)-xylose, dextrin, lactose, salicin and D(-)-sorbitol are fermented. Gas is produced from gluconate but not from glucose and maltose. Ammonia is not formed from L-arginine. All strains produce L-lactic acid. The peptidoglycan is of the L-lysine-D-iso-asparagine (L-Lys-D-Asp) type and cell walls contain glycerol-teichoic acid. The relative high G+C content of 49–53 mol% distinguishes *L. perolens* from all other known soft drink spoilage bacteria.

SDS-PAGE of whole-cell proteins

The reproducibility of the method was estimated by triplicate analysis of at least three *L. perolens* strains and was found to be between 91 and 94%, with an average of 92% (Fig. 1, duplicates of strain L533). The reproducibility of the electrophoretic procedure, however, was found to be over 95%. The fairly low overall reproducibility observed (which is normally between 93 and 96%) most probably relates to the slow growth (48 h) of the *L. perolens* strains on MRS agar.

For identification purposes the electrophoretic protein patterns of the *L. perolens* strains have been compared to a database covering all known species of *Lactobacillus* (except *L. iners* and *L. kunkeei*) as well as most other species of lactic acid bacteria, including those known to be involved in spoilage of beer and soft drinks. No significant correlation was found, indicating that the strains consisted of a previously unidentified taxonomic entity. A partial dendrogram, which displays also the visual differences in electrophoretic patterns is shown in Fig. 1. Protein patterns of representative species of the genera *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* have been included. The separate position of *L. perolens* with a similarity of 65% to its closest neighbour clearly indicates a separate taxonomic status, which is confirmed by 16S rDNA sequence analysis.

Fig. 1 shows that the protein electrophoretic cluster of *L. perolens* is composed of two subclusters. The main differences in the protein patterns between the two subclusters are situated in the molecular weight zone between 32.000 and 50.000 dalton. More genotypic comparisons might be necessary to estimate the exact taxonomic weight of these differences observed.

16S rRNA sequence analysis

The total 16S rRNA gene sequences of the strains *L. perolens* L 532 and L 534 were determined (1544bp) and deposited in the EMBL sequence data bank (accession numbers Y19176 and Y19168, respectively). Both sequences showed a sequence similarity of 98.4% amongst themselves.

Table 3. Damages in carbonated bright soft drinks caused by various lactic acid bacteria

Strains	Frequency of occurrence ^a	Turbidity	Sediment	Sensorics	Slime production
<i>Lactobacillus perolens</i>	c	+	+	Diacetyl	–
<i>L. casei</i> - <i>L. paracasei</i> -group	vc	+	+	Diacetyl	–
<i>L. plantarum</i>	c	+	+	Diacetyl	–
<i>L. brevis</i>	s	w	w	–	–
<i>L. buchneri</i>	s	w	w	–	–
<i>Leuconostoc</i> sp.	vc	+	+	Diacetyl	+
<i>Weissella confusa</i> ^b	vs	w	w	–	w

^a vc – very common; c – common; s – seldom; vs – very seldom; w – weak effect; + pronounced effect; – no effect.

^b only in soft drinks with pH > 4,5.

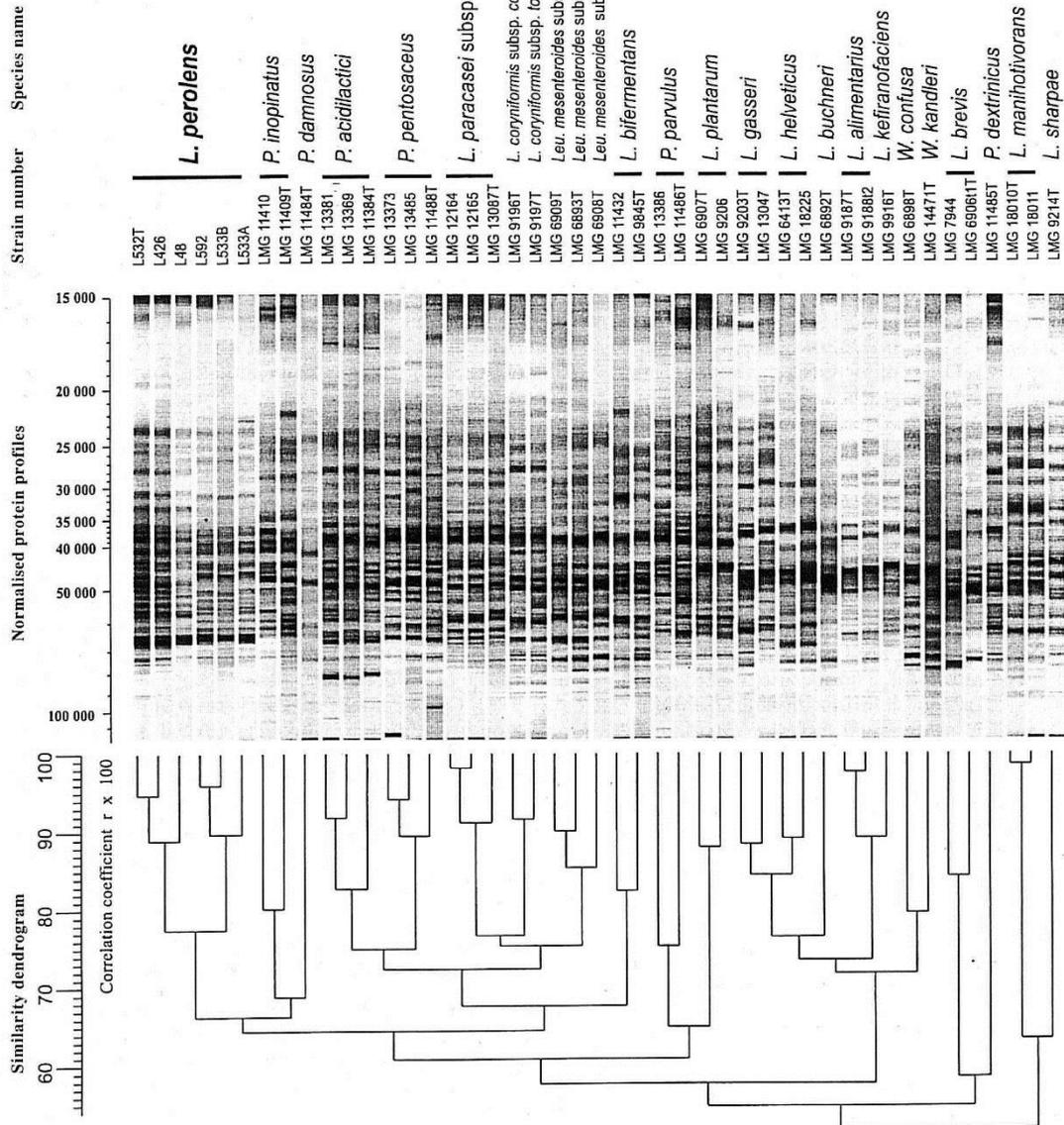


Fig. 1. Protein patterns of *L. perolens* strains and reference strains of various lactic acid bacteria and corresponding dendrogram derived from the unweighted pair group average linkage for correlation coefficients *r* (expressed for convenience as a percentage value). The molecular weight axis is on top of the normalized protein profiles. On the right hand side of the figure are the strain numbers and the cluster delineation by species. Abbreviations: *L.*, *Lactobacillus*; *Leu.*, *Leuconostoc*; *P.*, *Pediococcus*; *W.*, *Weissella* and *T.*, type strain. All reference strains are from the BCCMTM/LMG Bacteria Collection, Laboratory of Microbiology, Universiteit Gent, Belgium. L533A and L533B represent patterns of two independently grown subcultures of strain L533.

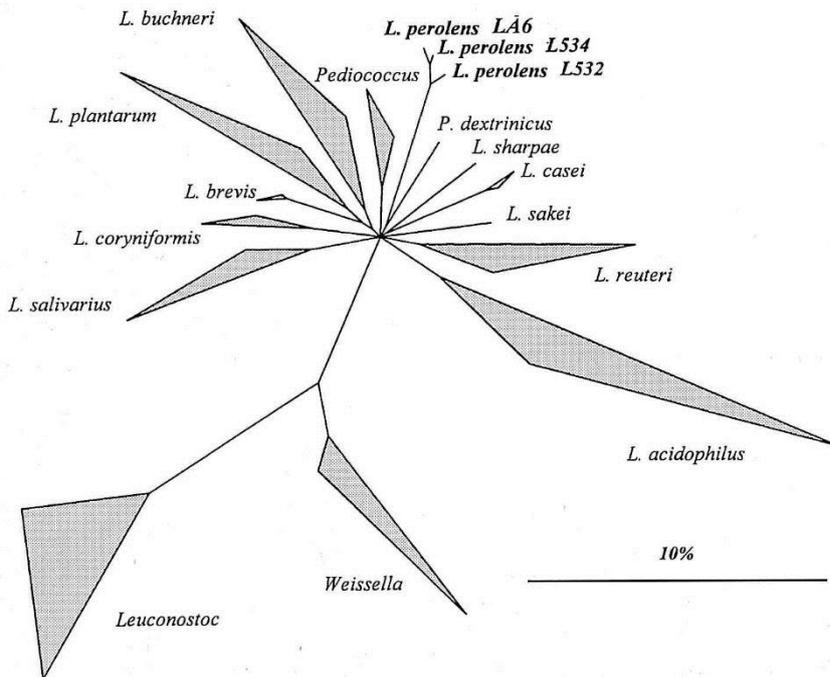


Fig. 2. 16S rRNA based tree showing the position of *L. perolens* among other members of the lactic acid bacteria. The consensus tree is based on maximum parsimony analyses of the complete data set of about 16.000 small subunit rRNA sequences. The topology was evaluated and corrected according to the results of maximum likelihood and distance matrix analyses of smaller data sets comprising lactic acid bacteria and representatives of the bacterial phyla. Alignment positions which share identical residues in at least 50% of all representatives of the *Lactobacillus-Pediococcus* cluster were considered. Multifurcations indicate that a common branching order could not be significantly determined or was not supported performing different alternative treeing approaches. The phylogenetic groups indicated by triangles are as defined earlier (SCHLEIFER and LUDWIG, 1995). The bar indicates 10% estimated sequence divergence.

The closest relative whose 16S rRNA gene is available in public databases is *Lactobacillus* sp. LA6 (similarity 98.4% and 99.5%). Only minor differences were found in the hypervariable regions (helices 6, 11, 18). The phylogenetic tree (Fig. 2) shows the relationship to other lactobacilli. Overall sequence similarities are below 93% for all other bacteria represented in 16S rRNA databases thus far.

Design and evaluation of a rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for *L. perolens*

Comparative analysis of 16S rRNA gene sequences revealed a region that can be used as a specific target site (see Materials and Methods). The specificity of the probe was checked by dot blot hybridization to membrane-bound crude nucleic acids of 10 different *Lactobacillus* species. No cross-hybridization to nucleic acids of other species used as controls could be detected (data not shown). Apart from *L. perolens* L 532 and L 534, nucleic acids from five additional strains of *L. perolens* reacted with the probe (Table 2).

Discussion

Despite self protecting properties non-alcoholic beverages like lemonades can undergo spoilage resulting in turbidity and off-flavours. During the last years we have isolated a variety of strains from lemonades and from the brewery environment that were characterized by their ability to grow under highly acidic and anaerobic condi-

tions. Physiological properties, protein electrophoretic patterns (Fig. 1) and phylogenetic analyses (Fig. 2) differentiated these organisms from hitherto known spoilage organisms. The strains displayed highly similar SDS-PAGE patterns. Their high 16S rRNA gene sequence similarity indicated their relationship at species level among themselves and to *Lactobacillus* sp. LA-6 which was recently isolated in a Japanese brewery (FUNAHASHI et al., 1998). Sequence similarity levels to other species (below 92%) justified a separate species status within the *L. casei-Pediococcus* group (COLLINS et al., 1991; SCHLEIFER and LUDWIG, 1995). Closest relative is *Pediococcus dextrinicus* (92% similarity) that was known to be more closely related to *L. coryniformis* and *L. bifermens* than to the other pediococci sensu stricto (VANDAMME et al., 1996). Using a gene probe targeted against a diagnostic region in addition to whole-cell protein patterns a variety of isolates forming a homogeneous taxon could be identified. These findings led to the proposal of the new species *L. perolens*.

Even if some strains of *L. perolens* were isolated from the brewery environment, there is no report on beer spoilage caused by *L. perolens* in Germany up to now.

Description of *Lactobacillus perolens* Back, Bohak, Ehrmann, Ludwig, Pot, Kersters and Schleifer sp. nov.

L. perolens (per.o'lens, Latin prefix *per* through, penetrating; *L.* part. adj. *olens* having an odor; M.L. part. adj. *perolens* offensive smelling). Gram-positive, non spore-forming rods with rounded ends, average size 0,7 to 2,5 μm , occurring singly, in pairs or short chains, cata-

lase-negative. Non-motile. Colonies on MRS flat or little exalted, wavy or toothed with rough, dull surface, beige to dirty-white colour; average diameter 2.5 mm. Facultatively anaerobic. Can grow up to 42 °C with an optimum at 28° to 32 °C; no growth below 15 °C. Optimum growth at pH 5.5 to 6.5, no growth below pH 3.7. Facultatively heterofermentative, producing L-lactic acid. Acid is produced from D(+)-melezitose, melibiose, esculin, amygdalin, D(-)-fructose, D(+)-galactose, cellobiose, glucose, maltose, D(+)-mannose, raffinose, sucrose, trehalose and in some cases from L(+)-arabinose, D(+)-xylose, dextrin, lactose, salicin and D(-)-sorbitol. Neither acid nor gas are formed from ribose, mannitol and rhamnose. Gelatine is not hydrolysed; arginine decarboxylase was not detected. Urease and H₂S are not produced; nitrate is not reduced to nitrite. The mol% G+C content of DNA is 49 to 53 (T_M). The mol% G+C content of the type strain is 51 (T_m) Habitat: isolated from spoiled soft drinks and from brewery environment. The type strain is DSM 12744 (LMG 18936).

Acknowledgements

This work was supported by the Commission of the European Communities (BIOTECH contract BIO2-CT94-3055) and the Prime Minister's Services - Federal Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs, Belgium.

References

- ALBERSHEIM, P., NEVIS, D. J., ENGLIS, P. D., KARR, A. (1967) A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 5: 340–345.
- BACK, W. (1993) Mikrobiologie der Fruchtsaft- und Erfrischungsgetränke. In: *Mikrobiologie der Lebensmittel, Getränke.* (H. H. DITTRICH, ed.) Behr's Verlag, Hamburg, Germany.
- BACK, W. (1999) Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil II (in press). Hans Carl Verlag, Nürnberg, Germany.
- COLLINS, M. D., RODRIGUES, U. M., ASH, C., AGUIRRE, M., FARROW, J.A.E., MARTINEZ-MURCIA, A., PHILLIPS, B.A., WILLIAMS, A. M., WALLBANKS, S. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse-transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 5–12.
- DE MAN, J.C., ROGOSA, M., SHARPE, M.E. (1960) A medium for cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.* 23: 130–135.
- EHRMANN, M., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. (1992) Species specific oligonucleotide probe for the identification of *Streptococcus thermophilus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 453–455.
- Fiedler, F., Schäffler, M. J., Stackebrandt, E. (1981) Biochemical and nucleic acid hybridization studies on *Brevibacterium linens* and related strains. *Arch. Microbiol.* 129: 85–93.
- FUNAHASHI, W., SUZUKI, K., OHTAKE, Y., YAMASHITA, H. (1998) Two novel beer-spoilage *Lactobacillus* species isolated from breweries. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56: 64–69.
- HUSS, V. A. R., FESTL, H., SCHLEIFER, K. H. (1983) Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst. Appl. Microbiol.* 4: 184–192.
- KUSANO, K., YAMADA, H., NIWA, M., YAMASATO, K. (1997) *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a new acid-tolerant w-cyclohexyl fatty acid-containing propionibacterium isolated from spoiled orange juice. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 825–831.
- LUDWIG, W. (1995) Sequence databases. pp. 3.3.5 1–22. In: *Molecular microbial ecology manual.* (A.D.L. AKKERMANS, J.D. VAN ELSAS, F.J. DE BRUIJN, eds.), Kluwer Academic Publ., Amsterdam, the Netherlands.
- LUDWIG, W., STRUNK, O. (1997) ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB/documentation/>
- LUDWIG, W., KIRCHHOF, G., KLUGBAUER, N., WEIZENEGGER, M., BETZL, D., EHRMANN, M., HERTEL, C., JILG, S., TATZEL, R., ZITZELSBERGER, H., LIEBL, S., HOCHBERGER, M., SHAH J., LANE, D., WALLNÖFER, P.R., SCHLEIFER, K.H. (1992) Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 487–501.
- PFFENNINGER, H. (editor) (1996) *Brautechnische Analysemethoden (Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission).* Band III. 2. Aufl. pp. 18–21. Selbstverlag der MEBAK. Freising-Weihenstephan, Germany.
- POT, B., VANDAMME P., KERSTERS, K. 1994. Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints. In *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics.* pp. 493–551. (M. GOODFELLOW, A. G. O'DONNELL, eds). John Wiley & Sons Ltd., Chichester, U.K.
- SCHLEIFER, K. H., KANDLER, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36: 407–477.
- SCHLEIFER, K. H. AND W. LUDWIG. (1995) Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria, pp. 7–18. In *The lactic acid bacteria*, vol. 2. The genera of lactic acid bacteria. (B.J.B. WOOD, W.H. HOLZAPFEL, eds.). Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Glasgow, Scotland.
- SPRINGER, N., LUDWIG, W., DROZANSKI, W., AMANN, R., SCHLEIFER, K.H. (1992) The phylogenetic status of *Sarcobium lyticum*, an obligate intracellular bacterial parasite of small amoebae. *FEMS Microbiol. Lett.* 96: 199–202.
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K., SWINGS, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407–438.
- YAMAZAKI, K., TEDUKA, H., SHINANO, H. (1996) Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Bioscience Biotechnol. Biochem.* 60: 543–545.

Corresponding author:

INGRID BOHAK, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Technische Universität München-Weihenstephan, D-85350 Freising, Germany
 Fax: 0049-8161-713883; Phone: 0049-8161-713787;
 e-mail: i.bohak@lrz.tu-muenchen.de

Bohak, I., Thelen, K. and Beimfohr, C.

Description of *Lactobacillus backi* sp. nov., an Obligate Beer-Spoiling Bacterium

Lactic acid bacteria that are able to spoil beer comprise a limited number of bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus*. Five Gram-positive isolates of uncertain taxonomic position causing turbidity, sediments and decreasing pH-value were isolated from lager, pils and wheat beers from different breweries in Germany and Italy. Physiological and biochemical studies of these strains showed a homogeneous group of organisms. The 16S rDNA sequence analysis of three of the five isolates revealed that they formed a phylogenetically distinct line within the genus *Lactobacillus* and have clearly less than 97% 16S rDNA sequence similarities to any other species. All strains were homofermentative, producing D(L)-lactic acid. Based on the data presented in this study the new species *Lactobacillus backi* is proposed. The type strain of *L. backi* is DSM 18080^T (LMG 23555^T).

