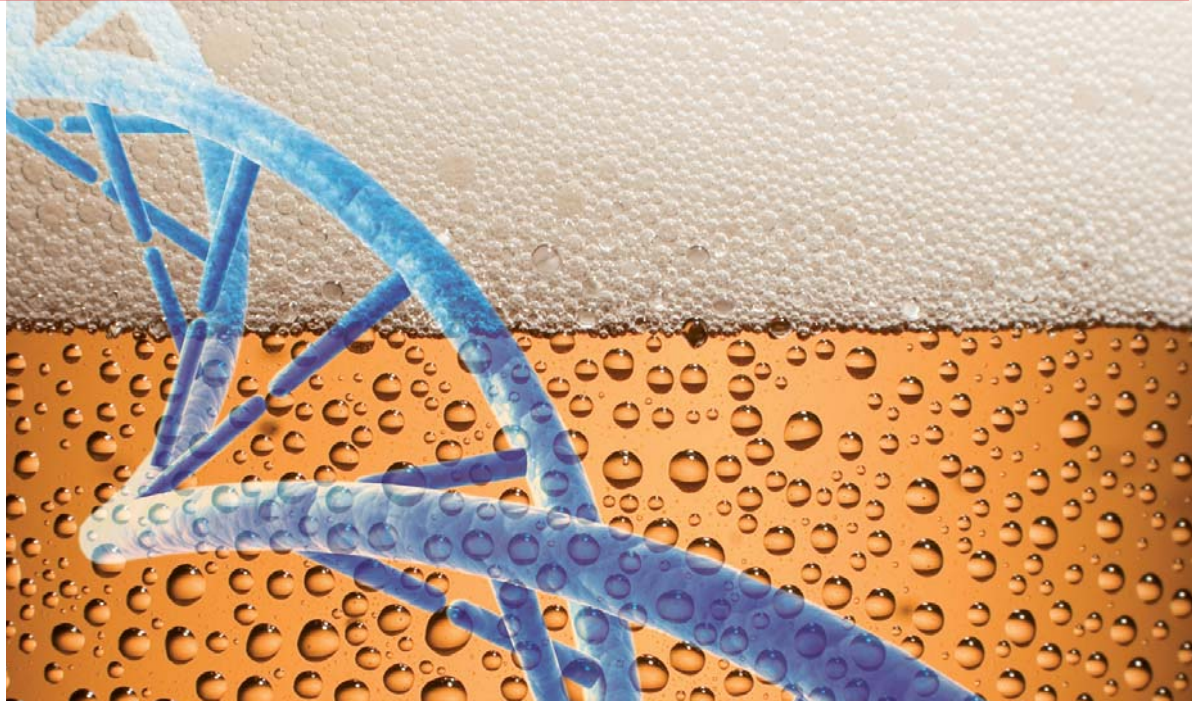




milenia biotec



Nachweis bierschädigender Keime

einfach, schnell, zuverlässig

Milenia[®] GenLine

Inhalt

Über uns	3
Milenia® GenLine	4
Technologie	5
Benötigte Laborausstattung	8
Probenvorbereitung	9
Testdurchführung	10
Interpretation der Testergebnisse	11
Milenia® GenLine Lactobacillus / Pediococcus Screening	12
Leistungsdaten Milenia® GenLine Lactobacillus / Pediococcus Screening	15
Milenia® GenLine Hopfenresistenz Screening	16
Leistungsdaten Milenia® GenLine Hopfenresistenz Screening	17
Verfügbare Produkte	18
Eigenschaften und Vorteile von Milenia® GenLine	19

