

**Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Identifizierung biogene Amine bildender Bakterien  
und Einsatz von Enzymen zur Hemmung ihres  
Wachstums während der Weinbereitung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Patrick Sebastian

geb. am 28.12.1983 in Bad Dürkheim

Mainz, November 2011

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2008 bis Oktober 2011 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz verfasst.

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2011

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Posterpräsentationen, Publikationen und Vorträgen veröffentlicht, eingereicht oder sind in Vorbereitung:

**Kaschak, E., Sebastian, P., Pfeiffer, P. und König, H. (2009)** Determination of biogenic amines in German wines. VAAM Jahrestagung, Bochum. Posterpräsentation.

**Sebastian, P., Petri, A. und König, H. (2010)** Isolation and identification of biogenic amines producing lactic acid bacteria from German wines. VAAM Jahrestagung, Hannover. Posterpräsentation.

**Bäumlisberger, M., Blättel, V., Sebastian, P. und König, H. (2011)** Untersuchungen zum Abbau biogener Amine durch weinrelevante Hefen. Deutsche Lebensmittel-Rundschau. Eingereicht.

**Sebastian, P., Blättel, V., Gasser, E., Claus, H., Pfeiffer, P. und König, H. (2011)** A novel enzymatic approach for growth inhibition of undesired wine related microorganisms. VAAM Jahrestagung, Karlsruhe. Vortrag.

**Sebastian, P., Claus, H., Schlott, B. und König, H. (2011)** Purification and characterization of two exoenzymes from *Streptomyces albidoflavus* B 578 useful to inhibit bacterial growth in wine. In Vorbereitung.

**Sebastian, P., Herr, P., Fischer, U. und König, H. (2011)** Molecular identification of lactic acid bacteria occurring in must and wine. South African Journal of Enology and Viticulture, Vol. 32, 300-309.

**Wirth, K., Petri, A., Sebastian, P., Blättel, V., Pfannebecker, J., Fröhlich, J. und König, H. (2011)** Differentiation of Microorganisms associated with wine by DNA-fingerprinting analysis. VAAM Jahrestagung, Karlsruhe. Posterpräsentation.

**Wirth, K., Sebastian, P., Schneider, I. und König, H. (2011)** Vorkommen von Essigsäurebakterien in Jungweinen: Isolierung neuer Arten. Der Deutsche Weinbau, Vol. 6, 33-34.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Mikrobiologie des Weines	1
1.2 Biogene Amine in Lebensmitteln	6
1.3 Der Einsatz von Enzymen in der Lebensmitteltechnologie	10
1.4 Die Gattung <i>Streptomyces</i> als Produzent für bioaktive Stoffe	12
1.5 Motivation	14
1.6 Ziele der Arbeit	15
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Verwendete Chemikalien	17
2.2 Geräte und Hilfsmittel	20
2.3 Biochemikalien und Enzyme	22
2.4 Verbrauchsmaterialien und Kits	23
2.5 Oligonucleotide	24
2.6 Untersuchte Weine	26
2.7 Mikroorganismen	28
2.8 Kulturmedien und Puffer	36
2.9 Kultivierung und Lagerung der Mikroorganismen	40
2.10 Isolierung von Mikroorganismen aus Versuchswainen	40
2.11 Identifizierung von Mikroorganismen	40
2.11.1 Isolierung der Gesamt-DNA	41
2.11.2 Polymerasekettenreaktion 16S rDNA/ITS-Region	41
2.11.3 Aufreinigung der PCR-Produkte	42
2.11.4 Agarosegelelektrophorese	42
2.11.5 Sequenzierung und Sequenzanalyse	43
2.11.6 Specifically amplified polymorphic DNA-PCR	43
2.11.7 Multiplex-PCR	45
2.12 Nachweis biogener Amine	46
2.12.1 Decarboxylase-Medium	46
2.12.2 Hochauflösende Dünnschichtchromatographie	47
2.12.3 High Performance Liquid Chromatography	49
2.13 Molekularbiologischer Nachweis der Decarboxylase-Gene	52
2.14 Proteinbiochemische Methoden	54
2.14.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	54
2.14.2 Proteinfärbung mittels Coomassie	55
2.14.3 Proteinfärbung mittels Silberfärbung	56

2.15 Identifizierung und Charakterisierung von <i>Streptomyces</i> sp. B 578	56
2.16 Produktion und Anreicherung lytischer Enzyme von Streptomyceten	57
2.16.1 Produktion im Labormaßstab	58
2.16.2 Produktion im halbtechnischen Maßstab	58
2.16.3 Anreicherung der Kulturüberstände	58
2.16.4 Bestimmung des Proteingehalts	59
2.17 Nachweis lytischer Aktivität in den Kulturüberständen	59
2.18 Reinigung der lytischen Enzyme	59
2.18.1 Fast Performance Liquid Chromatography	60
2.18.2 Gel-Permeations-Chromatographie	60
2.19 Charakterisierung der lytischen Enzyme	61
2.19.1 Größenbestimmung mittels SDS-PAGE	61
2.19.2 Isoelektrische Fokussierung	61
2.19.3 Nachweis der Enzym-Aktivitäten	62
2.19.4 Bestimmung der Aktivitäts-Optima	64
2.20 Identifizierung der lytischen Enzyme	64
2.20.1 Protein-Blot	64
2.20.2 N-terminale Sequenzierung	66
2.20.3 Massenspektroskopie	66
2.20.4 Nachweis der Gene	67
2.20.5 Bestimmung der Schnittstelle der Muramidase	68
2.20.6 Abbau von S-Layer-Strukturen durch die gereinigte Protease	69
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>70</b>
3.1 Isolierung von Mikroorganismen aus Versuchsweinen	70
3.2 Molekularbiologische Untersuchungen zur Identifizierung der Eigenisolate aus Versuchsweinen	71
3.2.1 Anwendung der specifically amplified polymorphic DNA-PCR zur Identifizierung von weinrelevanten Milchsäurebakterien	71
3.2.2 Art-Identifizierung durch Multiplex-PCR	75
3.2.3 Identifizierung der Eigenisolate mit Hilfe von 16S rDNA-Analysen	76
3.2.4 Isolierung und Identifizierung von Essigsäurebakterien aus Versuchsweinen	77
3.2.5 Zusammenfassung der Isolierung von Mikroorganismen aus Versuchsweinen	78

---

3.3 Analytische und physiologische Untersuchungen zum Nachweis biogener Amine	80
3.3.1 Nachweis biogener Amine durch Wachstum auf einem Decarboxylasemedium	80
3.3.2 Nachweis biogener Amine durch Dünnschichtchromatographie	81
3.3.3 Nachweis der Bildung biogener Amine durch die Eigenisolate mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie	88
3.3.4 Quantifizierung der Bildung biogener Amine	91
3.4 Der Testorganismus <i>Lactobacillus brevis</i> B 190	93
3.4.1 Molekularbiologische Identifizierung von <i>Lactobacillus brevis</i> B 190	93
3.4.2 Bildung biogener Amine durch <i>Lactobacillus brevis</i> B 190 unter weinrelevanten Bedingungen	93
3.4.3 Identifizierung und Sequenzierung der Decarboxylase-Gene bei <i>Lactobacillus brevis</i> B 190	96
3.4.4 Extraktion und Reinigung von S-Layer-Proteinen von <i>Lactobacillus brevis</i> B 190	100
3.5 Identifizierung von <i>Streptomyces</i> sp. B 578	101
3.5.1 Sequenzierung der kompletten 16S rDNA von <i>Streptomyces</i> sp. B 578	101
3.5.2 Phylogenetische Untersuchungen zur Identifizierung von <i>Streptomyces</i> sp. B 578	102
3.5.3 Zuckerverwertung von <i>Streptomyces</i> sp. B 578	105
3.6 Nachweis der bakteriolytischen Aktivität des Kulturüberstandes von <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	106
3.6.1 Aktivität unter weinrelevanten Bedingungen	107
3.6.2 Kinetik der Zellyse	108
3.6.3 Lyse der Eigenisolate aus Versuchswainen	110
3.7 Reinigung der lytischen Exoenzyme von <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	112
3.7.1 Fast Performance Liquid Chromatography zur teilweisen Reinigung der lytischen Exoenzyme	113
3.7.2 Reinigung der lytischen Exoenzyme mit Hilfe der Gelfiltration	116
3.8 Identifizierung der lytischen Exoenzyme von <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	121
3.8.1 Bestimmung der N-terminalen Sequenz mittels Edman-Abbau	121
3.8.2 Identifizierung der gereinigten Enzyme mittels Massenspektroskopie	124
3.8.3 Nachweis und Sequenzierung der Gene der lytischen Exoenzyme im Genom von <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	126

---

3.9 Charakterisierung der gereinigten Exoenzyme	132
3.9.1 Bestimmung der relativen Molekülmasse	132
3.9.1.1 Größenbestimmung anhand der SDS-PAGE	132
3.9.1.2 Größenbestimmung mit Hilfe der Gelfiltration	133
3.9.2 Bestimmung des isoelektrischen Punkts	135
3.9.3 Bestimmung der Aktivitäts-Optima der gereinigten Enzyme unter verschiedenen Parametern	137
3.9.4 Nachweis und Quantifizierung der Protease-Aktivität	140
3.9.4.1 Abbau von S-Layer-Proteinen durch die gereinigte Protease	142
3.9.5 Quantifizierung der Muramidase-Aktivität	144
3.9.6 Bestimmung der Schnittstelle der gereinigten Muramidase	146
<b>4 Diskussion</b>	<b>149</b>
4.1 Anwendung verschiedener molekularbiologischer Methoden zur Identifizierung der isolierten Bakterien aus Versuchswainen	149
4.2 Entwicklung einer dünnschichtchromatographischen Methode zum qualitativen Schnellnachweis biogener Amine	151
4.3 Bildung biogener Amine und systematische Zugehörigkeit der aus Versuchswainen isolierten Bakterien	152
4.4 Nachweis der Gene zur Produktion von biogenen Aminen durch <i>Lactobacillus brevis</i> B 190	157
4.5 Identifizierung von <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	158
4.6 Lyse biogene Amine produzierender Bakterien durch Kulturüberstand von <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	160
4.7 Reinigung und Charakterisierung zweier bakteriolytischer Enzyme aus <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	161
4.7.1 Charakterisierung der gereinigten Muramidase	163
4.7.2 Charakterisierung der gereinigten Protease	165
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>167</b>
<b>6 Ausblick</b>	<b>170</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>171</b>

---

<b>8 Anhang</b>	<b>187</b>
8.1 Nukleotidsequenzen	187
8.1.1 16S rDNA	187
8.1.2 Decarboxylase-Gene	190
8.1.3 Teilsequenz des Muramidase-Gens von <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	190
8.1.4 Teilsequenz des Protease-Gens von <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	190
8.2 Sequenzalignments zur Stammbaumberechnung	191
8.3 Proteinsequenzen	201
8.3.1 Gereinigte Muramidase	201
8.3.2 Gereinigte Protease	203
8.4 Verwendete Websites	204



---

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Biologischer Säureabbau
°C	Grad Celcius
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
Ch	Chardonnay
cm	Zentimeter
DAO	Diaminoxidase
DLR	Dienstleistungszentrum ländlicher Raum, Neustadt an der Weinstrasse
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNS	Dinnitrosalicylsäure
dNTP	Desoxy Nukleotid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
eH <sub>2</sub> O	Entionisiertes Wasser
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung
GC	Guanin + Cytosin- Gehalt
h	hora (Stunde)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IMW	Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz
ITS	Internal transcription spacer
kDa	Kilodalton
KBE	Koloniebildende Einheit
kg	Kilogramm
l	Liter
Ly	Lysozym
M	Molar
mA	Milliampere
MAO	Monoaminoxidase
mg	Milligramm

---

MG	Maischegärung
MH	Maischeerhitzung
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MSB	Milchsäurebakterien
NCBI	National Center of Biotechnology Information
nm	Nanometer
OD <sub>600nm</sub>	Optische Dichte bei 600 Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pI	Isoelektrischer Punkt
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SAPD	Specifically amplified polymorphic DNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp	Spätburgunder
T	Typstamm
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLC	Thin-layer chromatography
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
Wb	Weißburgunder
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

## 1. Einleitung

Die Herstellung von Wein gilt als eines der ältesten technologischen Verfahren zur Gewinnung von Lebens- und Genussmitteln. So gibt es Befunde, dass Menschen schon vor über 8000 Jahren in der Lage waren, aus Weintrauben Wein herzustellen (McGovern, 2003). In seiner langen Geschichte spielte der Wein nicht nur im Alltag eine wichtige Rolle, sondern unter anderem auch in der Medizin oder der christlichen Liturgie. Im Jahr 2009 gab es in Deutschland eine Rebfläche von ungefähr 102.000 Hektar auf der circa 9,2 Millionen Hektoliter Wein produziert wurden – in der Hauptsache Weißwein (Deutsches Weininstitut, 2009).

Neben der Arbeit der Winzer in den Weinbergen und Weinkellern ist auch die Mikrobiota des Weines von großer Wichtigkeit für die Weinherstellung. So sind Hefen essentiell für die Bildung von Ethanol, während andere Mikroorganismen in der Lage sind, die Sensorik des Weines negativ zu beeinflussen oder aber auch gesundheitsschädliche Substanzen zu synthetisieren.

### 1.1 Mikrobiologie des Weines

Wie bereits erwähnt, spielen Mikroorganismen eine wichtige Rolle in verschiedenen Stadien der Weinbereitung. Hier kommen vor allem Hefen aber auch Bakterien und, jedoch nur auf den Trauben, verschiedene Pilze vor. Ihr Vorkommen im Wein ist jedoch schon aufgrund des natürlichen Säuregehalts sowie dem Vorhandensein von Polyphenolen im Most limitiert (Figuerido *et al.*, 2008). Gleichzeitig kommt es durch die Bildung von Ethanol während der alkoholischen Gärung ebenfalls zu einer Erschwerung des Wachstums für Mikroorganismen (Waite und Daeschel, 2007).

Für die chemische Hauptreaktion, die Umwandlung von Glucose in Ethanol, die so genannte alkoholische Gärung, sind in erster Linie Hefen verantwortlich (Beltran *et al.*, 2002). Man unterscheidet hier grob zwei Gruppen von Hefen: Die Saccharomyceten und die Nicht-Saccharomyceten (auch Wildhefen). Systematisch sind die im Wein vorkommenden Hefen den Ascomyceten oder den Basidiomyceten zuzuordnen. Über 20 verschiedenen Gattungen von Hefen konnten bereits aus Weinen isoliert werden (Renouf *et al.*, 2007). Hierbei unterscheidet sich die Zusammensetzung der Hefe-Flora extrem in den unterschiedlichen Phasen der Weinherstellung. Auf der Oberfläche der Traube sind vor allem drei Arten zu finden: *Hanseniaspora uvarum* (anamorph: *Kloeckera apiculata*), *Metschnikowia pulcherrima* (anamorph: *Candida pulcherrima*) und *Candida stellata* (Bisson und Joseph, 2009). Die Anzahl der Hefen auf den Trauben liegt zwischen  $10^4$  und  $10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> und wird in erster Linie durch den Gesundheitszustand der Traubenhaut beeinflusst (Fleet *et al.*, 2002).

Neben den genannten Arten können noch weitere auftreten. So sind zum Beispiel auf Trauben kühlerer Anbaugelände die kälteunempfindlichen Hefen *Cryptococcus* und *Rhodotorula* vorherrschend (Yanagida *et al.*, 1992). Hefen der Gattung *Saccharomyces*, welche später in der Weinbereitung in den Vordergrund geraten, sind auf der Traubenhaut nur in niedrigen Titern vorzufinden oder nicht vorhanden (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Raspor *et al.*, 2006).

Ein weiterer Bestandteil der Hefe-Flora ist die so genannte Keller-Flora. Hierbei handelt es sich um Hefen, die auf Geräten oder Fässern im Weinkeller vorkommen. Diese Flora stellt eine direkte Infektionsquelle für den Most oder Wein dar. Zur ihr gehören vor allem Hefen der Gattung *Saccharomyces*, aber auch andere wie *Candida*, *Cryptococcus* und *Brettanomyces* können in niedrigeren Konzentrationen vorkommen (Renouf *et al.*, 2006).

Die meisten Untersuchungen gibt es zur Hefe-Flora während der alkoholischen Gärung. Hierbei muss man zwischen zwei möglichen Ansatzweisen des Winzers zur Durchführung der alkoholischen Gärung unterscheiden. Zum einen der unbeimpften Gärung und zum anderen der beimpften Gärung. Bei der unbeimpften Gärung (Spontangärung) beruht die Mikroflora der Gärung auf der Mikroflora der Traube und der Keller-Flora. Diese Hefen, vor allem Nicht-Saccharomyceten, beginnen mit der chemischen Umwandlung von Most in Wein, sprich mit der alkoholischen Gärung. Mit steigenden Ethanolkonzentrationen nimmt die Zellzahl von *Saccharomyces* im Most beziehungsweise Jungwein stärker zu. Am Ende der Gärung ist *Saccharomyces* meist die einzige Hefe, die isoliert wurde (Bisson und Joseph, 2009). Bei der beimpften Gärung wird der Most zu einem bestimmten Zeitpunkt mit einer hohen Zellzahl von *Saccharomyces* beimpft. Hierbei handelt es sich vor allem um die Arten *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus*, welche als kommerzielle Starterkulturen erworben werden können. Die Inokulation des Mostes mit diesen Hefen führt zu einer schnellen Hemmung der Wildhefe-Flora und Durchführung der alkoholischen Gärung (Egli *et al.*, 1998; Ganga und Martinez, 2004).

Beide Maßnahmen zur Durchführung der alkoholischen Gärung haben ihre Vor- und Nachteile. Während bei der Spontangärung viele aromaaktive Stoffe durch die Wildhefen gebildet werden können, die einen positiven Effekt auf die Sensorik des Weines haben können, besteht eine höhere Gefahr, dass die alkoholische Gärung nicht komplett durchgeführt werden kann. Bei der Vergärung des Mostes mit Reinzuchthefen wird zu einem großen Prozentsatz gewährleistet, dass die im Most vorhandene Glucose nahezu vollständig in Ethanol umgewandelt wird. Jedoch ist hierbei die Sensorik des Weines in weiten Teilen durch die von den Reinzuchthefen gebildeten Aromen abhängig (Dittrich und Großmann, 2005).

Die zweite Gruppe von Mikroorganismen in der Weinbereitung stellen die Bakterien dar. Hierbei sind vor allem zwei Gruppen zu nennen: Die Milchsäurebakterien und die

Essigsäurebakterien. Bei den Essigsäurebakterien handelt es sich um strikt aerobe, gram-negative  $\alpha$ -Proteobakterien. Ihre Hauptstoffwechselaktivität liegt in der Oxidation von Zuckern und Alkoholen und vor allem in der Umwandlung von Ethanol zu Essigsäure (Bartowsky und Henschke, 2008; Guillamón und Mas, 2009). Aufgrund dieser Reaktion werden Essigsäurebakterien in der Herstellung von Essig, aber auch bei der Produktion von Gluconsäure, Vitamin C und Cellulose eingesetzt (Deppenmeier *et al.*, 2002). In der Weinbereitung sind zur Zeit elf verschiedene Arten beschrieben: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter cerevisiae*, *Acetobacter cibernongensis*, *Acetobacter malorum*, *Acetobacter oeni*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter tropicalis*, *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter liquefaciens*, *Gluconobacter cerinus* und *Gluconobacter oxydans* (Guillamón und Mas, 2009; Wirth *et al.*, 2011). Das Vorkommen dieser Organismen im Wein ist stark von dem Gesundheitszustand des Traubenmaterials abhängig. So beeinflussen Pilzbefall, Hagelschäden und Wespenfraß maßgeblich die Essigsäurepopulation im Wein. Während auf gesundem Traubenmaterial vor allem *Gluconobacter oxydans* mit Zellzahlen von  $10^2$  bis  $10^5$  KBE/ml vorkommt (González *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2007), bestimmten bei verletzten Trauben Vertreter der Gattung *Acetobacter* die Mikroflora der Essigsäurebakterien (Barbe *et al.*, 2001). Essigsäurebakterien kommen also hauptsächlich über die Traube in den Wein. Eine weitere Infektionsquelle sind Fruchtliegen. In der Regel nimmt die Anzahl der Essigsäurebakterien während der alkoholischen Gärung ab. Zwar sind diese Organismen in der Lage bei den im Wein herrschenden pH-Werten noch leicht zu wachsen (Du Toit und Pretorius, 2002), jedoch wird dies durch die steigende Ethanolkonzentration, aber vor allem durch das Fehlen von Sauerstoff unterbunden. Auch die während der Weinbereitung vorhandenen Temperaturen wirken sich negativ auf das Wachstum dieser Organismen aus. Am Ende der Gärung sind in den meisten Fällen nur noch  $10^2$  bis  $10^3$  KBE/ml der Essigsäurebakterien vorhanden (Du Toit und Lambrechts, 2002; Bartowsky *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007).

Weit mehr im Milieu Wein verbreitet sind die Milchsäurebakterien. In der Literatur sind zurzeit um die 25 verschiedenen Arten, die aus Wein isoliert wurden, bekannt (Mañes-Lázaro *et al.*, 2008a, 2008b, 2009; König und Fröhlich, 2009; Mesas *et al.*, 2011). Hierzu gehören Vertreter der Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* und *Weisella*. Milchsäurebakterien sind gram-positive Bakterien, die sich durch Bildung von Milchsäure als Endprodukt der Glucoseverwertung auszeichnen. Bei der Milchsäuregärung gibt es zwei Formen: Die homo- und die heterofermentative Milchsäuregärung. Bei der homofermentativen Milchsäuregärung entsteht Lactat als einziges Endprodukt der Gärung, während bei der heterofermentativen Gärung zusätzlich  $\text{CO}_2$  und Acetat gebildet wird (König und Fröhlich, 2009). Ein wichtiges Merkmal dieser Bakterien-Gattungen, welches ihr Vorkommen im Wein begünstigt, ist ihre teilweise stark ausgeprägte Toleranz gegenüber

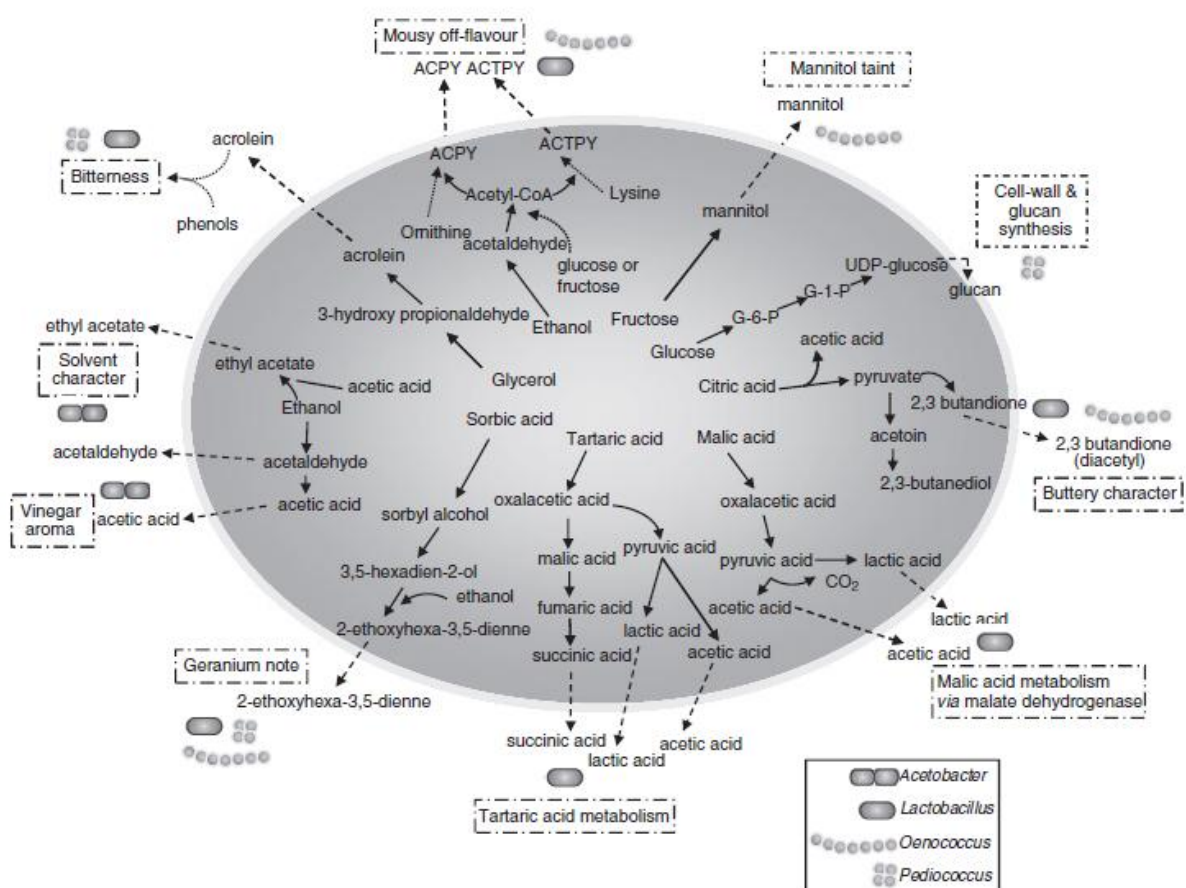
---

niedrigen pH-Werten (pH 2,9-3,6 im Wein) und hohen Alkoholkonzentrationen (bis zu 18 % Ethanol).

Als eine der wichtigsten Stoffwechselreaktionen der Milchsäurebakterien ist der biologische Säureabbau zu nennen. Hierbei handelt es sich um die Decarboxylierung von Malat unter der Bildung von Lactat (Liu, 2002). Diese Umwandlung wird durch das Malolaktat-Enzym katalysiert. Durch diese Reaktion kommt es zu einem Anstieg des pH-Wertes, welcher besonders bei Weinen mit hohem Säuregehalt erwünscht wird. Neben Milchsäurebakterien sind auch verschiedene Hefen wie *Schizosaccharomyces pombe* oder *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage Malat abzubauen, jedoch wird hierfür ein anderes Enzym, das Malatenzym, verwendet. Unter den Milchsäurebakterien spielt beim biologischen Säureabbau vor allem *Oenococcus oeni* in der Weinbereitung eine zentrale Rolle. Aufgrund seiner hohen Säuretoleranz (zum Teil Wachstum bei pH 2,9) findet dieses Bakterium einen Einsatz als Starterkultur für den biologischen Säureabbau bei säurereichen Weinen (Dittrich und Großmann, 2005). Daneben sind noch Starterkulturen von *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus hilgardii* erhältlich. Der Abbau des Malats ist jedoch nicht in allen Weinen erwünscht, da er teilweise mit der Bildung anderer aromaaktiven Stoffe einhergehen kann. Ebenfalls ist eine Reduzierung des Säuregehalts in bereits säurearmen Weinen nicht wünschenswert.

Generell ist jedoch das Vorkommen von Milchsäurebakterien, aber auch Essigsäurebakterien, in der Weinbereitung kritisch zu betrachten, da viele dieser Organismen in der Lage sind, Weinfehler zu verursachen, das heißt die Qualität des Weines zu vermindern. Hierbei spricht man von Weinschädlingen. Zu den wichtigsten und am weitesten verbreiteten mikrobiell verursachten Weinfehlern gehören der Essigsäureton, der Milchsäureton, das Bitterwerden und der Lindton (Dittrich und Großmann, 2005; Bartowsky, 2009). Der Essigsäureton, der bei besonders starker Ausprägung auch Essigstich genannt wird (Dittrich, 1984), geht hauptsächlich auf die Stoffwechselaktivität von Milchsäurebakterien zurück. Hierbei entsteht Essigsäure als Nebenprodukt der Zuckerverwertung, vor allem bei heterofermentativen Vertretern dieser Familie (Sponholz *et al.*, 1982). Daneben sind auch Essigsäurebakterien, durch die Oxidation von Ethanol, und einige Hefen in der Lage Acetat zu bilden (Wirth *et al.*, 2011). Durch eine richtige Kellerhygiene, gesundes Traubenmaterial und dem reduktiven Ausbau des Weines kann jedoch die Bildung von Essigsäure durch Essigsäurebakterien minimiert werden (Bartowsky, 2009). Die gebildete Essigsäure kann dem Wein nicht mehr entzogen werden, was zu einer irreversiblen Schädigung des Weines führt, der nur noch zur Essigherstellung verwendet werden darf. In Deutschland liegt die Grenze für die zugelassene Menge an Acetat bei 1,08 g/l bei Weißweinen und 1,2 g/l bei Rotweinen (Dittrich und Großmann, 2005). Der Milchsäureton, welcher sensorisch an Molke oder Butter erinnert, beruht auf der Bildung von Diacetyl während des Abbaus von

Zitronensäure durch Milchsäurebakterien (Ramos *et al.*, 1995; Hühn *et al.*, 1999). Zu einer Erhöhung der Viskosität des Weines und der damit verbundenen Ungenießbarkeit kommt es durch die Polymerisierung von Glucose oder Fructose. Man spricht vom Zähwerden des Weines (Lindton). Ein für die Weinbereitung relevanter Dextran-Bildner ist *Leuconostoc mesenteroides* (Monterisino *et al.*, 2008). Velasco *et al.* (2007) konnte die Bildung von extrazellulären Polysacchariden bei *Pediococcus parvulus* nachweisen. Stoffe wie Acrolein, die zum Bitterwerden des Weines beitragen, werden vor allem durch verschiedene Arten der Gattung *Lactobacillus* gebildet (Sponholz, 1993). Ein weiteres Produkt des bakteriellen Stoffwechsels im Wein sind biogene Amine (Garai *et al.*, 2007; Vincenzini *et al.*, 2009). Diese Stickstoffverbindungen können, neben sensorischen Einflüssen auf den Wein (Rohn *et al.*, 2005), auch einen physiologischen Effekt auf den menschlichen Körper hervorrufen (Smit *et al.*, 2008). Sie werden im nachfolgenden Kapitel näher behandelt. Eine Übersicht verschiedener durch Bakterien verursachter Weinfehler gibt Abbildung 1.1 wieder.



**Abbildung 1.1: Zusammenfassung der Stoffwechselwege von weinrelevanten Bakterien, die zur Bildung von Weinfehlern führen können (Aus: Bartowsky, 2009).**

Neben den genannten Bakterien besitzen auch Wildhefen ein großes Potenzial zur Bildung von Weinfehlern (Loureiro und Malfeito-Ferreira, 2003). Hier sind vor allem der Esterton

sowie das Mäuseln (hervorgerufen durch *Brettanomyces*, Lay, 2003) zu nennen (König und Fröhlich, 2009). Des Weiteren können im Wein beziehungsweise auf den Trauben verschiedene Schimmelpilze (zum Beispiel *Plasmopara viticola*, Eichhorn und Lorenz, 1980; Kassemeyer und Berkelmann-Löhnertz, 2009) auftreten, welche die Weinqualität negativ aber auch positiv, bei edelsüßen Weinen (zum Beispiel *Botrytis cinerea*, Dittrich, 1989), beeinflussen.

Zur Minimierung des Risikos der Bildung der genannten Weinefehler kann die Verwendung von gesundem Traubenmaterial, das Vergären des Mosts mit Starterkulturen, eine Most- oder Maischeschwefelung sowie eine gute Kellerhygiene beitragen.

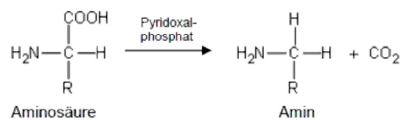
## 1.2 Biogene Amine in Lebensmitteln

Als biogene Amine bezeichnet man niedermolekulare Stickstoffverbindungen, die von tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Zellen gebildet werden (ten Brink *et al.*, 1990). Man unterscheidet hierbei drei Gruppen von Aminen: Die aliphatischen, zu denen zum Beispiel Putrescin und Cadaverin gezählt werden, die aromatischen (zum Beispiel Tyramin und Phenylethylamin) sowie die heterocyclischen biogenen Amine wie Histamin oder Tryptamin (Silla-Santos, 1996; Ruiz-Capillas und Jiménez-Colmenero, 2004). In einem Organismus haben diese Stickstoffverbindungen verschiedene Aufgaben. So dienen einige als Neurotransmitter, während andere eine hormonelle Funktion annehmen (Ohtsu und Watanabe, 2003). Ebenfalls stellen sie eine Stickstoffquelle dar und dienen als Vorläufer zur Synthese von Nukleinsäuren oder Proteinen (Karovičová und Kohajdová, 2005). Weiter können biogene Amine einen Einfluss auf die Regulation der Körpertemperatur, der Nahrungsaufnahme sowie den Blutdruck haben (Smit *et al.*, 2008).

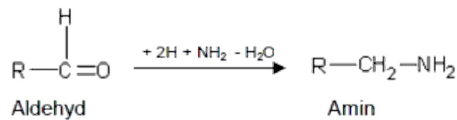
Biogene Amine können auf vier verschiedene Arten gebildet werden. Die am häufigsten auftretende Reaktion, die zur Bildung biogener Amine führt, ist die Decarboxylierung von Aminosäuren. Zwei der wichtigsten Amine, Histamin und Tyramin, entstehen aus den Vorläuferaminosäuren Histidin und Tyrosin. Die Abspaltung der Carboxylgruppen wird von den Enzymen Histidin- bzw. Tyrosin-Decarboxylase katalysiert. Beide Enzyme besitzen in der Regel Pyridoxal-5'-Phosphat als Co-Faktor (Moreno-Arribas und Lonvaud-Funel, 1999; Coton und Coton, 2005; Smit *et al.*, 2008). Weitere Reaktionsmechanismen zur Bildung biogener Amine sind die Transaminierung, die reduktive Aminierung und der Abbau von Stickstoffverbindungen (Askar und Treptow, 1986; Maijala, 1993; Silla-Santos, 1996). Die vier Reaktionstypen sind in Abbildung 1.2 dargestellt.



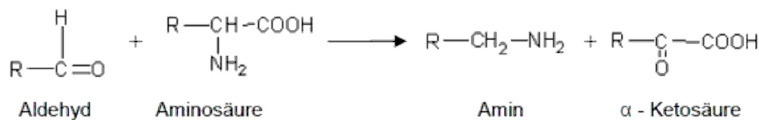
### Decarboxylierung von Aminosäuren



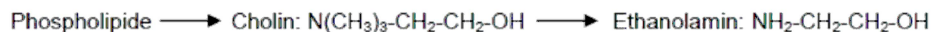
### Reduktive Aminierung von Aldehyden und Aminosäuren



### Transaminierung



### Hydrolytische Spaltung von Stickstoffverbindungen



**Abbildung 1.2: Mögliche Reaktionsmechanismen zur Bildung biogener Amine (verändert nach Bäumlisberger, 2011).**

Neben den genannten Aufgaben im Organismus können einige biogene Amine in höheren Konzentrationen oder bei Wechselwirkungen mit anderen Verbindungen toxisch wirken. Das wohl am bestuntersuchtete biogene Amin Histamin wird mit verschiedenen Symptomen in Verbindung gebracht und spielt eine zentrale Rolle bei Lebensmittelvergiftungen. So kann Histamin Kopfschmerz, Bluthochdruck und Verdauungsprobleme hervorrufen, während Tyramin oft mit Migräne assoziiert wird (Smit *et al.*, 2008). Andere biogene Amine wie Phenylethylamin und Tryptamin erhöhen den Blutdruck oder potenzieren die Wirkung anderer Amine. Dies ist zum Beispiel bei Cadaverin und Putrescin der Fall (Anli und Bayram, 2009). Im menschlichen Körper wird ein Teil der aufgenommenen biogenen Amine im Darm durch Aminoxidasen abgebaut. Hierbei handelt es sich um Monoaminoxidasen (MAO) und Diaminoxidasen (DAO). Diese Enzyme sind abhängig von Sauerstoff und werden gehemmt durch Ethanol und einige biogene Amine (Lucas *et al.*, 2008). Zudem ist die Wirkung der Enzyme bei Personen die MAO-Hemmer einnehmen eingeschränkt (Kalač und Křížek, 2003). Die Toxizität von Histamin wurde von Lehane und Olley (2000) beschrieben. Sie geben an, dass eine orale Einnahme von 10 mg Histamin als tolerable Höchstgrenze gesehen werden kann, während 100 mg eine mittlere und 1000 mg eine schwere Vergiftung hervorrufen kann. Generell können Konzentrationen zwischen 8 und 20 mg/l (Histamin), 25 und 40 mg/l (Tyramin) und 3 mg/l (Phenylethylamin) in alkoholischen Getränken bereits einen negativen physiologischen Effekt hervorrufen (Soufleros *et al.*, 1998).

Biogene Amine kommen in verschiedenen fermentierten, aber auch nicht-fermentierten Nahrungsmitteln vor (Askar und Treptow, 1986; Karovičová und Kohajdová, 2005). Hier sind vor allem Fisch, Fleisch, Käse, Wein und Bier zu nennen. Auch in fermentiertem Gemüse konnten biogene Amine nachgewiesen werden (Simon-Sarkadi *et al.*, 1994). Das Vorhandensein dieser Stickstoffverbindungen geht in den meisten Fällen auf Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen zurück. So sind zum Beispiel in der Fleischherstellung vor allem Vertreter der Familien *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae* sowie Milchsäurebakterien verantwortlich (Bover-Cid *et al.*, 2001; Ruiz-Capillas und Jiménez-Colmenero, 2004). Daneben sind noch weitere Gattungen wie *Bacillus*, *Citrobacter* oder *Clostridium* in der Lage biogene Amine in Lebensmitteln zu bilden (Silla-Santos, 1996). Die Funktion der Bildung dieser niedermolekularen Verbindungen wurde vielfach untersucht (van de Guchte *et al.*, 2002; Rhee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2007). Zum Teil gilt sie als Reaktion auf Säurestress, da der Abbau von Aminosäure in einer Erhöhung des pH-Wertes resultiert, ebenfalls stellt sie einen möglichen Mechanismus zur Energiegewinnung dar, da durch den Aminosäure/Amin-Antiport eine Protonenmotorische Kraft aufgebaut werden kann (Molenaar *et al.*, 1993).

In Weinen sind am häufigsten die Amine Cadaverin, Histamin, Putrescin und Tyramin zu finden (Ancin-Azpilicueta *et al.*, 2008; Beneduce *et al.*, 2010). Neben den durch Bakterien produzierten Aminen sind einige wie Ethanolamin, Ethylamin und Putrescin bereits auf der Traube vorhanden (Del Prete *et al.*, 2009). Cadaverin und Putrescin sind normalerweise ein Indiz für verunreinigtes Traubenmaterial (Leitão *et al.*, 2005). Einen Einfluss auf die Konzentration und die Zusammensetzung der biogenen Amine im Wein haben auch verschiedene önologische Faktoren wie die Auswahl der Rebsorte, Verwendung von Fungiziden und Düngemitteln, Qualität des Traubenmaterials, Verwendung von Starterkulturen oder die Lagerung der fertigen Weine (Marques *et al.*, 2008; Bach *et al.*, 2011). Als Vertreter der Milchsäurebakterien sind die Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* sowie *Pediococcus* als potentielle Amin-Bildner in der Weinbereitung zu nennen (Guerrini *et al.*, 2002; Moreno-Arribas *et al.*, 2003; Landete *et al.*, 2005; Beneduce *et al.*, 2010). Die meisten Spezies dieser Gattungen können als Weinschädlinge fungieren und somit auf niedrige Hygiene- oder Kellerwirtschaft hindeuten. Die Haupt-Amine im Wein, die auf mikrobielle Aktivität zurückzuführen sind, sind Histamin, Putrescin und Tyramin (Beneduce *et al.*, 2010). Mangani *et al.* (2005) konnten neben den toxischen Eigenschaften von Putrescin auch einen negativen Einfluss dieser Verbindung auf die Sensorik des Weines nachweisen. Die Gesamt-Konzentration an biogenen Aminen im Wein reicht von wenigen Milligramm bis zu 50 mg/l (Beneduce *et al.*, 2010). Diese Konzentrationen sind stark abhängig von den oben genannten önologischen Faktoren, dem Vorhandensein von Bakterien und dem Angebot an Aminosäuren als potentielle Vorstufen der biogenen Amine.

Mehrere Studien zeigten, dass im Allgemeinen die Konzentrationen an biogenen Aminen in Rotweinen höher ist, als in Weißweinen (Marcobal *et al.*, 2005; Kaschak *et al.*, 2009; Peña-Gallego *et al.*, 2009). Gründe hierfür sind der in der Regel höhere pH-Wert von Rotweinen, der mikrobielles Wachstum erleichtert, sowie höhere Konzentrationen von Aminosäuren als Vorstufen für biogene Amine. Kaschak *et al.* (2009) konnten neben den genannten biogenen Aminen, Histamin, Tyramin, Putrescin und Cadaverin, noch Ethanolamin (7,7 mg/l in Weißwein, 10,1 mg/l in Rotwein) und Isoamylamin (1,5 mg/l in Weißwein; 10,3 mg/l in Rotwein) in deutschen Discount-Weinen nachweisen.

Ein weiteres alkoholisches Getränk, in dem biogene Amine vorkommen können, ist Bier (Glória und Izquierdo-Pulido, 1999; Kalač und Křížek, 2003). Hier sind jedoch niedrigere Konzentrationen dieser Verbindungen zu finden, als in den vorhergehend beschriebenen Lebensmitteln. Auffällig hierbei ist die Tatsache, dass kein Unterschied im Amin-Gehalt zwischen alkoholischem und alkoholfreiem Bier zu beobachten ist. Als hauptverantwortliche Amin-Bildner im Bier sind *Lactobacillus frigidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus brevis* und *Pediococcus damnosus* zu nennen (Kalač und Křížek, 2003).

Eine wichtige Rolle spielen biogene Amine auch in der Produktion von Milchprodukten. Während in frischer Milch noch geringe Konzentrationen von Histamin nachweisbar sind (weniger als 0,3 mg/kg), kann der Gehalt dieses Amins in gereiftem Käse bis zu 2,5 g/kg betragen (Bodmer *et al.*, 1999). Neben Histamin sind vor allem die Amine Tyramin, Cadaverin, Putrescin, Tryptamin und Phenylethylamin in verschiedenen Käsesorten zu finden (Silla-Santos, 1996; Novella-Rodriguez *et al.*, 2000). Stratton *et al.* (1991) konnten beobachten, dass der Gehalt an Histamin und Tyramin nicht nur bei verschiedenen Käsesorten, sondern auch innerhalb einer Sorte stark variiert.

Auch in Fleisch- und Fischgerichten können biogene Amine vorkommen. Vor allen in fermentierten Wurstgerichten konnten hohe Konzentrationen dieser Stickstoffverbindungen nachgewiesen werden (bis zu 100 mg/kg Histamin, 500 mg/kg Tyramin oder 400 mg/kg Putrescin; Ruiz-Capillas und Jiménez-Colmenero, 2004). Von noch höheren Mengen an Histamin (bis zu 350 mg/kg), Cadaverin (bis zu 650 mg/kg), Putrescin (bis zu 500 mg/kg) und Tyramin (bis zu 740 mg/kg) in verschiedenen Trockenwürsten berichten Suzzi und Gardini (2003). Biogene Amine in frischen Fleisch- und Fischprodukten deuten in den meisten Fällen auf einen Verderb dieser Lebensmittel hin. Manche Fische, wie Thunfisch und Makrelen, bilden höhere Konzentration von Histamin (Al Bulushi *et al.*, 2009). Des Weiteren können die Amine Cadaverin und Putrescin in größeren Mengen in Fisch nachgewiesen werden.

Aufgrund des weitverbreiteten Vorkommens biogener Amine und ihrer bestätigten physiologischen Wirkung auf den menschlichen Organismus wurde in manchen Länder die Einführung gesetzlicher Grenzwerte diskutiert oder solche bereits eingeführt. So erlaubt die FDA (American Food and Drug Administration) maximal 5 mg/100g Histamin in Fischen

(FDA, 1998). In der Slowakei wurden Grenzwerte für zwei biogene Amine festgelegt (Halász *et al.*, 1999): Histamin (20 mg/kg für Bier; 200 mg/kg für Fischprodukte) und Tyramin (200 mg/kg für Käse). In der Europäischen Union soll die Konzentration von Histamin in rohem Fisch nicht 100 mg/kg überschreiten wohingegen bei Fischprodukten die enzymatisch behandelt wurden und in Salzlage gereift sind der Grenzwert dieser Verbindung bei 400 mg/kg liegt (EG-Verordnung 2073/2005). Für den Histamin-Gehalt in Fleisch und Fleischgerichten gibt es gesetzliche Grenzwerte in den Niederlanden und in Tschechien (200 mg/kg; Soufleros *et al.*, 1998). Die Einführung von Grenzwerten für biogene Amine in Wein wurde bereits mehrfach diskutiert (König, 2008). In Deutschland wurde jedoch bis heute keine Höchstgrenze dieser Stickstoffverbindungen definiert. Ein 1995 in der Schweiz eingeführter Grenzwert von 10 mg/l für Histamin im Wein (SR 817.021.23) wurde 2010 wieder aufgehoben.

Es ist somit zusammenfassend zu sagen, dass biogene Amine aufgrund ihres Vorkommens, ihrer physiologischen Effekte und sensorischen Beeinflussung eine große Rolle in der Lebensmittelindustrie spielen. Die genauere Erforschung ihrer Bildung durch Mikroorganismen stellt somit eine zentrale Aufgabe der Lebensmittelwissenschaft dar.

### 1.3 Der Einsatz von Enzymen in der Lebensmitteltechnologie

Der Einsatz von Enzymen in der Industrie ist heutzutage stark verbreitet. So finden Enzyme zum Beispiel Verwendung bei der Waschmittelherstellung, in der Textilindustrie, Papierindustrie, Landwirtschaft und Futterherstellung, Petrochemie und Lebensmittelindustrie (Kirk *et al.*, 2002; Sanchez und Demain, 2011). In den letzten Jahren hat sich der Weltmarkt an industriell verwendeten Enzymen stetig erhöht. Während er 1998 noch 1,6 Milliarden US-Dollar betrug, wurden 2009 bereits 5,1 Milliarden US-Dollar in Enzyme investiert (Sanchez und Demain, 2011). Im Bereich der Lebensmittelherstellung betrug der Weltmarkt 2003 634 Millionen US-Dollar und stellte somit den zweitgrößten Sektor, nach der Waschmittelindustrie, an Enzymverbrauch dar (Lorenz und Eck, 2005). Man geht davon aus, dass zurzeit über 500 Produkte durch den Einsatz von Enzymen hergestellt werden (Johannes und Zhao, 2006). Die Hauptproduzenten dieser Enzyme sind Pilze (über 50 %). Hier ist vor allem die Gattung *Aspergillus* zu nennen. Einen ebenfalls großen Teil der Enzymproduzenten machen, mit ungefähr einem Drittel, die Bakterien aus, während pflanzliche und tierische Enzyme eher die Minderheit darstellen (Sanchez und Demain, 2011). In näherer Vergangenheit geht der Trend mehr und mehr zur Verwendung rekombinanter Enzyme, die bereits heute circa 50 % der erhältlichen Produkte ausmachen. Die hierfür verwendeten Organismen sind vor allem den Gattungen *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Yarrowia* und *Bacillus* zuzuschreiben (Galante und Formantici, 2003). Durch die heterologe oder homologe Expression von Genen, die zur

Produktion von Enzymen führt, kann die Ausbeute dieser um ein vielfaches gesteigert werden.

Enzyme zeichnen sich durch hohe Aktivität in bereits niedrigen Konzentrationen, hohe Substratspezifität und meist niedrige Toxizität aus. Die Mehrzahl der industriell verwendeten Enzyme besitzen eine hydrolytische Aktivität und werden zum Abbau von Naturstoffen eingesetzt (Kirk *et al.*, 2002). So finden beispielsweise Amylasen einen Einsatz in der Backindustrie (Godfrey und West, 1996; Sanchez und Demain, 2011). Andere Enzyme wie Proteasen, Pektinasen oder Lipasen dienen der Freisetzung von Inhaltsstoffen und somit dem Aroma der Lebensmittel. Proteasen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Käseherstellung und werden hier auch zur Produktion niedrig allergener Milchproteine als Zusatz zu Säuglingsnahrung verwendet (Gupta *et al.*, 2002).

Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht einiger Enzyme und deren Einsatz in verschiedenen Zweigen der Lebensmittelindustrie.

**Tabelle 1.1: Einige Beispiele zur Anwendung von Enzymen in der Lebensmittelindustrie (verändert nach Kirk *et al.*, 2002).**

Industriezweig	Enzymklasse	Anwendung
Lebensmittelherstellung	Protease	Milchgerinnung, Säuglingsnahrung, Geschmacksentwicklung
	Lipase	Geschmacksentwicklung (Käse), Teigstabilität (Backwaren)
	Lactase	Entfernung von Lactose aus der Milch
	Pektinase	Aromaentfaltung (Fruchtprodukte)
	Amylase	Aromaentfaltung (Brot)
Getränkeherstellung	Pektinase	Maischebehandlung (Fruchtsäfte, Wein)
	$\beta$ -Glucanase	Maischebehandlung
	Laccase	Klärung (Fruchtsäfte)

Auch in der Weinherstellung finden Enzyme ihren Einsatz. Hierzu zählen pektolytische Enzyme, Wein stabilisierende Enzyme und Aroma verstärkende Enzyme (Moreno-Arribas und Polo, 2005; Ugliano, 2009). Pektinasen werden zur Freisetzung von aromaaktiven Stoffen aus der Zellwand der Trauben eingesetzt. In der Rotweinherstellung werden sie oft in Kombination mit Hemicellulasen und Cellulasen verwendet und tragen somit zu einer besseren Entfaltung der Farbe bei (Ducruet *et al.*, 2000; Gil und Valles, 2001). Der Einsatz von Pektinasen dient ebenfalls der Zersetzung fester Bestandteile nach der Pressung der Trauben. Eine große Anzahl an Pektinase-Präparaten sind bereits kommerziell erhältlich (Ugliano, 2009). Zu den aromaverstärkenden Enzymen sind Glycosidasen, Lyasen und Esterase zu zählen. Viele aromaaktive Stoffe im Wein sind glykosidisch gebunden

(Cordonnier und Bayonove, 1974). Hierzu zählen zum Beispiel Linalool, Geraniol oder Vinylguajacol (Sefton, 1998). Diese Aromastoffe können durch den Einsatz glykosidischer Enzyme entfaltet werden. Wie Glycosidasen, dienen Lyasen und Esterasen der Freisetzung von gebundenen Aromastoffen. Bei den Lyasen handelt es sich hauptsächlich um Cystein-gebundene Thiole (Tominaga *et al.*, 1998), die durch die Spaltung mit den Enzymen freigesetzt werden. Ester, welche dem Wein eine fruchtige Note verleihen (Fugelsang und Edwards, 2007), sind häufig an Acetat- oder Ethyl-Fettsäuren gebunden (Claus, 2007; Ugliano, 2009).

Eine wichtige Rolle bei der Weinherstellung spielen, wie bereits erwähnt, stabilisierende Enzyme. Hierzu zählen vor allem Proteasen und Muramidasen. Während der Lagerung der Weine kann es zum Ausfallen oder zur Aggregation von Proteinen kommen, was in einer Trübung der Weine resultieren kann (Ferreira *et al.*, 2002). Der Einsatz von Proteasen in Kombination mit Hitzebehandlung kann zu einer Abnahme der Trübung des betroffenen Weines führen (Pocock *et al.*, 2003). Zur Verhinderung des bakteriellen Wachstums während der Weinbereitung darf seit 2001 Lysozym aus Hühnereiweiß eingesetzt werden (EG-Verordnung 1622/2000). Hierbei handelt es sich um eine Muramidase, die die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung im Peptidoglykan von Bakterien spaltet. Eine Wachstumshemmung einiger Bakterien im Wein sowie die Verzögerung des biologischen Säureabbaus konnte von Gerbaux *et al.* (1997) und Weiland (2001) festgestellt werden. Nachteile der Anwendung von Lysozym in der Weinbereitung können unter anderem der Farbverlust von Rotweinen oder die Trübung von Weißweinen sein (Bartowsky *et al.*, 2004). Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass die Wirkung des kommerziell vertriebenen Lysozyms aus Hühnereiweiß unter den im Wein vorhandenen pH-Werten und Ethanolkonzentrationen stark gehemmt ist (Eggert *et al.*, 2006). Der Einsatz von Lysozym in der Weinbereitung muss ab Mitte 2012 auf den Flaschen gekennzeichnet werden, da es als Eiweißprodukt ein gewisses Allergenpotential aufweisen kann.

Wie erwähnt spielen Enzyme bereits heute eine wichtige Rolle in der Industrie. Aufgrund ihrer vielseitigen Anwendbarkeit und der Möglichkeit der Überproduktion werden Enzyme auch in den nächsten Jahren einen wichtigen Aspekt der Forschung in der Lebensmittelindustrie darstellen.

#### **1.4 Die Gattung *Streptomyces* als Produzent für bioaktive Stoffe**

Streptomyceten gehören zur Familie der Actinomyceten und besitzen ihren bevorzugten Lebensraum im Boden. Der typische Erdgeruch ist auf die Bildung von Geosmin durch diese Organismen zurückzuführen (Madigan *et al.*, 1997). Mit einer Zellzahl von bis zu  $10^9$  Zellen pro Gramm Erde bilden die Streptomyceten die vorherrschende Organismengruppe. Viele Mitglieder dieser Gattung spielen eine wichtige Rolle in der Zersetzung und Sanierung des

Bodens (Ishiyama *et al.*, 2004) durch beispielsweise den Abbau von Lignin und aromatischen Verbindung (Phelan *et al.*, 1979; Grund *et al.*, 1990). Vertreter der aeroben, gram-positiven Gattung *Streptomyces* weisen einen durchschnittlichen G+C-Gehalt von 72 % auf (Starr *et al.*, 1981; Wright und Bibb, 1992; Borodina *et al.*, 2005).

Streptomyceten zeichnen sich durch einen komplexen Lebenszyklus aus. Nach der Zellteilung kommt es zu keiner Trennung der Tochterzellen. Stattdessen kommt es zur Bildung eines Substratmycels, welches der Nahrungsaufnahme dient (Claessen *et al.*, 2006; Manteca *et al.*, 2007). Durch verschiedene Differenzierungen des Substratmycels kommt es zur Ausbildung eines Luftmycels. Die Verbreitung erfolgt durch Exosporen, die sogenannten Konidien. Hierbei handelt es sich um Abschnürungen des Luftmycels (Ensign *et al.*, 1978; Chater, 2001). Ein weiteres Charakteristikum der Gattung *Streptomyces* ist das Vorliegen ihres Genoms als lineares Chromosom. Bentley *et al.* (2002) gelang die Sequenzierung des Genoms von *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mit 8,7 Millionen Basenpaaren stellt es das bis heute größte sequenzierte prokaryotische Genom dar. Neben *Streptomyces coelicolor* A3(2) liegen zurzeit weitere fünf komplett sequenzierte Genome von Streptomyceten (*Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces percyetius*, *Streptomyces scabiae*) vor.

Streptomyceten sind bekannt für die Sekretion mehrerer bioaktiver Substanzen wie Antibiotika und hydrolytischer Enzyme (McCarthy und Williams, 1992; Borodina *et al.*, 2005; Dharmaraj, 2010). Aufgrund dieser Tatsache wurden seit den 1970er Jahren über 3000 verschieden Arten von Streptomyceten beschrieben (Guo *et al.*, 2008). Einige Arten der Gattung *Streptomyces* wurden bereits nach der Entdeckung von Actinomycin und Streptomycin in den 1940er Jahren von wirtschaftlichem Interesse als Bildner von Antibiotika (Challis und Hopwood, 2003). Heute werden mehr als die Hälfte aller bekannter Antibiotika von Streptomyceten gebildet (Berdy, 2005; Borodina *et al.*, 2005), wobei die Angaben zur Anzahl dieser stark variieren. Als die wichtigsten, in der Industrie eingesetzten, Produzenten für Antibiotika sind die Arten *Streptomyces griseus* (Actinomycin, Streptomycin), *Streptomyces antibioticus* (Actinomycin) sowie *Streptomyces aureofaciens* (Tetracyclin) zu nennen (Sauermost, 1994).

Die Produktion dieser bioaktiven sekundären Stoffwechselprodukte ist eng an die Differenzierung der Bakterienzelle gekoppelt (Rodriguez und McDaniel, 2001; Worrall und Vijgenboom; 2010). Während des Abbaus des Substratmycels beziehungsweise zum Zeitpunkt der Bildung des Luftmycels kommt es zur Herstellung der bioaktiven Substanzen (Süsstrunk *et al.*, 1998; Viollier *et al.*, 2001). Die Sekretion der hydrolytischen Enzyme dient neben der Abwehr von Konkurrenten in erster Linie der Beschaffung von Nahrungsmitteln (Challis und Hopwood, 2003). Da es sich bei den meisten im Boden enthaltenen Kohlenstoffquellen um unlösliche Polymere handelt, müssen diese extrazellulär gespalten

werden, damit die Oligo- oder Monomere in die Zelle aufgenommen werden können. Die wichtigsten Enzyme stellen hierbei Cellulasen, Hemicellulasen, Pektinasen, Chitinasen und Proteasen dar, die bereits bei verschiedenen Streptomycceten nachgewiesen werden konnten (Wilson, 1992; Shidu *et al.*, 1995; Kawase *et al.*, 2006; Jacob *et al.*, 2007).

Von besonderem Interesse für den industriellen Einsatz sind von Streptomycceten gebildete bakteriolytische, aber auch fungizide Enzyme (Welsch, 1962; Hayshi *et al.*, 1981; Worrall und Vijgenboom; 2010). Zur Bekämpfung von bakteriellem Wachstum sind hier die Peptidoglykan spaltende Muramidasen zu nennen, welche bereits mehrfach bei Streptomycceten gefunden wurden (Harada *et al.*, 1981; Rau *et al.*, 2001; Blättel *et al.*, 2009). Daneben wurde auch eine bakteriolytische Aktivität einer Protease (Yokogawa *et al.*, 1974) und einer Aminopeptidase (Karadzic *et al.*, 2002) beschrieben. Ohbuchi *et al.* (2001) und Blättel *et al.* (2009) waren in der Lage mit Hilfe bakteriolytischer Enzyme von verschiedenen Streptomycceten weinrelevante Milchsäurebakterien in ihrem Wachstum zu hemmen.

Obwohl viele Studien zur Produktion bioaktiver Substanzen durch Streptomycceten vorliegen, ist davon auszugehen, dass erst circa 10 % der durch diese Organismengruppe produzierten Stoffe entdeckt wurden (Watve *et al.*, 2001; Clardy *et al.*, 2006).

## 1.5 Motivation

Wein ist durch seine lange Geschichte nicht nur ein Kulturgut, sondern aufgrund seiner Rolle als Genussmittel ebenfalls von wirtschaftlichen Interesse. So betrug der deutsche Weinmarkt im Jahre 2009 ein Volumen von 19,7 Millionen Hektoliter, was einem Gesamtumsatz von 7,21 Milliarden Euro entsprach (Deutsches Weininstitut, 2009). Aufgrund dieser Tatsache ist es eine wichtige Aufgabe der Weinforschung die Qualität des Weines so hoch wie möglich zu halten und stetig zu verbessern. Hierzu gehört neben den Arbeiten im Weinberg und in den Weinkellern auch die chemische und mikrobiologische Untersuchung des Produktes von der Traube bis zum Wein.

Die Bildung von aromaaktiven Stoffen durch Bakterien spielt – wie bereits erwähnt – eine wichtige Rolle in der Weinbereitung. Die so möglicherweise entstandenen Weinfehler können zu hohen wirtschaftlichen Schäden führen, aber auch gesundheitliche Folgen für den menschlichen Körper haben. So im Fall der biogenen Amine (Smit *et al.*, 2008; Ammon, 2010). Deshalb erwog die Europäische Union im Jahr 2001 die Einführung von Grenzwerten für biogene Amine (COST 922). Hier wurde ein Höchstwert von 2 mg/l Histamin diskutiert, was jedoch dazu führen würde, dass ein beträchtlicher Teil der in Deutschland erzeugten Weine nicht mehr verkehrsfähig wäre (Rainer, 2005).

Um einen solchen Grenzwert einzuführen, ist es wichtig einen Überblick über das Vorkommen von Bakterien, die in der Lage sind diese Verbindungen zu bilden, zu gewinnen. Ebenfalls ist die Kenntnis über die Häufigkeit und Quantität solcher Verbindungen



unabdingbar. Hierzu müssen Methoden entwickelt werden, die es ermöglichen das Vorkommen dieser unerwünschten Stoffe frühzeitig zu erkennen, um gegebenenfalls darauf reagieren zu können.

In der gängigen Praxis der Weinbereitung wird zur Kontrolle des mikrobiellen Wachstums der Wein häufig geschwefelt. Aufgrund von gesundheitlichen Bedenken (Bartowsky *et al.*, 2003; Lustrato *et al.*, 2003) und sinkender Grenzwerte soll der Einsatz von Schwefel in der Weinbereitung in den nächsten Jahren minimiert werden. Seit dem Jahr 2001 ist der Einsatz von Lysozym zur Stabilisierung des Weines erlaubt (EG-Verordnung 1622/2000). Jedoch ist die Aktivität dieses Enzyms unter den im Wein herrschenden Bedingungen sehr eingeschränkt (Eggert *et al.*, 2006). Ebenfalls besitzt das Lysozym ein eingeschränktes Wirkspektrum, was es ihm nicht erlaubt alle als potentielle Weinschädlinge vorkommenden Bakterien in ihrem Wachstum zu hemmen (Weiland, 2001). Außerdem wird der Zusatz dieses Enzyms ab Mitte 2012 kennzeichnungspflichtig, da Lysozym als Eiprodukt ein Allergentpotential aufweist. Hier ist die Suche nach anwendbaren Alternativen ein zentrales Thema der aktuellen Weinforschung.

## **1.6 Ziele der Arbeit**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte durch gezielte Isolierung von Milchsäurebakterien aus Versuchswainen des Dienstleistungszentrums ländlicher Raum (DLR) Pfalz in Neustadt an der Weinstrasse ein Überblick über die Zusammensetzung von deren Mikrobiota gewonnen werden. In weiteren Versuchen stand die Bildung von biogenen Aminen im Vordergrund. Hierbei sollte untersucht werden, ob und wie viele der isolierten Milchsäurebakterien in der Lage sind diese zum Teil gesundheitsschädlichen Stickstoffverbindungen zu bilden. Hier sollte auch eine teilweise Quantifizierung der Bildung biogener Amine durchgeführt werden. Neben der Quantifizierung steht vor allem auch die Entwicklung einer schnellen und einfachen Nachweismethode von biogenen Aminen in Kultur-, aber auch Most- und Weinproben im speziellen Fokus der durchgeführten Forschungsarbeit.

Zur Identifizierung der isolierten Milchsäurebakterien werden verschiedene am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz entwickelte molekularbiologische Methoden angewandt, die somit in ihrer praktischen Anwendbarkeit bestätigt werden sollten. Anhand der Ergebnisse der Isolierung und Identifizierung in Kombination mit dem Wissen über die Bildung von biogenen Aminen, sollte ermittelt werden, welche Bakterienarten als hauptverantwortliche Verursacher für die Bildung von biogenen Aminen gesehen werden können. Hierdurch sollte es ermöglicht werden bereits bei frühzeitiger Detektion dieser Bakterien auf deren Auftreten zu reagieren. Deshalb war die Entwicklung einer schnellen

Nachweismethode für biogene Amine und spezielle Arten von Milchsäurebakterien ein Hauptziel dieser Forschungsarbeit.

Um mikrobielles Wachstum zu hemmen und somit die Bildung von unerwünschten Stoffen, wie zum Beispiel biogenen Aminen, während der Weinherstellung zu verhindern, sollten verschiedene Enzyme mit bakteriolytischem Potential gereinigt und charakterisiert werden. Hierbei lag der Fokus auf der Gattung *Streptomyces*, da diese für die Bildung von Exoenzymen bekannt ist. Durch den Einsatz verschiedener Aufarbeitungstechniken sowie proteinbiochemischer Methoden sollten gereinigte Enzymlösungen gewonnen werden. Die Untersuchung dieser Enzyme hinsichtlich ihrer bakteriolytischen Aktivität wurde durchgeführt. Ebenfalls sollte überprüft werden, ob die gereinigten Enzyme in der Lage sind unter weinrelevanten Bedingungen zu arbeiten. Diese Enzyme sollten mit Hilfe zweier Methoden identifiziert werden (N-terminale Sequenzierung und Massenspektroskopie). Auch sollten die gereinigten Enzyme als mögliche Alternativen zu den konventionellen Methoden der mikrobiellen Stabilisation während der Weinbereitung, das heißt Einsatz von Schwefel oder Lysozym, diskutiert werden.

Zusammenfassend gliedert sich die vorliegende Forschungsarbeit in zwei Teile: Zum Ersten die Isolierung und Identifizierung von potentiellen Bildnern biogener Amine und zum Zweiten die Hemmung des Wachstums dieser Bakterien durch den Einsatz von gereinigten und charakterisierten Enzymen, welche durch Bakterien der Gattung *Streptomyces* produziert werden.