Descriptors: *Lactobacillus backi*, beer-spoiling bacteria, Lactic acid bacteria

1 Introduction

Only a limited number of species of the genus *Lactobacillus* are able to spoil beer. This is due to the selective conditions of beer such as low pH-values, CO₂-content (anaerobic atmosphere), alcohol-content, lack of nutrients and hop-content. According to Back [1,2] beer-spoiling bacteria can be subdivided into obligate and potential beer-spoiling bacteria. Thereby obligate beer-spoiling bacteria quickly lead to a deterioration of the product and show a very high beer-spoiling ability, regardless of the type of beer. Whereas the possibility of deterioration due to potential beer-spoiling bacteria depends on the ingredients of the beer and on the ability of the bacterium to adapt to those conditions.

So far only a few number of obligate beer-spoiling lactobacilli like *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, "*Lactobacillus brevisimilis*" and "*Lactobacillus frigidus*" are known. Strains of the *Lactobacillus casei*/*Lactobacillus paracasei* group, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus coryniformis* are known to be members within the group of potential beer-spoiling lactobacilli [1,2]. In the last years five *Lactobacillus* strains were isolated from lager beers (EBC BU 20 – 22), pils beers (EBC BU 32) and wheat beers (EBC BU 12 – 14) from different breweries in Germany and Italy (Table 1). These strains caused turbidity, sediments and decreased the pH-values of different types of beer. All strains showed a striking morphological resemblance to *L. coryniformis*, whereas in contrast to *L. coryniformis* physiological tests consistently showed a lack of maltose fermentation and diacetyl formation. These results in combination with the homofermentative behavior of these strains suggested that they belong to a new species of obligate beer-spoiling lactobacilli. Further studies based on 16S rDNA sequence analysis of three of the five strains revealed significant differences to other *Lactobacillus* sp.. On the basis of our results, the strains L1062, L1064 and L1065 should be classified as members of a novel species

within the genus *Lactobacillus*. The name *Lactobacillus backi* is proposed for this organism. The type strain of *Lactobacillus backi* is strain L1062 (DSM 18080^T, LMG 23555^T).

2 Materials and Methods

Organisms and growth conditions

The origin of the *L. backi* strains studied is given in Table 1. The *L. backi* strains were cultivated on NBB-media (Döhler, Darmstadt, Germany) [3] at their optimum growth temperature of 28°C. Cultures were incubated in the presence of CO₂. Pure cultures were stored in 80% [v/v] glycerol at –20°C.

Physiological and biochemical tests

The physiological tests were carried out as described by BACK [4]. The determination of D- and L-lactic acid was carried out enzymatically according to the manufacturer's instructions (UV method, Boehringer, Mannheim). Diacetyl was determined by the method of MEBAK [5]. The G+C content of the DNA was determined by HPLC analysis. [6, 7, 8, 9].

Cell walls were prepared and analyzed by the method of SCHLEIFER and KANDLER [10], Mac KENZIE [11] and GROTH et al. [12].

Phylogenetic analysis

The 16S rRNA gene sequences of *L. backi* L1062, L1064 and L1065 were determined. *In vitro* amplification and direct sequencing of 16S rRNA genes encoding DNA fragments were carried out as previously described [13].

Sequences were added to a 16S rRNA sequence database by the use of the program package ARB [14, 15]. The tool ARB_EDIT was used for sequence alignment. The alignment was checked visually and corrected manually. The 16S rRNA-based phylogenetic tree was constructed on the results of distance matrix analyses of a full set of more than 22 000 homologous full and partial primary structures available in ARB database (<http://www.arb-home.de>). The topology of the tree was evaluated by performing maximum parsimony and maximum likelihood analysis of the full data set

Ingrid Bohak, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Technische Universität München - Weihenstephan, D-85354 Freising, Germany, phone: 0049-8161-713787, fax: 0049-8161-713883, e-mail: ingrid.bohak@wzw.tum.de; Karin Thelen, Claudia Beimfohr, vermicon AG, Emmy-Noether-Str. 2, D-80992 München, Germany

Tables and Figures see Appendix

and subsets, respectively [16]. Alignment positions at which fewer than 50% of the sequences of the entire data set shared the same residues were excluded from the calculations. The phylogenetic positions of organisms presented by partial sequences were roughly reconstructed by applying the parsimony criteria without changing the overall tree topology.

Bootstrapping was performed (1000 resamplings) with the ARB_GDE phylogeny tool to estimate stability of the clusters formed.

Nucleotide sequence accession numbers

16S rDNA sequences were submitted to GenBank under the accession numbers DQ406860 to DQ406862.

3 Results

Phenotypic and physiological properties

The cell morphology was observed by dark field microscopy. The studied beer-spoiling lactobacilli enriched in NBB-Bouillon formed rods morphologically similar to *L. coryniformis*. The shape of the rods was irregular, whereas cells were mostly appearing in the form of cudgels, drops or hearts, with rounded ends. They were occurring singly, in pairs or in short chains (about 5 to 10 cells). Whereby their arrangement in chains was jagged. All strains grew well in beers up to 32 EBC BU and spoiled these beverages by causing turbidity and sediments. Due to acidification the pH-value was decreased between 0.1 to 0.2 pH units. The strains analysed in this study can be distinguished from their phylogenetic most closely related species by their narrow range of carbohydrate fermentation patterns. The phenotypic and physiological results obtained in this study are summarized in Table 2.

The main characteristics of *L. backi* are the hydrolysis of aesculin and the fermentation of fructose, glucose, D(-)-mannitol, D(+)-mannose, salicine and D(-)-sorbitol. Neither maltose, D(+)-melezitose, melibiose, D(-)-ribose, L(+)-rhamnose, amygdalin, D(+)-galactose, cellobiose, raffinose, sucrose, trehalose, L(+)-arabinose, D(+)-xylose, dextrin nor lactose are fermented. No gas is produced from gluconate, glucose and maltose. Ammonia is not formed from L-arginine. All strains produce D(L)-lactic acid. The peptidoglycan is of L-lysine-D-asparagine type. The G+C content is 37 mol%. The cell wall composition and the G+C content of the DNA was determined for the type strain (DSM 18080^T/LMG 23555^T) of *Lactobacillus backi*.

16S rDNA sequence analysis

Due to the fact that all five strains of *L. backi* showed a homogeneous phenotypic and physiological behavior (Table 2), the 16S rDNA sequence was exemplary determined for three of the five isolated strains.

Phylogenetic analysis of almost complete 16S rDNA sequences (1483 bp, 1419 bp and 1428 bp) confirmed the affiliation of the *L. backi* strains L1062 (Genbank accession no. DQ406862), L1064 (DQ406861) and L1065 (DQ406860) within the genus *Lactobacillus*. The three strains shared average 16S rDNA sequence similarity values of 99.3% to each other and formed a tight monophyletic group (Fig. 1).

The constructed consensus tree showed the position of *L. backi* within a cluster composed of *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus rennini* and *Lactobacillus bifementans*.

The position of this cluster within the consensus tree was confirmed by all applied treeing methods.

The phylogenetic most closely related species *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* (Genbank accession number M58813) and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* (AJ575741) had 96.2 – 96.6% and 95.8 – 96.3% 16S rDNA sequence similarities to the new strains. All other species were more distantly related.

4 Discussion

Despite self-protecting properties beers like lager, pils or wheat beer can undergo microbial spoilage resulting in turbidity, sedimentation and decreased pH-value. During the last years we have isolated a variety of obligate beer-spoiling strains in breweries that were characterized by their ability to grow under highly acidic and anaerobic conditions. Physiological properties and phylogenetic analyses differentiated these organisms from hitherto known beer-spoiling organisms. Although showing a high morphological resemblance to *L. coryniformis* these new strains can be clearly distinguished physiologically from *L. coryniformis* by the lack of maltose and saccharose fermentation as well as by the lack of diacetyl formation. Moreover, the very low G+C content of 37 mol% (G+C content *L. coryniformis*: 45 mol%, [1]) and a homofermentative fermentation behavior underlines the differentiation. Their 16S rDNA sequence similarity values higher than 99% indicated their relationship at species level among themselves.

The 16S rDNA sequence similarities lower than 97% to the next related species *Lactobacillus coryniformis* justify that these three strains represent a new species within the genus *Lactobacillus* [18].

Description of *Lactobacillus backi* Bohak, Thelen and Beimfohr sp. nov.

Lactobacillus backi [bac.ki N.L. gen. n. of Back, named in honor to Werner Back, who contributed to the general classification of beer-spoiling bacteria and brewing microbiology]. Gram-positive, non spore-forming, non-motile, catalase-negative, mostly unregular rods with rounded ends, average size 0.7 to 2.0 µm. Cells are found singly, in pairs and occasionally in chains. Colonies on NBB-Agar are small (1 to 2 mm), flat or little exalted, white and smooth. They are facultatively anaerobic and can grow up to 36°C with an optimum at 28°C; no growth below 15°C. Optimum growth at pH 4.5 to 6.5, no growth above pH 8.0. Homofermentative, producing D(L)-lactic acid. Acid is only produced from aesculin, fructose, glucose, D(-)-mannitol, D(+)-mannose, salicine and D(-)-sorbitol. Neither acid nor gas are formed from gluconate and maltose. No gas is formed from glucose. Gelatine is not hydrolysed, arginine decarboxylase activity was not detected. Urease and H₂S are not produced; nitrate is not reduced to nitrite. The G+C content of the DNA is 37 mol%. Habitat: Isolated from spoiled beers of different breweries. The type strain is DSM 18080^T (LMG 23555^T).

Acknowledgements

We thank Nicole Gawlik, Raphael Kiener, Jaqueline Gruber and Christian Kreuzer for their excellent technical assistance.

5 References

1. Back, W. (1994) Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil 1. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany.
2. Back, W. (2005) Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany.
3. Back, W. (1980) Bierschädliche Bakterien. Nachweis und Kultivierung bierschädlicher Bakterien im Betriebslabor. Brauwelt 120, p. 1562 – 1569.
4. Back, W. (2000) Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil 2. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany.
5. Pfenniger, H. (editor) (1996) Brautechnische Analysemethoden (Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysekommision). Band III. 2. Aufl. Selbstverlag der MEBAK. Freising-Weißenstephan, Germany, p. 18 – 21.
6. Visuvanathan, S., Moss, M. T., Standord, J. L., Hermon-Taylor, J. and McFadden, J. J. (1989) Simple enzymatic method for isolation of DNA from diverse bacteria. J. Microbiol. Methods 10, p. 59 – 64.
7. Cashion, P., Holder-Franklin, M.A., McCully, J. & Franklin, M. (1977) A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. Anal. Biochem. 81, p. 461 – 466.
8. Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984) Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. FEMS Microbiology letters 25, p. 125 – 128.
9. Mesbah, M., Premachandra, U., Whitman, W.B. (1989) Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, p. 159 – 167.
10. Schleifer, K.H. and Kandler O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev. 36, p. 407 – 77.
11. Mac Kenzie, S.L. (1987) Gas chromatographic analysis of amino acids as the N-heptafluoro isobutyl esters. J. Assoc. Off. anal. Chem. 70, p. 151 – 160.
12. Groth, I., Schumann, P., Weiss, N., Martin, K. and Rainey, F.A. (1996) *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes with diamino butyric acid in the cell wall. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, p. 234 – 239.
13. Levantesi C., Beimfohr C. Geurkink B., Rossetti S., Thelen K., Krooneman J., Snaird J., van der Waarde J. and Tandoi V. (2004) Filamentous Alphaproteobacteria associated with bulking in industrial wastewater treatment plants. Syst. Appl. Microbiol. 27, (6) p. 728 – 736.
14. Strunk, O., Ludwig, W. (1996) ARB – a software environment for sequence data (<http://www.arb-home.de>).
15. Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., & 29 other authors (2004) ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Res. 32: p. 1363 – 1371.
16. Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., Schleifer, K.H. (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis 19: p. 554 – 568.
17. Chenoll, E., Macian, M.C., Aznar, R. (2006) *Lactobacillus rennini* sp. nov., isolated from rennin and associated with cheese spoilage. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56(Pt 2): p. 449 – 452.
18. Stackebrandt, E. and B.M. Goebel. (1994) Taxonomic note: a place for the DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: p. 846 – 849

Received 13. 03. 2006, accepted 10. 04. 2006

Appendix

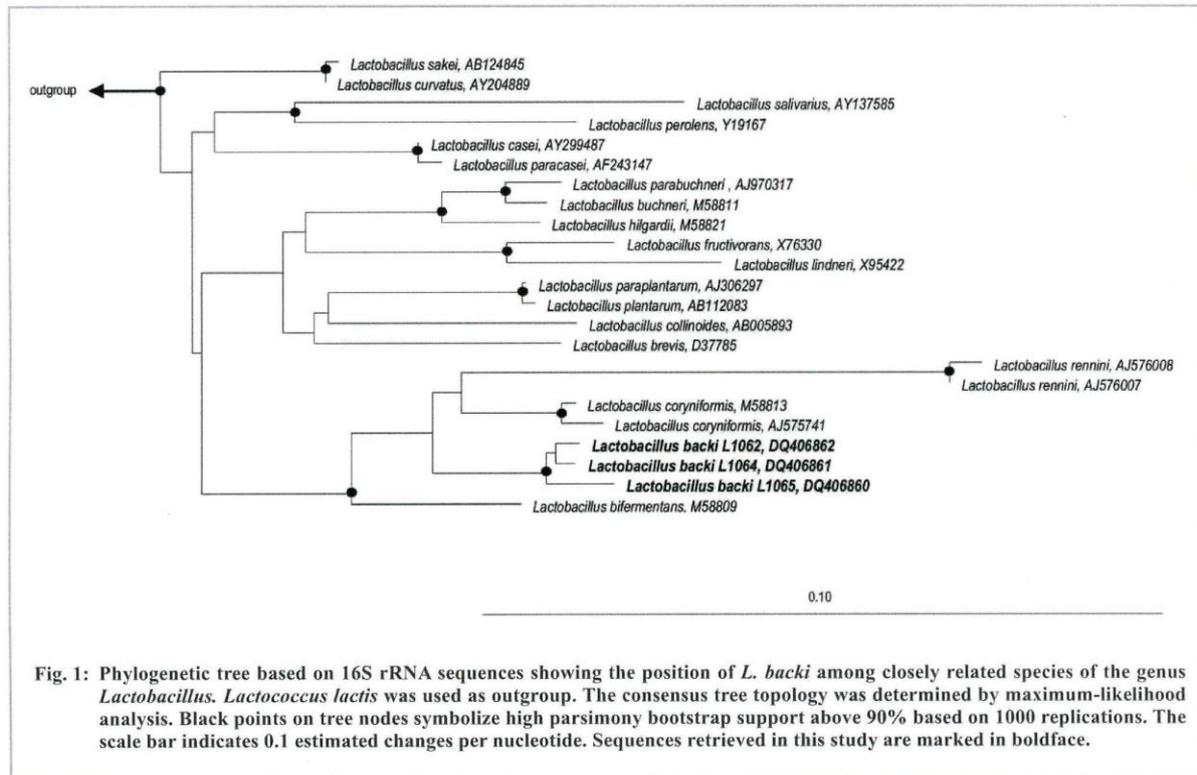


Fig. 1: Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences showing the position of *L. backi* among closely related species of the genus *Lactobacillus*. *Lactococcus lactis* was used as outgroup. The consensus tree topology was determined by maximum-likelihood analysis. Black points on tree nodes symbolize high parsimony bootstrap support above 90% based on 1000 replications. The scale bar indicates 0.1 estimated changes per nucleotide. Sequences retrieved in this study are marked in boldface.

Table 1 Origin of isolated *L. backi* strains

Strain ¹	Source	Year of isolation	Geographic location of the brewery
L1062 DSM 18080 ^T (LMG 23555 ^T)	Lager beer	2005	South Bavaria, Germany
L1064	Pils beer	2005	Hesse, Germany
L1065 (LMG 23556)	Lager beer	2005	Northern Italy
L700	Pils beer	1994	Hesse, Germany
L1002	Wheat beer	2002	Northern Bavaria, Germany

¹ DSMZ, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany
 LMG, BCCMTM/LMG Bacteria Collection, Laboratorium voor Microbiologie, Gent, Belgium
 L: Culture collection of the Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, TU Munich, Freising, Germany

Table 2 Phenotypic and physiological characteristics of *Lactobacillus backi* in comparison to the phylogenetic most closely related species *Lactobacillus coryniformis* and *Lactobacillus rennini*

	<i>Lactobacillus backi</i>					<i>Lactobacillus coryniformis</i> ssp. <i>coryniformis</i> ¹	<i>Lactobacillus coryniformis</i> ssp. <i>torquens</i> ¹	<i>Lactobacillus rennini</i> ²
	L1062	L1064	L1065	L700	L1002			
Gas production from:								
Glucanate	-	-	-	-	-	+	+	-
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	ND
D,L-Lactate	D(L)	D(L)	D(L)	D(L)	D(L)	D(L)	D	L(D)
Growth at:								
5°C	-	-	-	-	-	ND	ND	-
15°C	+	+	+	+	+	+	+	w
36°C	w	w	w	-	w	+	+	ND
45°C	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from:								
Amygdaline	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	w
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	+w
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	w
D-Galactose	-	-	-	-	-	+	v	w
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	v	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Sorbitol	w	+	w	+	+	v	-*	-
N-Acetylglucosamine	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	+
Arbutine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
D-Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	w	+	w	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	v	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	v	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	+	+	+
Saccharose	-	-	-	-	-	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+	+	v	-*	-
Hydrolysatation of:								
Aesculin	+	+	+	w	+	v	-	+
Arginin	-	-	-	-	-	-	-	-
Diacetyl formation	-	-	-	-	-	+	+	ND

Symbols:

+, all strains positive; -, all strains negative; w, weakly positive result; v, feature variable; *, exceptions possible; ND, no data

¹Data of *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis* and *Lactobacillus coryniformis* ssp. *torquens* were obtained by BACK ([1], p. 66).

²Data of *Lactobacillus rennini* were obtained by Chenoll et al. [17].