Über uns

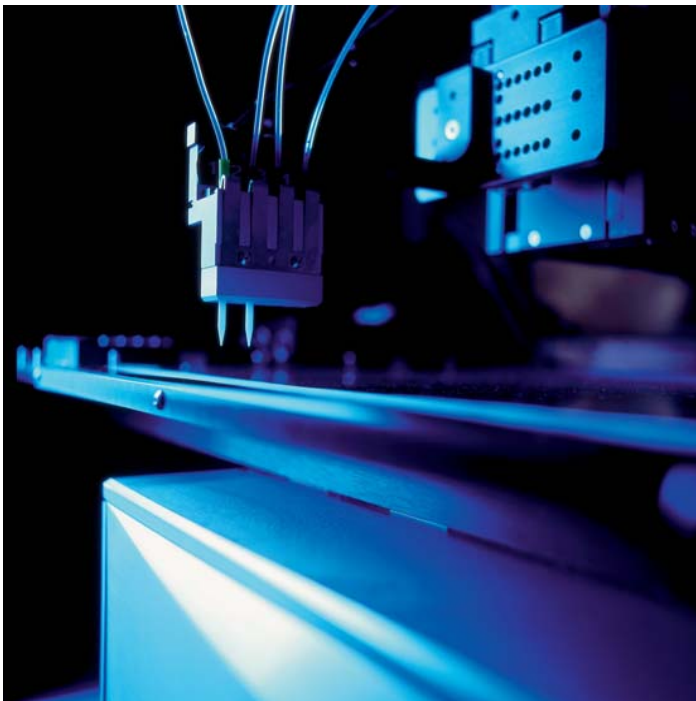
Milenia Biotec GmbH wurde im Jahr 2000 gegründet und beschäftigt sich mit der Entwicklung, der Produktion und dem Vertrieb diagnostischer Schnelltests, die auf der Technologiebasis der Lateral Flow Tests aufsetzen. Das bekannteste Beispiel ist der Schwangerschaftstest.

Die Produkte sind sehr einfach in der Handhabung und können entweder visuell oder mit einfachen Geräten ausgewertet werden. Ergebnisse stehen in kurzer Zeit zur Verfügung.

Um in Hinblick auf Service und Qualität Produkte zur Verfügung zu stellen, die die Erwartungen unserer Kunden erfüllen, hat Milenia Biotec GmbH bereits seit dem Jahr 2003 ein Qualitätsmanagementsystem eingeführt, das nach EN DIN ISO 9001:2008 und EN DIN ISO 13485:2012 vom TÜV Rheinland zertifiziert ist.

Mit Milenia® GenLine steht eine Produktlinie molekularbiologischer Nachweissysteme zur Verfügung, die modular aufgebaut ist. Alle GenLine-Tests basieren auf einem universellen Teststreifen, der beliebige molekularbiologisch hergestellte Produkte nachweisen kann. Die Streifen werden in einem „Universalmodul“ zur Verfügung gestellt. Zusätzlich zu den Streifen werden die molekularbiologischen Module entwickelt. Dieser Ansatz erlaubt uns, neue Entwicklungen zügig umzusetzen und auch Nischenmärkte zu bedienen.

Erste Produkte der Milenia® GenLine-Produktlinie sind Tests zum Nachweis bierschädigender Keime.



Hintergrund

Bier ist ein Medium, in dem Keime bedingt durch den Alkoholgehalt und den niedrigen pH-Wert schlechte Wachstumsbedingungen finden. Ferner stellen das Kohlendioxid und die in Hopfen enthaltenen Bitterstoffe weitere Wachstumsbarrieren für Mikroorganismen dar.

Trotzdem ist es einigen Keimen gelungen, sich an die Umgebung des Bieres anzupassen und darin zu wachsen. Diese haben bierschädigendes Potential, indem ihr Wachstum zu Trübungen und auch Geschmacksveränderungen führen kann.

Deshalb ist die Untersuchung auf bierschädigende Keime eine zunehmende Herausforderung in Brauereien. Mit der Milenia® GenLine-Produktlinie steht ein Testsystem zum molekularbiologischen Nachweis bierschädigender Organismen zur Verfügung, das schnell, einfach und zuverlässig ist.



