

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

Identifizierung, Quantifizierung und Hemmung von ausgewählten Hefen im Wein

Dissertation
zur Erlangung des Grades
“Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Verena Blättel
geb. am 04.03.1983 in Limburg an der Lahn

Mainz, 2012

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von April 2008 bis September 2011 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2012

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise in folgenden Publikationen und Posterpräsentationen veröffentlicht:

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

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

Blättel V, Larisika M, König H (2011) **Hydrolytische Enzyme zur Kontrolle von Wildhefen und Schleimbildung in der Weinbereitung.** In: Schultz H R und Stoll M (ed.), Deutsches Weinbaujahrbuch 2011. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart. 39-48.

Blättel V, Larisika M, Pfeiffer P, Nowak C, Eich A, Eckelt J, König H (2011) **Beta-1,3-glucanase from *Delftia tsuruhatensis* strain MV01 and its potential application in vinification.** Appl Environ Microbiol. 77: 983-990.

Blättel V, Larisika M, König H (2010) **Hydrolytische Enzyme zur Kontrolle von Wildhefen und Schleimbildung im Wein.** Vortrag. 50. Arbeitstagung des Forschungsrings des Deutschen Weinbaus bei der DLG, Weinsberg.

Blättel V, Larisika M, König H (2010) **A hydrolytic enzyme from *Delftia* sp. and its application in wine making.** Posterpräsentation. VAAM-Jahrestagung, Hannover.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Sukzession und Diversität: Ein Einblick in die Hefeflora von der Traube bis zum Wein | 1 |
| 1.2 | Die Gärer bei der Weinbereitung: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und die Mitglieder der <i>Saccharomyces sensu stricto</i> -Gruppe | 6 |
| 1.3 | Die natürliche Hefeflora: Das Risiko des Qualitätsverlustes | 12 |
| 1.4 | Verhinderung von Weinfehlern: Monitoring und Kontrolle von Mikroorganismen | 15 |
| 1.5 | Ziele der Arbeit | 17 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 2.1 | Chemikalien | 19 |
| 2.2 | Biochemikalien, Enzyme und Kits | 21 |
| 2.3 | Verbrauchsmaterial | 22 |
| 2.4 | Geräte und Hilfsmittel | 23 |
| 2.5 | Mikrobiologische Methoden | 25 |
| 2.5.1 | Bakterien- und Hefestämme | 25 |
| 2.5.2 | Kultivierung von Bakterien und Hefen | 30 |
| 2.6 | Molekularbiologische Methoden | 35 |
| 2.6.1 | DNA-Isolierung | 35 |
| 2.6.2 | Gelelektrophorese | 36 |
| 2.6.3 | PCR-Methoden | 37 |
| 2.6.3.1 | Amplifikation der ITS- und 5.8S rDNA-Regionen aus Hefe-DNA | 37 |
| 2.6.3.2 | SAPD-PCR | 38 |
| 2.6.3.3 | Stammspezifischer Nachweis mittel δ -PCR | 41 |
| 2.6.3.4 | Spezifischer Nachweis von <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. bayanus</i> | 42 |
| 2.6.3.5 | Quantitative PCR | 43 |
| 2.6.4 | Restriktionsfragmentpolymorphismus (RFLP) | 48 |
| 2.6.5 | Karyotyping mittels Pulsfeldgelelektrophorese | 49 |
| 2.6.6 | Sequenzierung | 51 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.7 | Proteinbiochemische Methoden | 51 |
| 2.7.1 | Proteinbestimmung | 51 |
| 2.7.2 | Konzentrierung von Proteinlösungen | 51 |
| 2.7.2.1 | Lyophilisation | 51 |
| 2.7.2.2 | Ultrafiltration | 52 |
| 2.7.2.3 | Cross-Flow-Filtration | 52 |
| 2.7.3 | Proteinreinigung | 53 |
| 2.7.3.1 | Anionenaustauscherchromatographie | 54 |
| 2.7.3.2 | Gelpermeationschromatographie | 55 |
| 2.7.4 | SDS-Gelelektrophorese | 56 |
| 2.7.4.1 | Denaturierende Gelelektrophorese | 56 |
| 2.7.4.2 | Renaturierte Aktivitätsgele | 57 |