4 Diskussion

4.1 Taxonomie der neubeschriebenen Arten

Innerhalb der bis Anfang 2015 bekannten Laktobazillen, bestehend aus 213 Arten und 29 Unterarten (<http://www.bacterio.net/lactobacillus.html>, abger. 01/2015), sind die vier neubeschriebenen bierspezifischen Arten wie folgt einzugruppieren:

L. lindneri kann aufgrund seines begrenzten Kohlenhydratstoffwechsels klar von anderen bierschädlichen Bakterien unterschieden werden. Es wird lediglich Glukose, D-Fruktose und manchmal Maltose fermentiert. Diese Spezies ist fast ausschließlich im Unfiltratbereich beheimatet (Primärkontaminant) und als obligat bierschädlich einzustufen. *L. lindneri* verdirbt Biere durch leichte Trübungsbildung, welche oft erst nach Wochen oder Monaten beobachtet werden kann. Da sich der pH-Wert der betroffenen Biere kaum verändert, macht sich *L. lindneri* aber in trüben Bieren, wie Hefeweißbieren oder Kellerbieren, entsprechend nicht bemerkbar. Der G+C Gehalt der DNS von 35 mol% liegt deutlich unter dem der übrigen bierschädlichen Bakterien (39–46 mol%). Alle analysierten Stämme unterscheiden sich von den Stämmen aus Sauerteig, welche von Spicher und Schröder (1978) beschrieben und „*L. brevis* var. *lindneri*“ genannt wurden. Chemotaxonomische Studien und DNS-DNS Hybridisierungen zeigen, dass diese Stämme *L. sanfrancisco* (Weiss und Schillinger, 1984) bzw. nach neuer Terminologie (Trüper und De Clari, 1997) *L. sanfranciscensis* zuzuordnen sind. So zeigt zum einen die DNS von „*L. brevis* var. *lindneri*“ 97 bis 101 % Übereinstimmung mit der DNS von *L. sanfranciscensis* DSM 20451, und zum anderen ist der Mureintyp identisch (Lys-DAla). *L. lindneri* dagegen weist die Zellwandkomposition Lys-DAsp auf. In diesem Zusammenhang hatte bereits Schillinger *L. lindneri* sowohl aufgrund physiologischer als auch durch DNS-DNS-Homologiestudien als eine in sich homogene Gruppe von Bierisolaten beschrieben, aber nicht valid publiziert (Schillinger, 1985). Storgårds *et al.* bestätigen den separaten Status von *L. lindneri* sowohl mit SDS-PAGE Identifizierung, als auch mit Ribotyping und vermerken, dass die analysierten Stämme, trotz unterschiedlicher Herkunft, keine signifikanten Unterscheidungsmerkmale aufweisen (Storgårds *et al.*, 1998). Die *L. lindneri* am nächsten verwandte Art ist *L. sanfranciscensis*, gefolgt von der fruktophilen Art *L. florum*, einem Isolat von südafrikanischen Blumen (Endo *et al.*,

2010), von Trauben und aus Weinproben (Mtshali *et al.*, 2012). Zusammen sind sie der *L. fructivorans*-Gruppe zuzuordnen (Abb. 7).

L. perolens ist zellmorphologisch von Vertretern der *L. casei/L. paracasei*-Gruppe kaum zu unterscheiden. Wie diese bildet er auf fakultativ-heterofermentativem Weg L(+)-Laktat, unterscheidet sich jedoch durch positive Melibiose- und negative D-Mannitverwertung. Genetisch betrachtet besteht ein weiterer Unterschied im G+C-Gehalt der DNS, der zwischen 49 bis 53 mol% liegt (*L. casei/L. paracasei* 45–47 mol%; Collins *et al.*, 1989). Der separate Status in der Gattung *Lactobacillus* wird bei der elektrophoretischen Auftrennung der Gesamtproteine (SDS-PAGE-Analyse) deutlich. Die entsprechende Clusteranalyse, die alle bis 1999 bekannten *Lactobacillus*-Arten (bis auf *L. kunkeei* und *L. iners*) und außerdem viele anderen Milchsäurebakterienarten einschließlich bekannte Bier- und AfG-Schädlinge berücksichtigte, zeigte für die untersuchten *L. perolens* Stämme ein separates Cluster mit einer Ähnlichkeit von nur 65 % zu seinen nächsten Nachbarn (*Pediococcus damnosus* und *P. inopinatus*). Auch die Vollsequenzierung der 16S rDNS zweier *L. perolens*-Stämme L532 und L534 bestätigte die Eigenständigkeit von *L. perolens* innerhalb der *L. casei*-Pediokokken-Gruppe (Collins *et al.*, 1991; Schleifer und Ludwig, 1995a und 1995b) und wies Overall-Sequenz-Ähnlichkeiten zu allen anderen in den 16S rDNA Datenbanken hinterlegten Bakterien von weniger als 93 % auf. Zwischen L532 und L534 betrug die Ähnlichkeit 98,4 %. Die phylogenetische Analyse ergab außerdem einen sehr hohen Verwandtschaftsgrad zu einem Isolat aus einer japanischen Brauerei mit der Bezeichnung LA-6 (Funahashi *et al.*, 1998). Dieser Stamm ist mit einer 16S rDNA Sequenz-Ähnlichkeit von 98,4 % zu dem *L. perolens*-Stamm L532 (DSMZ 12744^T) und 99,5 % zu dem *L. perolens*-Stamm L534 (DSMZ 12745) vermutlich ebenfalls als *L. perolens* einzustufen. Funahashi *et al.* (1998) publizierte *Lactobacillus* sp. LA-6 als neue fakultativ heterofermentative *Lactobacillus*-Art aus dem Brauereiumfeld und bescheinigte ihm einen schwach bierschädlichen Charakter. 2005 isolierten Miyamoto *et al.* aus dem fermentierten chinesischen Gemüse `Suan cai` zwei L-Laktat bildende, fakultativ heterofermentative Laktobazillen-Stämme, die in den 16S rDNS Analysen nahe Verwandtschaft zu *L. perolens* zeigen, und nannten die neuen Stämme *L. harbinensis*. DNS-DNS-Homologiestudien zeigten, dass diese Stämme zwar Unterschiede zum *L. perolens* Typstamm L532 (DSMZ 12744^T) aufwiesen, aber zusammen mit LA-6 [Funahashi] und *L. perolens* L534 (DSMZ 12745) ein Subcluster bildeten (Abb. 3). Neben den

Ergebnissen der DNS-DNS-Homologie und der vergleichenden 16S rDNS Sequenzanalysen wurden als weitere Unterschiede des LA-6 und L534 zum *L. perolens*-Typstamm angeführt: G+C-Gehalt der DNS ist 53,2–53,6 % (Typstamm: 51 %) und Unterschiede in der D- und L-Arabinose-Verwertung. Aufgrund dieser Angaben wurde L534 als *L. harbinensis* reklassifiziert und ist unter der DSMZ-Nr. 12745 aufzufinden. Es wurde allerdings schon in vorliegender Arbeit bei der SDS-Page Ganzzellproteinanalyse festgestellt, dass das *L. perolens*-Cluster aus zwei Subclustern besteht (Abb. 4). Die Hauptunterschiede hier liegen in der Molekulargewichtszone von 32.000 bis 50.000 Dalton. In diesem Zusammenhang erfolgte auch der Hinweis, dass die genaue taxonomische Bedeutung dieser Unterschiede über weitere genotypische Vergleiche abgeklärt werden müsste.

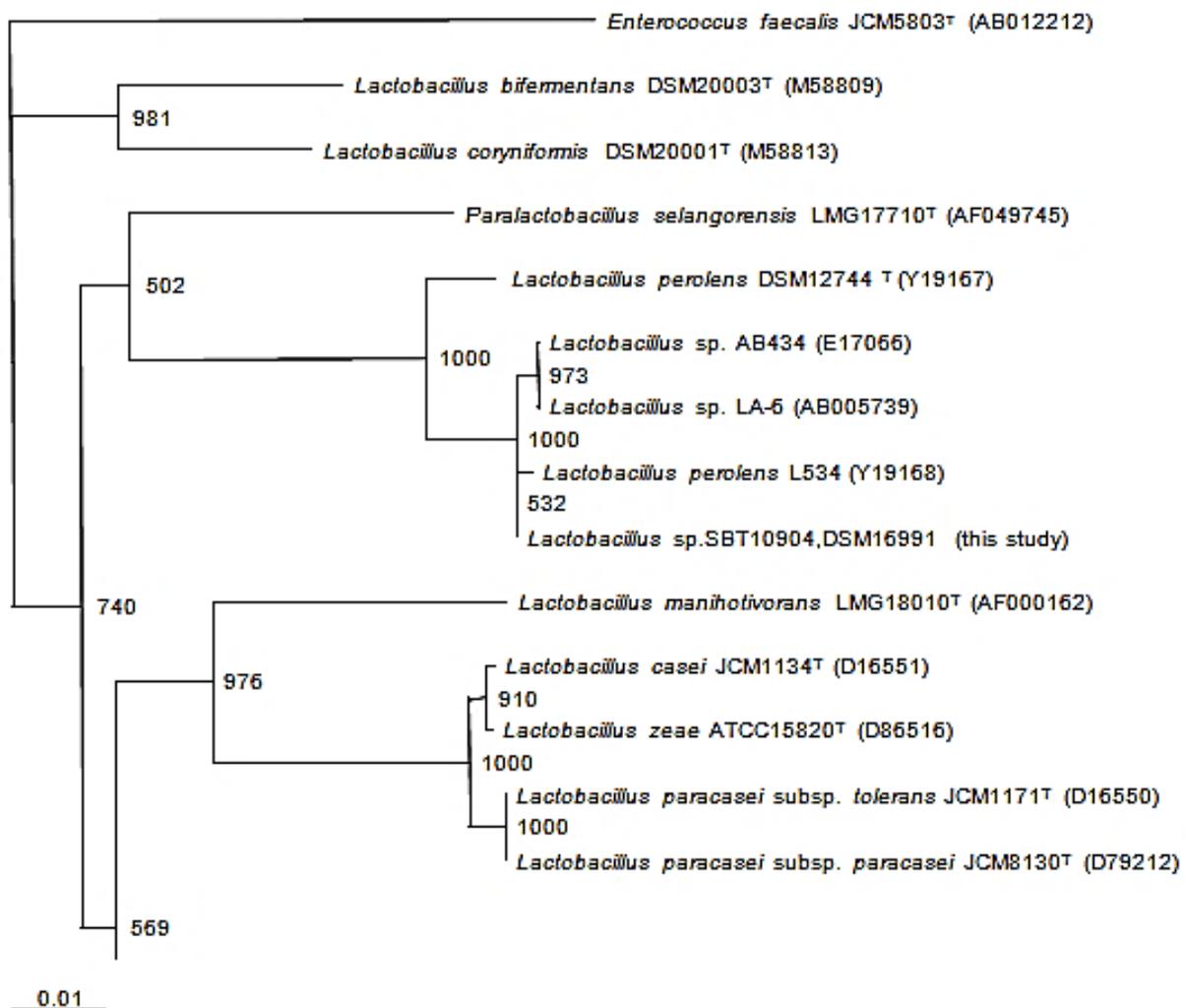


Abb. 3: Darstellung der phylogenetischen Stellung von *L. perolens* DSM12744^T zu *L. harbinensis*-Stämmen (*L. sp.* AB434, *L. sp.* LA-6, *L. sp.* DSM16991, *L. perolens* L534) (Ausschnitt aus Miyamoto *et al.*, 2005). Balken: 1 % Nukleotidsequenz-Unterschied.

Pot *et al.* (2014) ordnen *L. perolens* und *L. harbinensis* phylogenetisch in die *L. perolens*-Gruppe ein, der auch die ehemalige Gattung *Paralactobacillus* (reklassifiziert zu *L. selangorensis*, Haakensen *et al.*, 2011) angehört. Die *L. perolens*-Gruppe wird vervollständigt durch *L. shenzenensis*, einer Spezies aus einem fermentierten Milchgetränk, die sehr eng mit *L. harbinensis* (Zou *et al.*, 2013) verwandt ist. Aus Abbildung 7 wird ersichtlich, dass der *L. perolens*-Gruppe phylogenetisch *L. composti* am nächsten steht, gefolgt von *L. dextrinicus*. *L. dextrinicus* (Haakensen *et al.*, 2009a) wird übrigens in der vorliegenden Publikation noch unter dem Namen *Pedicoccus dextrinicus* (Back, 1978) mit 92%iger 16S rDNS Ähnlichkeit als sehr naher Verwandter von *L. perolens* angegeben, mit dem Hinweis, dass ersterer eher mit *L. coryniformis* und *L. bifermentans* verwandt ist, als mit anderen Pediokokken *sensu stricto* (Vandamme *et al.*, 1996).

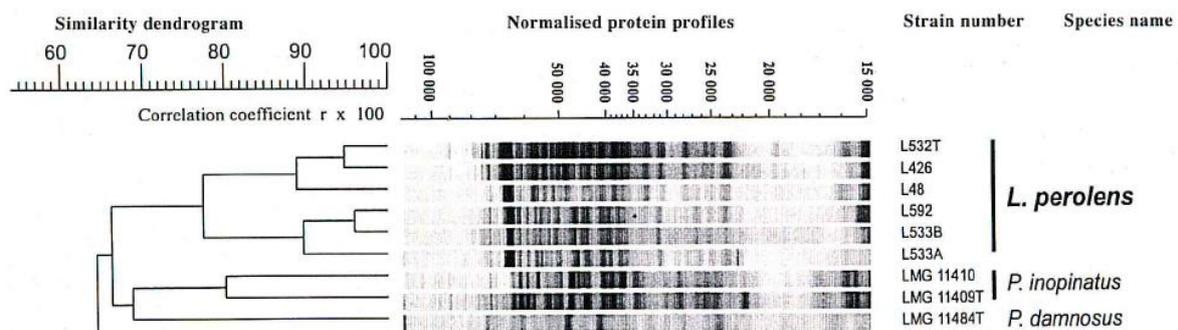


Abb. 4: SDS PAGE Ganzzellprotein-Analyse von *L. perolens* Stämmen. Das Dendrogramm zeigt 2 Subcluster von *L. perolens*. (Back *et al.*, 1999)

Die Erstbeschreibung von *L. backi* erfolgte durch die Promovendin in der Brewing Science - Monatsschrift für Brauwissenschaft (Bohak *et al.*, 2006). Tohno *et al.* (2013) griffen *L. backi* mit Übernahme der Daten aus der Erstbeschreibung in ihrer Publikation über *L. iwatensis* im IJSEM auf, womit die Namenskorrektur und Validierung von *L. backi* als *L. backii* erfolgte. *L. backii* wurde bisher ausschließlich aus verdorbenen Bieren verschiedener Herkunft mit EBC BU von 12 bis 32 isoliert und besitzt obligat bierschädliche Eigenschaften. Er unterscheidet sich phänotypisch von den anderen bierschädlichen Bakterien durch seinen obligat homofermentativen Charakter, den ansonsten im Brauereibereich bisher nur die meisten Kulturstämme der biologischen Säuerung aufweisen. Alle analysierten Stämme zeigen zellmorphologisch große Ähnlichkeit zu *L. coryniformis* spp., unterscheiden sich aber von diesen insbesondere durch die fehlende Maltose- und Saccharosefermentation, sowie die

fehlende Diacetylbildung. Des Weiteren weist seine DNS einen G+C Gehalt von 37 mol% auf und liegt damit deutlich unter dem Wert von *L. coryniformis* mit 45 mol%. Die Analyse der 16S rDNS Sequenzen (1483 bp, 1419 bp und 1428 bp) zeigt für die drei sequenzierten *L. backii* Stämme untereinander eine durchschnittliche Ähnlichkeit von 99,3 % und ergibt eine enge monophyletische Gruppe. Die 16S rDNS Sequenz-Ähnlichkeit zu seinen phylogenetisch nahen Verwandten *L. coryniformis* ssp. *coryniformis* und *L. coryniformis* ssp. *torquens* beträgt weniger als 97 % (Daten s. Kap. 3). Nakakita *et al.* (1998) beschrieben ein bierschädliches, bis dahin unbekanntes Isolat BS-1 aus Bieren, welches ebenfalls homofermentativ eine ähnliche Zuckerverwertung wie *L. backii* aufwies, einen G+C-Gehalt der DNS von 38 % besaß und zudem phylogenetisch sehr nahe mit *L. coryniformis* verwandt war. Es ist nicht auszuschließen, dass BS-1 heute *L. backii* zugeordnet werden könnte. Zwei Stämme von *L. iwatensis* (Tohno *et al.*, 2013), isoliert aus Knäuelgras-Silage, sind mit einer 16S rDNS-Sequenz-Ähnlichkeit von 99,7 % die phylogenetisch nächsten Verwandten zu *L. backii* (Abb. 5). Da der *L. backii* Typstamm (JCM 18665^T = DSM 18080^T = LMG 23555^T = L1062) sehr hohe 16S rDNS Sequenz-, Phenylalanyl-tRNA-Synthase (*pheS*) Gensequenz- sowie RNS-Polymerase alpha subunit (*rpoA*)-Gensequenz-Ähnlichkeiten zum Typstamm von *L. iwatensis* (IWT246^T) aufweist, wurde der jeweils separate Spezies-Status mit DNS-DNS-Homologien und Ribotyping überprüft und bestätigt (Tohno *et al.*, 2013).

Die Abtrennung des *L. backii* von *L. iwatensis* ist nicht nur aus wissenschaftlichen Aspekten sinnvoll, sondern auch von großer Bedeutung für die Brauereipraxis, da es hier um den spezifischen Nachweis von *L. backii* in seiner Rolle als obligaten Bierschädling geht. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Überprüfung von *L. iwatensis*-Stämmen auf ihr Bierschädlichkeitspotenzial.

Dass *L. backii* lange Zeit nicht als bierschädliche *Lactobacillus*-Art erkannt worden ist, mag an seiner zellmorphologischen und auch genetischen Ähnlichkeit zu *L. coryniformis* liegen, was möglicherweise zu Fehlidentifikationen führte. *L. backii* und sein phylogenetisch nächster Verwandter *L. iwatensis* ist der *L. coryniformis*-Gruppe zugeordnet (Abb. 7).