Technologie

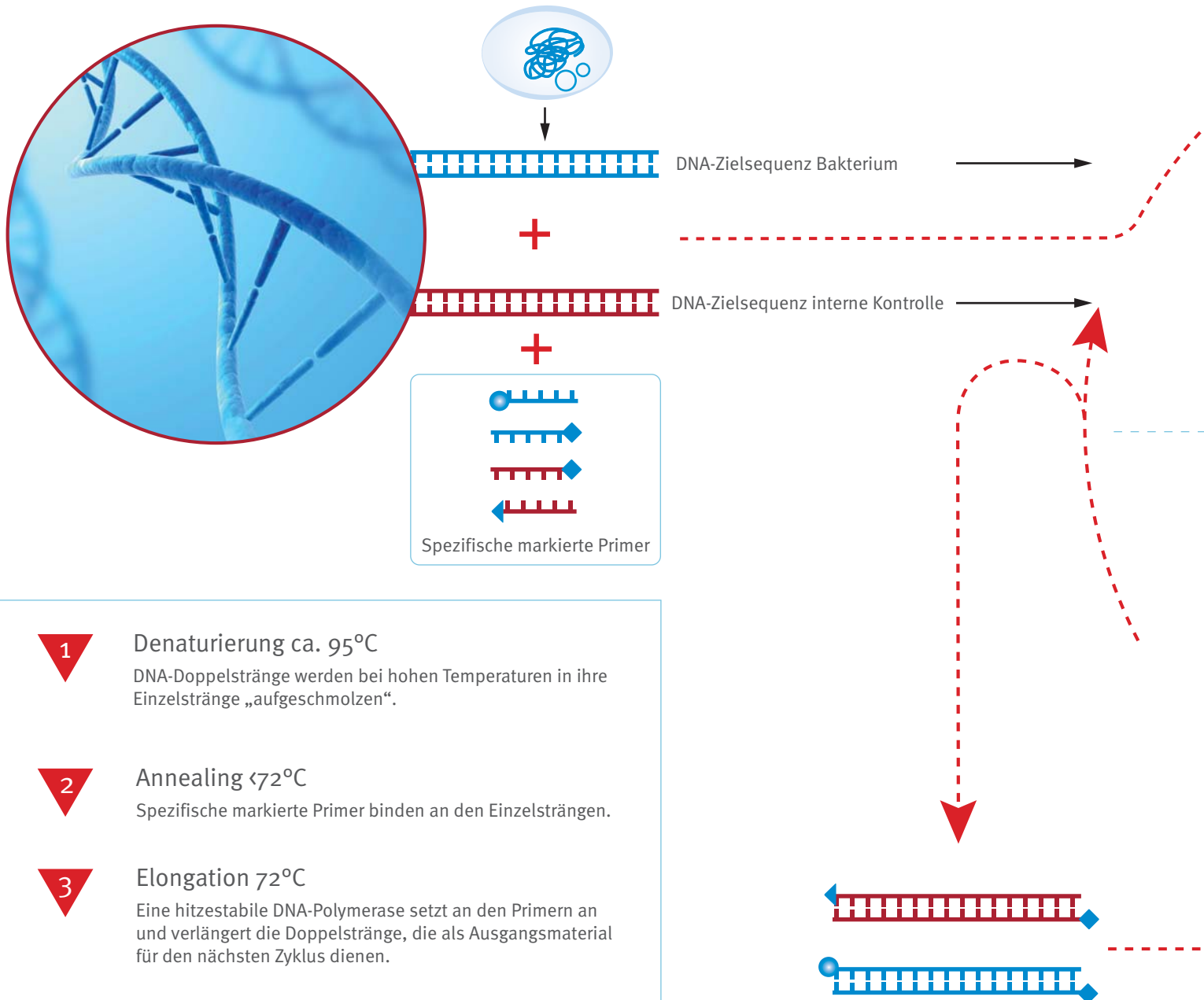
Als technologische Grundlage der Milenia® GenLine-Tests findet die PCR (Polymerasekettenreaktion) Anwendung.

Dabei werden mit einer DNA-Polymerase und kurzen einzelsträngigen DNA-Stücken, Primer genannt, definierte DNA-Sequenzbereiche einer Probe *in vitro* vervielfältigt. Grundlage der PCR ist ein Temperaturprotokoll, bestehend aus mehreren Zyklen, die nacheinander durchlaufen werden. Auf diese Weise wird pro Zyklus eine Verdopplung der genetischen Zielsequenz erzielt. Nach diesem Prinzip werden aus einer einzigen Kopie des Ziel-DNA-Abschnitts nach 30 Zyklen über 1 Mrd. Kopien hervorgehen.

Die in den Milenia® GenLine-Tests verwendeten Primer sind mit spezifischen Markierungen versehen, die von den Teststreifen erkannt werden. Der Milenia® GenLine-Test ermöglicht den Nachweis von zwei verschiedenen Genprodukten auf einem Streifen. Durch die Zugabe eines Kontrollgens zu den Reaktionsansätzen kann somit eine Aussage getroffen werden, ob die PCR in dem speziellen Ansatz ordnungsgemäß abgelaufen ist.



Technologie



1

Denaturierung ca. 95°C

DNA-Doppelstränge werden bei hohen Temperaturen in ihre Einzelstränge „aufgeschmolzen“.