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Chemikalien

Folgende Chemikalien der genannten Hersteller wurden genutzt:

▪ Aceton	Roth, Karlsruhe
▪ Acrylamid/Bisacrylamid	AppliChem, Darmstadt
▪ Adonitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Agar	Marcor, New Jersey, USA
▪ Agarose peqGold Universal-Agarose	Peqlab, Erlangen
▪ Agmatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Ammoniak	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
▪ Azocasein	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Borsäure	Roth, Karlsruhe
▪ Brij	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Bromcresol-Violet	Merck, Darmstadt
▪ Butanol	Roth, Karlsruhe
▪ Cadaverin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Calciumcarbonat	Roth, Karlsruhe
▪ Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
▪ Casaminosäuren	Roth, Karlsruhe
▪ Casein	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Cellulose	Roth, Karlsruhe
▪ Chloroform	Roth, Karlsruhe
▪ Citronensäure	Roth, Karlsruhe
▪ Coomassie Brilliantblau G-250	Merck, Darmstadt
▪ Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Cystein	Roth, Karlsruhe
▪ Dansylchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Di-Ammoniumcitrat	Roth, Karlsruhe
▪ Di-Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
▪ Di-Ethylether	Roth, Karlsruhe
▪ Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
▪ Di-Natrium-EDTA	Roth, Karlsruhe

---

▪ Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
▪ Dinitrosalicylsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Eisensulfat	Roth, Karlsruhe
▪ Essigsäure	Roth, Karlsruhe
▪ Ethanol	Roth, Karlsruhe
▪ Ethanolamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
▪ Ethylamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Fleischextrakt	Roth, Karlsruhe
▪ Fructose	Roth, Karlsruhe
▪ Galaktose	Roth, Karlsruhe
▪ Glucose	Roth, Karlsruhe
▪ Glycerin	Roth, Karlsruhe
▪ Glycin	Roth, Karlsruhe
▪ Hefeextrakt	Hartge Integedients, Hamburg
▪ Heptylamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Hexan	Roth, Karlsruhe
▪ Hexylamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Histamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Histidin	Roth, Karlsruhe
▪ Inositol	Roth, Karlsruhe
▪ Isoamylamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ K/Na-Tartrat	Roth, Karlsruhe
▪ Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
▪ Kaliumsorbit	Merck, Darmstadt
▪ Kupfersulfat	Roth, Karlsruhe
▪ Lactose	Roth, Karlsruhe
▪ Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
▪ Lysin	Roth, Karlsruhe
▪ Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
▪ Malat	Roth, Karlsruhe
▪ Maltose	Roth, Karlsruhe
▪ Malzextrakt	Merck, Darmstadt
▪ Manganchlorid	Merck, Darmstadt
▪ Mangansulfat	Roth, Karlsruhe
▪ Mannitol	Roth, Karlsruhe
▪ Mannose	Roth, Karlsruhe

▪ $\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Methanol	Roth, Karlsruhe
▪ Muraminsäure	Merck, Darmstadt
▪ Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
▪ Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
▪ Natriumborhydrat	Merck, Darmstadt
▪ Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
▪ Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
▪ Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
▪ Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
▪ Natriumsulfit	Roth, Karlsruhe
▪ Natronwasserglas	Roth, Karlsruhe
▪ Ornithin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ <i>ortho</i> -Phtaldialdehyd (OPA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	Roth, Karlsruhe
▪ Pepton aus Fleisch	Roth, Karlsruhe
▪ Pepton aus Sojamehl	BD Difco™, Franklin Lakes, USA
▪ Phenol	Roth, Karlsruhe
▪ Phenylethylamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
▪ Prolin	Roth, Karlsruhe
▪ Propionat	Roth, Karlsruhe
▪ Putrescin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Pyridoxal-5-Phosphat	Merck, Darmstadt
▪ Raffinose	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Rhamnose	Roth, Karlsruhe
▪ Ribose	Roth, Karlsruhe
▪ Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Salzsäure	Roth, Karlsruhe
▪ Serotonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Serva Violett 17	Serva, Heidelberg
▪ Spermidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Spermin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Stärke	Roth, Karlsruhe
▪ Taurin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
▪ Thiamin	Sigma-Aldrich, Steinheim

---

▪ Toluol	Roth, Karlsruhe
▪ Tomatensaft	Neu's, Freinsheim
▪ Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
▪ Triethylamin	Merck, Darmstadt
▪ Tris	Roth, Karlsruhe
▪ Triton X-100	Roth, Karlsruhe
▪ Tryptamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Tween 80	Merck, Darmstadt
▪ Tyramin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Tyrosin	Roth, Karlsruhe
▪ Xylose	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Zinksulfat	Merck, Darmstadt

## 2.2 Geräte und Hilfsmittel

Folgende Geräte und Hilfsmittel der genannten Hersteller wurden genutzt:

▪ Autoklav Certoclav	Certoclav, Traun, Österreich
▪ Blot-Apparatur Pegasus	Phase, Mölln
▪ Brutschrank	Köttermann, Uetze/Hänigsen
▪ CarboPac MA1-Säule	Dionex, Germering
▪ Cross-Flow-System	Satorius, Göttingen
▪ Digitalkamera Nikon Coolpix 4500	Nikon, Tokyo, Japan
▪ Dünnschichtplatten (Kieselgel 60, F <sub>254</sub> )	Merck, Darmstadt
▪ Durchlaufzentrifuge Sepatech Contifuge 17RS	Heraeus Instruments, Hanau
▪ Elektrophoresekammer (für Agarose-GE)	Biorad, Hercules, CA, USA
▪ Elektrophoresekammer (für SDS-PAGE)	Biorad, Hercules, CA, USA
▪ Festphasenextraktionssystem 10SPE™	Baker, Griesheim
▪ FPLC-Detektor: Single path Monitor UV-1 Control Unit und Optical Unit	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
▪ FPLC-Mischzelle: Flow Cell HR 10	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
▪ FPLC-Programmer: Gradient programmer GP- 250	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
▪ FPLC-Pumpe: Pump P-500	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

---

▪ FPLC-Sammler: Fraction collector Frac-10	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
▪ FPLC-Säule: MonoS™ HR 5/5	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
▪ FPLC-Verteiler: Valve V-7 und Valve V-8	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
▪ Geldokumentationseinheit	Vilber Lourmat, Eberhardzell
▪ Gelfiltrationssäule: Sephadex G-75	GE Healthcare, München
▪ Glaskugeln	Roth, Karlsruhe
▪ Glasplatten für Polyacrylamid-Gele	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
▪ Horizontale DC-Entwicklungskammer	Camag, Muttenz, Schweiz
▪ HPLC-Controller SCL-10Avp	Shimadzu, Kyoto, Japan
▪ HPLC-Entgaser DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
▪ HPLC-Fluoreszenzdetektor RF-535	Shimadzu, Kyoto, Japan
▪ HPLC-Probengeber SIL-10A	Shimadzu, Kyoto, Japan
▪ HPLC-Pumpen LC-10AT vp und LC-10AT	Shimadzu, Kyoto, Japan
▪ HPLC-Säulenofen CTO-10A	Shimadzu, Kyoto, Japan
▪ IEF-Apparatur Multiphor II	LKB, Bromma, Schweden
▪ Kryostat: Julabu F10 und Julabu UC	Julabo, Seelbach
▪ Leitfähigkeitsmessgerät WTW LF530	WTW, Weilheim
▪ LyovacGT2	Leybold-Heraeus, Köln
▪ Magnetrührer	IKA, Staufen
▪ Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
▪ Mikroskop SM Lux	Leitz, Wetzlar
▪ Mikrotiterplatten-Gerät Titertek Multiskan	Berthold, Pforzheim
▪ Mischer Vibrofix VF1	IKA, Staufen
▪ pH-Meter CG840	Schott, Mainz
▪ Photometer Specord 50	Analytic Jena, Jena
▪ Pilotfermenter	Bioengineering, Wald, Schweiz
▪ Prontosil Spherisorb ODS-2 Säule 5,0 µm	Bischoff, Leonberg
▪ Reinstwasseranlage: Milli-RO Plus 30 und Milli-Q plus 185	Millipore, Eschborn
▪ Rührzelle	Amicon, Houston, USA
▪ Schüttler	Brunswick Scientific, Edison, USA
▪ Spannungsgerät Consort E122	Consort, Turnhout, Belgien
▪ Spannungsgerät Power Supply Model 3000/300	Biorad, Hercules, CA, USA

---

▪ Starta® SCX Kartusche	Varian, Darmstadt
▪ Thermocycler	Biorad, Hercules, CA, USA
▪ Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
▪ Ultraschallbad Sonorex RK 106	Bandelin, Berlin
▪ Waagen	Sartorius, Göttingen
▪ Zelmühle Vibrogen	Edmund Bühler, Hechingen
▪ Zentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
▪ Zentrifuge J2-MC	Beckmann Coulter, Krefeld

## 2.3 Biochemikalien und Enzyme

Folgende Biochemikalien und Enzyme der genannten Hersteller wurden genutzt:

▪ Anhydrase	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Anodenflüssigkeit 3 für IEF	Serva, Heidelberg
▪ Aprotonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ BC-Assay protein quantification kit	Uptima, Monteluçon, Frankreich
▪ Bovines Serumalbumin (BSA)	Uptima, Monteluçon, Frankreich
▪ Cytochrom C	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ DNA-Größenstandard: „GeneRuler“	Fermentas, St. Leon-Rot
▪ DNA-Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
▪ dNTPs	Peqlab, Erlangen
▪ IEF Marker 3-10, Liquid-Mix	Serva, Heidelberg
▪ Kathodenflüssigkeit 10 für IEF	Serva, Heidelberg
▪ Lysozym aus Hühnereiweiß (Bacticare), Nr. 21431	Handelspräparat der Fa. Erbslöh, Geisenheim
▪ PCR-Reaktionspuffer	Peqlab, Erlangen
▪ Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Protein-Größenstandard: „PageRuler Prestained Protein Ladder plus (11-250 kDa)“	Fermentas, St. Leon-Rot
▪ Protein-Ladepuffer Rotiload 1	Roth, Karlsruhe
▪ Servalyt 2-9	Serva, Heidelberg
▪ Servalyt 7-9	Serva, Heidelberg
▪ Taq-Polymerase	Peqlab, Erlangen



## 2.4 Verbrauchsmaterialien und Kits

Folgende Verbrauchsmaterialien und Kits von den genannten Herstellern wurden genutzt:

- |   |                         |
|---|-------------------------|
| ▪ Dialyseschläuche, Porengröße: 3,5 kDa               | Roth, Karlsruhe         |
| ▪ Elektroden-Dochte für IEF                           | Serva, Heidelberg       |
| ▪ Eppendorf-Gefäße                                    | Eppendorf, Hamburg      |
| ▪ Falcon-Gefäße, 15 ml und 50 ml                      | Fisher, Schwerte        |
| ▪ HPTLC-Kieselgel 60-Platten (mit F <sub>254</sub> )  | Merck, Darmstadt        |
| ▪ Hydrosart® 0,1µ Filterkassette                      | Satorius, Götting       |
| ▪ IEF-Gel, Servalyt Precotes 3-10,<br>125 x 125 mm    | Serva, Heidelberg       |
| ▪ IEF-Gel, Servalyt Prenets 3-10,<br>125 x 125 mm     | Serva, Heidelberg       |
| ▪ Küvetten, 1,5 ml                                    | Roth, Karlsruhe         |
| ▪ Membranfilter, 25 mm Syringe, 0,45 µm und<br>0,2 µm | Fisher, Schwerte        |
| ▪ Microcon, YM10 und YM3                              | Millipore, Eschborn     |
| ▪ Multiplex-PCR-Kit                                   | Qiagen, Hilden          |
| ▪ Omega™ Polyethersulfon-Ultrafiltrations-<br>Membran | Pall, New York, USA     |
| ▪ Pipettenspitzen                                     | StarLab, Ahrensburg     |
| ▪ Plastik-Petrischalen                                | Fisher, Schwerte        |
| ▪ Polyethersulfon-Ultrasart (3 kDa)                   | Satorius, Götting       |
| ▪ PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran                 | Millipore, Eschborn     |
| ▪ QiAgen Blood and Tissue, DNA-Isolierungskit         | Qiagen, Hilden          |
| ▪ QiAquick gele extraction, Gelextraktionskit         | Qiagen, Hilden          |
| ▪ QiAquick PCR purification, PCR-<br>Aufreinigungskit | Qiagen, Hilden          |
| ▪ SDS-Fertiggele                                      | Serva, Heidelberg       |
| ▪ Silberfärbekit                                      | Fermentas, St. Leon-Rot |
| ▪ Vivaspin 5000Da, 30000Da und 50000Da                | Sartorius, Göttingen    |

## 2.5 Oligonucleotide

Die verwendeten Oligonucleotide (Primer) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersbach bezogen und sind in Tabelle 2.1 nach ihrer Verwendung aufgeführt.

**Tabelle 2.1: Verwendete Oligonucleotide.**

Name	Sequenz (5' → 3')	bp	T <sub>m</sub> [°C] <sup>a</sup>	GC [%] <sup>a</sup>
Primer zur Sequenzierung der 16S rDNA von Bakterien				
PurEubak3	AGA AAG GAG GTG ATC C	16	48,2	50
PurEubak5	AGA GTT TGA TCM TGG CT	17	48,7	44
BSF8	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	20	58,4	50
BSR1541	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	20	59,9	60
Primer zur Sequenzierung der 16S rDNA der Streptomyceten				
16F1	GTT CCT TGA GAA CTC AAC AG	20	55,3	45
16F2	GCG GAG CAT GTG GCT TAA TTC	21	59,8	52,4
16R1	CAA TAA TTC CGG ACA ACG CT	20	55,3	45
16/23R	AGA TGC TCG CGT CCA CTG TG	20	61,4	60
Primer zum Nachweis von Decarboxylase-Genen				
HDC 3	GAT GGT ATT GTT TCK TAT GA	20	51,3	44,6
HDC 4	CAA ACA CCA GCA TCT TC	17	49,9	47
TD 2	ACA TAG TCA ACC ATR TTG AA	20	51,3	32,5
TD 5	CAA ATG GAA GAA GAA GTA GG	20	54,3	40
Primer zum Nachweis von Protease-Genen				
FSC 1	CGA CCG GCT GGA AGA AGG T	19	61,6	63
RSC 1	CAA GGT CCG CCA CGG GCG C	19	68,1	79
RSC 3	CGC GGG CAC CGC CTG GAA C	19	68,1	79
FSC 2	GTG AGG ATC AAG CGC ACC	18	58,4	61
RSC 2	TGS AAA AGA AGG TCG GGC CAG	21	63,2	57
RSC 4	GCA GTT GCC GCT GCC GCC	18	65,3	78
PNT 1	AGC GGC GGC GAT GCG ATT TAT	21	63,2	57

<sup>a</sup> mittlere Schmelztemperatur und mittlerer GC-Gehalt, berechnet mit Oligo Calc; Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu>).

Tabelle 2.1: Verwendete Oligonucleotide (Fortsetzung).

Name	Sequenz (5' → 3')	bp	T <sub>m</sub> [°C] <sup>a</sup>	GC [%] <sup>a</sup>
Primer zum Nachweis von Muramidase-Genen				
MurF1	GGC GTG CAG GGC ATT GAT GTG	21	65,3	62
MurF2	GCC GTT AAA TTT GTT GCG ATC CAC	24	63,6	46
LyF1	TGC VCA GAT CCG GAR C	16	53,3	62,5
LyF2	GTG GAC GTC TCC AGC CA	17	57,3	65
LyR1	CCA GCC SGC CGG RAG	15	58,5	83,5
LyR2	TCA GCC GTT SGC SAG	15	51,7	67
Primer für SAPD-PCR				
A-Not	AGC GGC CGC A	10	36	80
C-Not	AGC GGC CGC C	10	38	90
G-Not	AGC GGC CGC G	10	38	90
T-Not	AGC GGC CGC T	10	36	80
Primer zur Sequenzierung des ITS1-5,8S rDNA-ITS2 Bereichs bei Hefen				
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	19	61,6	63
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	20	56,4	45
Primer für Multiplex-PCR				
SCAR-OENI-F	GGT AGA TTA ACC CGC GAC G	19	59,5	58
SCAR-OENI-R	GGA ATC GGT AGC ATC CTG	18	56,3	56
SCAR-LBR-F	GGA AGA TCA AGA ATA TCG GTG	21	57,5	43
SCAR-LBR-R	GCG TCT CTA ATT CAC TGA GC	20	58,4	50
SCAR-LPL-F	GAA GAT TTG CCC ATC GGT G	19	57,5	53
SCAR-LPL-R	CGT TTG ATG GTA GCG TTG C	19	57,5	53
SCAR-LBU-F	CTA TCT TTA ACC GCA TTG CCG	21	59,5	48
SCAR-LBU-R	GAC ACG CTT CTC ATG ATT GTC	21	59,5	48
SCAR-LEU-F	GTG GTC ATG GGT CTT AGC	18	56,3	56
SCAR-LEU-R	GGA TCA AGA CTA GCC AAT GG	20	58,4	50
SCAR-PAC-F	ATG ATG GAC AGA CTC CCT G	19	57,5	53
SCAR-PAC-R	CGA GCT GCG TAG ATA TGT C	19	57,5	53

<sup>a</sup> mittlere Schmelztemperatur und mittlerer GC-Gehalt, berechnet mit Oligo Calc; Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu>).

Tabelle 2.1: Verwendete Oligonucleotide (Fortsetzung).

Name	Sequenz (5' → 3')	bp	T <sub>m</sub> [°C] <sup>a</sup>	GC [%] <sup>a</sup>
Primer für Multiplex-PCR				
SCAR-LBH-F	TTC CTT GGT AAT GTG CTT GC	20	56,4	45
SCAR-LBH-R	AAT GGC AAT CGC AAT GGA CG	20	58,4	50
SCAR-WPA-F	GCT GAT GAA CCC ATA CCT C	19	57,5	53
SCAR-WPA-R	GAC CTG ATT CGC TCG TTG	18	56,3	56
SCAR-PIN-F	CTA TCC TTA CAA TGT GCA TCG	21	57,5	43
SCAR-PIN-R	TGG TGC GTC AGT AAA TGT AAG	21	57,5	43
SCAR-PDA-F	GTC TAA ACT GGT GGT TAA ACG	21	57,5	43
SCAR-PDA-R	ATC GCA CCT GGT TCA ATG C	19	57,5	53
SCAR-LCU-F	CCA GAT CCA TCA GAA GAT ACG	21	59,5	48
SCAR-LCU-R	GCT AAC TTA CCA CTA ACG ACC	21	59,5	48
SCAR-PPE-F	GGG AAC GGT TTT AGT TTT ATA CG	23	59,2	39
SCAR-PPE-R	CTA AGA GCG GTG ATG ATA AG	20	56,4	45
SCAR-PPA-F	GCA TGA ATC ACT TTT CGC TC	20	56,4	45
SCAR-PPA-R	CAA AGA TTG TGA CCC AGT TG	20	56,4	45

<sup>a</sup> mittlere Schmelztemperatur und mittlerer GC-Gehalt, berechnet mit Oligo Calc; Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu>).

## 2.6 Untersuchte Weine

Bei den Weinen, aus denen Mikroorganismen isoliert wurden, handelte es sich um Versuchsweine des Dienstleistungszentrums ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Neustadt an der Weinstrasse. Die Weine wurden hinsichtlich verschiedener Parameter, wie pH-Wert, Zugabe von BSA-Starterkulturen, Sulfit- und Lysozymzugabe und Temperatur hergestellt. Hierzu wurden drei verschiedene Rebsorten des Jahrgangs 2008 verwendet. Daneben wurden noch vier Weine des Jahrgangs 2009 untersucht (drei Weißburgunder und ein Trollinger).

Tabelle 2.2 gibt den Versuchsansatz der Rebsorte Chardonnay, Tabelle 2.3 der Weißburgunder und Tabelle 2.4 die der Spätburgunder des Jahrgangs 2008 wieder. Pro Variante wurden zwei 20 Liter-Versuchstanks angesetzt.

**Tabelle 2.2: Versuchsvarianten zur Herstellung von Weinen der Rebsorte Chardonnay.**

Bezeichnung	Zeitpunkt des BSA <sup>a</sup>	Zugabe von Lysozym
Ch BSA <sub>n</sub> AG_08	nAG	-
Ch SpoBSA_08	spoBSA, nAG	-
Ch Ly_08	-	+ 100 mg

<sup>a</sup> BSA = biologischer Säureabbau; AG = alkoholischer Gärung; spo = spontan; n = nach

**Tabelle 2.3: Versuchsvarianten zur Herstellung von Weinen der Rebsorte Weißburgunder.**

Bezeichnung	pH-Wert	Fäulnis des Traubenmaterials	Zugabe von Sulfit	Zugabe von Lysozym
WB 3,4_0_50_08	3,4	0 %	+ 50 mg	-
WB 3,6_0_50_08	3,6	0 %	+ 50 mg	-
WB 3,4_0_Ly_08	3,4	0 %	-	+ 100 mg
WB 3,6_0_Ly_08	3,6	0 %	-	+ 100 mg
WB 3,4_50_Ly_08	3,4	50 %	-	+ 100 mg
WB 3,6_50_Ly_08	3,6	50 %	-	+ 100 mg
WB 3,4_50_0_08	3,4	50 %	-	-
WB 3,6_50_0_08	3,6	50 %	-	-
WB 3,4_0_0_08	3,4	0 %	-	-
WB 3,6_0_0_08	3,6	0 %	-	-
WB 3,4_50_50_08	3,4	50 %	+ 50 mg	-
WB 3,6_50_50_08	3,6	50 %	+ 50 mg	-

**Tabelle 2.4: Versuchsvarianten zur Herstellung von Weinen der Rebsorte Spätburgunder.**

Bezeichnung	pH-Wert	Zeitpunkt des BSA <sup>a</sup>	Sonstiges
Sp_3,4_MH_BSA <sub>n</sub> AG_08	3,4	nAG	Maischeerhitzung
Sp_3,6_MH_BSA <sub>n</sub> AG_08	3,6	nAG	Maischeerhitzung
Sp_3,4_MG_SpoBSA_08	3,4	spoBSA, nAG	Maischegärung
Sp_3,6_MG_SpoBSA_08	3,6	spoBSA, nAG	Maischegärung

<sup>a</sup> BSA = biologischer Säureabbau; AG = alkoholischer Gärung; spo = spontan; sim = simultan; n = nach

**Tabelle 2.4: Versuchsvarianten zur Herstellung von Weinen der Rebsorte Spätburgunder (Fortsetzung).**

Bezeichnung	pH-Wert	Zeitpunkt des BSA <sup>a</sup>	Sonstiges
Sp_3,4_MG_BSA <sub>n</sub> AG_08	3,4	nAG	Maischegärung
Sp_3,6_MG_BSA <sub>n</sub> AG_08	3,6	nAG	Maischegärung
Sp_3,4_MG_SimAGBSA_08	3,4	simAGBSA	Maischegärung
Sp_3,6_MG_SimAGBSA_08	3,6	simAGBSA	Maischegärung
Sp_3,4_MG_SpoAGBSA_08	3,4	spoAGBSA	Maischegärung
Sp_3,6_MG-SpoAGBSA_08	3,6	spoAGBSA	Maischegärung

<sup>a</sup> BSA = biologischer Säureabbau; AG = alkoholischer Gärung; spo = spontan; sim = simultan; n = nach

## 2.7 Mikroorganismen

Die verwendeten Mikroorganismen wurden der Kulturensammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (IMW) entnommen bzw. von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) Braunschweig oder dem Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Utrecht, Niederlande bezogen (siehe Tabelle 2.5).

**Tabelle 2.5: Herkunft der verwendeten Mikroorganismen<sup>a</sup>.**

Stamm	Spezies	Herkunft	IMW-Stammsammlung <sup>b</sup>
DSM 3508 <sup>T</sup>	<i>Acetobacter aceti</i>	DSMZ	B 775
DSM 14362 <sup>T</sup>	<i>Acetobacter cerevisiae</i>	DSMZ	B 804
DSM 14337 <sup>T</sup>	<i>Acetobacter malorum</i>	DSMZ	B 794
K 113	<i>Acetobacter malorum</i>	IMW	B 797
K 299	<i>Acetobacter malorum</i>	IMW	
K 30	<i>Acetobacter malorum</i>	IMW	B 795
K 313	<i>Acetobacter malorum</i>	IMW	
K 66	<i>Acetobacter malorum</i>	IMW	B 796
K 42	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	IMW	B 808

<sup>a</sup> T = Typstamm

<sup>b</sup> Stammbezeichnung in der Kulturensammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz.

Tabelle 2.5: Herkunft der verwendeten Mikroorganismen<sup>a</sup> (Forstsetzung).

Stamm	Spezies	Herkunft	IMW <sup>b</sup>
K 99	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	IMW	B 803
DSM 15551 <sup>T</sup>	<i>Acetobacter tropicalis</i>	DSMZ	B 798
CBS 4805	<i>Brettanomyces custersianus</i>	CBS	H 576
CBS 1945	<i>Brettanomyces nanus</i>	CBS	H 577
DSM 70732	<i>Dekkera anomala</i>	DSMZ	H 574
DSM 70001	<i>Dekkera bruxellensis</i>	DSMZ	H 575
DSM 5603 <sup>T</sup>	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	DSMZ	B 774
DSM 19674 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus bobalius</i>	DSMZ	B 732
B 190	<i>Lactobacillus brevis</i>	IMW	<i>Lactobacillus buchneri</i>
DSM 20054 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus brevis</i>	DSMZ	B 737
B 137	<i>Lactobacillus buchneri</i>	IMW	
DSM 20057 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	DSMZ	B 729
DSM 5987	<i>Lactobacillus buchneri</i>	DSMZ	B 736
DSM 20011 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus casei</i>	DSMZ	B 777
DSM 20019 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSMZ	B 818
DSM 20074 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	DSMZ	
DSM 14421 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	DSMZ	B 724
B 168	<i>Lactobacillus fermentum</i>	IMW	
B 169	<i>Lactobacillus fermentum</i>	IMW	
B 170	<i>Lactobacillus fermentum</i>	IMW	
B 171	<i>Lactobacillus fermentum</i>	IMW	
B 191	<i>Lactobacillus fermentum</i>	IMW	
DSM 20052 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	B 730
DSM 20203 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	DSMZ	B 731
B 706	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	IMW	
DSM 20176 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSMZ	B 279
DSM 20557 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus jensenii</i>	DSMZ	
DSM 12361 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	DSMZ	B 771
DSM 20444 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus mali</i>	DSMZ	B 725

<sup>a</sup> T = Typstamm

<sup>b</sup> Stammbezeichnung in der Kulturensammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz.

Tabelle 2.5: Herkunft der verwendeten Mikroorganismen<sup>a</sup> (Forstsetzung).

Stamm	Spezies	Herkunft	IMW <sup>b</sup>
DSM 13675 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus nagelii</i>	DSMZ	B 723
DSM 5622 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSMZ	B 726
DSM 20174 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ	B 727
DSM 19971 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus uvarum</i>	DSMZ	B 728
DSM 20605 <sup>T</sup>	<i>Lactobacillus vini</i>	DSMZ	B 781
DSM 20343 <sup>T</sup>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSMZ	B 3/6-28
B 577	<i>Micrococcus luteus</i>	IMW	
B 139	<i>Oenococcus oeni</i>	IMW	entspricht DSM 20252 <sup>T</sup>
DSM 20284 <sup>T</sup>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSMZ	B 3/5-20
DSM 20331 <sup>T</sup>	<i>Pediococcus damnosus</i>	DSMZ	B 3/5-14
DSM 20285 <sup>T</sup>	<i>Pediococcus inopinatus</i>	DSMZ	B 3/5-19
DSM 20332 <sup>T</sup>	<i>Pediococcus parvulus</i>	DSMZ	B 3/5-15
DSM 20336 <sup>T</sup>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSMZ	B 3/5-18
B 578	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	IMW	<i>Streptomyces albus</i>
DSM 40233	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	DSMZ	
DSM 40455 <sup>T</sup>	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	DSMZ	
DSM 40149 <sup>T</sup>	<i>Streptomyces daghestanicus</i>	DSMZ	
DSM 40586 <sup>T</sup>	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	DSMZ	
DSM 41864 <sup>T</sup>	<i>Streptomyces koynagensis</i>	DSMZ	
DSM 40738 <sup>T</sup>	<i>Streptomyces somaliensis</i>	DSMZ	
DSM 40183 <sup>T</sup>	<i>Streptomyces violascens</i>	DSMZ	
DSM 20288 <sup>T</sup>	<i>Weisella paramesenteroides</i>	DSMZ	

<sup>a</sup> T = Typstamm

<sup>b</sup> Stammbezeichnung in der Kulturensammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz.

Neben den in Tabelle 2.5 angegebenen Mikroorganismen wurde eine Reihe von Bakterien aus Versuchweinen des Dienstleistungszentrums ländlicher Raum (DLR), Neustadt an der Weinstrasse isoliert. Diese Eigenisolate sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst.



Tabelle 2.6: Herkunft der Eigenisolate aus den Versuchsweinen.

Stamm	Spezies	Herkunft <sup>a</sup>	IMW <sup>b</sup>
4.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MH_BSAAnAG (T 1)	
5.2.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MH_BSAAnAG (T 2)	
5.2.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MH_BSAAnAG (T 2)	
12.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_BSAAnAG (T 1)	
12.2.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_BSAAnAG (T 1)	
14.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_spoBSA (T 2)	
15	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_spoBSA (T 2)	
16.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_spoBSA (T 2)	
16.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_spoBSA (T 2)	
17.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_spoBSA (T 2)	
18.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_spoBSA (T 2)	
19.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_spoBSA (T 2)	
21.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_spoBSA (T 1)	
21.3	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_spoBSA (T 1)	
22	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_spoBSA (T 1)	
25	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_spoBSA (T 1)	
28	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_spoBSA (T 2)	
32.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_BSAAnAG (T 1)	
32.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_BSAAnAG (T 1)	
35.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_BSAAnAG (T 1)	
35.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_BSAAnAG (T 1)	
37	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_BSAAnAG (T 1)	B763
41.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_BSAAnAG (T 1)	B 861
42.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_BSAAnAG (T 1)	B 882
52.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 1)	B 896
53.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 1)	
54.1.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 2)	
57.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 2)	
57.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 2)	
59.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 2)	
59.2.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 2)	

<sup>a</sup> Bezeichnungen siehe Tabelle 2.2, Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4; T = Tank.

<sup>b</sup> Stammbezeichnung in der Kultursammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz.

**Tabelle 2.6: Herkunft der Eigenisolate aus den Versuchsweinen (Fortsetzung).**

<b>Stamm</b>	<b>Spezies</b>	<b>Herkunft<sup>a</sup></b>	<b>IMW<sup>b</sup></b>
59.2.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 2)	
60	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 2)	
62.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_simAGBSA (T 1)	
63.1.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_simAGBSA (T 1)	
63.1.3	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_simAGBSA (T 1)	
63.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_simAGBSA (T 1)	B 864
68.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_simAGBSA (T 1)	B 865
71.2.3	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,6_MG_simAGBSA (T 1)	B 898
87	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_SpoAGBSA (T 2)	B 867
116.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,4_0_0_08 (T 2)	
121	<i>Lactobacillus brevis</i>	Ch Ly_08 (T 1)	
122.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,4_0_0_08 (T 2)	
123.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,6_50_0_08 (T 2)	
123.3	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,6_50_0_08 (T 2)	B 869
124.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,6_0_50_08 (T 2)	B 870
124.3	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,6_0_50_08 (T 2)	
130	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,4_0_Ly_08 (T 1)	
132	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,4_0_0_08 (T 1)	
133.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sp_3,4_MG_SimAGBSA (T 1)	B 886
327	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,6_0_Ly_08 (T 1)	B 873
331	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,6_50_50_08 (T 2)	B 874
365	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,6_50_0_08 (T 2)	B 875
378	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,4_0_Ly_08 (T 1)	B 876
379	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,4_0_Ly_08 (T 1)	B 866
382	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,4_0_Ly_08 (T 2)	B 877
383	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,4_0_Ly_08 (T 2)	B 878
386	<i>Lactobacillus brevis</i>	WB_3,4_0_Ly_08 (T 2)	B 902
3	<i>Pediococcus parvulus</i>	Sp_3,6_MH_BSAAnAG (T 1)	
4.2	<i>Pediococcus parvulus</i>	Sp_3,6_MH_BSAAnAG (T 1)	
14.1.1	<i>Pediococcus parvulus</i>	Sp_3,4_MG_spoBSA (T 2)	
14.1.2	<i>Pediococcus parvulus</i>	Sp_3,4_MG_spoBSA (T 2)	

<sup>a</sup> Bezeichnungen siehe Tabelle 2.2, Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4; T = Tank.

<sup>b</sup> Stammbezeichnung in der Kulturrensammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz.

Tabelle 2.6: Herkunft der Eigenisolate aus den Versuchsweißen (Fortsetzung).

Stamm	Spezies	Herkunft <sup>a</sup>	IMW <sup>b</sup>
201	<i>Pediococcus parvulus</i>	Spätburgunder, Pfalz	
104.1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Sp_3,6_MG_SpoAGBSA (T 2)	B 885
104.2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Sp_3,6_MG_SpoAGBSA (T 2)	
107	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Sp_3,6_MG_SpoAGBSA (T 2)	B 899
108	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Sp_3,6_MG_SpoAGBSA (T 2)	
128	<i>Lactobacillus paracasei</i>	WB 3,6_50_0_08 (T 2)	
24	<i>Lactobacillus casei</i>	Sp_3,6_MG_SpoBSA (T 1)	
26	<i>Lactobacillus casei</i>	Sp_3,6_MG_SpoBSA (T 1)	
27	<i>Lactobacillus casei</i>	Sp_3,6_MG_SpoBSA (T 1)	B 893
318	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	WB 3,6_0_0_08 (T 1)	
320	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	WB 3,6_0_0_08 (T 2)	
321	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	WB 3,6_50_50_08 (T 2)	
325	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	WB 3,6_50_50_08 (T 2)	
23	<i>Pediococcus damnosus</i>	Sp_3,6_MG_SpoBSA (T 1)	
37	<i>Pediococcus damnosus</i>	Sp_3,4_MG_BSAAnAG (T 1)	
38.2	<i>Pediococcus damnosus</i>	Sp_3,4_MG_BSAAnAG (T 1)	
46.1	<i>Pediococcus damnosus</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 1)	B 862
49.2	<i>Pediococcus damnosus</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 1)	B 863
51	<i>Pediococcus damnosus</i>	Sp_3,6_MG_BSAAnAG (T 1)	
73	<i>Pediococcus damnosus</i>	Sp_3,6_MG_simAGBSA (T 2)	
76.1	<i>Pediococcus damnosus</i>	Sp_3,4_MG_spoAGBSA (T 1)	
76.2	<i>Pediococcus damnosus</i>	Sp_3,4_MG_spoAGBSA (T 1)	
200	<i>Oenococcus oeni</i>	Trollinger, Württemberg	
300	<i>Oenococcus oeni</i>	Ch BSAAnAG_08 (T 1)	
301	<i>Oenococcus oeni</i>	Ch BSAAnAG_08 (T 1)	
311	<i>Oenococcus oeni</i>	Ch Ly_08 (T 1)	B 872
316	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,6_0_50_08 (T 2)	
328	<i>Oenococcus oeni</i>	Ch BSAAnAG_08 (T 1)	B 904
334	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_50_08 (T 1)	
335	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,6_Ly_08 (T 1)	
337	<i>Oenococcus oeni</i>	Ch Ly_08 (T 1)	

<sup>a</sup> Bezeichnungen siehe Tabelle 2.2, Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4; T = Tank.

<sup>b</sup> Stammbezeichnung in der Kulturensammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz.

Tabelle 2.6: Herkunft der Eigenisolate aus den Versuchsweißen (Fortsetzung).

Stamm	Spezies	Herkunft <sup>a</sup>	IMW <sup>b</sup>
343	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_0_08 (T 1)	
346	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,6_50_50_08 (T 2)	
349	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_Ly_08 (T 1)	
350	<i>Oenococcus oeni</i>	Ch Ly_08 (T 2)	B 905
351	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_Ly_08 (T 2)	
352	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_Ly_08 (T 2)	
353	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,6_0_0_08 (T 1)	B 906
354	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,6_50_0_08 (T 2)	B 907
355	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_50_08 (T 2)	B 888
356	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,6_50_Ly_08 (T 2)	
357	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_50_0_08 (T 1)	
358	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_Ly_08 (T 1)	
359	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_Ly_08 (T 1)	
360	<i>Oenococcus oeni</i>	Ch BSAAnAG_08 (T 1)	
361	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_Ly_08 (T 2)	
362	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,6_50_0_08 (T1)	
363	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_Ly_08 (T 2)	
364	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,6_50_0_08 (T2)	B 908
366	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,6_0_0_08 (T2)	
367	<i>Oenococcus oeni</i>	Ch Ly_08 (T1)	
368	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,6_0_0_08 (T1)	
369	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_Ly_08 (T 1)	
370	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_Ly_08 (T 1)	
371	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_Ly_08 (T 1)	
372	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_0_Ly_08 (T 2)	
373	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_50_0_08 (T 1)	
374	<i>Oenococcus oeni</i>	WB 3,4_50_0_08 (T 2)	B 901
402	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	B 883
411	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	B 909
412	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	

<sup>a</sup> Bezeichnungen siehe Tabelle 2.2, Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4; T = Tank.

<sup>b</sup> Stammbezeichnung in der Kulturensammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz.

Tabelle 2.6: Herkunft der Eigenisolate aus den Versuchsweinen (Fortsetzung).

Stamm	Spezies	Herkunft <sup>a</sup>	IMW <sup>b</sup>
414	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	B 889
415	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	B 881
416	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	
420	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	
423	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	B 883
424	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	B 910
425	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	B 890
426	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	B 891
427	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	B 884
428	<i>Oenococcus oeni</i>	Weißburgunder, Pfalz	B 892
408	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Weißburgunder, Pfalz	B 880
9	<i>Acetobacter oeni</i>	Sp_3,4_MG_spoBSA (T 1)	
13	<i>Acetobacter tropicalis</i>	Sp_3,4_MG_spoBSA (T 1)	B 799
64.2	<i>Acetobacter tropicalis</i>	Sp_3,4_MG_simAGBSA (T 1)	B 800
106.2	<i>Acetobacter tropicalis</i>	Sp_3,6_MG_spoAGBSA (T 2)	B 813
133.1	<i>Staphylococcus condimentii</i>	WB 3,4_0_0_08 (T 1)	
133.2	<i>Staphylococcus condimentii</i>	WB 3,4_0_0_08 (T 1)	
109.1	<i>Staphylococcus captitis</i>	Sp_3,6_MG_spoAGBSA (T 2)	
109.2	<i>Staphylococcus captitis</i>	Sp_3,6_MG_spoAGBSA (T 2)	
202	<i>Staphylococcus captitis</i>	Spätburgunder, Pfalz	B 871
65.1	<i>Staphylococcus captitis</i>	Sp_3,4_MG_simAGBSA (T 2)	
98.2	<i>Staphylococcus captitis</i>	Sp_3,6_MG_spoAGBSA (T 2)	
305	<i>Staphylococcus captitis</i>	Ch SpoBSA_08 (T 1)	
306	<i>Staphylococcus captitis</i>	Ch SpoBSA_08 (T 1)	
309	<i>Staphylococcus epidermitis</i>	Ch Ly_08 (T 1)	

<sup>a</sup> Bezeichnungen siehe Tabelle 2.2, Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4; T = Tank.

<sup>b</sup> Stammbezeichnung in der Kulturensammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz.

## 2.8 Kulturmedien und Puffer

Falls nicht anders angegeben, beziehen sich die Mengen- und Volumenangaben auf einen Liter eH<sub>2</sub>O. Der pH-Wert wurde in der Regel mit 1 N HCl bzw. 1 N NaOH eingestellt. Die Sterilisation der Medien und Puffer erfolgte durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C. Zur Herstellung von Nährböden wurden den Medien 1,5 % Agar zugegeben.

### Phosphatpuffer I (100 mM, pH 5,9)

Komponente	Menge [g]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12,25 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,58 g/l

### Phosphatpuffer II (100 mM, pH 6,8)

0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung wurde mittels 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt.

### Spurenelementlösung I

Komponente	Menge [g]
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,0
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,0
MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,0
CaCl <sub>2</sub>	1,0

### Spurenelementlösung II

Komponente	Menge [g] <sup>a</sup>
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,15
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,11
MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,79
CuSO <sub>4</sub>	0,64

<sup>a</sup> Angaben pro 100 ml

MRS-Medium zur Anzucht von Milchsäurebakterien (DSMZ 11 modifiziert, pH 6,2)

<b>Komponente</b>	<b>Menge [g]</b>
Glucose	20
Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	10
Natriumacetat	5,0
Hefeextrakt	5,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -Citrat	2,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
Fleischextrakt	2,0
Tween 80	1,0
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,05

Zur Hemmung des Hefewachstums wurde dem Medium nach Bedarf 670 mg/L Kaliumsorbat und 20 mg/l Cycloheximid zugegeben.

Tomatensaftmedium (TJM) zur Anzucht von Oenokokken (DSMZ 59 modifiziert, pH 5,5)

<b>Komponente</b>	<b>Menge [g]</b>
Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	20,0
Pepton aus Fleisch	5,0
Glucose	5,0
Hefeextrakt	5,0
Di-Ammoniumhydrogencitrat	3,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
Tween 80	1,0
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,05
Zentrifugierter Tomatensaft	250 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Angabe in ml

Zur Hemmung des Hefewachstums wurde dem Medium nach Bedarf 670 mg/L Kaliumsorbat und 20 mg/l Cycloheximid zugegeben.

GYM-Medium zur Anzucht von Streptomycten (DSMZ 65, pH 7,2)

<b>Komponente</b>	<b>Menge [g]</b>
Malzextrakt	10,0
Hefeextrakt	4,0
Glucose	4,0
CaCO <sub>3</sub>	2,0

Zur DNA-Isolierung aus Streptomycten wurde das Medium mit 5 g/l Glycin versetzt.

TSB-Medium zur Anzucht von Streptomycten (DSM 545, pH 7,3)

<b>Komponente</b>	<b>Menge [g]</b>
Pepton aus Casein	15,0
Pepton aus Soyamehl	3,0
Glucose	2,5
NaCl	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5

Das Medium wurde als Fertigmedium von der Firma BD Difco™, Franklin Lakes, USA bezogen. Zur DNA-Isolierung aus Streptomycten wurde das Medium mit 5 g/l Glycin versetzt.

NMMP-Medium (Hopwood *et al.*, 1985) zur Enzymproduktion der Streptomycten

<b>Komponente</b>	<b>Menge [g]</b>
Glycerin	40,0
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	6,25
Casaminsäure	2,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5
Spurenelementlösung I	1,25 <sup>a</sup>
Phosphatpuffer II	18,75 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Angaben in ml



Gluconobacter-Medium zur Anzucht der Essigäurebakterien (DSMZ 105, pH 6,8)

<b>Komponente</b>	<b>Menge [g]</b>
Glucose	100
Hefeextrakt	10
CaCO <sub>3</sub>	20

AAB-Medium zur Anzucht von Essigsäurebakterien (DSMZ 989, pH 6,6 - 7,0)

<b>Komponente</b>	<b>Menge [g]</b>
Pepton aus Fleisch (tryptisch verdaut)	5,0
Hefeextrakt	5,0
Glucose	5,0
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,0

GYP-Medium zur Anzucht von Hefen (DSMZ 852 modifiziert, pH 6,8)

<b>Komponente</b>	<b>Menge [g]</b>
Glucose	20,0
Pepton aus Fleisch (tryptisch verdaut)	10,0
Hefeextrakt	5,0

Glucose-Pepton-Medium zur Anzucht von *Brettanomyces* (DSMZ 85, pH 6,8)

<b>Komponente</b>	<b>Menge [g]</b>
Glucose	10
Pepton aus Fleisch (tryptisch verdaut)	20
Hefeextrakt	10
CaCO <sub>3</sub>	10

## 2.9 Kultivierung und Lagerung der Mikroorganismen

Die verwendeten Milchsäurebakterien wurden nach Beimpfung mit 1 % Inokulum bei 30 °C als Standkulturen bis zur gewünschten optischen Dichte bei 600 nm kultiviert. Bakterien der Art *Oenococcus oeni* wurden zusätzlich in Tomatensaft-Medium (siehe Kapitel 2.8) angezogen. Essigsäurebakterien und Hefen wurden schüttelnd in den jeweiligen Medien kultiviert. Dies geschah ebenfalls bei 30 °C. Die Streptomyceten wurden sowohl in Schüttel- als auch in Standkulturen gehalten (Inkubation bei 30 °C).

Zur Lagerung wurden die Kulturen mit Hilfe einer Impföse auf Schrägagar oder Agarplatten überführt und nach der Kultivierung bei 4 °C gelagert. Zudem wurden die Kulturen in Medium, versetzt mit 20 % Glycerin (v/v), aufgenommen und bei -20 °C eingefroren.

## 2.10 Isolierung von Mikroorganismen aus Versuchsweinen

Zur Isolierung von Mikroorganismen wurden insgesamt 54 Versuchsweine des DLR Neustadt untersucht. Das Augenmerk bei der Isolierung lag auf Vertretern der Ordnung *Lactobacillales*, da sie als Hauptverantwortliche für die Bildung von biogenen Aminen im Most und Wein bekannt sind. Hierzu wurden zwei verschiedene Kulturmedien gewählt. Für die Isolierung aller Milchsäurebakterien (MSB) wurde MRS-Medium, versetzt mit Cycloheximid und Kaliumsorbat, verwendet. Tomatensaft-Medium (ebenfalls mit Cycloheximid und Kaliumsorbat) diente der gezielten Isolierung von *Oenococcus oeni*. Die Zugabe von Cycloheximid und Kaliumsorbat sollte ein mögliches Wachstum von Hefen hemmen.

Für die Isolierung von Bakterien aus Versuchsweinen wurden 1,0 ml Versuchswein sowie etwaige Verdünnungen mit 15 ml flüssigem Kulturmedium versetzt und steril in Petrischalen gegossen. Diese wurden anschließend bei 30 °C inkubiert. Gewachsene Bakterienkolonien wurden in Flüssig-Medien überführt oder auf Agar-Platten weiter vereinzelt. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen bei 30 °C bis zur gewünschten optischen Dichte bei 600 nm. Die Überprüfung der Reinheit der Eigenisolate erfolgte mittels Phasenkontrast-Mikroskopie.

## 2.11 Identifizierung von Mikroorganismen

Die Identifizierung von Mikroorganismen ist eine wichtige Voraussetzung, um gezielt auf ein Auftreten einer bestimmten Art im Most und Wein reagieren zu können. Ebenfalls sollte durch die Identifizierung der isolierten Bakterienstämme ein Überblick über das momentane Vorkommen in Most und Wein gewonnen werden. Dies galt auch hinsichtlich der Frage nach potentiellen Bildnern biogener Amine.

Zur Identifizierung der Eigenisolate wurden verschiedene Strategien angewandt. Die Sequenzierung der 16S rDNA bedingt ebenso wie die specifically polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) das Vorhandensein von Reinkulturen, während die Multiplex-PCR eine Identifizierung einzelner Bakterienarten in Mischkulturen zulässt.

### 2.11.1 Isolierung der Gesamt-DNA

Die Isolierung der Gesamt-DNA von Bakterien erfolgte mit Hilfe des QIAgen Blood and Tissue Kits (QIAgen, Hilden) nach Angaben des Herstellers nach dem Protokoll für „gram-positive bacteria“ mit folgenden Modifikationen: Behandlung der Zellen mit Lysozym für 2 h bei 37 °C, Behandlung der Zellen mit Proteinase K für 30 min bei 72 °C.

Zur DNA-Isolierung aus Hefen wurde ebenfalls das QIAgen Blood and Tissue Kits (QIAgen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.11.2 Polymerasekettenreaktion der 16S rDNA/ITS-Region

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt eines der wichtigsten molekularbiologischen Werkzeuge dar, mit dessen Hilfe man gezielt bestimmte DNA-Regionen amplifizieren kann. Zur Identifizierung von Bakterien dient die 16S rDNA als phylogenetischer Marker. Gleiches gilt für die ITS-Region bei Hefen. Tabelle 2.7 gibt die Reaktionsansätze für die jeweilige PCR für Bakterien und Hefen wieder.

**Tabelle 2.7: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur 16S rDNA-PCR/ITS-PCR.**

Komponente	Volumen [µl]
dNTPs	2,0
Primer 1 (BSF8 <sup>a</sup> /ITS1 <sup>b</sup> )	1,5
Primer 2 (BSR1541 <sup>a</sup> /ITS5 <sup>b</sup> )	1,5
MgCl <sub>2</sub>	2,0
Reaktionpuffer	5,0
Template-DNA (20 ng / µl)	2,0
PCR-Wasser	34,0
Taq Polymerase	2,0

<sup>a</sup> Primer für 16S rDNA

<sup>b</sup> Primer für ITS-Region

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (Biorad, München oder Eppendorff, Hamburg) unter Verwendung des in Tabelle 2.8 angegebenen PCR-Programmes.

**Tabelle 2.8: Thermocycler-Programm zur Amplifizierung der 16S rDNA bzw. ITS-Region.**

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit
1	Initial-Denaturierung	95	5 min
2	Denaturierung	94	1 min
3	Annealing	55	1 min
4	Elongation	72	1,5 min
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72	10 min

### 2.11.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte von Bestandteilen des Reaktionsansatzes, die weitere Analyseschritte stören könnten, zu befreien, wurde diese aufgereinigt. Dies erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purifikation Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde anschließend in 50 µl ultrareinem Wasser aufgenommen.

### 2.11.4 Agarosegelelektrophorese

Nach der PCR erfolgte die Untersuchung der Amplifikate durch elektrophoretische Trennung in einem 1,5 %-igen Agarosegel (in 1 x TBE, siehe Tabelle 2.9).

**Tabelle 2.9: Zusammensetzung 10 x TBE.**

Komponente	Menge [g]
Tris	108
Borsäure	55
Na <sub>2</sub> -EDTA	70

Zur schärferen Auftrennung der DNA-Banden wurden die Agarosegele mit 1 % Natronwasserglas (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, 35 % v/v) versetzt. Zur Analyse der PCR-Produkte wurde 5 µl Probe mit 1 µl Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei konstanter Spannung in einer horizontalen Elektrophoresekammer durchgeführt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurden die Agarosegele nach der Elektrophorese für

30 min in einem Ethidiumbromid-Bad (0,1 % v/v in 1 x TBE) gefärbt. Die Detektion und Auswertung erfolgte unter UV-Licht mit Hilfe einer Geldokumentationseinheit.

### 2.11.5 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden zur Bestimmung ihrer Basenabfolge nach einer Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert. Dies erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersbach. Die so identifizierten DNA-Sequenzen wurden mit hinterlegten Sequenzen in Datenbanken ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) und [www.eztaxon.org](http://www.eztaxon.org)) verglichen (BLAST-Suche). Hierdurch konnte eine Identifizierung der amplifizierten DNA-Fragmente erzielt werden.

### 2.11.6 Specifically amplified polymorphic DNA-PCR

Die specifically amplified polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) stellt eine PCR-Fingerprint-Methode dar, mit der eine Identifizierung von Bakterien auf Art-Ebene möglich ist (Fröhlich und Pfannebecker, 2007). Sie beruht auf der Amplifikation bestimmter DNA-Regionen mit Hilfe spezieller Primer, die von der *NotI*-Erkennungssequenz abgeleitet sind. So ergibt sich nach der PCR und der elektrophoretischen Auftrennung (3 h bei 65 V) der Amplifikate ein spezie-spezifisches Bandenmuster auf dem Agarose-Gel (1,5 % in 1 x TBE-Puffer).

Tabelle 2.10 gibt die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Tabelle 2.11 das SAPD-PCR Programm wieder.

**Tabelle 2.10: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die SAPD-PCR zur Identifizierung von Mikroorganismen.**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
dNTPs	1,0
SAPD-Primer	1,0
MgCl <sub>2</sub>	2,0
Reaktionspuffer	2,5
Template-DNA (20 ng / $\mu$ l)	5,0
PCR-Wasser	12,5
Taq Polymerase	1,0

**Tabelle 2.11: Thermocycler Programm zur SAPD-PCR zur Identifizierung der Eigenisolate.**

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit
1	Initial-Denaturierung	95	5 min
2	Denaturierung	94	1 min
3	Annealing	35	1 min
4	Rampe (Temperatur-Inkrement)	35 (+ 0,5) <sup>a</sup>	12 s
5	15 Zyklen beginnend bei Nr. 4		
6	Annealing	42,5	1 min
7	Rampe (Temperatur-Inkrement)	42,5 (+ 0,5) <sup>a</sup>	12 s
8	19 Zyklen beginnend bei Nr. 7		
9	Elongation	72	5 min
10	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
11	Finale Elongation	72	10 min

<sup>a</sup>Zunahme der Annealing-Temperatur bei jedem Zyklus um 1 °C

Zur Identifizierung der Isolate wurde die DNA der Typstämme der weinrelevanten Milchsäurebakterien (Tabelle 2.12) isoliert und damit eine SAPD-PCR durchgeführt. Anhand des Vergleichs der Bandenmuster der Kulturen aus den Weinproben mit denen der Referenzstämme konnte die Mehrzahl der Isolate auf Art-Ebene bestimmt werden.

**Tabelle 2.12: Typstämme der weinrelevanten Milchsäurebakterien (DSMZ<sup>a</sup>-Stämme), die als Referenz für die Identifizierung verwendet wurden.**

Art	Sammlungsnummer	IMW <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus bobalius</i>	DSM 19674	B 732
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 20054	B 737
<i>Lactobacillus buchneri</i>	DSM 20057	B 729
<i>Lactobacillus casei</i>	DSM 20011	
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSM 20019	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	DSM 20074	
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	DSM 14421	B 724
<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 20052	B 730
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	DSM 20203	B 731
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSM 20176	B 279
<i>Lactobacillus jensenii</i>	DSM 20557	

<sup>a</sup> DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.

<sup>b</sup> Stammbezeichnung in der Kultursammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz.

**Tabelle 2.12: Typstämme der weinrelevanten Milchsäurebakterien (DSMZ<sup>a</sup>-Stämme), die als Referenz für die Identifizierung verwendet wurden (Fortsetzung).**

Art	Sammlungsnummer	IMW <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	DSM 12361	
<i>Lactobacillus mali</i>	DSM 20444	B 725
<i>Lactobacillus nagelii</i>	DSM 13675	B 723
<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSM 5622	B 726
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 20174	B 727
<i>Lactobacillus uvarum</i>	DSM 19971	B 728
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSM 20343	
<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 20252	B 139
<i>Pediococcus damnosus</i>	DSM 20331	
<i>Pediococcus parvulus</i>	DSM 20332	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20336	
<i>Weisella paramesenteroides</i>	DSM 20288	

<sup>a</sup> DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.

<sup>b</sup> Stammbezeichnung in der Kulturensammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz.

### 2.11.7 Multiplex-PCR

Eine schnelle Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen direkt aus Mischkulturen oder aus Most- und Weinproben stellt die Multiplex-PCR dar. Hierzu wurden von Petri *et al.* (2011) und Pfannebecker und Fröhlich (2008) konstruierte Primer verwendet, die artspezifisch PCR-Produkte bestimmter Größe amplifizieren. Mit Hilfe von Vergleichs-DNA bekannter Mikroorganismen ist so eine direkte Identifizierung möglich. Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm zur Multiplex-PCR sind in Tabelle 2.13 und Tabelle 2.14 zusammengefasst.

**Tabelle 2.13: Zusammensetzung des Multiplex-PCR Ansatzes.**

Komponenten	Volumen [µl]
2x Multiplex PCR Mastermix (Qiagen, Hilden)	12,5
10x Primer-Mix (2 - 3 µM je Primer)	2,5
Q-Solution	2,5
Template-DNA	1-5
PCR-Wasser	0-4

**Tabelle 2.14: Thermocycler-Programm der Multiplex-PCR.**

Nr.	Reaktionsschritte	Temperatur [°C]	Zeit
1	Initiale Denaturierung	95	15 min
2	Denaturierung	94	0,5 min
3	Annealing	69 (-1) <sup>a</sup>	3 min
4	Elongation	72	1,5 min
5	6 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Denaturierung	94	0,5 min
7	Annealing	62	3 min
8	Elongation	72	1,5 min
9	22 Zyklen beginnend bei Nr.6		
10	Finale Elongation	72	10 min

<sup>a</sup>Abnahme der Annealing-Temperatur bei jedem Zyklus um 1 °C

## 2.12 Nachweis biogener Amine

Der Nachweis der Bildung biogener Amine durch Mikroorganismen erfolgte zum einen qualitativ und zum anderen quantitativ. Eine schnelle und einfache Methode zur Detektion der Amin-Produktion war Voraussetzung für die Untersuchung einer großen Anzahl an Versuchsorganismen. Hierzu eignete sich am Besten die Dünnschichtchromatographie. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde der Amin-Gehalt einiger ausgewählter Proben ebenfalls mit Hilfe von HPLC quantifiziert.

### 2.12.1 Decarboxylase-Medium

Durch die Bildung biogener Amine durch Mikroorganismen kommt es zu einer Alkalisierung des Mediums. Dieser Vorgang kann durch die Zugabe eines pH-Indikators zum Medium sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde ein Decarboxylase-Medium (DC-Medium, Bover-Cid und Holzappel, 1999) verwendet (Tabelle 2.15). Durch Zugabe bestimmter Vorläufer-Aminosäuren (Histidin, Lysin, Ornithin oder Tyramin) lässt sich die Bildung bestimmter biogener Amine induzieren.



**Tabelle 2.15: Zusammensetzung des Decarboxylase-Mediums nach Bover-Cid und Holzapfel (1999).**

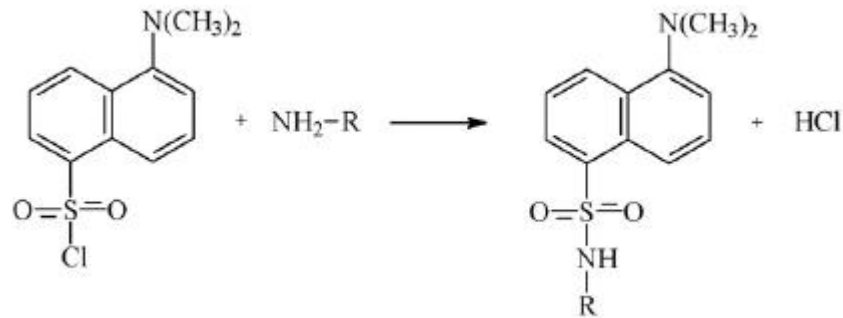
Komponente	Menge [g]
Casein aus Fleisch (tryptisch verdaut)	5,0
Hefeextrakt	5,0
Fleischextrakt	5,0
NaCl	2,5
Glucose	0,5
Tween	1,0
MgCl <sub>2</sub>	0,2
MnSO <sub>4</sub>	0,05
FeSO <sub>4</sub>	0,04
Ammonium-Citrat	2,0
Thiamin	0,01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
CaCO <sub>3</sub>	0,1
Pyridoxal-5-Phosphat	0,05
Aminosäuren <sup>a</sup>	10,0
Bromcresol-Violet	0,06
Agar	20,0

<sup>a</sup>Histidin, Lysin, Ornithin oder Tyrosin

Die Versuchorganismen wurden in den jeweiligen Medien (MRS, AAB und GYP) vorkultiviert und dann mittels einer Impföse auf DC-Medium-Platten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Durch die Bildung biogener Amine kam es zu einer Verfärbung des Mediums von grünlich gelb nach violett.

### 2.12.2 Hochauflösende Dünnschichtchromatographie

Die schnelle und qualitative Detektion der Bildung biogener Amine im Kulturüberstand von Bakterien erfolgte dünnschichtchromatographisch. Hierzu wurden hochauflösende Kieselgel-Platten (HPTLC Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt) verwendet. Zur Visualisierung der biogenen Amine mit Hilfe von UV-Licht wurden die Proben mit Dansyl-Chlorid derivatisiert. Hierbei entsteht ein Derivat der biogenen Amine, welches unter UV-Licht detektiert werden kann. Abbildung 2.1 stellt die Reaktion der Derivatisierung schematisch dar.



**Abbildung 2.1: Derivatisierung von Aminen mittels Dansyl-Chlorid (Aus: Hernández-Borges et al., 2007).**

Durch Zentrifugation (10 min bei 13000 x g) und Sterilfiltration der Bakteriensuspensionen wurde zellfreier Kulturüberstand gewonnen. 200 µl dieses Überstandes wurden mit 200 µl einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Zur Derivatisierung wurde dem Gemisch 400 µl einer Dansyl-Chlorid-Lösung (5 mg/ml in Aceton) zugegeben und nach gründlichem Mischen über Nacht dunkel und bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Erhöhung der Inkubationstemperatur konnte die Derivatisierungsdauer auf 2 h minimiert werden.

Nach der Inkubation wurde den Proben 100 µl einer wässrigen Prolin-Lösung (100 mg/ml) zugegeben. Dies diente der Entfernung überschüssigen Dansyl-Chlorids. Zur Abtrennung von weiteren störenden Substanzen wurden die Proben mit 500 µl Toluol versetzt und für 30 min bei -20 °C gefällt. Die zu untersuchenden Derivate befanden sich nun in den Lösungsmittel-Phasen, welche für anschließende Untersuchungen in neue Reaktionsgefäße überführt wurden.

Als Standards für die Detektion der biogenen Amine wurden Lösungen folgender Amine mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml hergestellt und derivatisiert: Agmatin, Cadaverin, Ethanolamin, Ethylamin, Hexylamin, Histamin, Isoamylamin, Phenylethylamin, Putrescin, Serotonin, Spermin, Spermidin, Taurin, Tryptamin und Tyramin. Durch serielle Verdünnungen konnte so die Detektionsgrenze für die untersuchten biogenen Amine ermittelt werden.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Derivate erfolgte in einer horizontalen Entwicklungskammer der Firma Camag, Muttenz, Schweiz. 5 µl der Proben wurden auf die zuvor bei 105 °C für ca. 1 h aktivierte Kieselgel 60 F<sub>254</sub>-Platte aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Wasser analog den Proben behandelt und ebenfalls aufgetragen. Zur Auftrennung der Derivate wurden verschiedene Laufmittel getestet (Tabelle 2.16).

**Tabelle 2.16: Laufmittel für den dünnschichtchromatographischen Nachweis von biogenen Aminen.**

Laufmittel	Zusammensetzung	Mischungsverhältnis [v/v/v]
LM 1	Toluol:Chloroform:Triethylamin	10:6:7
LM 2	Hexan:n-Butanol:Triethylamin	90:10:8,1
LM 3	Toluol:Methanol:Cyclohexan:Wasser	85:5:10:0,1
LM 4	Chloroform:Diethylether:Triethylamin	6:2:1

Um die Fluoreszenz-Signale der Derivate zu verstärken und zu stabilisieren wurde den Laufmitteln 1 % v/v Tween 80 zugegeben (Linares *et al.*, 1998). Nach der Durchführung der Dünnschichtchromatographie wurden die Kieselgel-Platten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend ausgewertet.

Zur Detektion der biogenen Amine wurden die Kieselgel-Platten mit UV-Licht (320 nm) angeregt. Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie wurden fotografisch festgehalten und fluoreszierende Spots wurden markiert. Anhand der Laufstrecken der Spots und der Fließmittelfront konnten  $R_f$ -Werte für die jeweiligen Derivate berechnet werden. Durch den Abgleich mit den eingesetzten Standards wurden die detektierten Spots, dem jeweiligen biogenen Amin zugeordnet.

### 2.12.3 High Performance Liquid Chromatography

Neben dem qualitativen Nachweis der Bildung biogener Amine wurde diese bei ausgewählten Stämmen mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) quantifiziert. Hierzu wurde eine HPLC-Methode nach Kaschak *et al.* (2009) mit leichten Modifikationen angewandt.

Zur Aufarbeitung der Proben und zur Entfernung ungewünschter Medienbestandteile wurde eine Festphasen-Extraktion (SPE, solid phase extraction) durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Strata<sup>®</sup>SCX Kationenaustauscher-Säule verwendet. Vor der SPE wurden 2970 µl zellfreier Kulturüberstand mit 30 µl internem Standard (Heptylamin, 0,05 mg/L) und 7 ml MilliQ-H<sub>2</sub>O vermischt. Der interne Standard diente der Konzentrationsbestimmung der anderen biogenen Amine und somit der Kalibrierung der Methode. Als Negativ-Kontrolle wurde MilliQ-H<sub>2</sub>O mitgeführt. Ein Standard aus 11 biogenen Aminen (Tabelle 2.17) wurde analog behandelt.

**Tabelle 2.17: Zusammensetzung des externen Standards für die Bestimmung biogener Amine mittels HPLC.**

Biogenes Amin	Menge [mg] <sup>a</sup>
2-Phenylethylamin	10
Cadaverin	10
Ethanolamin	1,5
Ethylamin	10
Hexylamin	10
Histamin	10
Isopentylamin	10
Putrescin	10
Serotonin	10
Tryptamin	10
Tyramin	10

<sup>a</sup> Angaben pro 100 ml

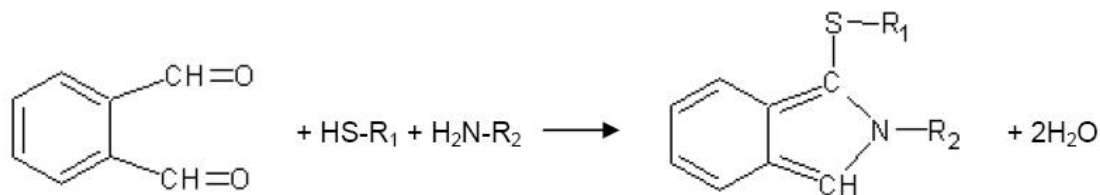
Die einzelnen Schritte der Durchführung der SPE sind in Tabelle 2.18 zusammengefasst.

**Tabelle 2.18: Durchführung der SPE mittels Strata<sup>®</sup>SCX-Kartuschen.**

SPE-Schritt	Substanz	Volumen [ml]
Equilibrieren der Säule [I]	Methanol	3,0
Equilibrieren der Säule [II]	MiliQ-H <sub>2</sub> O	3,0
Equilibrieren der Säule [III]	Na-Acetat (20 mM, pH 4.0)	15
Beladen der Säule	Probe	10
Waschen der Säule	Na-Acetat	20
Eluieren der Probe	Na-Acetat + 3 M NaCl : Methanol (1:1)	3,0 (3x1ml, trockenlaufen lassen)

Die Eluate wurde bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Überprüfung der SPE-Ausbeute wurde der Durchfluss der Probe ebenfalls aufbewahrt, falls nicht alle biogene Amine an der Säule gebunden wurden.

Die Detektion der biogenen Amine in den Eluaten erfolgte fluorometrisch. Hierzu wurde eine Vorsäulen-Derivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) durchgeführt. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 2.2 dargestellt.



**Abbildung 2.2:** Derivatisierung von Aminen mittels *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA).

Aus einer OPA-Stammlösung (Tabelle 2.19) wurde an jedem Messtag die Derivatisierungsreagenz (Tabelle 2.20) frisch angesetzt. Die Derivatisierung der Proben erfolgte automatisch im Probengeber der HPLC-Anlage. Hierbei wurden 50  $\mu$ l Probe mit 50  $\mu$ l Derivatisierungsreagenz vermischt. Nach einer Reaktionszeit von 1 min wurden 10  $\mu$ l des Derivatisierungsansatzes auf die HPLC-Säule injiziert.

**Tabelle 2.19:** Zusammensetzung der OPA-Stammlösung.

Komponente	Volumen
<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd (OPA)	100 mg
Methanol	9 ml
Boratpuffer [0,5 M; pH 10,4]	1 ml
2-Mercaptoethanol	100 $\mu$ l

**Tabelle 2.20:** Zusammensetzung der Derivatisierungsreagenz.

Komponente	Volumen
OPA-Stammlösung	100 $\mu$ l
Methanol	450 $\mu$ l
Boratpuffer [0,5 M; pH 10,4]	450 $\mu$ l
Brij-Lsg. [2,2 mM]	50 $\mu$ l

Für die Trennung der biogenen Amine wurde ein binäres Puffersystem verwendet. Bei Puffer A handelte es sich um Phosphatpuffer pH 6,0 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} = 5,93 \text{ g/l}$ ;  $\text{KH}_2\text{HPO}_4 = 2,27 \text{ g/l}$ ; pH-Wert eingestellt mit konz.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) bei Puffer B um 100 % Methanol. Beide Puffer wurden vor Gebrauch für 20 min entgast. Die Elution der biogenen Amin-Derivate erfolgte durch eine Gradienten-Elution von einer ODS 2-Säule (Tabelle 2.21). Die Flussrate betrug 1 ml/min bei einer Ofentemperatur von 40 °C.

**Tabelle 2.21: Binärer Elutionsgradient zur Trennung biogener Amine mittels HPLC.**

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer [B]
0	60	40
30	40	60
50	20	80
59	20	80
59	0	100
69	0	100
71	60	40
80	60	40

Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmungen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Hilfe der LC Solution Software der Firma Shimadzu, Kyoto, Japan. Hierbei wurde eine externe Kalibrierung für jedes biogene Amin durchgeführt.

### 2.13 Molekularbiologischer Nachweis der Decarboxylase-Gene

Die Hauptreaktion zur Bildung biogener Amine ist die Decarboxylierung von Aminosäuren. So entsteht Tyramin durch die Decarboxylierung von Tyrosin und Histamin durch Decarboxylierung von Histidin. Diese Reaktionen werden von dem Enzym Decarboxylase katalysiert. Durch Nachweis der entsprechenden Gene sollte gezeigt werden, dass der Versuchorganismus potentiell in der Lage ist biogene Amine zu bilden.

Nach DNA-Isolierung wurden mit Hilfe spezifischer Primer die entsprechenden Gene mittels PCR amplifiziert (Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm siehe Tabelle 2.22 und Tabelle 2.23), die PCR-Produkte überprüft, aufgereinigt und abschließend sequenziert.

**Tabelle 2.22: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifizierung der Decarboxylase-Gene.**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
dNTPs	1,0
Forward-Primer (TD 2 oder HDC3)	1,0
Reverse-Primer (TD5 oder HDC4)	1,0
MgCl <sub>2</sub>	2,0
Reaktionspuffer	2,5
Template-DNA (20 ng / $\mu$ l)	5,0
PCR-Wasser	11,5
Taq Polymerase	1,0

**Tabelle 2.23: Thermocycler-Programm zur Amplifizierung der Decarboxylase-Gene.**

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	15
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	48	1
4	Elongation	72	1,5
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72	5

Die Identifizierung der erhaltenen Sequenzen erfolgte durch Datenbank-Recherche (BLAST-Suche).

Für den gleichzeitigen Nachweis von zwei verschiedenen Decarboxylase-Genen wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt (Tabelle 2.24 und Tabelle 2.25). Durch Hinzunahme eines weiteren Primer-Paares (BSF8 und BSR 1541) konnte der untersuchte Organismus als Bakterium identifiziert werden.

**Tabelle 2.24: Zusammensetzung des Multiplex-PCR Ansatzes.**

Komponenten	Volumen [µl]
2x Multiplex PCR Mastermix (Qiagen, Hilden)	12,5
10x Primer-Mix (2-3 µM je Primer)	2,5
Template-DNA	3,5
PCR-Wasser	6,5

**Tabelle 2.25: Thermocycler-Programm der Multiplex-PCR.**

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit
1	Initial-Denaturierung	95	15 min
2	Denaturierung	95	45 s
3	Annealing	52	45 s
4	Elongation	72	75 s
5	32 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72	5 min

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, durch eine Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht und dokumentiert.

## 2.14 Proteinbiochemische Methoden

Um bestimmte Enzyme näher zu charakterisieren, wurden verschiedene proteinbiochemische Standardmethoden angewandt, die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

### 2.14.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung von Proteinen ist die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Das hierbei eingesetzte anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an das Protein und denaturiert es. Durch diese Bindung überdeckt das SDS die Eigenladung des Proteins und es kommt zu einem konstanten Masse/Ladungs-Verhältnis (Lämmli, 1970). Hierdurch ergibt sich die Situation, dass Proteine nur aufgrund ihrer Masse unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten in einem elektrischen Feld besitzen. Dies ermöglicht die Trennung einzelner Komponenten eines Proteingemisches sowie die ungefähre Abschätzung ihrer molekularen Masse anhand eines Größenstandards. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorwiegend 20 %-ige SDS-Gele benutzt, die aus einem Trenn- und einem Sammelgel bestanden. Zur Herstellung des Trenngels wurden 0,3 ml eH<sub>2</sub>O, 1,51 ml Trenngelpuffer (1 M Tris-HCl, pH 8,8) und 2,0 ml einer 40 %-igen Acrylamid-Lösung vermischt. Es wurden 40 µl einer 10 %-igen SDS-Lösung, 32 µl einer 10 %-igen Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) und 3,3 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin) hinzugefügt. Diese Mischung wurde in die dafür vorgesehenen Gelkassetten gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach einer Polymerisationsdauer von ca. 30 min wurde das Wasser entfernt und das Trenngel mit einem Sammelgel, hergestellt aus 1,23 ml eH<sub>2</sub>O, 0,21 ml Sammelgelpuffer (1 M Tris-HCl, pH 6,8), 0,21 ml Acrylamid-Lösung, 16,67 µl einer 10 %-igen SDS-Lösung, 1,7 µl TEMED und 16,7 µl einer 10 %-igen APS-Lösung, überschichtet, in welches dann der Probenkamm eingeführt wurde. Falls nicht sofort benötigt, wurden die SDS-Gele bis zu ihrem Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele in den mit Kammerpuffer (Tabelle 2.26) gefüllten Gelkammern befestigt. Die Proben (22,5 µl) wurden mit 7,5 µl Probenpuffer (Rotiload 1) versetzt und für 5 min bei 65 °C erhitzt. Anschließend wurden die Lösungen in die Probenaschen des SDS-Geles pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 60-100 V für ca. 2 h durchgeführt.



**Tabelle 2.26: Zusammensetzung des Kammerpuffers zur SDS-PAGE.**

Komponenten	Menge [g]
TRIS	3,0
Glycin	14,4
10-%ige SDS-Lösung	10,0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Angabe in ml

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus den Glasplatten genommen, ca. 5 min in eH<sub>2</sub>O gewaschen, um überschüssigen Kammerpuffer zu entfernen, und dann je nach Bedarf gefärbt.

### 2.14.2 Proteinfärbung mittels Coomassie

Eine Methode zur Visualisierung von Proteinen ist die Coomassie Färbung. Hierzu wurde das Gel nach der Elektrophorese für 20 min in die Proteinfärbelösung (Tabelle 2.27) gelegt und anschließend in der Entfärbelösung (Tabelle 2.28) entwickelt. Die Lagerung der gefärbten Gele fand in 10 %-iger Essigsäure statt.

**Tabelle 2.27: Zusammensetzung der Proteinfärbelösung.**

Komponenten	Volumen [ml]
Ethanol	500
Essigsäure	100
Coomassie Brilliant Blue R250	500 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Angabe in mg

**Tabelle 2.28: Zusammensetzung der Entfärbelösung.**

Komponenten	Volumen [ml]
Ethanol	100
Essigsäure	70

### 2.14.3 Proteinfärbung mittels Silberfärbung

Um kleinere Proteinmengen in einem SDS-Gel nachweisen zu können, wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Sie ist ungefähr 100 Mal sensitiver als die Coomassie Färbung. Hierzu wurde der „Silver-Staining“-Kit der Firma Fermentas genutzt. Nach der Fixierung der Proteine mittels Ethanol und Essigsäure können die Proteine nicht mehr aus dem Gel diffundieren. Zur Färbung der Proteine wird eine Silbernitratlösung hinzugegeben, hierbei binden die Silberionen an das Protein. Diese Silberionen werden durch die Zugabe von alkalischem Formaldehyd (Bestandteil der Entwicklerlösung) zu elementarem Silber reduziert, was in einer Schwarzfärbung der Banden resultiert. Die Silberfärbung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Nachweisgrenze der Methode wurde 0,1 ng pro Bande angegeben.

### 2.15 Identifizierung und Charakterisierung von *Streptomyces* sp. B 578

Für eine eindeutige Identifizierung von *Streptomyces* sp. B 578 wurde die Komplet-Sequenz der 16S rDNA ermittelt. Durch Datenbank-Recherche wurden neue Primer entwickelt, mit denen Anfangs- und Endbereiche dieser Gene ermittelt werden konnten. Zusammen mit Universal-Primern für die 16S rDNA (BSF8/BSR1541) wurde die Komplet-Sequenz ermittelt. Der PCR-Ansatz sowie das Thermocycler-Programm waren analog zu denen der 16S rDNA-PCR (siehe 2.11.2, Tabelle 2.7 und Tabelle 2.8). In Abbildung 2.3 sind die Bindungsstellen der verwendeten Primer dargestellt.