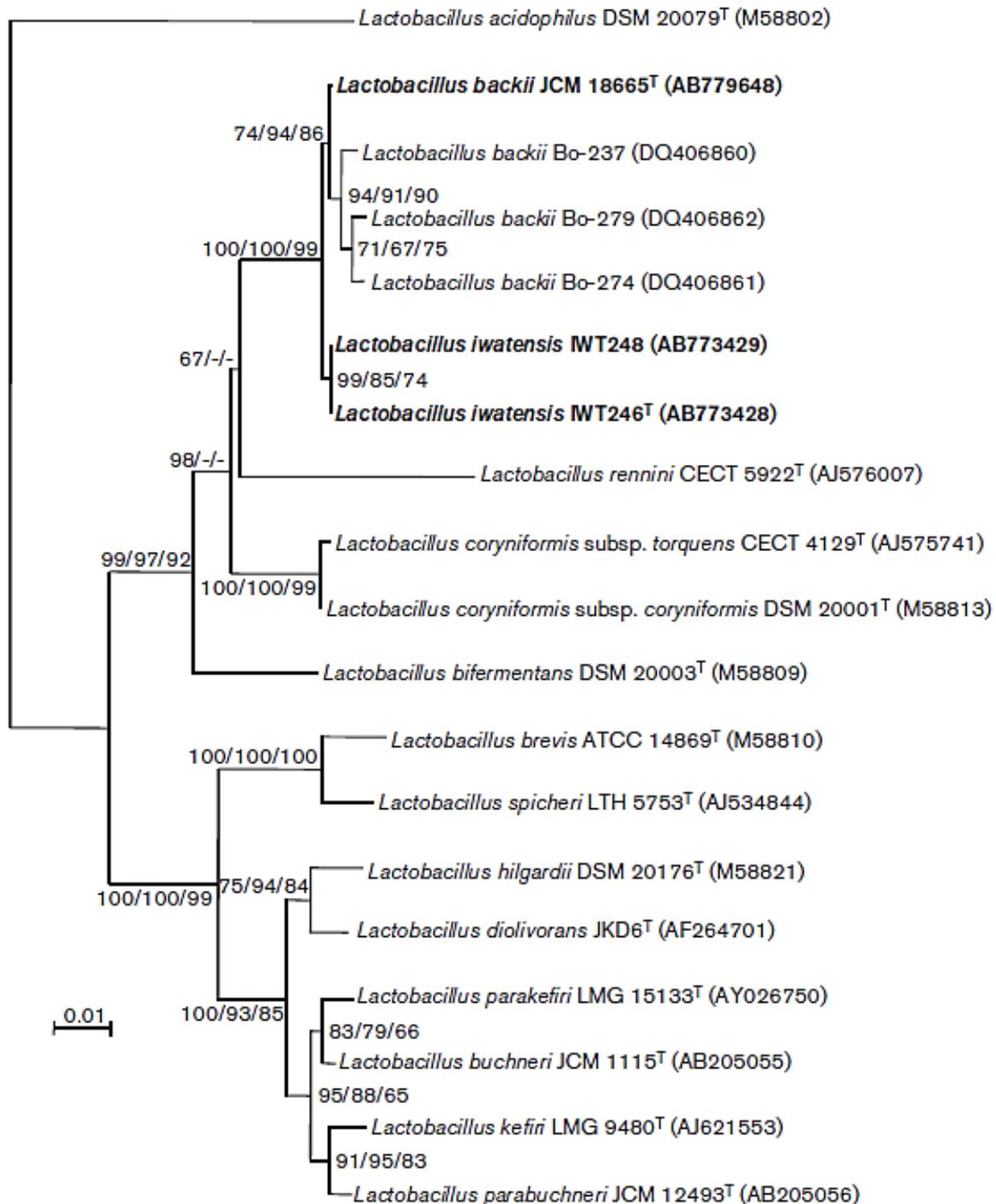


Abb. 5: Dendrogramm basierend auf 16S rDNS Sequenzen (aus Tohno et al., 2013): Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse zwischen *L. backii* und *L. iwatensis* zu verwandten Laktobazillen-Stämmen. Balken: 1 % Nukleotidsequenz-Unterschied

Lange Zeit wurde *L. amylovorus* als wichtigstes Bakterium der biologischen Maische- und Würzesäuerung betrachtet (Back, 1988 und 1994a). Dies ist nicht verwunderlich, da *L. amylovorus* (Nakamura, 1981) ganz ähnliche physiologische und biochemische Eigenschaften wie der hier beschriebene ***L. amylolyticus*** aufweist. So wird von beiden Arten homofermentativ unter fakultativ anaeroben Bedingungen bei einem

Temperaturoptimum von 45 bis 48 °C DL-Laktat aus Glukose gebildet. Beide Arten verwerten u. a. neben Glukose, D-Fruktose, Maltose und D-Mannose auch Stärke, was eine entscheidende Rolle bei der Substratumsetzung im Sauergut darstellt. Pentosen werden nicht fermentiert. Schließlich sind auch die G+C-Gehalte der DNS dieser Mikroorganismen nicht signifikant unterschiedlich (*L. amylolyticus*: 39 mol%, *L. amylovorus* 40,4 mol%). Vergleichende 16S rDNS Sequenzanalysen an 13 aus den Sauergutkulturen verschiedener Brauereien isolierten Stämmen ergaben jedoch, dass es sich bei diesen Stämmen um eine eigenständige Laktobazillen-Art handelt, welche aufgrund ihrer Fähigkeit der Stärkefermentation als *L. amylolyticus* bezeichnet wurde. *L. amylolyticus* ist ein Mitglied der *L. acidophilus*-Gruppe (Schleifer und Ludwig, 1995a und 1995b) bzw. nach neuer Nomenklatur der *L. delbrueckii*-Gruppe (Felis und Pot, 2014), mit *L. intestinalis*, *L. helveticus* *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus* als nächsten Verwandten, wobei die meisten der phylogenetischen Berechnungen auf einen gemeinsamen Ursprung von *L. amylolyticus* und *L. intestinalis* hinweisen. Die Signifikanz eines gemeinsamen Ursprungs ist allerdings aufgrund des kurzen gemeinsamen Astes (in Relation zu dem angelegten Maßstab) als relativ gering einzuschätzen. Die 16S rDNS Sequenzähnlichkeiten von *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus* und *L. helveticus* Arten bewegen sich in einem sehr engen Bereich (98,1–98,9 %). Der separate Status von *L. amylolyticus* hingegen wird gestützt durch die Ergebnisse der vergleichenden 16S rDNS Sequenzierungen und auch durch die Ergebnisse der DNS-DNS-Homologiestudien. Demnach beträgt die Ähnlichkeit der 16S rDNS Sequenz von *L. amylolyticus* zu seinen nächsten Verwandten auf Artebene weniger als 97 % und die DNS-DNS-Homologie liegt deutlich unter 70 % (Wayne *et al.*, 1987). Gancheva *et al.* (1999) bestätigen den Status von *L. amylolyticus* als neue homogene Spezies innerhalb der *L. delbrueckii*-Gruppe. Die mittels SDS-PAGE Ganzzellprotein Analyse, AFLP-Fingerprinting und RAPD-PCR-Fingerprinting erhaltenen Profile zeigen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Arten dieser Gruppe (Abb. 6), so dass insbesondere die Fingerprinttechniken als effiziente Methoden zur Differenzierung der Starterkultur *L. amylolyticus* von seinen nahen Verwandten in der *L. delbrueckii*-Gruppe gesehen werden können.

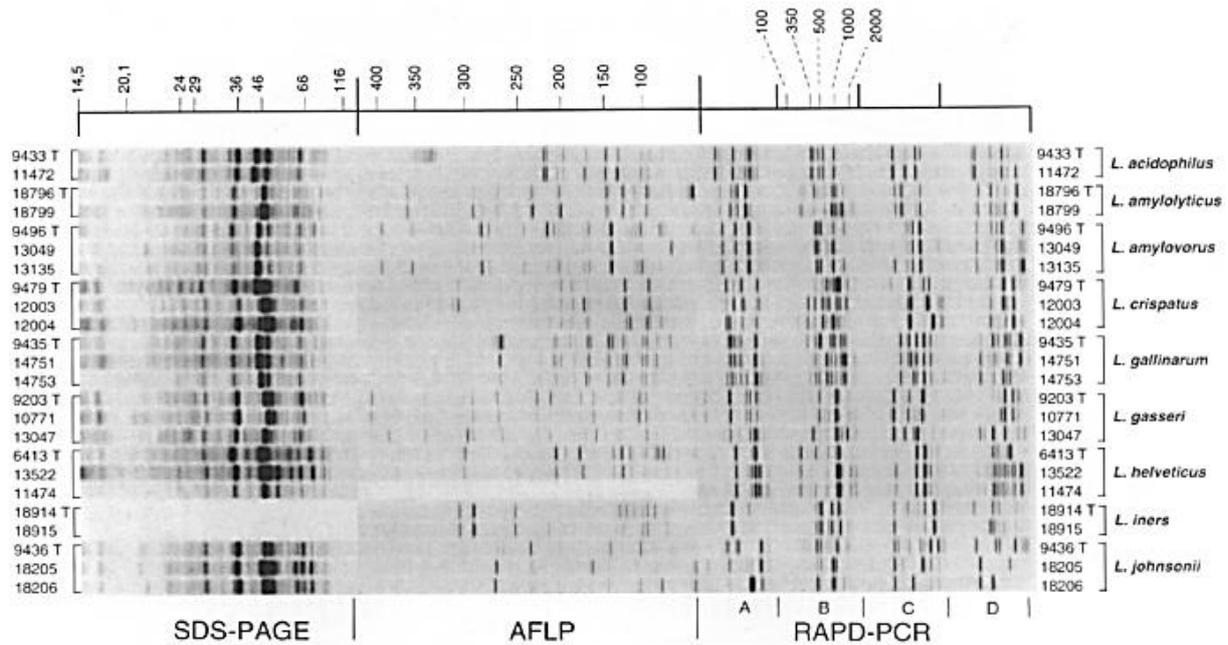


Abb. 6: Digitalisierte und normalisierte Darstellung der elektrophoretischen Abdrücke von *L. amylolyticus* im Vergleich zu anderen Arten der *L. delbrueckii*-Gruppe (aus Guancheva *et al.*, 1999)

Die aktuellsten phylogenetischen Positionen der beschriebenen Laktobazillen sind der Abbildung 7 zu entnehmen. Danach ist *L. amylolyticus* der sehr heterogenen *L. delbrueckii*-Gruppe zugeordnet und hat als nächsten phylogenetischen Verwandten *L. intestinalis*. *L. lindneri* befindet sich in der *L. fructivorans*-Gruppe. Zusammen mit seinem nächsten Verwandten *L. sanfranciscensis* teilt er sich eine gemeinsame Wurzel mit *L. florum*. *L. perolens* bildet zusammen mit seinen nächsten Verwandten *L. harbinensis* und *L. shenzenensis* ein Cluster und ist Namensgeber seiner Gruppe. Nahe phylogenetische Verwandtschaft besteht zu *L. composti* und *L. dextrinicus*, zwei außenstehenden Spezies. *L. backii* und *L. iwatensis* befinden sich in der *L. coryniformis*-Gruppe und bilden dort ein eigenes Cluster. Dieser Gruppe phylogenetisch am nächsten, mit einer gemeinsamen Wurzel, sind die *L. casei*- und die *L. perolens*-Gruppe, sowie *L. dextrinicus*.

Alle bekannten bierschädlichen Laktobazillen (Tab. 4) verteilen sich insgesamt auf zehn phylogenetische Gruppen (Abb. 7). Dies belegt ihre bereits erwähnte Heterogenität, welche sich auch in ihren unterschiedlichen phänotypischen Merkmalen widerspiegelt.

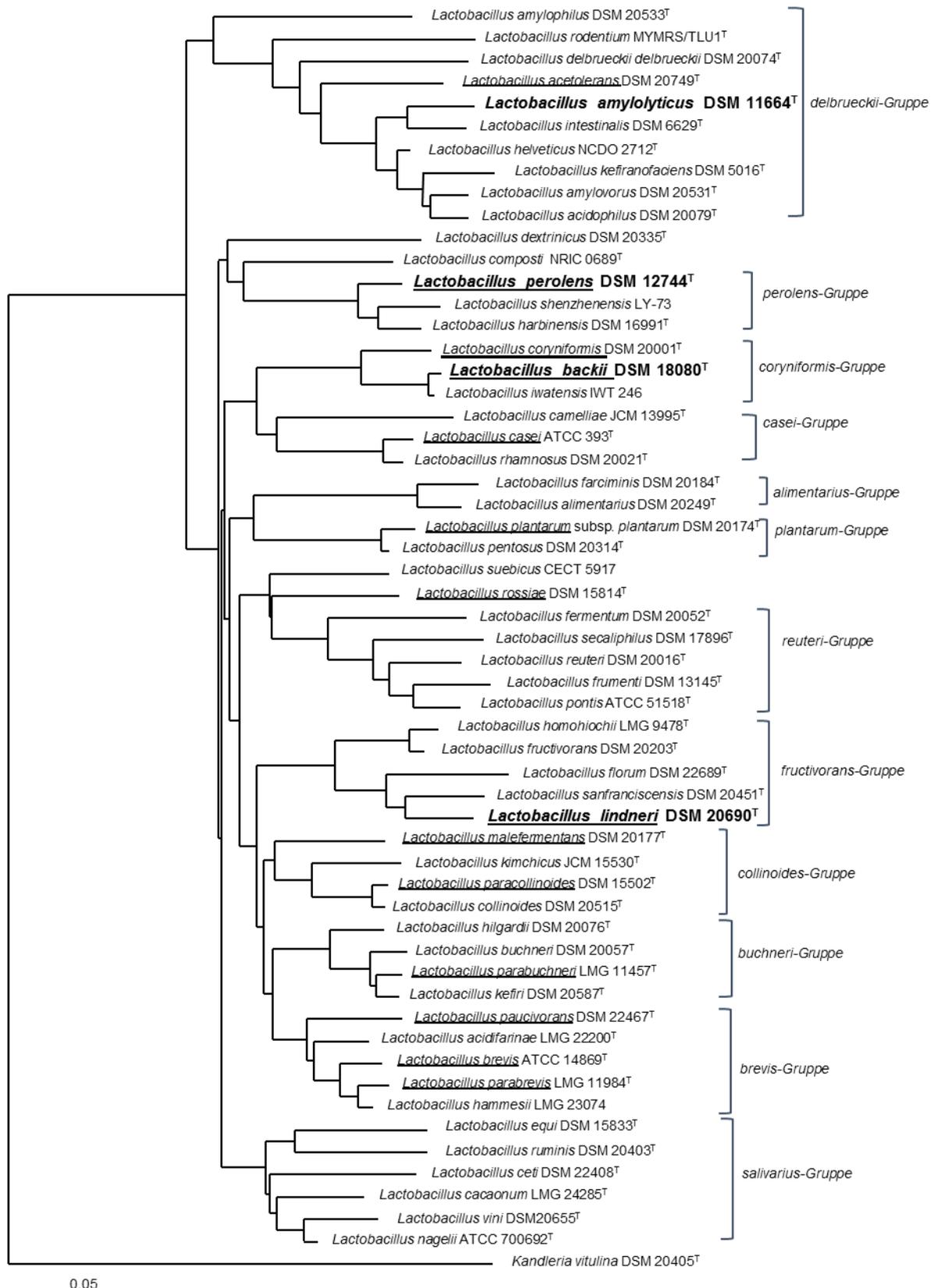


Abb. 7: Phylogenetischer Stammbaum (Neighbor-Joining-Verfahren) beruhend auf vollständigen 16S rDNS Sequenzen ausgewählter *Lactobacillus*-Spezies, Gruppeneinteilung nach W. H. Holzappel, B. J. B. Wood (eds.): *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons, 2014. Die in dieser Arbeit beschriebenen Spezies sind im Fettdruck dargestellt. Die als bierschädlich bekannten *Lactobacillus*-Spezies sind unterstrichen. Als outgroup wurde *K. vitulina* verwendet. Balken: 5 % Nukleotidsequenz-Unterschied.

4.2 Kritische Punkte beim Einsatz genbasierter Schnellnachweismethoden

Nun ist die Erforschung des spezifischen Erbgutes von Laktobazillen zum einen die Grundlage wissenschaftlicher phylogenetischer Betrachtungen. Zum anderen bildet das Studium und die Kenntnis art- oder stammspezifischer Gensequenzen – bei Laktobazillen sind dies hauptsächlich die spezifischen 16S rRNS-Sequenzen als Target-Gene – die Grundlage für Schnellnachweis- und Identifizierungssysteme, wie in Kapitel 1.3.2.3 dargestellt. Ein großer Vorteil der Nutzung von 16S rDNS liegt im Vorhandensein umfangreicher, allgemein zugänglicher Datenbanken. Andererseits führen inhärente Sequenzunterschiede innerhalb derselben Spezies zu vielfachen Kopien von Genen mit geringfügigen Sequenzenabweichungen, und damit zu Signalen, welche die Datenanalyse erschweren können (Cocolin *et al.*, 2013).

Die Vorteile kommerziell angebotener Nachweissysteme, die überwiegend auf der PCR- oder FISH-Technik basieren (Tab. 5), liegen im Allgemeinen in ihrer Schnelligkeit (präparativer Zeitaufwand: 2–8 Stunden) bei leichter Durchführbarkeit, ihrer Spezifität (Eindeutigkeit), ihrer Sensitivität (Detektion geringer Bakterienmengen von 1 bis 5×10^3 KBE pro ml; s. Tab. 5) und in ihrer Sicherheit (validierte Systeme) (Cocolin und Rantsiou, 2012; Rohde *et al.*, 2015). Dennoch greifen deutsche Brauereien kaum auf Schnellnachweis-Kits zurück, wie eine repräsentative Umfrage 2013 ergeben hat (Abb. 8). Arbeiten sie dennoch mit Gensonden oder PCR-basierten Methoden, dann meist nur in Kombination mit klassischen kulturellen Methoden (Membranfiltration, Flüssiganreicherung) (Novy *et al.*, 2013).

Als einige Gründe für diese eher geringe Akzeptanz werden die höheren Materialkosten für Geräte und Reagenzien, die komplizierte Handhabung im Vergleich zu klassischen Verfahren sowie Fehlinterpretationen bei der Auswertung angeführt (Hutter *et al.*, 2003; Storgårds *et al.*, 2006, Huhtamella *et al.*, 2007; Novy *et al.*, 2013).

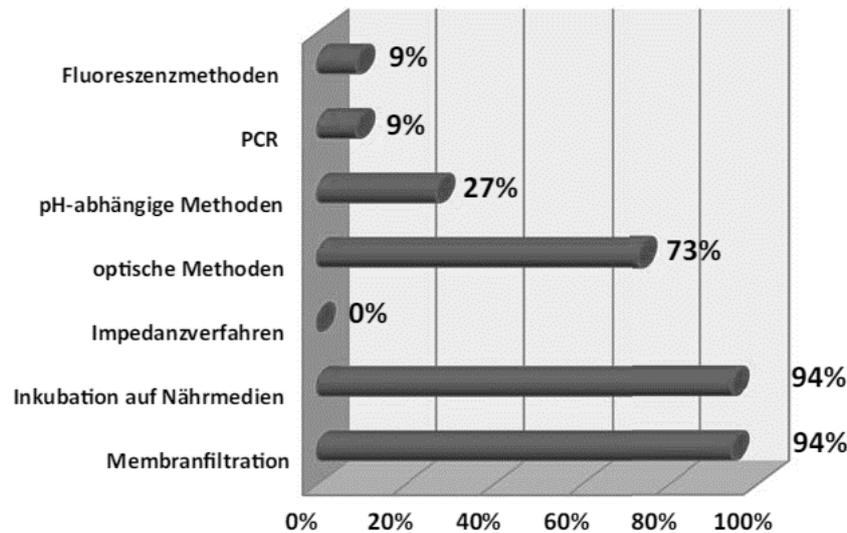


Abb. 8: Verfahren der mikrobiologischen Qualitätskontrolle in deutschen Brauereien. Erhebung zu praktizierten Nachweismethoden (aus: Novy *et al.*, 2013)

Der Hauptgrund ist jedoch in folgender brauereispezifischen Problematik zu sehen: Es müssen Spurenkontaminationen, d. h. ein bierschädlicher Keim pro Gebinde, bei einem statistisch äußerst ungünstigen Verhältnis von entnommenem Probevolumen zum Verkaufsbier (0,001–0,01 % der Gesamtmenge), gefunden werden. Selektive Voranreicherungen mit für PCR oder Gensondentechnik geeigneten Selektivmedien, Erhöhung der Probenahmevolumina und/oder mechanische Keimaufkonzentrierungen sind deshalb unabdingbar, um die für die Analyse benötigten Keimzahlen zu erhalten. Die Vertreiber der Test-Kits empfehlen aus diesem Grunde auch Vorinkubationen von 24 bis 48 Stunden, wobei für langsam wachsende Keimarten, wie *L. lindneri* oder *L. paracollinoides* (Storgårds *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2008; Asano *et al.*, 2009), diese Zeit aber häufig nicht ausreichend bemessen ist. Des Weiteren ist das in den Schnellnachweisen zur Analyse kommende Probevolumen sehr klein (Mikroliter-Bereich). Die automatisierte Auswertung bei PCR-basierten Verfahren, z. B. über Schmelzkurvenanalysen der gebildeten DNS-Fragmente, stellt eine Arbeitserleichterung dar. Sie beinhaltet aber keine Ganzzellcharakterisierung und setzt viel Erfahrung bei der Interpretation voraus. Eine Störung der PCR-Reaktion könnte durch eingeschleppte Verunreinigungen aus der Proben- und Nukleinsäureaufbereitung zu zweifelhaften Ergebnissen führen (Cocolin und Rantsiou, 2012). Ebenso könnten bestimmte Matrixinhaltsstoffe, wie z. B. Polyphenole im Bier, die PCR-Reaktion beeinflussen und damit die Sensitivität und Selektivität herabsetzen, wie dies auch bei Wein (Delaherche *et al.*, 2004) und für andere Lebensmittel

(Cocolin und Rantsiou, 2012; Rohde *et al.*, 2015) berichtet wird. Problematisch ist hier außerdem die Amplifikation der DNS toter Zellen, die eine aktive Kontamination vortäuschen könnte (Homann *et al.*, 2002; Cenciarini-Borde *et al.*, 2009; Nocker und Camper, 2009; Cocolin und Rantsiou, 2012). Versuchsansätze, diesem Problem mittels Einsatz der interkalierenden Substanz EMA (Ethidiumbromid-Monoazid) entgegenzuwirken, ergaben, dass nicht für alle untersuchten bierschädlichen Keime ein PCR-Signal von toten Zellen unterdrückt werden konnte und die PCR-Sensitivität für lebende Zellen abnahm (Brandl, 2006). Die Arbeit mit EMA ist außerdem sehr matrixabhängig (Pisz *et al.*, 2007). Versuche zur ausschließlichen Detektion lebensfähiger Zellen mittels RT-PCR, abzielend auf die 16S rRNS und den Elongationsfaktor *tuf* mRNA, ergaben ebenfalls unbefriedigende Resultate (Juvonen *et al.*, 2010). Die Problematik der Erfassung toter Zellen entfällt bei Schnellnachweisen mit Gensonden, da hier die in den lebenden Zellen zahlreich vorhandene ribosomale RNS als Zielgene fungieren (Schleifer *et al.*, 1992a und b; Thelen *et al.*, 2001 und 2002; Amann *et al.*, 2008; Thelen, 2009). Die mit der FISH-Technik einhergehende Visualisierung der Mikroorganismen (Rohde *et al.*, 2014) wird in den Brauereien häufig als positiv empfunden. Als Kritikpunkt bei FISH ist der geringe Probendurchsatz durch (noch) fehlende Automatisierung anzuführen.