2

Annealing <72°C

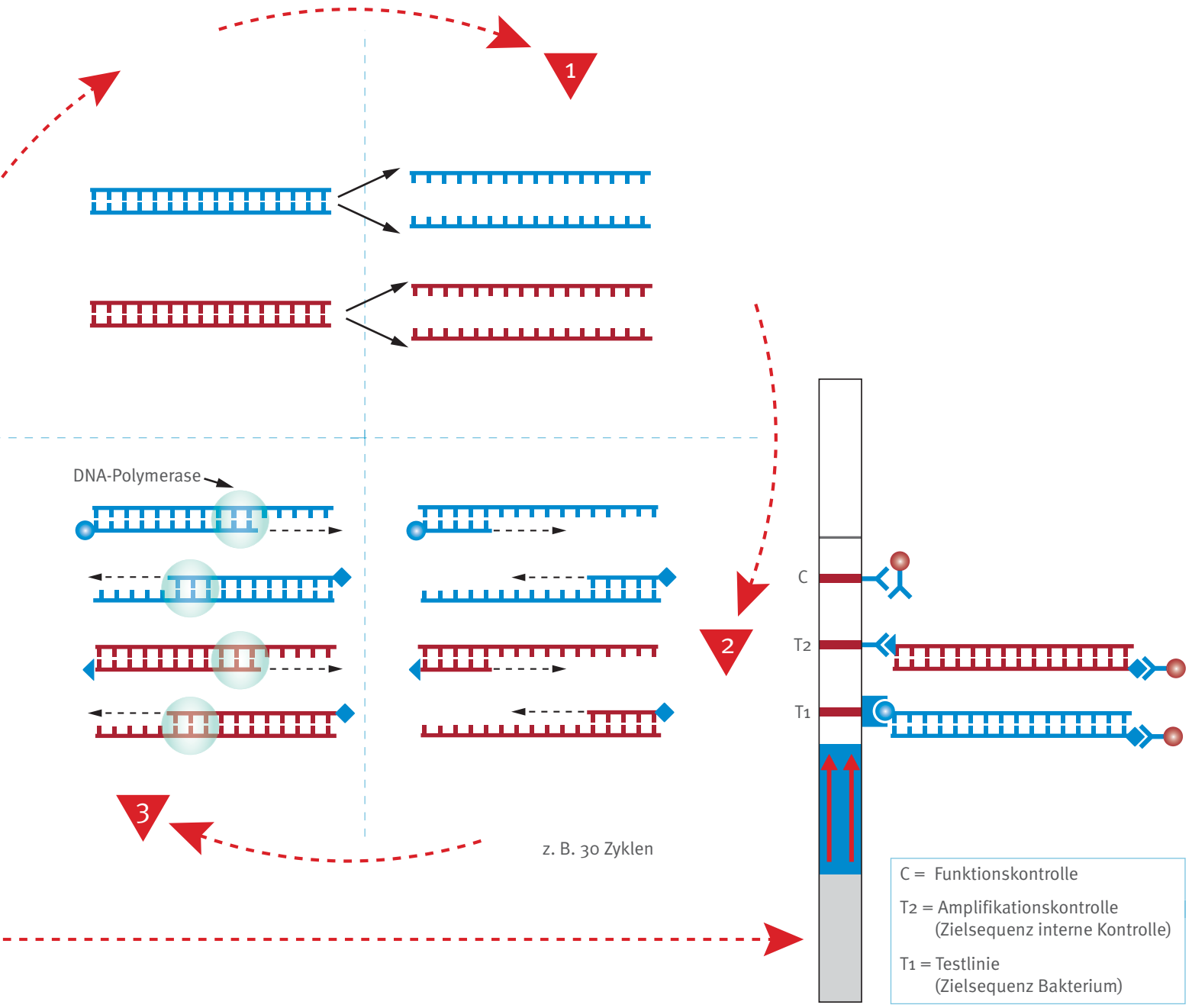
Spezifische markierte Primer binden an den Einzelsträngen.

3

Elongation 72°C

Eine hitzestabile DNA-Polymerase setzt an den Primern an und verlängert die Doppelstränge, die als Ausgangsmaterial für den nächsten Zyklus dienen.

Technologie



Benötigte Laborausstattung

- ▼ Einfacher Thermocycler
- ▼ Pipetten (2-20µl; 20-200µl)
- ▼ Pipettenspitzen
- ▼ PCR-Reaktionsgefäße
- ▼ Eppendorfhütchen
- ▼ Ständer für Reaktionsgefäße
- ▼ Minizentrifuge
- ▼ Vortexer
- ▼ Gefrierschrank



Probenvorbereitung

Die Milenia® GenLine-Tests zum Nachweis bierschädigender Keime können ohne eine DNA-Isolation aus der Probe durchgeführt werden. Als Probenmaterial eignen sich die meisten gängigen Flüssiganreicherungsmedien. Darunter befinden sich unter anderem die Medien der Firma Döhler (NBB-B, NBB-B-AM, NBB-C), weitere Medien auf MRS-Basis, Würze und Bier.