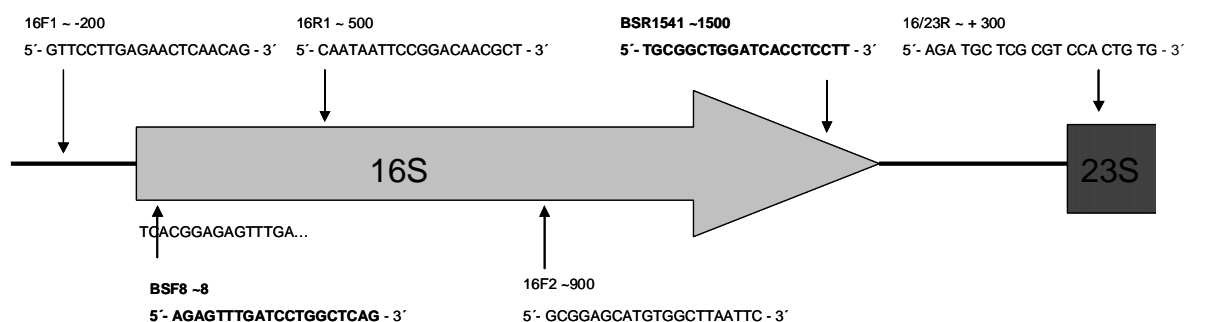


Abbildung 2.3: Bindungsstellen der Primer zur Sequenzierung der 16S rDNA.

Nach der Amplifikation der DNA-Bereiche wurden die erhaltenen PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und überprüft. Es folgte die Aufreinigung und Sequenzierung positiver Proben. Durch Zusammenfügen der Sequenzen der einzelnen Teilabschnitte konnte die Komplet-Sequenz der 16S rDNA ermittelt werden. Mit dieser Sequenz wurde

eine Datenbank-Recherche durchgeführt ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) und [www.eztaxon.org](http://www.eztaxon.org)). Anhand dieser Ergebnisse wurde eine Stammbaumanalyse durchgeführt (ClustalW, <http://www.ebi.ac.uk>). Als Referenzen dienten die Komplet-Sequenzen anderer nah verwandter Streptomyceten, welche ebenfalls nach der oben beschriebenen Methode ermittelt wurden.

Die genetische Identifizierung wurde durch die Bestimmung der verwertbaren C-Quellen physiologisch überprüft. Hierzu wurde *Streptomyces* sp. B 578 auf einem Mangelmedium (Tabelle 2.29, Shirling und Gottlieb, 1966) mit nur einer C-Quelle kultiviert.

**Tabelle 2.29: Zusammensetzung des Basalmediums zur Bestimmung der verwertbaren Kohlenstoff-Quellen.**

Komponente	Menge [g]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,64
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,38
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,65
MgSO <sub>4</sub>	1,00
Spurenelementlösung II	1,00 <sup>a</sup>
Agar	15,0

<sup>a</sup> Angabe in ml

Jedes Medium wurde mit 10 % (v/v) einer 10 %-igen (w/v) C-Quellen-Stammlösung versetzt. Als C-Quellen wurden folgende Substanzen verwendet: Adonitol, Cellulose, Cystein, D-Fructose, Galaktose, D-Glucose, Glycerin, D-Lactose, D-Xylose, Maltose, D-Mannitol, Mannose, I-Inositol, Propionat, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Saccharose und Stärke.

Zur Kultivierung wurden die Zellen mit Hilfe einer Impföse auf Schrägagar-Röhrchen ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Als Referenzstämme wurden der Typstamm von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455<sup>T</sup> sowie ein weiterer DSMZ-Stamm, DSM 40233, mitgeführt. Die Verwertbarkeit der C-Quelle wurde als Wachstum makroskopisch bestimmt.

## 2.16 Produktion und Anreicherung lytischer Enzyme von Streptomyceten

Bakterien der Gattung *Streptomyces* sind bekannt für die Bildung bakteriolytischer Agenzien. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden durch verschiedene Kultivierungs-Methoden lytische Exoenzyme produziert, welche dann für weitere Versuche angereichert und gereinigt wurden. Als Produzent für diese Enzyme wurde *Streptomyces albidoflavus* B 578 verwendet.

### **2.16.1 Produktion im Labormaßstab**

Zur Produktion lytischer Enzyme durch *Streptomyces albidoflavus* B 578 wurde dieser in einem Produktions-Medium nach Hopwood *et al.* (1985; NMMP-Medium) für 6 d bei 30 °C schüttelnd kultiviert (500 ml Kultur in 2000 ml Schikane-Kolben). Nach der Kultivierung wurden die Zellen mittels Zentrifugation (30 min, 13000 x g) vom Kulturüberstand getrennt und dieser für weitere Versuche bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.16.2 Produktion im halbtechnischen Maßstab**

Für die Produktion größerer Mengen an Kulturüberstand wurden mehrere Fermenter-Ansätze zu je 20 l durchgeführt. Die Beimpfung des Mediums (NMMP-Medium) erfolgte durch 1 l Vorkultur. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und O<sub>2</sub>-Zufuhr in einem Pilotfermenter der Firma Bioengineering, Wald, Schweiz. Nach ihrem Wachstum wurden die Zellen mit Hilfe einer Durchlauf-Zentrifuge vom Kulturüberstand getrennt und dieser wurde weiter verarbeitet.

### **2.16.3 Anreicherung der Kulturüberstände**

Zur Erhöhung der Enzymkonzentrationen und um die Kulturüberstände von unerwünschten Stoffen zu reinigen, wurden die Proben mit Hilfe verschiedener Methoden angereichert.

Um die Kulturüberstände von niedermolekularen Verbindungen zu befreien, wurden diese durch Dialyse gegen eH<sub>2</sub>O oder Puffer entfernt. Dies geschah mit Hilfe von Dialyseschläuchen (Ausschlussgröße 3,5 kDa) bei 4 °C für 36 bis 48 h. Hierdurch war auch eine Konzentrierung der Proteine größer 3,5 kDa möglich.

Eine Methode zur Anreicherung von Proteinen in größeren Kulturvolumina stellt die Ultrafiltration dar. Hierbei wurde zellfreier Kulturüberstand mit Rührzellen unterschiedlicher Volumina (bis zu 350 ml) der Firma Amicon unter langsamem Rühren in Stickstoffatmosphäre bei 2 bar Druck und 4 °C über eine Omega<sup>TM</sup>-Polyethersulfon-Ultrafiltrations-Membran konzentriert. Die nominale Ausschlussgrenze der Membran betrug 3,0 kDa. Das gewonnene Konzentrat wurde anschließend gegen das gewünschte Medium dialysiert. Zur Ultrafiltration kleinerer Volumina (0,4 bis 15,0 ml) wurden Vivaspin-Columns (Ausschlussgrenze 5,0 kDa) oder Microcons (Ausschlussgrenze 3,0 kDa) gemäß Hersteller-Anweisung verwendet. Die Proben konnten anschließend bei Bedarf in den gleichen Konzentrationsgefäßen dialysiert oder umgepuffert werden. Die Cross-Flow-Methode wurde angewandt, um den Kulturüberstand der Fermenteransätze einzuengen. Die Ausschlussgröße der benutzten Kartuschen lag bei 5 kDa. Die so gewonnenen Enzymkonzentrate wurden für weitere Untersuchungen bei 4 °C gelagert.

#### **2.16.4 Bestimmung des Proteingehalts**

Zur Quantifizierung des Proteingehaltes im Kulturüberstand wurde ein Kit (BC-Assay) der Firma Uptima, Frankreich, benutzt. Es handelt sich hierbei um eine kolorimetrische Methode, die auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ - zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen durch Peptidbindungen und Aminosäureseitenketten (Cystein, Tyrosin, Tryptophan) beruht. Diese  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen werden mit hoher Spezifität von dem Chelatbildner Bicinchoninsäure (BCA) gebunden, was in der Bildung eines purpurfarbenen Komplexes resultiert, welcher photometrisch bei 562 nm nachgewiesen werden kann.

Die Durchführung des BC-Assays wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zur Bestimmung der Konzentration der einzelnen Proben wurde eine Kalibrierungskurve mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (von 50  $\mu\text{g}$  bis 2,0 mg/ml) erstellt, anhand derer die Konzentration der Probe errechnet werden konnte.

#### **2.17 Nachweis lytischer Aktivität in den Kulturüberständen**

Der Nachweis bakteriolytischer Aktivität von Kulturüberständen und gereinigten Enzymlösungen erfolgte photometrisch. Hierzu wurde als Testorganismus *Lactobacillus brevis* B 190 gewählt, da dieser sowohl Histamin als auch Tyramin bildet und somit einen potentiellen Produzent biogener Amine im Wein darstellt.

Die Zellyse wurde standardmäßig bei 600 nm im Photometer gemessen (Ohbuchi *et al.*, 2001). Der Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt: Gefriergetrocknete oder lebende Zellen wurden in 10 mM Phosphatpuffer I gelöst und die optische Dichte dieser Suspension auf ca. 0,7 eingestellt. Zur Bestimmung der lytischen Aktivität wurden 1950  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension mit 50  $\mu\text{l}$  des Kulturüberstandes bzw. der Proteinproben versetzt und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente  $\text{eH}_2\text{O}$ , als Positiv-Kontrolle Lysozym (Konzentration: 1,0 mg/l). Die Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm der Probe im Vergleich zur Negativ-Kontrolle wurde als %-Zellyse berechnet.

Um größere Mengen an Proben zu messen, wurden die Reaktionsansätze teilweise in kleineren Volumina (195  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension + 5  $\mu\text{l}$  Enzymlösung/Kulturüberstand) angefertigt und in Mikrotiter-Platten bei 578 nm gemessen.

#### **2.18 Reinigung der lytischen Enzyme**

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es gereinigte Enzyme zu erhalten, welche anschließend näher charakterisiert werden sollten. Hierzu wurden verschiedene Chromatographie-Verfahren angewandt.

### 2.18.1 Fast Performance Liquid Chromatography

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) handelte es sich um eine Ionenaustauscherchromatographie. Sie beruht auf Wechselwirkungen der Probe mit dem Säulenmaterial. Es wurde eine Kationenaustauschersäule (MonoS™ HR 5/5, Biotech Pharmacia, geladene Gruppe:  $-\text{CH}_2-\text{SO}_3$ ) verwendet, welche eine Auftrennung von Proteinen nach Ladung ermöglichte. Hierzu wurde ein Citratpuffer pH 4,0 (Puffer A: Zitronensäure = 2,35 g/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  = 2,82 g/l; Puffer B = Puffer A + 1 M NaCl) genutzt. Die eingesetzte Probe wurde gegen den entsprechenden FPLC-Puffer mittels Dialyseschlauch oder Ultrafiltration dialysiert. Der niedrige pH-Wert der Probe wurde zur besseren Bindung der Proteine an das Säulenmaterial gewählt. Die dialysierte Probe wurde auf die Säule gegeben und mittels eines NaCl-Gradienten, der in Tabelle 2.30 dargestellt ist, chromatographisch aufgetrennt. Das eingesetzte Probenvolumen war abhängig von der Proteinkonzentration der Probe und betrug zwischen 0,5 und 2 ml.

**Tabelle 2.30: FPLC-Programm zur Reinigung der lytischen Enzyme.**

Zeit [min]	Konzentration NaCl [M]	Konzentration Puffer B [%]
0	0	0
6	0	0
36	1,0	100
41	1,0	100
41	0	0
48	0	0

(pH 4,0, Flussrate: 1 ml/min, Papiervorschub: 0,5 cm/min)

Die eluierten Proteine wurden mit Hilfe eines UV-Detektors bei 280 nm nachgewiesen und in Fraktionen zu je 1,0 ml gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit untersucht sowie auf ihre lytische Aktivität hin überprüft.

### 2.18.2 Gel-Permeations-Chromatographie

Alternativ zur SDS-PAGE stellt die Gel-Permeations-Chromatographie (Gelfiltration) eine weitere Methode zur Größenbestimmung von Proteinen dar. Hierbei wird eine Proteinprobe (200  $\mu\text{l}$ ) auf eine Säule (hier Sephadex® G-75) gegeben und mittels eines Elutionspuffers eluiert (Tabelle 2.31). Das Säulenmaterial besteht aus Partikeln bestimmten Durchmessers und Porengröße. Je nach Größe kann ein Protein in die Poren eindringen und wird dabei zurückgehalten, oder es kann sich nur zwischen den Partikel bewegen. Dementsprechend eluieren größere Proteine schneller als kleine. Anhand verschiedener Referenz-Proteine von

bestimmter Größe und Retentionszeit kann man die Größe der Proteine berechnen. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 1 ml gesammelt und die Proteine mit einem UV-Detektor bei 280 nm gemessen.

**Tabelle 2.31: Zusammensetzung des Elutionspuffers für die Gelfiltration.**

Komponente	Menge [g]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,32
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,45
NaCl	5,84
MgCl <sub>2</sub>	0,38

Durch die Trennung einzelner Proteine aufgrund ihrer Größe stellt die Gelfiltration ebenfalls eine Methode zur Reinigung von Enzymen dar. Einzelne Fraktionen wurden anschließend auf ihre lytische Aktivität hin untersucht.

## 2.19 Charakterisierung der lytischen Enzyme

Nach der Reinigung der lytischen Enzyme erfolgte die Charakterisierung. Hierzu wurden einige Parameter wie Größe, isoelektrischer Punkt und Art der Enzym-Aktivität untersucht.

### 2.19.1 Größenbestimmung mittels SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde gemäß Kapitel 2.14.1 durchgeführt. Die Bestimmung der Größe, d.h. des Molekulargewichts der Probe erfolgte durch die Kalibrierung der Laufstrecke auf die im Proteinmarker befindlichen Referenz-Proteine. So konnte durch die Eintragung der Laufstrecke des unbekanntes Proteins in die Eichgerade das Molekulargewicht berechnet werden.

### 2.19.2 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) bietet die Möglichkeit Proteine gemäß ihres isoelektrischen Punktes (pI) aufzutrennen (Awdeh *et al.*, 1968). Der pI ist für jedes Protein typisch und stellt den pH-Wert dar, an dem es keine Nettoladung aufweist, d.h. die Anzahl positiver und negativer Ladungen seiner Aminosäuren gleich sind. Bei der IEF wird mittels niedermolekularer Ampholyte ein pH-Gradient erstellt. In einem elektrischen Feld wandern zwitterionische Proteine zu dem pH-Wert, der ihrem spezifischen pI entspricht.

Die IEF-Elektrophoreseeinheit wurde auf 5 °C vorgekühlt. Anschließend wurde das IEF-Gel aufgelegt, die Elektrodendochte in Anoden- bzw. Kathodenflüssigkeit getränkt und auf das Gel aufgelegt. Da von einem Protein mit leicht alkalischem pI ausgegangen wurde, wurde der Applikatorstreifen zur Kathode versetzt platziert. Mit Hilfe eines Netzgerätes wurde eine Spannung von 2000 V (5 mA, 1 W) aufgebaut. Bei Erreichen dieser Endspannung, wurden 8 µl der entsalzten Proteinlösung pro Tasche aufgetragen sowie 1 µl eines Proteinstandards. Die Dauer der IEF betrug ca. 3 h.

Nach Beendigung der IEF wurde das Gel für 20 min in der Fixierlösung (20 % Trichloressigsäure) inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation von ca. 1 min in der Entfärbelösung (20 ml konz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l eH<sub>2</sub>O). Zur Färbung des IEF-Gels wurden ein Teil Stammlösung I (2 g Serva Violett 17-Pulver in 1 l eH<sub>2</sub>O) mit einem Teil Stammlösung II (70 ml konz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in 500 ml eH<sub>2</sub>O) vermischt und das Gel darin für 20 min gefärbt. Das Gel wurde danach dreimal 10 min mit Entfärbelösung entfärbt, zweimal 10 min mit eH<sub>2</sub>O neutralisiert und anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Alternativ wurde eine Silberfärbung gemäß Kapitel 2.14.3 durchgeführt.

### 2.19.3 Nachweis der Enzym-Aktivitäten

Um die gereinigten Enzyme näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Enzym-Aktivitäten untersucht. Da davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei den Exoenzymen um Muramidasen und/oder Proteasen handelt, wurden hierfür zwei Test-Verfahren angewandt.

Zur Bestimmung der Protease-Aktivität wurde der Azocasein-Test durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen unspezifischen Nachweis des Abbaus von Proteinen. Durch den Abbau von Azocasein durch Proteasen kommt es zur Abspaltung von kleinen azofarbstoffmarkierten Peptiden, die säurelöslich sind und dadurch nach Zugabe von Trichloressigsäure den Überstand verfärben. In Abwesenheit von Proteasen bleibt Azocasein intakt und fällt durch Zugabe von Trichloressigsäure aus (Gifford *et al.*, 2002).

Die Substratlösung bestand aus 250 mg Azocasein gelöst in 50 ml Tris-HCl pH 7,2. Zur Untersuchung der proteolytischen Aktivität wurden 980 µl der Substratlösung mit 20 µl Enzymlösung versetzt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 150 µl 20 %-ige Trichloressigsäure hinzugegeben und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ausgefallenes Azocasein wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 13000 x g der Probe entfernt. 500 µl des entstandenen Überstandes wurden mit 800 µl einer 1 M NaOH-Lösung versetzt und die Extinktion bei 440 nm gemessen. Als Negativ-Kontrolle diente eH<sub>2</sub>O.



Der Nachweis der Muramidase-Aktivität erfolgte zum einen indirekt über den Nachweis reduzierender Zucker und zum anderen direkt aufgrund der Abnahme der optischen Dichte einer Zellwand-Suspension. Für beide Verfahren wurden Zellwände des Versuchorganismus *Lactobacillus brevis* B 190 hergestellt. Die Zellwandpräparation erfolgte nach Schleifer und Kandler (1967). Zellen einer Vorkultur wurden abzentrifugiert und mehrfach mit eH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit zwei Drittel des Volumens Glasperlen vermischt und für 20 min in einem Homogenisator (Bühler, Tübingen) zerkleinert. Mittels Filtration wurde das Homogenisat von den Glasperlen getrennt. Die gewonnenen Zellwände wurden abzentrifugiert und mehrmals gewaschen. Es folgte die Aufnahme der Zellwände in 50 mM Phosphatpuffer I und der tryptische Verdau für 24 h bei 37 °C (Trypsin 5 mg/ml). Nach der Inkubation wurden die Zellwände abzentrifugiert, mehrfach gewaschen und gefriergetrocknet.

Zur direkten Bestimmung der Muramidase-Aktivität wurden Zellwände in Phosphatpuffer I suspendiert und auf eine optische Dichte von ca. 0,5 bei 600 nm eingestellt. Zu 1950 µl dieser Suspension wurden 50 µl Enzymlösung zugegeben und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Messung der Trübungsabnahme der Zellsuspension erfolgte photometrisch.

Die indirekte Bestimmung der Muramidase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des Dinitrosalicylsäure-Tests (DNS-Test; Miller, 1959) in modifizierter Form. Dieser Test dient dem Nachweis reduzierender Zucker. Da Muramidasen die β-1,4-glycosidische Bindung im Peptidoglycan der bakteriellen Zellwand spalten, kommt es zur Freisetzung dieser reduzierenden Zucker, welche dann mittels 3,5-Dinitrosalicylsäure nachgewiesen werden können. Hierbei wird die 3,5-Dinitrosalicylsäure zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert, was in einen Farbumschlag von gelb nach rot resultiert. Dieser Farbumschlag kann photometrisch bei 575 nm gemessen werden. Durch Ermittlung einer Eichgeraden mit Glucose kann die Konzentration an neu gebildeten reduzierenden Zucker quantifiziert werden.

Zur Durchführung des DNS-Tests wurden 450 µl Zellwandsuspension (0,25 % in 50 mM Na-Acetatpuffer pH 6,0) mit 125 µl Enzymlösung und 125 µl eH<sub>2</sub>O versetzt und für 2 h bei 50 °C inkubiert. Zu der Probe wurden anschließend 50 µl Schutz-Glucose (1 mg/ml) und 750 µl DNS-Reagenz (Tabelle 2.32) hinzugegeben.

**Tabelle 2.32: Zusammensetzung der DNS-Reagenz.**

Komponente	Menge [g]
NaOH	10
Phenol	1,0
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0,25
K/Na-Tartrat	200
3,5-Dinitrosalicylsäure	5,0

Dieser Reaktionsansatz wurde für 15 min im Wasserbad gekocht. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben bei 575 nm im Photometer gemessen. Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmung, als Kontrolle diente eH<sub>2</sub>O bzw. hitzeinaktivierter Kulturüberstand.

#### 2.19.4 Bestimmung der Aktivitäts-Optima

Die optimale Aktivität der Enzyme wurde bzgl. Temperatur, pH-Wert und Ethanol-Gehalt bestimmt. Hierzu wurde der Standardtest zur Bestimmung lytischer Aktivität (siehe 2.16) durchgeführt. Zellen des Versuchsorganismus *Lactobacillus brevis* B 190 wurden in verschiedenen Puffern gelöst und mit den gereinigten Enzymlösungen behandelt. Nach der Inkubation wurde die Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm photometrisch bestimmt.

Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums wurden die Zellen bei den Temperaturen 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C und 50 °C inkubiert. Die Analyse des Optimums bzgl. des Ethanol-Gehalts fand bei 0 %, 2 %, 5 %, 7 %, 10 %, 12 % und 15 % Ethanol in Phosphatpuffer I (Endkonzentration v/v) statt.

Für die Ermittlung des pH-Optimums wurden Universalpuffer nach Skujins *et al.* (1962; siehe Tabelle 2.33) mit Hilfe von 1 M NaOH auf verschiedene pH-Werte eingestellt (3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, und 8,0).

**Tabelle 2.33: Zusammensetzung des Univesalpuffers nach Skujins *et al.* (1962).**

Komponente	Menge [g]
Tris	13,0
Malat	11,6
Citrat	14,0
Borsäure	6,3

## 2.20 Identifizierung der lytischen Enzyme

Neben der Charakterisierung der lytischen Enzyme stand ebenso deren Identifizierung im Vordergrund dieser Arbeit. Hierzu wurden verschiedene Methoden der Identifizierung von Proteinen angewandt, die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

### 2.20.1 Protein-Blot

Proteine können nach der gelektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe eines Protein-Blots auf eine Membran (im Rahmen dieser Arbeit eine PVDF-Membran) übertragen werden.

Hierdurch werden die Proteine auf der Membran fixiert und können für weitere Untersuchungen (z.B. N-terminale Sequenzierung) genutzt werden.

Zur Durchführung des Protein-Blots wurde ein Semi-Dry-Blot-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) angewandt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 2.34 dargestellt.

**Tabelle 2.34: Zusammensetzung der Puffer für den Protein-Blot.**

Komponente	Menge [g]
Anodenpuffer pH 9,4	
Tris	3,03
Aminocaprinsäure	5,25
Methanol	100 <sup>a</sup>
Katodenpuffer pH 10,4	
Tris	36,34
Methanol	100 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Angabe in ml

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für 15 min in Kathodenpuffer equilibriert. Zur Equilibrierung der PVDF-Membran wurde diese für 15 s in 100 % Methanol gelegt, 2 min eH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend 5 min mit Anodenpuffer behandelt.

Zur Durchführung des Protein-Blots wurden auf die Kathodenseite der Blot-Apparatur zwei in Kathodenpuffer eingeweichte Filterpapiere gelegt. Es folgte das Auflegen des SDS-Gels, der PVDF-Membran und abschließend von zwei in Anodenpuffer eingeweichten Filterpapieren.

Der Semi-Dry-Blot wurde für 2 h bei Raumtemperatur und konstanter Stromstärke durchgeführt. Die eingesetzte Stromstärke berechnete sich anhand der Fläche der PVDF-Membran (Fläche PVDF-Membran x 0,8 = Stromstärke [mA], Angabe des Herstellers). Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran für 2 min mit Färbelösung gefärbt. Es folgten 2 Entfärbeschritte zu je 10 min mit Entfärbelösung I und II. Die Zusammensetzungen der Lösungen sind Tabelle 2.35 zu entnehmen.

**Tabelle 2.35: Zusammensetzung der verwendeten Lösung zur Färbung der PVDF-Membran.**

Komponente	Volumen [ml]
Färbelösung	
Methanol	500
Essigsäure	70
Coomassie Brilliant Blue R250	1,0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Angabe in g

**Tabelle 2.35: Zusammensetzung der verwendeten Lösung zur Färbung der PVDF-Membran (Fortsetzung).**

Komponente	Volumen [ml]
Entfärbelösung I	
Methanol	500
Essigsäure	70
Entfärbelösung II	
Methanol	900
Essigsäure	100

Nach der Färbung wurde die Membran luftgetrocknet und die vorhandenen Banden für die N-terminale Sequenzierung ausgeschnitten.

### 2.20.2 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung erfolgte mittels Edman-Abbau (Edman und Begg, 1967). Die N-terminale Aminosäure eines Peptids wird hierbei in ein Phenylisothiocyanat-Derivat umgewandelt und anschließend abgespaltet. Dieses Derivat kann dann mit Hilfe der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) identifiziert werden kann. Diese Methode lässt die schrittweise Identifizierung der ersten 10 bis 20 Aminosäuren des N-Terminus zu.

Die N-terminalen Sequenzierungen wurden am Leibnitz-Institut für Altersforschung in Jena oder von der Firma TopLab, Martinsried durchgeführt.

Mit den erhaltenen Aminosäuresequenzen wurde eine Datenbank-Recherche durchgeführt (BLAST-Suche). So war eine Identifizierung der Enzyme anhand ihrer Sequenz möglich. Außerdem dienten die N-terminalen Sequenzen der Konstruktion spezifischer Primer zum Nachweis der jeweiligen Gene.

### 2.20.3 Massenspektroskopie

Zusätzlich zu der Identifizierung der gereinigten Proteine aufgrund ihres N-Terminus wurden diese auch massenspektroskopisch untersucht. Hierzu wurden die Proteinlösungen in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend in selbigem tryptisch verdaut (Shevchenko *et al.*, 1996). Die Trennung der entstandenen Peptid-Fragmente erfolgte durch eine LC-MS/MS-Methode (Aebersold und Mann, 2003). Hierzu wurde eine Kombination aus Kapillar-HPLC mit Nanospray-ESI-Quelle (nanoAcquity™ HPLC/UPLC™ System, Waters) und Tandem Q-TOF (Quadropole-Time-of-Flight) Massenspektrometer (Q-Tof Premier™ Massenspektrometer, Waters) verwendet. Die Auswertung der Fragmentspektren erfolgte

mit Hilfe der MassLynx™ Expression und ProteinLynx™ Global SERVER 2.2 Software (Waters).

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der gereinigten Enzyme wurden am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz durchgeführt.

#### 2.20.4 Nachweis der Gene

Für den Nachweis der Gene der einzelnen Enzyme wurden anhand der N-terminalen Sequenzen und bekannten Sequenzen in Datenbanken spezifische Primer konstruiert. Hierzu wurden die Sequenzen aligniert (ClustalW) und konservierte Bereiche für die Konstruktion von Primern ausgewählt. Nach der DNA-Isolation aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 wurde eine PCR mit den ermittelten Primern durchgeführt. PCR-Ansatz und Thermocycler-Programm sind in Tabelle 2.36 und Tabelle 2.37 dargestellt.

**Tabelle 2.36: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifizierung der Muramidase- bzw. Protease-Gene.**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
dNTPs	2,0
Forward-Primer <sup>a</sup>	1,5
Reverse-Primer <sup>b</sup>	1,5
MgCl <sub>2</sub>	2,0
Reaktionspuffer	5,0
Template-DNA (20 ng / $\mu$ l)	2,0
PCR-Wasser	34,0
Taq Polymerase	2,0

<sup>a</sup> Muramidase: MurF1, LyF1 und LyF2; Protease: FSC1, FSC3 und PNT1

<sup>b</sup> Muramidase: MurR1, LyR1 und LyR2; Protease: RSC1, RSC2, RSC3 und RSC4

**Tabelle 2.37: Thermocycler-Programm zur Amplifizierung der Muramidase- bzw. Protease-Gene.**

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	15
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	48/52 <sup>a</sup>	1
4	Elongation	72	1,5
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72	5

<sup>a</sup> 48 °C zur Amplifizierung der Protease; 52 °C zur Amplifizierung der Muramidase

Nach der PCR wurden die erhaltenen DNA-Fragmente aufgereinigt und sequenziert. Die so gewonnenen Sequenzen wurden durch die BLAST-Suche identifiziert und mit Hilfe einer Translations-Software ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) in die entsprechenden Aminosäuresequenzen (6 Leseraster) übersetzt. Durch die Auswahl des richtigen Leserasters konnte somit über die Gen-Sequenz die Aminosäuren-Abfolge der isolierten und gereinigten Enzyme bestimmt werden.

### 2.20.5 Bestimmung der Schnittstelle der Muramidase

Die Bestimmung der Schnittstelle wurde mit Hilfe einer Anionenaustauscherchromatographie mit gekoppelter gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD, **H**igh **P**erformance **A**nion **E**xchange **C**hromatography with **P**ulsed **A**mperometric **D**etection) durchgeführt. Hierbei werden Zucker und Zuckeralkohole aufgrund ihrer schwach sauren Eigenschaften bei hohen pH-Werten an einer Anionenaustauschersäule getrennt (Johnson und La Course, 1990). Die Detektion der getrennten Verbindungen erfolgt durch Messung von Stromänderungen an einer Goldelektrode, welche aufgrund der Oxidation ihrer Oberfläche durch die jeweiligen Zucker entstehen (Schiller, 2002).

Zur Bestimmung der Enzymspezifität wurde die präparierte Zellwand (100 µg/ml) von *Micrococcus luteus* B 577 (Präparation analog Kapitel 2.18.3) mit Enzymlösung (10 %, v/v) versetzt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente eH<sub>2</sub>O, als Positivkontrolle Lysozym (1 mg/ml). Analog wurden 100 µl Muraminsäure (1 mg/ml) als Standard behandelt. Nach der Inkubation wurden 100 µl des Reaktionsansatzes mit 1 mg NaBH<sub>4</sub> versetzt und für eine Stunde aus Eis inkubiert. Hierdurch kommt es zu einer Reduktion freier Carbonylgruppen-Gruppen. Anschließend wurde die Probe mit 1 ml

Essigsäure versetzt. Der entstandene Borsäuremethylester wurde durch mehrmalige Zugabe von Methanol mittels eines Vakuumkonzentrators (SpeedVac) abgedampft.

Zur Hydrolyse der Proben wurden diese mit 100 µl einer 6 N HCl versetzt. Die Hydrolyse erfolgte für 2 h bei 99 °C im Thermocycler. Anschließend wurde die HCl im Exikator mit Hilfe von KOH-Plättchen entfernt. Die Probe wurde in 100 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bis zur HPAEC-PAD-Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

Die Parameter zur Bestimmung der entstandenen Zuckeralkohole mittels HPAEC-PAD sind in Tabelle 2.38 zusammengefasst. Bei der verwendeten Anionenaustauschersäule handelte es sich um eine CarboPac MA1-Säule. Die Flußrate betrug 0,4 ml/min.

**Tabelle 2.38: Binäres Gradientenprogramm zur Bestimmung von Zuckeralkoholen.**

Zeit [min]	Eluent A [%] <sup>a</sup>	Eluent B [%] <sup>b</sup>
0,0	94	6
6,0	94	6
35,0	34	66
40,0	34	66
41,0	94	6
50,0	94	6

<sup>a</sup> eH<sub>2</sub>O

<sup>b</sup> 1 M NaOH

### 2.20.6 Abbau von S-Layer-Strukturen durch die gereinigte Protease

Die proteolytische Aktivität der gereinigten Enzymlösung sollte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Hierzu wurden S-Layer-Moleküle mit der Enzymlösung versetzt und ihr Abbau durch SDS-PAGE überprüft.

Zur Überprüfung der Lyse von S-Layer-Proteinen wurden diese nach einer Methode von Lortal *et al.* (1992) von dem Testorganismus *Lactobacillus brevis* B 190 extrahiert. Nach der Kultivierung in MRS-Medium wurden die Zellen abzentrifugiert und mehrfach mit eH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml/g (Nassgewicht) 5 M LiCl gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und der gewonnene Überstand (enthält die S-Layer-Proteine) für 3 d bei 4 °C gegen eH<sub>2</sub>O dialysiert. Abschließend folgte eine Zentrifugation (30 min, 20000 x g) des Dialysats. Die Reinheit und Größe der extrahierten S-Layer-Proteine wurde mit Hilfe von SDS-PAGE überprüft. Um die Lyse der S-Layer-Protein zu untersuchen, wurde 20 µl einer S-Layer-Suspension mit 10 µl Enzymlösung versetzt und für verschiedene Zeiten bei 30 °C inkubiert. Durch SDS-PAGE konnte der mögliche Abbau der S-Layer-Proteine überprüft werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Isolierung von Mikroorganismen aus Versuchsweinen

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es Mikroorganismen aus verschiedenen Versuchsweinen zu isolieren und diese hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung biogener Amine zu untersuchen. So sollte ein Überblick über das Vorkommen und die Anzahl der biogenen Amin-Bildner in deutschen Versuchsweinen gewonnen werden.

Insgesamt wurden 54 Versuchsweine der Jahrgänge 2008 und 2009 untersucht. Hierbei handelt es sich um Weine der Rebsorten Chardonnay, Spätburgunder, Trollinger und Weißburgunder, die vom Dienstleistungszentrum ländlicher Raum (DLR) Neustadt an der Weinstrasse zur Verfügung gestellt wurden. Tabelle 3.1 stellt die Anzahl der Stämme aus den verschiedenen Weinproben dar, die gemäß Kapitel 2.10 isoliert wurden.

**Tabelle 3.1: Verteilung der bakteriellen Isolate nach Rebsorte.**

Rebsorte	Anzahl untersuchter Weine	Anzahl der bakteriellen Isolate
Chardonnay	6	11
Spätburgunder	20	71
Trollinger	1	1
Weißburgunder	27	64

Aus Tabelle 3.1 geht hervor, dass die Mehrzahl der 148 Eigenisolate aus Weinen der Rebsorten Spät- und Weißburgunder isoliert werden konnten. Jedoch wurde von diesen Rebsorten auch eine größere Anzahl an Proben untersucht.

Anhand der Anzahl der Isolate aus den verschiedenen experimentell hergestellten Weinen lässt sich keine eindeutige Aussage über die tatsächliche Populationszusammensetzung treffen, da nicht davon auszugehen ist, dass sämtliche in diesen Proben vorkommende Bakterienarten isoliert werden konnten. Somit kann man aufgrund dieser Ergebnisse auch keinen Rückschluss auf die Auswirkungen der verschiedenen Versuchsvarianten auf die Mikroflora des Weines ziehen. Dies war aufgrund der Fragestellung nach der Verteilung biogener Amin-Bildner jedoch auch nicht notwendig.

Die gewonnenen Kulturen wurden für weitere Untersuchungen kultiviert und mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Methoden identifiziert.

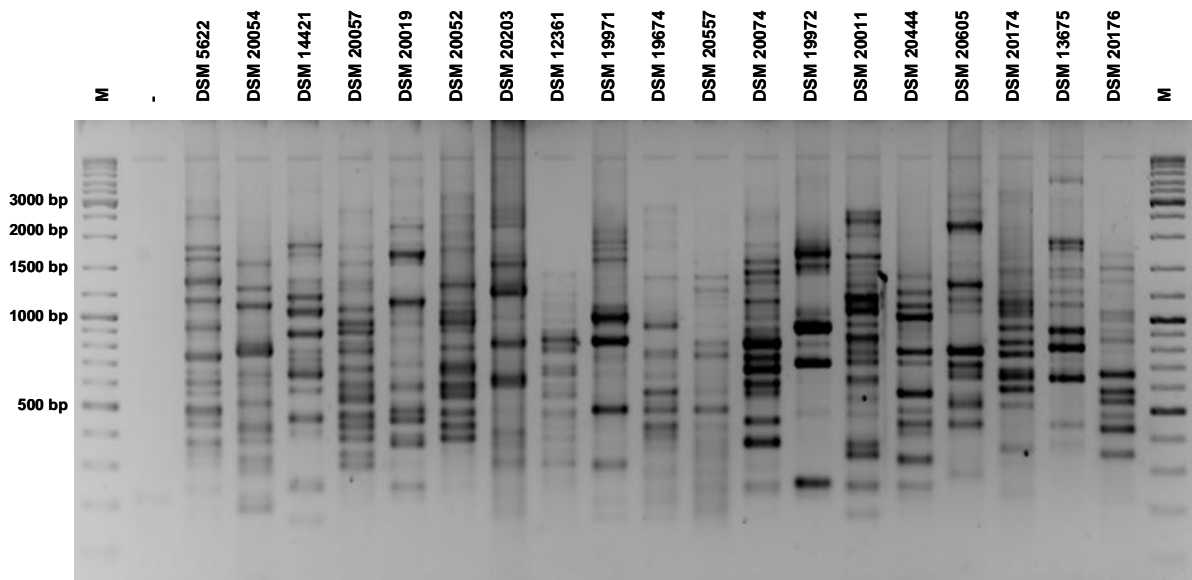


## 3.2 Molekularbiologische Untersuchungen zur Identifizierung der Eigenisolate aus Versuchswainen

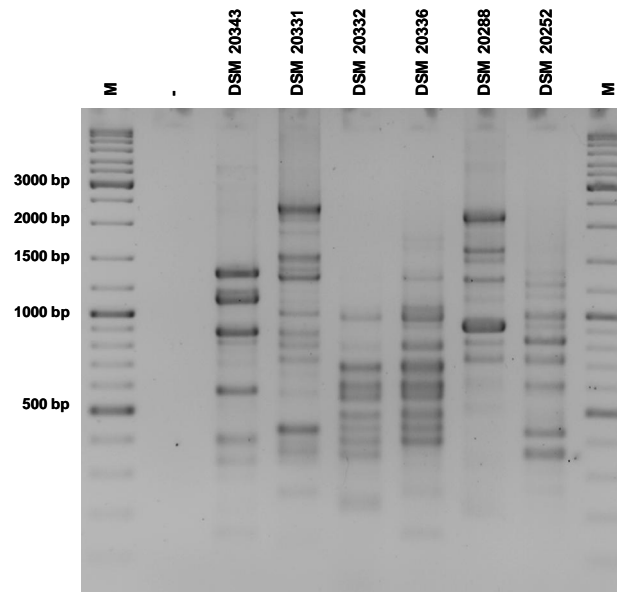
Um die 148 Eigenisolate aus den Versuchswainen eindeutig identifizieren zu können, wurden neben der klassischen 16S rDNA-Sequenzierung zwei am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung entwickelte Methoden zur schnellen Identifizierung von Mikroorganismen angewandt. Hierbei handelte es sich um eine DNA-Fingerprintmethode und eine Multiplex-PCR, die die Identifizierung von Bakterien in Mischkulturen oder Weinen zulässt.

### 3.2.1 Anwendung der specifically amplified polymorphic DNA-PCR zur Identifizierung von weinrelevanten Milchsäurebakterien

Aus allen Eigenisolaten wurde jeweils die Gesamt-DNA extrahiert. Mit dieser DNA wurde eine specifically amplified polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) durchgeführt. Die eingesetzten Primer binden hierbei an spezifische DNA-Sequenzen, die Notl-Erkennungssequenzen (5'- GCG GCC GC -3'). Hierdurch kommt es zu einem spezifischen PCR-Fragment-Muster, das gelelektrophoretisch aufgetrennt werden kann. Als Referenzen zur Identifizierung der Eigenisolate wurden die PCR-Fragment-Muster der 25 weinrelevanten Milchsäurebakterien verwendet. Diese sind in Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2 dargestellt.



**Abbildung 3.1: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte weinrelevanter *Lactobacillus*-Arten (Typstämme) nach der SAPD-PCR.** Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung). Als Primer wurde C-Not (5'- AGC GGC CGC C-3') verwendet. Als Negativ-Kontrolle diente PCR-Wasser. Artnamen: siehe Tabelle 3.2. M = Marker (GeneRuler).



**Abbildung 3.2: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte weinrelevanter Milchsäurebakterien-Arten (Typstämme) nach der SAPD-PCR.** Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung). Als Primer wurde C-Not (5'- AGC GGC CGC C-3') verwendet. Als Negativ-Kontrolle diente PCR-Wasser. Artnamen: siehe Tabelle 3.2. M = Marker (GeneRuler).

In Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2 ist deutlich zu erkennen, dass jede einzelne Art ein spezifisches Bandenmuster aufwies. Mit Hilfe der Vision Capt 14.1 Software (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland) wurden die Fragmentlängen der einzelnen Banden jeder Art bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3.2 zusammengestellt.

**Tabelle 3.2: Fragmentlängen der entstandenen Bandenmuster weinrelevanter Milchsäurebakterien nach der SAPD-PCR.**

Art	DSMZ- Nummer	SAPD-PCR Fragmentlänge [bp]
<i>Lactobacillus bobalius</i>	DSM 19674	3465, 1785, 1026, 847, 740, 652, 576, 535, 492
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 20054	2060, 1652, 1378, 914, 840, 740, 705, 597, 525, 479, 417, 378, 296
<i>Lactobacillus buchneri</i>	DSM 20057	2374, 2099, 1673, 1535, 1338, 1107, 987, 914, 862, 775, 694, 609, 573, 535, 492, 440, 394
<i>Lactobacillus casei</i>	DSM 20011	3290, 3000, 2459, 2171, 1695, 1464, 1310, 1089, 961, 885, 796, 740, 625, 471, 440, 333

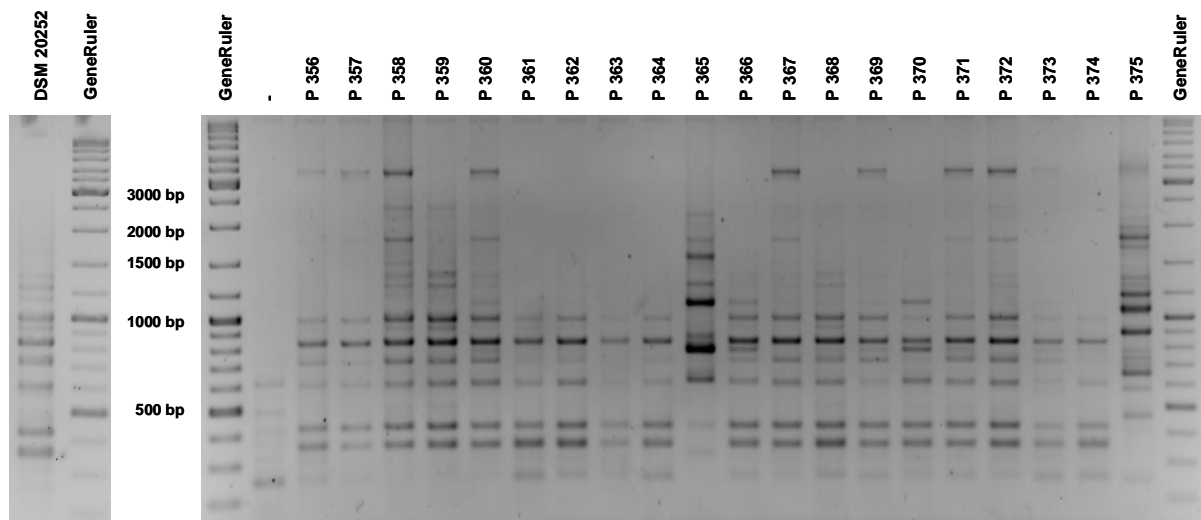
**Tabelle 3.2: Fragmentlängen der entstandenen Bandenmuster weinrelevanter Milchsäurebakterien nach der SAPD-PCR (Fortsetzung).**

<b>Art</b>	<b>DSMZ- Nummer</b>	<b>SAPD-PCR Fragmentlänge [bp]</b>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSM 20019	2844, 2237, 1416, 1107, 921, 792, 676, 579, 558, 475, 338
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	DSM 20074	2135, 1903, 1695, 1428, 1107, 914, 832, 771, 694, 647, 548, 471, 335
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	DSM 14421	2403, 2269, 1739, 1452, 1249, 974, 869, 806, 735, 670, 551, 507, 338
<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 20052	2330, 1611, 1365, 1265, 1072, 892, 783, 744, 700, 630, 573, 535, 488
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	DSM 20203	2844, 2188, 2060, 1500, 1217, 914, 711, 522, 414
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSM 20176	2221, 2041, 1717, 1265, 1143, 921, 749, 658, 600, 564, 522, 432
<i>Lactobacillus jensenii</i>	DSM 20557	1808, 1500, 914, 840, 576, 525
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	DSM 12361	1855, 1488, 1324, 1072, 948, 869, 753, 688, 647, 573, 488, 410
<i>Lactobacillus mali</i>	DSM 20444	1808, 1517, 1351, 1162, 854, 806, 664, 579, 542, 410, 338
<i>Lactobacillus nagelii</i>	DSM 13675	2445, 2285, 2000, 1832, 1553, 1365, 1026, 885, 716, 532
<i>Lactobacillus oeni</i>	DSM 19972	2254, 2000, 1265, 1026, 900, 792, 721, 558, 352
<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSM 5622	3147, 2345, 2153, 1717, 1416, 1000, 832, 749, 711, 658, 579, 542, 475
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 20174	1378, 1233, 1040, 921, 847, 762, 744, 664, 597, 447
<i>Lactobacillus uvarum</i>	DSM 19971	2625, 2459, 2345, 2221, 1338, 1200, 935, 819, 740, 630, 579, 400
<i>Lactobacillus vini</i>	DSM 20605	2768, 1652, 1440, 1310, 869, 792, 735, 597, 535, 376
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSM 20343	1350, 1149, 1105, 880, 825, 576, 400, 332

**Tabelle 3.2: Fragmentlängen der entstandenen Bandenmuster weinrelevanter Milchsäurebakterien nach der SAPD-PCR (Fortsetzung).**

Art	DSMZ- Nummer	SAPD-PCR Fragmentlänge [bp]
<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 20252	1315, 1200, 1124, 980, 920, 815, 704, 607, 421, 355
<i>Pediococcus damnosus</i>	DSM 20331	2255, 2106, 1850, 1520, 1406, 1297, 1000, 865, 800, 726, 435, 385, 353
<i>Pediococcus parvulus</i>	DSM 20332	980, 795, 678, 600, 554, 482, 444, 397, 353, 229
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20336	1263, 1022, 975, 930, 805, 685, 607, 558, 488, 424, 387
<i>Weisella paramesenteroides</i>	DSM 20288	2075, 1626, 1472, 1255, 1099, 935, 910, 805, 721

Aufgrund der nach der SAPD-PCR erhaltenen Fragmentlängen, die in Tabelle 3.2 aufgeführt sind und den Bandenmustern der Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2 konnte eine Vielzahl der isolierten Bakterien identifiziert werden. Ein Beispiel für die Identifizierung der Eigenisolate mit Hilfe der SAPD-PCR ist in Abbildung 3.3 dargestellt.



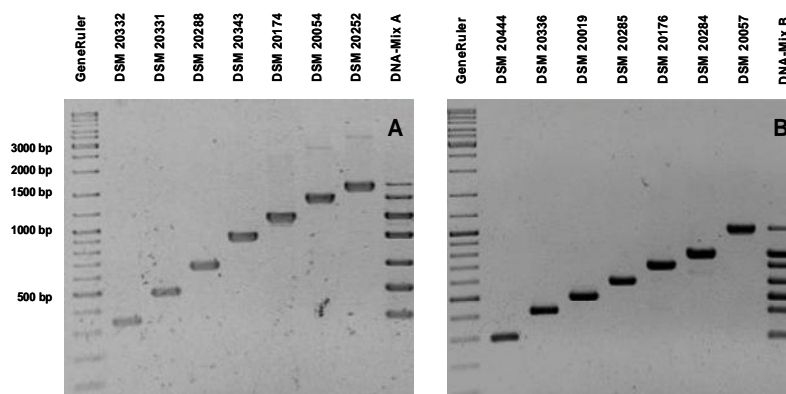
**Abbildung 3.3: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte einiger Eigenisolate und des Typstamms DSM 20252 von *Oenococcus oeni* nach der SAPD-PCR.** Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung). Als Primer wurde C-Not (5'- AGC GGC CGC C-3') verwendet. Als Negativ-Kontrolle diente PCR-Wasser.

In Abbildung 3.3 ist deutlich zu erkennen, dass die Eigenisolate P 356 - P 364 und P 366 - P 374 dasselbe Bandenmuster wie der Typstamm von *Oenococcus oeni* DSM 20252<sup>T</sup> aufwiesen. Charakteristisch waren hierbei die starke Bande bei ca. 850 bp, sowie die zwei Banden etwas oberhalb und unterhalb von 400 bp. Weiter geht aus Abbildung 3.3 hervor, dass es sich bei den Eigenisolaten P 365 und P 375 nicht um *Oenococcus oeni* handelt, da die Bandenmuster eindeutig von dem des Typstammes unterscheidbar sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Eigenisolate mit Hilfe der SAPD-PCR untersucht. Es zeigte sich, dass diese Methode sehr gut anwendbar für eine hohe Anzahl von Proben war und gut reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Jedoch konnten nicht alle Isolate durch die SAPD-PCR identifiziert werden, da einige Bandenmuster nicht eindeutig den Referenzstämmen zugeordnet werden konnten. Ebenso konnten Eigenisolate, die nicht den Milchsäurebakterien angehörten, mangels Referenzen nicht identifiziert werden. Hierzu mussten weitere Untersuchungen angestellt werden.

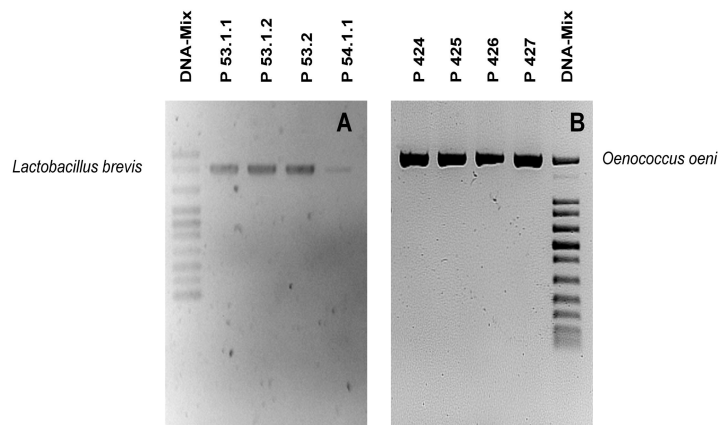
### 3.2.2 Art-Identifizierung durch Multiplex-PCR

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Multiplex-PCR zur Identifizierung von weinrelevanten Mikroorganismen wurde am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung entwickelt und beruht auf dem Einsatz spezies-spezifischer Primer (Pfannebecker und Fröhlich, 2008; Petri *et al.*, 2011). Mit Hilfe dieser Primer lassen sich PCR-Fragmente bestimmter Größe generieren, die für die jeweiligen Mikroorganismen charakteristisch sind. Zum derzeitigen Zeitpunkt können durch den Einsatz der Multiplex-PCR 14 verschiedene Milchsäurebakterien einzeln und in Mischung identifiziert werden. Die Ergebnisse einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte von Typstämmen weinrelevanter Bakterien sind in Abbildung 3.4 dargestellt.



**Abbildung 3.4: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte weinrelevanter Milchsäurebakterien (Typstämme) nach der Multiplex-PCR.** Der DNA-Mix A enthielt die in A dargestellten Arten, DNA-Mix B die in B. Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung). Artnamen: siehe Tabelle 3.2.

Aufgrund der besseren Unterscheidbarkeit der DNA-Banden, wurden zwei Multiplex-PCR-Systeme angewandt. So sind die einzelnen Banden eindeutig sichtbar, in ihrer bp-Größe unterscheidbar und den jeweiligen Banden im Standard-Gemisch zuzuordnen (siehe Abbildung 3.4). Diese Methode ermöglicht es ebenfalls Bakterien, die nicht in Reinkulturen vorliegen, zu identifizieren. Ein Teil der Eigenisolate wurde mit Hilfe der Multiplex-PCR eindeutig identifiziert bzw. die Ergebnisse der SAPD-PCR bestätigt.



**Abbildung 3.5: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte einiger Eigenisolate nach der Multiplex-PCR.** Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung).

Aus Abbildung 3.5 A geht hervor, dass es sich bei den Eigenisolaten P 53.1.1, P 53.1.2, P53.2 und P 54.1.1 um Stämme der Art *Lactobacillus brevis* handelte. Die entstandenen PCR-Produkte konnten eindeutig dem PCR-Produkt dieses Bakteriums im Standard zugeordnet werden. Das gleiche gilt für Abbildung 3.5 B. Hier lagen die bei der Multiplex-PCR erzeugten DNA-Amplifikate der Eigenisolate auf derselben Höhe wie die von *Oenococcus oeni* und konnten somit als Vertreter dieser Art identifiziert werden. Ein Nachteil dieser Methode war, genauso wie bei der SAPD-PCR, dass für die Identifizierung unbekannter Bakterien das Vorhandensein von Referenzen notwendig war. Konnten Stämme nicht mit Hilfe der SAPD-PCR oder der Multiplex-PCR identifiziert werden, wurde deren 16S rDNA sequenziert.

### 3.2.3 Identifizierung der Eigenisolate mit Hilfe von 16S rDNA-Analysen

Die 16S rDNA der Bakterien gilt in der Molekularbiologie als phylogenetischer Marker zur Zuordnung von Bakterien zu bestimmten Arten. Zur Sequenzierung dieser DNA-Bereiche werden diese mit bestimmten universellen Primern amplifiziert. Durch die Amplifikation und anschließende Sequenzierung der 16S rDNA der Eigenisolate mit unbekanntem bzw. uneindeutigem SAPD-PCR Fragmentmuster konnten diese identifiziert werden. So wurden

zum Beispiel verschiedene Vertreter der Gattung *Acetobacter* und *Staphylococcus* unter den Eigenisolaten nachgewiesen.

### 3.2.4 Isolierung und Identifizierung von Essigsäurebakterien aus Versuchswainen

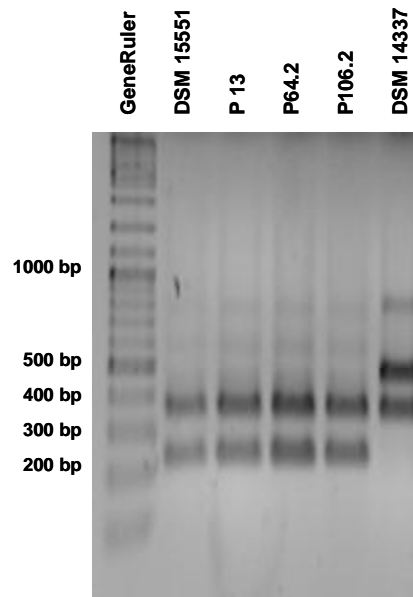
Neben den mit Hilfe von SAPD-PCR und Multiplex-PCR nachweisbaren Milchsäurebakterien wurden auch verschiedene Arten der Gattung *Acetobacter* aus den Versuchswainen isoliert. Diese Stämme zeigten eine eindeutige Katalase-Aktivität und Wachstum auf CaCO<sub>3</sub>-Platten. Eine Identifizierung dieser Mikroorganismen anhand der SAPD-PCR Fragment-Muster war mangels Referenzen nicht möglich, so dass eine 16S rDNA-Analyse zur Identifizierung diese Stämme notwendig war (Sequenzen siehe Anhang).

**Tabelle 3.3: Ergebnisse der Datenbank-Analyse der 16S rDNA-Sequenzen von Eigenisolaten.**

Stamm	Spezies	Nächster Verwandter (NCBI Datenbank)	Sequenzidentität [bp/bp]
P 9	<i>Acetobacter oeni</i>	<i>Acetobacter oeni</i> B7 Accession number: <a href="#">EU131161.1</a>	959/966 (99 %)
P 13	<i>Acetobacter tropicalis</i>	<i>Acetobacter tropicalis</i> Y-1BM Accession number: <a href="#">AB052716.1</a>	871/872 (99 %)
P 64.2	<i>Acetobacter tropicalis</i>	<i>Acetobacter tropicalis</i> Y-1BM Accession number: <a href="#">AB052716.1</a>	977/978 (99 %)
P 106.2	<i>Acetobacter tropicalis</i>	<i>Acetobacter tropicalis</i> LMG 1663 Accession number: <a href="#">AJ419842.1</a>	944/946 (99 %)

Aus Tabelle 3.3 geht hervor, dass es sich bei drei der vier isolierten Essigsäurebakterien um Stämme der Art *Acetobacter tropicalis* handelte. Dieses Essigsäurebakterium ist bisher im Gegensatz zu *Acetobacter oeni* noch nicht aus Wein- oder Mostproben isoliert worden und hat sein natürliches Habitat auf den Früchten der Stachelannone (*Annona muricata*).

Um sicherzustellen, dass es sich bei den drei Stämmen von *Acetobacter tropicalis* tatsächlich um diese Art handelt, wurde deren 16S rDNA mit Hilfe des Restriktionsenzym HpaII verdaut. Anhand des Restriktions-Musters sollten, im Vergleich zum Typstamm DSM 15551<sup>T</sup>, die Eigenisolate identifiziert werden können. Als Negativ-Kontrolle wurde die 16S rDNA eines nahverwandten Essigsäurebakterium, *Acetobacter malorum* DSM 14337<sup>T</sup>, ebenfalls verdaut.



**Abbildung 3.6: Gelelektrophoretische Auftrennung eines Restriktionsverdaus der 16S rDNA verschiedener Essigsäurebakterien mit HpaII.** Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung).

Wie in Abbildung 3.6 zu erkennen, zeigten die Stämme, die mit Hilfe der 16S rDNA-Sequenzierung als *Acetobacter tropicalis* identifiziert wurden, das gleiche Bandenmuster wie der Typstamm DSM 15551<sup>T</sup>. Das Bandenmuster des nahverwandten Essigsäurebakteriums *Acetobacter malorum* DSM 14337<sup>T</sup> war eindeutig von den anderen Proben zu unterscheiden. Es konnten somit durch 16S rDNA-Analysen und Restriktionsverdau vier Stämme von Essigsäurebakterien identifiziert werden, die den Arten *Acetobacter oeni* und *Acetobacter tropicalis* angehörten.

### 3.2.5 Zusammenfassung der Isolierung von Mikroorganismen aus Versuchsweinen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt 148 Stämme von Bakterien aus insgesamt 54 Versuchsweinen isoliert werden. Diese wurden mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Methoden wie SAPD-PCR, Multiplex-PCR und 16S rDNA-Analysen identifiziert. Tabelle 3.4 gibt die Verteilung der bakteriellen Eigenisolate nach Rebsorten wieder.



Tabelle 3.4: Verteilung der bakteriellen Eigenisolate nach Rebsorten.

Rebsorte	Spezies	Anzahl
Spätburgunder	<i>Lactobacillus brevis</i>	41
	<i>Pediococcus parvulus</i>	5
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	4
	<i>Lactobacillus casei</i>	3
	<i>Pediococcus damnosus</i>	9
	<i>Acetobacter oeni</i>	1
	<i>Acetobacter tropicalis</i>	3
	<i>Staphylococcus captitis</i>	5
Weißburgunder	<i>Lactobacillus brevis</i>	16
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4
	<i>Oenococcus oeni</i>	40
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	1
	<i>Staphylococcus condimenti</i>	2
Chardonnay	<i>Oenococcus oeni</i>	8
	<i>Staphylococcus captitis</i>	2
	<i>Lactobacillus brevis</i>	1
	<i>Staphylococcus epidermitis</i>	1
Trollinger	<i>Oenococcus oeni</i>	1

Es ist festzustellen, dass es sich bei der Mehrzahl der Eigenisolate um Vertreter der Milchsäurebakterien handelte. So konnten 134 der 148 Isolate dieser Familie zugeordnet werden. Die Hauptarten waren hierbei *Lactobacillus brevis* (58 Stämme) und *Oenococcus oeni* (49 Stämme). Diese beiden Arten machten somit ca. 80 % der isolierten Milchsäurebakterien aus. Daneben wurden noch weitere Arten wie *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus hilgardii* und *Lactobacillus paracasei*, sowie die Pediokokken-Arten *Pediococcus damnosus* und *Pediococcus parvulus*, und *Leuconostoc mesenteroides* in geringerer Anzahl isoliert. Auffällig war, dass trotz der hohen Anzahl an Proben aus keinem Versuchswein der Rebsorte Spätburgunder das Bakterium *Oenococcus oeni* isoliert werden konnte, wohingegen diese Art in nahezu allen Weißburgundern nachweisbar war (40 Stämme). *Lactobacillus brevis* wurde vor allem aus Spätburgunderweinen isoliert (41 Stämme), konnte aber ebenfalls in Weißburgundern und Chardonnay nachgewiesen werden.

Bei den restlichen, nicht den Milchsäurebakterien angehörenden, Eigenisolaten handelte es sich um vier Stämme der Gattung *Acetobacter* sowie 10 Stämme von Staphylokokken.

Während Essigsäurebakterien in der Weinherstellung vorkommen und das Milieu Wein ein natürliches Habitat für sie darstellt, ist davon auszugehen, dass die verschiedenen *Staphylococcus*-Arten durch Verunreinigungen, z.B. bei der Probenentnahme, in die Versuchsweine gelangt sind.

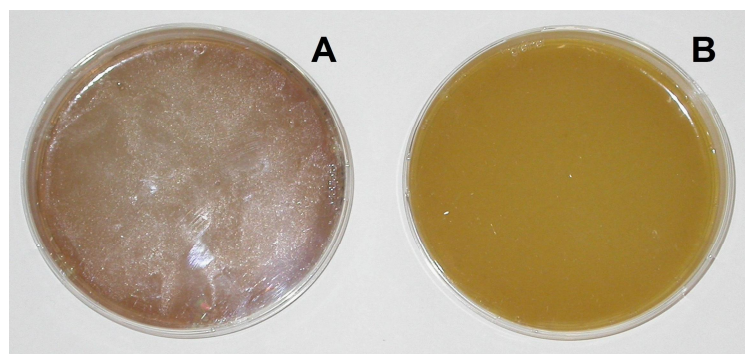
Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass es sich bei ca. 90 % der isolierten Stämme um Milchsäurebakterien handelte. Die SAPD-PCR und Multiplex-PCR stellten sich hierbei als Methoden der Wahl zur Identifizierung von weinrelevanten Bakterien heraus. Die so identifizierten Eigenisolate wurden in weiteren Versuchen auf ihr Potential zur Bildung biogener Amine hin untersucht.

### 3.3 Analytische und physiologische Untersuchungen zum Nachweis biogener Amine

Biogene Amine spielen eine wichtige Rolle in der Weinbereitung, da sie zum einen Einfluss auf die Sensorik des Weines haben können, aber auch zum anderen einen physiologischen Effekt beim Weinkonsumenten hervorrufen können. Um das Vorkommen von Bakterien, die diese Stickstoffverbindungen bilden können, zu untersuchen, wurden die 148 aus Versuchsweinen isolierten Bakterienstämme auf ihre Fähigkeit zur Produktion biogener Amine hin untersucht. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Vertreter der Milchsäurebakterien gelegt, da diese als Hauptproduzenten biogener Amine gelten.

#### 3.3.1 Nachweis biogener Amine durch Wachstum auf einem Decarboxylasemedium

Die Bildung biogener Amine ist mit der Alkalisierung des Mediums und somit einem Anstieg des pH-Werts verbunden. Dieser pH-Anstieg lässt sich durch die Zugabe eines pH-Indikators nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Decarboxylasemedium nach Bover-Cid und Holzapfel (1999) verwendet, dem die Vorstufen-Aminosäure Tyrosin zugegeben wurde.



**Abbildung 3.7: Decarboxylasemedium zum Nachweis der Bildung biogener Amine.** A = beimpft mit *Lactobacillus brevis* B 190. B = unbeimpfte Kontrolle. Photographie. Beide Platten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert.

Durch die Umwandlung von Tyrosin zu Tyramin durch Abspaltung der Carboxylgruppe kommt es zu einer pH-Wert-Erhöhung. Abbildung 3.7 zeigt die Photographie zweier Agarplatten mit Decarboxylasemedium. Die Platte A wurde mit dem Bakterium *Lactobacillus brevis* B 190 beimpft, wohingegen Platte B als Negativ-Kontrolle diente. Es ist zu erkennen, dass es bei Platte A zu einer Verfärbung des Nährmediums von gelblich-grün zu violett gekommen ist. Dies lässt eine Bildung von Tyramin vermuten.

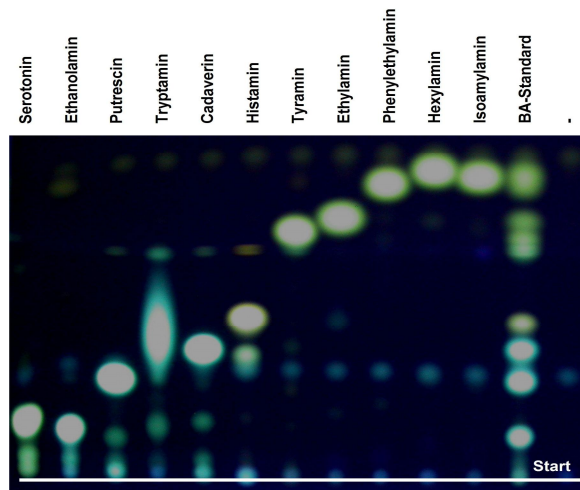
Der Nachweis einer Bildung biogener Amine mit Hilfe dieses Decarboxylasemediums setzt voraus, dass für jedes biogene Amin die jeweilige Vorläufer-Aminosäure im Medium vorhanden ist. Zudem werden nicht alle biogene Amine durch Decarboxylierung gebildet, so dass deren Nachweis mit Hilfe dieser Methode nicht möglich ist. Da der Nachweis nur auf eine Änderung des pH-Wertes beruht, ist gleichfalls nicht auszuschließen, dass der Farbumschlag durch andere Stoffwechsel-Prozesse, die einen Anstieg des pH-Werts mit sich bringen, bewerkstelligt wird.

Aufgrund dieser Nachteile wurden für die Analyse der Bildung biogener Amine durch die Eigenisolate sensitivere und spezifischere Methoden, wie Dünnschichtchromatographie und HPLC, genutzt.

### 3.3.2 Nachweis biogener Amine durch Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie stellt eine schnelle und einfache Methode zur Trennung verschiedener Verbindungen in einer Probe dar. Zur Trennung von biogenen Aminen wurde eine Derivatisierung dieser Verbindungen mit Dansylchlorid durchgeführt. Die entstandenen Derivate ließen sich dann mit Hilfe von UV-Licht detektieren und durch den Einsatz verschiedener Laufmittel dünnschichtchromatographisch auftrennen.

Es wurden vier verschiedene Laufmittel zur Trennung der Derivate untersucht. Mit den Laufmitteln LM 2 (Hexan:n-Butanol:Triethylamin; 90:10:8,1, v/v/v) und LM 3 (Toluol:Methanol:Cyclohexan:Wasser; 85:5:10:0,1, v/v/v) konnte keine zufriedenstellende Trennung der biogenen Amine erreicht werden. Eine bessere Auftrennung wurde durch das Laufmittel LM 4 (Chloroform:Diethylether:Triethylamin; 6:2:1, v/v/v) erreicht (siehe Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Standards biogener Amine (1 mg/ml).** Photographie einer hp-TLC-Platte unter UV-Licht. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Chloroform:Diethylether:Triethylamin im Verhältnis 6:2:1 (v/v/v) verwendet. Die biogenen Amine wurden dansyliert. Als Negativ-Kontrolle diente Wasser.

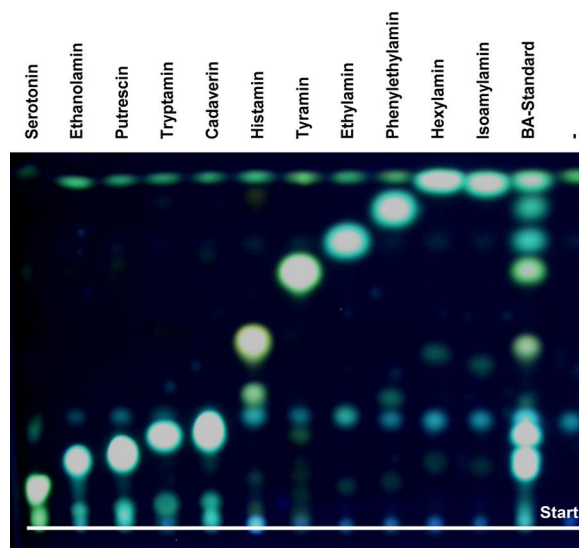
Die  $R_f$ -Werte der in Abbildung 3.8 aufgetrennten biogenen Amine sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

**Tabelle 3.5:  $R_f$ -Werte der einzelnen biogenen Amine durch Auftrennung mit Laufmittel LM 4 (Chloroform:Diethylether:Triethylamin; 6:2:1, v/v/v).**

Biogenes Amin	$R_f$ -Wert [abs.]
Serotonin	0,254
Ethanolamin	0,214
Putrescin	0,398
Tryptamin	0,422
Cadaverin	0,506
Histamin	0,631
Tyramin	0,722
Ethylamin	0,727
Phenylethylamin	0,811
Isoamylamin	0,816
Hexylamin	0,835

Aus Abbildung 3.8 geht hervor, dass vor allem die biogenen Amine mit einem  $R_f$ -Wert unter 0,5 (Cadaverin, Ethanolamin, Putrescin, Serotonin und Tryptamin) mit Hilfe dieses Laufmittels getrennt werden konnten. Bei den restlichen Aminen lagen die Signale sehr nahe

beieinander und die  $R_f$ -Werte konnten nicht eindeutig unterschieden werden. Zur besseren Auftrennung dieser Amine wurde ein weiteres Laufmittel, LM 1, verwendet, das aus einem Gemisch von Toluol:Chloroform:Triethylamin im Verhältnis 10:6:7 (v/v/v) bestand. Die Ergebnisse der dünnenschichtchromatographischen Auftrennung der Standards biogener Amine sind in Abbildung 3.9, die  $R_f$ -Werte in Tabelle 3.6 dargestellt.



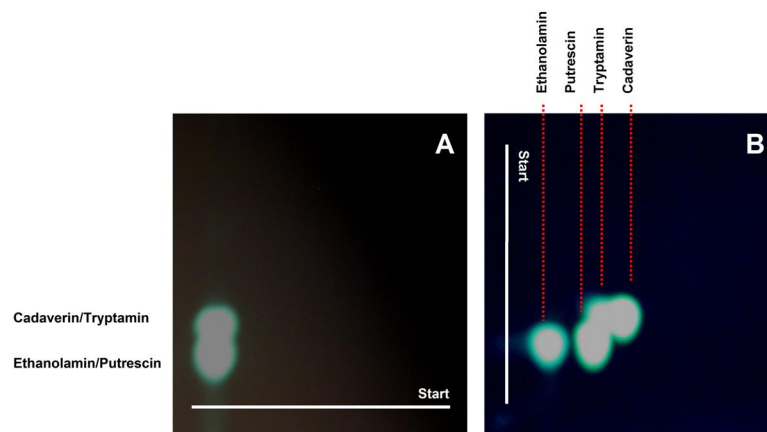
**Abbildung 3.9: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Standards biogener Amine (1 mg/ml).** Photographie einer hp-TLC-Platte unter UV-Licht. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Toluol:Chloroform:Triethylamin im Verhältnis 10:6:7 (v/v/v) verwendet. Die biogenen Amine wurden dansyliert. Als Negativ-Kontrolle diente Wasser.

**Tabelle 3.6:  $R_f$ -Werte der einzelnen biogenen Amine durch Auftrennung mit Laufmittel LM 1 (Toluol:Chloroform:Triethylamin; 10:6:7, v/v/v).**

Biogenes Amin	$R_f$ -Wert [abs.]
Serotonin	0,109
Ethanolamin	0,17
Putrescin	0,176
Tryptamin	0,241
Cadaverin	0,241
Histamin	0,476
Tyramin	0,667
Ethylamin	0,743
Phenylethylamin	0,804
Isoamylamin	0,883
Hexylamin	0,92

Wie in Abbildung 3.9 ersichtlich ist, konnte eine Trennung der biogenen Amine Ethylamin, Hexylamin, Isolamylamin, Phenylamin und Tyramin mit Hilfe dieses Laufmittels erzielt werden. Auch die berechneten  $R_f$ -Werte lassen sich unterscheiden (vergleiche Tabelle 3.6). Jedoch war eine zufriedenstellende Trennung von Cadaverin, Ethanolamin, Putrescin und Tryptamin nicht möglich.