Dass die molekularen Techniken aufgrund ausgewählter Primer und Gensonden, hohe Spezifitäten aufweisen, kann sich auch als Nachteil erweisen. Hier liegt nämlich die Gefahr in der Nicht-Erfassung noch nicht erkannter, und damit nicht erwarteter, neuer Spezies und Subspezies (Temmermann *et al.*, 2004), welche in den Test-Kits entsprechend nicht aufgenommen sind. Die daraus resultierenden falsch negativen Befunde verhindern die Ergreifung von Gegenmaßnahmen und können bei Distribution der betroffenen Biere zu erheblichen Imageschäden und finanziellen Verlusten führen. Andererseits finden sich in den Schnellnachweis-Kits mancher Hersteller nicht-bierschädliche Mikroorganismen (z. B. *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. pentosus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*). Diese werden detektiert und führen zu falsch positiven Befunden, mit der Konsequenz, dass die Qualitätssicherung zu unnötigen zeit- und kostenintensiven Maßnahmen (z. B. doppelte Filtration, erhöhter Reinigungs- und Desinfektionsaufwand, Rückrufaktionen) greift oder sogar das falsch-positiv analysierte Bier vernichten lässt. Als falsch-positiv muss ein Befund auch dann gewertet werden, wenn ein Stamm, der einer als bierschädlich charakterisierten Art angehört, detektiert wird, obwohl er keine

bierschädlichen Eigenschaften aufweist. Dies ist durchaus vorstellbar, wenn man die aktuell bekannten obligaten oder potentiellen bierschädlichen Laktobazillen (Tab. 4) unter dem Aspekt ihrer phylogenetischen Gruppeneinordnung (Abb. 7) betrachtet: Wie bereits diskutiert, bemerkt man zum einen eine weite Streuung dieser Mikroorganismen über die verschiedenen Gruppen in der Gattung *Lactobacillus* (Abb. 7). Zum anderen ist über die phylogenetische Einordnung kein direkter Zusammenhang mit den jeweiligen biochemisch-physiologischen Einordnungskriterien und jeweiligen Schädlichkeitspotenzialen erkennbar. Ein Blick in die Datensammlung der DSMZ oder der LPSN genügt, um zu erkennen, dass die Mitglieder der verschiedenen Arten der Gattung *Lactobacillus* aus den unterschiedlichsten Substraten an den unterschiedlichsten Standorten der Erde isoliert worden sind. Das wirft die grundsätzliche Frage nach den Ursachen des bierschädlichen Charakters bestimmter Stämme innerhalb dieser Arten auf, bzw. gibt Anlass nachzufragen, in welchen Merkmalen die Eigenschaft der Bierschädlichkeit in den Bakterien festgeschrieben ist. Dieses Wissen ist die unabdingbare Voraussetzung für die Entwicklung wirklich aussagekräftiger und spezifischer Nachweis- und Identifizierungsverfahren.

4.3 Ausblick: Trends in der Forschung

Ein Hauptziel der Forschung ist also die Ergründung der Faktoren, welche dem Merkmal der Bierschädlichkeit zugrunde liegen. Diese Faktoren lassen Mikroorganismen die im Bier vorhandene Stresssituation tolerieren, was ihnen zum einen das Überleben sichert und zum anderen sogar Wachstum im Bier ermöglicht. Stress wird allgemein definiert als Veränderungen von Umweltbedingungen, die reduziertes Wachstum oder generell eine Einschränkung der Überlebensfähigkeit nach sich ziehen (Spano und Massa, 2006). Laktobazillen reagieren mit Stressantworten, die auf koordinierten Genexpressionen beruhen, welche zusammenwirkend die zellulären Prozesse, wie z. B. Mechanismen zur Aufrechterhaltung der pH-Homöostase oder erhöhte Produktion von Chaperonen, zur Steigerung ihrer Stresstoleranz verändern (van de Guchte *et al.*, 2002). Zahlreiche Quellen verweisen auf die Stressfaktoren, welche die mikrobiologische Anfälligkeit von Bieren limitieren. Dies sind insbesondere die Hopfeninhaltsstoffe (hpts. Humulonsäuren), tiefe pH-Werte (Säureanteil), Alkoholgehalte bis 8 Vol%, reduzierte Sauerstoffgehalte, hohe CO₂-

Anteile, Nährstoffmangel aufgrund vorangegangener Hefegärung sowie niedere Temperaturen im Produktionsbereich (u. a. Back, 1994a, 2005 und 2008; Thiele und Back, 2008; Hammond *et al.*, 1999; Suzuki, 2011; Vriesekoop *et al.*, 2012; Bokulich *et al.*, 2013). Ausgehend von der Annahme, dass das Bierschädlichkeitspotenzial der MOs in unmittelbarem Zusammenhang mit ihrer Toleranz gegenüber Hopfeninhaltsstoffen steht und genetisch verankert sein könnte, befassten und befassen sich zahlreiche Forschungsgruppen in den letzten Jahren intensiv mit verschiedenen durch Hopfen bedingte Resistenzmechanismen. Diese Mechanismen werden vor allem 1. mit der Cytoplasmamembran, im Wesentlichen den Hopfenresistenzgenen *horA*, *horC* und ihren flankierenden Open Reading Frames [ORF]), 2. mit der Zellwand (höhermolekulare Lipoteichonsäuren in Kombination mit Mn^{2+} und *hitA*) und 3. mit anderen Hopfentoleranzmechanismen, wie z. B. der Induzierung Mn^{2+} -abhängiger Enzyme durch Hopfenbitterstoffe oder der Verkleinerung der Zellgröße zur Verringerung des Bierkontaktes, in Verbindung gebracht (Suzuki, 2011). Die wissenschaftlichen Grundlagen hierzu werden, neben Sakamoto und Konings (2003), Suzuki (2011) und Preissler (2011), auch ausführlich von Behr und Vogel (2010), Vogel *et al.* (2010) und aktuell von Schurr *et al.* (2015) wiedergegeben. Letztendlich kann resümiert werden, dass durch die untersuchten hopfenbezogenen Resistenzmechanismen die Problematik der Bierschädlichkeit nicht vollständig erklärt werden kann (u. a. Suzuki *et al.*, 2005b; Haakensen *et al.*, 2008b; Bergsveinson, 2013; Deng *et al.*, 2014; Kern *et al.*, 2014a, 2014b). Zwar finden sich Betrachtungen über Stressantworten von Laktobazillen bez. Hitze, Alkohol und Azidität, allgemein für den Lebensmittelbereich (Van de Guchte *et al.*, 2002; Liu und Qureshi, 2009) oder für einzelne *Lactobacillus*-Stämme (u. a. Laplace *et al.*, 1999; Siegumfeldt *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2010; Van Bokhorst-van de Veen *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2013 [für *Lactococcus lactis*]; Heunis *et al.*, 2014; Liu, 2014). Berichte über bierspezifische Untersuchungen zu nicht hopfeninduzierten Stressantworten sind jedoch selten. Zhao *et al.* (2014) berichten über oxidative Stressreaktionen bei bierschädlichen *L. brevis*-Stämmen im Vergleich zu nicht-bierschädlichen Stämmen, wenn sie Desinfektionsmitteln ausgesetzt werden. Über den Effekt von Alkohol und tiefen pH-Werten auf die Genexpression bez. der Argininverwertung durch *L. brevis* und *P. pentosaceus* referieren Araque *et al.* (2013). Pittet *et al.* (2011) befassten sich mit der Stressantwort bierschädlicher Bakterien auf Alkohol, konnten aber keine signifikante Korrelation zwischen Alkoholtoleranz und Bierschädlichkeit ausmachen.

Offensichtlich ist die Fokussierung auf die Suche nach einzelnen Markern für das Merkmal Bierschädlichkeit nicht ausreichend. Einige Faktoren sprechen für diese Annahme: Das Medium Bier besitzt eine komplexe Zusammensetzung, welche zunächst von der Getreidebeschaffenheit mit ihrer Mikroflora und der sich daraus ableitenden Malzqualität sowie der Hopfenart und der Wasserbeschaffenheit im Sudprozess bestimmt wird. Auch spielen die verwendeten Hefestämme, ihre Gäreigenschaften, das Hefemanagement und die Reifungs- und Lagerungsbedingungen des Jungbieres eine wesentliche Rolle für die Ausprägung der Bierzusammensetzung und -stabilität. Da durch den Hefestoffwechsel und bei unsachgemäßer Prozessführung durch eventuelle Autolyseerscheinungen auch wachstumsfördernde Substanzen wie Aminosäuren und organische Säuren (u. a. Säuren aus dem Krebs-Zyklus und aus dem Aminosäure-Biosynthese-Weg) ins Bier entlassen werden (Dufour *et al.*, 2003), wird dieses kontaminationsanfälliger gegenüber Bakterien. Hier spielt auch der forschungsmäßig noch einzugrenzende „P-Faktor“ (Peptidfaktor) eine Rolle, den scheinbar manche recht anfälligen Biere besitzen und den schwer nachweisbare Keime wie *L. lindneri* zum Wachstum benötigen (Back, 1994a). Tatsächlich wurde bereits von Berg *et al.* (1981) ein Peptid mit einem Molekulargewicht von ca. 1.065 aus frischen Hefeextrakten nachgewiesen und analysiert. Dieses Peptid stimulierte laut Berg das Wachstum von *L. sanfranciscensis* aus Sauerteig, dem phylogenetisch nächsten Verwandten von *L. lindneri*.

Die dargestellte Komplexität des Bieres erschwert zudem die Evaluierung des Bierschädlichkeitspotenzials von Bakterien. Diese Evaluierung ist als Voraussetzung für alle Studien zur Bierschädlichkeit unabdingbar. Da eine umfassende Nachstellung der Komplexität des Bieres in Kulturmedien kaum in vollem Umfang gelingen kann, erweist sich bis zum jetzigen Zeitpunkt die sogenannte „Bierpassage“ als die zuverlässigste Evaluierungsmethode. Hier wird das Wachstum der Testorganismen direkt in den unveränderten Biertypen (s. Kap. 2.1; Preissler *et al.*, 2010) beobachtet. Bei der Entwicklung von Nährmedien für Bierschädlinge ist darauf zu achten, dass die Validierung mit bieradaptierten Stämmen erfolgt, da Stämme aus Kultursammlungen oder Stämme, die mehrfach über Optimalmedien geführt werden, ihren bierschädlichen Charakter verlieren können (Suzuki, 2011; Bohak *et al.*, 2012). Diese Möglichkeit des Verlustes (oder Erwerbes) ist eine Indikation dafür, dass die Eigenschaft der Bierschädlichkeit nicht von vornherein fest im Genom

verankert ist, sondern über Adaptationsprozesse, vielleicht auch über Plasmid bezogenen horizontalen Gentransfer, erst erworben wird. Hierzu könnte möglicherweise die Betrachtung des gesamten Bakteriengenoms weiteren Aufschluss bringen, da zu vermuten ist, dass wesentliche Teile des Genoms eines bestimmten Stammes diesen einzigartig machen (Gevers *et al.*, 2005).

Vielversprechende Ansätze für weitere Forschungen zu den Faktoren der Bierschädlichkeit und mikrobiologischen Identifizierungsmöglichkeiten bieten die „Omik“-Wissenschaften, welche neben der Genomik u. a. die Proteomik, Transkriptomik und Metabolomik umfassen. Ziel dieser Wissenschaften ist es, interdisziplinär ein Bild von allen zellregulatorischen Prozessen im Kontext zum Gesamtverhalten des untersuchten Mikroorganismus oder der MO-Gemeinschaft in ihrem ökologischen Umfeld zu erhalten (Brul, 2014). Herrero *et al.* (2012) bezeichnen die Omik für Lebensmittel als Foodomik. Sie definieren Foodomik als eine Disziplin, die das Studium aller Nahrungsmittel- und Ernährungsbereiche, z. B. über die Detektion von qualitätsrelevanten Biomarkern oder das Studium von Nahrungsmittelkontaminanten, durch Anwendung fortschrittlicher Omik-Technologien, im Sinne des Verbraucherwohls, beinhaltet. Dabei sind massenspektrometrisch-basierte Techniken, wie z. B. MALDI-TOF für Proteom-Analysen, unabdingbar (Herrero *et al.*, 2012). Colgrave *et al.* (2012) erörtern die Applikationen der massenspektrometrischen Techniken für die Proteomanalyse vom Getreide bis hin zum Produkt Bier. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass diese hochsensitiven und schnellen Techniken eine gute Alternative zu immunologischen Methoden darstellen. Untersuchungen zur Proteomzusammensetzung vom Getreide über die Würze bis zum Bier mittels 2D-Gelelektrophorese oder MALDI-TOF MS belegen den deutlichen Einfluss der verschiedenen Kulturhefestämme auf das Proteinprofil und unterstreichen damit die Bedeutung der Wahl des Hefestammes für die Bierqualität, wie z. B. auf die Filtrierbarkeit, den Schaum oder die oxidative Stabilität (Berner *et al.*, 2013; Konecna *et al.*, 2012). Ein großes Potenzial der Proteomik ist in der Brauerei insbesondere auch auf dem Gebiet der Bakteriendiagnostik zu sehen. So gelang die Identifizierung von Bakterien nicht nur auf Spezies-, sondern auch auf Stammebene (Kern *et al.*, 2014a, 2014b; Wieme *et al.*, 2014). Umfangreiche Analysen der Proteome von bierschädlichen und nicht-bierschädlichen *L. brevis*-Stämmen aus unterschiedlichen Substraten wurden ebenfalls bereits mittels MALDI-TOF MS getätigt und lieferten vielversprechende Informationen über mögliche Gruppen-

bildung in Abhängigkeit zur Bierschädlichkeit (Kern *et al.*, 2014b; Preissler, 2011). Eine Erweiterung der Proteomerfassung aller bierschädlicher Mikroorganismen im Vergleich mit nicht-bierschädlichen Vertretern der gleichen Art und dem damit verbundenen Ausbau der spezifischen Datenbanken könnte für Schädlichkeitsbeurteilungen in Zukunft nützlich sein. mRNS-basierte Transkriptom-Sequenzierungen, wie sie von Pittet *et al.* (2013) für bierschädliche *Pediococcus clausenii*-Stämme beschrieben werden, eröffnen neue Aspekte zu substratabhängigen Genexpressionen und werden, neben der Proteomik, eine bedeutende Funktion für die Aufklärung der Faktoren einnehmen, welche die Bierschädlichkeit steuern.

Das Nahrungsmittel Bier stellt eine ökologische Nische dar und weist so sein eigenes spezifisches Keimspektrum auf. Die Mikroorganismen haben sich an dieses Umfeld vermutlich während ihres evolutionären Entwicklungsprozesses adaptiert und dabei komplexe molekulare Mechanismen entwickelt, welche wahrscheinlich in ihrer genetischen Ausstattung zu finden sind. Diese Mechanismen sichern nicht nur ihr Überleben, sondern begünstigen auch ihre Vermehrung unter an sich ungünstigsten Bedingungen. Die Wissenschaften der Omics werden bei der Aufklärung der molekularen Zusammenhänge in Zukunft eine wesentliche Rolle spielen und damit insgesamt zum besseren Verständnis des Substrates Bier und seiner Mikroflora beitragen.