Sehr einfach können hausinterne Medien auf Kompatibilität untersucht werden. Auch hefehaltige Proben können direkt untersucht werden.

Ferner erlauben die Milenia® GenLine-Tests Direktanalysen von Einzelkolonien von Festmedien (Medien-unabhängig).

1. Testung aus Flüssiganreicherung



2. Direktanalyse von Einzelkolonien auf Festmedien



Testdurchführung

1

2 µl der vorbereiteten Proben in PCR-Röhrchen pipettieren, in den Thermocycler stellen und das Programm starten.



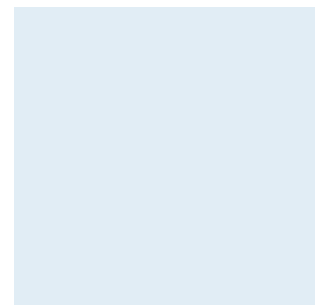
2

PCR-Röhrchen aus dem Thermocycler nehmen und daraus 2 µl auf die Probenaufgabestelle des Teststreifens pipettieren.



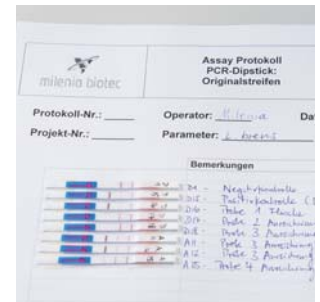
3

Den Streifen in ein Gefäß (z. B. Mikrotiterplatte) stellen, das 80 µl Laufpuffer enthält.



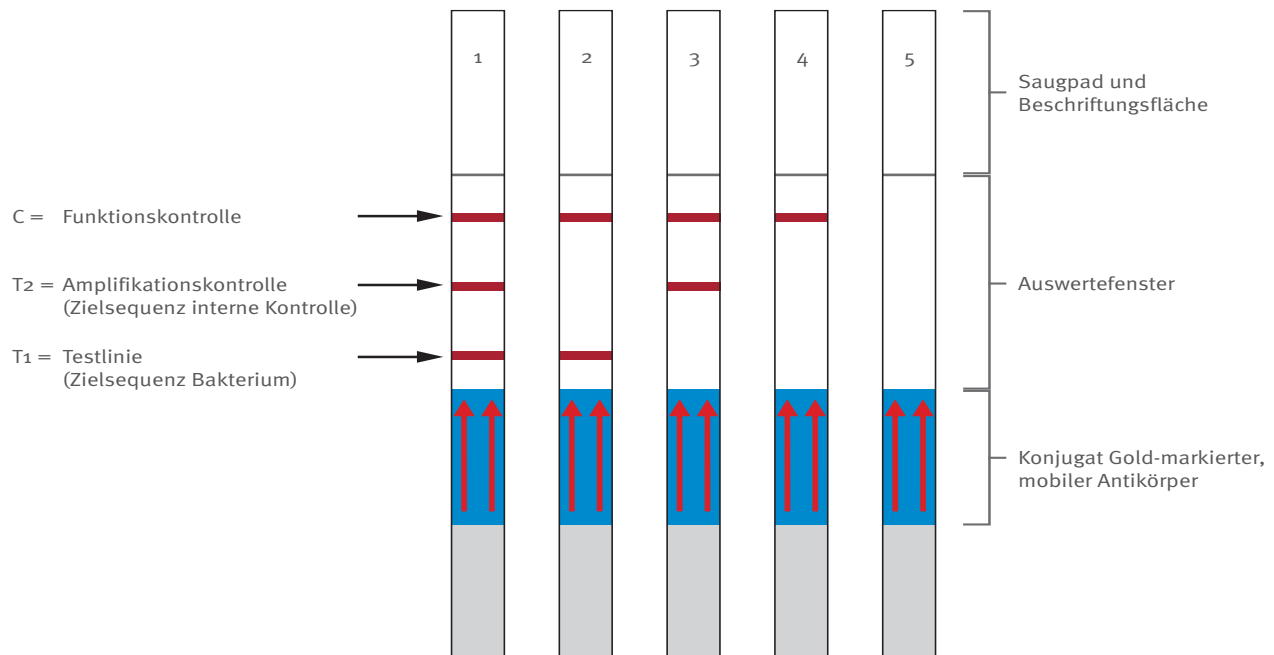
4

Nach 5 Minuten Streifen ablesen.