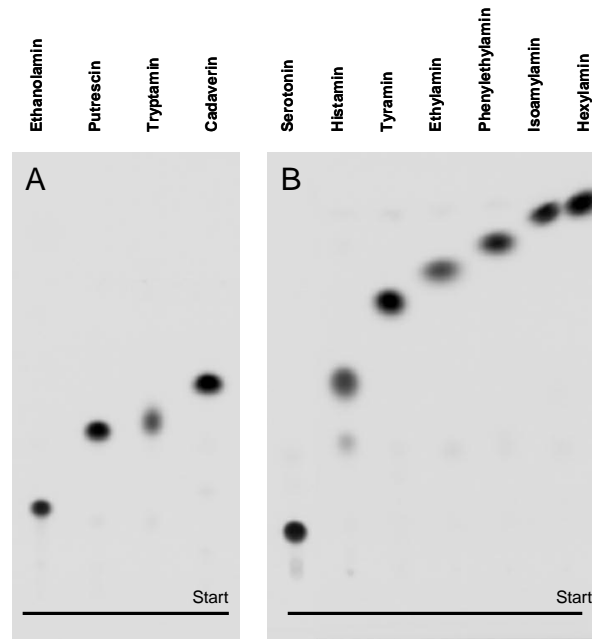
Als mögliche Methode zur Trennung dieser vier biogenen Amine wurde eine 2D-Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Hierbei wurden die Derivate zuerst in einer Dimension mit LM 1 getrennt und, nach der Trocknung der Dünnschichtplatte, in der zweiten Dimension mit LM 4 getrennt.



**Abbildung 3.10: 2D-Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Cadaverin/Tryptamin und Ethanolamin/Putrescin (1 mg/ml).** Photographie einer hp-TLC-Platte unter UV-Licht. Als Laufmittel wurde A = Chloroform:Diethylether:Triethylamin (6:2:1, v/v/v) und B = Toluol:Chloroform:Triethylamin (10:6:7, v/v/v) verwendet. Die biogenen Amine wurden dansyliert.

Durch den Einsatz eines zweiten Laufmittels orthogonal zum ersten konnte eine Trennung der biogenen Amine Cadaverin/Tryptamin und Ethanolamin/Putrescin erzielt werden (siehe Abbildung 3.10). Während nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Amine mit dem ersten Laufmittel nur zwei Signale erkennbar waren, konnten nach der zweiten Auftrennung vier Signale detektiert werden. Da jedoch für das Auftrennen einer Probe in zwei Dimensionen jeweils eine hp-TLC-Platte notwendig war, wurde diese Methode nicht zur Untersuchung der Bildung biogener Amine durch die Eigenisolate genutzt.

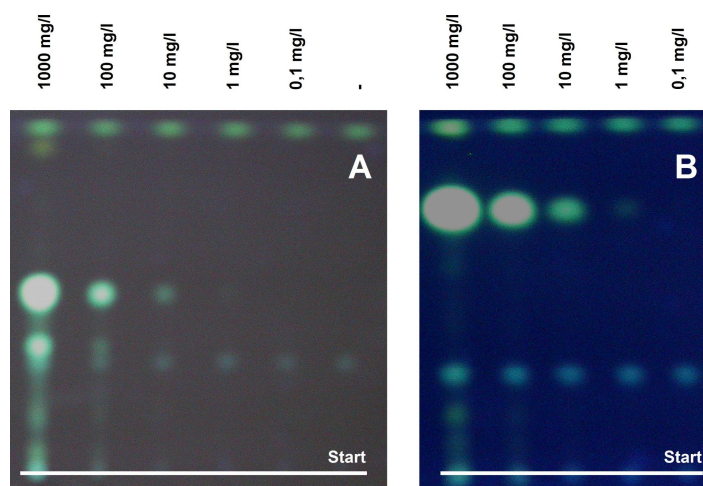
Eine Trennung aller biogenen Amine konnte durch den Einsatz von zwei parallelen Dünnschichtchromatographien mit verschiedenen Laufmitteln bewerkstelligt werden. So konnten die Amine Cadaverin, Ethanolamin, Putrescin und Tryptamin am besten mit dem Laufmittel LM 4 (Chloroform:Diethylether:Triethylamin; 6:2:1, v/v/v) getrennt werden, während bei den Aminen Ethylamin, Hexylamin, Histamin, Isoamylamin, Phenylethylamin, Serotonin und Tyramin Laufmittel LM 1 (Toluol:Chloroform:Triethylamin; 10:6:7, v/v/v) die besten Ergebnisse zeigte (siehe Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Standards biogener Amine (0,1 mg/ml).** Photographie einer hp-TLC-Platte unter UV-Licht (schwarz-weiß-Darstellung). Als Laufmittel wurde A = Chloroform:Diethylether:Triethylamin (6:2:1, v/v/v) und B = Toluol:Chloroform:Triethylamin (10:6:7, v/v/v) verwendet. Die biogenen Amine wurden dansyliert.

Wie in Abbildung 3.11 dargestellt, konnte durch den Einsatz von zwei parallelen Dünnschichtchromatographien mit verschiedenen Laufmitteln die Trennung aller untersuchten biogenen Amine erzielt werden. Weiter war zu erkennen, dass die besonders beachteten biogenen Amine Histamin, Phenylethylamin und Tyramin eindeutig von den anderen Aminen unterschieden werden konnten und so die Bildung dieser Verbindungen zweifelsfrei nachweisbar war. Da mit Laufmittel LM 4 (Toluol:Chloroform:Triethylamin; 10:6:7, v/v/v) die Trennung dieser Amine am Besten war, wurde dieses Laufmittel standardmäßig zur Untersuchung biogener Amin-Bildung durch die Eigenisolate eingesetzt. Durch Zugabe von 1 % Tween 80 zum Laufmittel konnte die Stabilität und Intensität der Fluoreszenzsignale der Dansylderivate noch gesteigert werden.

Zur genaueren Beschreibung der Methode wurden die Nachweisgrenzen für jedes biogene Amin bestimmt. Hierzu wurden serielle Verdünnungen der Standard-Lösungen angesetzt und diese mit Dansylchlorid derivatisiert. Anschließend wurden die Derivate dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die minimal nachweisbare Konzentration ermittelt. Ein Beispiel für die Bestimmung der Nachweisgrenze gibt Abbildung 3.12. Hier wurden die Nachweisgrenzen für Histamin und Tyramin bestimmt.



**Abbildung 3.12: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Standardlösungen biogener Amine zur Bestimmung der Nachweisgrenze.** Photographie einer hp-TLC-Platte unter UV-Licht. A = Histamin; B = Tyramin. Als Laufmittel wurde Toluol:Chloroform:Triethylamin (10:6:7, v/v/v) verwendet. Die biogenen Amine wurden dansyliert. Als Negativ-Kontrolle diente Wasser.

Aus Abbildung 3.12 geht hervor, dass sowohl Histamin als auch Tyramin noch in einer Konzentration von 10 mg/l nachweisbar waren. Die Konzentration von 1 mg/l konnte nicht mehr detektiert werden. Analog zur Durchführung der in Abbildung 3.12 dargestellten Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der Nachweisgrenze, wurde diese für weitere biogene Amine bestimmt (siehe Tabelle 3.7).

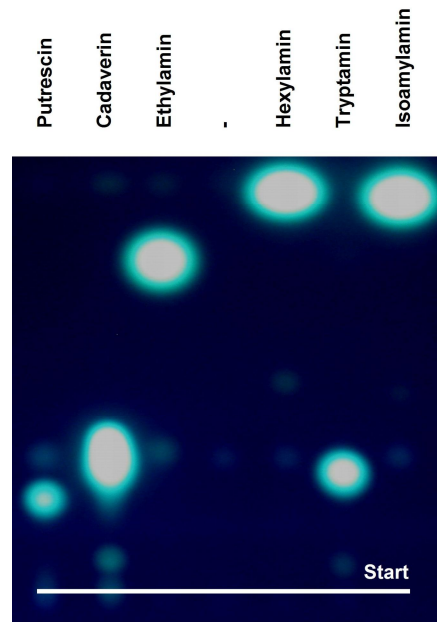
**Tabelle 3.7: Nachweisgrenzen verschiedener biogener Amine durch Dünnschichtchromatographie.**

Biogenes Amin	Minimale Nachweisgrenze [mg/l]
Agmatin	100
Ethylamin, Histamin, Hexylamin, Tryptamin, Tyramin, Spermidin, Phenylethylamin, Serotonin	10
Cadaverin, Ethanolamin, Spermin, Putresin	1
Taurin	n.d.

Während Cadaverin, Ethanolamin, Putrescin und Spermin noch in Konzentrationen von 1 mg/l detektiert werden konnten, lag die Nachweisgrenze der Mehrzahl der untersuchten Amine bei 10 mg/ml (siehe Tabelle 3.7). Lediglich Agmatin konnte nur in hohen Konzentrationen, das heißt ab 100 mg/l, nachgewiesen werden. Auffällig war, dass das biogene Amin Taurin nicht durch Dansylchlorid derivatisiert werden konnte. Da dieses Amin jedoch nicht in Wein und Most vorkommt, wurden keine weiteren Versuche zum Nachweis von Taurin durchgeführt.



Zur Verfeinerung der Methode wurde versucht durch Erhöhung der Derivatisierungstemperatur die Inkubationszeit zu verringern. Hierzu wurde die Derivatisierung der Proben bei 70 °C für 2 h, anstatt bei Raumtemperatur für 24 h durchgeführt. Abbildung 3.13 zeigt das Ergebnis dieser Schnellderivatisierung.



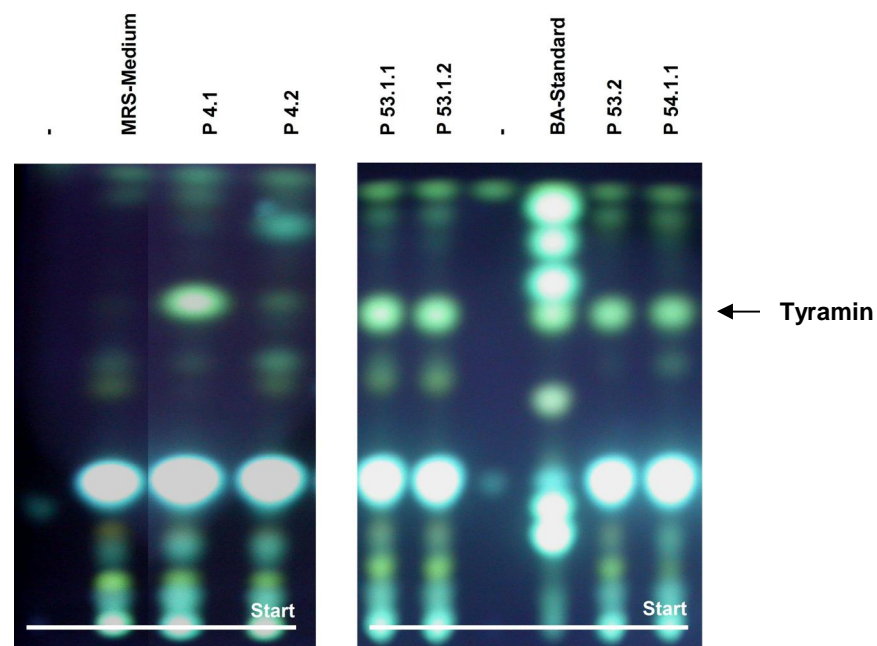
**Abbildung 3.13: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Standardlösungen biogener Amine (1 mg/ml) nach Schnellderivatisierung.** Photographie einer hp-TLC-Platte unter UV-Licht. Als Laufmittel wurde Toluol:Chloroform:Triethylamin (10:6:7, v/v/v) verwendet. Die biogenen Amine wurden dansyliert. Als Negativ-Kontrolle diente Wasser.

Durch die Erhöhung der Derivatisierungstemperatur konnte die Inkubationsdauer der Derivatisierung reduziert werden. Wie aus Abbildung 3.13 hervorgeht, konnten schon nach 2 h bei 70 °C Signale verschiedener biogener Amine nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung detektiert werden. Die Signale unterschieden sich hierbei in Intensität und Stabilität nicht von denen der Proben, die für 24 h inkubiert wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die Derivatisierung der zu untersuchenden Proben und damit die Analysezeit drastisch verkürzt werden.

Mit Hilfe der beschriebenen entwickelten und verfeinerten Dünnschichtchromatographie ist es gelungen elf verschiedene weinrelevante biogene Amine zu trennen und bis zu einer Konzentration von durchschnittlich 10 mg/l nachzuweisen. Dies diente als Grundlage zum Nachweis der Bildung biogener Amine durch die aus Versuchswainen isolierten Bakterienstämme.

### 3.3.3 Nachweis der Bildung biogener Amine durch die Eigenisolate mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Mit Hilfe der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Dünnschichtchromatographie sollte die Bildung biogener Amine durch die Eigenisolate überprüft werden. Dafür wurden die Bakterien in Kulturmedium inkubiert. Nach dem Wachstum wurde der Kulturüberstand der Eigenisolate auf das Vorhandensein von biogenen Aminen untersucht. Abbildung 3.14 zeigt die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Kulturüberstände einiger Eigenisolate.

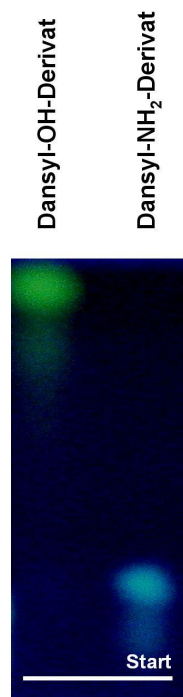


**Abbildung 3.14: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Kulturüberstände einiger Eigenisolate.** Photographie einer hp-TLC-Platte unter UV-Licht. Als Laufmittel wurde Toluol:Chloroform:Triethylamin (10:6:7, v/v/v) verwendet. Die biogenen Amine wurden dansyliert. Als Negativ-Kontrolle diente Wasser.

In Abbildung 3.14 ist zu erkennen, dass neben den Signalen, die bereits im unbeimpften MRS-Medium auftraten, weitere Signale in den Proben der Kulturüberstände detektierbar waren. Durch Abgleich mit dem Standard, konnte eine Bildung von Tyramin bei den Eigenisolaten P 4.1, P 53.1.1, P 53.1.2, P 53.2 und P 54.1.1, die als *Lactobacillus brevis* identifiziert wurden, nachgewiesen werden. Das hellgrüne Fluoreszenzsignal in den Proben wies denselben  $R_f$ -Wert auf wie das vierte Signal des Standards (von oben), welches dem biogenen Amin Tyramin zuzuordnen ist. Das Eigenisolat P 4.2 (*Pediococcus parvulus*) zeigte ein Signal mit einem  $R_f$ -Wert von 0,8 und bildete offenbar das biogene Amin Phenylethylamin.

In allen dünnschichtchromatographischen Auftrennungen der Kulturüberstände fiel auf, dass in jeder Probe ein starkes Fluoreszenzsignal mit dem  $R_f$ -Wert von etwa 0,30-0,33 auftrat, das

zwischen den Signalen von Cadaverin/Tryptamin und Histamin lag. Ebenfalls war in der Lauffront ein Signal in jeder Probe detektierbar. Da Dansylchlorid sowohl Amino- als auch Hydroxylgruppen derivatisiert, wurde untersucht, ob es sich bei den auftretenden Signalen um diejenigen der Dansyl-NH<sub>2</sub>- bzw. Dansyl-OH-Derivate handelte. Hierzu wurde zum einen Ethanol und zum anderen Ammoniak analog der Vorgehensweise bei den Proben derivatisiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (siehe Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von derivatisiertem Ammoniak und Ethanol.** Photographie einer hp-TLC-Platte unter UV-Licht. Als Laufmittel wurde Toluol:Chloroform:Triethylamin (10:6:7, v/v/v) verwendet. Die biogenen Amine wurden dansyliert.

In Abbildung 3.15 ist zu erkennen, dass sowohl in Fluoreszenzfarbe als auch in den R<sub>F</sub>-Werten die Signale, die durch Derivatisierung von Ammoniak und Ethanol entstanden sind, denen in den Kulturüberständen entsprechen. Es war somit davon auszugehen, dass es sich bei den Signalen im Medium bzw. in den Proben um die NH<sub>2</sub>- bzw. OH-Derivate des Dansylchlorids handelte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle 148 Eigenisolate dünnschichtchromatographisch auf die Bildung biogener Amine hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

**Tabelle 3.8: Verteilung der biogenen Amine, die durch dünnschichtchromatographische Auftrennung der Kulturüberstände der Eigenisolate nachgewiesen werden konnten.<sup>a</sup>**

Art	Anzahl der Stämme	Anzahl der Produzenten	Ety <sup>b</sup>	His <sup>b</sup>	Tyr <sup>b</sup>	Phe <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>	58	58	4	8	58	6
<i>Lactobacillus casei</i>	3	2	-	1	2	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	5	4	2	4	-	-
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus damnosus</i>	9	4	-	2	3	-
<i>Pediococcus parvulus</i>	5	2	-	2	2	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4	2	-	-	1	1
<i>Oenococcus oeni</i>	49	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter oeni</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter tropicalis</i>	3	2	-	-	2	-
<i>Staphylococcus condimentii</i>	2	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus capitis</i>	7	6	-	5	2	3
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	1	1	-	-	1	1
<b>Summe</b>	148	81	6	22	71	12

<sup>a</sup> Ety = Ethylamin, His = Histamin, Tyr = Tyramin, Phe = Phenylethylamin

<sup>b</sup> Absolute Anzahl der produzierenden Stämme

Insgesamt waren 81 der 148 isolierten Stämme in der Lage, mindestens ein biogenes Amin zu bilden (siehe Tabelle 3.8). Hierbei war Tyramin, welches von 71 Stämmen gebildet wurde, das am häufigsten auftretende Amin. Während Histamin in 22 Kulturüberständen detektierbar war, wurde die Produktion der biogenen Amine Phenylethylamin und Ethylamin in 12 bzw. 6 Stämmen nachgewiesen. Betrachtet man nur die Milchsäurebakterien, so ließ sich bei 72 der 134 Eigenisolate die Produktion biogener Amine nachweisen. Auch hier handelte es sich vor allem um Tyramin (66 Stämme). Histamin wurde von 17, Phenylethylamin von 8 und Ethylamin von 6 Stämmen gebildet. Auffällig war, dass nicht alle isolierten Arten von Milchsäurebakterien in der Lage waren biogene Amine zu bilden. So wurden in allen Kulturüberständen der Stämme, die als *Lactobacillus brevis* identifiziert wurden, biogene Amine detektiert, während eine Bildung dieser Verbindungen durch *Oenococcus oeni* und *Lactobacillus hilgardii* nicht nachgewiesen werden konnte. Bei den anderen Arten zeigte sich, dass die Bildung biogener Amine stammspezifisch war, da z.B. bei den isolierten Pediokokken-Stämmen nur etwa die Hälfte der Kulturüberstände biogene Amine enthielt.

Tyramin, welches das häufigste biogene Amin darstellte, wurde von allen Stämmen von *Lactobacillus brevis* gebildet. Daneben konnte eine Produktion der anderen drei biogenen Amine (Ethylamin, Histamin und Phenylethylamin) durch diese Spezies nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Art gab es auch Stämme, die in der Lage waren bis zu drei biogene Amine zu bilden. Die Arten *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus paracasei* zeichneten sich durch die Bildung von Histamin aus. So konnte dieses Amin in 5 der 8 untersuchten Stämme detektiert werden. Bei *Leuconostoc mesenteroides* konnte die Bildung von Tyramin und Phenylethylamin in je einem Stamm nachgewiesen werden. Das am häufigsten gebildete Amin bei den Pediokokken war ebenfalls das Tyramin. Es konnte in 5 der 14 isolierten Stämme nachgewiesen werden, gefolgt von Histamin (4 Stämme) und Phenylethylamin (1 Stamm). Wie bereits erwähnt enthielt kein Kulturüberstand der 49 *Oenococcus oeni*-Stämme biogene Amine.

Auch bei den isolierten Essigsäurebakterien konnte bei 2 Stämmen der Art *Acetobacter tropicalis* eine Bildung von Tyramin detektiert werden. Die anderen beiden Stämme zeigten hingegen keine Produktion dieser Verbindungen. Von den 10 *Staphylococcus*-Isolaten waren 7 in der Lage biogene Amine zu bilden. Hierbei handelte es sich vor allem um Histamin (5 Stämme). Auffällig war die gleichzeitige Bildung mehrerer biogener Amine durch einen *Staphylococcus*-Stamm.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass etwa 54 % der isolierten Milchsäurebakterien in der Lage waren unter den gegebenen Versuchsbedingungen ein oder mehrere biogene Amine zu bilden. Tyramin wurde hierbei von 49 % der Milchsäurebakterien-Isolate gebildet, gefolgt von Histamin (13 %), Phenylethylamin (6 %) und Ethylamin (4 %).

### 3.3.4 Quantifizierung der Bildung biogener Amine

Neben der dünnschichtchromatographischen Untersuchung von Kulturüberständen der isolierten Bakterien, wurde die Bildung biogener Amine bei fünf ausgewählten Stämmen verschiedener Arten mit Hilfe von HPLC-Analyse quantifiziert. Hierzu wurde eine am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung entwickelte Umkehrphasen-HPLC Methode mit einer Vorsäulenderivatisierung der Amine mit *ortho*-Phtaldialdehyd (OPA) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.9: Quantifizierung der Bildung biogener Amine durch einige Eigenisolate.<sup>a</sup>

Art (Stamm)	Eta	His	Ser	Ety	Tyr	Try	Phe	Iso	Cad	Put
	[mg/ml]									
<i>Pc. parvulus</i> P 4.2	4,01	11,9	n.d.	5,28	1,97	0,18	n.d.	2,5	0,38	0,08
<i>Lb. brevis</i> P 17.2	1,11	3,02	n.d.	5,39	1,91	0,81	0,23	1,92	0,18	n.d.
<i>Lb. casei</i> P 26	2,23	4,12	n.d.	5,53	1,22	0,74	0,33	1,41	0,18	n.d.
<i>Lb. paracasei</i> P 104.1	1,17	9,1	n.d.	6,72	n.d.	0,4	n.d.	2,69	0,15	0,68
<i>Lc. mesenteroides</i> P 325	0,42	5,67	1,93	4,61	8,9	0,18	0,53	1,58	0,09	0,16

<sup>a</sup> Eta = Ethanolamin, His = Histamin, Ser = Serotonin, Ety = Ethylamin, Tyr = Tyramin, Try = Tryptamin, Phe = Phenylethylamin, Iso = Isoamylamin, Cad = Cadaverin, Put = Putrescin; *Pc.* = *Pediococcus*, *Lb.* = *Lactobacillus*, *Lc.* = *Leuconostoc*; n.d. = nicht detektiert.

Wie in Tabelle 3.9 ersichtlich konnte mit Hilfe der HPLC eine Vielzahl biogener Aminen nachgewiesen werden. Neben den Aminen Ethylamin, Histamin, Phenylethylamin und Tyramin, deren Bildung durch die Eigenisolate mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen wurde, wurden des weiteren die Amine Cadaverin, Ethanolamin, Isoamylamin, Putrescin, Serotonin und Tryptamin detektiert. Mit Ausnahme von Ethanolamin und Isoamylamin lagen die Konzentrationen dieser biogenen Amine jedoch unter 1 mg/l. Histamin und Ethylamin wurde in allen untersuchten Proben mit einer Konzentration von 3,02 bis 11,9 mg/l (Histamin) bzw. 4,61 bis 6,72 mg/l (Ethylamin) nachgewiesen. Tyramin, welches das am häufigsten nachgewiesene biogene Amin bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Eigenisolate war, konnte in vier der fünf Stämme in Konzentrationen von 1,22 bis 8,89 mg/l wiedergefunden werden. Das Eigenisolat *Lactobacillus paracasei* P 104.1 zeigte jedoch schon bei der Dünnschichtchromatographie keine Bildung von Tyramin. Eine Bildung von Cadaverin und Tryptamin konnte in allen untersuchten Stämmen detektiert werden. Mit Konzentrationen von unter einem mg/l war diese jedoch nicht sehr ausgeprägt. Eine Bildung von Serotonin war nur bei *Leuconostoc mesenteroides* P 325 zu beobachten. Dieser Stamm zeichnete sich auch durch eine besonders hohe Bildung von Tyramin aus (8,89 mg/l). Die Gesamt-Konzentration der gebildeten biogenen Amine betrug von 14,57 mg/l bei *Lactobacillus brevis* P 17.2 bis zu 23,38 mg/l bei *Pediococcus parvulus* P 4.2 und somit durchschnittlich 20,33 mg/l.

Durch die Quantifizierung der biogenen Amine konnte ein Überblick über die Konzentrationen der gebildeten biogenen Amine gewonnen werden. Weiterhin wurde die Bildung weiterer Amine nachgewiesen. Dass diese gebildeten biogenen Amine nicht mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nachweisbar waren, ist höchstwahrscheinlich der Nachweisgrenze der einzelnen Verbindungen geschuldet. Somit stellte die HPLC eine sinnvolle Ergänzung zu den Ergebnissen der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der Eigenisolate dar.

### 3.4 Der Testorganismus *Lactobacillus brevis* B 190

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Enzyme zu isolieren und identifizieren, mit denen man in der Lage ist, das Wachstum von biogenen Aminen bildenden Bakterien zu hemmen. Hierzu wurde ein Testorganismus gewählt, der im Milieu Most und Wein zu finden ist und biogene Amine produziert. Die Wahl fiel hierbei auf *Lactobacillus brevis* B 190.

#### 3.4.1 Molekularbiologische Identifizierung von *Lactobacillus brevis* B 190

Zur molekularbiologischen Identifizierung des Stammes B 190, der in der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung als *Lactobacillus buchneri* hinterlegt war, wurde dessen 16S rDNA mit Hilfe von PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (siehe Tabelle 3.10, Sequenz siehe Anhang).

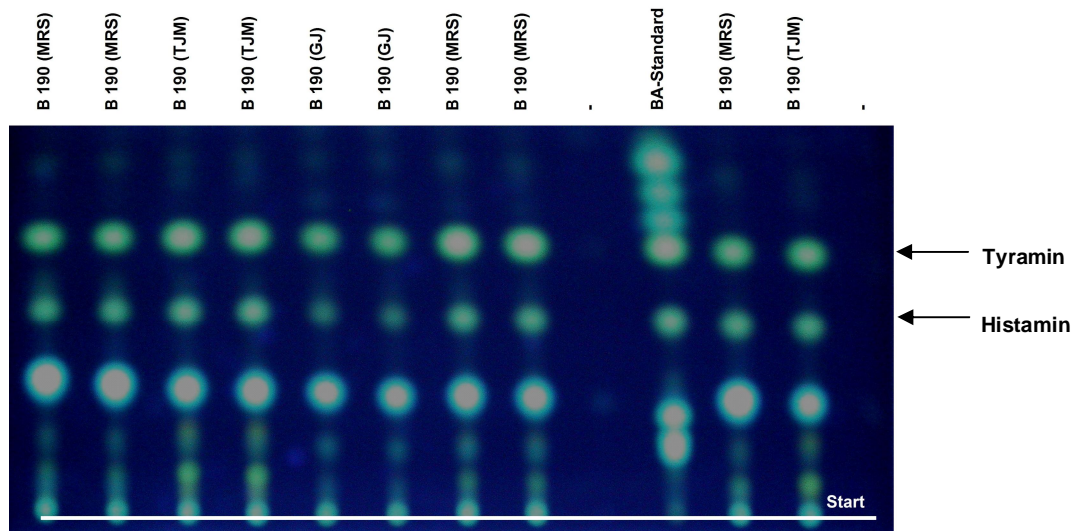
**Tabelle 3.10: Ergebnisse der Datenbank-Analyse der 16S rDNA-Sequenz von Stamm B190.**

Stamm	Nächster Verwandter (NCBI Datenbank)	Sequenzidentität [bp/bp]
B 190	<i>Lactobacillus brevis</i> GIMC3:BVL-390 Accession number: <a href="#">JF728255.1</a>	998/1001 (99 %)

Durch Sequenzierung der 16S rDNA konnte der Stamm B 190 als *Lactobacillus brevis* identifiziert werden.

#### 3.4.2 Bildung biogener Amine durch *Lactobacillus brevis* B 190 unter weinrelevanten Bedingungen

Nachdem der Testorganismus eindeutig identifiziert werden konnte, wurde dieser hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Bildung biogener Amine untersucht. Dazu wurden Kulturüberstände von *Lactobacillus brevis* B 190 mit Dansylchlorid derivatisiert und anschließend die Derivate dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Der Testorganismus wurde in drei verschiedenen Medien (MRS-Medium, TJ-Medium und Traubensaft) kultiviert, um eine etwaige Abhängigkeit der Produktion biogener Amine vom Kulturmedium zu untersuchen (siehe Abbildung 3.16).

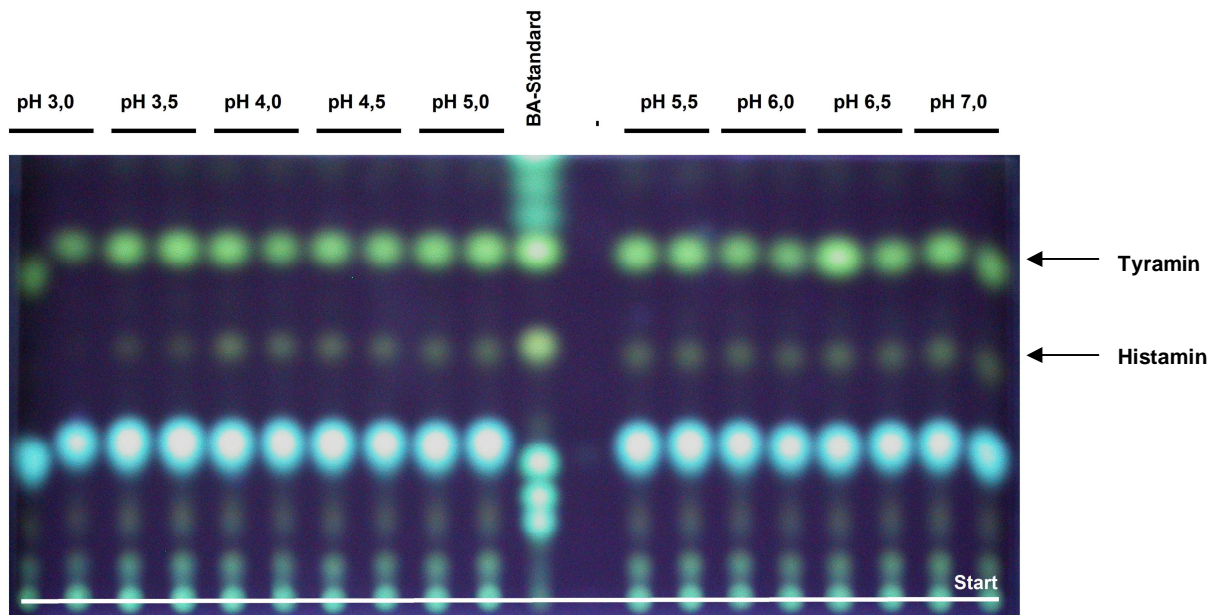


**Abbildung 3.16: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Kulturüberstände von *Lactobacillus brevis* B 190, angezogen in verschiedenen Kulturmedien (angegeben in Klammern).** Photographie einer hp-TLC-Platte unter UV-Licht. Als Laufmittel wurde Toluol:Chloroform:Triethylamin (10:6:7, v/v/v) verwendet. Die biogenen Amine wurden dansyliert. Als Negativ-Kontrolle diente Wasser. GJ = Traubensaft.

Wie in Abbildung 3.16 zu erkennen, war der Testorganismus *Lactobacillus brevis* B 190 in der Lage in allen untersuchten Kulturmedien biogene Amine zu bilden. Die Signale in den Proben entsprachen hierbei denen von Histamin und Tyramin, deren Signalstärke in allen Medien nahezu gleichmäßig ausgeprägt war. Lediglich das Histamin-Signal in den Kulturüberständen des Traubensafts war etwas schwächer. Somit konnte bewiesen werden, dass *Lactobacillus brevis* B 190 ein potentieller Bildner biogener Amine darstellt. Da dieser Organismus ebenfalls im Traubensaft Histamin und Tyramin bildete, war dieser Stamm ein Repräsentant für die mögliche Bildung biogener Amine während der Weinbereitung. Dies sollte in weiteren Versuchen spezifiziert werden.

Wichtige Parameter während der Weinbereitung sind die Temperatur und der pH-Wert. Um die Bildung biogener Amine durch *Lactobacillus brevis* B 190 unter verschiedenen weinrelevanten Bedingungen zu testen, wurde dieser bei vier verschiedenen Temperaturen und neun verschiedenen pH-Werten kultiviert. Der Nachweis der biogenen Amine erfolgte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.

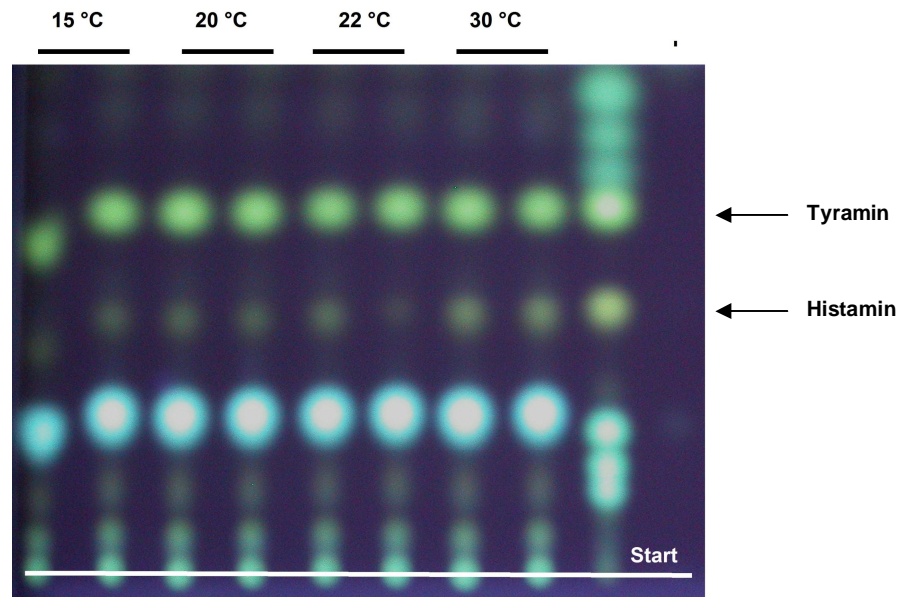




**Abbildung 3.17:** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Kulturüberstände von *Lactobacillus brevis* B 190, angezogen bei verschiedenen pH-Werten. Photographie einer hp-TLC-Platte unter UV-Licht. Als Laufmittel wurde Toluol:Chloroform: Triethylamin (10:6:7, v/v/v) verwendet. Die biogenen Amine wurden dansyliert. Als Negativ-Kontrolle diente Wasser.

Aus Abbildung 3.17 geht hervor, dass Tyramin in allen Proben vorhanden war. Auch die Intensität der Signale war in nahezu allen Proben gleichmäßig ausgeprägt. Es ließ sich also festhalten, dass die Bildung von Tyramin vom pH-Wert des Mediums unabhängig ist. Histamin hingegen konnte erst ab einem pH-Wert des Mediums von 4,0 zweifelsfrei detektiert werden. Bei pH-Wert 3,5 ließ sich bereits eine schwache Bildung von Histamin vermuten. Wurde der Testorganismus bei einem pH-Wert von 3,0 kultiviert, konnte keine Bildung von Histamin im Medium detektiert werden. Die Fluoreszenzstärke der Histamin-Signale in den Proben der pH-Werte 4,0 bis 7,0 war gleichbleibend und etwas schwächer als die Tyramin-Signale.

Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der Bildung biogener Amine von der Kultivierungstemperatur untersucht.



**Abbildung 3.18: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Kulturüberstände von *Lactobacillus brevis* B 190, angezogen bei verschiedenen Temperaturen.** Photographie einer hp-TLC-Platte unter UV-Licht. Als Laufmittel wurde Toluol:Chloroform:Triethylamin (10:6:7, v/v/v) verwendet. Die biogenen Amine wurden dansyliert. Als Negativ-Kontrolle diente Wasser.

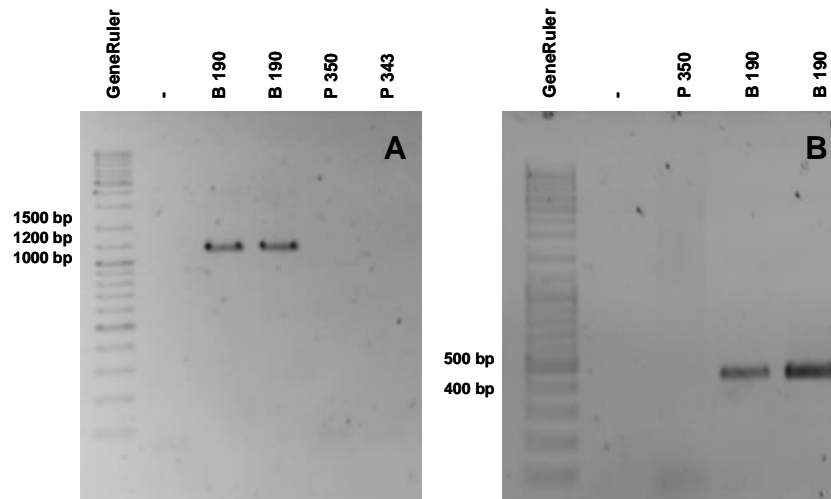
Bei allen getesteten Temperaturen war eine Produktion von Histamin und Tyramin durch *Lactobacillus brevis* B 190 zu detektieren (siehe Abbildung 3.18). Auch hier war die Signalstärke von Tyramin in allen Proben höher als die des Histamins. Darüber hinaus unterschieden sich die Signal-Muster der Kulturüberstände der einzelnen Kultivierungstemperaturen weitgehend nicht. Lediglich bei den Kulturen die bei 30 °C gewachsen waren, konnte eine stärkere Ausprägung des Histamin-Signals als in den restlichen Proben nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass *Lactobacillus brevis* B 190 in der Lage war unter weinrelevanten Bedingungen, d.h. niedrige Temperaturen und pH-Werte, biogene Amine zu produzieren. Die Bildung von Tyramin konnte dabei bei allen untersuchten Parametern detektiert werden, wohingegen Histamin bei pH-Werten unter 4,0 nur kaum oder gar nicht nachgewiesen werden konnte.

### 3.4.3 Identifizierung und Sequenzierung der Decarboxylase-Gene bei *Lactobacillus brevis* B 190

Nachdem die Produktion von Histamin und Tyramin durch *Lactobacillus brevis* B 190 mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie festgestellt wurde, sollten die Gene für Enzyme zur Bildung dieser biogenen Amine nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um zwei Decarboxylasen, welche die Abspaltung der Carboxyl-Gruppen von Histidin und Tyrosin

katalysieren und hierdurch Histamin bzw. Tyramin bilden. Zum Nachweis dieser Gene wurden spezifische Primer für die Histidin-Decarboxylase und Tyrosin-Decarboxylase verwendet.



**Abbildung 3.19: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von *Lactobacillus brevis* B 190 nach Amplifikation der Decarboxylase-Gene.** Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung). A = Nachweis des Gens der Tyrosin-Decarboxylase; B = Nachweis des Gens der Histidin-Decarboxylase. Als Kontrolle diente PCR-Wasser. *Oenococcus oeni* P 343 und P 350 dienen als Negativkontrolle.

In Abbildung 3.19 A ist in beiden Proben von *Lactobacillus brevis* B 190 ein PCR-Amplifikat mit einer Größe von ca. 1200 bp zu erkennen. In den beiden Proben von *Oenococcus oeni* P 343 und P 350 konnte dieses DNA-Fragment nicht wiedergefunden werden. *Oenococcus oeni* wurden als Negativ-Kontrolle gewählt, da beide Stämme bei der dünnschicht-chromatographischen Untersuchung der Eigenisolate auf die Bildung biogener Amine keine Produktion dieser Verbindungen zeigten. Ein PCR-Produkt der ungefähren Größe von 500 bp konnte bei der Amplifikation des Gens für die Histidin-Decarboxylase in den beiden Proben von *Lactobacillus brevis* B 190 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.19 B). Auch hier war kein PCR-Produkt bei der Negativ-Kontrolle *Oenococcus oeni* P 350 zu erkennen.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den Amplifikaten tatsächlich um die Gene der Decarboxylasen handelte, wurden diese sequenziert. Die Ergebnisse dieser Sequenzierung sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

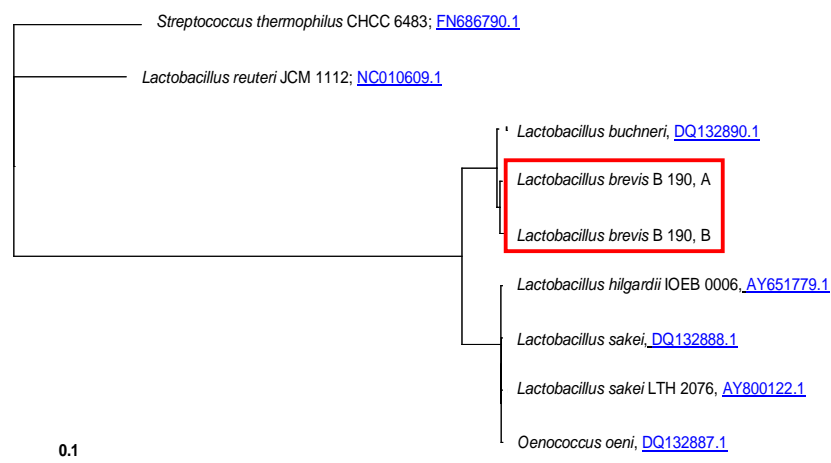
**Tabelle 3.11: Ergebnisse der Datenbank-Analyse von Sequenzen der PCR-Produkte nach Amplifizierung der Decarboxylase-Gene.<sup>a</sup>**

Stamm	Spezies	Gen	Nächster Verwandter (NCBI Datenbank)	Sequenzidentität [bp/bp]
B 190	<i>Lb. brevis</i>	TDC	<i>Lb. brevis</i> , Tyrosin-Decarboxylase Operon Accession number: <a href="#">AF446085.5</a>	354/357 (99 %)
B 190	<i>Lb. brevis</i>	TDC	<i>Lb. brevis</i> , Tyrosin-Decarboxylase Operon Accession number: <a href="#">AF446085.5</a>	886/887 (99 %)
B 190	<i>Lb. brevis</i>	TDC	<i>Lb. brevis</i> , Tyrosin-Decarboxylase Operon Accession number: <a href="#">AF446085.5</a>	982/984 (99 %)
B 190	<i>Lb. brevis</i>	TDC	<i>Lb. brevis</i> , Tyrosin-Decarboxylase Operon Accession number: <a href="#">AF446085.5</a>	987/988 (99 %)
B 190	<i>Lb. brevis</i>	TDC	<i>Lb. fermentum</i> RAF15800, Tyrosin-Decarboxylase Accession number: <a href="#">EF371900.1</a>	258/258 (100 %)
B 190	<i>Lb. brevis</i>	HDC	<i>Lb. buchneri</i> , Histidin-Decarboxylase; Accession number: <a href="#">DQ132890.1</a>	394/398 (99 %)
B 190	<i>Lb. brevis</i>	HDC	<i>Lb. buchneri</i> , Histidin-Decarboxylase; Accession number: <a href="#">DQ132890.1</a>	385/386 (99 %)

<sup>a</sup> *Lb.* = *Lactobacillus*

Durch Recherchen in der NCBI-Datenbank konnten die PCR-Produkte mit einer Größe von ca. 1200 bp als das Gen für eine Tyrosin-Decarboxylase identifiziert werden. Die ermittelte Sequenz wurde mit einer Sequenzidentität von 99 % dem Tyrosin-Decarboxylase Operon von *Lactobacillus brevis* (Accession number: [AF446085.5](#)) zugeordnet. Dabei wurden bis zu 988 bp für den Sequenzabgleich verwendet (siehe Tabelle 3.11). Eine Teilsequenz der PCR-Produkte war zu 100 % übereinstimmend mit der Sequenz für das Gen einer Tyrosin-Decarboxylase von *Lactobacillus fermentum* RAF 15800 (Accession number: [EF371900.1](#)). Jedoch hatte die in der Datenbank hinterlegte Sequenz nur eine Länge von 258 bp, so dass eine verlässliche Aussage über die Sequenzidentität nicht gegeben war.

Bezüglich der Sequenz der PCR-Produkte mit einer Größe von ca. 500 bp, konnte eine Sequenzidentität von 99 % mit dem Gen einer Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus buchneri* (Accession number: [DQ132890.1](#)) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.11). Da diese Sequenz nicht der Art *Lactobacillus brevis* zugeordnet war und sich ebenfalls keine Sequenz einer Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus brevis* in der NCBI-Datenbank befand, wurde ein phylogenetischer Stammbaum mit den Gensequenzen verschiedener Histidin-Decarboxylasen von naheverwandten Mikroorganismen erstellt. Dies sollte der phylogenetischen Einordnung des Gens für die Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus brevis* B 190 dienen.



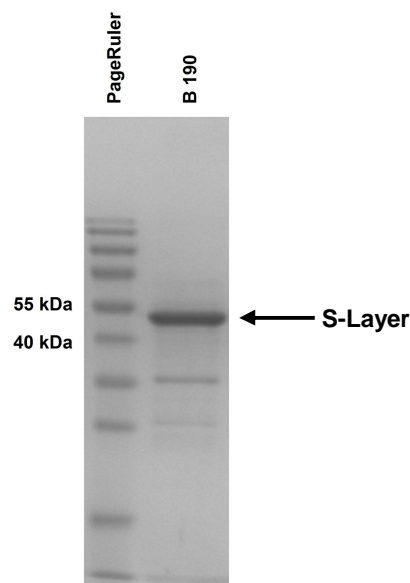
**Abbildung 3.20: Phylogenetischer Stammbaum der Gensequenzen für eine Histidin-Decarboxylase verschiedener Mikroorganismen.** Zur Erstellung des Stammbaums wurde ein Alignment der Sequenzen mit Hilfe der Software ClustalX durchgeführt (siehe Anhang). Die Darstellung des Stammbaums erfolgte mit Hilfe von TreeView. Als Outgroup wurde *Streptococcus thermophilus* bestimmt. Die Accession number der einzelnen Sequenzen ist in blau dargestellt. Die ermittelten HDC-Sequenzen von *Lactobacillus brevis* B 190 sind rot umrandet (Parallele A und B).

Aus Abbildung 3.20 geht hervor, dass das Gen für die Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus brevis* B 190 in naher phylogenetischer Verwandtschaft zu *Lactobacillus buchneri* steht (siehe rote Umrandung). Hierbei ist jedoch eine Abspaltung des Astes der Sequenzen von *Lactobacillus brevis* B 190 vom *Lactobacillus buchneri* zu erkennen. Einen weiteren Ast bilden die Gensequenzen von *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus sakei* und *Oenococcus oeni*. Innerhalb dieses Astes ist jedoch keine Abspaltung einer Art zu erkennen, so dass davon auszugehen ist, dass bei diesen Sequenzen eine hohe Identität besteht. Neben den bereits erwähnten Arten zeigt die Gensequenz der Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus reuteri* eine deutliche Entfernung von diesen. Somit hat dieses Milchsäurebakterium eine nähere phylogenetische Verwandtschaft zur Outgroup *Streptococcus thermophilus* als zu den anderen *Lactobacillus*-Arten und *Oenococcus oeni*.

Zusätzlich zum dünnenschichtchromatographischen Nachweis der Bildung von Histamin und Tyramin, konnte für den Testorganismus *Lactobacillus brevis* B 190 somit das Vorhandensein der Gene für die Histidin-Decarboxylase und Tyrosin-Decarboxylase nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigten die Tatsache, dass es sich bei diesem Organismus um einen potentiellen Schädling während der Weinbereitung handelte. Somit wurde dieses Bakterium als Zielorganismus für die Untersuchung lytischer Enzyme ausgewählt.

#### 3.4.4 Extraktion und Reinigung von S-Layer-Proteinen von *Lactobacillus brevis* B 190

Manche Bakterien besitzen als zusätzliche Schutzschicht auf der Zellwand noch S-Layer. Hierbei handelt es sich um 2-dimensionale Strukturen, die aus Proteinen bestehen und Poren definierter Größe aufweisen, welche eine Barriere für Exoenzyme darstellen. Sind diese Strukturen vorhanden, können sie somit Enzyme, die die Zellwand von Bakterien lysieren, am Angriff auf diese hindern. Um zu überprüfen ob *Lactobacillus brevis* B 190 einen S-Layer besitzt, wurde dieser extrahiert und gereinigt. Dies geschah durch Ausschütteln des S-Layers mit Lithium-Chlorid. Nach der Extraktion wurde das Vorhandensein eines S-Layers mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft (siehe Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21: Gelelektrophoretische Auftrennung des extrahierten S-Layers von *Lactobacillus brevis* B 190.** Photographie einer SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Die Probe wurde 1:10 mit eH<sub>2</sub>O verdünnt.

In der Probe von *Lactobacillus brevis* B 190 konnte nach der Gelelektrophorese eine starke Proteinbande mit einer ungefähren Größe von 50 kDa nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.21). Es waren noch weitere, jedoch schwächere Banden mit niedrigeren

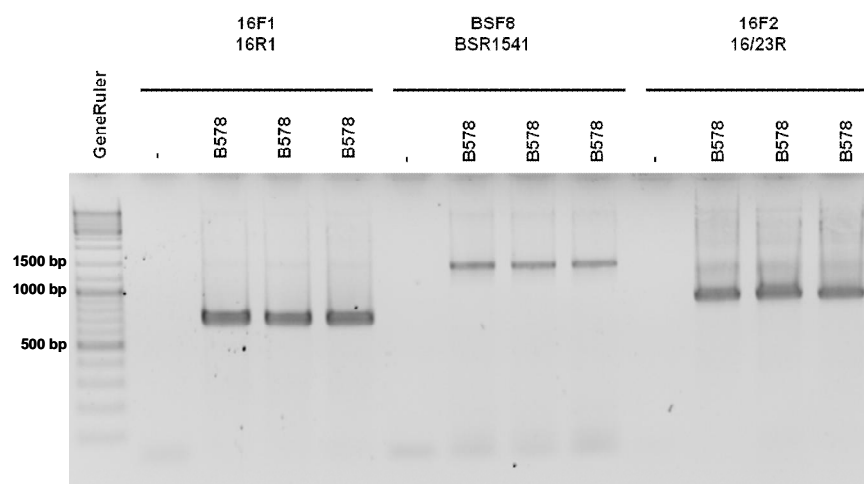
Molekulargewichten zu erkennen. Aufgrund der Stärke der Hauptproteinbande war davon auszugehen, dass es sich hierbei um den S-Layer von *Lactobacillus brevis* B 190 handelte. Somit konnte die Existenz dieser zusätzlichen Schutzschicht bei dem gewählten Testorganismus nachgewiesen werden.

### 3.5 Physiologische und phylogenetische Analysen zur Identifizierung von *Streptomyces* sp. B 578

Auf der Grundlage verschiedener molekularbiologischer und physiologischer Merkmale sollte der Produzenten-Stamm *Streptomyces* sp. B 578 identifiziert werden (Sebastian, 2008; Blättel *et al.*, 2009).

#### 3.5.1 Sequenzierung der kompletten 16S rDNA von *Streptomyces* sp. B 578

Zur Identifizierung von *Streptomyces* sp. B 578 wurde die Gesamt-DNA isoliert und anschließend eine PCR mit Primern zur Amplifikation der 16S rDNA durchgeführt. Hierzu wurde, anhand von Sequenzen aus der NCBI-Datenbank, ein Alignment berechnet anhand dessen Primer konstruiert wurden, mit denen die gesamte 16S rDNA amplifiziert werden konnte. Abbildung 3.22 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der entstandenen PCR-Produkte nach der Amplifizierung der 16S rDNA.



**Abbildung 3.22: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von *Streptomyces* sp. B 578 nach Amplifikation verschiedener Teilbereiche der 16S rDNA.** Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung). Als Kontrolle diente PCR-Wasser.

In der Abbildung 3.22 sind Banden verschiedener Größe zu erkennen. Bei dem Amplifikat des Primer-Paars 16F1/16F2 mit einer Größe von ca. 750 bp, handelt es sich um den Anfang der 16S rDNA. Das Amplifikat bei 1500 bp stellte den mittleren Teil der 16S rDNA dar und wurde durch das Primer-Paar BSF8/BSR1541 amplifiziert. Das dritte PCR-Produkt (ca. 1000 bp), amplifiziert mit dem Primer-Paar 16F2 und 16/23S, entsprach dem Ende der 16S rDNA. Die entstandenen PCR-Produkte wurden sequenziert.

Durch Datenbankrecherche konnten der Anfang und das Ende der 16S rDNA bei Streptomycceten ermittelt werden. Die jeweiligen Sequenzen sind in Tabelle 3.12 dargestellt.

**Tabelle 3.12: Anfangs- und Endsequenz der 16S rDNA von Streptomycceten.**

Abschnitt der 16S rDNA	Sequenz
Beginn	5'- TCA CGG AGA GTT TGA - 3'
Ende	5'- CTC CTT TCT AAG GAG CA - 3'

Anhand der erhaltenen Sequenzen und der bekannten Anfangs- und Endsequenzen der 16S rDNA konnte die Gesamt-Sequenz der 16S rDNA von *Streptomycces* sp. B 578 ermittelt werden (siehe Anhang).

### 3.5.2 Phylogenetische Untersuchungen zur Identifizierung von *Streptomycces* sp. B 578

Mit der ermittelten Gesamtsequenz der 16S rDNA von *Streptomycces* sp. B 578 wurden verschiedene Datenbankrecherchen durchgeführt (NCBI-BLAST und Ez-Taxon). Hierbei wies der Stamm bei der NCBI-BLAST-Suche eine 100 %-ige Sequenzidentität mit *Streptomycces sampsonii* ATCC 25495 auf. Anhand der Ez-Taxon-Suche konnte eine Sequenzidentität von 99,931 % mit dem Typstamm DSM 40455 von *Streptomycces albidoflavus* ermittelt werden.

Zur genaueren Überprüfung der phylogenetischen Zuordnung von *Streptomycces* sp. B 578 wurde die Gesamtsequenz der 16S rDNA nahverwandter Streptomycceten analog der Vorgehensweise von B 578 ermittelt. Die Ergebnisse der Amplifizierung der DNA-Bereiche sind in Abbildung 3.23 dargestellt.



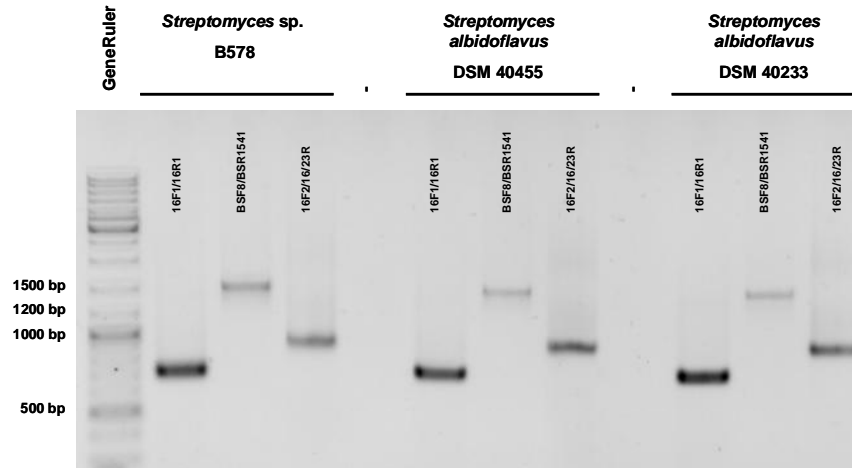
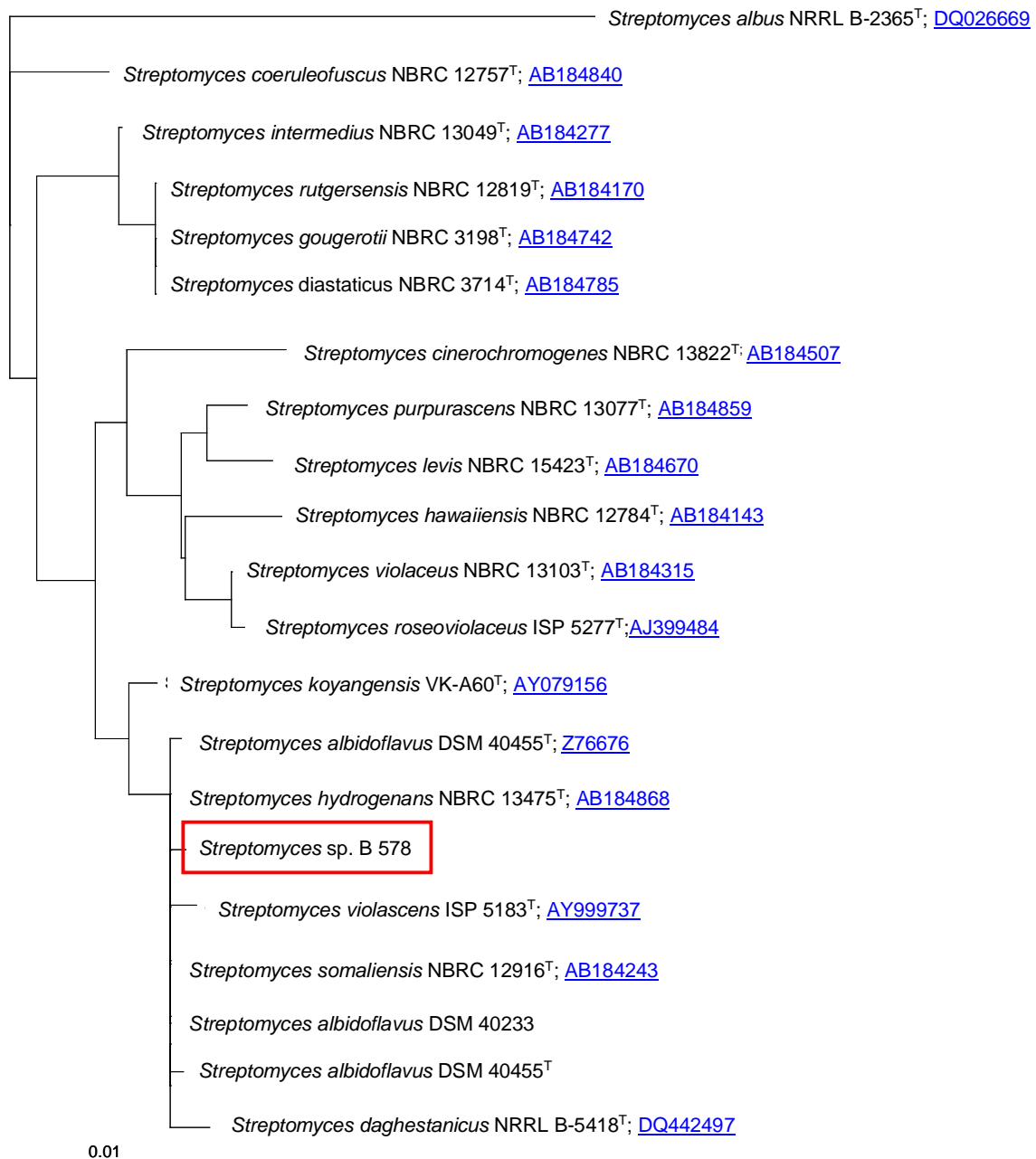


Abbildung 3.23: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von *Streptomyces* sp. B 578, *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455 und *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 nach Amplifikation verschiedener Teilbereiche der 16S rDNA. Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung). Als Kontrolle diente PCR-Wasser.

Die entstandenen PCR-Produkte wiesen die gleiche Größe auf wie in Abbildung 3.22. Alle Amplifikate wurden sequenziert und die Gesamtsequenzen der 16S rDNA ermittelt.

Anhand dieser Sequenzen wurde ein phylogenetischer Stammbaum berechnet, der in Abbildung 3.24 dargestellt ist.



**Abbildung 3.24: Phylogenetischer Stammbaum einiger Streptomyceten aufgrund der Gensequenzen ihrer 16S rDNA.** Zur Erstellung des Stammbaums wurde ein Alignment der Sequenzen mit Hilfe der Software ClustalX durchgeführt (siehe Anhang). Die Darstellung des Stammbaums erfolgte mit Hilfe von TreeView. Als Outgroup wurde *Streptomyces albus* bestimmt. Die Accession number der einzelnen Sequenzen ist in blau dargestellt.

Aus Abbildung 3.24 geht hervor, dass *Streptomyces* sp. B 578 (siehe rote Umrandung) zusammen mit *Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces daghestanicus*, *Streptomyces hydrogenans*, *Streptomyces somaliensis* und *Streptomyces violascens* ein Cluster bildet. Vergleicht man nun die Astlängen, so ist zu erkennen, dass *Streptomyces* sp. B 578 die nächste Verwandtschaft zu *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455 und *Streptomyces*

*albidoflavus* DSM 40233 aufweist. Die Ergebnisse des paarweisen Alignments (NCBI) der 16S rDNA-Sequenzen dieser drei Stämme zeigt Tabelle 3.13.

**Tabelle 3.13: Ergebnisse der paarweisen Alignments verschiedener Stämme von *Streptomyces albidoflavus*.**

Stämme	Sequenzidentität [%]	Identische bp
DSM 40455 und B 578	99,675	1532/1537
DSM 40233 und B 578	99,675	1532/1537
DSM 40455 und DSM 40233	99,869	1533/1535

In allen Kombinationen zeigte sich eine Sequenzidentität von über 99,6 %. Somit war davon auszugehen, dass es sich bei *Streptomyces* sp. B 578 um *Streptomyces albidoflavus* handelt. Diese Annahme sollte durch Untersuchungen zur Zuckerverwertung bestätigt werden.

### 3.5.3 Zuckerverwertung von *Streptomyces* sp. B 578

Zur Überprüfung der Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchungen von *Streptomyces* sp. B 578 wurde dieser auf einem Mangelmedium mit nur einer C-Quelle kultiviert. So sollte gezeigt werden, welche Zucker das Bakterium zum Wachstum verwerten kann. Als Referenzen wurden der Typstamm DSM 40455 und der Stamm DSM 40233 von *Streptomyces albidoflavus* analog zum Stamm B 578 kultiviert.

**Tabelle 3.14: Wachstum verschiedener Stämme von *Streptomyces albidoflavus* mit unterschiedlichen C-Quellen. Wachstum für sieben Tage bei 30 °C.**

C-Quelle	<i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40233
Adonitol	-	-	-
Cellulose	-	-	-
Cystein	-	-	-
Fructose	+	+	+
Galaktose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Glycerin	+	+	+

+ = Wachstum; - = kein Wachstum

Tabelle 3.14: Wachstum verschiedener Stämme von *Streptomyces albidoflavus* mit unterschiedlichen C-Quellen. Wachstum für sieben Tage bei 30 °C (Fortsetzung).

C-Quelle	<i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40233
Inositol	-	-	-
Lactose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Mannose	+	+	+
Propionat	-	-	-
Raffinose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Ribose	+	+	+
Saccharose	-	-	-
Stärke	+	+	+
Xylolose	+	+	+
eH <sub>2</sub> O (Kontrolle)	-	-	-

+ = Wachstum; - = kein Wachstum

Wie in Tabelle 3.14 zu erkennen, zeigten alle drei untersuchten Stämme von *Streptomyces albidoflavus* Wachstum bei den gleichen C-Quellen. Eine Verwertung der Zucker Raffinose und Rhamnose, der Zuckeralkohle Adonitol und Inositol sowie der Aminosäure Cystein und der Säure Propionat als einzige C-Quelle zum Wachstum konnte nicht beobachtet werden. Ebenfalls war keiner der untersuchten Stämme in der Lage Cellulose oder Saccharose abzubauen.

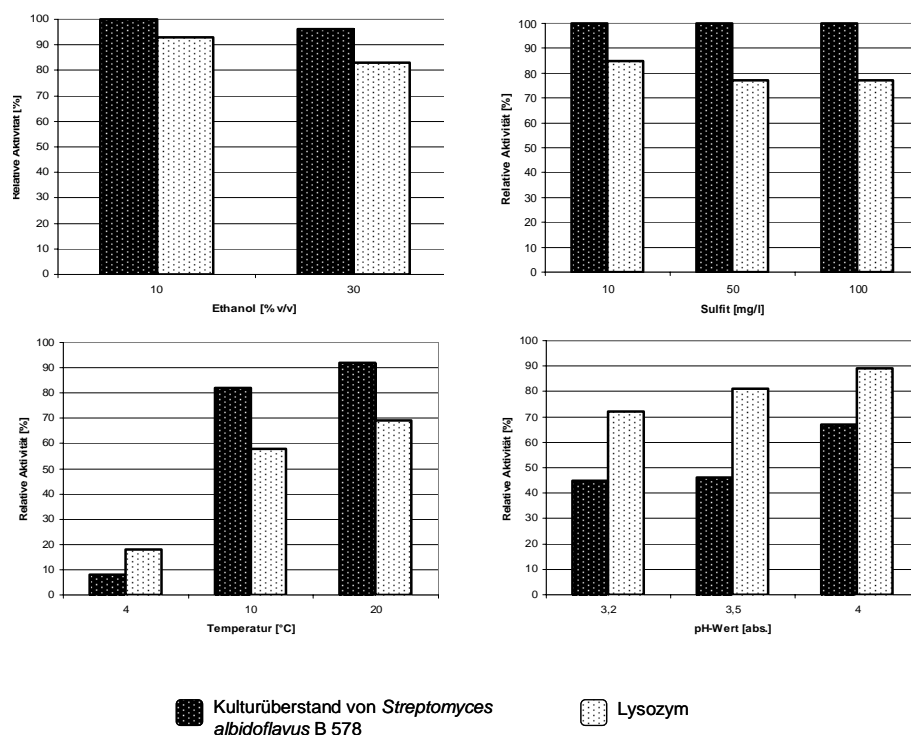
Zusammen mit den Ergebnissen der phylogenetischen Untersuchungen konnte der Stamm B 578 als *Streptomyces albidoflavus* identifiziert werden.

### 3.6 Nachweis der bakteriolytischen Aktivität des Kulturüberstandes von *Streptomyces albidoflavus* B 578

Als Produzent bakteriolytischer Enzyme wurde das Bodenbakterium *Streptomyces albidoflavus* B 578 ausgewählt. In ersten Versuchen wurde überprüft, ob es Exoenzyme produziert, welche gegen weinrelevante Bakterien unter weinrelevanten Bedingungen wirksam sind. Hierzu wurden verschiedene Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse in den folgenden Kapiteln erläutert werden.

### 3.6.1 Aktivität unter weinrelevanten Bedingungen

Für den Einsatz bakteriolytischer Enzyme in der Weinbereitung ist es wichtig, dass diese unter den im Milieu Wein vorherrschenden Bedingungen ihre Wirkung zeigen. Hierzu wurde die Aktivität des Kulturüberstandes von *Streptomyces albidoflavus* B 578 gegen das weinrelevante und biogene Amine produzierende Milchsäurebakterium *Lactobacillus brevis* B 190 unter verschiedenen Bedingungen getestet. Neben verschiedenen pH-Werten und Ethanol-Konzentrationen wurde auch der Einfluss der Temperatur und des Sulfid-Gehalts auf die Wirksamkeit der Exoenzyme untersucht. Als Vergleichsenzym wurde Lysozym aus Hühnereiweiß mitgeführt, welches bereits in der Weinbereitung zur Kontrolle des mikrobiellen Wachstums eingesetzt wird. Um die Ergebnisse der Untersuchung vergleichen zu können, wurde die relative Aktivität der Enzyme bestimmt. Hierbei wurde die Aktivität unter Optimalbedingungen als 100 % gesetzt (Temperaturoptimum: Lysozym 37 °C, Kulturüberstand 60 °C; pH-Optimum: Lysozym pH 9, Kulturüberstand pH 6). Die Ergebnisse dieser Untersuchung gibt Abbildung 3.25 wieder.



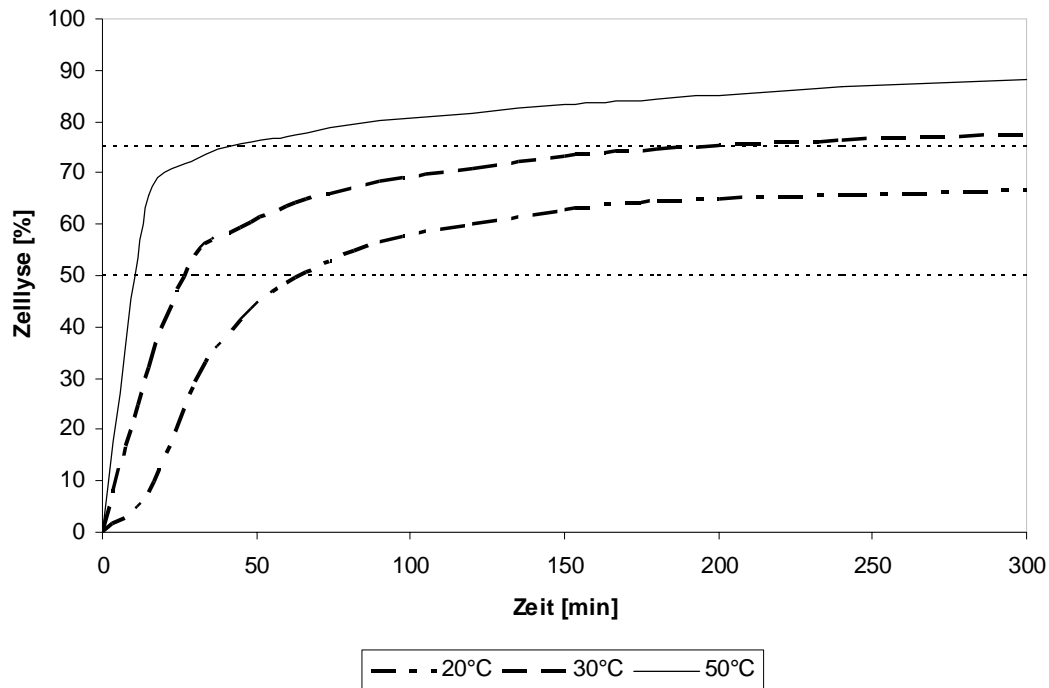
**Abbildung 3.25:** Graphische Darstellung der relativen Aktivität des Kulturüberstandes von *Streptomyces albidoflavus* B 578 und von Lysozym unter weinrelevanten Bedingungen. Als Zielorganismus wurde *Lactobacillus brevis* B 190 verwendet. Die Optimalbedingungen zur Berechnung der relativen Aktivität wurden wie folgt gewählt: Temperaturoptimum: Lysozym 37 °C, Kulturüberstand 60 °C; pH-Optimum: Lysozym pH 9, Kulturüberstand pH 6. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug jeweils 1 mg/ml. Die Auswertung erfolgte durch photometrische Messung der Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm.