5 Literaturverzeichnis

- Abo–Elnaga, I., Kandler, O.: Zur Taxonomie der Gattung *Lactobacillus Beijerinck*. I. Das Subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. Zentralbl. Bakteriologie II. Abt. 119, 1–36, 1965
- Adams, M. R., O Moss, M.: Food Microbiology. Third edition. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2008
- Amann, R., Fuchs, B. M.: Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. Nature Reviews Microbiology 6, 339–348, 2008
- Araque, I., Bordons, A., Reguant, C.: Effect of ethanol and low pH on citrulline and ornithine excretion and *arc* gene expression by strains of *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus pentosaceus*. Food Microbiology 33, 107–113, 2013
- Asano, S., Iijima, K., Suzuki, K., Motoyama, Y., Ogata, T., Kitagawa, Y.: Rapid detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria by microcolony method. Journal of Bioscience and Bioengineering 108 (2), 124–129, 2009
- Ault, R. G.: Spoilage Bacteria in Brewing - a Review. J. Inst. Brew. 71, 376–391, 1965
- Back, W.: Elevation of *Pediococcus cerevisiae* subsp. *dextrinicus* Coster and White to Species Status [*Pediococcus dextrinicus* (Coster and White) comb. nov.]. Int. J. Syst. Bacteriol. 28 (4), 523–527, 1978
- Back, W.: Bierschädliche Bakterien. Nachweis und Kultivierung bierschädlicher Bakterien im Betriebslabor. Brauwelt 120, 1562–1569, 1980
- Back, W.: Taxonomie der bierschädlichen Bakterien. GRAMpositive Arten. Monatsschrift für Brauerei 34, 7, 267–276, 1981
- Back, W.: Neubeschreibung einer bierschädlichen Laktobazillen-Art: *Lactobacillus brevisimilis* spec. nov. Monatsschrift für Brauwissenschaft 12, 484–488, 1987
- Back, W.: Biologische Säuerung. Monatsschrift für Brauwissenschaft 41, 152–155, 1988
- Back, W.: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie. Teil I. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 1994a
- Back, W.: Sekundärkontaminationen im Abfüllbereich. Brauwelt 134, 16, 686–695, 1994b
- Back, W.: Secondary contaminations in the filling area. Brauwelt International 12, 326–333, 1994c
- Back, W., Bohak, I., Ehrmann, M., Ludwig, L., Schleifer, K. H.: Revival of the species *Lactobacillus lindneri* and the design of a species specific oligonucleotide probe. System. Appl. Microbiol. 19, 322–325, 1996
- Back, W., Bohak, I., Fischer, E.: Untersuchungen zum Einfluß eines Bandschmiermittels mit desinfizierenden Zusätzen auf die Hygiene im Flaschenkellerbereich. Brauwelt 138, 46/47, 2307–2310, 1998a
- Back, W., Pöschl, P.: Bypass-Membranfiltration (BM-System) – Verbesserung des Spurennachweises nach der Filtration. Brauwelt 138 (46/47), 2312–2315, 1998b
- Back, W., Bohak, I., Ehrmann, M., Ludwig, W., Pot, W., Kersters, K., and K. H. Schleifer. 1999. *Lactobacillus perolens* sp. nov., a Soft Drink Spoilage Bacterium. System. Appl. Microbiol. 22, 354–359, 1999
- Back, W., Bohak, I., Fischer, E.: Investigations on influence of conveyor lubricants with disinfecting additives on Hygiene in the bottling cellar. Brauwelt International IV, 295–294, 1999a
- Back, W., Pöschl, P.: Bypass membrane filtration (BM-System) – improvement in detection of trace elements after filtration. Brauwelt International 3 (17), 202–204, 1999b
- Back, W.: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie. Teil II. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2000
- Back, W.: Biofilme in der Brauerei und Getränkeindustrie – 15 Jahre Praxiserfahrung. Brauwelt 143, 24/25, 766–777, 2003
- Back, W.: Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2005
- Back, W.: Mikrobiologie der Erfrischungsgetränke. In: Back, W. (Hrsg.): Mikrobiologie der Lebensmittel. Getränke. Behr's Verlag Hamburg, 2008

- Bae, S., Fleet, G. H., Heard, G. M.: Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology* 100, 712–727, 2006
- Baltes, W., Kroh, L. W. (Hrsg.): Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen. Behr's Verlag Hamburg, 2004
- Barney, M., Volgyi, A., Navarro, A., Ryder, D.: Riboprinting und 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Brewery *Pediococcus* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 2 (67), 553–560, 2001
- Beckmann, G.: Ein Ärgernis, das haften bleibt – Biofilme in der Brauerei. *Brauindustrie* 11, 62–66, 2012
- Behr J, Vogel R. F.: Mechanisms of hop inhibition include the transmembrane redox reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 142–149, 2010
- Berg, R. W., Sandine, W. E., Anderson, A. W.: Identification of a Growth Stimulant for *Lactobacillus sanfrancisco*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (6), 768–788, 1981
- Bergey, D. H., Harrison, F. C., Breed, R. S., Hammer, B. W., Hunton, F. M.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. A Key for the Identification of Organisms of the Class Schizomycetes.* 1st edition. Williams & Wilkins Co., Baltimor 1923
- Berghof, K., Fandke, M., Pardigol, A., Tauschmann, A., Kiehne, M.: Chapter 2. Fast Detection of Beer Spoilage Microorganisms by consensus Polymerase Chain Reaction with Foodproof® Beer Screening. In: Smart, K. (ed.): *Brewing Yeast Fermentation Performance. Second Edition*, Blackwell Science, 2003
- Bergsveinson, J.: Effect of plasmid loss on the beer-spoilage ability, hop tolerance, and antibiotic resistance of *Lactobacillus brevis* BSO 464. 63rd Annual Conference of the Canadian Society of Microbiologists, Carleton University, Ottawa, Ontario, 2013
- Berner, T. S., Jacobsen, S., Arneborg, N.: The impact of different ale brewer's yeast strains on the proteome of immature beer. *BMC Microbiology* 13 (215), 1-8, 2013
- Beverly, M. B., Basile, F., Voorhees, K J.: Fatty Acid Analysis of Beer Spoiling Microorganisms Using Pyrolysis Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 55 (2), 79–82, 1997
- Bhandari, R. R., Walker, T. K.: *Lactobacillus frigidus* sp. isolated from brewery yeast. *J. Gen. Microb.* 8, 330–332, 1953
- Bhandari, R. R., Russell, C., Walker, T. K.: Studies of acid lactic bacteria associated with brewery products. I. – Identification of types isolated from beer and from yeast. *J. Sci. Food. Agric.* 5, 27–31, 1954
- Birkenstock, B.: Automatisches Probenahmesystem. *Brauwelt* 120 (8), 240–245, 1980
- Birkenstock, B.: Nachweisgrenze der mikrobiologischen Analyse in der Brauerei. *Brauwelt* 27, 809–811, 2010
- Blažková, M., Koets, M., Wichers, J. H., van Amerongen, A., Fukal, L., Rauch, P.: Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Pathogenic Bacteria from Food. *Czech J. Food Sci.* 27, 350–353, 2009
- Bohak, I., Back, W., Richter, L., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K. H.: *Lactobacillus amylolyticus* sp. nov., Isolated from Beer Malt and Beer Wort. *System. Appl. Microbiol.* 21, 360 – 364, 1998
- Bohak, I., Thelen, K., Beimfohr, C.: Description of *Lactobacillus backi* sp. nov., an Obligate Beer-Spoiling Bacterium. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 60, 78–82, 2006
- Bohak, I., Back, W.: Biologische Säuerung. In: Back, W. (Hrsg.): *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie.* 109–121. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2008
- Bohak, I., Qian, F., Back, W., Weber, H., Szamer, T.: Biofilmbekämpfung nach dem Vorbild der Natur. *Brauwelt* 23, 716–719, 2011a
- Bohak, I., Back, W.: Erfolgsfaktor Micelle. Auswirkung von micellierten Konservierungsstoffen auf Biofilme in der Getränkeindustrie. *LVT Lebensmittel Industrie* 3, 22–25, 2011b
- Bohak, I., Qian, F., Englmann, J.: Gängige Nachweismedien für bierschädliche Bakterien. *Brauwelt* 14/15, 1556–1563, 2012
- Bokulich, N. A., Mills, D. A.: Differentiation of mixed lactic acid bacteria communities in beverage fermentations using targeted terminal restriction fragment length polymorphism. *Food Microbiology* 31, 126–132, 2012

- Bokulich, N. A., Bamforth, C. W.: The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77(2), 157–172, 2013
- Brandl, A.: Entwicklung und Optimierung von PCR-Methoden zur Detektion und Identifizierung von brauereirelevanten Mikroorganismen zur Routine-Anwendung in Brauereien. Dissertation, TU München, 2006
- Brettschneider, M.: Direkter Nachweis von Bierschädlingen. *Brauwelt* 24/25, 761–762, 2003
- Brul, S.: An Introduction to Molecular Biology (Omics) in Food Microbiology. In: Batt, C. A., Tortorello, M. L. (eds.): *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol. 2. Elsevier Ltd, Academic Press, 759–769, 2014
- Carriere, A.: Über die Biologie und Systematik der bierschädigenden stäbchenförmigen Bakterienarten. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin, 1959
- Carvalho, A. L., Turner, D.L., Fonseca, L. L., Solopova, A., Catarino, T., Kuipers, O. P., Voit, E. O., Neves, A. R., Santos, H.: Metabolic and Transcriptional Analysis of Acid Stress in *Lactococcus lactis*, with a Focus on the Kinetics of Lactic Acid Pools. *PLOS ONE* 8 (7), e68470, 2013
- Cenciarini-Borde, C., Courtois, S., La Scola, B.: Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools. *Future Microbiol.* 4, 45–64, 2009
- Cocolin, L., Rantsiou, K.: Quantitative Polymerase Chain Reaction in Food Microbiology. In: Filion, M. (ed.): *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk UK, 2012
- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., Rantsiou, K.: Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 29–43, 2013
- Colgrave, M. L., Goswami, H. Howitt, C. A., Tanner, G. J.: Review. Proteomics as a tool to understand the complexity of beer. *Food Research International* 54 (1), 1001–1012, 2013
- Collins, M. D., Phillips, B. A., Zanoni, P.: Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov., *IJSB* 39 (2), 105–108, 1989
- Collins, M. D., Rodrigues, U. M., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M., Wallabanks, S.: Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse-transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77(1), 5–12, 1991
- Comi, G., Manzano, M.: Beer Production. Chapter 7. In: Cocolin, L., Ercolino, D. (eds.): *Food Microbiology and Food Safety. Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer Science+Business Media, LLC, 2008
- Corsetti, A., Settanni, L., van Sinderen, D., Felis G. E., Dellaglio, F., Gobbetti, M.: *Lactobacillus rossii* sp. nov., isolated from wheat sourdough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 35–40, 2005
- Curk, M. C., Peladan, F., Hubert, J. C.: Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 123, 241–248, 1994
- Delaherche, A., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A.: Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 97, 910–915, 2004
- Deng, Y., Liu, J., Li, H., Li, L., Tu, J., Fang, H., Chen, J., Qian, F.: An improved plate culture procedure for the rapid detection of beer-spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* 120, 127–132, 2014
- Denoya, C., Reyes, J., Ganatra, M., Eshete, D.: Rapid sterility testing using ATP Bioluminescence based PALLCHEK™ RAPID microbiology system. In: Moldenhauer, J. (ed.): *Rapid Sterility Testing*. PDA and DHI Publishing, USA, 2011
- Dicks, L. M. T., Endo, A.: Taxonomic Status of Lactic Acid Bacteria in Wine and Key Characteristics to Differentiate Species. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 30 (1), 72–90, 2009
- Dittrich, H. H., Back, W., Sponholz, W. R.: Mikroorganismen in Getränken – eine Übersicht. In: Back, W. (Hrsg.): *Mikrobiologie der Lebensmittel. Getränke*. Behr's Verlag Hamburg, Deutschland, 2008

- Dowhanick, T.M., Sobczak, J., Presente, E., Russell, I.: Trial studies on the rapid quantitative detection of brewery microorganisms using a prototype ATP bioluminescence system. EBC Congress, 1995
- Donhauser, S.: Immunchemische Methoden in Brauerei und Mälzerei unter Berücksichtigung des Reinheitsgebotes. *Brauwelt* 1/2, 12–17, 2011
- Dufour, J.-P., Verstrepen, K., Derdelinckx, G.: Brewing yeasts. In: Boekhout, T., Robert, V. (eds.): *Yeasts in Food. Beneficial and Detrimental Aspects*. Behr's Verlag Hamburg, 2003
- Dzantiev, B. B., Byzova, N. A., Urusov, A. E., Zherdev, A. V.: Immunochromatographic methods in food analysis. Review. *Trends in Analytical Chemistry* 55, 81–93, 2014
- Eger, C., Donhauser, S., Winnewisser, W.: Schnelldiagnostik von Bierschädlingen. Möglichkeiten und Grenzen der Durchflußzytometrie nach Immo fluoreszenzmarkierung. *Brauwelt* 41, 2087–2095, 1993
- Eger, C.: Schnelldiagnostik bierschädlicher Bakterien mit immunchemischen Methoden. Dissertation, TU München, 1995
- Ehrmann, M., Pavlovic, M.: Einsatz molekularer Methoden für Starterkulturen. In: Busch, U. (Hrsg.): *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik. Grundlegende Methoden und Anwendungen*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010a
- Ehrmann, M., Preissler, P., Danne, M., Vogel, R. F.: *Lactobacillus paucivorans* sp. nov., isolated from a brewery environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2353–2357, 2010b
- Ehrmann, M., Vogel, R. F.: Taxonomic note "*Lactobacillus pastorianus*" (Van Laer, 1892) a former synonym for *Lactobacillus paracollinoides*. *System. Appl. Microbiol.* 28, 54–56, 2005
- Ellis, D. I., Goodacre, R.: Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. *Trends in Food Science & Technology* 12, 414–424, 2001
- Ellis, D. I., Goodacre, R.: Quantitative detection and identification methods for microbial spoilage. In: Blackburn, C. d. W. (ed.): *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England 2006
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Sakamoto, M., Kitahara, M., Dicks, L. M. T.: *Lactobacillus florum* sp. nov., a fructophilic species isolated from flowers. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 60, 2478–2482, 2010
- Eschenbecher, F.: *Lactobacillus pastorianus*? Über die Artzugehörigkeit der „Biermilchsäurestäbchen“. *Brauwissenschaft* 6, Jg. 19, 233–246, 1966
- Eschenbecher, F.: Zur Kenntnis der biersäuernden Bakterien. Teil I. *Brauwissenschaft* 11, Jg. 21, 424–437, 1968. (und als Fortsetzungen) Zur Kenntnis der biersäuernden Bakterien. *Brauwissenschaft*. Teil II. *Brauwissenschaft* 12, Jg. 21, 464–471, 1968
- Eschenbecher, F.: Zur Kenntnis der biersäuernden Bakterien. Teil III. *Brauwissenschaft* 1, Jg. 22, 14–28, 1969
- Fabienke, M., Siegrist, J.: New Fast and Innovative Detection of Beer Spoilage Organisms. *Microbiology Focus* 1.4, 1–8, 2009
- Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Collins, M. D.: Nucleic acid studies on some heterofermentative lactobacilli: Description of *L. malefermentans* sp. nov. and *Lactobacillus parabuchneri* sp. nov. *FEMS Microbiology Letters* 55, 163–168, 1988
- Felis, G. E., Pot, B.: The family *Lactobacillaceae*. in: Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. (ed.): *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons Ltd., 2014
- Filion, M. (ed.): *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk UK, 2012
- Fleet, G.H.: Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 101–117, 1999
- Forster, A., Andersen, L.: Gas chromatographic technique for the confirmation of *Megasphaera* and *Pectinatus* spp. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57 (3), 91–93, 1999
- Fuchs, G. (Hrsg.): *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 2007
- Funahashi, W., Suzuki, K., Ohtake, Y., Yamashita, H.: Two novel beer-spoilage *Lactobacillus* species isolated from breweries. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56, 64–69, 1998

- Gancheva, A., Pot, B., Vanhonacker, K., Hostel, B., Kersters, K.: A Polyphasic Approach towards the Identification of Strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and Related Species. *System. Appl. Microbiol.* 22, 573–585, 1999
- GEA-Tuchenhagen: Betriebsanleitung: VARIVENT-Probenahmesystem TSVR zur Entnahme von repräsentativen Durchschnittsproben. Ausgabe 02/94, Stand: 01.12.2014
- Gerhards, D., Born, H., Knoll, C.: Three Challenges – one solution. User-friendly PCR-based system for the detection of beer spoilage bacteria, thermophilic *Alicyclobacillus* spp. and *Legionella* spp. *BBII* 4, 52–55, 2014
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F. L., Swings, J.: Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (9), 733–739, 2005
- Giraffa, G.: Overview of the ecology and biodiversity of the LAB. In: Holzapel, W. H., Wood, B. J. B. (eds.): *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons, 2014
- Giraffa, G., Carminati, D.: Molecular Techniques in Food Fermentation: Principles and Applications. Chapter 1. In: Cocolin, L., Ercolini, D. (eds.). *Food Microbiology and Food Safety. Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer Science+Business Media, LLC, 2008
- Gracias, K. S., McKillip, J. L.: A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Can. J. Microbiol.* 50, 883–890, 2004
- Grünewälder, TH. Laaff, R.: Schnelltestmethoden auf Basis ATP-Biolumineszenz. *Brauwelt* 8/9, 314–317, 1998
- Haakensen, M., Dobson, C. M., Deneer, H., Ziola, B.: Real-time PCR detection of bacteria belonging to the *Firmicutes* Phylum. *International Journal of Food Microbiology* 125, 236–241, 2008a
- Haakensen, M., Schubert A., Ziola B.: Multiplex PCR for putative *Lactobacillus* and *Pediococcus* beer-spoilage genes and ability of gene presence to predict growth in beer. *J. American Society of Brewing Chemists.* 66 (2), 63–70, 2008b
- Haakensen, M., Dobson, C. M., Hill, J. E., Ziola, B.: Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 615–621, 2009a
- Haakensen, M., Schubert, A., Ziola, B.: Broth and agar hop-gradient plates used to evaluate the beer-spoilage potential of *Lactobacillus* and *Pediococcus* isolates. *International Journal of Food Microbiology* 130, 56–60, 2009b
- Haakensen, M., Pittet, V., Ziola, B.: Reclassification of *Paralactobacillus selangorensis* Leisner *et al.* 2000 as *Lactobacillus selangorensis* comb. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2979–2983, 2011
- Hall-Stoodly, L., Costerton, J. W., Stoodly, P.: Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2 (2), 95–108, 2004
- Hammes, W. P., Vogel, R. F.: The genus *Lactobacillus*. In: Wood, B.J.B., Holzapel, W.H. (eds.): *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2. Blackie Academic & Professional, 1995
- Hammes, W. P., Hertel, C.: The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (eds.): *The Prokaryotes*. Vol. 4: Bacteria: *Firmicutes*, Cyanobacteria. Springer Science & Business Media, 2006
- Hammes, W. P., Hertel, C.: Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901. In: Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., Whitman, W. (eds.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed., Vol. 3: The *Firmicutes*. Springer New York, 2009
- Hammond, J., Brennan, M., Price, A.: The Control of Microbial Spoilage of Beer. *J. Inst. Brew.* 105 (2), 113–120, 1999
- Heidebrecht, H.-J.: Validierung und Optimierung einer PCR-Nachweismethode bierschädlicher Bakterien und Hefen mit der Multiplexkapillarelektrophorese. Diplomarbeit, TU München, 2012