Interpretation der Testergebnisse

Mögliche Ergebnisse der Auswertung von PCR-Produkten über den universellen Teststreifen.



- ▼ Streifen 1 und 2 sind als eindeutig positive Befunde zu interpretieren.
- ▼ Streifen 3 entspricht einem negativen Befund.
- ▼ Streifen 4 deutet auf eine vollständige Inhibition der PCR hin. Hierbei handelt es sich um keinen validen negativen Befund, sondern um eine nicht auswertbare Probe; die Probe muss wiederholt werden.
- ▼ Streifen 5 ist nicht auswertbar.

Der rote Pfeil auf dem Teststreifen gibt die Laufrichtung an.

Milenia® GenLine Lactobacillus / Pediococcus Screening

Verwendungszweck

Bei dem Milenia® GenLine *Lactobacillus* / *Pediococcus* Screening handelt es sich um einen Bestätigungs- und Suchtest für die häufigsten Bierverderber. Der Test weist die bedeutendsten Schädlinge der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus*, darunter *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus casei* und *Pediococcus damnosus* nach. Die zur biologischen Säuerung verwendeten Lactobacillen (z.B. *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus amylovorus*, usw.), sowie die wichtigsten brauereirelevanten Hefen werden nicht detektiert.

Deshalb ist das Milenia® GenLine *Lactobacillus* / *Pediococcus* Screening ein besonders nützliches Werkzeug für die Beurteilung von schwierig zu interpretierendem mikrobiologischem Probenmaterial, zum Beispiel hefehaltige Proben oder unselektive Anreicherungen, wie Abstrichproben angereichert in NBB-B-AM.

nachweisbar ✓

L. brevis
L. backi
L. casei
L. paracasei
L. collinoides
L. paracollinoides
P. damnosus
L. lindneri
L. plantarum
L. harbinensis
L. rossiae
L. coryniformes
L. acetotolerans
L. frisingensis
L. perolens
P. clausenii
P. inopinatus

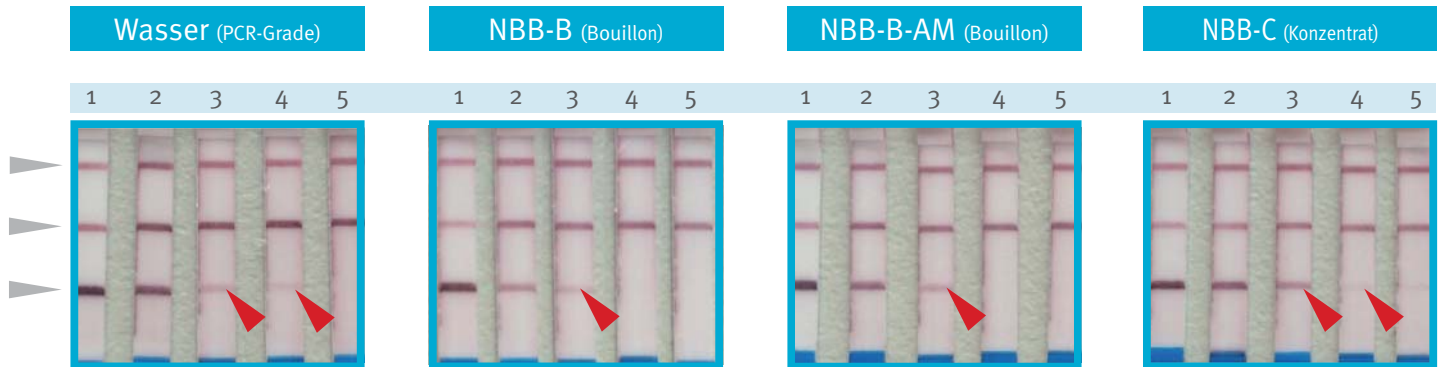
nicht nachweisbar ×

L. delbrueckii
L. amylovorus
L. amylolyticus
Megasphaera sp.
Pectinatus sp.
Acetobacteriaceae
(*Enterobacteriaceae*)
Torulaspora delbrueckii
Wickerhamomyces anomalus
Saccharomyces pastorianus 34/70
Saccharomyces cerevisiae 68
Saccharomycodes ludwigii

Milenia® GenLine Lactobacillus / Pediococcus Screening

Empfindlichkeit / Verwendete Medien

Mit den Milenia® GenLine Tests können Direktanalysen aus Anreicherungen durchgeführt werden. Es ist keine DNA-Extraktion erforderlich. Dadurch reduzieren sich Arbeitsaufwand und Komplexität der Abarbeitung erheblich. Alle Milenia® GenLine Nachweise sind kompatibel mit den gängigen Nachweismedien. Die Abarbeitung per Direktanalyse funktioniert sowohl aus Flüssiganreicherungen, als auch als Kolonieranalyse von Festmedien.