---

Aus Abbildung 3.25 geht hervor, dass sowohl die Aktivität der Exoenzyme aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 als auch die des Lysozyms mit der Steigerung der Ethanolkonzentration abnimmt. Jedoch ist diese Abnahme mit jeweils unter 10 % nur gering und bei Lysozym stärker ausgeprägt. Keinen Einfluss auf die relative Aktivität der Exoenzyme zeigte die Sulfitkonzentration. Beim Lysozym hingegen konnte eine Abnahme der Aktivität mit steigender Sulfitkonzentration beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.25). In Bezug auf die Temperatur, welche ein wichtiger Faktor bei der Weinherstellung ist, war eine Abnahme der Aktivität beider Enzyme mit abnehmender Temperatur zu verzeichnen. Bei den für die Weinbereitung relevanten Temperaturen zwischen 10 °C und 20 °C lag die relative Aktivität der Enzyme aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 höher als die des Lysozyms. Dies ist als ein weiterer Vorteil der Enzymlösung gegenüber dem Hühnereiweiß-Lysozym zu sehen. Niedrige pH-Werte wirken sich auf beide Enzyme negativ aus. Jedoch ist der relative Aktivitätsverlust bei den lytischen Enzymen aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 höher als beim Lysozym, wobei die absolute Aktivität höher war. Dies lässt den Schluss zu, dass die im Kulturüberstand vorhandenen Enzyme etwas empfindlich gegenüber dem in Wein vorhanden pH-Werten sind, jedoch in ihrer Wirksamkeit immer noch besser als Lysozym.

### 3.6.2 Kinetik der Zellyse

Um den Verlauf der Zellyse durch den Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 zu untersuchen, wurde die lytische Aktivität im Verlauf der Zeit bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Als Zielorganismus wurde erneut *Lactobacillus brevis* B 190 gewählt.

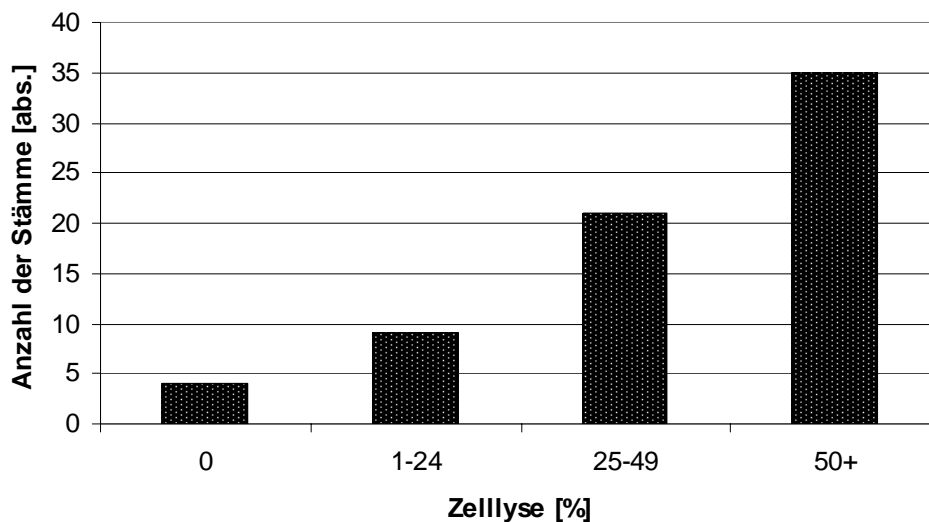


**Abbildung 3.26: Graphische Darstellung des Verlaufs der Zellyse von *Lactobacillus brevis* B 190 durch den Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 in Abhängigkeit der Zeit bei verschiedenen Temperaturen.** Die Zellen wurden mit Enzymlösung (1 mg/ml) versetzt und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch photometrische Messung der Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm.

Aus Abbildung 3.26 geht hervor, dass die Zellyse bei allen drei gewählten Temperaturen einen hyperbolischen Verlauf gegen ein Aktivitätsmaximum aufweist. Die höchsten Lysewerte konnten bei 50°C erreicht werden. Hier betrug die Zellyse nach fünf Stunden 89 %. Bei einer Temperatur von 30 °C konnte eine Zellyse von 77 %, bei 20 °C von 67 % erreicht werden. Weiter konnte beobachtet werden, dass die maximalen Lysewerte bereits nach zwei Stunden schon nahezu erreicht wurden und es danach nur noch zu einer geringeren Steigerung der Zellyse kam. Eine Zellyse von 50 % wurde bei 50 °C bereits nach 15 Minuten gemessen. Auch bei 30 °C (30 Minuten) und 20 °C (60 Minuten) wurden die Zielzellen bereits zu Anfang der Messungen zur Hälfte lysiert. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich schließen, dass der Einsatz der lytischen Enzyme unter den Temperaturbedingungen während der Weinbereitung schon innerhalb kurzer Zeit eine Wirkung gegen unerwünschte Bakterien zeigt.

### 3.6.3 Lyse der Eigenisolate aus Versuchsweinen

Anhand der Eigenisolate sollte bewiesen werden, dass der Kulturüberstand aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 in der Lage war eine Reihe von weinrelevanten Bakterien zu lysieren. Dazu wurden Zellen von insgesamt 69 Eigenisolaten mit der Enzymlyösung versetzt und die Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt (Abbildung 3.27).



**Abbildung 3.27:** Graphische Darstellung der Verteilung der durch den Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 lysierten Eigenisolate. Die Zellen wurden für 24 h bei 30 °C mit der Enzymlyösung (1 mg/ml) inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch photometrische Messung der Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm.

Bei insgesamt 35 der untersuchten Stämme (51 %) konnte eine Zelllyse von über 50 % erreicht werden. Hierbei lag die Zelllyse bei der Hälfte der Stämme (18 Stämmen) bei über 60 %. Zu einer Abnahme der  $OD_{600\text{ nm}}$  von 25-49 % kam es bei 21 Stämmen (30 %). Neun Stämme (13 %) ließen sich zu weniger als 25 % lysieren. Bei 4 Stämmen (6 %) konnte keine Abnahme der  $OD_{600\text{ nm}}$  gemessen werden. Die Inkubation der Enzymlyösung betrug 24 h, so dass längere Einwirkzeiten der Enzyme noch eine Steigerung der Zelllyse erzielen könnten. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Zelllyse in Bezug auf die systematische Zugehörigkeit der Testbakterien sind in Tabelle 3.15 dargestellt.



Tabelle 3.15: Systematische Zugehörigkeit der lysierten Eigenisolate.

Spezies	Stämme <sup>a</sup>	Zelllyse			
		0 % <sup>b</sup>	1-24 % <sup>b</sup>	25-49 % <sup>b</sup>	50 % + <sup>b</sup>
<i>Acetobacter tropicalis</i>	1	-	-	1	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	35	-	1	5	29
<i>Lactobacillus casei</i>	4	-	1	2	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	1	-	1	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	-	1	-	-
<i>Oenococcus oeni</i>	16	3	2	9	2
<i>Pediococcus damnosus</i>	5	-	2	2	1
<i>Pediococcus parvulus</i>	2	-	1	-	1
<i>Staphylococcus captitis</i>	1	-	1	-	-
<i>Staphylococcus condimentii</i>	2	-	-	1	1

<sup>a</sup> Anzahl der untersuchten Stämme

<sup>b</sup> Anzahl der Stämme

Bei der Mehrzahl der untersuchten Stämme handelte es sich um *Lactobacillus brevis* (35 Stämme). Von diesen konnten mehr als 82 % (29 Stämme) zu mehr als 50 % durch den Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 lysiert werden. Lediglich bei einem Stamm nahm die OD<sub>600 nm</sub> nur zu 8,2 % nach der Inkubationszeit ab. Bei der Art *Oenococcus oeni* (16 untersuchte Stämme) war auffällig, dass einige Stämme nicht (drei Stämme) oder nur zu einem sehr geringen Prozentsatz (zwei Stämme) durch die Enzymlyse gehemmt wurden. Die Mehrzahl der Stämme von *Oenococcus oeni* (9 Stämme) zeigte eine Zelllyse von 25-49 %. Daraus folgt, dass die Zelllyse durch den Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 stammspezifisch innerhalb einer Art variiert. Dies war ebenfalls bei *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus damnosus* und *Pediococcus parvulus* zu beobachten. Bei den beiden Staphylokokken-Arten konnte eine Zelllyse von über 25 % nur bei *Staphylococcus condimentii* erzielt werden (47 % bzw. 51 %). Auffällig war, dass auch bei dem gram-negativen *Acetobacter tropicalis* eine Abnahme der OD<sub>600 nm</sub> (31 %) nach Zugabe von Kulturüberstand gemessen werden konnte.

### 3.7 Reinigung der lytischen Exoenzyme von *Streptomyces albidoflavus* B 578

Ein Einsatz von Enzymen in der Weinbereitung setzt die Kenntnis der vorhandenen Enzymaktivitäten voraus. Hierzu sollten verschiedene Enzymklassen, die im Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* vorhanden waren, gereinigt werden, um diese in nachfolgenden Versuchen näher zu charakterisieren und zu identifizieren. Zur Gewinnung größerer Mengen an Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578, wurde dieser in einem Pilotfermenter (Kulturvolumen 20 Liter) kultiviert. Hierzu wurde das Medium (NMMP) mit einem Liter einer sieben Tage alten Vorkultur beimpft. Die Kultivierungsbedingungen für den Fermenteransatz lauteten wie folgt: Temperatur = 30 °C; pH-Wert = 6,0; Rührwerk = 200 rpm; Belüftung = 100 % Luft; Kultivierungsdauer = 7 Tage.

Die Entfernung der Zellen vom Kulturüberstand erfolgte mit Hilfe der Durchlaufzentrifuge. Zur Anreicherung der Enzyme wurde der Kulturüberstand durch Tangentialfiltration (Cross-Flow) aufkonzentriert und umgepuffert.

Tabelle 3.16 gibt die Proteinkonzentration sowie die bakteriolytische Aktivität der einzelnen Anreicherungs-schritte wieder.

**Tabelle 3.16: Anreicherungsschema der Enzyme im Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578.<sup>a</sup>**

Anreicherungsschritt	Volumen [ml]	Volumen- einengung [abs.]	Zellyse von <i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i> B 190 [%]	Protein- konzentration [mg/ml]
Vorkultur	1000	-	72,27	1,16
Fermenteransatz	20000	-	85,06	4,58
Kulturüberstand	20000	-	84,40	5,59
Kulturüberstand (sf)	20000	-	81,67	5,32
Cross-Flow-Konzentrat	300	66,67	83,82	11,77
Dialysat	300	66,67	83,47	2,92
Cross-Flow Durchfluss	-	-	1,49	4,26
Dialysat (sf)	300	66,67	97,12	1,86

<sup>a</sup> sf = sterilfiltriert (0,1 µm-Filter)

Durch den Einsatz der Cross-Flow-Filtration konnte der Kulturüberstand des 20 Liter-Ansatzes auf ein Volumen von 300 ml eingeeengt werden (66,67 % Volumeneinengung). Dieses Konzentrat wurde gegen 20 mM Citrat-Puffer (pH 4,0) dialysiert. Nach der Sterilfiltration dieses Dialysats konnte eine Zellyse von 97,12 % erreicht werden. Weiter war zu bemerken, dass die Proteinkonzentration nach der Anreicherung mit Hilfe der Cross-Flow

---

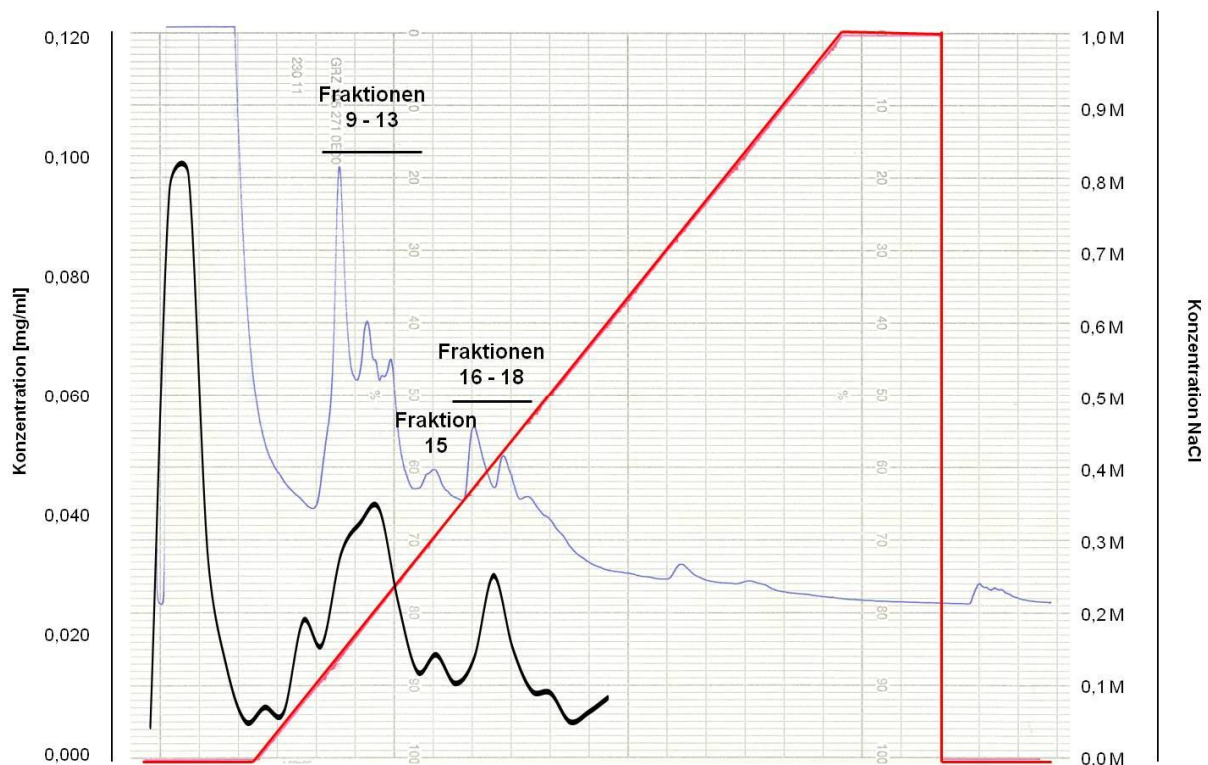
mehr als verdoppelt werden konnte (5,32 auf 11,77 mg/ml). Durch Dialyse und Sterilfiltration des Enzymkonzentrates nahm die Proteinkonzentration ab, so dass am Ende der Anreicherung eine Proteinkonzentration von 1,86 mg/ml vorlag. Dieser Anreicherungsschritt zeigte, wie bereits oben erwähnt, die höchste bakteriolytische Aktivität gegen den Zielorganismus *Lactobacillus brevis* B 190.

Analog zur Anreicherung mittels Cross-Flow-Filtration wurde der Kulturüberstand in kleineren Volumina durch Ultrafiltration (Rührzelle) aufkonzentriert und dialysiert. Die so gewonnenen Enzymlösungen dienten der Durchführung weiterer Reinigungsschritte zur Gewinnung reiner Enzyme.

### **3.7.1 Fast Performance Liquid Chromatography zur teilweisen Reinigung der lytischen Exoenzyme**

Bei der angewandten Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) handelt es sich um eine Ionenaustauscherchromatographie zur Trennung von Proteingemischen aufgrund von Wechselwirkungen mit dem verwendeten Säulenmaterial. Zur Reinigung der lytischen Enzyme im Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 wurde eine Kationenaustauschersäule (MonoS™ HR 5/5) verwendet. Aufgrund von Vorversuchen (Sebastian, 2008) wurde als Puffersystem ein Citrat-Puffer (pH 4,0) gewählt.

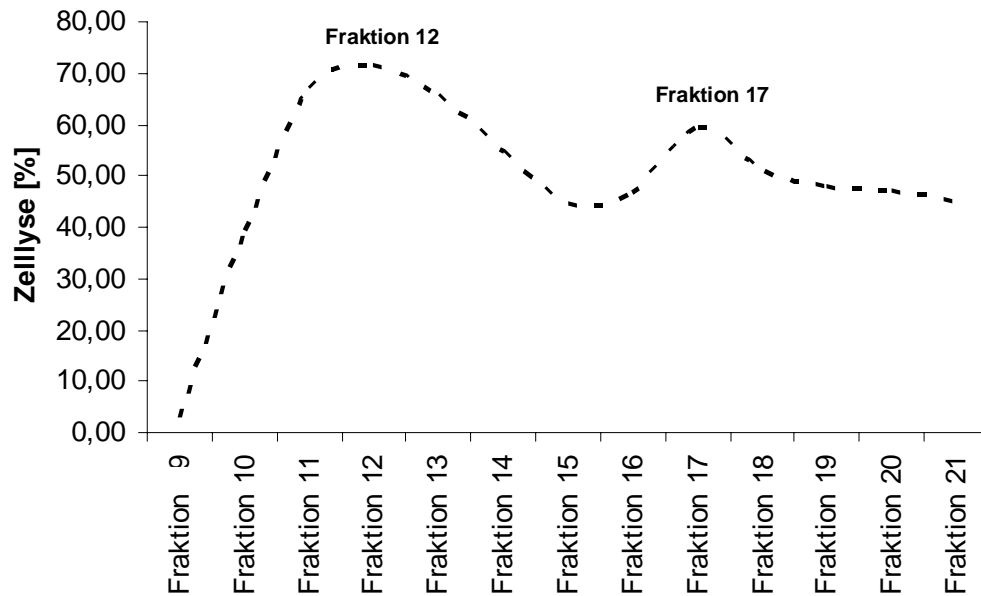
Der angereicherte Kulturüberstand wurde auf die Säule injiziert und in einem linearen NaCl-Gradient in einzelne Fraktionen getrennt. Abbildung 3.28 zeigt das Chromatogramm der Auftrennung des Kulturüberstandes von *Streptomyces albidoflavus* B 578.



**Abbildung 3.28: Chromatogramm der Auftrennung des Kulturüberstandes von *Streptomyces albidoflavus* B 578 mit Hilfe der FPLC.** Als Säule wurde ein Kationenaustauscher (MonoS™) verwendet. In rot ist die Konzentration des Elutionspuffers, in blau die Signalstärke bei 280 nm und in schwarz die Proteinkonzentration dargestellt. Es wurden 0,29 mg Protein injiziert. Die Flussrate des Elutionspuffers (20 mM Citrat-Puffer pH 4.0 + 1 M NaCl) betrug 1,0 ml/min.

In dem in Abbildung 3.28 dargestellten Chromatogramm sind drei Bereiche mit Signalen zu erkennen. Bei den Fraktionen 1-4 handelte es sich um den Durchfluss, d.h. den Proteinanteil der Probe, der nicht an das Säulenmaterial gebunden wurde. In den Fraktionen 9-13 waren drei Signalmaxima (Fraktion 9, 11 und 12) erkennbar, wobei das erste Signal deutlich ausgeprägter war. Diese Fraktionen wurden bei einer NaCl-Konzentration von 0,1-0,25 M eluiert. Weitere Proteinsignale waren in den Fraktionen 17-19 zu erkennen. Das Hauptsignal lag hierbei in Fraktion 17, welche bei 0,35 M NaCl eluiert wurde. Ein weiteres Signal konnte in Fraktion 15 beobachtet werden. Der Verlauf der Proteinkonzentration entsprach dem Verlauf des Chromatogramms. Hier zeigten sich die höchsten Proteinkonzentrationen in den Fraktionen mit ausgeprägten Signalen.

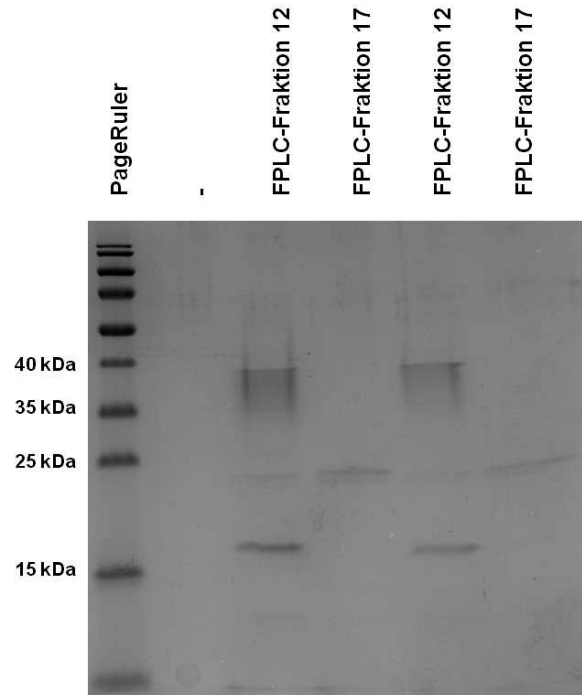
Von den genannten Fraktionen wurde die bakteriolytische Aktivität bestimmt. Diese Untersuchung diente der Überprüfung, ob es mit Hilfe der FPLC gelungen war den Kulturüberstand in einzelne aktive Fraktionen zu trennen.



**Abbildung 3.29: Graphische Darstellung der Zellyse *Lactobacillus brevis* B 190 durch die einzelnen FPLC-Fraktionen.** Die Zellen wurden mit den einzelnen Fraktionen vermischt und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch photometrische Messung der Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm.

Wie in Abbildung 3.29 zu erkennen ist, lag die Hauptaktivität in den Fraktionen 11-13 und in der Fraktion 17. Die höchsten Lysewerte (72 %) erreichte Fraktion 12. Der Verlauf der bakteriolytischen Aktivität lässt sich mit dem Chromatogramm der Trennung des Kulturüberstandes durch FPLC in Einklang bringen. Fraktionen in denen ein Proteinsignal vorkam, zeigten auch überwiegend bakteriolytische Aktivität. Lediglich Fraktion 15 zeigte nur eine Zellyse von 45 %, obwohl ein eindeutiges und einzelnes Signal in der FPLC detektiert wurde. Der Durchfluss, in dem aufgrund der Signalintensität die Mehrzahl der im Kulturüberstand enthaltenen Proteine zu vermuten waren, wies keine bakteriolytische Aktivität gegen *Lactobacillus brevis* B 190 auf. Die getesteten Fraktionen 22-36 waren ebenfalls nicht in der Lage den Zielorganismus zu lysieren.

Aufgrund der Ergebnisse der FPLC war davon auszugehen, dass im Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 mehrere bakteriolytische Enzyme vorhanden waren, da es zur Ausbildung zweier Aktivitätsmaxima gekommen war. Zur Überprüfung, ob in den aktiven Fraktionen (12 und 17) Proteine enthalten waren, wurden diese mit Hilfe von SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt.



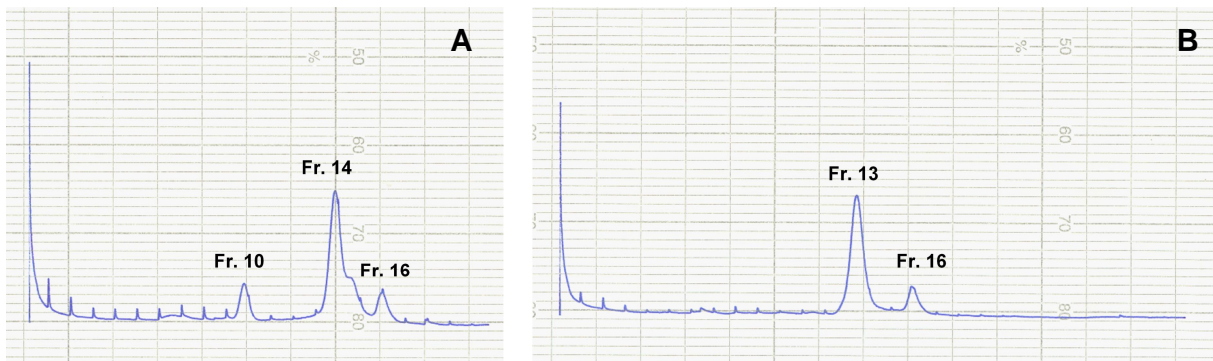
**Abbildung 3.30: Gelelektrophoretische Auftrennung der beiden aktiven FPLC-Fraktionen 12 und 17 (siehe Abbildung 3.29).** Photographie einer SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Als Negativ-Kontrolle diente eH<sub>2</sub>O.

Es ist zu erkennen, dass in beiden FPLC-Fraktionen Proteinbanden vorhanden waren (siehe Abbildung 3.30). In der Fraktion 12 konnten drei Banden detektiert werden. Die Bande mit der stärksten Intensität entsprach einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa. Daneben waren eine sehr schwache Bande bei ca. 23 kDa sowie eine diffuse Bande der ungefähren Größe von 40 kDa zu erkennen. Lediglich eine Proteinbande konnte in der FPLC-Fraktion 17 detektiert werden. Das ungefähre Molekulargewicht dieses Proteins lag bei 24 kDa.

Somit konnten aus dem Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 zwei aktive Fraktionen angereichert werden, die Proteine enthielten. In darauf folgenden Schritten sollten diese Proteinlösungen weiter aufgearbeitet werden, so dass reine Enzymlösungen vorhanden waren.

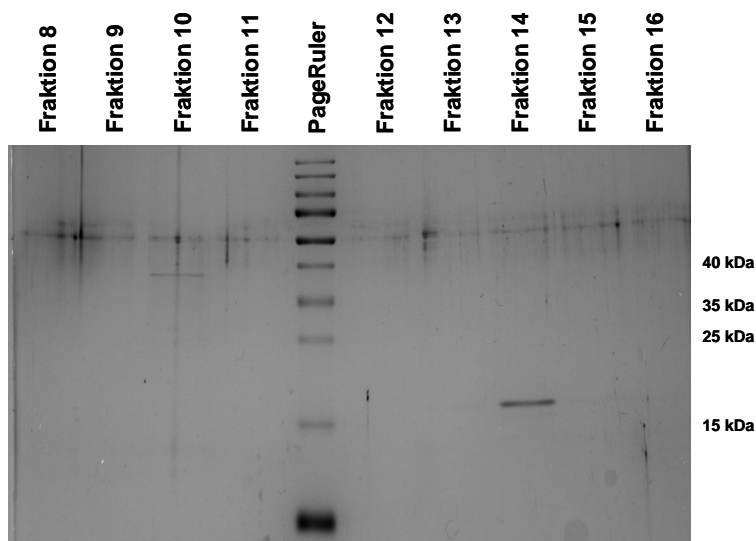
### 3.7.2 Reinigung der lytischen Exoenzyme mit Hilfe der Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration sollten die angereinigten Enzymlösungen weiter aufgearbeitet werden. Hierzu wurde eine Sephadex<sup>®</sup> G-75 Säule verwendet. Mit Hilfe dieser Säule werden Proteine anhand ihrer Größe getrennt. Für die Gelfiltration wurden die FPLC-Fraktionen 12 und 17 verwendet. Beide wurden mit Hilfe der Ultrazentrifugation (Amicon-Filter, Ausschlussgröße 3 kDa) auf ein Volumen von 200 µl eingengt und auf die Säule injiziert. Die entstandenen Chromatogramme sind in Abbildung 3.31 dargestellt.



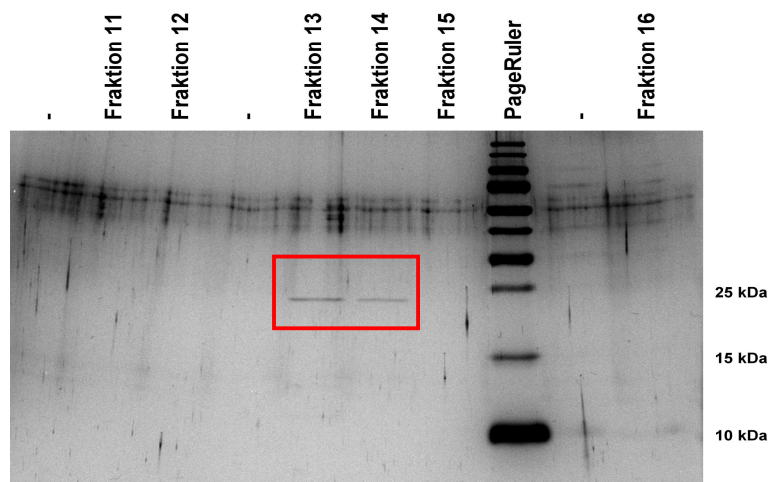
**Abbildung 3.31: Chromatogramm der Gelfiltration der FPLC-Fraktion 12 (A) und 17 (B).** Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Sephadex® G-75 Säule verwendet. Die Flussrate des Elutionspuffers betrug 0,5 ml/min.

Nach der Auftrennung der FPLC-Fraktion 12 mit Hilfe der Gelfiltration waren drei Signale zu erkennen (siehe Abbildung 3.31 A). Hierbei handelte es sich um die Fraktionen 10, 14 und 16. Die höchste Signalstärke zeigte Fraktion 14. Im Chromatogramm der FPLC-Fraktion 17 konnten zwei Proteinsignale detektiert werden. Neben einem ausgeprägtem Signal in Fraktion 13 war ein schwaches Signal in Fraktion 16 zu erkennen (siehe Abbildung 3.31 B). Die durch die Gelfiltration gewonnenen Fraktionen wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE auf das Vorhandensein von Proteinen untersucht.



**Abbildung 3.32: Gelelektrophoretische Auftrennung der einzelnen Fraktionen nach der Gelfiltration der FPLC-Fraktion 12 (siehe Abbildung 3.31 A).** Photographie einer SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Als Negativ-Kontrolle diente eH<sub>2</sub>O.

Abbildung 3.32 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Gelfiltrations-Fractionen der FPLC-Fraktion 12. Es ist eine Proteinbande in Fraktion 14 zu erkennen. Das Protein hatte ein ungefähres Molekulargewicht von 17 kDa. Weiter war eine schwache Bande in Fraktion 10 (ca. 40 kDa) zu detektieren. In diesen beiden Fraktionen zeigten sich auch Signale im Chromatogramm der Gelfiltration (siehe Abbildung 3.31). Eine Proteinbande in Fraktion 16, wie sie das Chromatogramm vermuten ließ, war nicht zu erkennen. Mögliche Gründe hierfür könnte eine zu geringe Proteinkonzentration in der Probe oder das Vorhandensein von Proteinen mit einem Molekulargewicht von unter 10 kDa sein, die durch SDS-PAGE nicht mehr nachweisbar waren. Es konnten somit zwei Proteine der FPLC-Fraktion 12 gereinigt werden und lagen für weitere Versuche als reine Enzymlösungen vor. Hierbei handelte es sich um ein Protein der Größe 40 kDa sowie eines der Größe 17 kDa.

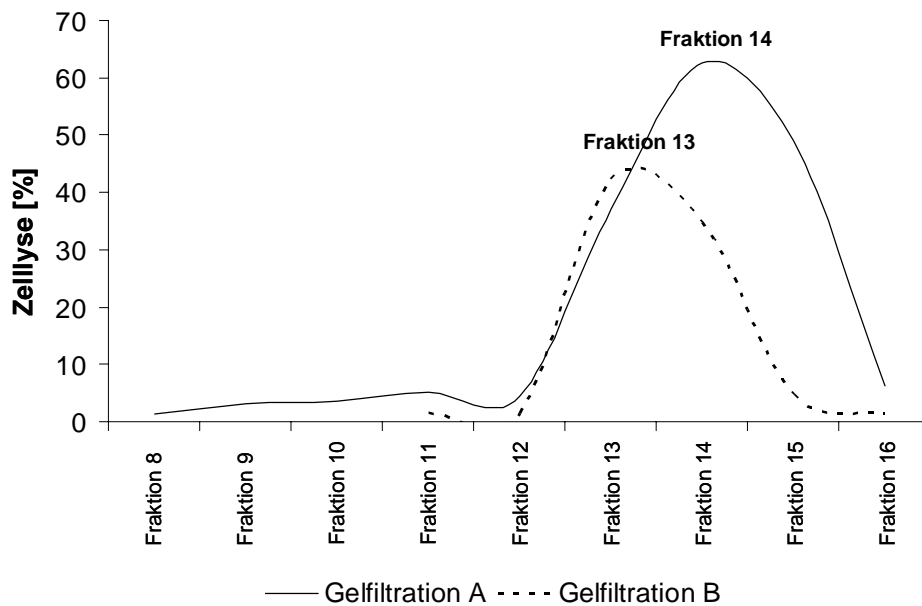


**Abbildung 3.33: Gelelektrophoretische Auftrennung der einzelnen Fraktionen nach der Gelfiltration der FPLC-Fraktion 17 (siehe Abbildung 3.31 B).** Photographie einer SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Als Negativ-Kontrolle diente eH<sub>2</sub>O.

In der elektrophoretischen Auftrennung der Gelfiltrations-Fractionen der FPLC-Fraktion 17 waren zwei Proteinbanden gleicher molekularer Masse (ca. 24 kDa) in den Fraktionen 13 und 14 zu erkennen (siehe Abbildung 3.33, rote Umrandung). Jedoch zeigte die Proteinbande in Fraktion 13 eine höhere Intensität als die der Fraktion 14. Auch hier stimmte das Auftreten von Proteinbanden mit dem Chromatogramm der Gelfiltration überein. Wie in Abbildung 3.32 konnte ebenso in Abbildung 3.33 keine Proteinbande in Fraktion 16 detektiert werden.

Zur Überprüfung, ob es sich bei den gereinigten Proteinen um die gesuchten bakteriolytischen Enzyme handelt, wurde ein Aktivitätstest durchgeführt. Hierzu wurde die Zelllyse von *Lactobacillus brevis* B 190 durch die einzelnen Gelfiltrations-Fractionen gemessen (siehe Abbildung 3.34).





**Abbildung 3.34: Graphische Darstellung der Zelllyse von *Lactobacillus brevis* B 190 durch die einzelnen Gelfiltration-Fraktionen.** Gelfiltration A = FPLC-Fraktion 12; Gelfiltration B = FPLC-Fraktion 17 (siehe Abbildung 3.31). Die Zellen wurden mit den einzelnen Fraktionen vermischt und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch photometrische Messung der Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm.

Aus Abbildung 3.34 geht hervor, dass die Fraktionen mit Proteinbanden die höchste bakteriolytische Aktivität zeigten. So konnte *Lactobacillus brevis* B 190 durch das in der Gelfiltrations-Fraktion 14 (aus FPLC-Fraktion 12) enthaltene Protein zu 62 % lysiert werden. Fraktion 13 der Gelfiltration der FPLC-Fraktion 17 zeigte eine Zelllyse von 42 %. Eine Zelllyse durch das Protein in Gelfiltrations-Fraktion 10 (Molekulargewicht 40 kDa, siehe Abbildung 3.32) konnte nicht beobachtet werden. Es war somit davon auszugehen, dass es sich bei diesem Protein nicht um ein lytisches Enzym handelte.

Tabelle 3.17 gibt abschließend eine Zusammenfassung der einzelnen Aufreinigungsschritte wieder, inklusive der Proteinkonzentrationen und bakteriolytischen Aktivität.

**Tabelle 3.17: Reinigungsschema der Enzyme im Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578.<sup>a</sup>**

<b>Aufreinigungs- schritte</b>	<b>Volumen [ml]</b>	<b>Protein- konzentration [mg/ml]</b>	<b>Protein- menge [ng]<sup>b</sup></b>	<b>Bakterio- lytische Aktivität [%]</b>	<b>Spezifische Aktivität [% Zellyse/ ng Protein]</b>
Kulturüberstand	350	0,58	29	59	2,03
Konzentrat	10	1,09	54,5	88	1,61
Dialysat	10	0,57	28,5	67	2,35
FPLC-Fraktion 12	1	0,064	3,2	72	22,5
FPLC-Fraktion 17	1	0,036	1,8	59	32,78
GF-Fraktion 13	1	0,024	1,2	42	35,00
GF-Fraktion 14	1	0,057	2,85	62	21,75

<sup>a</sup> GF = Gelfiltration

<sup>b</sup> zur Bestimmung der bakteriolytischen Aktivität eingesetzte Proteinmenge

Durch die Reinigung der im Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 enthaltenen Proteine konnten zwei hochaktive Enzyme gewonnen werden. Die Abnahme der Proteinkonzentration mit jedem Aufreinigungsschritt war höchstwahrscheinlich der Entfernung von Fremdproteinen, d.h. Proteinen geringer molekularer Masse (Ultrafiltration und Gelfiltration) oder anderer Ladung (FPLC), geschuldet. Jedoch zeigten die aufgereinigten und gereinigten Enzymlösungen eine 10 bis 15-fache höhere spezifische Aktivität gegenüber dem Zielorganismus *Lactobacillus brevis* B 190 (siehe Tabelle 3.17). So wurde z.B. während der Reinigung der Gelfiltrations-Fraktion 13 die Proteinmenge gegenüber dem Ausgangsmaterial (Kulturüberstand) um das 24-fache verringert, wobei die spezifische Aktivität sich um das 17-fache erhöht hatte.

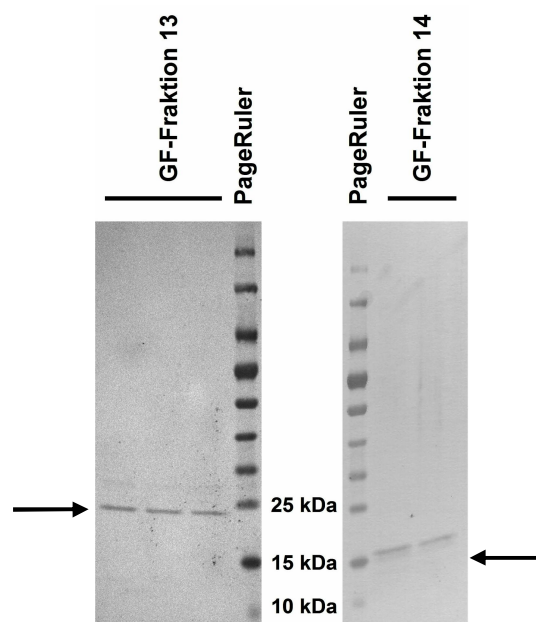
Bei den mit Hilfe der Gelfiltration gereinigten Proteinen handelte es sich um ein Enzym mit dem Molekulargewicht von ca. 17 kDa und eines mit dem Molekulargewicht von ca. 24 kDa. Mit beiden Proteinlösungen wurden weitere Tests zur näheren Bestimmung der katalytischen Aktivitäten sowie der Identifizierung der Enzyme durchgeführt.

### 3.8 Identifizierung der lytischen Exoenzyme von *Streptomyces albidoflavus* B 578

Nach der Reinigung zweier bakteriolytischer Enzyme sollten diese identifiziert werden. Durch die Identifizierung der beiden Proteine konnte ermittelt werden, um welche Klasse von Enzymen es sich handelte. Hierzu wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: Die N-terminale Sequenzierung durch Edman-Abbau und die Massenspektroskopie. Anschließend wurden durch spezifische Primer die Gene der beiden Enzyme nachgewiesen und sequenziert.

#### 3.8.1 Bestimmung der N-terminalen Sequenz mittels Edman-Abbau

Mit Hilfe des Edman-Abbaus kann durch schrittweise Abspaltung und Detektion von mit Phenylisothiocyanat markierten Aminosäuren die N-terminale Sequenz von Proteinen bestimmt werden. Hierzu wurden die gereinigten Enzyme durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels eines Protein-Blots auf eine PVDF-Membran übertragen. Abbildung 3.35 zeigt das Ergebnis eines Protein-Blots der beiden aktiven Gelfiltrations-Fractionen.



**Abbildung 3.35:** Ergebnis des Protein-Blots der beiden bakteriolytisch aktiven Gelfiltrations-Fractionen (siehe Abbildung 3.32 und 3.33). Photographie einer PVDF-Membran nach Coomassie-Färbung.

Wie in der elektrophoretischen Auftrennung der Fraktionen mittels SDS-PAGE (vergleiche Abbildung 3.32 und Abbildung 3.33) waren auch auf der PVDF-Membran jeweils zwei

Banden zu erkennen. Beide entsprachen demselben Molekulargewicht wie bei der SDS-PAGE. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass der Transfer der beiden aktiven Enzyme auf die PVDF-Membran erfolgreich war. Die entstandenen Proteinbanden wurden ausgeschnitten und N-terminal sequenziert.

Die nach dem Edman-Abbau erhaltenen N-terminalen Sequenzen sind in Tabelle 3.18 aufgeführt.

**Tabelle 3.18: N-terminale Sequenzen der gereinigten Enzyme.**

Proben	Molekulargewicht [kDa]	N-terminale Sequenz
Gelfiltrations-Fraktion 13	ca. 24	S-G-V-Q-G-I-D-V-V-V
Gelfiltrations-Fraktion 14	ca. 17	L-S-G-G-D-A-I-I-Y

Im Fall der Gelfiltrations-Fraktion 13 konnten die ersten zehn, bei Gelfiltrations-Fraktion 14 die ersten neun Aminosäuren des N-Terminus bestimmt werden. Anhand der erhaltenen Sequenzen wurde ein Protein-BLAST (blastp) mit in einer Datenbank (NCBI) hinterlegten Sequenzen durchgeführt. Die Ergebnisse der Datenbank-Recherche sind in Tabelle 3.19 und Tabelle 3.20 zusammengefasst.

**Tabelle 3.19: Ergebnisse des Sequenzvergleichs des ermittelten N-Terminus der gereinigten Gelfiltrations-Fraktion 13 mit in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen.**

N-terminale Sequenz	In Datenbank vorhandene Peptidsequenzen	Sequenz-Identität
S-G-V-Q-G-I-D-V-V-V	Lysozym aus <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> XylebKG-1 NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">ZP_08238524.1</a>	80 %
	Lysozym M1 aus <i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998 NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">ZP_06584176.1</a>	80 %
	N,O-diacetylmuramidase R2 aus <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">AAR97572.1</a>	80 %

Wie aus Tabelle 3.19 hervorgeht, hatte der N-Terminus des gereinigten Enzyms mit einem Molekulargewicht von ca. 24 kDa eine 80 %-ige Sequenzidentität mit verschiedenen Lysozym-Sequenzen aus unterschiedlichen Streptomyceten-Arten. Hierbei handelte es sich

um ein Lysozym aus *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*, dem Lysozym M1 aus *Streptomyces roseosporus* sowie einer N,O-diacetylmuramidas aus *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*. Neben den Sequenzen für die verschiedenen Enzyme, zeigte der N-Terminus des gereinigten Proteins aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 auch eine hohe Sequenzidentität zu Vorstufen verschiedener Muramidasen aus Streptomyceten. So konnte mit der Referenzsequenz der Lysozym M1 Vorstufe von *Streptomyces albus* J1074 (NCBI-Accession-Nr: [ZP\\_04706126.1](#)) eine Sequenzidentität von ebenfalls 80 % ermittelt werden. Aufgrund der Ergebnisse der Datenbankrecherche konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem gereinigten Protein um ein Enzym der Lysozym-, das heißt Muramidaseklasse handelt. Diese Enzymfamilie katalysiert die hydrolytische Spaltung des Peptidoglycanstrangs von Bakterien an der  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin.

**Tabelle 3.20: Ergebnisse des Sequenzvergleichs des ermittelten N-Terminus der gereinigten Gelfiltrations-Fraktion 14 mit in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen.**

<b>N-terminale Sequenz</b>	<b>In Datenbank vorhandene Peptidsequenzen</b>	<b>Sequenz-Identität</b>
L-S-G-G-D-A-I-I-Y	Peptidase M23B aus <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar pulsiensis BGSC 4CC1 NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">ZP_04081978.1</a>	88 %
	Peptidase M61 domain-containing protein aus <i>Thioalkalimicrobium cyclicum</i> ALM1 NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">YP_004536771.1</a>	88 %
	Streptogrisin-B aus <i>Streptomyces</i> sp. NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">ZP_07285963.1</a>	77 %

Auch im Fall der Gelfiltrations-Fraktion 14 konnten verschiedene Proteine in der NCBI-Datenbank gefunden werden, die eine hohe Sequenzidentität mit dem ermittelten N-Terminus aufwiesen. Hierbei handelte es sich jeweils um Peptidasen. So wiesen die Sequenzen einer Peptidase M23B aus *Bacillus thuringiensis* sowie die einer Peptidase M61 aus *Thioalkalimicrobium cyclicum* eine 88 %-ige Übereinstimmung mit dem N-Terminus des ca. 17 kDa großen Proteins aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 auf. Bei diesen zwei Enzymen handelt es sich um Metallopeptidase, die sowohl Endo- als auch Exopeptidasen sein können und ein unspezifisches Substratspektrum aufweisen (vergleiche konservierte Proteindomäne; NCBI-Accession-Nr.: pfam01551). Streptogrisin-B aus *Streptomyces* sp. hingegen ist eine dem Trypsin ähnliche Serin-Endopeptidase, die erstmals aus *Streptomyces*

*griseus* isoliert wurde. Dieses Enzym enthält eine Triade aus Serin, Histidin und Asparagin (Glutamin) im katalytischen Zentrum, welche die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen einzelnen Aminosäuren bewerkstelligt. Hierbei werden vor allem Phenylalanin-, Tyrosin-, Tryptophan- und Leucin-Glycin-Bindungen gespalten. Die Sequenz dieses Proteins weist eine 77 %-ige Identität mit der des Enzyms aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 auf. Auch hier zeigt die Referenzsequenz einer Protein-Vorstufe, ebenfalls Streptogrisin-B, aus *Streptomyces albus* J1074 (NCBI-Accession-Nr.: [ZP\\_04701200.1](#)) eine hohe Übereinstimmung der Aminosäureabfolge. Aufgrund der hohen Homologie mit den Sequenzen einer Serin-Endopeptidase aus verschiedenen Streptomyceten war davon auszugehen, dass das gereinigte Enzym (Gelfiltrations-Fraktion 14, Molekulargewicht ca. 17 kDa) ebenfalls dieser Enzymklasse zuzuordnen war. Zur Bestätigung der Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung wurden die beiden Enzymlösungen ebenfalls massenspektroskopisch untersucht.

### **3.8.2 Identifizierung der gereinigten Enzyme mittels Massenspektroskopie**

Zur Durchführung der Massenspektroskopie wurden die zwei teilgereinigten FPLC-Fraktionen 12 und 17 durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abbildung 3.30). Anschließend wurden drei Banden (ca. 17 kDa und ca. 40 kDa aus Fraktion 12 sowie ca. 24 kDa aus Fraktion 17) im Acrylamid-Gel verdaut und die Peptidfragmente in das Massenspektrometer injiziert.

Nach Erhalt der Fragmentspektren wurden diese mit in Datenbanken hinterlegten Referenzspektren verglichen. So konnten die drei Proteine identifiziert werden. Abbildung 3.36, Abbildung 3.37 und Abbildung 3.38 zeigen die Ergebnisse der Datenbankanalyse der Peptid-Fragmentspektren.

1	MPAYSSLARR	GRRPAVLLG	GLVSASLALT	LAPTAAAAPL	APPPGKDVGP
51	GEAYMGVGR	IEQGLGAGPD	ERTIGPADTS	GVQGIDVSHW	QGSINWSSVK
101	SAGMSFAYIK	ATEGTNYKDD	RFSANYTNAY	NAGIIRGAYH	FARPNASSGT
151	AQADYFASNG	GGWSRDNRTL	PGVLDIEHNP	SGAMCYGLST	TOMRTWINDE
201	HARYKARTR	DVVIYTTASW	WNICTGSWNG	MAAKSPFWVA	HWGVSAPTVP
251	SGFPTWTFWQ	YSATGRVGGV	SGDVDRNKFN	GSAARLLALA	NNTA



**Abbildung 3.36:** Darstellung des Vergleichs des Peptid-Fragmentspektrums des gereinigten Proteins der Größe ca. 24 kDa mit der Referenzsequenz einer Lysozym M1 Vorstufe aus *Streptomyces albus* J1074 (NCBI-Accession-Nr.: [ZP\\_06594806.1](#)). Die farbig unterlegten Bereiche zeigen Bereiche an, in denen die einzelnen Peptidfragmente mit den Referenzsequenzen übereinstimmen.

Durch Abgleich des Fragmentspektrums des Proteins mit der Molekularmasse von ca. 24 kDa mit in der Datenbank hinterlegten Referenzsequenzen, konnte dieses einer Vorstufe des Lysozyms M1 aus *Streptomyces albus* J1074 zugeordnet werden (NCBI-Accession-Nr.: [ZP\\_06594806.1](#)). Hiermit wurde das Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung durch die massenspektroskopische Untersuchung des Proteins bestätigt.

1	MRIKRITPRS	SVARRIRLVA	LAAGLAAVGA	LAIPTAHAGE	SAAFSSAELT
51	SAAEAVLDTD	VAGTAWYVDK	AANKVVVTAD	STVSKAEIAK	IRKAAGGEAG
101	ALEINRTEGT	FSPLLSSGDA	IYSSSSRCSL	GFNVRSGSTY	YALTAGHCTN
151	GTSTIWTNSS	RTTAFGTVAG	SSFPNNDYGL	IRYTNSSVPA	SGTVGSVDIT
201	RAANPTVGQS	VTRRGSTTGI	ESGIVTGLNA	TVNYGSGQVV	YGMIQTNVCA
251	EPGDSGGPLY	SGSTALGLTS	GGSGNCSSGG	TTFQPVVEA	LNAYGVSVF



**Abbildung 3.37:** Darstellung des Vergleichs des Peptid-Fragmentspektrums des gereinigten Proteins der Größe ca. 17 kDa mit der Referenzsequenz einer Streptogrisin B Vorstufe aus *Streptomyces albus* J1074 (NCBI-Accession-Nr.: [ZP\\_04701200.1](#)). Die farbig unterlegten Bereiche zeigen Bereiche an, in denen die einzelnen Peptidfragmente mit der Referenzsequenz übereinstimmen. Hierbei bedeutet blau die exakte Übereinstimmung und grün eine teilweise Übereinstimmung. In den helleren Bereichen überlappen sich mehrere Peptidfragmente.

Analog zum Ergebnis der Datenbankrecherche nach der N-terminalen Sequenzierung, zeigte auch das Fragmentspektrum des Proteins mit der molekularen Masse von ca. 17 kDa eine Übereinstimmung mit der Referenzsequenz einer Streptogrisin-B-Vorstufe aus *Streptomyces*

*albus* J1074 nach der Massenspektroskopie (NCBI-Accession-Nr.: [ZP\\_04701200.1](#); siehe Abbildung 3.37).

Aufgrund der Ergebnisse der Massenspektroskopie, welche die Befunde der N-terminalen Sequenzierung bestätigten, konnten die beiden bakteriolytischen Enzyme als Muramidase (Gelfiltrations-Fraktion 13, ca. 24 kDa) und Peptidase/Protease (Gelfiltrations-Fraktion 14, ca. 17 kDa) eindeutig identifiziert werden. Neben den bereits mit Edman-Abbau untersuchten Proteinen konnte auch das Protein mit der molekularen Masse von ca. 40 kDa identifiziert werden (siehe Abbildung 3.38)

1	MKLQRKNRAR	ALTLGALALS	GALALTACGS	DETGDTTGGG	NEASASAADV
51	ECGKGGQLLA	SGSSAQKNAM	DVWIKNYRAA	CPDTQINYKP	DGSGAGVTAF
101	LQGQAFAGS	DSALKPEEIE	QSAEVCKDSQ	AIDLPMVGGP	IAIGYNVPGV
151	DKLNLDAAATL	ADIFNDKITT	WDDEAIKKLN	PDAELPDTKI	QAFHRSDESG
201	TTDNFTKYLK	AAAPKSWPYE	PGKAWKAKGG	QSAQGSSGVA	QQVKQTAGAI
251	SYFELSYATD	GIKTVDLDTG	AGTPVEATVD	NASKAISEAK	VVGQKDLAL
301	ELAYDTKAEG	AYPITLVTYE	IACEKGNKAE	TLDATEKFLG	YIAGEDGQEL
351	LKDGGYAPLP	TEIAEKVRTT	IADLG		



**Abbildung 3.38:** Darstellung des Vergleichs des Peptid-Fragmentspektrums des gereinigten Proteins der Größe ca. 40 kDa mit der Referenzsequenz eines Phosphat-Bindeproteins aus *Streptomyces albus* J1074 (NCBI-Accession-Nr.: [ZP\\_04703060.1](#)). Nähere Erklärung siehe Abbildung 3.37.

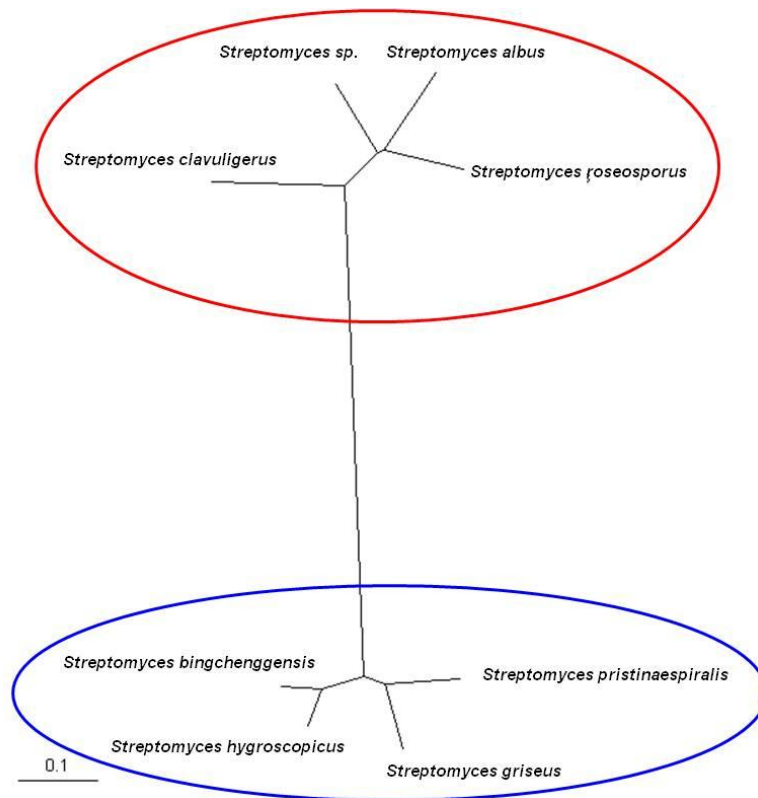
Bei diesem Protein handelt es sich um ein Phosphat-Bindeprotein aus *Streptomyces albus* J1074 (NCBI-Accession-Nr.: [ZP\\_04703060.1](#)). Die Masse des in der Datenbank hinterlegten Proteins beträgt 38,95 kDa (pI 4,38) und liegt somit in der Größenordnung des aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 isolierten Proteins. Da von diesem Protein keine hemmende Wirkung gegen andere Mikroorganismen ausging, wurde es im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

### 3.8.3 Nachweis und Sequenzierung der Gene der lytischen Exoenzyme im Genom von *Streptomyces albidoflavus* B 578

Nach der Identifizierung der beiden gereinigten Enzyme sollten deren Gene in *Streptomyces albidoflavus* B 578 nachgewiesen werden. Anhand der durch Edman-Abbau erhaltenen N-terminalen Sequenzen wurden verschiedene Aminosäuresequenzen nahverwandter Enzyme aus Streptomyceten aus der NCBI-Datenbank ausgesucht. Mit diesen Sequenzen wurden Alignments durchgeführt, um übereinstimmende Sequenzbereiche zur Konstruktion von Primern zu ermitteln.

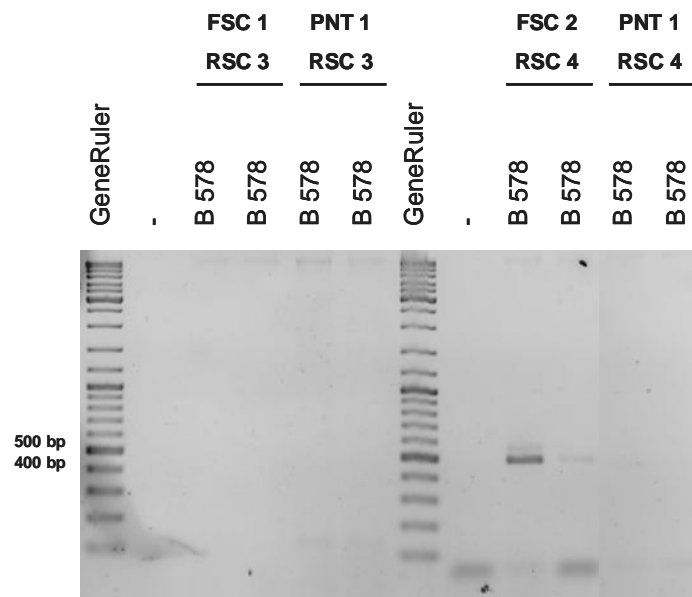


Im Fall der Protease zeigte das Alignment der Referenz-Sequenzen eine hohe Heterologie, das heißt einen geringen Prozentsatz von übereinstimmenden Aminosäuresequenz-Bereichen. Auf der Grundlage dieses Alignments wurde ein Stammbaum der verschiedenen Streptogrisin-Sequenzen berechnet (siehe Abbildung 3.39).



**Abbildung 3.39: Darstellung eines ungewurzelten Stammbaums verschiedener Streptogrisin-Aminosäuresequenzen aus Streptomyceten.** Der Stammbaum wurde nach der Neighbor-Joining-Methode berechnet. Als Grundlage der Berechnung dienten Referenzsequenzen verschiedener Streptomyceten aus der NCBI-Datenbank.

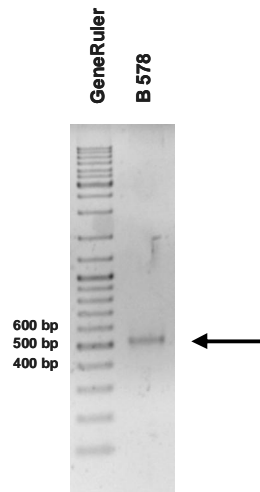
Wie in Abbildung 3.39 zu erkennen, konnten zwei Cluster von Streptogrisin-Sequenzen ermittelt werden (blaue und rote Umrandung). Die Sequenzen innerhalb eines Cluster zeigten eine hohe Sequenzidentität, während sie mit den Sequenzen des anderen Clusters nur einen geringen Anteil an Sequenzhomologien aufwiesen. Auffällig war, dass alle Sequenzen den nahezu gleichen N-Terminus aufwiesen. Anhand dieses Stammbaums lässt sich somit vermuten, dass die Sequenz der Protease artspezifisch ist. Durch Ermittlung der Gensequenzen der verwendeten Referenz-Arten konnten Primer konstruiert werden, die spezifisch das Gen für die Protease innerhalb des einen Clusters und innerhalb des zweiten Clusters nachweisen konnten. Ebenfalls wurde ein Primer konstruiert, der an die Gensequenz des N-Terminus binden sollte.



**Abbildung 3.40: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifikation des vermuteten Gens der Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578.** Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung). Als Negativ-Kontrolle diente PCR-Wasser.

Abbildung 3.40 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach der Amplifikation des Protease-Gens aus *Streptomyces albidoflavus* B 578. Es ist zu erkennen, dass lediglich das Primer-Paar FSC2/RSC4 eine Amplifikation eines DNA-Bereichs ermöglichte. Hier war eine Bande auf der Höhe von ca. 500 bp zu erkennen. Jedoch konnte ebenso eine leichte Bande etwas oberhalb der starken Bande in derselben Probe detektiert werden. Da das Primer-Paar FSC2/RSC4 spezifisch für ein Cluster der Protease war (Abbildung 3.39, blaue Umrandung), konnte auch eine Aussage über die phylogenetische Zugehörigkeit des untersuchten *Streptomyces*-Stamm getroffen werden. So wurden die Ergebnisse der Identifizierung von *Streptomyces albidoflavus* B 578 durch die Ermittlung des Gens für die Protease bestätigt, da *Streptomyces albidoflavus* auf 16S rDNA Ebene eine nähere Verwandtschaft mit den *Streptomyces*-Arten des einen Clusters (*Streptomyces bingchenggensis*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces hygroscopius* und *Streptomyces pristinaespiralis*) als denen des anderen Clusters (*Streptomyces albus*, *Streptomyces clavuligerus* und *Streptomyces roseosporus*) aufweist.

Um die Nukleotidsequenz der gereinigten Protease zu ermitteln, wurden die PCR-Bedingungen optimiert, so dass mit Hilfe des Primer-Paars FSC2/RSC4 nur noch ein Amplifikat generiert wurde (siehe Abbildung 3.41)



**Abbildung 3.41:** Gelelektrophoretische Auftrennung des gereinigten PCR-Produkts des vermuteten Gens einer Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578. Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung).

Nach der PCR war nur noch eine Nukleotidbande mit einer ungefähren Größe von 500 bp zu erkennen (siehe Abbildung 3.41, Pfeil). Dieses PCR-Produkt wurde gereinigt und die Nukleotidsequenz ermittelt (siehe Anhang). Anschließend folgte der Datenbankvergleich der erhaltenen Sequenz mit Referenzsequenzen (siehe Tabelle 3.21).

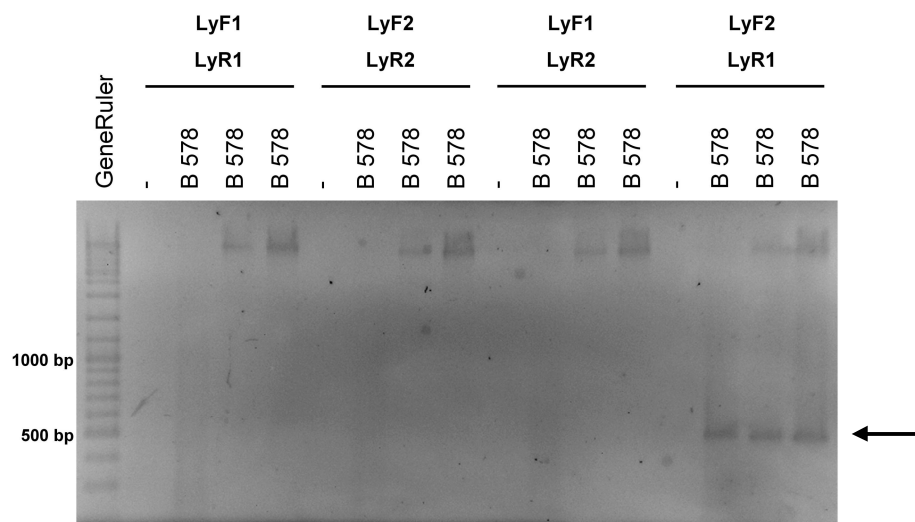
**Tabelle 3.21:** Ergebnisse des Sequenzvergleichs der ermittelten Nukleotidsequenz einer vermuteten Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 mit in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen.

Stamm	Spezies	Gen	Nächster Verwandter (NCBI Datenbank)	Sequenzidentität [bp/bp]
B 578	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Protease	Protease A (sprA) aus <i>Streptomyces griseus</i> Accession number: <a href="#">M17103.1</a>	395/474 (83 %)
			Serin-Protease 2 Vorstufe aus <i>Streptomyces fradiae</i> sfp2 Accession number: <a href="#">AJ784940.1</a>	404/501 (81 %)
			Serin-Protease (spr1) aus <i>Streptomyces peucetius</i> ATCC 29050 Accession number: <a href="#">JF939716.1</a>	248/313 (79 %)

Bei dem Amplifikat des Primer-Paars FSC2/RSC4 handelte es sich um das Gen für eine Serin-Protease. So zeigte die ermittelte Sequenz eine 83 %-ige Sequenzidentität mit einer Serin-Protease aus *Streptomyces griseus* (siehe Tabelle 3.21). Ebenfalls konnten zwei weitere Streptomyceten, *Streptomyces fradiae* und *Streptomyces peucetius*, ermittelt werden, deren Gene für eine Serin-Protease eine hohe Homologie mit der ermittelten Sequenz aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 aufwiesen.

Durch Translation der Nukleotidsequenz konnte auch die Aminosäurezusammensetzung der Serin-Protease ermittelt werden (siehe Anhang). Die Berechnung des Molekulargewichts anhand der Aminosäuresequenz ab dem N-Terminus (Protein Calculator, [www.scripps.edu/cgi-bin/cdputnam/protcalc3](http://www.scripps.edu/cgi-bin/cdputnam/protcalc3)) ergab eine mittlere Molekülmasse von ca. 16 kDa. Dies entsprach in etwa der Größe der in der SDS-PAGE detektierten Bande des gereinigten Enzyms. Somit konnte sowohl die Aminosäure- als auch die Nukleotidsequenz der Serin-Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 ermittelt werden.

Analog zur Serin-Protease wurden für die Muramidase aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 spezifische Primer konstruiert. Die Referenzsequenzen zeigten hierbei eine hohe Sequenzhomologie, so dass die Konstruktion zweier Primer-Paare unterschiedlicher Amplifikationslänge (LyF1/LyR1 und LyF2/LyR2) ausreichend war. Abbildung 3.42 zeigt das Ergebnis einer PCR der DNA aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 mit den verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der konstruierten Primer.



**Abbildung 3.42: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifikation des vermuteten Gens der Muramidase aus *Streptomyces albidoflavus* B 578.** Photographie eines Agarose-Gels nach Ethidiumbromid-Färbung (Negativ-Darstellung). Als Negativ-Kontrolle diente PCR-Wasser.

Lediglich in dem PCR-Ansatz, der mit dem Primer-Paar LyF2/Ly1 amplifiziert wurde, konnte eine Bande detektiert werden (siehe Abbildung 3.42, Pfeil). Mit einer ungefähren Größe von 500 bp entsprach sie auch der anhand des Sequenz-Alignments der Referenzarten erwarteten Größe. In den Proben, welche mit anderen Primer-Paaren amplifiziert wurden, konnte keine Bande nachgewiesen werden. Es war somit davon auszugehen, dass die konstruierten Primer in diesen Fällen nicht spezifisch genug für das Muramidase-Gen von *Streptomyces albidoflavus* B 578 waren.

Das gereinigte PCR-Produkt des Primerpaars LyF2/LyR1 wurde sequenziert und die erhaltene Sequenz durch BLAST-Suche überprüft (Tabelle 3.22).

**Tabelle 3.22: Ergebnisse des Sequenzvergleichs der ermittelten Nukleotidsequenz der vermuteten Muramidase aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 mit in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen.**

Stamm	Spezies	Gen	Nächster Verwandter (NCBI Datenbank)	Sequenzidentität [bp/bp]
B 578	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Muramidase	Lysozym aus <i>Streptomyces koyangensis</i> Accession number: <a href="#">EU260095.1</a>	492/508 (97 %)
			Sezernierte Hydrolase aus <i>Streptomyces griseus</i> S106 Accession number: <a href="#">EU296922.1</a>	493/510 (97 %)
			Lysozym aus <i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331 Accession number: <a href="#">CP002475.1</a>	439/514 (85 %)

Aufgrund der Sequenzanalyse durch die BLAST-Suche konnte die ermittelte Sequenz aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 als das Gen für eine Muramidase/ein Lysozym identifiziert werden. Wie aus Tabelle 3.22 hervorgeht, wies die ermittelte Sequenz eine 97 %-ige Sequenzidentität mit dem Gen für ein Lysozym aus *Streptomyces koyangensis* auf. Ein weiteres Lysozym (aus *Streptomyces flavogriseus*) zeigte 85 % Übereinstimmung mit der ermittelten Sequenz.

Die somit gewonnene Sequenz des Gens für die Muramidase konnte in die Aminosäuresequenz übersetzt werden. Auch die BLAST-Suche dieser Sequenz ergab eine hohe

Übereinstimmung mit Sequenzen verschiedener Muramidasen/Lysozyme aus Streptomycceten. Im Bezug auf die Größe des Enzyms zeigen alle nahverwandten Enzyme eine ab dem N-Terminus berechnete molekulare Masse (Protein Calculator, [www.scripps.edu/cgi-bin/cdputnam/protcalc3](http://www.scripps.edu/cgi-bin/cdputnam/protcalc3)) von ca. 24 kDa. Auch hier stimmte das anhand der Nukleotidsequenz berechnete Molekulargewicht mit der bei der SDS-PAGE detektierten Proteinbande überein.

Mit Hilfe der Gensequenzen konnten die Ergebnisse der Identifizierung der beiden gereinigten Enzyme bestätigt werden. Auch die theoretisch berechneten Massen der Muramidase sowie der Protease stimmten mit den beobachteten Größen der Proteinbanden überein.

### **3.9 Charakterisierung der gereinigten Exoenzyme**

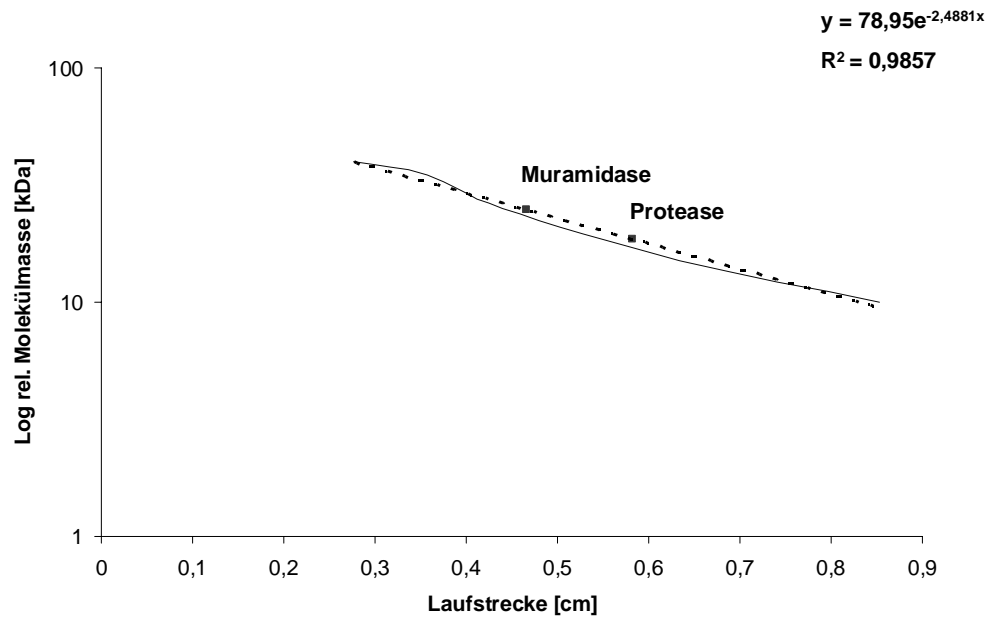
Die beiden als Muramidase und Protease identifizierten bakteriolytischen Enzyme aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 sollten hinsichtlich verschiedener physikalischer und biochemischer Eigenschaften näher charakterisiert werden. Hierzu zählte neben der Bestimmung der relativen Molekülmasse und des isoelektrischen Punktes (pI) auch die Ermittlung der Wirkungs-Optima sowie die Quantifizierung der Enzymaktivität. Abschließend sollte noch die Schnittstelle der gereinigten Muramidase bestimmt werden. Die Ergebnisse der oben genannten Versuche sind in den folgenden Kapiteln wiedergegeben.

#### **3.9.1 Bestimmung der relativen Molekülmasse**

Nach der theoretischen Bestimmung des Molekulargewichts der beiden Enzyme anhand ihrer Sequenz wurde die relative Molekülmasse experimentell durch zwei verschiedene Methoden genauer bestimmt. Zum einen durch Berechnung des Molekulargewichts anhand der Laufstrecke bei der SDS-PAGE und zum anderen aufgrund der Größentrennung von Proteinen bei der Gelfiltration, durch den Vergleich mit Referenzproteinen.