- Hein, T.: Der „Turboboost“ der Biotechnologie. Nachweis von bakteriellen Spurenkontaminationen mittels real-time PCR Brauindustrie 12, 10–13, 2010
- Henneberg, W.: Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien der Brenneremaische, der Milch und des Bieres. (*Bacillus Delbrücki* [Leichmann], *Bacillus Delbrücki* var. α n. sp., *Pediococcus lactis acidii* [Lindner] - *Bacillus lactis acidii* [Leichmann] *Bacterium lactis acidii* [Leichmann] - *Saccharobacillus pastorianus* [v. Laer], *Saccharobacillus pastorianus* var. α n. sp., *Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis* n. sp., *Bacillus lindneri* n. sp.). Wochenschrift für Brauerei 18, 381–384, 1901
- Henneberg, W.: Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien der Brenneremaische, der Milch, des Bieres, der Preßhefe, der Melasse, des Sauerkohls, der sauren Gurken und des Sauerteiges, sowie einige Bemerkungen über die Milchsäurebakterien des menschlichen Magens. Zeitschrift für Spiritusindustrie 26, Nr. 22–31, Zbl. Bact., II. 226–227, 243–244, 255–257, 270, 277–279, 288–290, 1903
- Henneberg, W.: Bakteriologische Untersuchungen an säuernden und gärenden Hefemaischen. (Ein Beitrag zur Kenntnis des Verhaltens des *Bacillus Delbrücki* bei verschiedenen Temperaturen.). Zeitschrift für Spiritusindustrie 28, 26–29, 1905
- Henneberg, W.: Gärungsbakteriologisches Praktikum, Betriebsuntersuchungen und Pilzkunde. Unter besonderer Berücksichtigung der Spiritus-, Hefe-, Essig- und Milchsäurefabrikation. Paul Parey, Berlin, 1909
- Henneberg, W.: Handbuch der Gärungsbakteriologie. Zweiter Band. Spezielle Pilzkunde. Unter besonderer Berücksichtigung der Hefe-, Essig-, und Milchsäurepilze. 2. Aufl., Paul Parey, Berlin, 1926
- Hensel, R., Mayr, U., Stetter, K. O., Kandler, O.: comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. I. Purification and kinetics of the allosteric L-lactic acid dehydrogenase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* and *Lactobacillus curvatus*. Arch. Microbiol. 112, 81–93, 1977
- Herbel, S. R., Vahjen, W., Wieler, K. H., Guenther, S.: Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. Review. Gut Pathogens 5 (27), 1–13, 2013
- Herrero, M., Simo, C., Garcia-Canas, V., Ibanez, E., Cifuentes, A.: Foodomics: MS-based Strategies in Modern Food Science and Nutrition. Mass Spectrometry Reviews 31, 49–69, 2012
- Heunis, T., Deane, S., Smit, S., Dicks, L. M. T.: Proteomic Profiling of the Acid Stress Response in *Lactobacillus plantarum* 423. J. Proteome Res. 13, 4028–4039, 2014
- Holzappel, W. H., Wood, B. J. B. (eds.): Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy. John Wiley & Sons, 2014
- Holzappel, W. H., Wood, B. J. B.: Introduction to the LAB. In: Holzappel, W. H., Wood, B. J. B. (eds.): Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy. John Wiley & Sons, 2014a
- Homann, F., Bremer, Z., Moeller-Hergt, G.: Etablierung der LightCycler™-PCR als Schnellnachweismethode. Bierschädliche Bakterien in der mikrobiologischen Routineanalytik, Brauwelt 23/24, 798–801, 2002
- Huhtamella, S., Leinonen, M., Nieminen, T., Fahnert, B., Myllykoski, L., Breitenstein, A., Neubauer, P.: RNA-based sandwich hybridisation method for detection of lactic acid bacteria in brewery samples. J. Microbiol. Methods, 68 (3), 543–553, 2007
- Hutter, K.-J.: Floreszenzserologischer Schnelldienst zur Identifizierung von Mikroorganismen auf Membranfilter. Brauwelt 18, 726–730, 1991
- Hutter, K.-J., Nachweis von Kontaminanten in Bier mit Hilfe der Bildanalyse. Brauwelt 30/31, 1235–1236, 2000
- Hutter, K.-J., Lappas, S., Kiehne, M., Kemenji, D., Nitzsche, F.: Kombiniertes Schnellverfahren mit der Mikrosiebfiltration und PCR-Analyse zur direkten Detektion von bierschädlichen Mikroorganismen. Monatsschrift für Brauwissenschaft 11/12, 198–205, 2003
- Hutzler, M., Schuster, E., Stettner, G.: Ein Werkzeug in der Brauereimikrobiologie. Real-time PCR in der Praxis. Brauindustrie 4, 52–55, 2008
- Hutzler, M.: Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen. Dissertation, TU München, 2009
- Hutzler, M.: Nährmedien in der Brauerei (aktuelle Entwicklungen). 43. Technologisches Seminar, Freising-Weihenstephan, Februar 2010

- Hutzler, M.: Brauereimikrobiologie – ausgewählte Befunde und Entwicklungen 2010. 44. Technologisches Seminar, Freising-Weihenstephan, Februar 2011
- Hutzler, M., Müller-Auffermann, K., Koob, J., Riedl, R., Jacob, F.: Bierschädliche Mikroorganismen – eine aktuelle Übersicht. Brauwelt 3, 58–60, 2013
- Hutzler, M.: Brauereimikrobiologie 2013 – aktuelle Forschungsprojekte und Praxiserfahrungen. 47. Technologisches Seminar, Freising Weihenstephan, Febr. 2014
- Jespersen, L., Jakobsen, M.: Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. Int. J. Food Microbiol. 33, 139–155, 1996
- Joergensen, A.: Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie. 5. Aufl. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin, 1909
- Joergensen, A.: Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie. Neubearbeitet von A. Hansen und A. Lund., 6. Aufl., Gustav Fischer, Jena, 1940
- Juvonen, R., Suihko, M.-L.: *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikaræ* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 695–702, 2006
- Juvonen, R.: DNA-based detection and characterisation of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria. Dissertation, VTT Publications 723, Helsinki, Finland, 2009
- Juvonen, R., Partanen, T., Koivula, T.: Evaluation of Reverse-Transcription PCR Detection of 16S rRNA and *tuf* mRNA for Viable/Dead Discrimination of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria. J. Am. Soc. Brew. Chem. 68 (2), 101–106, 2010
- Kern, C. C., Vogel, R. F., Behr, J.: Identification and differentiation of brewery isolates of *Pectinatus* sp. by Matrix-Assisted-Laser Desorption–Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Eur. Food Res. Technol. 238 (5), 875–880, 2014a
- Kern, C. C., Vogel, R. F., Behr, J.: Differentiation of *Lactobacillus brevis* strains using Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry with respect to their beer spoilage potential. Food Microbiology 40, 18–24, 2014b
- Kern, S., Elstner, E. F., Bohak, I.: Immunaktives naturtrübes Bier. Brauwelt 11, 294–298, 2008
- Kiehne, M.: Schnellnachweis von bierschädlichen Mikroorganismen mittels foodproof® beer screening. Brauerei Forum 3, 72–73, 2001
- Kiehne, M.: Nachweis und Identifikation mikrobiologischer Verunreinigungen mittels real-time PCR. Brauwelt 40, 1216–1218, 2009
- Knoll, C., Born, H., Ziehl, J.: Bier-Schädlinge schnell und zuverlässig detektieren. Brauwelt 45, 1320–1324, 2012
- Kötke, H.: Entwicklung von Mikrosieb-Applikationen in der Getränke-Filtrationstechnologie. Dissertation, TU München, 2012
- Kolbach, P., Haussmann, G., Wilharm, G.: Ueber den Einfluß der biologischen Säuerung auf die Zusammensetzung von Würze und Bier. Wochenschrift für Brauerei 52, 233–246, 1935
- Konecna, H., Müller, L., Dosoudilova, H., Potešil, D., Bursikova, J., Šedo, O., Marova, I., Zdraha, Z.: Exploration of Beer Proteome Using OFFGEL Prefractionation in Combination with Two-Dimensional Gel Electrophoresis with Narrow pH Range Gradients. J. Agric. Food Chem. 60, 2418–2426, 2012
- Koob, J., Jacob, F., Grammer, M., Kleucker, A., Riedl, R., Hutzler, M.: PCR-Analysen bierschädlicher Bakterien 2012 und 2013. Brauwelt 10, 288–290, 2014
- Kruska, L., Schneegans, S.: Identifizierung von Mikroorganismen jenseits der klassischen Mikrobiologie. Brauwelt 31/32, 946–947, 2010
- Kusano, K., Yamada, H., Niwa, M., Yamasato, K.: *Proponibacterium cyclohexanicum* sp. Nov., a new acid-tolerant w-cyclohexyl fatty acid-containing *proponibacterium* isolated from spoiled orange juice. Int. J. Syst. Bacterio. 47, 825–831, 1997
- Lafar, F.: Die künstliche Säuerung des Hefegutes der Brennereien. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk., Abt. II 2, 194–196, 1896
- Laplace, J. M., Sauvageot, N., Hartke, A., Auffray, Y.: Characterization of *Lactobacillus collinoides* response to heat, acid and ethanol treatments. Appl Microbiol. Biotechnol. 51, 659–663, 1999

- Leichmann, G.: Über die im Brennereiprozeß bei der Bereitung von Kunsthefe auftretende spontane Milchsäuregärung (*Bacillus Delbrücki*). Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk., Abt. II 20, 281–285, 1896
- Leroy, F., De Vuist, L.: Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Review. Trends in Food Science & Technology 15, 67–78, 2004
- Lewington, J., Greenaway, S. P., Spillane, G. J.: Rapid small scale preparation of bacteria genomic DNA, suitable for cloning and hybridization analysis. Lett Appl. Microbiol. 5, 51–53, 1987
- Lindner, P.: Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben mit einer Einführung in die technische Biologie, Hefenreinkultur und Infektionslehre. 4. Aufl. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin, 1905
- Lindner, P.: Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben mit einer Einführung in die technische Biologie, Hefenreinkultur und Infektionslehre. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, 5. Auflage, Berlin, 1909
- Lindner, P.: Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. 6. Auflage. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin, 1930
- Liu, S., Qureshi, N.: How microbes tolerate ethanol and butanol. New Biotechnology 2, (3/4), 117–121, 2009
- Liu, S.: Proteomic analyses of ethanol tolerance in *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929. Proteomics 14, 2540–2544, 2014
- London, J.: Uncommon pathways of metabolism among lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 87 (1/2), 103–112, 1990
- Lowe, D. P., Arendt, E. K.: The Use and Effects of Lactic Acid Bacteria in Malting and Brewing with Their Relationships to Antifungal Activity, Mycotoxins and Gushing: A Review. J. Inst. Brew. 110 (3), 163–180, 2004
- LPSN bacterio.net (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature): a folder available on the Internet <http://www.bacterio.net/>. Abgerufen 12/2014
- Ludwig, W., Kirchof, G., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Betzl, D., Ehrmann, M., Hertel, C., Jilg, S., Tatzel, R., Zitzelsberger, H., Liebl, S., Hochberger, M., Lane, D., Wallnöfer, P. R., Schleifer, K. H.: Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content. System. Appl. Microbiol. 15, 487–501, 1992
- Ludwig, W., Schleifer, K. H.: Bacterial phylogeny based on 16S and 23 S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Rev. 15, 155–173, 1994
- Ludwig, W.: Reprint of "Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification". [Int. J. Food Microbiol., 120 (2007) 225–236]. Int. J. Food Microbiol. 125 (1), I–XII, 2008
- Lüers, H.: Erfahrungen über die Verwendbarkeit des *Bacillus Delbrücki* zur Herstellung haltbarer, heller Biere. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. 7, 51–53 und 58–61, 1920
- Maerker, M.: Anleitung zum Brennereibetrieb. Praktischer Leitfaden für Brenner und zum Gebrauch an landwirtschaftlichen Lehranstalten. Verlagsbuchhandlung Paul Parey Berlin, 1898
- McMurrugh, I., Palmer, V.: Lactic Acid Production in Sweet Wort. J. Inst. Brew. 85, 11–14, 1978
- Mamvura, T.A., Iyuke, S.E., Cluett, J.D., Paterson, A.E.: Soil Films in the Beverage Industry: A Review. J. Inst. Brew. 117 (4), 608–616, 2011
- Manzano, M., Iacumin, L., Vendrame, M., Cecchini, F., Comi, G., Buiatti, S.: Craft Beer Microflora Identification Before and After a Cleaning Process. J. Inst. Brew. 117 (3), 343–351, 2011
- March, C. Manclús, J. J., Abad, A., Navarro, A., Montoya, A.: Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera. Journal of Immunological Methods 303 (1–2), 92–104, 2005
- Martinez, A. R., Abranches, J., Kajfasz, J. K., Lemos, J. A.: Characterization of the *Streptococcus sobrinus* acid stress response by interspecies microarrays and proteomics. Mol. Oral Microbiol. 25 (5), 331–342, 2010

- Martínez, N., Martín, M. C., Herrero, A., Fernández, M., Alvarez, M. A., Ladero, V.: qPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: Significance for food quality. *Trends in Food Science & Technology* 22, 367–376, 2011
- Spano, G., Massa, S.: Environmental Stress Response in Wine Lactic Acid Bacteria: Beyond *Bacillus subtilis*. *Critical Reviews in Microbiology* 32, 77–86, 2006
- Mattarelli, P., Holzapfel, W., Franz, C. M. A. P., Endo, A., Felis, G. E., Hammes, W., Pot, B., Dicks L., Dellaglio, F.: Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1434–1451, 2014
- Menz, G., Aldred, P., Vriesekoop, F.: Chapter 39, Pathogens in Beer. In: Preedy, V. R. (ed.): *Beer in Health and Disease Prevention*. 403–413. Elsevier Inc. Academic Press, 2009
- Menz, G., Andrighetto, C., Lombardi, A., Corich, V., Aldred, P., Vriesekoop, F.: Isolation, Identification, and Characterisation of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria from Microbrewed Beer from Victoria, Australia. *J. Inst. Brew.* 116 (1), 14–22, 2010
- Methner, F.-J., Schuster, E., Schackmann, A.: Screening of Beer-Spoilage Bacteria Using the LightCycler PCR Workflow System. *Biochemica* 1, 9–11, 2004
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A.: The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 136–141, 2000
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jains, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O., Yadv, H.: Approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Diseases* 9 (4), 190–198, 2008
- Molzahn, S.W.; Portno A.D.: New advances in microbiological quality Control. *Proceedings of the EBC Congress, Nizza*, 479–487, 1975
- Moore, W. B., Rainbow, C.: Nutritional requirements and biochemical activities of brewery lactobacilli. *J. gen. Microbiol.* 13, 190–197, 1955
- Mortensen, B. K.: Mikrobiologische Gefahren vermeiden. Erkennung von Biofilmen, Rissen und Poren in Edeltanktanks. *Brauindustrie* 10, 44–47, 2014
- Motoyama, Y., Ogata, T., Sakai, K.: Characterisation of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *P. frisingensis* by Ribotyping. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56 (1), 19–23, 1998
- Motoyama, Y., Funahashi, W., Ogata, T.: Characterization of *Lactobacillus* spp. by Ribotyping. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58 (1), 1–3, 2000
- Mtshali, P. S., Divol, B., du Toit, M.: Identification and characterization of *Lactobacillus florum* strains isolated from South African grape and wine samples. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 106–113, 2012
- Mücher, G., Schönling, J.: PCR-Nachweis von Bierschädlingen mit dem First-Bier-Kit. *Brauwelt* 39/40, 1570–1572, 2000
- Miyamoto, M., Seto, Y., Hao, D.H., Teshima, T., Sun, Y.B., Kabuki, T., Yao, L.B., Nakajima, H.: *Lactobacillus harbinensis* sp. nov., consisted of strains isolated from traditional fermented vegetables 'Suan cai' in Harbin, Northeastern China and *Lactobacillus perolens* DSM 12745. *System. Appl. Microbiol.* 28, 688–694, 2005
- Murakami, H., Fujii, T., Hayashi, N.: Loop-mediated Isothermal Amplification to Detect and Identify Beer Spoilage *Lactobacillus* spp. *Brewing Science* 62, 172–180, 2009
- Nakakita, Y., Takahashi, T., Sugiyama, H., Shigyo, T., Shinotsuka, K.: Isolation of Novel Beer-Spoilage Bacteria from Brewery Environment. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56 (3), 114–117, 1998
- Nakamura, L. K.: *Lactobacillus amylovorus*, a New Starch-Hydrolyzing Species from Cattle Waste-Corn Fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31 (1), 56–63, 1981
- Narziß, L., Back, W., Leibhard, M.: Optimierung biologischer Verfahren zur Herstellung von alkoholfreiem Bier mittels geeigneter Kulturen. *Brauwelt* 45, 2206–2214, 1989
- Narziß, L., Heiden, L.: Über die Anwendung von Sauermais oder Sauerwürze beim Sudprozeß. *Brauwelt* 111, 435–440, 1971
- Narziß, L., Kieninger, H.: Über die Anwendung von Milchsäure beim Sudprozeß. *Brauwelt* 113, 53–55, 1973
- Nishikawa, N., Kohgo, M.: Microbiological control in Brewery. *MBBA Technical Quarterly* 22, 61–66, 1985

- Nocker, A., Camper, A. K.: Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbio. Lett.* 291, 137–142, 2009
- Novy R., Tippmann, J., Becker, T.: Marktanalyse: Mikrobiologische Qualitätssicherung. *Brauwelt* 20, 582–589, 2013
- Nummer, B.A.: Brewing with lactic acid bacteria. *Brewing Techniques* 4, 56–63, 1996
- Odebrecht, E., Curitiba, Schidt, H. J., Franco, B.G. M.: Versuche zur Einsetzbarkeit der Biolumineszenz in der Brauerei. *Brauwelt* 45, 1904–1915, 2000
- O'Rourke, T.: Microbiological quality. *Brewers' Guardian* 39–41, Oct. 2000
- o. V.: Über den Einfluß der Milchsäure beim Maischprozeß. *Zeitschr. f. d. ges. Brauw.* 24, 637–639, 1880
- Pedersen, C., Jonsson H., Lindberg, J.E., Roos S.: Microbiological Characterization of Wet Wheat Distillers' Grain, with Focus on Isolation of Lactobacilli with Potential as Probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (3), 1522–1527, 2004
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Fernández-González, M., Arévalo, M., Llanos Palop, M.: Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *Int. J. Food Microbiol.* 190, 44–53, 2014
- Pisz, J. M., Lawrence J. R., Schafer, A. N., Siciliano, S. D.: Differentiation of genes extracted from non-viable versus viable micro-organisms in environmental samples using ethidium monoazide bromide. *J. Microbiol. Methods* 71, 312–318, 2007
- Pittet, V., Morrow, K, Ziola, B.: Ethanol Tolerance of Lactic Acid Bacteria, Including Relevance of the Exopolysaccharide Gene *gtf*. *J. Am.Soc. Brew. Chem.* 69, 57–61, 2011
- Pittet, V., Phister, T. G., Ziola, B.: Transcriptome Sequence and Plasmid Copy Number Analysis of the Brewery Isolate *Pediococcus claussenii* ATCC BAA-344^T during Growth in Beer. *PLOS ONE* 8 (9), e73627, 2013
- Pöschl, P.: Verfahren zum sicheren Nachweis von Spurenkontaminationen bei der Getränkeherstellung. Dissertation, TU München, 2000
- Pot, B., Vandamme, P., Kersters, K.: Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints. In: M. Goodfellow, A. G.O'Donnell (eds.): *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics.* 493–551. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, U. K., 1994
- Pot, B., Felis, G. E., De Bruyne, K., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., Vandamme, P.: The genus *Lactobacillus*. In: Holzappel, W. H., Wood, B. J. B. (eds.): *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy.* John Wiley & Sons, 2014
- Poulsen, P. C.: Über die Säuerung der Maische. *Wochenschrift für Brauerei*, 91–93, 1925
- Prior, E.: *Chemie und Physiologie des Malzes und des Bieres.* Barth Verlag Leipzig, 1896
- Preissler, P., Behr, J., Vogel, R. F.: Detection of Beer-spoilage *Lactobacillus brevis* strains by Reduction of Resazurin. *J. Inst. Brew.* 116 (4), 399–404, 2010
- Preissler, P.: Categorization of *Lactobacillus brevis* along their beer-spoiling potential. Dissertation, TU München, 2011
- Qian F.: Einfluss der Bierzusammensetzung auf die mikrobiologische Stabilität von Reisbier. 42. Technologisches Seminar, Freising Weihenstephan, Januar 2009
- Quain, D.: The „new“ microbiology. EBC Kongress, Cannes, 1999
- Reddy, G., Altaf, Md., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E.V.: Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. *Biotechnology Advances* 26, 22–34, 2008
- Rinck, M., Wackerbauer, K.: Mikrobiologische Endproduktkontrolle mit direkten Schnellverfahren. Vergleichende Untersuchungen zur Praktikabilität neuerer Methoden. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 4, 164–169, 1987
- Rogosa, M., Sharpe, M. E.: An approach to the classification of the *lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* 22, 329–340, 1959
- Rogosa, M., Hansen, A.: Nomenclatural Considerations of Certain Species of *Lactobacillus* Beijerinck. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol. (IJSEM)* 21 (2), 177–186, 1971
- Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., Al Dahouk, S.: FISHing for bacteria in food – A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria? Review. *Food Microbiology* 46, 395–407, 2015