L. brevis: 1821B

1	ca. 1×10^6 cfu/mL
2	ca. 1×10^5 cfu/mL
3	ca. 1×10^4 cfu/mL
4	ca. 1×10^3 cfu/mL
5	ca. 1×10^2 cfu/mL

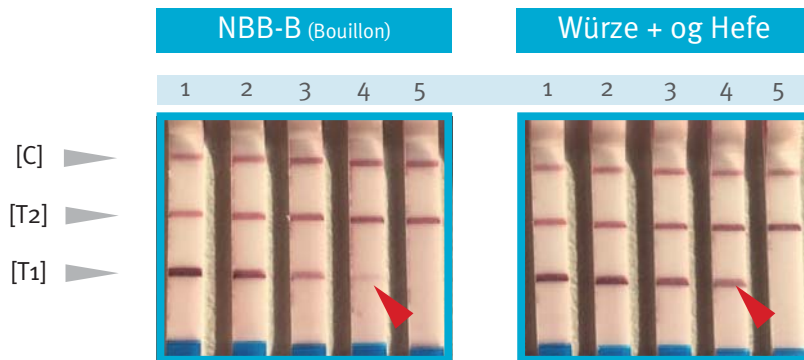
Empfindlichkeit:

PCR-Wasser	→ ~2-20 Zellen
NBB-B	→ ~20-200 Zellen
NBB-B-AM	→ ~20-200 Zellen
NBB-C	→ ~20-200 Zellen

Milenia® GenLine Lactobacillus / Pediococcus Screening

Empfindlichkeit / Hefehaltige Proben

Im Brauereiumfeld gestaltet sich häufig die Analyse hefehaltiger Proben als besonders schwierig. Mit den Milenia® GenLine Tests ist es möglich, mit sehr guter Empfindlichkeit Direktmessungen aus hefehaltigen Proben durchzuführen. Daher sind die Nachweise ein wertvolles Werkzeug für die Analyse schwierig zu interpretierender Probenmatrices.



L. brevis: 1821B

1	ca. 1×10^7 cfu/mL
2	ca. 1×10^6 cfu/mL
3	ca. 1×10^5 cfu/mL
4	ca. 1×10^4 cfu/mL
5	ca. 1×10^3 cfu/mL

Empfindlichkeit:

→ ~20-200 Zellen



Leistungsdaten Milenia® GenLine Lactobacillus / Pediococcus Screening

		Milenia (LB-PC-Screen)		
		+	-	Summe
RT-PCR (sLP 600, Brandl 2006)	+	16	0	16
	-	3	31	34
Summe		19	31	50

Konkordanzindex 0,91

Milenia® GenLine Hopfenresistenz Screening

Hintergrundinformation

Bier ist ein für Mikroorganismen schwierig zu besiedelnder Lebensraum. Einige Spezialisten haben es jedoch geschafft, dieses Milieu zu tolerieren und im Bier zu wachsen. Ein oft entscheidender Punkt für mikrobielles Wachstum in Bier ist die Fähigkeit Hopfenbitterstoffe (vorrangig Iso-alpha-Säuren) zu tolerieren. Das Milenia® GenLine Hopfenresistenz-Screening weist zwei der bedeutendsten artübergreifenden genetischen Marker für die Resistenz gegenüber Hopfenbitterstoffen nach. Verfügbar nachgewiesene Bakterien über entsprechende Gene, hat es man es höchst wahrscheinlich mit starken Verderbern zu tun, die ein erhebliches Produktschädigungspotenzial aufweisen.

Verwendung und Vergleich mit dem Produktschädlichkeitstest

Das Milenia® GenLine Hopfenresistenz-Screening eignet sich als Bestätigungs- und Suchtest für obligat bierschädigende Vertreter der Gattungen Lactobacillus und Pediococcus. Mit Hilfe dieses Tests lässt sich das Schadpotenzial von potenziell bierschädigenden Bakterien abschätzen. Hierbei handelt es sich also um ein neuartiges Werkzeug, das in weniger als zwei Stunden Informationen liefert, die bisher über den klassischen Produktschädlichkeitstest mehr als 14 Tage erforderten.