##### **3.9.1.1 Größenbestimmung anhand der SDS-PAGE**

Da die molekularen Massen der im Größenstandard enthaltenen Proteine bekannt waren, konnte anhand ihrer Laufstrecke im SDS-Gel eine Kalibrierung im Bezug zur relativen Molekülmasse erstellt werden (siehe Abbildung 3.43).



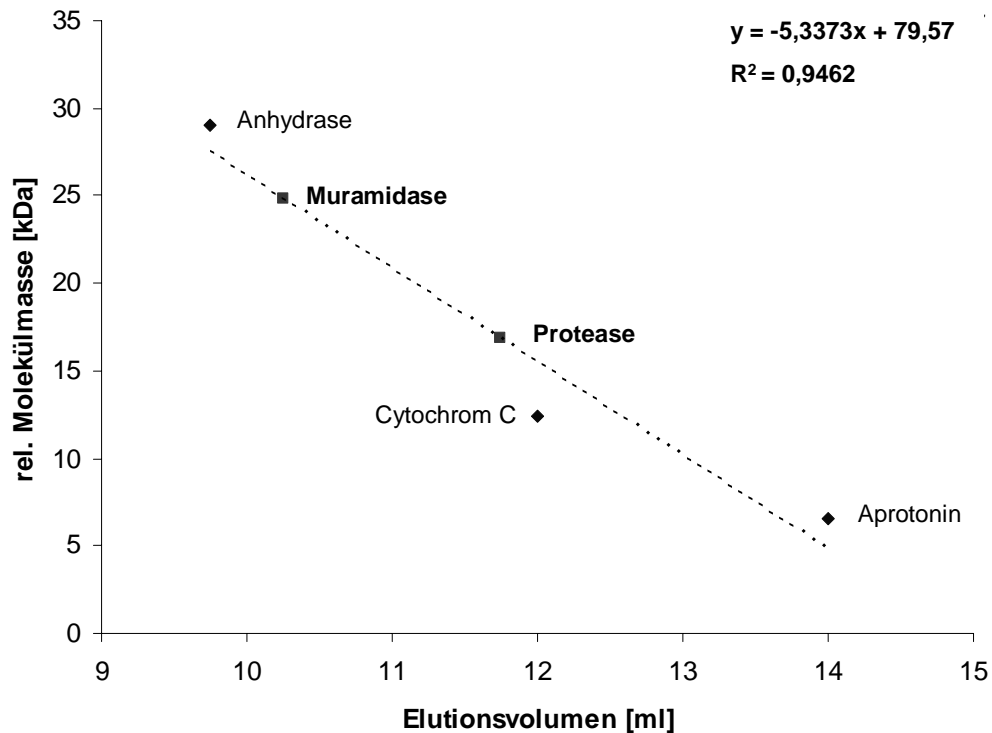
**Abbildung 3.43:** Graphische Darstellung der zur Berechnung der relativen Molekülmassen der gereinigten Enzyme aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 benutzten Kalibrierungskurve (SDS-PAGE). Zur Berechnung der Kalibrierungskurve wurden die Laufstrecken und Molekulargewichte der im PageRuler™-Proteinmarker (Fermentas, St. Leon-Rot) enthaltenen Standard-Proteine benutzt. Gleichung und Bestimmtheitsgrad der Kalibrierungskurve sind in der Abbildung dargestellt.

Aufgrund der bestimmten  $R_f$ -Werte der beiden Proteinbanden der gereinigten Enzyme und durch das Einsetzen dieser Werte in die Gleichung der Kalibrierungskurve konnte das Molekulargewicht der Enzyme berechnet werden. So ergab sich für die gereinigte Muramidase eine relative Molekülmasse von 23,4 kDa, was in etwa der geschätzten Masse von 24 kDa anhand der SDS-PAGE und der aufgrund der Sequenz berechneten Werte entsprach. Im Fall der gereinigten Protease wurde ein Molekulargewicht von 17,1 kDa berechnet. Dieser Wert lag somit ebenfalls in der Nähe des geschätzten Werts von 17 kDa (SDS-PAGE) und des anhand der Sequenz berechneten Werts von 16 kDa.

Somit konnten durch die Berechnung der relativen Molekülmassen mittels der Laufstrecken der beiden Proteine in der SDS-PAGE die vorhergehenden Ergebnisse bestätigt werden.

### 3.9.1.2 Größenbestimmung mit Hilfe der Gelfiltration

Zur Bestimmung des Molekulargewichts durch die Gelfiltration wurde eine Sephadex® G-75 Säule mit verschiedenen Proteinen bekannter Größe kalibriert. Zur Erstellung der Kalibrierungskurve wurden drei Enzyme gewählt, deren Molekulargewichte in der Nähe der zu erwartenden Massen der gereinigten Enzyme lagen. Hierbei handelte es sich um Aptonin (6,5 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa) und eine Anhydrase aus bovinen Erythrocyten (29 kDa).



**Abbildung 3.44:** Graphische Darstellung der zur Berechnung der relativen Molekülmassen der gereinigten Enzyme aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 benutzten Kalibrierungskurve (Gelfiltration). Gleichung und Bestimmtheitsgrad der Kalibrierungskurve sind in der Abbildung dargestellt.

Wie aus Abbildung 3.44 hervorgeht, eluierten die beiden gereinigten und bakteriolytisch aktiven Proteine mit 10,25 ml (Muramidase) und 11,75 ml (Protease) zwischen Cytochrom C und der Anhydrase. Durch Einsetzen der Elutionsvolumina in die berechnete Gleichung der Kalibrierungskurve ergaben sich folgende Molekulargewichte: Die Muramidase besaß eine relative Molekülmasse von 24,9 kDa, während für die Protease der Wert 16,9 kDa berechnet wurde. Beide Werte stimmten nahezu mit denen anhand der mittels SDS-PAGE sowie der Sequenz berechneten relativen Molekulargewichte überein.

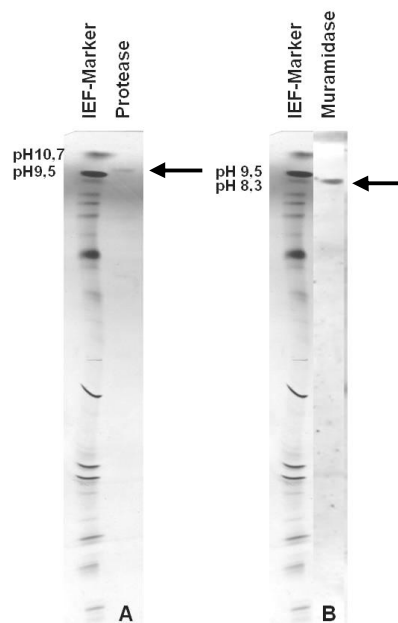
Zusammenfassend ließ sich sagen, dass das Molekulargewicht der gereinigten Muramidase um 24 kDa, das der Protease um die 17 kDa liegt.



### 3.9.2 Bestimmung des isoelektrischen Punkts

Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins gibt den pH-Wert an, bei dem die Nettoladung des Proteins gleich Null ist. Somit können anhand des pIs Rückschlüsse über den Anteil geladener Reste und damit über die Aminosäurezusammensetzung eines Proteins gezogen werden. Jedes Protein besitzt einen spezifischen pI, womit dieser einen wichtigen Aspekt bei der Charakterisierung dieser Makromoleküle darstellt.

Die gereinigten Enzyme wurden zur Bestimmung auf ein Acrylamid-Gel aufgetragen indem durch das Anlegen eines elektrischen Felds durch die vorhandenen Ampholyte ein pH-Gradient aufgebaut wurde. Somit wanderten die Proteine zu dem pH-Wert der ihrem pI entspricht.



**Abbildung 3.45: Ergebnis der Bestimmung der gereinigten Protease (A) und Muramidase (B) aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 durch analytische IEF.** Photographie eines IEF-Gels nach Serva Violet 17 Färbung. Aufgetragen wurden 1,6  $\mu$ g der gereinigten Muramidase und 3,9  $\mu$ g der Protease.

Wie aus Abbildung 3.45 hervorgeht, war in beiden Proteinproben wie erwartet nur jeweils eine Proteinbande zu erkennen (siehe Pfeile). Im Fall der gereinigten Protease (siehe Abbildung 3.45 A) lag diese etwas oberhalb der pH 9,5-Bande des als Referenz aufgetragenen Markers. Durch Berechnung der Laufstrecke konnte für diese Proteinbande ein ungefähres pI von 9,7 ermittelt werden. In der Proteinprobe der Muramidase war eine Bande zwischen pH 8,3 und pH 9,5 zu sehen. Hier ergab die Berechnung einen ungefähren pI von 8,8. Somit lagen die isoelektrischen Punkte beider Enzyme im alkalischen Bereich.

Um die durch analytische IEF ermittelten Werte zu überprüfen, wurde anhand der Aminosäuresequenzen verschiedener Muramidasen/Lysozyme und Proteasen aus Streptomycceten der theoretische pI berechnet (Protein Calculator, [www.scripps.edu/cgi-bin/cdputnam/protcalc3](http://www.scripps.edu/cgi-bin/cdputnam/protcalc3)). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.23 zusammengefasst.

**Tabelle 3.23: Berechnetes Molekulargewicht und berechneter isoelektrischer Punkt ausgewählter Enzyme verschiedener Streptomycceten auf Grundlage von in der NCBI-Datenbank hinterlegten Aminosäure-Sequenzen.**

Art	Enzyme	NCBI- Accession- number	berechnetes Molekulargewicht [kDa]	berechneter pI
<i>Streptomyces pristinaspinalis</i> ATCC 25486	Lysozyme M1	<a href="#">ZP_06908510.1</a>	23,5	9,4
<i>Streptomyces albus</i> J1074	Lysozyme M1	<a href="#">ZP_06594806.1</a>	23,4	9,4
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998	Lysozyme M1	<a href="#">ZP_06584176.1</a>	23,2	9,2
<i>Streptomyces griseus</i>	Protease A	<a href="#">M17103.1</a>	18,0	7,3
<i>Streptomyces</i> sp.	Streptogrisin B	<a href="#">ZP_07285963.1</a>	18,6	6,7
<i>Streptomyces griseus</i> XylebKG-1	Streptogrisin B	<a href="#">EGE_45398.1</a>	18,6	7,2

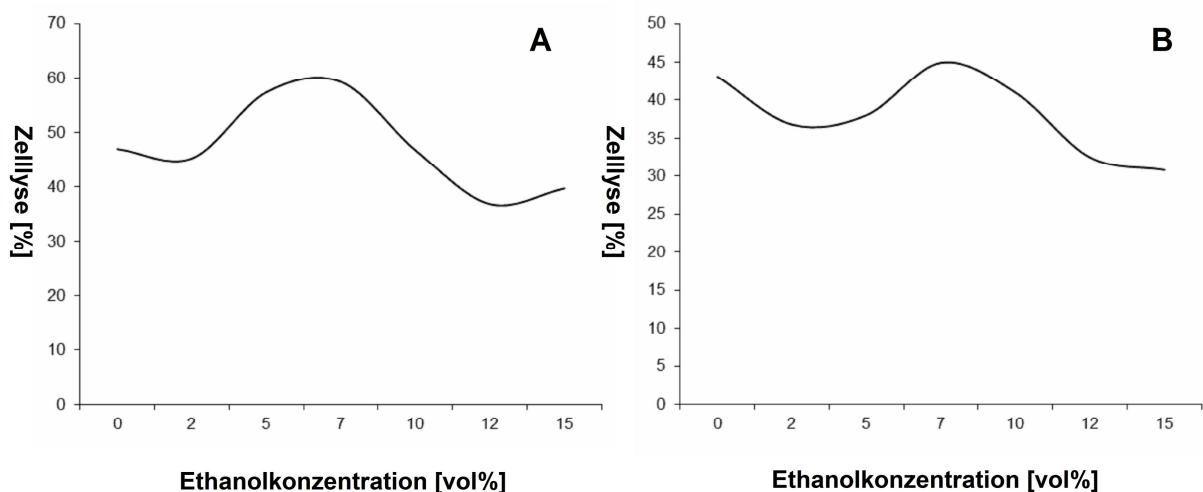
Es ist zu erkennen, dass die berechneten pIs der Referenzsequenzen von Lysozym M1 mit 9,2 bis 9,4 etwas höher lagen als der mit Hilfe der analytischen IEF bestimmte Wert von 8,8 für die gereinigte Muramidase (siehe Tabelle 3.23). Jedoch lag dieser Wert noch annähernd im Bereich der Referenz-Proteine. Anders konnte dies bei der gereinigten Protease beobachtet werden. Hier wick der ermittelte Wert von ca. 9,7 deutlich von den theoretischen Werten der Referenz-Proteasen ab. Der pI dieser Proteine lag zwischen 6,7 und 7,3 und hatte damit, trotz ähnlicher Molekulargewichte und Aminosäuresequenzen, eine Schwankung von 0,5. Da es sich aber bei der aufgetragenen Proteinprobe der Protease um ein bakteriolytisches und proteolytisches Enzym handelte, konnte davon ausgegangen werden, dass der ermittelte isoelektrische Punkt dem tatsächlichen Wert entspricht. Weiter

war anzumerken, dass es sich bei den berechneten pls um theoretische Werte handelte, wobei als Grundlage der Berechnung nur die Aminosäuresequenz unabhängig von der Struktur und Umgebung des Proteins genutzt wurde. Dies war eine mögliche Erklärung für die starke Abweichung des ermittelten Werts von 9,7 für die Protease von den theoretischen pls der Referenz-Proteine.

### 3.9.3 Bestimmung der Aktivitäts-Optima der gereinigten Enzyme unter verschiedenen Parametern

Zur weiteren Charakterisierung der bakteriolytischen Enzyme aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 wurde ihre Aktivität unter verschiedenen Bedingungen ermittelt. Drei wichtige Parameter für die Weinbereitung sind die Temperatur, der pH-Wert sowie die Ethanolkonzentration. Deshalb wurden Zellen von *Lactobacillus brevis* B 190 in verschiedenen Puffern mit den jeweiligen Versuchsparametern aufgenommen und mit Enzymlösung versetzt. Anschließend erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 600 nm um festzustellen, ob eine Zelllyse stattgefunden hatte.

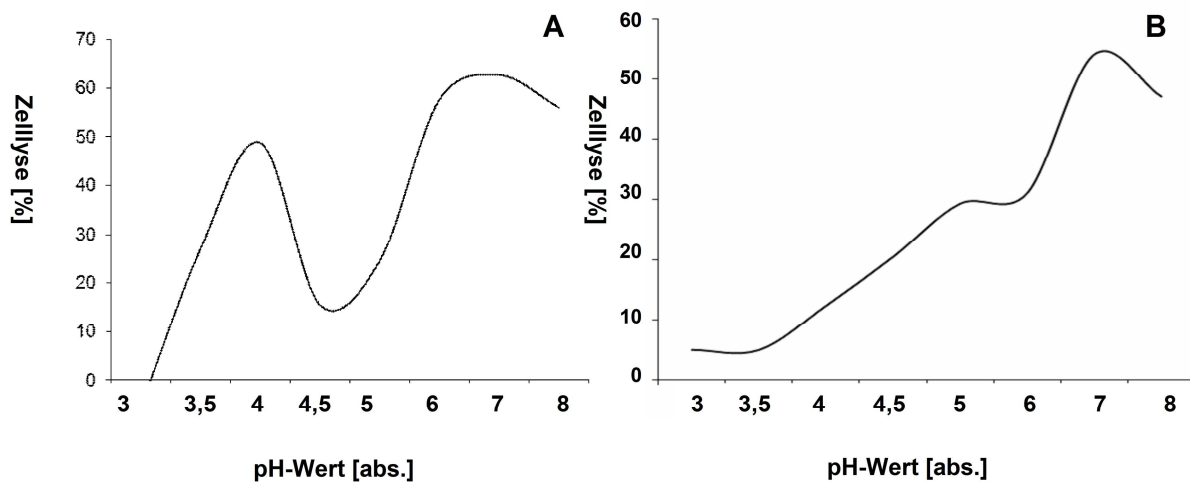
Die Ergebnisse der Untersuchung des Aktivitäts-Optimums bezüglich der Ethanolkonzentration sind in Abbildung 3.46 dargestellt.



**Abbildung 3.46:** Graphische Darstellung der Zelllyse von *Lactobacillus brevis* B 190 durch die gereinigte Protease (A) und Muramidase (B) bei verschiedenen Ethanolkonzentrationen. Eingesetzt wurden 1,28 µg Protease und 0,72 µg Muramidase. Die Inkubationszeit betrug 24 h bei 30 °C.

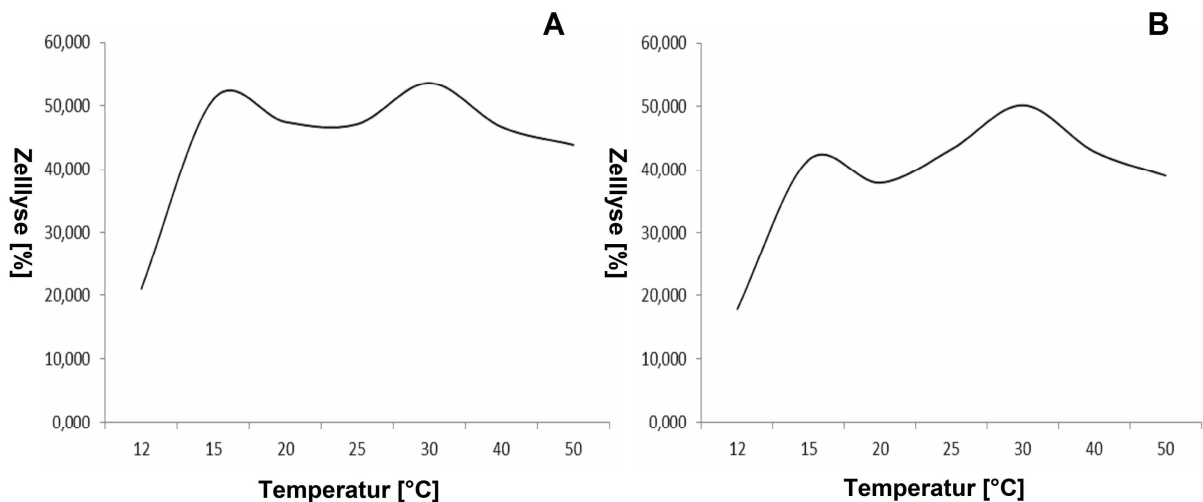
Es ist zu erkennen, dass beide Kurven einen ähnlichen Verlauf zeigten (Abbildung 3.46). Nach einer Abnahme der bakteriolytischen Aktivität bei einer Ethanol-Konzentration von 2 Vol% kam es zu einer Steigerung bis zur maximalen Zelllyse bei 7 Vol% (60 % bei der gereinigten Protease, 45 % bei der gereinigten Muramidase). Anschließend fiel die Aktivität der Enzyme leicht ab. Aus der Abbildung 3.46 geht ebenfalls hervor, dass die gereinigte

Muramidase eine geringere Schwankung der Zelllyse hinsichtlich der Ethanol-Konzentration aufwies als die Protease. Jedoch war zu bemerken, dass die bakteriolytische Aktivität auch bei der Protease bei allen Ethanol-Konzentrationen gewährleistet blieb. Vor allem unter den Ethanol-Werten, die zu Beginn der Gärung vorliegen, zeigten die beiden Enzyme keinen Aktivitätsverlust. Somit hatten die im Wein vorherrschenden Ethanol-Konzentrationen keinen größeren Einfluss auf die Aktivität der Muramidase und der Protease.



**Abbildung 3.47:** Graphische Darstellung der Zelllyse von *Lactobacillus brevis* B 190 durch die gereinigte Protease (A) und Muramidase (B) bei verschiedenen pH-Werten. Eingesetzt wurden 1,28 µg Protease und 0,72 µg Muramidase. Die Inkubationszeit betrug 24 h bei 30 °C.

Ein weiterer wichtiger Faktor der Weinbereitung ist der pH-Wert. Abbildung 3.47 zeigt die Aktivität der gereinigten Enzyme aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 bei verschiedenen pH-Werten. Im Fall der Protease konnten zwei Aktivitätsmaxima beobachtet werden (siehe Abbildung 3.47 A). Das erste Maximum lag bei pH 4,0. Hier wurde eine Zelllyse von ca. 50 % erreicht. Bei pH 4,5 nahm die Aktivität ab, um anschließend wieder anzusteigen. Die maximale Zelllyse von ca. 62 % wurde bei pH 7,0 erreicht. Eine Erhöhung des pH-Wertes brachte keine Steigerung der Aktivität mehr. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die gereinigte Protease bei allen getesteten pH-Werten (außer pH 3,0) in der Lage war den Testorganismus *Lactobacillus brevis* B 190 zu lysieren. Im Gegensatz zur Protease zeigte der Aktivitätsverlauf der Muramidase nur ein Maximum (siehe Abbildung 3.47 B). Dieses lag mit einer Zelllyse von ca. 57 % bei einem pH-Wert von 7,0. Hierbei stieg die bakteriolytische Aktivität kontinuierlich von pH 3,0 bis zum Maximum an. Die Messung der Probe bei pH 8,0 zeigte keine weitere Steigerung der Zelllyse. Im Fall der Muramidase konnte eine Lyse des Testorganismus bei allen pH-Werten beobachtet werden. Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die gereinigte Protease zwei Aktivitäts-Maxima besaß, eines bei pH 4,0 und eines bei pH 7,0, während die Muramidase ihr einziges Aktivitäts-Maximum bei pH 7,0 aufwies.



**Abbildung 3.48:** Graphische Darstellung der Zelllyse von *Lactobacillus brevis* B 190 durch die gereinigte Protease (A) und Muramidase (B) bei verschiedenen Temperaturen. Eingesetzt wurden 1,28 µg Protease und 0,72 µg Muramidase. Die Inkubationszeit betrug 24 h.

Bezüglich der bakteriolytischen Aktivität unter verschiedenen Temperaturen zeigten die Kurven der beiden gereinigten Enzyme, vergleichbar der Ethanol-Konzentration, eine hohe Ähnlichkeit (siehe Abbildung 3.48). Bei einer Temperatur von 12 °C war die gereinigte Protease in der Lage ca. 20 % der Zellen von *Lactobacillus brevis* B 190 zu lysieren. Durch die Erhöhung der Temperatur auf 15 °C ließ sich die Aktivität um über 30 % auf 51 % Zelllyse steigern. Anschließend fiel die bakteriolytische Aktivität leicht ab, um dann bei 30 °C ihr Maximum mit 54 % zu erreichen. Mit steigender Temperatur nahm die Wirkung der Protease anschließend wieder ab. Zusammenfassend konnten somit zwei Temperatur-Optima der Protease detektiert werden, eines bei 15 °C und eines bei 30 °C. Ähnlich zur Protease zeigte sich die Muramidase hinsichtlich des Verlaufs des Temperatur-Optimums. Dieses Enzym wies bei der ersten untersuchten Temperatur von 12 °C eine Zelllyse von ca. 18 % auf. Dieser Wert konnte durch die Erhöhung der Inkubations-Temperatur um 3 °C mehr als verdoppelt werden. Das Temperatur-Optimum der gereinigten Muramidase lag mit ungefähr 50 % Lyse von *Lactobacillus brevis* B 190 bei 30 °C. Eine weitere Erhöhung der Temperatur resultierte nicht in einer Aktivitäts-Steigerung. Es ließ sich zeigen, dass zwischen 15 und 50 °C die bakteriolytische Aktivität nahezu konstant blieb und nur um ca. 12 % schwankte. Auch in dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass beide Enzyme in der Lage waren unter allen getesteten Varianten die Zellen des Testorganismus *Lactobacillus brevis* B 190 zu lysieren. Vor allem die niedrigen Temperaturen (15 und 20 °C) sind für die Weinbereitung von speziellem Interesse, da in diesem Bereich hauptsächlich die alkoholische Gärung durchgeführt wird.

Abschließend sind die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der gereinigten Enzyme aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 noch einmal tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 3.24).

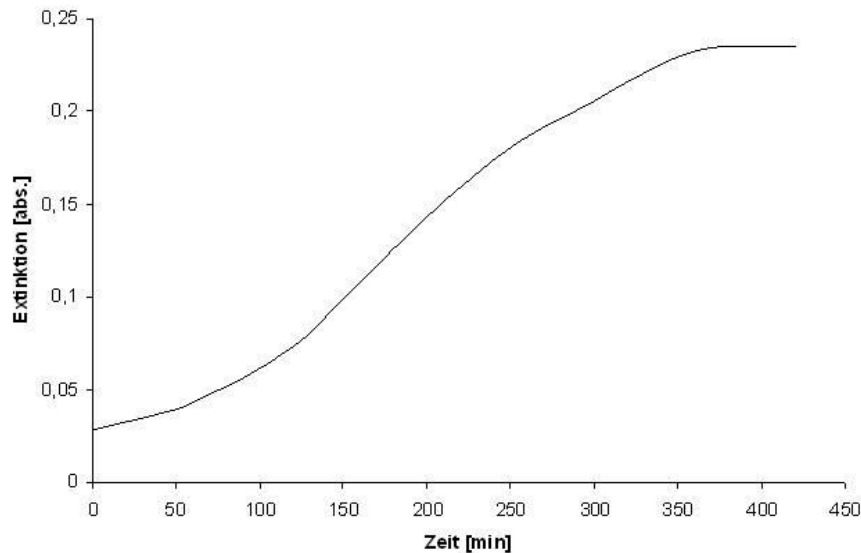
**Tabelle 3.24: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Aktivität der gereinigten Enzyme aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 bei verschiedenen Parametern.**

Parameter	Muramidase	Protease
Ethanol	Optimum 7 Vol% aktiv zwischen 0 und 15 Vol%	Optimum 7 Vol% aktiv zwischen 0 und 15 Vol%
pH-Wert	Optimum pH 7.0  aktiv zwischen pH 3.0 und pH 8.0	Optimum 1: pH 4.0 Optimum 2: pH 7.0  aktiv zwischen pH 3.5 und pH 8.0
Temperatur	Optimum 30 °C aktiv zwischen 12 und 50 °C	Optimum 30 °C aktiv zwischen 12 und 50 °C

#### 3.9.4 Nachweis und Quantifizierung der Protease-Aktivität

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die gereinigte Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 in der Lage war, den Testorganismus *Lactobacillus brevis* B 190 zu lysieren, wurde überprüft, ob es sich hierbei um eine proteolytische Reaktion handelte. Hierzu wurde die proteolytische Aktivität des gereinigten Enzymes anhand des Abbaus von Azo-Casein ermittelt. Bei Azo-Casein handelt es sich um ein mit einem Azo-Farbstoff gekoppeltes Casein. Durch Proteolyse des Caseins wird dieser Farbstoff freigesetzt und kann photometrisch nachgewiesen werden.

Der Verlauf der proteolytischen Aktivität wurde über einen Zeitraum von sieben Stunden gemessen (siehe Abbildung 3.49).



**Abbildung 3.49: Graphische Darstellung der proteolytischen Aktivität der gereinigten Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 in Abhängigkeit der Zeit.** Als Substrat diente Azo-Casein (5 mg/ml). Eingesetzt wurden 1,14 µg Enzym. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C.

Die in Abbildung 3.49 dargestellte Kurve der proteolytischen Aktivität der gereinigten Protease zeigt einen leicht sigmoidalen Verlauf. Zu Beginn der Inkubation nahm die Extinktion, sprich die freigesetzte Menge an Azo-Farbstoff, dass heißt die Menge an abgebautem Casein, nur leicht zu. Zwischen der Messung nach 120 Minuten und der nach 360 Minuten kam es zu einem nahezu linearen und raschen Anstieg der Enzym-Aktivität. Der nach sechs Stunden erhaltene Extinktionswert blieb im weiteren Verlauf der Messung konstant und konnte nicht mehr gesteigert werden. So ergab eine zusätzlich durchgeführte Messung nach 24 Stunden eine Extinktion von 0,238, was in etwa dem gemessenen Wert nach sieben Stunden entsprach.

Auf der Grundlage der oben genannten Ergebnisse wurde eine Unit-Definition für die gereinigte Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 erstellt. Hierbei entspricht ein Unit der Menge an Enzym, die benötigt wird um die Extinktion bei 440 nm des Azo-Farbstoffes pro Minute um 0,001 zu erhöhen.

Durch Berechnung der Steigung der Kurve in der exponentiellen Phase (siehe Abbildung 3.49) konnte ermittelt werden, dass 1,14 µg reines Enzym in der Lage war die Extinktion des Azo-Farbstoffes um 0,0007 pro Minute zu erhöhen. Somit entsprachen laut Definition 1,14 µg Protease 0,7 Units. Folglich hatte ein Unit Protease die Masse 1,63 µg. Die Ergebnisse der Unit-Bestimmung sind in Tabelle 3.25 zusammengefasst.

Tabelle 3.25: Ergebnisse der Unit-Bestimmung der gereinigten Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578.

Enzym	U [ $\mu$ g]	Spezifische Aktivität [U/mg]
Protease aus <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	1,63	614

### 3.9.4.1 Abbau von S-Layer-Proteinen durch die gereinigte Protease

Nachdem die proteolytische Aktivität der gereinigten Protease nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob das Enzym in der Lage ist, S-Layer-Proteine abzubauen. Diese Proteinschicht befindet sich außerhalb der Zellwand mancher Bakterien und bildet somit eine zusätzliche Barriere für den Angriff von beispielsweise Enzymen auf die Zellwand.

Wie in Kapitel 3.4.4 gezeigt wurde, besitzt der in dieser Arbeit verwendete Testorganismus *Lactobacillus brevis* B 190 ein S-Layer Protein mit der ungefähren Molekülmasse von 50 kDa. Durch Zugabe der gereinigten Protease zu der S-Layer-Suspension sollte der Abbau dieser Proteine überprüft werden.

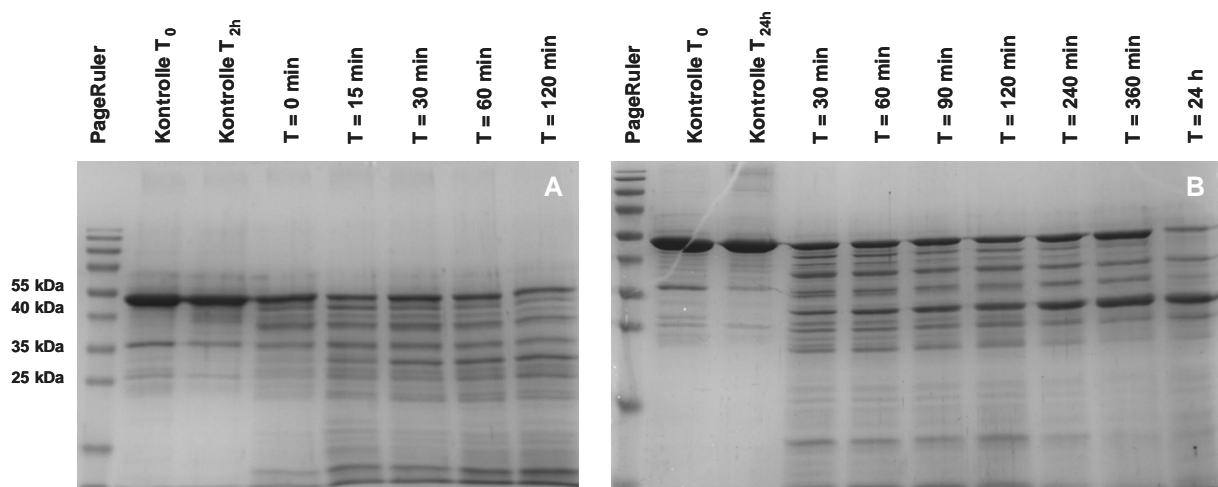


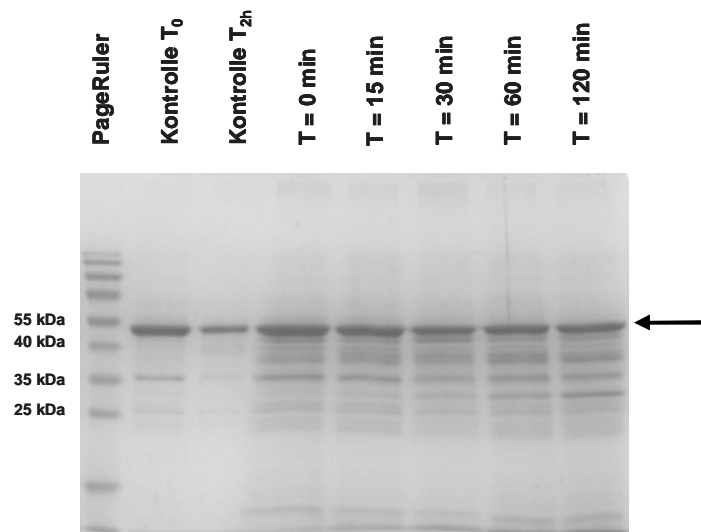
Abbildung 3.50: Abbau von S-Layer-Proteinen durch die gereinigte Protease. Photographie einer SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. T = Zeitpunkt des Reaktionsabbruchs. Eingesetzte Enzymkonzentration = 0,77  $\mu$ g. A = Abbauverlauf über 2 h. B = Abbauverlauf über 24 h. Als Negativkontrolle wurde eH<sub>2</sub>O eingesetzt.

In der Kontrolle, die nur die S-Layer-Suspension enthielt, war vor und nach der Inkubation eine starke Proteinbande mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 50 kDa zu erkennen (siehe Abbildung 3.50). Hierbei handelt es sich um den S-Layer. Die Intensität dieser Proteinbande nimmt nach der Inkubation mit der gereinigten Protease ab. Bereits zwei



Stunden nach der Enzym-Zugabe war die Intensität der S-Layer-Bande deutlich verringert (siehe Abbildung 3.50 A). Ebenfalls war zu beobachten, dass die Anzahl und Intensität der Proteinbanden, die wahrscheinlich Abbauprodukte darstellen, mit der Zeit zunehmen. Nach 24-stündiger Inkubation war die Proteinbande des S-Layer nur noch schwach zu erkennen (siehe Abbildung 3.50 B). Es war zusätzlich zu beobachten, dass die Intensität einer Proteinbande mit einem relativen Molekulargewicht von ungefähr 25 kDa, was der Hälfte der S-Layer-Bande entsprach, proportional zur Abnahme der S-Layer-Bande zunahm. Hier konnte vermutet werden, dass das S-Layer-Protein aus zwei gleich großen Domänen besteht, die durch die Protease gespalten werden. Gleichzeitig kam es zu dem Verschwinden von anderen Abbauproteinbanden im Verlauf der Zeit. Während zu Beginn der Inkubation noch eine Vielzahl von Banden zu beobachten war, konnten in der Messung nach 24 Stunden neben der 25 kDa-Proteinbande nur noch wenige, schwache Banden detektiert werden (siehe Abbildung 3.50 B). Es war davon auszugehen, dass diese Abbauprodukte weiter unspezifisch durch die Protease verdaut wurden, während das Protein mit ca. 25 kDa eine gewisse Resistenz gegenüber der gereinigten Protease aufzuweisen schien.

Um zu überprüfen, ob die gereinigte Muramidase gegebenenfalls auch eine proteolytische Aktivität besaß beziehungsweise in der Lage war S-Layer-Protein abzubauen, wurde mit ihr analog zur Protease verfahren. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 3.51 dargestellt.

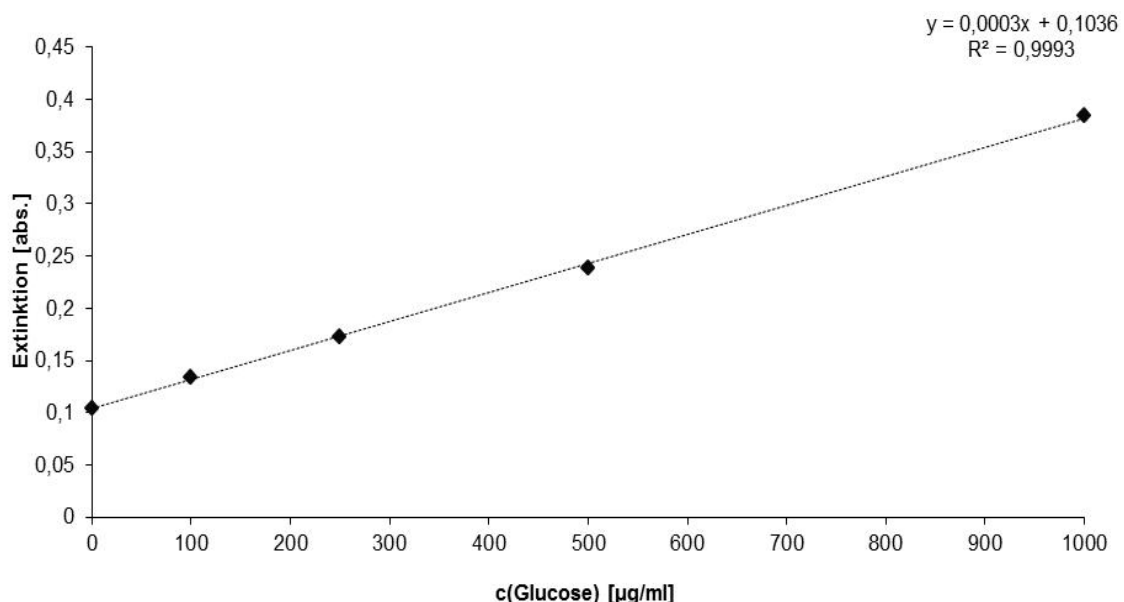


**Abbildung 3.51: Abbau von S-Layer-Proteinen durch die gereinigte Muramidase. Photographie einer SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung.** T = Zeitpunkt des Reaktionsabbruchs. Eingesetzte Enzymkonzentration = 0,35 µg. Als Negativ-Kontrolle wurde eH<sub>2</sub>O eingesetzt.

Wie bereits in Abbildung 3.50 nachgewiesen, konnte auch in der Kontrolle der Abbildung 3.51 die S-Layer-Bande mit der Größe von ca. 50 kDa beobachtet werden. Nach Zugabe der gereinigten Muramidase zu den S-Layer-Proteinen konnte keine Abnahme der Intensität der S-Layer-Bande (siehe Pfeil) beobachtet werden. Auch nach zweistündiger Inkubation besaß die 50 kDa-Proteinbande noch dieselbe Intensität wie die Kontrolle ohne Enzymzugabe. Aufgrund dieser Ergebnisse war davon auszugehen, dass die gereinigte Muramidase, wie erwartet, keine proteolytische Aktivität zeigte. Bei den Banden unterhalb der 50 kDa handelte es sich wahrscheinlich um Verunreinigungen der S-Layer-Präparation, da diese sowohl in den Proben als auch in den Kontrollen vorhanden waren.

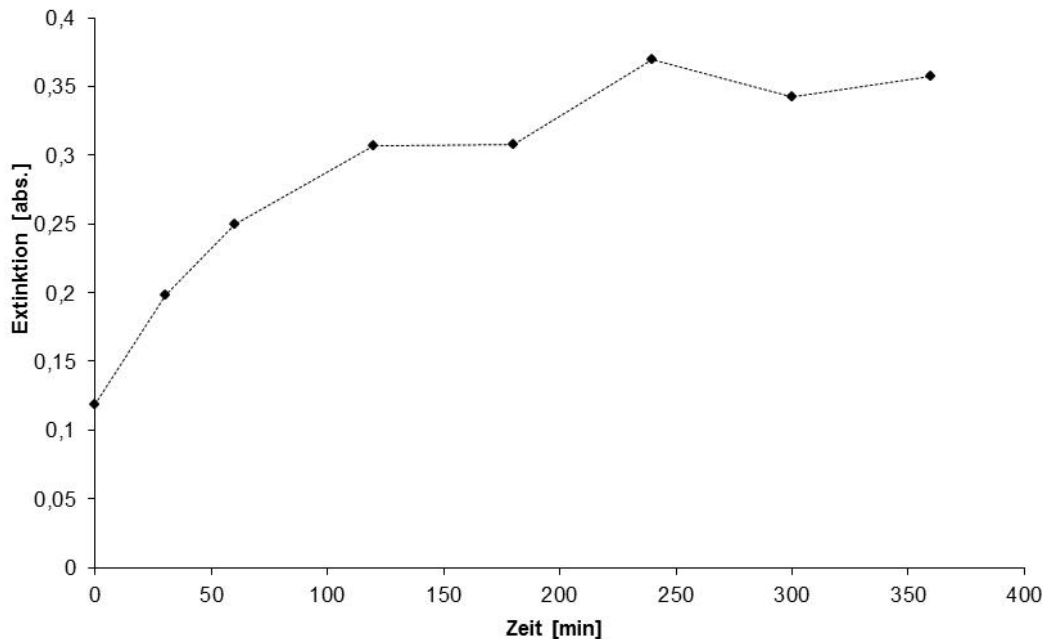
### 3.9.5 Quantifizierung der Muramidase-Aktivität

Zur Bestimmung der Muramidase-Aktivität wurde die Zellwand von *Micrococcus luteus* B 577 präpariert und anschließend mit dem gereinigten Enzym inkubiert. Beim Abbau des Peptidoglycans entstehen reduzierende Enden an der N-Acetyl-Muraminsäure. Bei Zugabe von 3,5-Dinitrosalicylsäure zum Probeansatz kommt es zur Reduktion dieser Verbindung zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure. Bei dieser Reaktion kommt es zu einem Farbumschlag, der bei 575 nm gemessen werden kann. Folglich ist die Menge an freigesetztem Zucker proportional zur Extinktionszunahme bei 575 nm. Um festzustellen welche Extinktion welcher Menge an freigesetztem Zucker entspricht, wurde eine Kalibrierungs-Kurve mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen erstellt (siehe Abbildung 3.52).



**Abbildung 3.52:** Graphische Darstellung der zur Berechnung der spezifischen Aktivität der gereinigten Muramidase aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 benutzten Kalibrierungskurve. Als Referenz dienten verschiedene Glucosekonzentrationen. Gleichung und Bestimmtheitsgrad der Kalibrierungskurve sind in der Abbildung dargestellt.

Wie in Abbildung 3.52 ersichtlich, nahm die Extinktion linear mit der Konzentration der eingesetzten Glucose zu. Mit Hilfe dieser Kenntnis konnte nun die Aktivität der Muramidase im Verlauf der Zeit bestimmt werden. Es konnte davon ausgegangen werden, dass bei einer bestimmten Extinktion – analog der Kalibrierungskurve – eine gewisse Menge reduzierende N-Acetyl-Muraminsäure freigesetzt wurde. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 3.53 dargestellt.



**Abbildung 3.53: Graphische Darstellung der Ergebnisse zur Berechnung der spezifischen Aktivität der gereinigten Muramidase aus *Streptomyces albidoflavus* B 578.** Gemessen wurde die Menge an freigesetzten reduzierenden Zuckern. Eingesetzt wurden 3,0 µg gereinigte Muramidase.

Es ist zu erkennen, dass bereits 30 Minuten nach der Enzym-Zugabe nahezu eine Verdopplung der Extinktion zu beobachten war (siehe Abbildung 3.53). Im weiteren Zeitverlauf stieg der Extinktionswert weiter, bis er bei vier Stunden sein Maximum erreichte. Eine längere Inkubation der Zellwand mit dem gereinigten Enzym brachte keine Steigerung der Extinktion. Somit war zu beobachten, dass die Reaktion höchstwahrscheinlich bereits nach vier Stunden abgeschlossen war. Der Anstieg der Extinktion, welcher mit der Freisetzung von reduzierenden Zuckern einhergeht, ist ein deutlicher Nachweis der Muramidase-Aktivität des gereinigten Enzyms.

Auch im Falle der Muramidase wurde eine Unit-Bestimmung durchgeführt. Hierbei wurde ein Unit als die Menge Enzym definiert, die benötigt wird, um in einer Minute 1 µg Glucose (bzw. N-Acetyl-Muraminsäure) freizusetzen.

Betrachtet man die Steigung der in Abbildung 3.53 gezeigten Kurve zwischen der 60 Minuten- und der vier Stunden-Messung, so ergibt sich in diesem Zeitraum eine Freisetzung

von 0,32 µg reduzierendem Zucker pro Minute. Für den Versuch wurden pro Probe 3,0 µg gereinigte Muramidase eingesetzt. Somit entsprach ein Unit laut Definition 9,38 µg Enzym. Um diese Werte einordnen zu können, wurde die Zellwand von *Micrococcus luteus* ebenfalls mit Lysozym behandelt. Hierbei ergab sich eine Freisetzung von 0,27 µg N-Acetyl-Muraminsäure pro Minute. Analog zur gereinigten Muramidase aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 wurde auch hier eine Unit-Bestimmung durchgeführt. Hierbei ergab sich für Lysozym (eingesetzt wurden 6,25 µg) eine Menge von 23,15 µg/U. Dieser Wert lag somit deutlich über dem für das gereinigte Enzym. Die Ergebnisse der Unit-Bestimmung sind abschließend nochmals in Tabelle 3.26 zusammengefasst.

**Tabelle 3.26: Ergebnisse der Unit-Bestimmung der gereinigten Muramidase aus *Streptomyces albidoflavus* B 578.**

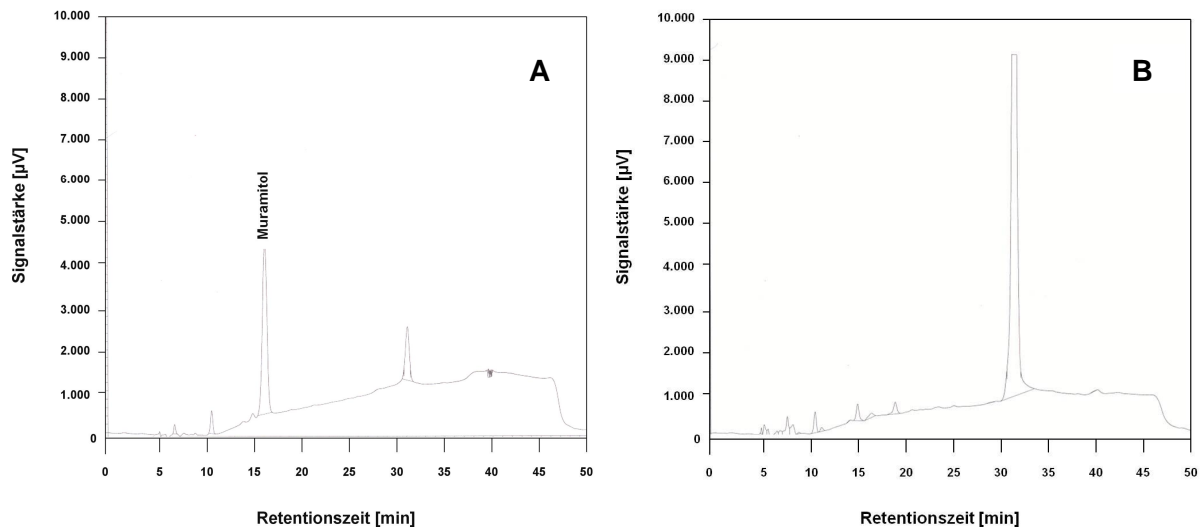
Enzym	U [µg]	Spezifische Aktivität <sup>a</sup> [U/mg]
Muramidase aus <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	9,38	107
Lysozym EC 3.2.1.17 (Sigma-Aldrich, Steinheim)	23,15	43

<sup>a</sup> gegenüber der Zellwand von *Micrococcus luteus* B 577.

### 3.9.6 Bestimmung der Schnittstelle der gereinigten Muramidase

Bei der Spaltung des Peptidoglycans der bakteriellen Zellwand durch eine Muramidase entsteht eine freie Carbonyl-Gruppe an der N-Acetyl-Muraminsäure. Durch Reduktion dieser Gruppe durch NaBH<sub>4</sub> und anschließender Hydrolyse entsteht der Zuckeralkohol Muramitol, welcher mit Hilfe einer Anionenaustauscherchromatographie mit gekoppelter gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) nachgewiesen werden kann.

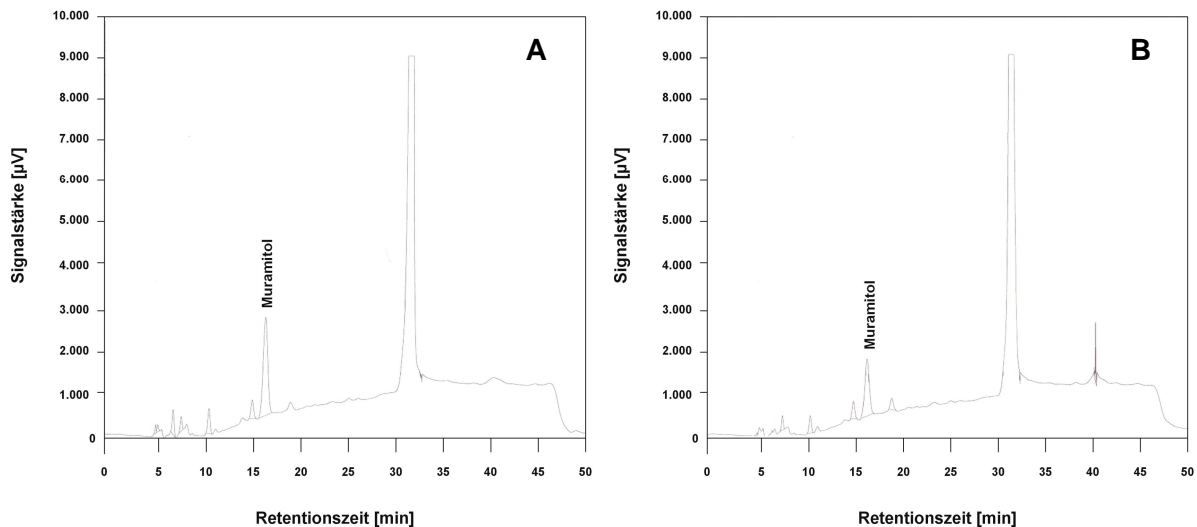
Um zu überprüfen, ob mit der angewandten Methode Muramitol nachgewiesen werden kann und ob in der hydrolysierten Zellwand Verbindungen enthalten waren, die ähnliche Retentionszeiten wie das Muramitol aufwiesen, wurde als Negativ- und Positiv-Kontrolle Zellwand bzw. Muraminsäure mit NaBH<sub>4</sub> reduziert und anschließend hydrolysiert. Das Ergebnis der chromatographischen Auftrennung der beiden Proben ist in Abbildung 3.54 dargestellt.



**Abbildung 3.54: Chromatographische Auftrennung des Muramitol-Standards (A) und der hydrolysierten Zellwand von *Micrococcus luteus* B 577 (B) mit Hilfe der HPAEC-PAD.** Die Proben wurden jeweils mit  $\text{NaBH}_4$  reduziert. Die Konzentration des Standards (Muraminsäure) betrug 1 mg/ml, die der Zellwand 1 mg/100 ml.

In Abbildung 3.54 A ist ein starkes Signal mit der Retentionszeit von ca. 16,5 Minuten zu erkennen. Hier war davon auszugehen, dass es sich bei diesem Signal um das Muramitol handelte, da als einzige Probenkomponente die Muraminsäure reduziert werden konnte. Neben dem Hauptsignal konnten weitere schwache Signale mit niedrigen Retentionszeiten detektiert werden. In der Probe, die die hydrolysierte Zellwand von *Micrococcus luteus* B 577 enthielt, war kein Signal mit ähnlicher Retentionszeit des Muramitols zu erkennen (siehe Abbildung 3.54 B). Lediglich eine Reihe schwacher Signale mit einer Retentionszeit von 5 bis 20 Minuten war detektierbar. In beiden Proben konnte ein Signal mit der Retentionszeit von ca. 31 Minuten detektiert werden. Dieses Signal war bei der Probe mit der Zellwand deutlich ausgeprägter. Bei diesem Signal könnte es sich um unspezifische Hydrolyse-Produkte handeln.

Um festzustellen, ob es sich bei dem gereinigten Enzym tatsächlich um eine Muramidase, wie die Identifizierung ergab, handelte, wurde gereinigte Zellwand von *Micrococcus luteus* B 577 mit diesem Enzym behandelt. Anschließend wurde die Probe analog zu den oben beschriebenen Kontrollen behandelt. Gleichzeitig wurde die Zellwand mit Lysozym behandelt, um die Methode zu überprüfen.



**Abbildung 3.55: Chromatographische Auftrennung der mit Lysozym behandelten und hydrolysierten Zellwand von *Micrococcus luteus* B 577 (A) und der mit gereinigten Muramidase behandelten und hydrolysierten Zellwand von *Micrococcus luteus* B 577 (B) mit Hilfe der HPAEC-PAD.** Die Proben wurden jeweils mit  $\text{NaBH}_4$  reduziert. Die Konzentration des Lysozyms betrug 1 mg/ml, die der gereinigten Muramidase 24  $\mu\text{g/ml}$ .

In beiden in Abbildung 3.55 dargestellten Chromatogrammen ist ein Signal mit der Retentionszeit von 16,5 Minuten zu erkennen. Aufgrund des in Abbildung 3.54 dargestellten Standards des Muramitols, konnte der detektierte Signal-Peak in den Proben, welche mit Enzym behandelt wurden, dieser Verbindung zugewiesen werden. Bei der Probe, die mit Lysozym inkubiert wurde, war – wie zu erwarten – dieses Signal stark ausgeprägt (siehe Abbildung 3.55 A). Jedoch ist dieses auch in der Probe mit dem gereinigten Enzym aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 deutlich zu erkennen. Neben den erwähnten Signalen des Muramitols, waren in beiden Chromatogrammen weitere schwache Signale sowie ein starkes Signal mit der Retentionszeit von ca. 31 Minuten zu detektieren. Dieses Signal konnte schon in den beiden Proben der Positiv- und Negativ-Kontrolle nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass dieses Signal in allen vier Proben vorhanden war, sprach dafür, dass es sich hierbei um Nebenprodukte der hydrolytischen Spaltung handelte.

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse, welche eindeutig das Freiwerden des Muramitols belegen, konnte – zusätzlich zur proteinbiochemischen und molekulargenetischen Identifizierung – das gereinigte Enzym aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 als Muramidase identifiziert werden.

## 4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurde das Vorkommen biogene Amine bildender Bakterien in deutschen Versuchswainen des Dienstleistungszentrums ländlicher Raum in Neustadt an der Weinstrasse untersucht. Hierzu wurden vor allem Milchsäurebakterien isoliert, mit Hilfe verschiedener Methoden identifiziert und hinsichtlich ihres Potentials zur Bildung biogener Amine überprüft. Ein weiterer Teil der Arbeit bestand in der Reinigung und Identifizierung zweier bakteriolytischer Enzyme aus dem Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578. Beide Enzyme wurden in Bezug auf ihre Aktivität unter verschiedenen weinrelevanten Bedingungen getestet sowie proteinbiochemisch untersucht. Hierdurch sollte festgestellt werden, ob man mit Hilfe der gereinigten Enzyme in der Lage ist, die Weinqualität mindernden Bakterien in ihrem Wachstum zu hemmen. Ein möglicher Einsatz der Enzyme in der Weinbereitung könnte eine Alternative zur konventionellen mikrobiologischen Stabilisierung durch Zugabe von Sulfid oder Lysozym darstellen.

### 4.1 Anwendung verschiedener molekularbiologischer Methoden zur Identifizierung der isolierten Bakterien aus Versuchswainen

Durch die Isolierung mit Hilfe verschiedener Kulturmedien konnte eine große Anzahl an Reinkulturen gewonnen werden. Insgesamt wurden 148 bakterielle Stämme aus 54 Versuchswainen gewonnen.

Zur Identifizierung dieser Stämme wurden moderne molekularbiologische Methoden verwendet. Im Gegensatz zur klassischen Identifizierung aufgrund physiologischer Merkmale, sind für die molekularbiologischen Untersuchungen keine Lebend- und zum Teil auch keine Reinkulturen notwendig. Sie sind somit kulturunabhängig. Milchsäurebakterien, welche hauptverantwortlich für die Bildung biogener Amine sind (Landete *et al.*, 2005; Garai *et al.*, 2007; Vincenzini *et al.*, 2009), können physiologisch aufgrund der Verwertung verschiedener C-Quellen, Endprodukte der Milchsäuregärung oder Wachstumsverhalten bei verschiedenen Bedingungen, wie Ethanol- oder NaCl-Konzentration unterschieden werden (König und Fröhlich, 2009).

Eine von Fröhlich und Pfannebecker (2007) entwickelte DNA-Fingerprintmethode ermöglicht die artspezifische Identifizierung von weinrelevanten Milchsäurebakterien (SAPD-PCR; **s**pecifically **a**mplified **p**olymorphic **D**NA-PCR). Hierbei werden Primer verwendet, die die Erkennungssequenz der *NotI*-Endonuklease enthalten. Diese Oligonukleotide binden während der PCR an die jeweiligen Zielsequenzen und erzeugen somit DNA-Fragmente spezifischer Länge. Bei der Auftrennung dieser DNA-Fragmente in einem Agarose-Gel entsteht ein Bandenmuster das für die jeweilige Art spezifisch ist. Pfannebecker und Fröhlich

(2008) konnten mit Hilfe der SAPD-PCR 65 % der untersuchten *Pediococcus*-Stämme eindeutig den jeweiligen Arten zuordnen. Durch Anwendung der Methode auf weitere Milchsäurebakterien-Arten konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass alle bis heute im Wein beschriebenen Milchsäurebakterien (Mañes-Lázaro *et al.*, 2008a, 2008b, 2009; König und Fröhlich, 2009) durch die Amplifikation ihrer DNA mit dem Primer C-Not (5' - AGC GGC CGC C - 3') ein bestimmtes Bandenmuster aufweisen, welches für die jeweilige Art spezifisch ist. Durch den Vergleich der Bandenmuster der isolierten Stämme mit denen von Referenzstämmen aus der Kultursammlung der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), konnte somit eine große Anzahl der Bakterien identifiziert werden. Die Sequenzierung einzelner Stämme konnten die Befunde der SAPD-PCR bestätigen. Es konnte somit gezeigt werden, dass die SAPD-PCR für die zeitnahe Identifizierung von Mikroorganismen in Reinkulturen genutzt werden kann.

Da nicht alle isolierten Stämme durch den Einsatz der SAPD-PCR eindeutig phylogenetisch eingeordnet werden konnten, wurden weitere molekularbiologische Methoden angewandt. Zur klassischen Identifizierung wird in den meisten Fällen die ribosomale DNA näher untersucht (Ludwig und Schleifer, 1994). Hierbei wird in der Regel die 16S rDNA sequenziert und mit in Datenbanken hinterlegten Sequenzen verglichen. So ist eine grobe Zuordnung der Bakterien in verschiedene Klassen möglich. Jedoch konnten Fox *et al.* (1992) zeigen, dass eine speziesspezifische Identifizierung auf Grundlage der 16S rDNA in manchen Fällen nicht möglich ist. So weist zum Beispiel die Gattung *Lactobacillus* eine sehr hohe Homologie innerhalb der verschiedenen 16S rDNA-Sequenzen auf (Mohania *et al.*, 2008). Um einen generellen Überblick über die systematische Zugehörigkeit einzelner Bakterien zu erhalten, kann jedoch die Sequenz der 16S rDNA herangezogen werden. So konnten einige der in dieser Arbeit isolierten Stämme bestimmten Arten zugeordnet werden.

Eine schnelle und einfache Methode zur Identifizierung von Bakterien stellt die Multiplex-PCR dar (Pfannebecker und Fröhlich, 2008; Petri *et al.*, 2011). Hierbei werden bestimmte Primer verwendet, die artspezifisch ein PCR-Fragment erzeugen. Diese Oligonukleotide werden auf der Grundlage von SAPD-PCR Banden konstruiert, die für die jeweilige Art einzigartig sind. Anhand der Größe des entstandenen DNA-Amplifikats nach der Multiplex-PCR kann eine Art nachgewiesen werden. Durch den gleichzeitigen Einsatz mehrerer Primer-Paare ist eine simultane Identifizierung verschiedener Bakterien möglich. Diese Methode bedingt daher keine Reinkulturen und ist in der Lage eine geringe Anzahl an Bakterien nachzuweisen. So konnten Pfannebecker und Fröhlich (2008) durch den Einsatz von 35 PCR-Zyklen noch zehn Zellen von *Pediococcus damnosus* DSM 20332<sup>T</sup> pro Milliliter Kultur nachweisen. Durch die Weiterentwicklung der bestehenden Methode am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz können zum jetzigen Zeitpunkt 13 verschiedene Milchsäurebakterien zeitgleich detektiert werden:



*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus* und *Weissella paramesenteroides* (Petri *et al.*, 2011).

Neben den hier beschriebenen und angewandten molekularbiologischen Methoden zur Identifizierung gibt es noch eine Reihe weiterer Techniken (Fröhlich *et al.*, 2009). Hierzu zählen Fingerprint-Methoden wie die random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR; Du Plessis und Dicks, 1995), die pulsed field gel electrophoresis (PFGE; Larisika *et al.*, 2008) oder das Ribotyping (Rodtong und Tannock, 1993), aber auch Methoden, die auf verschiedenen Fragmentmustern aufgrund von Enzymverdau einzelner DNA-Bereiche oder der Gesamt-DNA basieren (Rodas *et al.*, 2003; Claisse *et al.*, 2007). Immer häufiger findet auch die Realtime-PCR ihren Einsatz zum Nachweis von Milchsäurebakterien (Haarman und Knol, 2006; Kao *et al.*, 2007). In den letzten 20 Jahren wird auch mehr und mehr die Massenspektroskopie als analytische Anwendung zur Identifizierung in der Mikrobiologie verwendet (Sauer und Kliem, 2010).

#### **4.2 Entwicklung einer dünnschichtchromatographischen Methode zum qualitativen Schnellnachweis biogener Amine**

Die Dünnschichtchromatographie stellt eine günstige und relativ einfach handhabbare Methode zur Trennung von Stoffgemischen dar. In der Regel beruht die Trennung der einzelnen Komponenten auf Wechselwirkungen zwischen den Verbindungen und einer mobilen sowie einer stationären Phase (Stahl, 1967).

Zum Nachweis verschiedener biogener Amine mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurden bereits mehrere Studien durchgeführt (Eaton und Mullis, 1988; Lapa-Guimarães und Pickova, 2004; Latorre-Moratalla *et al.*, 2009). In allen Arbeiten wurden die biogenen Amine zuerst derivatisiert, um anschließend mittels verschiedener Laufmittelsysteme getrennt zu werden. Seiler und Wiechman (1970) beschrieben erstmals die Derivatisierung mit Dansyl-Chlorid und die anschließende Detektion der biogenen Amine mit UV-Licht. Als andere Reagenzien zur Visualisierung der Amine nach der dünnschichtchromatographischen Trennung können Ninhydrin, *ortho*-Phthalaldehyd, Fluorescamin oder *ortho*-Diacetylbenzol verwendet werden (Lieber und Taylor, 1978). Jedoch ist man aufgrund von eventuellen gesundheitlichen Risiken und der geringen Nachweisempfindlichkeit von dem Gebrauch von Ninhydrin und *ortho*-Diacetylbenzol abgekommen. Die beiden anderen Reagenzien, *ortho*-Phthalaldehyd und Fluorescamin, weisen eine hohe Nachweisgrenze für biogene Amine auf. Eine hohe Lichtempfindlichkeit und die relativ kurze Stabilität der Amin-Derivate dieser Reagenzien ist ein Nachteil ihrer Anwendung in der Dünnschichtchromatographie.

Mit Hilfe zweier Laufmittelsysteme konnte die Trennung von elf weinrelevanten biogenen Aminen erzielt werden. Die optimale Trennung der Amine Ethylamin, Hexylamin, Histamin, Isoamylamin, Phenylethylamin, Serotonin und Tyramin konnte mit einem Laufmittel aus Toluol, Chloroform und Triethylamin (10:6:7, v/v/v) erzielt werden, während zur Trennung von Cadaverin, Ethanolamin, Putrescin und Tryptamin sich ein Gemisch aus Chloroform, Diethylether und Triethylamin (6:2:1, v/v/v) als optimales Laufmittel herausstellte. Die Nachweisgrenze der einzelnen Amine betrug hierbei zwischen 1 und 10 mg/l. Latorre-Moratalla *et al.* (2009) konnten unter der Verwendung eines Gemisches aus Chloroform, Diethylether und Triethylamin (4:1:1, v/v/v) acht verschiedene biogene Amine nachweisen. Dies gelang auch Lapa-Guimarães und Pickova (2004) mit Hilfe einer Doppelentwicklung der Dünnschichtplatte mit zwei verschiedenen Laufmitteln. Im Gegensatz zu diesen Studien reichten bei der hier entwickelten Methode geringere Mengen an Derivatisierungsreagenz und Probe aus, um eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Eine Festphasen-Extraktion zur Aufreinigung der biogenen Amine vor der Dünnschichtchromatographie, wie sie von Meseguer-Lloret *et al.* (2004) beschrieben wurde, war nicht notwendig. Ein Nachweis aller Amine mit einem Laufmittel war ebenfalls möglich, jedoch konnten die Amine Cadaverin, Ethanolamin, Putrescin und Tryptamin nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Dies lag womöglich an ihrer nahen chemischen Verwandtschaft. Für die Durchführung der Untersuchungen zur Bildung biogener Amine durch die Eigenisolate war die Trennung aller Amine jedoch nicht notwendig, so dass hierfür das Laufmittel Toluol, Chloroform und Triethylamin (10:6:7, v/v/v) verwendet wurde.

Durch den Einsatz nur eines Laufmittels zur Detektion der biogenen Amine konnte der Zeitaufwand für die Untersuchung einer großen Probenzahl minimiert werden. Eine weitere Zeiteinsparung wurde durch die Erhöhung der Derivatisierungstemperatur erzielt. Ebenso konnte durch Zusatz von Tween 80 die Intensität und die Stabilität der Dansyl-Derivate erhöht werden (Linares *et al.*, 1998). Somit stellt die entwickelte Methode ein einfaches, günstiges und schnelles Werkzeug zum Nachweis von biogenen Aminen dar.

#### **4.3 Bildung biogener Amine und systematische Zugehörigkeit der aus Versuchswainen isolierten Bakterien**

Die Mehrzahl der insgesamt 148 isolierten Stämme konnte Arten von Milchsäurebakterien zugeordnet werden. Der am häufigsten gefundene Vertreter dieser Familie war *Lactobacillus brevis*. Diese Art konnte 58 Mal isoliert werden, was einen Gesamtanteil von ca. 40 % der Isolate ausmachte. *Oenococcus oeni*, welcher einen wichtigen Bestandteil der Mikroflora im Milieu Wein ausmacht, wurde insgesamt 49 Mal isoliert. Somit machten diese beiden Spezies mehr als zwei Drittel der isolierten Bakterien aus. Neben den beiden genannten Arten, machten die beiden Pediokokken-Arten, *Pediococcus damnosus* (9 Stämme) und

*Pediococcus parvulus* (5 Stämme) einen weiteren großen Anteil an den isolierten Bakterien aus. Diese beiden Mikroorganismen konnten ausschließlich in den Versuchsweinen der Rebsorte Spätburgunder gefunden werden, wohingegen *Leuconostoc mesenteroides* (4 Stämme) nur in den Weißburgunder-Weinen nachweisbar war. Die drei letztgenannten Organismen sind in der Lage unter bestimmten Bedingungen extrazelluläre Polysaccharide zu bilden, welche zur Erhöhung der Viskosität des Weines führen und im Weinfehler „Lindton“ gipfeln können (Renouf *et al.*, 2007; Montersino *et al.*, 2008; Bartowsky, 2009). Weiter wurden die Arten *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus hilgardii* und *Lactobacillus paracasei* in geringer Anzahl isoliert. Die identifizierten Milchsäurebakterien wurden bereits im Wein nachgewiesen (Wibowo *et al.*, 1985; König und Fröhlich, 2009) und können neben erwünschten Stoffwechselreaktionen, wie der malolaktischen Fermentation, auch Verbindungen bilden, die die Qualität des Weines vermindern (Gram *et al.*, 2002; Bartowsky, 2009). Sie stellen somit potentielle Schädlinge in der Weinbereitung dar.

Neben Vertretern der Milchsäurebakterien wurden Organismen zweier weiterer Genera isoliert. Hierbei handelte es sich um vier Essigsäurebakterien, die den Arten *Acetobacter oeni* und *Acetobacter tropicalis* angehörten, sowie drei verschiedenen *Staphylococcus*-Arten: *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus condimentii* und *Staphylococcus epidermitis*. Während das Vorkommen von *Acetobacter oeni* in der Weinbereitung bereits beschrieben ist (Silva *et al.*, 2006; Guillamón und Mas, 2009), konnte *Acetobacter tropicalis* noch nicht nachgewiesen werden. Dieser Organismus wurde zuerst aus Kokosnüssen isoliert (Lisdiyanti *et al.*, 2000) und von Kounatidis *et al.* (2009) als Hauptsymbiont der Oliven-Fruchtfliege (*Bactrocera oleae*) beschrieben. Die Infektion von Weinen mit Essigsäurebakterien durch Fruchtfliegen ist bekannt. Somit könnte der Organismus auf diese Art in die Versuchsweine gelangt sein. Das Vorkommen von *Acetobacter tropicalis* und weiterer neu isolierter Essigsäurebakterien ist in Wirth *et al.* (2011) zusammengefasst. Die in dieser Arbeit angewandte Methode des RFLP der 16S rDNA konnte bereits von Ruiz *et al.* (2000) und González *et al.* (2006) als zuverlässiges Werkzeug zur Identifizierung von Essigsäurebakterien nachgewiesen werden.

Ungewöhnlich war die Isolierung von insgesamt zehn Stämmen der Gattung *Staphylococcus*. Diese Organismen spielen in der Regel keine Rolle in der Weinherstellung. Sie könnten durch Verunreinigungen des Traubenmaterials oder der Geräte sowie durch unsauberes Arbeiten bei der Probenverarbeitung in die Weine gelangt sein. Die drei isolierten Arten, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus condimentii* und *Staphylococcus epidermitis*, wurden aus anderen Lebensmitteln isoliert. So wurde *Staphylococcus condimentii* erstmals in Soja-Maische nachgewiesen (Probst *et al.*, 1998) während *Staphylococcus capitis* und *Staphylococcus condimentii* häufig in Fleisch- und Wurstprodukten wiedergefunden wurden (De las Rivas *et al.*, 2007).

Neben der Bildung von Fehlgerüchen spielt vor allem das Vorkommen und die Bildung biogener Amine durch Milchsäurebakterien eine zentrale Rolle in der aktuellen Weinforschung (Landete *et al.*, 2005; Costanini *et al.*, 2009; Kaschak *et al.*, 2009). Nicht nur wegen möglicher sensorischer Beeinflussung der Weinqualität (Rohn *et al.*, 2005) sondern vor allem wegen den mit ihnen in Verbindung gebrachten gesundheitlichen Risiken (Silla-Santos, 1996; Smit *et al.*, 2008) sind biogene Amine von speziellem Interesse. Hauptverantwortlich für die Bildung dieser niedermolekularen Stickstoffverbindungen während der Weinbereitung sind Milchsäurebakterien (Landete *et al.*, 2007a).