- Roszak, D. B., Colwell, R. R.: Survival strategies of bacteria in the natural environment, *Microbiol. Rev.* 51 (3), 365–379, 1987
- Rusch, A., Krämer, J.: Schnellnachweis bierschädlicher Mikroorganismen mit der modifizierten MMCF-Methode. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 2, 77–90, 1990
- Russell, C., Walker, T. K.: *Lactobacillus malefermentans* n. sp., isolated from beer. *J. gen. Microbiol.* 8, 160–162, 1953a
- Russell, C., Walker, T.K.: *Lactobacillus parvus* n. sp., isolated from beer. *J. gen. Microbiol.* 8, 310–313, 1953b
- Sakakibara, T., Murakami, S., Imai, K.: Enumeration of bacterial cell numbers by amplified firefly bioluminescence without cultivation. *Analytical Biochemistry* 312, 48–56, 2003
- Sakamoto, K., Konings, W. N.: Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 105–124, 2003
- Salvetti, E., Fondi, M., Fani, R., Torriana, S., Felis, G. E.: Evolution of lactic acid bacteria in the order Lactobacillales as depicted by analysis of glycolysis and pentose phosphate pathways. *System. Appl. Microbiol.* 36, 291–305, 2013
- Satoh T., Kato, J., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kuroda, A.: ATP Amplification for Ultrasensitive Bioluminescence Assay: Detection of a Single Bacterial Cell. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68 (6), 1216–1220, 2004
- Schillinger, U.: Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Milchsäurebakterien. Dissertation, Ludwig-Maximilian Universität München, 1985
- Schleifer, K. H., Ludwig, W., Amann, R.: Gensonden und ihre Anwendung in der Mikrobiologie. *Naturwissenschaften* 79, 213–219, 1992a
- Schleifer, K. H., Ludwig, W., Amann, R.: Nucleic acid Probes. In: Goodfellow, M., Stackebrand, E. (eds.): *Handbook of new bacterial Systematics*. 463–510. Academic Press, New York, 1992b
- Schleifer, K. H., Ludwig, W.: Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. 7–18. In: Wood, B. J. B., Holzappel, W. H. (eds.): *The lactic acid bacteria, Vol. 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Glasgow, Scotland. 1995a
- Schleifer, K. H., Ludwig, W.: Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System. Appl. Microbiol.* 18, 461–467, 1995b
- Schleifer, K. H.: Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future. *System. Appl. Microbiol.* 32 (8), 533 – 542, 2009
- Schmidt, H. J.: Mikrobiologische Schnellnachweisverfahren – Eine kritische Betrachtung. *Brauwelt* 10/11, 402–409, 1992
- Schnegg, H.: *Das mikroskopische Praktikum des Brauers. II. Teil: Gärungsorganismen. Band 3.* Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, 1922
- Schnick, T, Baier, B., Voetz, M., Otto, R.: Überlebenskünstler. Verstecktes Infektionspotential anaerober Bierschädlinge. *Brauindustrie* 10, 62–64, 2014
- Schönfeld, F., Rommel, W.: Untersuchungen über Trübungen im Lagerbier verursachendes Stäbchenbakterium (*Bacillus fasciformis*). *Wochenschr. Brauerei* 19, 585–588, 1902
- Schropp, H.-P., Englmann, J., Cotterchio, D., Jacob, F.: Technologische Abnahme und mikrobiologische Betrachtung von Getränkeabfüllanlagen. *Brauwelt* 5/6, 140–143, 2013
- Schubert, S., Wieser, A.: Molekulare Speziesdifferenzierung. MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOspektrum* 16, 760–763, 2010
- Schütt, R.: Produktbroschüre - Probenahmesystem Simplex 2600. <http://rschuett.de>, Stand: 24.11.2014
- Schütza, M.: Vorgänge im Sauergutbottich. *Wochenschrift für Brauerei* 52, Jg. 29, 227–229, 1935
- Schumann, P., Pukall, R.: Minireview. The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 36, 369–375, 2013
- Schurr, B. C., Hahne, H., Kuster, B., Behr, J., Vogel, R. F.: Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- α -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology* 46, 553–563, 2015

- Schwill-Miedaner, A., Eichert, U.: Methodenentwicklung zur Beurteilung des Hygienestatus von Schankanlagen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 51, 7/8, 104–110, 1998
- Shimwell, J. L.: A rational nomenclature for the brewery lactic acid bacteria. *J Inst Brew* 54 (2), 100–104, 1948
- Shipovskov, S., Saunders, A. M., Nielsen, J. S., Hansen, M. H., Gothelf, K. V., Ferapontova, E. E.: Electrochemical sandwich assay for attomole analysis of DNA and RNA from beer spoilage bacteria *Lactobacillus brevis*. *Biosensors and Bioelectronics* 37, 99–106, 2012
- Siegumfeldt, A., Rechinger, K. B., Jakobsen, M.: Dynamic Changes of Intracellular pH in Individual Lactic Acid Bacterium Cells in Response to a Rapid Drop in Extracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (6), 2330–2335, 2000
- Singh, S., Goswami, P., Singh, R., Heller, K. J.: Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT - Food Science and Technology* 42, 448–457, 2009
- Snaidr, J., Beimfohr, C.: VIT for fun, Biergenuss ohne Reue. *Lebensmittelindustrie* 47, 30–31, 2003
- Soro-Yao, A. A., Schumann, P., Thonar, P., Djè, K. M., Pukall, R.: The Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry, Ribotyping and Phenotypic Tests to Identify Lactic Acid Bacteria from Fermented Cereal Foods in Abidjan (Côte d'Ivoire). *The Open Microbiology Journal* 8, 78–86, 2014
- Spicher, G., Schröder, R.: Die Mikroflora des Sauerteiges. IV. Mitteilung. Untersuchungen über die Art der in „Reinzuchtsauern“ anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus Beijerinck*). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 167, 343–354, 1978
- Storgårds, E., Suihko, M.-L., Pot, B., Vanhonacker, K., Janssen, D., Broomfeld, P. L. E., Banks, J. G.: Detection and Identification of *Lactobacillus lindneri* from Brewery environments. *J. Inst. Brew.* 104, 47–54, 1998
- Storgårds, E.: Process hygiene control in beer production and dispensing. *VTT Publications* 410, 1–105, 2000
- Storgårds, E., Haikara, A., Juvonen, R.: Brewing control systems: microbiological analysis. In: Bamforth, C. W. (ed.): *Brewing. New technologies*. Woodhead Publishing Limited, Abington, England, 2006
- Storgårds, E., Priha, O.: Biofilms and brewing. In: Fratamico P.M., Annous B.A., Gunther N.W. (eds.): *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Woodhead Publishing Limited, UK. 432–454, 2009
- Strachotta, T.: Wichtige Aspekte der mikrobiologischen Probenahme. *Brauwelt* 32, 973–984, 2004
- Suihko, M.-L., Haikara, A.: Characterization of *Pectinatus* and *Megasphaera* Strains by Automated Ribotyping, *J. Inst. Brew.* 107 (3), 175–184, 2001
- Sun Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., Zhang, H.: Chapter 1: Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria, 1–101. In: Zhang, H., Cai Y. (eds.): *Lactic Acid Bacteria*. Springer Science+Business Media, Dordrecht, 2014
- Suzuki, K., Koyanagi, M., Yamashita, H.: Genetic characterization and specific detection of beer-spoilage *Lactobacillus* sp. LA2 and related strains. *Journal of Applied Microbiology* 96, 677–683, 2004a
- Suzuki, K., Funahashi, W., Koyanagi, M., Yamashita, H.: *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov., isolated from brewery environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 115–117, 2004b
- Suzuki, K., Iijima K., Ozaki, K., Yamashita, H.: Study on ATP Production of Lactic Acid Bacteria in Beer and Development of a Rapid Pre-Screening Method for Beer-Spoilage Bacteria. *J. Inst. Brew.* 111 (3), 328–335, 2005a
- Suzuki, K., Iijima K., Ozaki, K., Yamashita, H.: Isolation of a Hop-Sensitive Variant of *Lactobacillus lindneri* and Identification of Genetic Markers for Beer Spoilage Ability of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9), 5089–5097, 2005b

- Suzuki, K., Iijima, K., Asano, S., Kuriyama, H., Kitagawa, Y.: Induction of Viable but Nonculturable State in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. *J. Inst. Brew.* 112 (4), 295–301, 2006
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., Kuriyama, H., Kitagawa, Y.: Development of detection medium for hard-to-culture beer-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 104 (5), 1458–1470, 2008
- Suzuki, K.: 125th Anniversary Review: Microbiological Instability of Beer Caused by Spoilage Bacteria. *J. Inst. Brew.* 117 (2), 2011
- Szewzyk, U., Szewzyk, R.: Biofilme – die etwas andere Lebensweise. *BIOspektrum* 3, Jg. 9, 253–255, 2003
- Takahashi, T., Nakakita, Y., Monji, Y., Watarei, J., Shinotsuka, K.: Application of new automatic MicroStar RMDS (ATP-bioluminescence system) for rapid quantitative detection of brewery contaminants. *Proc. of the EBC-Congress 1999, Cannes*, 259–267, 1999
- Takahashi, T., Nakakita, Y., Monji, Y., Watarei, J., Shinotsuka, K.: A New Rapid Technique for Detection of Microorganisms Using Bioluminescence and Fluorescence Microscope Method. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89(5), 509–513, 2000
- Takahashi, M., Kita, Y., Kusaka, K., Mizuno, A., Goto-Yamamoto, N.: Evaluation of microbial diversity in the pilot-scale beer brewing process by culture-dependent and culture-independent method. *J. Appl. Microbiol.* 118, 454–469, 2014
- Taskila, S., Tuomola, M., Kronlöf, J., Neubauer, P.: Comparison of Enrichment Media for Routine Detection of Beer Spoiling Lactic Acid Bacteria and Development of Troubleshooting Medium for *Lactobacillus backii*. *J. Inst. Brew.* 116 (2), 151–156, 2010
- Taskila, S., Kronlöf, J., Ojama, H.: Enrichment Cultivation of Beer-Spoiling Lactic Acid Bacteria. *J. Inst. Brew.* 117 (3), 285–294, 2011
- Temmermann, R., Huys, G., Swing, J.: Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology* 15 (7/8), 348–359, 2004
- Thelen K., Beimfohr C., Bohak I., Back, W.: Spezifischer Schnelldiagnostik von bierschädlichen Bakterien mittels fluoreszenzmarkierter Gensonden. *Brauwelt* 38, 1596–1603, 2001
- Thelen, K., Beimfohr, C., Bohak, I., Back, W.: Specific rapid detection test for beer spoilage bacteria using fluorescently labelled gene probes, *Brauwelt International III*, 156–159, 2002
- Thelen, K., Beimfohr, C., Snaidr, J.: Evaluation study of the frequency of different beer-spoiling bacteria using the VIT analysis. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 43, 31–35, 2006
- Thelen, K.: Entwicklung und Optimierung von in situ Methoden zum Nachweis von lebensmittelrelevanten Bakterien. Dissertation, TU München. 2009
- Thiele, F., Back, W.: Mikrobiologie des Bieres. In: Back, W. (Hrsg.): *Mikrobiologie der Lebensmittel. Getränke*. Behr's Verlag Hamburg, 2008
- Trüper, H. G., De Clari L.: Taxonomic note: Necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". In: *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 47, 908-909, 1997
- Tohno, M., Kitahara, M., Tomohiro Irisawa, T., Masuda, T., Uegaki, R., Ohkuma, M., Tajima, K.: Description of *Lactobacillus iwatensis* sp. nov., isolated from orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) silage, and *Lactobacillus backii* sp. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3854–3860, 2013
- Tsuchiya, Q., Nakakita, Y., Watari, J., Shinotsuka, K.: Monoclonal Antibodies Specific for the Beer-Spoilage Ability of Lactic Acid Bacteria, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58 (3), 89–93, 2000
- Utz, L.: Ueber die Vergärbarkeit der Milchsäure. *Der bayerische Bierbrauer*, 170–176, 190–195 und 214–222, 1870
- Vaitl, R.: Die biologische Säuerung. *Brauwelt* 17, Jg. 101, 285–288, 1961
- Valton-El Khoury, N., Caron, A., Vicente, M., Chollet, R.: Nicht-destruktiver Schnelldiagnostik mikrobieller Bierschädlinge. *Brauwelt* 50, 1507–1509, 2012

- Van Bokhorst-van de Veen, H., Abee, T., Tempelaars, M., Bron, P. A., Kleerebezem, M., Marco, M.L.: Short- and Long-Term Adaptation to Ethanol Stress and Its Cross-Protective Consequences in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (15), 5247–5256, 2011
- Vancanneyt, M., Naser, S. M., Engelbeen, K., De Wachter, M., Van der Meulen, R., Cleenwerck, I., Hoste, B., De Vuyst, L., Swings, J.: Reclassification of *Lactobacillus brevis* strains LMG 11494 and LMG 11984 as *Lactobacillus parabrevis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1553–1557, 2006
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J.: Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407–438, 1996
- Vandamme, P., De Bruyne, K., Pot, B.: Phylogenetics and systematic. In: Holzapel, W. H., Wood, B.J.B. (eds.): *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons, 2014
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., Maguin, E.: Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 187–216, 2002
- Van der Vossen, J. M. B. M., Hofstra, H.: DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 35–49, 1996
- Van Laer, H.: Contributions a l'histoire des ferments des hydrates de carbone (Bacille des bieres tournees). *Mem. Acad. Roy. Belgique* 47, 37–39, 1892
- Vaughan, A., O'Sullivan, T., van Sinderen, D.: Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer – A Review. *J. Inst. Brew.* 111 (4), 355–371, 2005
- Vera, A., Ly-Chatain, M.H., Rigobello, V., Demarigny, Y.: Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focussing on the *lactobacilli* present in the microbiota. *Antonie van Leeuwenhoek* 101, 369–377, 2012
- Vogel, H., Bohak, I.: Schnellnachweismethoden für schädliche Mikroorganismen in der Brauerei. Impedanzverfahren. *Brauwelt* 10, 414–422, 1990
- Vogel, R. F., Preissler, P., Behr, J.: Towards an Understanding of Hop Tolerance in Beer Spoiling *Lactobacillus brevis*. *BrewingScience* 63, 23–31, 2010
- Vogeser, G., Donhauser, S., Winnewisser, W.: Schnellnachweis von Bierschädlichen *Lactobacillus*-Arten mit der Polymerase Chain Reaction (PCR). *Analysis and Process Management*. EBC Congress, 1995
- Vogeser, G., Geiger, E.: Mikrobiologische Analyse von Bierproben mit der PCR-Methode. *Brauwelt* 24/25, 1060–1063, 1998
- Vriesekoop, F., Krahl, M., Hucker, B., Menz, G.: 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *J. Inst. Brew.* 118, 335–345, 2012
- Wackerbauer, K., Methner, F.J.: The microorganisms of „Berliner Weissbier“ and their influence on the beer flavour. EBC Microbiology Group Meeting, Wuppertal, Germany, 13.–15. June, 1988
- Walker, S. L., Hammond, J R M, Pawlowsky, K D M , Mauguere, T M.-J.: A PCR-ELISA assay for the detection of beer spoilage organisms. *Proc. 29th EBC Congr.*, Dublin, 104, 1057–1064, 2003
- Wassenaar, T. M., Lukjancenko, O.: Comparative genomics of *Lactobacillus* and other LAB. In: Holzapel, W. H., Wood, B. J. B. (eds.): *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons, 2014
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell. R. R., Grimont, P A D., Kandler, O., Krichevsky, M I., Morre, L H., Morre, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., Trüper, H. G.: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846.849, 1987
- Weber, D. G., Sahm, K., Polen, T., Wendisch, V. F., Antranikian, G.: Oligonucleotide microarrays for the detection and identification of viable beer spoilage bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 105 (4), 951–962, 2008
- Weiss, N., Schillinger, U., Kandler, O.: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmanni*, *Lactobacillus bulgaricus*, Subjectiv Synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and Description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov. *System. Appl. Microbiol.* 4, 552–557, 1983

- Weiss, N., Schillinger, U.: *Lactobacillus sanfrancisco* nov. spec., nom. rev. System. Appl. Microbiol. 5, 230–232, 1984
- Werlein, H. D., Kerschbaum, M., Mevs, U.: Hygienekontrolle im Brauereiwesen. Brauwelt 17, 640–644, 1997
- Wieme, A. D., Spitaels, F., Aerts, M., De Bruyne, K., Van Landschoot, A., Vandamme, P.: Identification of beer-spoilage bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Int. J. Food Microbiol. 185, 41–50, 2014
- Windisch, W.: Bierherstellungsversuche mit künstlicher Säuerung der Maische durch den *Bacillus Delbrücki*. Wochenschrift für Brauerei 30, 521–524, 1913
- Windisch, W., Klein J.: Über die Benutzung von *Bacillus Delbrücki* zur Säuerung von Brauereimaischen, sowie über den Einfluß der Säuerung auf die Zusammensetzung der Würze. Wochenschrift für Brauerei 30, 501–504, 1913
- Yamazaki, K., Teduka, H., Shinano, H.: Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Bioscience Biotechnol. Biochem. 60, 543–545, 1996
- Yansanjav, A., Svec, P., Sedlacek, I., Hollerova, I., Nemeč, M.: Ribotyping of *Lactobacilli* isolated from spoiled beer. FEMS Microbiology Letters 229, 141–144, 2003
- Yasuhara, T., Yuuki, T., Kagami, N.: Novel Quantitative Method for Detection of *Pectinatus* Using rRNA Targeted Fluorescent Probes, J. Am. Soc. Brew. Chem. 59 (3), S. 117–121, 2001
- Yasui, T., Yoda, K.: Purification and partial characterization of an antigen specific to *Lactobacillus brevis* strains with beer spoilage activity. FEMS Microbiology Letters 151, 169–176, 1997
- Zarnkow, M., Bohak, I., Back, W.: Hygienekontrolle im Brauereiproduktionsbereich mittels ATP-Biolumineszenz. Brauwelt 5, 170–175, 2000
- Zhao, Y., Knøchel, S., Siegumfeldt, H.: *In situ* examination of *Lactobacillus brevis* after exposure to an oxidizing disinfectant. Frontiers in Microbiology 5, Artikel 623, 2014
- Ziola, B., Ulmer, M., Bueckert, J., Giesbrecht, D., Lee, S.: Monoclonal Antibodies Showing Surface Reactivity with *Lactobacillus* and *Pediococcus* Beer Spoilage Bacteria. J. Am. Soc. Brew. Chem. 58 (2), 63–68, 2000
- Zou, Y., Liu, F., Fang, C., Wan, D., Yang, R., Su, Q., Yang, R., Zhao, J.: *Lactobacillus shenzhenensis* sp. nov., isolated from a fermented dairy beverage. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 1817–1823, 2013
- Zschaler, R.: Mikrobiologische Schnellmethoden. In: Baltes, W., Kroh, L. W. (Hrsg.): Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen. 3. Auflage. Behr's Verlag Hamburg, 2004