Nr.	Organismus	Milenia® GenLine Tests		Kultivierung						
		Lacto-Pedio-Screen	Hopfen-resistenz-Screen	NBB-B-AM (Bouillon)	NBB-B (Bouillon)	Hefeweizen	Lager	Pilsener	Pale Ale	Double IPA
	Alkoholgehalt					10,04	5,2	5,1	5,7	8,3
	pH-Wert					4,36	4,73	4,46	4,79	4,91
	IBU's					15	24	32	36	83
-	Negativkontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Lactobacillus brevis I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Lactobacillus brevis II	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3	Lactobacillus lindneri I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Lactobacillus lindneri II	+	+	+	+	+	+	+	-	+
5	Lactobacillus backi 2334	+	+	+	+	+	-	+	+	+
6	Pediococcus damnosus	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Lactobacillus rossiae I	+	+	+	+	+	+	-	-	-
8	Lactobacillus rossiae II	+	-	+	+	-	-	-	-	-
9	Lactobacillus casei 610	+	-	+	+	-	(+)*	(+)*	-	(+)*
10	Lactobacillus parabuchneri	+	-	+	+	n.a.	-	-	-	-
11	Lactobacillus plantarum	+	-	+	+	-	-	-	-	-
12	Leuconostoc mesenteroides	-	-	+	+	-	-	-	-	-
13	Lactococcus lactis	-	-	+	+	n.a.	-	-	-	-

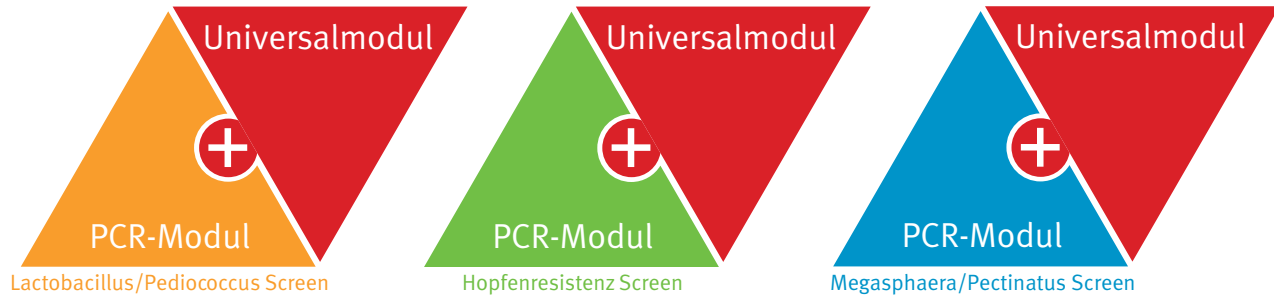
Analysen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, * nur in 1/2 Kulturen wurde bakterielles Wachstum verzeichnet; in diesen Proben war ein erneuter Test auf Hopfenresistenzen positiv

Leistungsdaten Milenia® GenLine Hopfenresistenz Screening

		Milenia (HOR)		
		+	-	Summe
RT-PCR (TUM FZW BLQ, Hor A oder Hor C Gen)	+	10	0	10
	-	0	7	7
Summe		10	7	17

Konkordanzindex 1

Verfügbare Produkte



Universalmodul

MGUP 1

48 Tests

Das Universalmodul wird immer in Kombination mit den PCR-Modulen verwendet.

PCR-Module



Lactobacillus / Pediococcus Screen

MGSCLP 1

48 Tests



Hopfenresistenz Screen

MGSCHOR 1

48 Tests



Megasphaera / Pectinatus Screen

MGSMP 1

48 Tests



Lactobacillus brevis

MGLBR Z

24 Tests

Eigenschaften und Vorteile von Milenia® GenLine

- ▼ Sensitiv und spezifisch
- ▼ Interne PCR-Kontrolle
- ▼ Positive Kontrollen im Kit enthalten
- ▼ Direkter Probeneinsatz ohne DNA-Reinigung
- ▼ Geringe Investition in Geräte
- ▼ Geringe Beeinflussung durch Hefe
- ▼ Ergebnisse in 60 Minuten





milenia biotec

Milenia Biotec GmbH
Versailler Str. 1, 35394 Gießen, Germany
Tel.: +49 641-94 888 3-0 · Fax: +49 641-94 888 3-80
E-mail: info@milenia-biotec.de
Internet: www.milenia-biotec.de

design: VISUV

fotos: Hendrik Roggemann, Matthias Hoffmann

GenLine / C / 2016-10-20