Die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen zeigten, dass 72 der 134 isolierten Milchsäurebakterien in der Lage waren, in einem Vollmedium ein oder mehrere biogene Amine zu bilden. Die Auswahl eines Vollmediums (MRS; De Man *et al.*, 1960) erfolgte aufgrund des besseren Vergleichs der Ergebnisse sowie der Untersuchung des Potentials der einzelnen Isolate zur Bildung biogener Amine unter Laborbedingungen. Auf den Zusatz von Vorläufer-Aminosäuren wie Histidin oder Tyramin wurde verzichtet.

Am meisten wurden die Amine Tyramin (66 Stämme) und Histamin (17 Stämme) gefunden. Diese beiden Amine kommen auch im Wein – neben Putrescin und Cadaverin – am häufigsten vor (Beneduce *et al.*, 2010). Die Bildung von Phenylethylamin konnte bei acht Stämmen, die von Ethylamin bei sechs Stämmen nachgewiesen werden. Andere Amine wurden gegebenenfalls aufgrund der Nachweisgrenze der Dünnschichtchromatographie nicht in den Kulturüberständen der isolierten Milchsäurebakterien detektiert. Alle 58 untersuchten Stämme von *Lactobacillus brevis* waren in der Lage biogene Amine zu bilden. Hierbei wurde Tyramin im Kulturüberstand aller Stämme detektiert, während Histamin (8 Stämme), Phenylethylamin (6 Stämme) und Ethylamin (4 Stämme) in geringerer Anzahl nachweisbar waren. Die Bildung von Tyramin durch *Lactobacillus brevis* in Wein wurde von Moreno-Arribas und Lonvaud-Funel (1999) beschrieben. Coton und Coton (2009) postulierten, dass es sich bei der Tyramin-Bildung dieses Milchsäurebakteriums um ein stammspezifisches Merkmal handelt, welches über horizontalen Gentransfer gewonnen werden oder verloren gehen kann. Dem widersprechen die Ergebnisse von Landete *et al.* (2007b), die zeigten, dass alle aus Weinen isolierten Stämme von *Lactobacillus brevis* in der Lage waren Tyramin zu bilden. Aufgrund dieser Befunde und denen der vorliegenden Arbeit ist es nicht auszuschließen, dass die Bildung von Tyramin in Wein eine Adaptation der Bakterien an die Umwelt darstellt, welche zum Beispiel der Regulation des intrazellulären pH-Werts oder aber auch der zusätzlichen Energiegewinnung dient. Der Aufbau einer protonenmotorischen Kraft zur ATP-Synthese durch den Amin/Aminosäure-Antiport wurde von Molenaar *et al.* (1993) bei der Bildung von Histamin durch *Lactobacillus buchneri* beschrieben. Phenylethylamin, welches ebenfalls in einigen Kulturüberständen von *Lactobacillus brevis* gefunden wurde, konnte bereits von Landete *et al.* (2007b) bei diesem

Organismus nachgewiesen werden. Daneben berichten Bover-Cid *et al.* (2001) und Landete *et al.* (2007b) von der Bildung dieses Amins durch *Lactobacillus curvatus* beziehungsweise *Lactobacillus hilgardii*. Ein Vorhandensein von Phenylethylamin oder anderen biogenen Aminen im Kulturüberstand des einzigen isolierten Stamms von *Lactobacillus hilgardii* konnte nicht detektiert werden. Landete *et al.* (2005) bezeichnen die Arten *Lactobacillus hilgardii* und *Pediococcus parvulus* als hauptverantwortliche Amin-Bildner im Wein. Aus den Versuchswainen konnten jedoch nur sechs Stämme dieser Arten isoliert werden, von denen zwei Histamin, Tyramin und Phenylethylamin bildeten. So konnte diese Annahme nicht bekräftigt werden, sondern eher widerlegt, da der hauptverantwortliche Bildner in den Versuchswainen *Lactobacillus brevis* war. Neben *Lactobacillus brevis* zeigten einige Stämme der Arten *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus parvulus* und *Leuconostoc mesenteroides* eine Bildung biogener Amine. Dies konnten bereits Landete *et al.* (2005) und Marino *et al.* (2008) nachweisen. *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus paracasei* spielen vor allem in alten Weinen eine Rolle (Moreno-Arribas und Polo, 2008). Diese Organismen können auch für das Auftreten anderer Weinefehler verantwortlich sein (Costello *et al.*, 2001; Bunková *et al.*, 2009; Bartowsky, 2009; Coton *et al.*, 2010). Studien bezüglich der Bildung biogener Amine unter weinrelevanten Bedingungen zeigten, dass das gleichzeitige Vorkommen verschiedener Arten die Amin-Produktion potenziert. So konnte in einer Co-Kultur von *Lactobacillus hilgardii* und *Oenococcus oeni* bis zu 34 % mehr Histamin nachgewiesen werden als in den jeweiligen Reinkulturen (Aredes Fernández *et al.*, 2010). Ebenfalls können diese Organismen als Kontaminationen in Hefe-Starterkulturen vorkommen und somit für die Bildung biogener Amine verantwortlich sein (Costantini *et al.*, 2009).

In den Kulturüberständen des für die Weinbereitung am wichtigsten Milchsäurebakteriums *Oenococcus oeni* wurden keine biogenen Amine gefunden. Während Straub *et al.* (1995) und Moreno-Arribas *et al.* (2003) bei je 88 beziehungsweise 39 Stämmen dieses Bakteriums keine Amin-Bildung nachwiesen, berichten Landete *et al.* (2005) von der Bildung von bis zu 99 mg/l Histamin durch *Oenococcus oeni*. Coton *et al.* (1998) und Izquierdo Canas *et al.* (2009) wiesen nach, dass *Oenococcus oeni* das genetische Potential zur Bildung von Histamin besitzen kann. Bei der industriellen Herstellung von bakteriellen Starterkulturen für den biologischen Säureabbau werden jedoch Stämme ausgesucht, deren Genotyp die Bildung biogener Amine und anderer unerwünschter Verbindungen weitgehend ausschließt. Aufgrund dieser Annahme kann vermutet werden, dass es sich bei der Mehrzahl der isolierten *Oenococcus oeni*-Stämme um Bakterien handelt, die den Weinen im Rahmen der Versuchsdurchführung zugegeben wurden. Costantini *et al.* (2009) zeigten, dass keines der getesteten *Oenococcus oeni*-Präparate in der Lage war biogene Amine zu bilden.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde der Kulturüberstand je eines Amin produzierenden Stammes einer Art mittels HPLC untersucht. Alle bei der Dünnschichtchromatographie gefundenen Amine konnten auch bei der HPLC wiedergefunden werden. Neben Tyramin, Histamin, Ethylamin und Phenylethylamin wurden noch fünf weitere Amine in den Kulturüberständen nachgewiesen: Cadaverin, Ethanolamin, Isoamylamin, Putrescin und Tryptamin, wobei lediglich Ethanolamin mit bis zu 4,01 mg/l in höheren Konzentrationen nachweisbar war. Ein Vergleich dieser Werte mit der Literatur ist nicht möglich, da alle Literaturwerte auf anderen Anzuchtmethoden beziehungsweise Nachweisverfahren beruhen. So bildet ein Stamm von *Lactobacillus brevis* bei Landete *et al.* (2007b) bis zu 1,2 g/l Tyramin und 0,2 g/l Phenylethylamin, wohingegen bei denen im Rahmen dieser Arbeit angewandten Bedingungen Konzentrationen von 1,9 mg/l respektive 0,23 mg/l für das jeweilige Amin detektiert wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein großer Anteil der in den Versuchswainen vorkommenden Bakterien in der Lage war biogene Amine zu bilden. Hauptverantwortlich für diese Bildung war *Lactobacillus brevis*, wohingegen von *Oenoccus oeni* keine Gefahr für die Weinqualität ausging.

Bezüglich der Isolate, die nicht der Familie der Milchsäurebakterien zuzuordnen waren, konnte gezeigt werden, dass zwei Stämme von *Acetobacter tropicalis* in der Lage waren Tyramin zu bilden. Die Entstehung biogener Amine durch Essigsäurebakterien im Wein ist noch nicht ausreichend untersucht und die genannte Art wurde – wie bereits erwähnt – erstmals im Rahmen dieser Arbeit aus Wein isoliert. Neben diesem Essigsäurebakterium konnten biogene Amine im Kulturüberstand von *Staphylococcus capitis* und *Staphylococcus epidermitis* detektiert werden. De las Rivas *et al.* (2007) wies das Gen für die Histidin-Decarboxylase und die Bildung von Histamin bei *Staphylococcus capitis* nach, während keine Amin-Bildung durch *Staphylococcus epidermitis* beobachtet wurde. Über die Bildung biogener Amine durch verschiedene Staphylokokken-Arten, die als proteolytische Starterkulturen bei der Reifung von Dauerwurst eingesetzt werden, referieren Bover-Cid *et al.* (1999).

Neben den Milchsäurebakterien stellen somit weitere Gattungen von Bakterien ein Risiko bezüglich der Bildung biogener Amine in der Weinbereitung dar. Es ist somit von höchster Priorität für den Winzer die Mikroflora seines Weins zu beobachten, Kontaminationen zu verhindern und gegebenenfalls frühzeitig auf das Vorkommen dieser Schadorganismen zu reagieren.

#### 4.4 Nachweis der Gene zur Produktion von biogenen Aminen durch *Lactobacillus brevis* B 190

Das Milchsäurebakterium *Lactobacillus brevis* gehört zu der natürlichen Mikroflora des Weines und ist in der Lage eine Reihe von aromaaktiven Verbindungen zu bilden (König und Fröhlich, 2009). Die Bildung von biogenen Aminen durch dieses Bakterium wurde unter anderem von Moreno-Arribas *et al.* (2003) nachgewiesen. Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurde gezeigt, dass *Lactobacillus brevis* B 190 Histamin und Tyramin unter weinrelevanten Bedingungen bildet. Hierzu zählte eine Amin-Bildung bei pH-Werten unter 3,5 sowie bei Temperaturen um die 15 °C.

Zur genaueren Untersuchung von *Lactobacillus brevis* B 190 wurden mit spezifischen Primern die jeweiligen Gene der Decarboxylasen zur Bildung von Histamin und Tyramin nachgewiesen. Das Vorhandensein einer Tyrosin-Decarboxylase bei *Lactobacillus brevis* wurde erstmals von Moreno-Arribas und Lonvaud-Funel (1999) bestätigt. Lucas *et al.* (2003) postulierten, dass die Gene die zur Bildung von Tyramin aus Tyrosin benötigt werden in einem Operon codiert werden. Dieses Operon besitzt neben dem Gen für die Tyrosin-Decarboxylase noch drei weitere Gene für eine Tyrosyl-tRNA Synthetase, einen Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter und eine Tyrosin-Permease (Wolken *et al.*, 2006). Ähnliche Genanordnungen wurden bei den Tyramin produzierenden Arten *Enterococcus durans* (Fernández *et al.*, 2007) und *Carnobacterium divergens* (Coton *et al.*, 2004) nachgewiesen. In einer Studie von Buňková *et al.* (2009) konnte gezeigt werden, dass einige Bakterien, trotz Vorhandensein der Gene zur Bildung von Tyramin, dieses Amin nicht bilden. Somit lässt sich sagen, dass der Nachweis der Gene nicht die Bildung von Tyramin bedingt. Eine stammspezifische Bildung von Tyramin aufgrund von horizontalem Gentransfer bei *Lactobacillus brevis* wird von Coton und Coton (2009) beschrieben. Marcobal *et al.* (2006) berichten von horizontalem Gentransfer der Ornithin-Decarboxylase zur Bildung von Putrescin durch *Oenococcus oeni*. Im Gegensatz zum Gen für die Tyrosin-Decarboxylase, konnte dasjenige für eine Histidin-Decarboxylase bisher noch nicht bei *Lactobacillus brevis* nachgewiesen werden. In dieser Arbeit konnte die mit Hilfe von spezifischen Primern amplifizierte und sequenzierte DNA-Sequenz von *Lactobacillus brevis* B 190 durch Datenbankrecherche als Histidin-Decarboxylase identifiziert werden. Dabei zeigte die Sequenz eine hohe Identität mit dem Gen einer Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus buchneri*. Phylogenetische Untersuchungen der Gensequenz zeigten eine nahe Verwandtschaft zu verschiedenen Histidin-Decarboxylasen aus weinrelevanten Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus hilgardii* und *Oenococcus oeni*. Coton *et al.* (1998) und Lucas *et al.* (2005) referieren über das Vorkommen dieser Gene in den genannten Arten. Ähnlich der Gene zur Bildung von Tyramin sind die Gene des Histamin-Bildungswegs in einem Operon codiert. Es besteht ebenfalls aus vier Genen für die Histidin-Decarboxylase, eine Histidyl-tRNA Synthetase, einen Histidin/

Histamin-Antiporter und ein unbekanntes Protein (Lucas *et al.*, 2005). Die Gene zur Histamin-Bildung durch *Lactobacillus hilgardii* sind auf einem instabilen Plasmid lokalisiert, so dass die Fähigkeit zur Produktion dieses Amins durch das Bakterium gewonnen werden oder verloren gehen kann (Lucas *et al.*, 2005).

Ein weiterer Unterschied der Histidin-Decarboxylase zur Tyrosin-Decarboxylase besteht darin, dass ihr Vorhandensein stets in der Bildung von Histamin resultiert (Landete *et al.*, 2005). Somit genügt der Nachweis des Decarboxylase-Gens zur Identifizierung eines Bakteriums als Histamin-Produzent. Ferner konnten Landete *et al.* (2008) zeigen, dass einige weinrelevante Parameter Einfluss auf die Expression der Gene zur Bildung von Histamin haben. So hemmen hohe Glucose-, Fructose-, Malat- und Citrat-Konzentrationen die Expression während hohe Ethanol-Konzentrationen diese erhöhen. Dies spricht dafür, dass die Bildung von Histamin vor allem nach Ende der alkoholischen Gärung stattfindet, da zu diesem Zeitpunkt ein Großteil des im Most vorhandenen Zuckers umgesetzt wurde und erhöhte Konzentrationen von Ethanol vorliegen.

Es konnte gezeigt werden, dass *Lactobacillus brevis* B 190 die genetische Ausstattung zur Bildung von Tyramin und Histamin besitzt und diese auch unter weinrelevanten Bedingungen bildet. Somit geht von dieser Spezies ein gewisses Risiko für die Qualität des Weines aus.

#### **4.5 Identifizierung von *Streptomyces albidoflavus* B 578**

Aufgrund der wirtschaftlichen Relevanz als Antibiotika- oder Enzym-Produzent ist die Gattung *Streptomyces* von hohem Interesse für die Forschung (Welsch, 1962; Blättel *et al.*, 2009). Seit der Erstbeschreibung dieser Gattung durch Waksman und Henrici (1943) wurden über 550 verschiedene Arten von Streptomyceten beschrieben (Kämpfer, 2011). Viele dieser Arten wurden vor allem in den 1960er Jahren isoliert und beschrieben ohne die phylogenetische Verwandtschaft genauer zu untersuchen. Zur besseren und vergleichbaren Identifizierung von neuen Isolaten gründeten Shirling und Gottlieb (1966) das International Streptomyces Project (ISP), in dem sie einheitliche Medien und Tests zur Charakterisierung von neuen Arten vorschlugen. Ferner sollten Referenzstämme neuer Arten in zentralen Stammsammlungen hinterlegt werden (Gottlieb und Shirling, 1967). So konnte eine Reihe von Arten reklassifiziert werden.

Durch Ampifizierung der 16S rDNA mit Primern, die zum Teil in der Intergenregion (intergenic spacer region, IGS-Region) zwischen der 16S rDNA und der 23 rDNA binden, konnte die Gesamtsequenz der 16S rDNA von *Streptomyces albidoflavus* B 578 ermittelt werden. Die IGS-Region bei Streptomyceten besteht aus sechs hoch konservierten und fünf variablen Bereichen, die ebenfalls zur Identifizierung der jeweiligen Arten genutzt werden können (Hain *et al.*, 1997). Der Datenbankvergleich (NCBI) der erhaltenen Nukleotidabfolge der 16S rDNA des untersuchten Stamms B 578 zeigt eine hohe Sequenzidentität mit



---

*Streptomyces albidoflavus* und *Streptomyces sampsonii*. Rong *et al.* (2009) wiesen nach, dass 13 beschriebene Arten von Streptomyceten aufgrund von 16S rDNA-Untersuchungen, Multilocus Sequenz Analysen und DNA-DNA Hybridisierung der Art *Streptomyces albidoflavus* angehörten. Darunter befindet sich auch das Synonym *Streptomyces sampsonii*. Bereits 2008 identifizierten Kiss *et al.* den Streptomycin produzierenden Stamm *Streptomyces griseus* 45H aufgrund von Southern-Blot Ergebnissen als *Streptomyces albidoflavus*. Durch die Reklassifizierung dieser Art konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Stamm B 578 um *Streptomyces albidoflavus* handelte. Diese Annahme wurde durch den Vergleich der Gesamtsequenz der 16S rDNA mit denen aus zwei Referenzstämmen, DSM 40233 und DSM 40455<sup>T</sup>, von *Streptomyces albidoflavus* bestätigt. Es wurde eine Sequenzidentität von jeweils über 99,6 % berechnet. Die Gene für die ribosomale RNA bei Streptomyceten sind in einem Operon angeordnet, welches in vier bis sieben Ausführungen vorliegt und von verschiedenen Promotoren reguliert wird (Van Wezel *et al.*, 1991). Aufgebaut sind die Operons aus dem Genen der 16S rRNA, gefolgt der 23S rRNA und abschließend der 5S rRNA sowie den jeweiligen Promotoren und Intergenregionen (Pujić *et al.*, 2001).

Neben der genannten Identifizierung der Streptomyceten durch 16S rDNA Sequenzanalysen, stellen RFLP Analysen (Lanoot *et al.*, 2005) sowie Multilocus Sequenz Analysen (MLSA), bei denen mehrere verschiedene, in der Regel Haushaltsgene, zur Bestimmung der phylogenetischen Verwandtschaft genutzt werden (Guo *et al.*, 2008; Kiss *et al.*, 2008; Rong *et al.*, 2009), weitere Methoden zur Identifizierung von Streptomyceten dar. Die MLSA werden vor allem zur Detektion von Antibiotika produzierenden Stämmen durchgeführt (Gharaibeh *et al.*, 2003).

Zusätzlich zu den phylogenetischen Untersuchungen von *Streptomyces albidoflavus* B 578 wurden noch Tests bezüglich der Verwertbarkeit einiger Zucker durchgeführt. Hierbei zeigten die beiden Referenzstämmen von *Streptomyces albidoflavus* das gleiche Verhalten wie der Stamm B 578. Somit konnte der Stamm B 578 eindeutig als *Streptomyces albidoflavus* identifiziert werden.

#### 4.6 Lyse biogene Amine produzierender Bakterien durch Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578

Das Vorkommen von Bakterien in der Weinbereitung ist in der Regel unerwünscht, da sie als Verursacher einer Reihe von Weinfehlern in Frage kommen (Bartowsky, 2009). Lediglich *Oenococcus oeni* bildet hier eine Ausnahme. Dieses Bakterium wird zum Teil als Starterkultur für den biologischen Säureabbau in Weinen mit hohem Säuregehalt eingesetzt. Eine Reduktion der Säure in von Natur aus säurearmen Weinen, vor allem Rotweinen südlicher Regionen, ist jedoch andererseits teilweise unerwünscht.

Insgesamt wurden 69 Stämme, davon 65 Milchsäurebakterien, die aus den Versuchswainen isoliert wurden und zum Teil biogene Amine bildeten, mit dem Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 versetzt. Eine Zellyse von über 50 % konnte bei mehr als der Hälfte der Stämme ermittelt werden. Vor allem *Lactobacillus brevis*, welcher als häufigster Bildner biogener Amine aus den Versuchswainen isoliert wurde, konnte in hohem Maße lysiert werden. Eine Zellyse von Milchsäurebakterien durch Kulturüberstände von Streptomyceten wurde bereits von Ohbuchi *et al.* (2001) und Blättel *et al.* (2009) nachgewiesen. Jedoch zeigen die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Forschungsarbeit erbracht wurden, dass der Kulturüberstand *Streptomyces albidoflavus* B 578 in der Lage ist eine Vielzahl von Milchsäurebakterien zu lysieren und das bei hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Auffällig war, dass die einzelnen Stämme von *Oenococcus oeni* im Gegensatz zu den restlichen Milchsäurebakterien in geringeren Prozentzahlen lysiert wurden. Dies ist jedoch aufgrund des Einsatzes dieses Bakteriums als Starterkultur zur Durchführung des biologischen Säureabbaus erstrebenswert. Ein Nachteil des in der Weinbereitung eingesetzten Lysozyms besteht darin, dass es eine höhere Lyseaktivität gegen *Oenococcus oeni* besitzt, als zum Beispiel gegen den Weinschädling *Lactobacillus hilgardii* (Delfini *et al.*, 2004; Sigler, 2004).

Ferner konnte die Lyse eines gramnegativen Essigsäurebakteriums – *Acetobacter tropicalis* – beobachtet werden. Dieses Bakterium wurde erstmals aus Wein isoliert und beschrieben (Wirth *et al.*, 2011). Essigsäurebakterien spielen in der Weinbereitung vor allem als Schadorganismen eine Rolle, da sie in ihrem Stoffwechsel aromaaktive Stoffe bilden können, die die Qualität des Weines beeinflussen (Du Toit *et al.*, 2005; Bartowsky, 2009). Durch das Vorhandensein einer äußeren Membran kann das Lysozym das Peptidoglykan der Essigsäurebakterien nicht angreifen und ist somit ineffektiv zur Bekämpfung dieser Mikroorganismen. Zur Zellyse dieser Bakterien werden somit neben einer Muramidase auch noch andere Enzymklassen wie Proteasen oder Lipasen benötigt. Diese scheinen somit im Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 vorhanden zu sein. Kim und Park (2007) konnten die Bildung von extrazellulären Lipasen bei *Streptomyces clavuligerus* nachweisen.

Neben den genannten Bakterien zeigten auch drei Isolate der Gattung *Staphylococcus* eine Zelllyse durch den Kulturüberstand. Da das Vorkommen dieser Bakterien bisher noch nicht in der Weinbereitung beschrieben wurde, ist davon auszugehen, dass sie durch Verunreinigung der Probe, zum Beispiel bei der Probenentnahme, in die Versuchsweine gelangt waren. Eine Zelllyse von *Staphylococcus aureus* durch Enzyme von Streptomyceten konnten Yoshimoto und Tsuru (1972) erzielen. Babenko *et al.* (1990) wiesen eine staphylolytischen Aktivität des Kulturextrakts von *Streptomyces recifensis* subsp. *lyticus* nach. Demnach kann auch davon ausgegangen werden, dass in der medizinischen Forschung ein Interesse an den im Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 enthaltenen Enzymen besteht, da viele Staphylokokken als Humanpathogene bekannt sind.

#### **4.7 Reinigung und Charakterisierung zweier bakteriolytischer Enzyme aus *Streptomyces albidoflavus* B 578**

Blättel *et al.* (2009) konnten zeigen, dass im Kulturüberstand des damals noch nicht näher bestimmten Stammes B 578 von *Streptomyces albidoflavus* mehrere Enzyme vorhanden sind, die eine Zelllyse bei weinrelevanten Bakterien erzielen. Diese Enzyme wurden allerdings aufgrund von Aktivitätsnachweisen bestimmt und nicht gezielt gereinigt und charakterisiert.

Zur Reinigung der bakteriolytischen Enzyme aus dem Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 wurde eine bestimmte Form der Ionenaustauscher-Chromatographie angewandt (Fast Performance Liquid Chromatography, FPLC). Aufgrund der in vorhergehenden Versuchen ermittelten isoelektrischen Punkte der vermuteten Enzyme, welche im basischen Bereich lagen (Sebastian, 2008), wurde eine Kationen-Austauscher-Säule zur Trennung der einzelnen Verbindungen gewählt. Zur Durchführung der Chromatographie wurde der Kulturüberstand angereichert und gegen einen Citrat-Puffer (pH 4,0) dialysiert. Nach der Injektion der Probe auf die Säule erfolgte die Elution der einzelnen Proteinfractionen durch einen NaCl-Gradienten. Die Reinigung eines Lysozyms aus *Streptomyces erythraeus* mit Hilfe der FPLC wurde von Morita *et al.* (1978) beschrieben. In diesen Versuchen wurde jedoch ein pH-Wert von 6,0 gewählt. Die Versuche zur Reinigung der Enzyme aus dem Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 durch die Durchführung der FPLC bei pH 6,0 (Na-Acetat-Puffer) fielen jedoch negativ aus, da sich die gesamte bakteriolytische Aktivität im Durchfluss befand, das heißt die entsprechenden Proteine nicht an der Säule gebunden wurden. Zur stärkeren Bindung der Enzyme an das Säulenmaterial wurde deshalb ein pH-Wert von 4,0 gewählt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass eine Umpufferung des Kulturüberstands stets an einen gewissen Verlust an Proteinmenge gekoppelt war, wohingegen die bakteriolytische Aktivität nahezu gleichbleibend war. Möglicherweise kam es durch das Absenken des pH-Werts zu einer

Denaturierung einzelner Proteine im Kulturüberstand, die jedoch nicht an der Zellyse beteiligt waren.

Nach der Chromatographie wurden die einzelnen Fraktionen hinsichtlich ihrer Aktivität gegen *Lactobacillus brevis* B 190 getestet. Dieser Organismus wurde aufgrund seines Vorkommens in der Weinbereitung, was durch die Ergebnisse der Isolierung von Bakterien aus den Versuchsweinen bestätigt wurde, und seines Potentials zur Bildung biogener Amine als Testorganismus für die Bestimmung der bakteriolytischen Aktivität verwendet. Als beste Methode zur Ermittlung der Zellyse stellte sich die Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm einer Zellsuspension nach Enzymbehandlung heraus. Diese Trübungsmessungen wurden schon mehrmals als Mittel der Wahl zur Aktivitätsbestimmung lytischer Enzyme beschrieben (Morita *et al.*, 1978; Ohbuchi *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verringerung des pH-Werts auf 4,0 alle an der Zellyse beteiligten Enzyme am verwendeten Säulenmaterial gebunden haben und erst mit steigender NaCl-Konzentration von der Säule eluierten. So verteilte sich die lytische Aktivität auf die Fraktionen 9-13 und 16-18 mit nahezu 70 beziehungsweise 60 % Zellyse. Die Hauptsignale lagen bei Fraktion 12 und 17. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung dieser Fraktionen konnten in beiden Proben Proteinbanden nachgewiesen werden. Die Visualisierung dieser Banden bedingte allerdings die Durchführung einer sensitiven Silbernitratfärbung, da die erhaltenen Proteinmengen mit 64 und 36 µg sehr gering ausfielen. Jedoch kann durch den Einsatz dieser Färbemethode auch die Reinheit einer Probe überprüft werden, da sie es ermöglicht selbst Spuren (bis zu 0,1 ng) von anderen Proteinen nachzuweisen (Rabilloud *et al.*, 1994). So konnte in Fraktion 12 neben einer Hauptbande bei ca. 17 kDa eine weitere schwache Proteinbande bei ungefähr 40 kDa detektiert werden, während die Fraktion 17 nur eine Proteinbande der ungefähren Größe von 24 kDa besaß.

Zur weiteren Reinigung der beiden bakteriolytisch aktiven Fraktionen wurden diese zusätzlich über eine Gelfiltration aufgetrennt. Yum *et al.* (1994) und Bono *et al.* (1996) konnten durch den Einsatz der Gelfiltration zwei Proteasen aus verschiedenen Streptomyceten isolieren. Die Trennung der einzelnen Proteine beruht hierbei vor allem auf der Größe der Makromoleküle. Zusätzlich können die dreidimensionale Struktur sowie gegebenenfalls auftretende Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial das Laufverhalten der Proteine beeinflussen. Durch den Einsatz der Gelfiltration konnten zwei reine Proteinfractionen isoliert werden, die eine hohe Zellyse (62 und 42 %) von *Lactobacillus brevis* B 190 bewirkten. Jedoch war ein weiterer Verlust der Proteinkonzentration in den jeweilig aktiven Fraktionen zu beobachten. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der einzelnen Fraktionen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den aktiven Proteinen um die Proteine der Größe 17 beziehungsweise 24 kDa handelte. Das Protein der ungefähren

Größe von 40 kDa zeigte keine Aktivität und wurde massenspektroskopisch als Phosphat-Bindeprotein identifiziert.

Zur N-terminalen Sequenzierung der beiden gereinigten Enzyme wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. Die erhaltenen N-Termini zeigten dabei hohe Identitäten mit verschiedenen in der NCBI-Datenbank hinterlegten Aminosäuresequenzen. So zeigte der N-Terminus des 17 kDa großen Enzyms eine Sequenzidentität von über 77 % mit verschiedenen Peptidasen beziehungsweise Proteasen. Es handelte sich um zwei Metallo-Peptidasen aus *Bacillus thuringiensis* und *Thioalkalimicrobium cyclium* sowie um eine Serin-Endopeptidase aus *Streptomyces* sp., dem Streptogrisin B. Diese Protease ist dem Trypsin sehr ähnlich und spaltet vor allem Phenylalanin-, Tyrosin-, Tryptophan- und Leucin-Glycin-Bindungen. Streptogrisin B wurde erstmals bei *Streptomyces griseus* beschrieben (Wählby und Engström, 1968). Auch der Datenbankabgleich des N-Terminus des zweiten gereinigten Enzyms zeigte hohe Sequenzidentitäten. Mehrere Muramidasen aus verschiedenen Streptomyceten zeigten eine hohe Homologie mit der Sequenz des gereinigten Enzyms der ungefähren Größe von 24 kDa. Das Vorkommen dieser Enzymklasse bei mehreren Vertretern der Gattung *Streptomyces* wurde bereits mehrfach beschrieben (Heymer und Schmidt, 1975; Morita *et al.*, 1978; Rau *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2003).

Aufgrund der Ergebnisse der Datenbankrecherche anhand der N-terminalen Sequenzen der beiden gereinigten Enzyme konnten diese somit eindeutig identifiziert werden. Bei dem Protein mit einem ungefähren Molekulargewicht von 17 kDa handelte es sich um eine Protease, während das größere Protein (ca. 24 kDa) als Muramidase identifiziert werden konnte. Diese Befunde wurden durch die massenspektroskopischen Untersuchungen der Proteine bestätigt. Die nach dem tryptischen Verdau der Proteine entstandenen Peptidmuster konnten eindeutig Sequenzen aus *Streptomyces albus* zugeordnet werden. Die Massenspektroskopie stellte sich hierbei als gute Methode zur Identifizierung von Proteinen heraus, da sie im Gegenteil zur N-terminalen Sequenzierung keine reinen Proteinproben benötigt. Auch in der aktuellen Forschung findet die Massenspektroskopie zur Identifizierung von Proteinen immer mehr Anwendung (Aebersold und Mann, 2003).

Zur näheren Charakterisierung der beiden bakteriolytischen Enzyme wurden verschiedene Tests durchgeführt, die im Folgenden diskutiert werden.

#### 4.7.1 Charakterisierung der gereinigten Muramidase

Das Molekulargewicht der gereinigten Muramidase wurde mit Hilfe der SDS-PAGE und der Gelfiltration auf circa 24 kDa bestimmt. Eine genauere Angabe konnte aufgrund der Trenn- und Nachweisgrenzen der benutzten Methoden nicht ermittelt werden. So betrug das ermittelte Molekulargewicht bei der SDS-PAGE 23,4 kDa während bei der Gelfiltration eine Größe von 24,9 kDa bestimmt wurde. Das Molekulargewicht der Muramidase lag somit im

Bereich vergleichbarer Muramidasen aus anderen Streptomyceten. Solche lytischen Enzyme wurden bei *Streptomyces coelicolor* (Rau *et al.*, 2001), *Streptomyces globisporus* (Seo *et al.*, 2001), *Streptomyces griseus* (Yokogawa *et al.*, 1976) und *Streptomyces rutgersensis* (Hayashi *et al.*, 1981) beschrieben. Heymer und Schmidt (1975) berichten von einer 10 bis 12 kDa großen endo-N-Acetylmuramidase bei *Streptomyces albus*. Der anhand von Referenzsequenzen berechnete isoelektrische Punkt des Enzyms aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 von 9,1 konnte durch die isoelektrische Fokussierung nahezu bestätigt werden. Hierbei lag der pI bei ungefähr 8,8. Hayashi *et al.* (1981) ermittelten bei einer gereinigten Muramidase aus *Streptomyces rutgersensis* einen pI von 9,19.

Die lytische Wirkung des Enzyms wurde durch den Abbau von bakterieller Zellwand näher charakterisiert. Hierbei konnte mit Hilfe einer Anionen-Austauscher-Chromatographie mit gekoppelter gepulster amperometrischer Detektion die Schnittstelle bestimmt werden. Durch das Freiwerden von Muramitol in der Probe nach Behandlung mit dem Enzym wurde gezeigt, dass es sich bei dem untersuchten Protein um eine Muramidase handelt. Die Durchführbarkeit der Methode zur Schnittstellenbestimmung wurde durch Kontrollen mit gereinigtem Lysozym (EC 3.2.1.17), welches die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung zwischen der N-Acetylmuraminsäure und dem N-Acetylglucosamin der bakteriellen Zellwand spaltet (Salton, 1964; Vollmer *et al.*, 2008), nachgewiesen. Mit Hilfe des DNS-Tests (Miller, 1959) wurde eine Unit-Definition für die gereinigte Muramidase durchgeführt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Spaltung der Zellwand mit dem Freiwerden von reduzierenden Zuckern beziehungsweise Zuckersäuren, in diesem Fall reduzierender N-Acetylmuraminsäure, einhergeht. Somit konnte anhand einer Glucose-Standardkurve die lytische Aktivität quantifiziert werden. Es zeigte sich, dass die gereinigte Muramidase eine mehr als doppelt so hohe spezifische Aktivität aufwies, als das in der Weinbereitung eingesetzte Lysozym (Gerbeaux *et al.*, 1997). Auch konnte durch die Behandlung mit der Muramidase eine Zelllyse bei dem Milchsäurebakterium *Lactobacillus brevis* B 190 erzielt werden, welches eine Resistenz gegen Lysozym aufwies. Bei verschiedenen Milchsäurebakterien ist das Vorkommen von Zellwandmodifikationen bekannt (Clarke und Dupont, 1992; Delcour *et al.*, 1999). Hierzu zählen O-Acetylierung, Peptidquervernetzungen, freie Aminogruppen oder Teichonsäuren am Peptidoglykan, welche die Aktivität von Lysozym einschränken können (Logardt und Neujahr, 1975). Es ist davon auszugehen, dass die gereinigte Muramidase in der Lage ist Zellwände mit solchen Modifikationen ebenfalls zu spalten, was sie zu einem interessanten Enzym für die mögliche Wachstumshemmung von Weinschädlingen macht. Eine proteolytische Aktivität des Enzyms war – wie zu erwarten – nicht nachweisbar.

Die Muramidase zeigte eine bakteriolytische Wirkung bei pH 3,0 bis pH 8,0, bei einem Ethanolgehalt von 0 bis 15 Vol% und in einem Temperaturbereich von 12 bis 50 °C. Somit konnte die Aktivität des Enzyms unter den im Wein gegebenen Bedingungen nachgewiesen

werden (Waite und Daeschel, 2007). Über einen Aktivitätsverlust des Lysozyms unter Weinbedingungen berichteten Delfini *et al.* (2004) und Azzolini *et al.* (2010). Vor allem der Einsatz von Lysozym in jungen Weinen nach der Schwefelung ist kritisch zu begutachten (Tirelli und De Noni, 2007). Freies Schwefeldioxid wirkt bereits ab Konzentrationen von 10 mg/l hemmend auf Lysozym (Amati *et al.*, 1994). Diese Hemmung beruht wahrscheinlich auf der Interaktion des Schwefeldioxids mit den Schwefelbrücken des Enzyms (Cecil und Wake, 1962). Eine Hemmung der gereinigten Muramidase durch Schwefeldioxid konnte nicht beobachtet werden.

Aufgrund der genannten Befunde kann davon ausgegangen werden, dass die gereinigte Muramidase potentiell ihren Einsatz in der Weinbereitung finden könnte, da sie über eine hohe Stabilität unter Weinbedingungen verfügt sowie ein weites Spektrum an Zielorganismen aufweist.

#### 4.7.2 Charakterisierung der gereinigten Protease

Das Vorkommen proteolytischer Enzyme bei Streptomyceten wurde bereits mehrfach beschrieben (Ghuysen, 1968; Yokogawa *et al.*, 1974; Karadzic *et al.*, 2002). Es handelt sich vor allem um unspezifische Proteasen. Bei dem gereinigten Enzym, welches ein Molekulargewicht von ungefähr 17 kDa besaß, konnte ein isoelektrischer Punkt von 9,7 bestimmt werden. Dastager *et al.* (2008) berichteten von mehreren Proteasen aus *Streptomyces gulbargensis* mit Molekulargewichten in dem genannten Größenbereich. Die berechneten  $pI$ 's der Referenzsequenzen lagen deutlich niedriger (6,7 bis 7,3). Ein möglicher Grund für diese starke Abweichung könnte sein, dass die Berechnung des isoelektrischen Punktes einzig auf der Aminosäuresequenz beruht. Der tatsächliche  $pI$  ist jedoch neben der Primärstruktur ebenfalls von der Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins sowie der chemischen Umgebung abhängig. Auffällig war ebenfalls, dass die Molekulargewichte, die anhand der Nukleotidsequenz berechnet wurden, weit über dem experimentell ermittelten Wert von 17 kDa lagen. Wurde jedoch dieser Wert erst ab dem durch Edmann-Abbau erhaltenen N-Terminus berechnet, so konnte das mit Hilfe von SDS-PAGE und Gelfiltration gemessene Molekulargewicht bestätigt werden. Möglicherweise bildet *Streptomyces albidoflavus* B 578 eine Vorläuferstufe der Protease, von der dann später ein Teil abgespalten wird. Solche post-translationalen Prozessierungen von Proteasen sind bekannt (Haese und Finkelstein, 1993).

Die gereinigte Protease zeigte eine nahe phylogenetische Verwandtschaft mit dem Enzym Streptogrisin B. Diese Serin-Protease ist Teil der Chymotrypsin Superfamilie und bildete einen Bestandteil hydrolytischen Kulturextrakts von *Streptomyces griseus*, welches als Pronase bezeichnet wird (Sidhu *et al.*, 1994). Die Kristall-Struktur von Streptogrisin B konnte von Fujinaga *et al.* (1982) bestimmt werden. Aufgrund der hohen Sequenzidentität und des

---

ähnlichen Molekulargewichts (Streptogrisin B 18,5 kDa; Fujinaga *et al.*, 1982) war davon auszugehen, dass es sich bei dem gereinigten Enzym aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 um eine Serin-Protease analog dem Streptogrisin B handelte.

Neben der proteolytischen Aktivität gegen Azocasein (spezifische Aktivität von 614 U/mg) konnte auch eine bakteriolytische Wirkung der Protease gezeigt werden. Es lässt sich vermuten, dass das Enzym Proteine in der Zellwand der Bakterien lysiert und somit die Zelle zum Absterben bringt. Möglich ist aber, dass die quervernetzenden Peptide im Murein angegriffen werden. Dass Proteasen in der Lage sind eine zelllytische Wirkung auf Mikroorganismen auszuüben wurde bereits von Thorne *et al.* (1976) und Bush (1985) berichtet.

Weiter konnte in dieser Arbeit bewiesen werden, dass die gereinigte Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 S-Layer-Proteine abbaut. Diese, der Zellwand aufgelagerten Strukturen, welche schon mehrfach bei Milchsäurebakterien beschrieben wurden (Lortal *et al.*, 1992; Claus *et al.*, 2005;) und auch beim Testorganismus *Lactobacillus brevis* B190 nachgewiesen werden konnten, stellen mit einer relativen Porengröße von 30 kDa eine Diffusionsbarriere dar, welche den enzymatischen Abbau der Zelle verhindern oder erschweren kann. Dohm *et al.* (2011) konnten zeigen, dass verschiedene Proteasen in der Lage sind S-Layer-Strukturen zu zerstören, darunter auch der Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578. Durch die Entfernung des S-Layers wurden die Zellen empfindlicher gegen zelllytische Enzyme, aber auch gegen die im Wein vorherrschenden Bedingungen (Dohm *et al.*, 2011). Der Einsatz solcher Proteasen in der Weinbereitung könnte somit eventuell auftretende Schadorganismen, neben ihrer eigenen bakteriolytischen Wirkung, einerseits gegen das Milieu Wein und andererseits gegen den Einsatz von weiteren bakteriolytischen Enzymen empfindlicher machen. Darüber hinaus wird derzeit in der Weinindustrie intensiv nach geeigneten Proteasen gesucht, allerdings mit dem Ziel Weintrübungen zu verhindern und allergene Proteine abzubauen (Younes *et al.* 2011).

Durch die Bestimmung der Zelllyse von *Lactobacillus brevis* B 190 durch die gereinigte *Streptomyces* Protease bei verschiedenen pH-Werten, Ethanolkonzentrationen und Temperaturen wurde die Aktivität dieses Enzyms unter Weinbedingungen bestätigt. Vor allem ein pH-Optimum bei pH 4,0 macht dieses Enzym interessant für die Weinbereitung. Bei Weinen mit niedrigen Säuregehalten ist die Gefahr der mikrobiellen Kontamination besonders hoch, da die meisten weinrelevanten Bakterien erst bei niedrigeren pH-Werten in ihrem Wachstum gehemmt werden (König und Fröhlich, 2009).

Diese Forschungsarbeit konnte zeigen, dass die gereinigte Protease, gegebenenfalls auch in Kombination mit der gereinigten Muramidase, ein Präparat ist, das in der Lage ist weinrelevante Bakterien unter den im Wein vorherrschenden Bedingungen in ihrem Wachstum zu hemmen oder zu lysieren.



## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Forschungseinheit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der specifically amplified polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) eine Identifizierung aller bisher im Wein beschriebenen Milchsäurebakterien möglich ist. Durch den Vergleich der nach der Amplifizierung mit bestimmten SAPD-Primern entstandenen Bandenmuster mit denen bekannter Referenzstämmen konnte eine Vielzahl der aus Versuchsweinen isolierten Bakterien eindeutig einer bestimmten Art zugeordnet werden. Die Überprüfung der Methode mit einer großen Anzahl an Proben bestätigte, dass die SAPD-PCR eine sichere und reproduzierbare Identifizierung von Milchsäurebakterien in Reinkulturen zulässt.

Insgesamt wurden 148 verschiedene Bakterien-Stämme aus 54 untersuchten Weinen isoliert. Mehr als 90 % dieser Organismen wurden aufgrund der molekularbiologischen Untersuchungen den Milchsäurebakterien zugeordnet. Bei der Mehrzahl der Milchsäurebakterien handelte es sich um Vertreter der Arten *Lactobacillus brevis* und *Oenococcus oeni*. Neben weiteren Arten von Milchsäurebakterien wurden auch vier Stämme der Gattung *Acetobacter* isoliert. Bei drei dieser Essigsäurebakterien handelte es sich um *Acetobacter tropicalis*, der bisher noch nicht im Wein beschrieben wurde. Ebenfalls wurde eine größere Anzahl von Staphylokokken (zehn Stämme) in den Versuchsweinen nachgewiesen. Diese Mikroorganismen spielen jedoch – im Gegensatz zu den vorher genannten Bakterien – keine Rolle in der Weinbereitung und sind wahrscheinlich durch Verunreinigungen in die Versuchweine gelangt.

Zur Untersuchung der bakteriellen Isolate hinsichtlich ihrer Produktion von biogenen Aminen wurde eine dünnschichtchromatographische Methode entwickelt. Der Nachweis der biogenen Amine beruht hierbei auf der Derivatisierung dieser Verbindungen mit Dansyl-Chlorid. Die so entstandenen Derivate können mit Hilfe von UV-Licht nachgewiesen werden. Durch Optimierung der Laufmittel, deren Zusammensetzung sowie der Derivatisierungsbedingungen konnte eine Trennung von elf weinrelevanten biogenen Aminen erzielt werden. Die Nachweisgrenzen der einzelnen Verbindungen lagen hierbei zwischen 1 und 10 mg/l. Somit stellt die entwickelte Dünnschichtchromatographie eine schnelle, einfache und günstige Methode zum Nachweis biogener Amine dar, die bereits Einsatz in Weinkellereien finden könnte.

Es zeigte sich, dass 55 % der isolierten Stämme in der Lage waren, ein oder mehrere biogene Amine unter Laborbedingungen zu bilden. Die am häufigsten gebildeten Amine waren hierbei Tyramin (71 Stämme), Histamin (22 Stämme) und Phenylethylamin (zwölf Stämme). Auffällig war, dass alle isolierten Bakterien der Art *Lactobacillus brevis* eine Bildung biogener Amine vorwiesen, während keine Produktion dieser Verbindungen durch die *Oenococcus oeni*-Isolate beobachtet wurde. Die Bildung biogener Amine durch

verschiedene Milchsäurebakterien wurde mittels HPLC-Untersuchungen quantifiziert. Es zeigte sich, dass die einzelnen Stämme bis zu 23,38 mg/l Gesamt-Konzentration an biogenen Aminen produzierten. *Acetobacter tropicalis* war ebenfalls in der Lage Tyramin zu bilden, was belegt, dass von dieser Bakterien-Art neben der Bildung von Essigsäure noch weitere Gefahr für die Qualität des Weines ausgehen kann. Aufgrund der Ergebnisse der Isolierung von Bakterien aus Versuchsweinen und der Untersuchungen hinsichtlich ihrer Produktion von biogenen Aminen ließ sich belegen, dass das Vorkommen dieser Bakterien im Wein eng verknüpft sein kann mit der Bildung unerwünschter Aromastoffe oder physiologisch aktiver Substanzen.

Eine mögliche Strategie zur Wachstumshemmung solcher Schadorganismen während Weinbereitung stellt der Einsatz von bakteriolytischen Enzymen dar. Als Produzent solcher Enzyme konnte der Stamm B 578 aus der Sammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit Hilfe physiologischer und molekularbiologischer Methoden als *Streptomyces albidoflavus* identifiziert werden. Der Kulturüberstand dieses Organismus zeigte unter Laborbedingungen eine höhere bakteriolytische Aktivität gegen weinrelevante Mikroorganismen als das in der Weinbereitung verwendete Hühnereiweiß-Lysozym. Ebenfalls konnte durch den Einsatz dieses Überstands die Mehrheit der aus den Versuchsweinen isolierten Bakterien lysiert werden. Der Einsatz verschiedener Anreicherungs- und Reinigungsmethoden führte zu einer Optimierung der Aktivität des Kulturüberstands von *Streptomyces albidoflavus* B 578.

Durch den Einsatz der Fast Liquid Performance Chromatography (FPLC) und der Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) konnten zwei Enzyme, welche an der Zelllyse beteiligt waren, gereinigt und anschließend gelelektrophoretisch nachgewiesen werden. Beide Enzyme wiesen trotz niedriger Protein-Konzentrationen eine hohe bakteriolytische Aktivität auf. Mit Hilfe der N-terminalen Sequenzierung und massenspektroskopischen Untersuchungen konnten beide Enzyme eindeutig identifiziert werden. Hierdurch konnte ein Protein mit einer Molekularmasse von ca. 17 kDa als Protease ermittelt werden. Der ermittelte N-Terminus wies eine Sequenzidentität von 77 % mit einer dem Trypsin ähnlichen Serin-Endopeptidase (Streptogrisin-B) aus *Streptomyces* sp. auf. Der isoelektrische Punkt dieses Enzyms betrug 9,7. Analog konnte ein weiteres Protein als Muramidase identifiziert werden. Die gereinigte Muramidase besaß ein Molekulargewicht von 24 kDa und einen pI von 8,8. Beide Proben wurden hinsichtlich ihrer Aktivität unter verschiedenen weinrelevanten Bedingungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Protease als auch die Muramidase unter nahezu allen getesteten Parametern, das heißt Temperatur, pH-Wert und Ethanolkonzentration, in der Lage waren eine Zelllyse zu erzielen. Beide gereinigten Enzyme zeigten hierbei die höchste Aktivität bei pH 7,0, 7 Vol% Ethanol und 30 °C. Die spezifische Aktivität der Protease konnte mit 614 U/mg, die der Muramidase mit 107 U/mg quantifiziert

werden. Zusätzlich wurden die Gene der Proteine identifiziert und zum Teil sequenziert. Eine Datenbankrecherche mit den erhaltenen Nukleotidsequenzen bestätigte die Ergebnisse der Identifizierung der gereinigten Enzyme. S-Layer-Proteine, welche von manchen Milchsäurebakterien gebildet werden und eine zusätzliche Schutzschicht darstellen, konnten effektiv und schnell durch die gereinigte Protease abgebaut werden.

Anhand der Ergebnisse dieser Forschungsarbeit konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl möglicher Produzenten biogener Amine im Wein vorkommen können. Ein schneller Nachweis dieser Amine sowie eine zeitnahe Identifizierung der bildenden Organismen sind notwendig, um gezielt auf das Auftreten dieser Weinschädigung zu reagieren. Hierbei konnten die Dünnschichtchromatographie zur Detektion der biogenen Amine und die SAPD-PCR zur Identifizierung der Milchsäurebakterien etabliert werden. Zwei gereinigte Enzyme aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 zeigten bereits in niedrigen Konzentrationen eine hohe bakteriolytische Aktivität gegenüber weinrelevanten Produzenten biogener Amine. Hierbei stellten sich die Enzyme effektiver als das handelsübliche Hühnereiweiß-Lysozym heraus.

Die entwickelten Methoden erlauben dem Winzer ein zeitnahes Erkennen biogener Amine im Wein und ermöglichen ihm durch den Einsatz von Enzymen ein Fortschreiten ihrer Bildung durch Mikroorganismen zu verhindern.

## 6. Ausblick

Anhand der Ergebnisse der Isolierung von Milchsäurebakterien, die in der Lage sind biogene Amine zu produzieren, wurde gezeigt, dass ein hohes Potential zur Bildung dieser teilweise toxischen Verbindungen in deutschen Weinen vorliegt. Es ist davon auszugehen, dass diese Schadorganismen weitere Weinfehler verursachende Substanzen bilden. Dies sollte in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden. Weiterhin sollte getestet werden, in welchem Maße die isolierten Bakterien biogene Amine in der praktischen Weinbereitung bilden. Dies bedingt die Kultivierung der Mikroorganismen in größeren Volumina Most.

Die Anwendung der specifically amplified polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) zeigt eine große Reproduzierbarkeit zur Identifizierung verschiedener Milchsäurebakterien. Durch die Ermittlung der spezifischen Bandenmuster weiterer Referenzstämme, verbunden mit der Erstellung einer Datenbank der einzelnen DNA-Fragmentlängen, könnte die Anwendung der beschriebenen Methode noch erweitert und verbessert werden. Ebenfalls könnten noch weitere im Wein vorkommende Mikroorganismen wie Essigsäurebakterien und Hefen durch die SAPD-PCR identifiziert werden.

Eine Lyse möglicher Schadorganismen in der Weinbereitung konnte mit gereinigten Enzymen aus dem Kulturüberstand von *Streptomyces albidoflavus* B 578 erzielt werden. Ebenfalls konnten diese Enzyme in großem Maßstab, das heißt bis zu 20 l Kulturen, produziert werden. Eine Aktivität der Enzyme unter Weinbedingungen wurde ebenfalls nachgewiesen. Für den kommerziellen Einsatz dieser bakteriolytischen Enzyme sind Untersuchungen hinsichtlich ihrer Aktivität unter Praxisbedingungen in größeren Versuchsvolumina von Nöten. Um die einzelnen Proteine als mögliche Alternative zur Schwefelung oder Zugabe von Lysozym für die mikrobielle Stabilisierung und Wachstumskontrolle in der Weinbereitung einzusetzen, müssen ebenfalls die Methoden zur Aufreinigung der Enzyme optimiert werden, da die bestehenden Verfahren mit einem hohen Verlust an Proteinkonzentration verbunden waren. Eine mögliche Alternative wäre hierfür die homo- oder heterologe Überexpression der betreffenden Gene.

Das Fernziel dieser Versuche muss es sein, aus den gereinigten Enzymen ein Präparat zu gewinnen, welches zur Regulation des mikrobiellen Wachstums sowie der Verhinderung von Kontaminationen in Wein eingesetzt werden kann und in der Produktion und Aufarbeitung finanziell rentabel ist.

## 7. Literatur

- Aebersold, R. und Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, Vol. 422, 198-207.
- Al Bulushi, I., Poole, S., Deeth, H.C. und Dykes, G.A. (2009) Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 49, 369-377.
- Amati, A., Chinnici, F. und Piva, A. (1994) Il lisozima in enologia per il controllo della fermentazione malolattica. *Industrie delle bevande*, Vol. 23, 215-221.
- Ammon, H. (2010) *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter GmbH und Co. KG, München.
- Ancin-Azpilicueta, C., Gonzalez-Marco, A. und Jimenez-Moreno, N. (2008) Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 48, 257-275.
- Anli, R.E. und Bayram, M. (2009) Biogenic amines in wines. *Food Reviews International*, Vol. 25, 86-102.
- Aredes Fernández, P.A., Farías, M.E. und de Nadra, M.C. (2010) Interaction between *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. Modification of available nitrogen and biogenic amine production. *Biotechnological Letters*, Vol. 32, 1095-1102.
- Askar, A. und Treptow, H., 1986. *Biogene Amine in Lebensmitteln*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Awdeh, Z.L., Williamson, A.R. und Askonas, B.A. (1968) Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins. *Nature*, Vol. 219, 66-67.
- Azzolini, M., Tosi, E., Veneri, G. und Zapparoli, G. (2010) Evaluating the efficacy of lysozyme against lactic acid bacteria under different winemaking scenarios. *South African Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 31, 99-105.
- Babenko, Iu.S., Ghilomedova, L.E. und Kukushkina, N.V. (1990) Enzymatic lysis of staphylococci in relation to their species and strain properties. *Antibiotiki i khimioterapiia*, Vol. 35, 20-22.
- Bach, B., Colas, S., Massini, L., Barnavon, L. und Vuchot, P. (2011) Effect of nitrogen addition during alcoholic fermentation on the final content of biogenic amines in wine. *Annals of Microbiology*, Vol. 61, 185-190.
- Barbe, J.C., De Revel, G., Joyeux, A., Bertrand, A. und Lonvaud-Funel, A. (2001) Role of botrytized grape micro-organisms in SO<sub>2</sub> binding phenomena. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 90, 34-42.
- Bartowsky, E.J. (2009) Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 48, 149-156.
- Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H. und Henschke P.A. (2003) Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 36, 307-314.
- Bartowsky, E.J., Costello, P.J., Villa, A. und Henschke, P.A. (2004) The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol. 10, 143-150.
- Bartowsky, E.J. und Henschke, P.A. (2008) Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine – A review. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 125, 60-70.

- Bäumlisberg, M. (2011) Abbau und Bildung biogener Amine durch weinrelevante Mikroorganismen. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J.M., Rozes, N. und Mas, A. (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 25, 287-293.
- Beneduce, L., Romano, A., Capozzi, V., Lucas, P., Barnavon, L., Bach, B., Vuchot, P., Grieco, F. und Spano, G. (2010) Biogenic amine in wines. *Annals of Microbiology*, Vol. 60, 573-578.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, D., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. und Hopwood, D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, Vol. 417, 141-147.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, Vol. 58, 1-26.
- Bisson, L.F. und Joseph, C.M.L (2009) Yeasts. In: König, H., Uden, G. und Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Musts and in Wine*. Springer, Heidelberg, pp. 47-60.
- Blättel, V., Wirth, K., Claus, H., Schlott, B., Pfeiffer, P. und König, H. (2009) A lytic enzyme cocktail from *Streptomyces* sp. B 578 for the control of lactic and acetic acid bacteria in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 83, 839-848.
- Bodmer, S., Imark, C. und Kneubühl, M. (1999). Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflammation Research*, Vol. 48, 296-300.
- Bono, F., Savi, P., Tuong, A, Maftouh, M., Pereillo, J.M., Capdevielle, J., Guillemot, J.C., Maffrand, J.P. und Herbert, J.M. (1996) Purification and characterization of a novel protease from culture filtrates of a *Streptomyces* sp. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 141, 213-220.
- Borodina, I., Krabben, P. und Nielson, J. (2005) Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Research*, Vol. 15, 820-829.
- Bover-Cid, S. und Holzapfel, W.H. (1999) Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 53, 33-41.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. Und Vidal-Carou, M.C. (1999) Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 46, 95-104.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. und Vidal-Carou, M.C. (2001) Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 66, 185-189.
- Buňková, L., Bunka, F., Hlobilova, M., Vanatkova, Z., Novakova, D. und Drab, V. (2009) Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*, Vol. 229, 533-538.
- Bush, J.W. (1985) Enzymatic lysis of the pseudomurein-containing methanogen *Methanobacterium formicicum*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 163, 27-36.
- Cecil, R. und Wake, R.G. (1962) Reactions of inter- and intra- chain disulphide bonds in proteins with sulphite. *Biochemical Journal*, Vol. 82, 401-406.

- Challis, G.L. und Hopwood, D.A. (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 100, 14555-14561.
- Chater, K.F. (2001) Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 4, 667-673.
- Claessen, D., De Jong, W., Dijkhuizen, L. und Wösten, H.A. (2006) Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends in Microbiology*, Vol. 14, 313-319.
- Claisse, O., Renouf, V. und Lonvaud-Funel, A. (2007) Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 69, 387-390.
- Clardy, J., Fischbach, M.A. und Walsh, C.T. (2006) New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*, Vol. 24, 1541-1550.
- Clarke, A. und Dupont, C. (1992). O-acetylated peptidoglycan: its occurrence, pathobiological significance, and biosynthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 38, 85-91.
- Claus, H., Akça, E., Debaerdemaeker, T., Evrad, C., Declercq, J.P., Harris, J.R., Schlott, B. und König H. (2005) Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 51, 731-743.
- Claus, H. (2007) Extrazelluläre Enzyme und Peptide von Milchsäurebakterien: Relevanz für die Weinbereitung. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, Vol. 11, 505-511.
- Cordonnier, R. und Bayonove, C. (1974) Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *Compte rendus Académie Science Paris*, Vol. 278, 3387-3390 Série D.
- Costantini, A., Vaudano, E., Del Prete, V., Danei, M. und Garcia-Moruno, E. (2009) Biogenic amine production by contaminating bacteria found in starter preparations used in winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 57, 10664-10669.
- Costello, P.J., Lee, T.H. und Henschke, P.A. (2001) Ability of lactic acid bacteria to produce N-heterocycles causing mousy off-flavour in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol. 7, 160-167.
- Coton, E., Rollan, G.C. und Lonvaud-Funel, A. (1998) Histidine carboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 84, 143-151.
- Coton, M., Coton, E., Lucas, P. und Lonvaud, A. (2004) Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiology*, Vol. 21, 125-130.
- Coton, E. und Coton, M. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Grampositive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 63, 296-304.
- Coton, E. und Coton, M. (2009) Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*, Vol. 26, 52-57.
- Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P. und Coton, E. (2010) Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, Vol. 27, 1078-1085.

- Dastager, S.G., Dayanand, A., Li, W.J., Kim, C.J., Lee, J.C., Park, D.J., Tian, X.P. und Raziuddin, Q.S. (2008) Proteolytic activity from an alkali-thermotolerant *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. *Current Microbiology*, Vol. 57, 638-642.
- De las Rivas, B., Rodríguez, H., Carrascosa, A.V. und Muñoz, R. (2007) Molecular cloning and functional characterization of a histidine decarboxylase from *Staphylococcus capitis*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 104, 194-203.
- De Man, J.C., Rogosa, M. und Sharpe, M.E. (1960) A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 23, 130-135.
- Del Prete, V., Costantini, A., Cecchini, F., Morassut, M. und Garcia-Moruno, E. (2009) Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chemistry*, Vol. 112, 474-481.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E. und Hols, P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 76, 159-184.
- Delfini, D., Cersosimo, M., Del Prete, V., Stramo, M., Gaetano, G., Pagliara, A. und Ambro, S. (2004) Resistance screening assay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficiency of lysozyme in unclarified grape musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, 1861-1866.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M. und Prust, C. (2002) Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 60, 233-242.
- Dharmaraj, S. (2010) Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 26, 2123-2139.
- Dittrich, H.H. (1984) Essigstich – Noch immer Weinfehler Nr.1. Ursachen und Zusammenhänge. *Der Deutsche Weinbau*, Vol. 39, 1154-1163.
- Dittrich, H.H. (1989) Die Veränderung der Beereninhaltsstoffe und der Weinqualität durch *Botrytis cinerea* – ein Übersichtsreferat. *Wein-Wissenschaft*, Vol. 44, 105-131.
- Dittrich, H.H. und Großmann, M. (2005) *Mikrobiologie des Weines*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Dohm, N., Petri, A., Schlander, M., Schlott, B., Claus, H. und König, H. (2011) Molecular and biochemical properties of the S-Layer protein from the wine bacterium *Lactobacillus hilgardii* B 706. *Archives of Microbiology*, Vol. 193, 251-261.
- Du Plessis, E.M. und Dicks L.M.T. (1995) Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus johnsonii*. *Current Microbiology*, Vol. 31, 114-118.
- Du Toit, W.J. und Lambrechts, M.G. (2002) The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 74, 57-64.
- Du Toit, W.J. und Pretorius, I.J. (2002) The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*, Vol. 52, 155-179.
- Du Toit, E.J., Pretorius, I.S. und Lonvaud-Funel, A. (2005) The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 98, 862-871.
- Ducruet, J., Glories, Y. und Canal, R.M. (2000) Mécanisme d'action et utilisation raisonnée d'une préparation enzymatique de macération. *Révision en Œnologie*, Vol. 27, 17-19.



- Eaton, J.L. und Mullins, D.E. (1988) Quantitative high-performance thin-layer chromatography of dansyl derivatives of biogenic amines. *Analytical Biochemistry*, Vol. 172, 44-487.
- Edman, P. und Begg, G. (1967) A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 1, 80-91.
- Eggert, K., Rawel, H.M., Purniktardjam, M.S. und Kroll, J. (2006) Wechselwirkungen von Lysozym mit Weinhaltstoffen. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, Vol. 102, 472-478.
- Egli, C.M., Edinger, W.D., Mitrakul, C.M. und Henick-Kling, T. (1998) Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 85, 779-789.
- Eichhorn, K.W. und Lorenz, D.H. (1980) Einfluss von Pflanzenschutzmitteln auf das Auftreten von Pilzen an Trauben und deren Einfluss auf die Weinqualität. *Jahresbericht 1980, Forschungsring des Deutschen Weinbaus*, Frankfurt, 19-20.
- Ensign, J.M.C. (1978) Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 32, 185-219.
- Fernández, M., Linares, D.M., Rodriguez, A. und Alvarez, M.A. (2007) Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 73, 1400-1406.
- Ferreira, R.B., Picarra-Pereira, M.A., Monteiro, S., Loureiro, V.B. und Teixeira, A.R. (2002). The wine proteins. *Trends Food Science and Technology*, Vol. 12, 230-239.
- Figuerido, A.R., Campos, F., De Freitas, V., Hogg, T. und Couto, J.A. (2008) Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiology*, Vol. 25, 105-112.
- Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C., Beh, A.L. und Heard, G.M. (2002) The yeast ecology of wine grapes. In: Ciani, M. (Ed) *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts*. Research Signpost, Kerala, India, pp 1-17.
- Food and Drug Administration (1998) Scombrototoxin (histamine) formation. In: *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide 2*, Food and Drug Administration, Washington D.C., pp 73-90
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. und Jurtshuk, P. (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 42, 166-170.
- Fröhlich, J. und Pfannebecker, J. (2007) Species-independent DNA fingerprint analysis with primers derived from the NotI identification sequence. Patentnummer EP2027285 (A1).
- Fröhlich, J., König, H. und Claus, H. (2009) Rapid Detection and Identification with Molecular Methods. In: König, H., Unden, G. und Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Musts and in Wine*. Springer, Heidelberg, pp. 429-450.
- Fugelsang, K.C. und Edwards, C.G. (2007) *Wine Microbiology*. Springer, Heidelberg.
- Fujinaga, M., Read, R.J., Sielecki, A., Ardelt, W., Laskowski, Jr., M. und James, M.N.G. (1982) Refined crystal structure of the molecular complex of *Streptomyces griseus* Protease B, a serine protease, with the third domain of the ovomucoid inhibitor from turkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 79, 4868-4872.
- Galante, Y.M. und Formantici, C. (2003) Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. *Current Organic Chemistry*, Vol. 7, 1399-1422.

- Ganga, M.A. und Martinez, C. (2004) Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non- *Saccharomyces* yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 96, 76-83.
- Garai, G., Duenas, M.T., Irastorza, A. und Moreno-Arribas, M.V. (2007) Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 45, 473-478.
- Garai, G., Duenas, M.T., Irastorza, A. und Moreno-Arribas, M.V. (2007) Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 45, 473-478.
- Gerbeaux, V., Villa, A., Monamy, C. und Bertrand, A. (1997). Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 48, 49-54.
- Gharaibeh, R., Saadoun, I. und Mahasneh, A. (2003) Evaluation of combined 16S rDNA and *strb1* gene targeted PCR to identify and detect streptomycin-producing *Streptomyces*. *Journal of Basic Microbiology*, Vol. 43, 301-311.
- Ghuysen, J.M. (1968) Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriological Reviews*, Vol. 32, 425-464.
- Gifford, A.H.T., Klippenstein, J.R. und Moore, M.M. (2002) Serum stimulates growth of and proteinase secretion by *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, Vol. 70, 19-26.
- Gil, J.V. und Valles, S. (2001) Effect of macerating enzymes on red wine aroma at laboratory scale: addition or expression by transgenic wine yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 49, 5515-5523.
- Glória, M.B.A. und Izquierdo-Pulido, M. (1999) Levels and significance of biogenic amines in Brazilian beers. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 12, 129-136.
- Godfrey, T. und West, S.I. (1996) Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey, T. und West, S. (Eds) *Industrial Enzymology*. Macmillan Press, London.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. und Guillamon, J.M. (2005) Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal Food of Microbiology*, Vol. 102, 295-304.
- González, A., Guillamon, J.M., Mas, A. und Poblet, M (2006) Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.108, 141-146.
- Gottlieb, D. und Shirling, E.B. (1967) Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. I. The international *Streptomyces* project. *International Journal of Systematic Microbiology*, Vol. 17, 315-322.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B. und Givskov, M. (2002) Food spoilage – interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 78, 79-97.
- Grund, E., Knorr, C. und Eichenlaub, R. (1990) Catabolism of benzoate and monohydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, 1459-1464.
- Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L. und Vincenzini, M. (2002) Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*, Vol. 44, 374-378.
- Guillamón, J.M. und Mas, A. (2009). Acetic acid bacteria. In: König, H., Uden, G., und Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Musts and in Wine*. Springer, Heidelberg, pp. 31-46.

- Guo, Y., Zheng, W., Rong, X. und Huang, Y. (2008) A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 58, 149-159.
- Gupta, R., Beg, Q. K. und Lorenz, P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 59, 15-32.
- Haarman, M. und Knol, J. (2006) Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, 2359-2365.
- Haese, C.C. und Finkelstein, R.A. (1993) Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiological Reviews*, Vol. 57, 823-837.
- Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. und Rainey, F.A. (1997) Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 47, 202-206.
- Halász, A., Baráth, A. und Holzapfel, W. (1999) The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchungen und -Forschung A*, Vol. 208, 418-423.
- Harada, S., Sarma, R., Kakudo, M., Hara, S. und Ikenaka, T. (1981) The three-dimensional structure of the lysozyme produced by *Streptomyces erythraeus*. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 256, 11600-11602.
- Hayashi, Y., Kasumi, T., Kubo, N. und Tsumura, N. (1981) Purification and characterization of the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agricultural Biology and Chemistry*, Vol. 45, 2289-2300.
- Hernández-Borges, J., D’Orazio, G., Aturki, Z. und Fanali, S. (2007) Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1147, 192-199.
- Heymer, B. und Schmidt, W.C. (1975) Purification and characterization of a *Streptomyces albus* endo-N-acetylmuramidase lytic for group A and other beta haemolytic streptococci. *Microbios*, Vol. 12, 51-66.
- Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B.A., Floss, H.G. und Omura, S. (1985) Production of ‚hybrid‘ antibiotics by genetic engineering. *Nature*, Vol. 314, 642-644.
- Hühn, T., Sponholz, W.R. und Pulver, D. (1999) Mikroorganismen bei der Weinbereitung. *Mitteilungen für Wissenschaft und Technik*, CDR 3, 42-88.
- Ishiyama, D., Vujaklija, D. und Davies, J. (2004) Novel pathway of salicylate degradation by *Streptomyces* sp. strain WA46. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, 1297-1306.
- Izquierdo Canas, P.M., Gomez Alonso, S., Ruiz Perez, P., Sesena Prieto, S., Garcia Romero, E. und Palop Herreros, M.L.L. (2009) Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* isolates from malolactic fermentation of Tempranillo wine. *Journal of Food Protection*, Vol. 72, 907-910.
- Jacob, N., Ashapoorna, C. und Prema, P. (2007) Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource Technology*, Vol. 99, 6697-6701.
- Johannes, T. W. und Zhao, H. (2006) Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 9, 261-267.

- Johnson, D. C. und La Course, W. R. (1990) Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes. *Analytical Chemistry*, Vol. 62, 586-596.
- Kalač, P. und Křížek, M. (2003) A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute und Guild of Brewing*, Vol. 109, 132-128.
- Kämpfer, P. (2011). Genus *Streptomyces*. In: Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W. und Whitman, W.B. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York.
- Kao, Y.T., Liu, Y.S. und Shyu, Y.T. (2007) Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Research International*, Vol. 40, 71-79.
- Karadzic, I., Izrael, L., Gojgic-Cvijovic, G. und Vujcic, Z. (2002) Leucine aminopeptidase from *Streptomyces hygrosopicus* is controlled by a low molecular weight inhibitor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 94, 309-314.
- Karovičová, J. und Kohajdová, Z. (2005) Biogenic amines in food. *Chemical Papers – Chemické Zvesti*, Vol. 59, 70-79.
- Kaschak, E., Göhring, N., König, H. und Pfeiffer, P. (2009) Biogenic amines in German wines: analysis and assessment according to the application of different HPLC-process. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, Vol. 105, 375-384.
- Kassemeyer, H.H. und Berkelmann-Löhnertz, B. (2009) Fungi of Grapes. In: König, H., Uden, G. und Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Musts and in Wine*. Springer, Heidelberg, pp. 61-88.
- Kawase, T., Yokokawa, S., Saito, A., Fujii, T., Nikaidou, N., Miyashita, K. und Watanabe, T. (2006) Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 und 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 70, 988-998.
- Kim, H.S. und Park, Y.I. (2007) Lipase activity and tacrolimus production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 mutant strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 17, 1638-1644.
- Kirk, O., Borchert, T.V. und Fugelsang, C.C. (2002) Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 2002, 345-351.
- Kiss, Z., Ward, A.C., Birkó, Z., Chater, K.F. und Biró, S. (2008) *Streptomyces griseus* 45H, a producer of the extracellular autoregulator protein factor C, is a member of the species *Streptomyces albidoflavus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 58, 1029-1031.
- König, H. (2008) Bedeutung von biogenen Aminen für die Weinqualität. *Der Oenologe*, Vol. 6, 44-46.
- König, H. und Fröhlich J. (2009) Lactic acid bacteria. In: König, H., Uden, G. und Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Musts and in Wine*. Springer, Heidelberg, pp. 3-29.
- Kounatidis, I., Crotti, E., Sapountzis, P., Sacchi, L., Rizzi, A., Chouaia, B., Bandi, C., Alma, A., Daffonchio, D., Mavragani-Tsipidou, P. und Bourtzis, K. (2009) *Acetobacter tropicalis* is a major symbiont of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*). *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, 3281-3288.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Vol. 10, 203-209.

- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Vol. 227, 680-685.
- Landete, J.M., Ferrer S. und Pardo, I. (2005) Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 99, 580-586.
- Landete, J.M., Ferrer, S. und Pardo, I. (2007a) Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*, Vol. 18, 1569-1574.
- Landete, J.M., Pardo, I. und Ferrer, S. (2007b) Tyramine and phenylethylamine production among lactic acid bacteria isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 115, 364-368.
- Landete, J.M., Pardo, I. und Ferrer, S. (2008) Regulation of *hdc* expression and HDC activity by enological factors in lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 105, 1544-1551.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, M.C., Dawyndt, P., Liu, Z., Huang, Y. und Swings, J. (2005) Grouping of *Streptomyces* using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Research in Microbiology*, Vol. 156, 755-762.
- Lapa-Guimarães, J. und Pickova, J. (2004) New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1045, 223-232.
- Larisika, M., Claus, H. und König, H. (2008) Pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of *Oenococcus oeni* isolates from different wine-growing regions in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 123, 171-176.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, T. und Vidal-Carou, M.C. (2009) Thin-layer chromatography for the identification and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteria. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1216, 4128-4132.
- Lay, H. (2003) Untersuchungen über die Entstehung des Mäuseltons im Wein und Modelllösungen. *Mitteilungen Klosterneuburg*, Vol. 53, 243-250.
- Lee, Y.H., Kim, B.H., Kim, J.H., Yoon, W.S., Bang, S.H. und Park, Y.K. (2007) CadC has a global translational effect during acid adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, Vol. 189, 2417-2425.
- Lehane, L. und Olley, J. (2000) Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 58, 1-37.
- Leitão, M.C., Marques, A.P. und San Romão, M.V. (2005) A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control*, Vol. 16, 199-204.
- Lieber, E.R und Taylor, S.L. (1978) Comparison of thin-layer chromatographic detection methods for histamine from food extracts. *Journal of Chromatography*, Vol. 160, 27-237.
- Linares, R.M., Ayala, J.H., Afonso, A.M. und Gonzalez, V. (1998) Effect of non-ionic surfactants as mobile phase additives on the fluorescence intensity of dansyl derivatives of biogenic amines in high-performance thin-layer chromatography. *Analyst*, Vol. 123, 725-729.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. und Komagata, K. (2000). Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 46, 147-165.

- Liu, S.Q. (2002) Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 92, 589-601.
- Logardt, I.M. und Neujahr, H.Y. (1975) Lysis of modified walls from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 124, 73-77.
- Lorenz, P. und Eck, J. (2005) Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 3, 510-516.
- Lortal, S., Vanheijenoort, J., Gruber, K. und Sleytr, U.B. (1992) S-Layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 – Isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium-chloride. *Journal of General Microbiology*, Vol. 138, 611-618.
- Loureiro, V. und Malfeito-Ferreira, M. (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 86, 23-50.
- Lucas, P., Landete, J., Coton, M., Coton, E. und Lonvaud-Funel, A. (2003) The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 229, 65-71.
- Lucas, P.M., Wolken, W.A., Claisse, O., Lokema, J.S. und Lonvaud-Funel, A. (2005) Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, 1417-1424.
- Lucas, P.M., Claisse, O. und Lonvaud-Funel, A. (2008) High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of histidine decarboxylase production phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, 811-817.
- Ludwig, W. und Schleifer, K.H. (1994) Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 15, 155-173.
- Lustrato, G., Alfano, G., Belli, C., Grazia, L., Iorizzo, M., Maiuro, L., Massarella, F., Zandardini, E. und Ranalli, G. (2003) Controlling grape must fermentation in early winemaking phases: the role of electrochemical treatment. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 95, 1087-1095.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. und Parker, J. (1997) Signal transduction and two-component regulatory systems. In: Brock, T.D. (Ed) *Biology of microorganisms*. Prentice Hall International, London: pp. 241-245.
- Maijala, R.L. (1993) Formation of histamine and tyramine by some lactic-acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 17, 40-43.
- Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Roselló-Mora, R. und Pardo, I. (2008a) *Lactobacillus bobalius* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 58, 2699-2703.
- Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Roselló-Mora, R. und Pardo, I. (2008b) *Lactobacillus uvarum* sp. nov. – A new lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 31, 425-433.
- Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Roselló-Mora, R. und Pardo, I. (2009) *Lactobacillus oeni* sp. nov., from wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 59, 2010-2014.
- Mangani, S., Guerrini, S., Granchi, L. und Vincenzini, M. (2005) Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*, Vol. 51, 6-10.

- Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C. und Sanchez, J. (2007) Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 274, 118-125.
- Marcobal, A., Polo, M.C., Martín-Álvarez, P.J. und Moreno-Arribas, M.V. (2005) Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Research International*, Vol. 38, 387-394.
- Marcobal, A., De las Rivas, B., Moreno-Arribas, M.V. und Muñoz, R. (2006) Evidence of horizontal gene transfer as origin of putrescine production in *Oenococcus oeni* RM 83. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, 7954-7985.
- Marino, M., Maifreni, M., Bartolomeoli, I. und Rondinini, G. (2008) Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 105, 540-549.
- Marques, A.P., Leitão, M.C. und San Romão, M.V. (2008) Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chemistry*, Vol. 107, 853-860.
- McCarthy, A.J. und Williams, S.T. (1992) Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. *Gene*, Vol. 115, 173-179.
- McGovern, P.E. (2003) Stone Age Wine. In: *Ancient Wine: the search for the origins of viticulture*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1-15.
- Mesas, J.M., Rodriguez, M.C. und Alegre, M.T. (2011) Characterization of lactic acid bacteria from musts and wines of three consecutive vintages of Ribeira Sacra. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 52, 258-268.
- Meseguer-Lloret, S., Molins-Legua, C., Verdú-Andrés, J. und Campíns-Falcó, P. (2004) Sensitive determination of aliphatic amines in water by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1035, 75-82.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Vol. 31, 426-428.
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardawaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O. und Yadav, H. (2008) Molecular approaches for identification and characterization of *Lactic acid bacteria*. *Journal of Digestive Diseases*, Vol. 9, 190-198.
- Molenaar, D., Bosscher, J.S., ten Brink, B., Driessen, A.J.M. und Konings, W.N. (1993) Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 175, 2864-2870.
- Montersino, S., Prieto, A., Muñoz, R. und De Las Rivas, B. (2008). Evaluation of exopolysaccharide production by *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from wine. *Journal of Food Science*, Vol. 73, M196-M199.
- Moreno-Arribas, V. und Lonvaud-Funel, A. (1999) Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 180, 55-60.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F. und Muñoz, R. (2003) Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 84, 117-123.
- Moreno-Arribas, M.V. und Polo, M.C. (2005) Winemaking biochemistry and microbiology: Current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 45, 265-286.

- Moreno-Arribas, M.V. und Polo, M.C. (2008) Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food Microbiology*, Vol. 25, 875-881.
- Morita, T., Hara, S. und Matushima, Y. (1978) Purification and characterization of lysozyme produced by *Streptomyces erythraeus*. *Journal of Biochemistry*, Vol. 83, 893-903.
- Novella-Rodriguez, S., Veciana-Nogúes, M. T., und Vidal-Carou, M. C. (2000) Biogenic amines and polyamines in miles and cheeses by iron high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 48, 5117-5123.
- Ohbuchi, K., Hasegawa, K., Hamachi, M., Ozeki, K. und Kumagai, C. (2001) Isolation of a new lytic enzyme for hiochi bacteria und other lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 91, 487-492.
- Ohtsu, H. und Watanabe, T. (2003) New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 305, 443-447.
- Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J. und Ferreira, V. (2009) Biogenic amine determination in wines using solide-phase extraction: a comperative study. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1216, 3398-3401.
- Petri, A., Pfannebecker, J., Fröhlich, J. und König, H. (2011) Fast identification of lactic acid bacteria responsible for the formation biogenic amines and other wine spoilages by multiplex-PCR. *Food Microbiology*, eingereicht.
- Pfannebecker, J. und Fröhlich, J. (2008) Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 128, 288-296.
- Phelan, M.B., Crawford, D.L. und Pometto, A.L. (1979) Isolation of lignocellulose-decomposing Actinomycetes and degradation of specifically C-14-labeled lignocellulose by 6 selected *Streptomyces* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 25, 1270-1276.
- Pocock, K.F., Høj, P.B., Adams, K.S., Kwiatkowsky, M.J. und Waters, E.J. (2003) Combined heatand proteolytic enzyme treatment of white wines reduces haze forming protein content without detrimental effect. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol. 9, 56-63.
- Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H. und Heard, G.M. (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyze the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, Vol. 4, 865-877.
- Prieto, C., Jara, C., Mas, A. und Romero, J. (2007) Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 115, 348-355.
- Probst, A.J., Hertel, C., Richter, L., Wassill, L., Ludwig, W. und Hammes, W.P. (1998) *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. *utilis* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 48, 651-658.
- Pujić, P., Durajlija-Žinić, S., Pandža, S., Mikoč, A., Plohl, M. und Gamulin, V. (2001) Ribosomal RNA operon in *Streptomyces rimosus*: Sequence of the *rrnF* and comparative analysis of *rrn* Promoter regions. *Food Technology and Biotechnology*, Vol. 39, 77-81.
- Rabilloud, T., Vuillard, L., Gilly, C. und Lawrence, J.J. (1994) Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cellular and Molecular Biology*, Vol. 40, 57-75.



- Rainer, G. (2005) Biogene Amin im steirischen Wein: Charakterisierung des Konzentrationsprofils im Jahrgang 2003 und deren Entstehung während der Vinifizierung. Diplomarbeit an der Technischen Universität Gießen.
- Ramos, A., Lolkema, J.S., Konings, W.N. und Santos, H. (1995) Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 61, 1303-1310.
- Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Mozina, S. und Cadez, N. (2006) Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska wine-growing region, Slovenia. International Journal of Food Microbiology, Vol. 109, 97-102.
- Rau, A., Hogg, T., Marquardt, R. und Hilgenfeld, R. (2001) A new lysozyme fold: crystal structure of the muramidase from *Streptomyces coelicolor* at 1.65 Å resolution. Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, 31994-31999.
- Renouf, V., Perello, M.C., Strehaiano, P. und Lonvaud-Funel, A. (2006) Global survey of the microbial ecosystem during alcoholic fermentation in winemaking. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, Vol. 40, 101-116.
- Renouf, V., Claisse, O. und Lonvaud-Funel, A. (2007) Inventory and monitoring of wine microbial consortia. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 75, 149-164.
- Rhee, J.E., Rhee, J.H., Ryu, P.Y. und Choi, S.H. (2002) Identification of the cadBA operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. FEMS Microbiology Letters, Vol. 208, 245-251.
- Rodas, A.M., Ferrer, S. und Pardo, I. (2003) 16S-ARDRA: A tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. Systematic and Applied Microbiology, Vol. 26, 412-422.
- Rodriguez, E. und McDaniel, R. (2001) Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products. Current Opinion in Microbiology, Vol. 4, 526-534.
- Rodtong, S. und Tannock, G.W. (1993) Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, 3480-3484.
- Rohn, L., Page, L., Borck, H., Horr, B. und Diel, F. (2005) Can histamine be tasted in wine? Inflammation Research, Vol. 54, suppl 1.
- Rong, X., Guo, Y. und Huang, Y. (2009) Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. *solivifaciens*. Systematic and Applied Microbiology, Vol. 32, 314-322.
- Ruiz, A, Poblet, M., Mas, A. und Guillamon, J.M. (2000) Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 50, 1981-1987.
- Ruiz-Capillas, C. und Jiménez-Colmenero, F. (2004) Biogenic Amines in Meat and Meat Products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 44, 489-499.
- Salton, M.R.J. (1964) The Bacterial Cell Wall. Elsevier, Amsterdam.
- Sanchez, S. und Demain, A.L. (2011) Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. Organic Process Research and Development, Vol. 15, 224-230.
- Sanger, F., Niclen, S. und Coulen, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Vol. 74, 5463-5467.
- Sauer, S. und Kliem, M. (2010) Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nature Reviews Microbiology, Vol. 8, 74-82.
- Sauermost, R. (1994) Herder-Lexikon der Biologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

- Schiller, M. (2002) Analytik und technologische Optik von Filmtabletten mit Extrakten von *Eschscholzia californica* Cham. Dissertation Universität Tübingen.
- Schleifer, K.H. und Kandler, O. (1967) *Micrococcus lysodeikticus*: a new type of cross-linkage of the murein. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 28, 965-972.
- Schleifer, K.H. und Fischer U. (1982) Description of a new species of the genus *Staphylococcus* – *Staphylococcus carnosus*. International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 32, 153-156.
- Sebastian, P. (2008) Reinigung und Charakterisierung bakteriolytischer Enzyme von Streptomyceten. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Sefton, M.A. (1998). Hydrolytically-released volatile secondary metabolites from a juice sample of *Vitis vinifera* cvs Merlot and Cabernet Sauvignon. Australian Journal of Grape and Wine Research, Vol. 4, 30-38.
- Seiler, N. und Wiechman, M. (1970) In: Niederweise, A. und Pataki, G. (Eds.) Progress in thin-layer chromatography and related methods. Ann Arbor-Humphrey Science Publishers, Ann Arbor, Michigan, USA, 94-144.
- Seo, H.J., Shimonishi, T., Ohmiya, K. und Hayashi, K. (2001) Characterization of N-Acetylmuramidase M-1 of *Streptomyces globisporus* produced by *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 92, 472-474.
- Seo, H.J., Kitaoka, M., Ohmiya, K. und Hayashi, K. (2003) Substrate specificity of N,6-O-diacetylmuramidase from *Streptomyces globisporus*. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 95, 313-316.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M. (1996) Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. Analytical Chemistry, Vol. 68, 850-858.
- Shidu, S.S., Kalmar, G.B., Willis, L.G. und Borgford, T.J. (1994) *Streptomyces griseus* Protease C. Journal of Biological Chemistry, Vol. 269, 20167-20171.
- Shidu, S.S., Kalmar, G.B., Willis, L.G. und Borgford, T.J. (1995) Protease evolution in *Streptomyces griseus* discovery of a novel dimeric enzyme. Journal of Biological Chemistry, Vol. 270, 7594-7600.
- Shirling, E.B. und Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 16, 313-340.
- Sigler, J. (2004) Der Einsatz von Lysozym in der Weinbereitung. Der Badische Winzer, Vol. 7, 31-34.
- Silla-Santos, M.H., (1996) Biogenic amines: Their importance in food. International Journal of Food Microbiology, Vol. 29, 213-231.
- Silva, L.R., Cleenwerck, I., Rivas, R.I., Swings, J., Trujillo, M.E., Willems, A. und Velázquez, E. (2006) *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 56, 21-24.
- Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. und Halasz, A.J. (1994) Biogenic amine content and microbial contamination of leafy vegetables during storage at 5°C. Journal of Food Biochemistry, Vol. 17, 407-418.
- Skujins, J.J., Braal, L. und McLaren, A.D. (1962) Characterization of phosphatase in terrestrial soil sterilized with an electron beam. Enzymologia, Vol. 25, 125-133.
- Smit, A.Y., du Toit, W.J. und du Toit, M. (2008) Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache. South African Journal of Enology and Viticulture, Vol. 29, 109-127.

- Soufleros, E., Barrios, M.L. und Bertrand, A. (1998) Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 49, 266-269.
- Sponholz, W.R., Dittrich, H.H. und Barth, A. (1982) Über die Zusammensetzung essigstichiger Weine. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, Vol. 78, 423-428.
- Sponholz, W.R. (1993) Wine spoilage by microorganisms. In: Fleet, G.H. (Ed), *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood, Chur, Switzerland, pp. 395-420.
- Stahl, E. (1967) *Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch*. Springer, Berlin.
- Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A. und Schlegel, H.G. (1981). *The Prokaryotes. A Handbook on Habits, Isolation and Identification of Bacteria*, Vol. II. Springer, Berlin.
- Stratton, J. E., Hutkins, R.W. und S. L. Taylor, S.L. (1991) Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, Vol. 54, 460-470.
- Straub, B.W., Kicherer, M., Schlicher, S.M. und Hammes, W.P. (1995) The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung*, Vol. 201, 79-82.
- Süsstrunk, U., Pdux, J., Tauberts, S., Ullmann, A. und Thompson, C.J. (1998) Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis, and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, Vol. 30, 33-46.
- Suzzi, G. und Gardini, F. (2003) Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiol*, Vol. 88, 41-54.
- Ten Brink, B., Damnik, C., Joosten, H.M.L.J. und Huis in't Veld, J.H.J. (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 11, 73-84.
- Thorne, K.J., Oliver, R.C. und Barrett, A.J. (1976) Lysis and killing of bacteria by lysosomal proteinases. *Infection and Immunity*, Vol. 14, 555-563.
- Tirelli, A. und De Noni, I. (2007) Evaluation of lysozyme stability in young red wine and model systems by a validated HPLC method. *Food Chemistry*, Vol. 105, 1564-1570.
- Tominaga, T., Peyrot de Gachons, C. und Dubourdiou, D. (1998) A new type of flavour precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc: S-cysteine conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 46, 5215-5219.
- Ugliano, M. (2009) Enzymes in Winemaking. In: Moreno-Arribas, M.V. und Polo, M.C. (Eds.) *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, New York, pp. 103-126.
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D. und Maguin, E. (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 82, 187-216.
- Van Wezel, G.P., Vijgenboom, E. und Bosch, L. (1991) A comparative study of the ribosomal RNA operons of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and sequence analysis of *rrnA*. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, 4399-4403.
- Velasco, S.E., Yebra, M.J., Monedero, V., Ibarburu, I., Duenas, M.T. und Iraztorza, A. (2007) Influence of the carbohydrate source on  $\beta$ -glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 115, 325-334.
- Vincenzini, M., Guerrini, S., Mangani, S. und Granchi, L. (2009) Amino acid metabolisms and production of biogenic amines and ethyl carbamate. In: König, H., Unden, G. und Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Musts and in Wine*. Springer, Heidelberg, pp. 167-180.

- Viollier, .P.H., Minas, W., Dale, G.E., Folcher, M. and Thompson, C.J. (2001) Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, Vol. 183, 3184-3192.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. und Foster, S. (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 32, 259-286.
- Wählby, S. und Engström, L. (1968) Studies on *Streptomyces griseus* protease. II. The amino acid sequence around the reactive serine residue of DFP-sensitive components with esterase activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 151, 402-08.
- Waite, J.G. und Daeschel, M.A. (2007) Contribution of wine components to inactivation of food-borne pathogens. *Journal of Food Science*, Vol. 72, 286-291.
- Waksman, S. A. und Henrici, A. T. (1943). The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. *Journal of bacteriology*, Vol. 46, 337-341.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. und Bhole, B.D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, Vol. 176, 386-390.
- Weiland, J. (2001) Mit Lysozym den BSA im Griff? *Deutsches Weinmagazin*, Vol. 23, 14-17.
- Welsch, M. (1962) Bacteriolytic enzymes from streptomycetes. *Journal of General Physiology*, Vol. 45, 115-124.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H. und Lee, T.H. (1985) Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 36, 302-313.
- Wilson, D.B. (1992) Biochemistry and genetics of a actinomycete cellulase. *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 12, 45-63.
- Wirth, K., Sebastian, P., Schneider, I. und König, H. (2011) Essigsäurebakterien: neue Arten isoliert. *Der Deutsche Weinbau*, Vol. 6, 36-37.
- Wolken, W.A., Lucas, P.M., Lonvaud-Funel, A. und Lolkema, J.S. (2006) The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 188, 2198-2206.
- Worrall, J.A.R. und Vijgenboom, E. (2010) Copper mining in *Streptomyces*: enzymes, natural products and development. *Natural Product Reports*, Vol. 27, 742-756
- Wright, F. und Bibb, M.J. (1992) Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene*, Vol. 113, 55-65.
- Yanagida, F., Ichinose, F., Shinohara, T. und Goto, S. (1992) Distribution of wild yeasts in the white grape varieties at central Japan. *Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 38, 501-504.
- Yokogawa, K., Kawata, S., Nishimura, S., Ikeda, Y. und Yoshimura, Y. (1974) Mutanolysin, bacteriolytic agent for cariogenic streptococci: partial purification and properties. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 6, 156-165.
- Yoshimoto, T. und Tsuru, D. (1972) Studies on bacteriolytic enzymes. II. Purification and some properties of two types of staphylolytic enzymes from *Streptomyces griseus*. *Journal of Biochemistry*, Vol. 72, 279-390.
- Younes, B., Cilindre, C., Villaume, S., Parmentier, M., Jeandet, P. und Vasserot, Y. (2011) Evidence for an extracellular acid proteolytic activity secreted by living cells of *Saccharomyces cerevisiae* PIR1: impact on grape proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 59, 6239-6246.
- Yum, D.Y., Chung, H.C., Bai, D.H., Oh, D.H. und Yu, J.H. (1994) Purification and characterization of alkaline serine-protease from an alkalophilic *Streptomyces* sp. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 58, 470-474.

## 8. Anhang

### 8.1 Nukleotidsequenzen

#### 8.1.1 16S rDNA

##### *Acetobacter oeni* P 9 (963 bp)

ACTTCCCCAGTCGCTGACCCGACCGTGGTTCGGCTGCGTCCTTTCGGGTTTCGCTCACC GGCTTAAGGTCAAACCAAC  
TCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGC  
GATTCCACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAAGTGCAGACGGCTTTTAGAGATCAGCACGATGTCGC  
CATCTAGCTTCCCCTGTACCCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGACATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTC  
ATCCCCACCTTCCTCCGGCTTGTACCCGGCAGTCTCTTTAGAGTGCCACCCAGACGTGCTGGCAACTAAAGATAA  
GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCGAA  
AGGTCCCTTTCGGGAAATGCCATCTCTGGACACAGCCTCTCCATACAAGCCCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTT  
CGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTTCGGGCGTACTC  
CCCAGGCGGTGTGCTTATCGCGTTAGCTACGACACTGAATGACTAAGTCAACCAACATCCAGCACACATCGTTTAC  
AGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTAATGAGCCAGGTT  
GCCGCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACGAATTTACCTCTACACTGAGAATTCACAACCCCTCTCTC  
ATACTCTAGTCTGCACGTATCAATGCAGCTCCCAGGTTAAGCCGGGATTTACATCTGACTGTACAAACCGCC  
TACACGCCCTTTACGCCAGTCATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTAT

##### *Acetobacter tropicalis* P 13 (874 bp)

TTCCCCAGTCGCTGACCCGACCGTGGTTCGGCTGCGCCCCCTTTCGGGTTTCGCTCACC GGCTTAAGGTCAAACCAAC  
TCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGC  
GATTCCACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAAGTGCAGACGGCTTTTAGAGATCAGCACGATGTCGC  
CATCTAGCTTCCCCTGTACCCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGACATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTC  
ATCCCCACCTTCCTCCGGCTTGTACCCGGCAGTCTCTCTAGAGTGCCACCCAAAACATGCTGGCAACTAAAGATAG  
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCTGT  
AGGTCCCTTTCGGGAAATGCCATCTCTGGACACAGCCTACACATAACAAGCCCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTT  
CGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTTCGGGCGTACTC  
CCCAGGCGGTGTGCTTATCGCGTTAGCTACGACACTGAACAACATAAGTTGCCCAACATCCAGCACACATCGTTTAC  
AGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTCATGAGCCAGGTT  
GCCGCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACGAATTTACCTCTACACTGGGAATTCACAACCCCTCTCTC  
ACACTCTAGTCTGCACGTATCAATGCAGCTCCCAGGTT

##### *Acetobacter tropicalis* P 64.2 (980 bp)

TTCCCCAGTCGCTGACCCGACCGTGGTTCGGCTGCGCCCCCTTTCGGGTTTCGCTCACC GGCTTAAGGTCAAACCAAC  
TCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGC  
GATTCCACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAAGTGCAGACGGCTTTTAGAGATCAGCACGATGTCGC  
CATCTAGCTTCCCCTGTACCCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGACATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTC  
ATCCCCACCTTCCTCCGGCTTGTACCCGGCAGTCTCTCTAGAGTGCCACCCAAAACATGCTGGCAACTAAAGATAG  
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGCTGT  
AGGTCCCTTTCGGGAAATGCCATCTCTGGACACAGCCTACACATAACAAGCCCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTT  
CGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTTCGGGCGTACTC  
CCCAGGCGGTGTGCTTATCGCGTTAGCTACGACACTGAACAACATAAGTTGCCCAACATCCAGCACACATCGTTTAC  
AGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTCATGAGCCAGGTT  
GCCGCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACGAATTTACCTCTACACTGGGAATTCACAACCCCTCTCTC  
ACACTCTAGTCTGCACGTATCAATGCAGCTCCCAGGTTAAGCCGGGATTTACATCTGACTGTACAAACCGCCT  
ACACGCCCTTTACGCCAGTCATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

*Acetobacter tropicalis* P 106.2 (946 bp)

ATCGACTTCACCCCAGTCGCTGACCCGACCGTGGTGGCTGCGCCCCTTGCGGGTTCGCTCACCGGCTTAAGGTCA  
 AACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGAT  
 TACTAGCGATTCCACCTTCATGCACCTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAAGTACGACGGCTTTTAGAGATCAGCACG  
 ATGTCGCCATCTAGCTTCCCCTGTCACCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGACATAAGGGCCATGAGGACT  
 TGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGCTTGTACCGGCAGTCTCTCTAGAGTGCCACCACAAACATGCTGGCAACTA  
 AAGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCT  
 GTGCTGTAGGTCCCTTGGCGGAAATGCCCATCTCTGGACACAGCCTACACATAACAAGCCCTGGTAAGGTTCTGCGC  
 GTTGCTTCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGC  
 CGTACTCCCCAGGCGGTGTGCTTATCGCGTTAGCTACGACACTGAACAATAAGTTGCCAACATCCAGCACACAT  
 CGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTCATGAG  
 CCAGGTTGCCGCTTTCGCCACCGGTGTTCTTCCAATATCTACGAATTTACCTCTACACTGGGAATTCACAACC  
 CTCTCTCACACTCTAGTCTGCACGTATCAAATGCAGCTCCCAGGTTAAGCCCCGGGATTTACATCTGACTGTACA  
 AACCGCCTACACGCCCTTTACGCCCAGTCATTCC

*Lactobacillus brevis* B 190 (998 bp)

TAATACATGCAGTCGAACGAGCTTCCGTTGAATGACGTGCTTGCACCTGATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACT  
 GGTGAGTAACACGTGGGGAATCTGCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGGAAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAAC  
 AAAATCCGCATGGATTTTTGTTTGAAGGTGGCTTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTT  
 GGTGAGGTAAAGGCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACA  
 CGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGT  
 GAGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTTG  
 ACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
 GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTTCGGCTTAACCGGAGAAGTG  
 CATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATAT  
 GGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCATGGGTAGCGAACAG  
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCA  
 GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGATTGACGGGGGCCCGCACA  
 AGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCTACGCGAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGA  
 GATAAGACGT

*Streptomyces albidoflavus* B 578 (1534 bp)

TCACGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTGAACGATGAACCGC  
 TTTCCGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGA  
 AACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCC  
 GCGGCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGAGCGGGTAGCCGCTGAGAGGGCGACCGGC  
 CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCT  
 GATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGAC  
 GGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGA  
 ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACAGTCCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCA  
 GTCGATACGGCAGGCTAGAGTTCCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG  
 AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA  
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGCGAG  
 CTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA  
 AGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATACACCGGAACGTCCTGGA  
 GACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA  
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCC  
 GGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACA  
 ATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATAACCGGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGGATTGGGGTC  
 TGCAACTCGACCCCATGAAGTCCGAGTGCCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC  
 TTGTACACACCGCCCGTACGTCACGAAAGTCCGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGC  
 TGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCTGAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTC  
 CTTTCTAAGGAGCA

*Streptomyces albidoflavus* DSM 40455<sup>T</sup> (1535 bp)

TCACGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTGAACGATGAACCGC  
TTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGA  
AACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATCGCATGGAGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCC  
GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGC  
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCT  
GATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGAC  
GGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGA  
ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACGTCCGTTGTGAAAGCCCAGGGCTTAACCCCGGGTCTGCA  
GTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG  
AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA  
TTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACCTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGCGAG  
CTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA  
AGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAACGTCTGG  
AGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTA  
AGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGC  
CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTAC  
AATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGATTGGGGT  
CTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
CTTGTACACACCGCCCGTACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAG  
CTGTCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCT  
CCTTTCTAAGGAGCA

*Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 (1534 bp)

TCACGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTGAACGATGAACCGC  
TTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGA  
AACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCC  
GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGC  
CACACTGAGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCT  
GATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGAC  
GGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGA  
ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACGTCCGTTGTGAAAGCCCAGGGCTTAACCCCGGGTCTGCA  
GTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG  
AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA  
TTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACCTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGCGAG  
CTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA  
AGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATACACCGGAACGTCTGGA  
GACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAA  
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCC  
GGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACA  
ATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGATTGGGGTC  
TGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC  
TTGTACACACCGCCCGTACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGC  
TGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTC  
CCTTTCTAAGGAGCA

### 8.1.2 Decarboxylase-Gene

#### Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus brevis* B 190 (398 bp)

GGCCTATATTGGACAATTAACATGACTACCGCATCAAGTTTCTCTGGTGTAGGAGGAACAGTTCTTGGATATGACATTCTTCGTAACCCAGAAGTTGATAAGGCTAAGCCTTTATTTACTGAAAAGCAATGGGACGGTAGCGAGTTACCAATTTACGACGCAAAGCCTCTGCAAGATACATTGGTTGAATACTTTGGTACCAAAGACGATATGCGTCATTATCCAGCTCCTGGTGCTTTTGTATGCTGTGCTAACAAAGGTGTCACTGCAGAACGTCCAAAGAATGATGAAGACATGAAGCCAGGCCAAGGCTATGGTGTATGGTCTGCTATTGCAATTTTCATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAAGATCTGGGTGTTTA

#### Tyrosin-Decarboxylase von *Lactobacillus brevis* B 190 (1004 bp)

CTGAATCCGTTTACCAGCCACTTCAAACTTTAAATTCTTCAAGAAATCATAGTAACGGTGGGCCCCCTTCAATTGAGGCACCTTCCAACCTTCCCATATCCTGTCACGTTCAATGGCAATGTGTGGTGTGCTGCCCAAACAGATGCAGCAGTGGCACCCGCTTGGAGCCCTCCAGAATATAAGCACCTAGCAATGCCGGAATATCGGCACCTTCTCAAATACATATGTTGCAAATAGGAAATCGTGTACGCATCCGAATATCTTGAATGACAATGCCCCAGCCGAGTATGGTACATATCCCATCTTATGGGGATCAATTGTAATGGACTCTGCTTGATCGAAAGCTTTATATGCCGCATAGACTTCTGGCTTGATGTATTCTTTATCTTCCGTGAAGACATGATTTTTCCGCATGTACTTTTTGTAAATTTTTGTATGGAATAAACTGATCGTCTCGTCCAAGAACAATGCCGAGCATA TCCACCATATGCAGCATCTACGTGTAGATAAAAAGTAAATTCCTTCCTTTTGCAGCTTTTGACGTAAAGC GACAATCTTATCAATGCCATCAACGGCACCTTCTTTCAGTTGATCCGGCCACACCAACCACACCTAGTAT TGGTGTCTTTTCAGCCGCATATTTACGAATAATACTTTCTAAGGCTTGAATATCCATCCGATAATTACT ATCAATTGGAACAGGAACAACCTTGATCCAAACCAATACCAATGATATCAGCGGCCTTCATCCAAGAATA ATGCTTCGTTTTGTGGTACTAGCCATTTCCCAAGGCGTTGTAGATTCTTACCACCTTCGAGCTGAACGCTT CTTGACTTCATCGATCTGAGAACC CGCATTCTCCAAAAGATCCATAATTTCTTTAGTCGGCATATTAAG AAGCTCCCAATCGGACTTACC GGCAACTAAATFCTGGATTAACCTTCTTTTCATGGCAAACGGGAGTGATT TAATATTTTCGCGCATACCAGAGTCCCTCAAGATTAGCC

### 8.1.3 Teilsequenz des Muramidase-Gens von *Streptomyces albidoflavus* B 578 (522 bp)

TCCGCTGGTGGACGTCACAGCCACCAGGGGAACGTCGACTGGGCGGGCTGTGGAACAGCGGCCTCAAGTGGTTCGACTGAAAGGCCACCGAAGGCACGTAACAAGAACCCTACTTCGCGCAGCAGTACAACGGCAGCTACAACGTTGGGCATGATCCGCGGGGCTACCACCTTCGCGACGCCAACACGACGAGCGGCGCCGCCAGGCCAACTACTTCGTTGGACAACGGCGGGCTGGTCCCGCGACGGCAAGACCCTCCCCGGCGTCTGGACATCGAGTGAACCCGTACGGCGACCAAGTGTACGGCCTGAGCCAGTCCGCGATGGTCAACTGGATCCGCGACTTCACCAACACCTACAAGGCCCGCACCGGCCGTGACGCGGTTCATCTACACCGCGACCAGCTGGTGGACCTCCTGCACCGGCAACTACGCGGGCTTCGCGGCCACCAACCCGCTCTGGGTGCCCCGGTATGCCGCCTCGGTGGGCGAACTCCCGGCCCGGCTGGAAACATCTC

### 8.1.4 Teilsequenz des Protease-Gens von *Streptomyces albidoflavus* B 578 (475 bp)

CTGCGGCGAGAGCGCGCCCGCTGTCCCGGGCTCGGCGCAGACGTTGGTCTGGATCAGACCCGGAGACGATGCCGTCGGCACCGTAGTTGACGGTGGCGTTGAGGCCGGTGACCGAGCCCGCTGCAGGCCGGTGGTGCTGCCGCTGCGCTGGACGGACTGGCCGACCGAGGCGTTGCCGGCGCCGGTGTCTCCTGGTAGCTGCCGTTGTAGAGGTAGACACGGCCGTCCGGCGGCTCGGGTTGGAGTGCCGGATGATGCCGTAGCTGTTGCCCGGAAAGCTGGAGCCGGCGGTGGTGGCGATCGACCACGAGCTGCCGATGTTGGTGCAGTGGCCGGCGGTGAGCGCGAACTTGGTGGCCGCGCTGTCTGCACGTTGAAGCCGAGGGAGCACCGGGCGCCCGGTCGTGATGGCCTCGCCGCCCGCATGAGCTTGGAGAACTTGCCGGTGGTGCCTTGATCTCACA



## 8.2 Sequenzalignments zur Stammbaumberechnung

### Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus brevis* B 190

```

HDC1      -----GGCCTATATTGGACAA-TTAACATGACTACCGCATCAAGTTTCTCTGGTGTAG
HDC2      -----TGCTATATTGGACAA-TTAACATGACTACCGCATCAAGTTTCTCTGGTGTAG
Lb.buchneri  -----TGCCTATATTGGACAAATTAACATGACTACCGCATCAAGTTTCTCTGGTGTAG
Lb.sakei1    -----TGCCTATATTGGACAAATCAACATGACTACTGCATCAAGTTTCTCTGGTGTAG
Lb.sakei2    -----TGCCTATATTGGACAAATCAACATGACTACTGCATCAAGTTTCTCTGGTGTAG
O.oeni       -----TGCCTATATTGGACAAATCAACATGACTACTGCATCAAGTTTCTCTGGTGTAG
Lb.hilgardii -----TGCCTATATTGGACAAATCAACATGACTACTGCATCAAGTTTCTCTGGTGTAG
S.thermophilus AGGCTATGGTGTCTGGTCAGCGA-TTGCTATCTCCTTTGCAGCAGATGGTACTGTTGATT
Lb.reuteri   AGGATATGGTGTATGGTCAGCCA-TTGCTCTTTCATTCGTAAGGATCCTGCAAAAGATT
                *      *      * * *      * *      * *      *      *      *

```

```

HDC1      GAGGAACAGTTCTTGGATATGACATTCCTTCGTAACCCAGAAGTTGATAAGGCTAAGCCTT
HDC2      GAGGAACAGTTCTTGGATATGACATTCCTTCGTAACCCAGAAGTTGATAAGGCTAAGCCTT
Lb.buchneri  GAGGAACAGTTCTTGGATATGACATTCCTTCGTAACCCAGAAGTTGATAAGGCTAAGCCTT
Lb.sakei1    GTGGAAGTGTCTTGGTTATGACATCCTTCGTAACCCAGAAGTTGACAAAGCTAAGCCAT
Lb.sakei2    GTGGAAGTGTCTTGGTTATGACATCCTTCGTAACCCAGAAGTTGACAAAGCTAAGCCAT
O.oeni       GTGGAAGTGTCTTGGTTATGACATCCTTCGTAACCCAGAAGTTGACAAAGCTAAGCCAT
Lb.hilgardii GTGGAAGTGTCTTGGTTATGACATCCTTCGTAACCCAGAAGTTGACAAAGCTAAGCCAT
S.thermophilus CAGATATGTTTCATAGAAGACGCGGGTGTGGGACGAAAAATGATAACGAAGCTGA--TTT
Lb.reuteri   CGAGTATGTTTATTGAAGATGCTGGTGTATGG--GAAACACC-TAATGAAGATGA--ATT
                *      * * * *      * *      *      * * * * * * * * *

```

```

HDC1      TATTTACTGAAAAGCAATGGGACGGTAGCGAGTTACCAATTTACGACGCAAAGCCTCTGC
HDC2      TATTTACTGAAAAGCAATGGGACGGTAGCGAGTTACCAATTTACGACGCAAAGCCTCTGC
Lb.buchneri  TATTTACTGAAAAGCAATGGGACGGTAGCGAGTTACCAATTTACGACGCAAAGCCTCTGC
Lb.sakei1    TATTTACTGAAAAACAATGGGACGGTAGTGAAGTCCAATTTACGATGCAAAGCCTTTAC
Lb.sakei2    TATTTACTGAAAAACAATGGGACGGTAGTGAAGTCCAATTTACGATGCAAAGCCTTTAC
O.oeni       TATTTACTGAAAAACAATGGGACGGTAGTGAAGTCCAATTTACGATGCAAAGCCTTTAC
Lb.hilgardii TATTTACTGAAAAACAATGGGACGGTAGTGAAGTCCAATTTACGATGCAAAGCCTTTAC
S.thermophilus GATCGCTTGGCTAGATACTCGTCGCAAAGCGATTGCCAAATC-CATTGCAGAATGTGGAC
Lb.reuteri   AATTGAATACCTTAAGGGTCGTCGTAAGGCAATTGCTAAGTC-AATTGCTGAGTGTGGTC
                **      *      * * * *      * * * *      * * * * *

```

```

HDC1      AAGATACATTGGTTGAATACTTTGGTAC-CAAAGACGATATGC-----GTCATTAT-----C
HDC2      AAGATACATTGGTTGAATACTTTGGTAC-CAAAGACGATATGC-----GTCATTAT-----C
Lb.buchneri  AAGATACATTGGTTGAATACTTTGGTAC-CAAAGACGATATGC-----GTCATTAT-----C
Lb.sakei1    AAGATACTTTAGTTGAATACTTTGGTAC-TAAAGACGATATGC-----GTCACTAT-----C
Lb.sakei2    AAGATACTTTAGTTGAATACTTTGGTAC-TAAAGACGATATGC-----GTCACTAT-----C
O.oeni       AAGATACTTTAGTTGAATACTTTGGTAC-TAAAGACGATATGC-----GTCACTAT-----C
Lb.hilgardii AAGATACTTTAGTTGAATACTTTGGTAC-TAAAGACGATATGC-----GTCACTAT-----C
S.thermophilus AAGATAGCCATGTTTCGCTTCGCAAGAACATATATTGGCTTTGCCCATGCCATGATGAAAC
Lb.reuteri   AAGATGCTAATACCTCATTCAGGGTTATGGATCGGCTTTGCTCATGCAATGATGGAAC
                *****      * *      * *      * * * * *      * * * * *

```

```

HDC1      CAGCTCCTGGTGCTTTTGTGTA--TGCTGT-GCTAACAAAGGTGTCACTGCAGAACGTCCAA
HDC2      CAGCTCCTGGTGCTTTTGTGTA--TGCTGT-GCTAACAAAGGTGTCACTGCAGAACGTCCAA
Lb.buchneri  CAGCTCCTGGTGCTTTTGTGTA--TGCTGT-GCTAACAAAGGTGTCACTGCAGAACGTCCAA
Lb.sakei1    CTGCTCCAGGTGCATTTGTGTA--TGCTGT-GCCAACAAAGGTGTAAGTGCAGAACGTCCAA
Lb.sakei2    CTGCTCCAGGTGCATTTGTGTA--TGCTGT-GCCAACAAAGGTGTAAGTGCAGAACGTCCAA
O.oeni       CTGCTCCAGGTGCATTTGTGTA--TGCTGT-GCCAACAAAGGTGTAAGTGCAGAACGTCCAA
Lb.hilgardii CTGCTCCAGGTGCATTTGTGTA--TGCTGT-GCCAACAAAGGTGTAAGTGCAGAACGTCCAA
S.thermophilus CAAATCAAATCGGCAATGCCATCACCGTCGGCCCTTATTTGCCATCCCAGTGCATGCAA
Lb.reuteri   CAGGTCAAATGGTAATGCAATTACCGTAGCACCTTACGTTTCAATGCCGGTTGATTCTA
                *      * *      * * * *      * * * *      * * * * *

```

```

HDC1      AGAATGATGAAGACAT --- GAAGCCAGGCCAAGGCTATGGTGTAT --GGTCTGCTATTGC
HDC2      AGAATGATGAAGACAT --- GAAGCCAGGCCAAGGCTATGGTGTAT --GGTCTGCTATTGC
Lb.buchneri1  AGAATGATGAAGACAT --- GAAGCCAGGCCAAGGCTATGGTGTAT --GGTCTGCTATTGC
Lb.sakei1    AGAACGATGCAGATAT --- GAAGCCTGGTCAAGGATATGGTGTAT --GGTCAGCAATCGC
Lb.sakei2    AGAACGATGCAGATAT --- GAAGCCTGGTCAAGGATATGGTGTAT --GGTCAGCAATCGC
O.oeni       AGAACGATGCAGATAT --- GAAGCCTGGTCAAGGATATGGTGTAT --GGTCAGCAATCGC
Lb.hilgardii AGAACGATGCAGATAT --- GAAGCCTGGTCAAGGATATGGTGTAT --GGTCAGCAATCGC
S.thermophilus TCCCTGGAGGAGACATAACCGATCCTGACGGTTGTTTTGATATTTTGGAAACATTTGTCTC
Lb.reuteri   TCCCAGGCGGTTCAATCTTAACACCAGATACTGACATGGATATTATGGAAAACCTTAACAA
                * *      **      * * *      * * *      *

```

```

HDC1      AATTTTCATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAAGATCTGGGT --
HDC2      AATTTTCATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAAGATCTGGGT --
Lb.buchneri1  AATTTTCATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAAGATCTGGGT --
Lb.sakei1    AATTTTCATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAAGATCTGGGT --
Lb.sakei2    AATTTTCATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAAGATCTGGGT --
O.oeni       AATTTTCATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAAGATCTGGGT --
Lb.hilgardii AATTTTCATTTGCTAAGGATCCAACCTAAGTATTCAAGTATGTACGTTGAAGATCTGGGT --
S.thermophilus TGCCCTGACTGGTTA --GATGCGATGAATTACACCTCCTTGACAGCTAATGATCAGATCAA
Lb.reuteri   TGCCCTAAGTGGCTC --GATAAGATGGGATATAAGTCGTTAACTGCTAACGGCGCTATTA
                * * * *      ***      *      * *      *      * * * *

```

```

HDC1      -----
HDC2      -----
Lb.buchneri1  -----
Lb.sakei1    -----
Lb.sakei2    -----
O.oeni       -----
Lb.hilgardii -----
S.thermophilus ATATTAAC
Lb.reuteri   GACTAA-

```

Abkürzungen: HDC1/2 = Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus brevis* B 190 (Sequenz 1/2); *Lb.buchneri1/2* = Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus buchneri* (Sequenz 1); *Lb.sakei1/2* = Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus sakei* (Sequenz 1/2); *O.oeni* = Histidin-Decarboxylase von *Oenococcus oeni*; *Lb.hilgardii* = Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus hilgardii*; *S.thermophilus* = Histidin-Decarboxylase von *Streptococcus thermophilus*; *Lb.reuteri* = Histidin-Decarboxylase von *Lactobacillus reuteri*.

### 16S rDNA von *Streptomyces albidoflavus* B 578

```

40233      CAAGTCGAACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
40455      CAAGTCGAACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.daghestanicus CAAGTCGAACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.somaliensis   CAAGTCGAACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.violascens    CAAGTCGAACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
B578      CAAGTCGAACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.hydrogenans   CAAGTCGAACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.albidoflavus  CAAGTCGAACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.koyangensis  CAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGG --ATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.purpurascens CAAGTCGAACGATGAACCACTTC --GGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.levis         CAAGTCGAACGATGAACCACTTC --GGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.violaceus     CAAGTCGAACGATGAACCACTTC --GGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.roseoviolaceus CAAGTCGAACGATGAACCACTTC --GGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.hawaiiensis  CAAGTCGAACGATGAACCACTTC --GGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.cinerochromogenes CAAGTCGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.gougerotii   CAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGG --ATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.diastaticus  CAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGG --ATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.rutgersensis CAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGG --ATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.intermedius  CAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGG --ATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.coeruleofuscus CAAGTCGAACGATGAACCACTTC --GGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
S.albus        CAAGTCGAACGATGAAGCCGCTTCGGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
                ***** * * * * *****

```

40233 GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
 40455 GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. daghestanicus* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. somaliensis* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. violascens* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
**B578** **GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G**  
*S. hydrogenans* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. albidoflavus* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. koyangensis* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. purpurascens* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATG  
*S. levis* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. violaceus* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATG  
*S. roseoviolaceus* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATG  
*S. hawaiiensis* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATG  
*S. cinerochromogenes* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. gougerotii* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. diastaticus* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. rutgersensis* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. intermedius* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. coeruleofuscus* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
*S. albus* GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT-G  
 \*\*\*\*\* \*

40233 ACTGTCCATCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
 40455 ACTGTCCATCGCATGGAGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. daghestanicus* ACTGTCCATCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. somaliensis* ACTGTCCATCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. violascens* ACTGTCCATCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
**B578** **ACTGTCCATCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC**  
*S. hydrogenans* ACTGTCCATCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. albidoflavus* ACTGTCCATCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. koyangensis* ACTGTCCACCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. purpurascens* ACCATCTTGGGCATCTTTGATG-GTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. levis* ACCATCTTGGGCATCTTTGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. violaceus* ACCACCGCAGGCATCTGTGGTG-GTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. roseoviolaceus* ACCACCGCAGGCATCTGTGGTG-GTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. hawaiiensis* ACCACTGGGGCATCTCGGTG-GTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. cinerochromogenes* AGCCTCCAAGGCATCTTTGAGG-TTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. gougerotii* ACCGTCCATCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. diastaticus* ACCGTCCATCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. rutgersensis* ACCGTCCATCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. intermedius* ACTGTCCACCGCATGGTGGATG-GTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. coeruleofuscus* AGCCTCCATCGCATGGTGGGG-CTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
*S. albus* ACACGGGATCGCATGGTCTCCGTGTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCC  
 \* \*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\*

40233 TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
 40455 TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. daghestanicus* TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. somaliensis* TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. violascens* TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
**B578** **TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG**  
*S. hydrogenans* TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. albidoflavus* TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. koyangensis* TATCAGCTTGTGGTGGGTTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. purpurascens* TATCAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. levis* TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. violaceus* TATCAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. roseoviolaceus* TATCAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. hawaiiensis* TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. cinerochromogenes* TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. gougerotii* TATCAGCTAGTTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. diastaticus* TATCAGCTAGTTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. rutgersensis* TATCAGCTAGTTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. intermedius* TATCAGCTAGTTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. coeruleofuscus* TATCAGCTTGTGGTGGTGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
*S. albus* TATCAGCTTGTGGTGGGTTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG  
 \*\*\*\*\*

40233 GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
40455 GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.daghestanicus* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.somaliensis* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.violascens* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
**B578** **GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG**  
*S.hydrogenans* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.albidoflavus* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.koyangensis* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.purpurascens* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.levis* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.violaceus* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.roseoviolaceus* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.hawaiiensis* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.cinerochromogenes* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.gougerotii* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.diastaticus* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.rutgersensis* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.intermedius* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.coeruleofuscus* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
*S.albus* GCGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
\*\*\*\*\*

40233 GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
40455 GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.daghestanicus* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.somaliensis* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.violascens* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
**B578** **GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT**  
*S.hydrogenans* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.albidoflavus* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.koyangensis* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.purpurascens* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.levis* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.violaceus* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.roseoviolaceus* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.hawaiiensis* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.cinerochromogenes* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.gougerotii* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.diastaticus* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.rutgersensis* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.intermedius* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.coeruleofuscus* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
*S.albus* GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTT  
\*\*\*\*\*

40233 CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
40455 CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.daghestanicus* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.somaliensis* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.violascens* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
**B578** **CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC**  
*S.hydrogenans* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.albidoflavus* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.koyangensis* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.purpurascens* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.levis* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.violaceus* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.roseoviolaceus* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.hawaiiensis* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.cinerochromogenes* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.gougerotii* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.diastaticus* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.rutgersensis* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.intermedius* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.coeruleofuscus* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
*S.albus* CGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGC  
\*\*\*\*\*

40233 GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
40455 GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.daghestanicus* GCCGGCCTAATACGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.somaliensis* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.violascens* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
**B578** **GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA**  
*S.hydrogenans* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.albidoflavus* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.koyangensis* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.purpurascens* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGGAA  
*S.levis* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGGAA  
*S.violaceus* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGGAA  
*S.roseoviolaceus* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGGAA  
*S.hawaiiensis* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGGAA  
*S.cinerochromogenes* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.gougerotii* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.diastaticus* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.rutgersensis* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.intermedius* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.coeruleofuscus* GCCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAA  
*S.albus* ACCGGCTAACTACG-TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAA  
\*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*

40233 TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
40455 TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.daghestanicus* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.somaliensis* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.violascens* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
**B578** **TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT**  
*S.hydrogenans* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.albidoflavus* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.koyangensis* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.purpurascens* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.levis* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.violaceus* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.roseoviolaceus* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.hawaiiensis* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.cinerochromogenes* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.gougerotii* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.diastaticus* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.rutgersensis* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.intermedius* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.coeruleofuscus* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTT  
*S.albus* TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACCGTTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTT  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

40233 AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
40455 AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.daghestanicus* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.somaliensis* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.violascens* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
**B578** **AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC**  
*S.hydrogenans* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.albidoflavus* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.koyangensis* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.purpurascens* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.levis* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.violaceus* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.roseoviolaceus* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.hawaiiensis* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.cinerochromogenes* AACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.gougerotii* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.diastaticus* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.rutgersensis* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.intermedius* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.coeruleofuscus* AACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC  
*S.albus* AACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGCAGGGGAGATTGGGAATTCC  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

40233 TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
40455 TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. daghestanicus* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. somaliensis* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. violascens* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
**B578** **TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT**  
*S. hydrogenans* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. albidoflavus* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. koyangensis* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. purpurascens* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. levis* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. violaceus* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. roseoviolaceus* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. hawaiiensis* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. cinerochromogenes* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. gougerotii* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. diastaticus* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. rutgersensis* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. intermedius* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. coeruleofuscus* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
*S. albus* TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCGATCTCT  
\*\*\*\*\*

40233 GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
40455 GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. daghestanicus* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. somaliensis* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. violascens* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
**B578** **GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG**  
*S. hydrogenans* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. albidoflavus* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. koyangensis* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. purpurascens* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. levis* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. violaceus* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. roseoviolaceus* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. hawaiiensis* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. cinerochromogenes* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. gougerotii* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. diastaticus* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. rutgersensis* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. intermedius* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. coeruleofuscus* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
*S. albus* GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
\*\*\*\*\*

40233 TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
40455 TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. daghestanicus* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. somaliensis* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. violascens* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
**B578** **TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG**  
*S. hydrogenans* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. albidoflavus* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. koyangensis* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. purpurascens* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. levis* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. violaceus* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. roseoviolaceus* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. hawaiiensis* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. cinerochromogenes* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. gougerotii* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. diastaticus* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. rutgersensis* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. intermedius* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. coeruleofuscus* TAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCG  
*S. albus* TAGTCCACGCCGTAACCGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGGCATTCACGTTGTCCGTGCCG  
\*\*\*\*\*

40233 CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
40455 CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. daghestanicus* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. somaliensis* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. violascens* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
**B578** **CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA**  
*S. hydrogenans* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. albidoflavus* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. koyangensis* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. purpurascens* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. levis* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. violaceus* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. roseoviolaceus* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. hawaiiensis* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. cinerochromogenes* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. gougerotii* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. diastaticus* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. rutgersensis* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. intermedius* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. coeruleofuscus* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
*S. albus* CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGA  
\*\*\*\*\*

40233 ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
40455 ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. daghestanicus* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. somaliensis* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. violascens* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
**B578** **ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAT**  
*S. hydrogenans* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. albidoflavus* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. koyangensis* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. purpurascens* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. levis* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. violaceus* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. roseoviolaceus* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. hawaiiensis* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. cinerochromogenes* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. gougerotii* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. diastaticus* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. rutgersensis* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. intermedius* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. coeruleofuscus* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
*S. albus* ATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
\*\*\*\*\*

40233 CCTTACCA-GGCTTGACATACACCGGAA-CGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
40455 CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAA-CGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. daghestanicus* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. somaliensis* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. violascens* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
**B578** **CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG-**  
*S. hydrogenans* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. albidoflavus* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. koyangensis* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. purpurascens* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. levis* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. violaceus* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. roseoviolaceus* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. hawaiiensis* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. cinerochromogenes* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. gougerotii* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. diastaticus* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. rutgersensis* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. intermedius* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. coeruleofuscus* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
*S. albus* CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCG  
\*\*\*\*\*

40233 TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
40455 TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.daghestanicus* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.somaliensis* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.violascens* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
**B578** **TGTACAGGTGGTGCATGGCTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG**  
*S.hydrogenans* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.albidoflavus* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.koyangensis* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.purpurascens* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.levis* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.violaceus* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.roseoviolaceus* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.hawaiiensis* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.cinerochromogenes* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.gougerotii* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.diastaticus* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.rutgersensis* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.intermedius* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.coeruleofuscus* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
*S.albus* TGTACAGGTGGTGCATGGCT-GTCGT CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
\*\*\*\*\*

40233 CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
40455 CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.daghestanicus* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.somaliensis* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.violascens* CAACNANCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
**B578** **CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC**  
*S.hydrogenans* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.albidoflavus* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.koyangensis* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.purpurascens* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.levis* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.violaceus* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.roseoviolaceus* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.hawaiiensis* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.cinerochromogenes* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.gougerotii* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.diastaticus* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.rutgersensis* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.intermedius* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.coeruleofuscus* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTG---CTGGGGACTC  
*S.albus* CAACGAGCGCAACCCTTGTCCCCTGTTGCCAGCAACTCCTTTCGGGAGGTTGGGGACTC  
\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\*

40233 ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
40455 ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.daghestanicus* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.somaliensis* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.violascens* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
**B578** **ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC**  
*S.hydrogenans* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.albidoflavus* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.koyangensis* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.purpurascens* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.levis* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.violaceus* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.roseoviolaceus* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.hawaiiensis* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.cinerochromogenes* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.gougerotii* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.diastaticus* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.rutgersensis* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.intermedius* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.coeruleofuscus* ACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
*S.albus* ACGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCC  
\*\*\*\*\*



40233 CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
40455 CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.daghestanicus* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.somaliensis* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.violascens* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
**B578** CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.hydrogenans* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.albidoflavus* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGNGA  
*S.koyangensis* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.purpurascens* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.levis* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.violaceus* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.roseoviolaceus* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.hawaiiensis* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.cinerochromogenes* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.gougerotii* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGA  
*S.diastaticus* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGA  
*S.rutgersensis* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGA  
*S.intermedius* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.coeruleofuscus* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA  
*S.albus* CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCGGTGA  
\*\*\*\*\* \*\*

40233 GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
40455 GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.daghestanicus* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.somaliensis* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.violascens* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
**B578** GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.hydrogenans* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.albidoflavus* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.koyangensis* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.purpurascens* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.levis* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.violaceus* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.roseoviolaceus* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.hawaiiensis* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.cinerochromogenes* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.gougerotii* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.diastaticus* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.rutgersensis* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.intermedius* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.coeruleofuscus* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
*S.albus* GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
\*\*\*\*\*

40233 TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
40455 TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.daghestanicus* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.somaliensis* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.violascens* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
**B578** TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.hydrogenans* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.albidoflavus* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.koyangensis* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.purpurascens* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.levis* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.violaceus* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.roseoviolaceus* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.hawaiiensis* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.cinerochromogenes* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.gougerotii* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.diastaticus* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.rutgersensis* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.intermedius* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.coeruleofuscus* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
*S.albus* TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC  
\*\*\*\*\*

```

40233      CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
40455      CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. daghestanicus  CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. somaliensis   CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. violascens    CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
B578           CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. hydrogenans  CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. albidoflavus CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. koyangensis  CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. purpurascens CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. levis        CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. violaceus    CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. roseoviolaceus CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. hawaiiensis  CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. cinerochromogenes CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. gougerotii   CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. diastaticus  CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. rutgersensis CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. intermedius  CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. coeruleofuscus CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
S. albus        CTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC
*****

40233      CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
40455      CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. daghestanicus  CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. somaliensis   CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. violascens    CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
B578           CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. hydrogenans  CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. albidoflavus CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. koyangensis  CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. purpurascens CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. levis        CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. violaceus    CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. roseoviolaceus CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACNAAG
S. hawaiiensis  CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. cinerochromogenes CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. gougerotii   CCCCTTGTGGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. diastaticus  CCCCTTGTGGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. rutgersensis CCCCTTGTGGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. intermedius  CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. coeruleofuscus CCC-TTGTGGG-AGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
S. albus        CCC-TTGTGGG-AGGGAATCGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
***  ***  ***  *****  *****

```

Abkürzungen: S. = *Streptomyces*; 40233 = *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233; 40455 = *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455<sup>T</sup>, 578 = *Streptomyces albidoflavus* B 578.

## 8.3 Proteinsequenzen

### 8.3.1 Gereinigte Muramidase

In der Datenbank hinterlegte Proteinsequenzen mit hoher Ähnlichkeit zum N-Terminus der gereinigten Muramidase aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 (Tabelle 8.1):

**Tabelle 8.1: Datenbank-Vergleich des N-Terminus der gereinigten Muramidase aus *Streptomyces albidoflavus* B 578.**

Protein	N-Terminus				
Muramidase aus <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	1	-	SGVQGIDVVV	-	10
Lysozym aus <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> XylebKG-1	80	-	SGVQGIDVSH	-	89
NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">ZP_08238524.1</a>	80	-	SGVQGIDV--	-	89
Lysozym M1 aus <i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998	78	-	SGVQGIDVSH	-	87
NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">ZP_06584176.1</a>	78	-	SGVQGIDV--	-	87
N,O-diacetylmuramidase R2 aus <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i>	3	-	SGVQGIDVSH	-	12
NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">AAR97572.1</a>	3	-	SGVQGIDV--	-	12

Die N-Termini-identischen Abschnitte liegen innerhalb der mittels Datenbank-Recherche identifizierten Proteinsequenzen. Zur Berechnung der relativen Molekülmasse (Programm: Protein Calculator v.3.3) wurden die Aminosäuren vor den mutmaßlichen N-Termini, in rot dargestellt, nicht berücksichtigt.

Lysozym aus *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* XylebKG-1 NCBI-Accession-Nr.: [ZP\\_08238524.1](#) (berechnetes Molekulargewicht ab N-Terminus: 23,2 kDa).

```

1  mpayrpsr  lkrspiralla  agalgsaaal  iltatgpaaa  appapdepvr  pgqawmgagt
61  rieqgpasa  aggvapl dts  gvqgidvshw  qgainwgsvk  aagiafaymk  ategtsfkds
121 rfsanytgsy  naglirgayh  farpdvsnga  tqagyfasng  ggwskdgktl  pgvldiehnp
181 ygamcyglst  tqmrtwindf  yntykarttr  dvviyttasw  wntctgswtg  msaksplwva
241 hwgtsspnip  agfptwtiwq  ytatgrvsgv  sgdvdrnkfn  gsparlqala  dnta

```

Lysozym M1 aus *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 NCBI-Accession-Nr.: [ZP\\_06584176.1](#) (berechnetes Molekulargewicht ab N-Terminus: 23,2 kDa).

```

1 mlayrpsr lkrprgavla galgsavali ltgtgtaaaa ppapdepvrs gqawmgagtr
61 ieggpapsag gvtpmdtsgv qgidvshwqg sinwgsvkaa gidfaymka egtsfkdssf
121 nanytgsyna glirgayhfa rpnvsngatq agyfasnggg wskdgktpg vldiehnpyg
181 amcyglsttq mrtwindfyn tykarttrdv viyttaswwn tctgswtgma aksplwiahw
241 gtasptipag fptwtiwqyt atgrvsgvsg dvrnkfnsg larlqalann tp

```

N,O-diacetylmuramidase R2 aus *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NCBI-Accession-Nr.: [AAR97572.1](#) (berechnetes Molekulargewicht ab N-Terminus: 23,6 kDa).

```

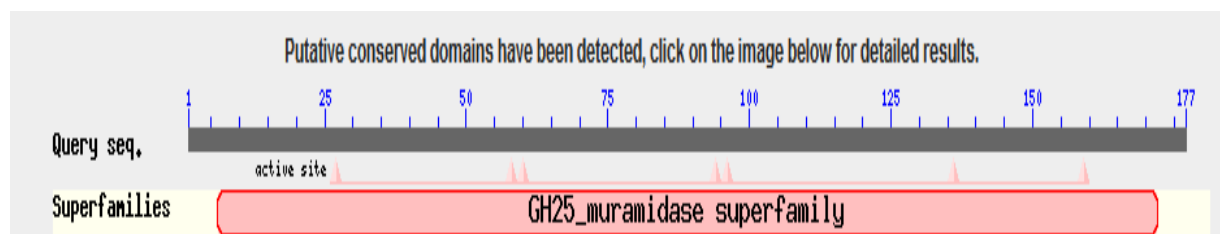
1 dtsgvqgidv shwqgsinws svksagmsfa yikategtny kddrfnanyt naynagiirg
61 ayhfarnas sgtaqadyfa sngggwsrdn rtlpgvldie hnpsgamcyg lsttqmrwti
121 ndfharykar ttrdvviytt aswwntctgs wngmaakspf wvhwgvsap tvpsgfptwt
181 fwqysatgrv ggvngdvdrn kfngfavrll alannta

```

Aminosäuresequenz der gereinigten Muramidase aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 (177 AS). Bei dieser Sequenz handelt es sich nur um eine Teilsequenz, da die Kompletsequenz des Muramidase-Gens nicht ermittelt werden konnte. Der N-Terminus ist in rot dargestellt. (berechnetes Molekulargewicht ab N-Terminus: 17,1 kDa).

AGGRPSHQGNVDWAGLWN **SGV**KWSYVKATEGTYYKNPYFAQQYNGSYNVGMIRGAYHFATPNTTSGAAQ  
ANYFVDNNGGWSRDGKTLPGVLDIEWNPYGDQCYGLSQSAMVNWIRDFTNTYKARTGRDAVIYTATSWW  
TSCTGNYAGFGATNPLWVARYAASVGELPARLETS

Die unterstrichenen Bereiche stellen konservierten Sequenzabschnitte der Muramidase Superfamilie GH25 dar (siehe Abbildung 8.1).



**Abbildung 8.1: Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der gereinigten Muramidase mit dem konservierten Sequenzbereich der Muramidase Superfamilie GH25.**

### 8.3.2 Gereinigte Protease

In der Datenbank hinterlegte Proteinsequenzen mit hoher Ähnlichkeit zum N-Terminus der gereinigten Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 (Tabelle 8.2):

**Tabelle 8.2: Datenbank-Vergleich des N-Terminus der gereinigten Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578.**

Protein	N-Terminus				
Protease aus <i>Streptomyces albidoflavus</i> B 578	1	-	LSGGDAIY	-	9
Peptidase M23B aus <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar pulsiensis BGSC 4CC1	509	-	FSGGDGIY	-	517
NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">ZP_04081978.1</a>	509	-	-SGGDGIY	-	5177
Peptidase M61 domain-containing protein aus <i>Thioalkalimicrobium cyclicum</i> ALM1	525	-	LSGGDEII	-	532
NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">YP_004536771.1</a>	525	-	LSGGD-II	-	532
Streptogrisin-B aus <i>Streptomyces</i> sp.	100	-	LSGGDAIYA	-	108
NCBI-Accession-Nr.: <a href="#">ZP_07285963.1</a>	100	-	LSGGDAI--	-	108

Die N-Termini-identischen Abschnitte liegen innerhalb der mittels Datenbank-Recherche identifizierten Proteinsequenzen. Zur Berechnung der relativen Molekülmasse (Programm: Protein Calculator v.3.3) wurden die Aminosäuren vor den mutmaßlichen N-Termini, in rot dargestellt, nicht berücksichtigt.

Peptidase M23B aus *Bacillus thuringiensis* serovar pulsiensis BGSC 4CC1 NCBI-Accession-Nr.: [ZP\\_04081978.1](#) (berechnetes Molekulargewicht ab N-Terminus: 14,4 kDa).

```

1  msngtddqik ntdkglelek saldqvlvmm afsgppqgai aggikavllv kdilgflgyl
61  gsgtsipdal rslqndidri qaelkqiger lativqdqad ienratleql lnyhdeirin
121 alalqntpad nvamsvnian eigivvdkfl rndyniwrwt dievrtetdp qtgmvinrvp
181 ynarlkfkn1 ptltvyvmgl ltwtarerv vqlgetgrls ddagriarhl aavsvrpnfd
241 kytsgdlgdp ksitehikwr iratptssnk ypvngqchfy yifenwmsgg rksgdnfdiy
301 kgnnnvlctv dpnslgapam eldaeteagv elllnmaevl qhvasrgt1r kqfigqfptt
361 qahp1ttfyv islneelhwy rnlessrpgg stilegpkki gtgwgnftsv fsgggvaiyg
421 vqpngdllwy ghdyfdgsd rwrghrvwg gwngfkkifs ggeyvvygiq pngdllwyrh
481 hasqsggdvt twtgqikvgn gwahfakvfs ggdgiyair edgsllrykh tgy1tgtntw
541 enysdgsqyr iigr1fndyl eviagkngvi yaftkdgril wyryyrnp1ga lgnrtr1vpg
601 veikrnf1paf rk1vfahmdap yv1gpry1p1fg ltgy

```

Peptidase M61 domain-containing protein aus *Thioalkalimicrobium cyclicum* ALM1 NCBI-Accession-Nr.: [YP\\_004536771.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/YP_004536771.1) (berechnetes Molekulargewicht ab N-Terminus: 8,16 kDa).

```

1  mnnihyqltl  hdyrshrlal  tlnirqpnad  gqmlrlpkwi  pgsymirdfs  khiinvratt
61  qdgrplavtv  idpshwqvap  hpgsiqvhye  vyawdlsvrg  ahydqqhaf1  ngtscflevv
121  gqskephsld  lladewaqqq  awsvattlpa  lalnpgqfgh  yhasnydeli  dhpiemaafk
181  evrfdaggie  hrmvltgvhd  addriaqdl  apiceaqlaf  fgepapfery  ifmvmvtgdg
241  ygglehrsst  alicsrds1p  yagmdkpsdk  yleflelcsh  eyfhswnvkr  iqpailqqsd
301  lqspastqll  wwfegatsy1  dllflyragt  idqttylqkl  aeqltrvyrm  pgrfqgtlad
361  sskqawtkly  qqdenapnai  isyytkgala  vialdltlrm  hsqqqksldd  lmrl1lwrdyg
421  ipqag1vedh  ieqlagelva  adlteffqga  lhstad1pla  elfaqvginf  alrppvsnpd
481  lggtakenpn  akpylnlgan  lvnsqngsvk  lthvwherpa  hkag1sggde  iialdglrms
541  svaqldsylq  rrplgdr1nc  hyfrrdelav  thitldsppa  drvvltaeqt  yswpek

```

Streptogrisin-B aus *Streptomyces* sp. NCBI-Accession-Nr.: [ZP\\_07285963.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ZP_07285963.1) (berechnetes Molekulargewicht ab N-Terminus: 18,6 kDa).

```

1  mlalaaglaa  taalaaptaa  saddngngfs  aarlaaagas  v1radvagta  whtdpatgt1
61  vvtadstvtg  adiarirrea  gpdaaalrie  rtpgkltkl1  sggdaiyass  wrcslgfnvr
121  sgsnyyilta  ghctegagtw  wsnsshttvv  gstagssfpt  ndyglykyas  nspvppgtvg
181  sqditsavna  ttgmsvtrrg  sttgihs1gsv  tglnatvnyg  ggdivygmir  tnvcaepgds
241  ggplysgsra  vglts1gsgsn  csssgt1tfq  pvvealnayg  vsvy

```

Aminosäuresequenz der gereinigten Protease aus *Streptomyces albidoflavus* B 578 (158 AS). Bei dieser Sequenz handelt es sich nur um eine Teilsequenz, da die Kompletsequenz des Protease-Gens nicht ermittelt werden konnte. Der N-Terminus ist in rot dargestellt. (berechnetes Molekulargewicht ab N-Terminus: 14,1 kDa).

```

VRIKRTTGKFSKLIAGGEATTTGGARCSLGFNVQDSAGTKFALTAGHCTNIGSSWSIGTTAGSSFPGND
YGIIRHSNPAAADGRVYLYNGSYQEITGAGNASVQSVQRSGSTTGLHGGSVTGLNATVNYGADGIVSG
LIQTNVCAEPGDSGGALSPQ

```

## 8.4 Verwendete Websites

<http://web.expasy.org/translate/>

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

[http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.deutscheweine.de> (Deutsches Weininstitut, 2009; Statistik Deutscher Wein 2009)

<http://www.dsmz.de>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

<http://www.eztaxon.org>

<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst angefertigt wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

A handwritten signature in blue ink that reads "Patrick Heston". The signature is written in a cursive style with a large, looping initial 'P'.

---

Heidelberg, den 14.11.2011

## Lebenslauf

Name Patrick Sebastian  
Geburtsdatum 28. Dezember 1983  
Geburtsort Bad Dürkheim



## Akademischer Werdegang

Nov. 2008 – Nov. 2011 Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung,  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Mrz. 2008 – Nov. 2008 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung,  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sep. 2006 – Feb. 2007 Auslandssemester an der Universidad de Granada, Spanien

Okt. 2003 – Mrz. 2008 Studium der Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Botanik, Biophysik, Biochemie  
und Pharmakologie

## Schulischer Werdegang

Aug. 1994 – Mrz. 2003 Werner Heisenberg-Gymnasium Bad Dürkheim

Aug. 1990 – Jul. 1994 Heumarkt-Grundschule Deidesheim