| 2.7.5 | Isoelektrische Fokussierung | 58 |
| 2.7.6 | N-terminale Sequenzierung | 59 |
| 2.7.7 | Bestimmung von Enzymaktivitäten | 60 |
| 2.7.7.1 | Aktivitätstest mittels Plattendiffusionstests | 61 |
| 2.7.7.2 | Photometrische Aktivitätstests | 62 |
| 2.7.7.3 | DNS-Test | 63 |
| 2.7.7.4 | Dünnschichtchromatographie | 65 |
| 2.8 | Sonstige Methoden | 66 |
| 2.8.1 | Analyse der Zellwand von Hefen mittels mikroskopischer Methoden | 66 |
| 2.8.2 | Quantitative Bestimmung von Zuckern, Säuren und Alkoholen | 67 |
| 2.8.3 | Zellwandpräparation | 67 |
| 2.8.4 | Präparation des extrazellulären Glucans von <i>Botrytis cinerea</i> | 67 |
| 3 | ERGEBNISSE | 69 |
| 3.1 | Einordnung von Hefe-Stämmen in die <i>Saccharomyces sensu stricto</i>-Gruppe | 69 |
| 3.1.1 | Etablierung der Fingerprinting-Methode SAPD-PCR | 69 |
| 3.1.2 | Art-Identifizierung von Instituts-Stämmen durch SAPD-PCR | 74 |
| 3.1.3 | Auflösung von Hybrid-Stämmen und Untersuchung von Stämmen aus dem Weingut Heymann-Löwenstein | 77 |
| 3.2 | Bestimmung der Zellzahl von Hefen mittels quantitativer PCR | 91 |
| 3.2.1 | Entwicklung eines qPCR-Systems für die Detektion von <i>Saccharomyces</i> spp., <i>Hanseniaspora</i> spp. und <i>Brettanomyces</i> spp. | 91 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.2.2 | Quantifizierung von Hefe-Kulturen mittels quantitativer PCR | 97 |
| 3.3 | Enzymatische Zelllyse von weinrelevanten Hefen | 107 |
| 3.3.1 | Produktion und Sekretion von Zellwand-abbauenden Enzymen | 107 |
| 3.3.2 | Reinigung eines glucanolytischen Enzyms und partielle Reinigung eines Mannan-abbauenden Enzyms | 111 |
| 3.3.3 | Charakterisierung der β -Glucanase | 119 |
| 3.3.4 | Aktivität der β -1,3-Glucanase gegen die Zellwand von Hefen | 129 |
| 4 | DISKUSSION | 135 |
| 4.1 | Identifizierung von Spezies der <i>Saccharomyces sensu stricto</i>-Gruppe | 135 |
| 4.1.1 | SAPD-PCR: Differenzierung von <i>Saccharomyces</i> spp. mittels DNA-Fingerprinting | 135 |
| 4.1.2 | Interspezifische Hybride: Detektion durch SAPD-PCR? | 140 |
| 4.2 | Quantitative PCR: Untersuchung mikrobieller Populationen in der Weinbereitung | 145 |
| 4.2.1 | Amplifikationsspezifität der Ziel-DNA | 146 |
| 4.2.2 | Parameter des qPCR-Systems: Stabilität, Effizienz, Reproduzierbarkeit und Sensitivität | 148 |
| 4.2.4 | Quantifizierung von Hefepopulationen | 152 |
| 4.3 | Einsatz von Enzymen als Wachstumskontrolle von Wildhefen | 155 |
| 4.3.1 | Zellwand-abbauende Enzyme | 155 |
| 4.3.2 | Charakterisierung der β -1,3-Glucanase | 157 |
| 4.3.3 | β -1,3-Glucanase: Einsatz in der Weinbereitung? | 159 |
| 5 | AUSBLICK | 165 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 166 |
| 7 | LITERATUR | 168 |
| 8 | ANHANG | 187 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------|--|
| °C | Grad Celcius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| A | Ampere |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| bp | Basenpaare |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| BSA | Bovines Serum-Albumin |
| CBS | Centraalbureau voor Schimmelcultures |
| C _t | Threshold-Value |
| d | day (Tag) |
| Da | Dalton |
| dest. | destilliert |
| DNA | Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EPS | Exopolysaccharid |
| FPLC | Fast protein liquid chromatography |
| g | Gramm |
| g | Erdschwerebeschleunigung |
| GC | Guanin + Cytosin-Gehalt (%) |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| ITS | internal transcribed spacer |
| KBE | koloniebildende Einheiten |
| kDa | Kilodalton |
| KÜ | Kulturüberstand |
| l | Liter |
| M | Molar |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |

| | |
|----------------|---|
| NCBI | National Center of Biotechnology Information |
| NCYC | National collection of yeast cultures |
| nm | Nanometer |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | Polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| PFGE | Pulsfeldgelelektrophorese |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| rDNA | Ribosomal deoxyribonucleic acid (ribosomale Desoxyribonukleinsäure) |
| REM | Rasterelektronenmikroskop |
| S | Svedberg |
| SAPD | Specifically amplified polymorphic DNA |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| T | Typstamm |
| T _m | Schmelzpunkt |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Units |
| V | Volt |

1 EINLEITUNG

Die Herstellung alkoholischer Getränke durch Menschenhand ist ein seit Jahrtausenden bestehender Prozess, dessen Ursprung in China mit 7000 vor Christus datiert werden kann (McGovern et al 2004). Belege für die Erzeugung von Wein aus Trauben stammen aus Mesopotamien etwa 5400 bis 5000 vor Christus (McGovern et al 1996). Die mikrobielle Flora als Ursache des Alkoholgehalts dieser Getränke wurde erst im 19. Jahrhundert durch Charles Cagniard-Latour (Cagniard-Latour 1838), Theodor Schwann (Schwann 1837), Friedrich Traugott Kützing (Kützing 1837) und nicht zuletzt durch Louis Pasteur verstanden (Schwartz 2001) und kann somit als der Beginn einer mikrobiologischen Forschung an fermentierten Lebensmitteln gesehen werden.

Im Folgenden soll ein Überblick über die mit Trauben, Most und Wein assoziierte Mikrobiota gegeben werden. Diese beschränkt sich aufgrund der Fragestellungen dieser Arbeit auf die eukaryotische Mikrobiologie, genauer auf die Hefe-Flora, wissend, dass Bakterien wie Milchsäure- und Essigsäurebakterien einen nicht unerheblichen Teil dieser komplexen mikrobiologischen Habitate einnehmen.

1.1 Sukzession und Diversität: Ein Einblick in die Hefeflora von der Traube bis zum Wein

Hefen sind die klassischen Besiedler von natürlichen „Standorten, an denen vergärbare, zuckerreiche Säfte frei werden“ (Schlegel, 1992) und spielen daher auch im Traubenmost eine übergeordnete Rolle. Nicht nur die im Most auftretende hohe Zuckerkonzentration fördert die Vermehrung dieser zumeist osmotoleranten Gruppe, auch die vorherrschenden niedrigen pH-Werte tragen zu ihrer Dominanz gegenüber anderen Organismen wie Milchsäurebakterien bei. Ferner ist es die durch die alkoholische Gärung der Hefen verursachte Ethanolbildung als auch die im Zuge der Gärung schnell einsetzende Anaerobie, die die mikrobielle Diversität weiter schmälert und so – zumindest einigen Vertretern der Hefen – einen Wachstumsvorteil bietet.

Die Komplexität einer Diversitätsforschung von Hefen während der Weinbereitung wird erhöht durch die Betrachtung verschiedener Habitate und ökologischer Nischen, die grob in vier Hauptgebiete – Traube, Most, gärender Most/Jungwein und Wein – unterteilt werden müssen. Weiter zeigt sich die Weinbereitung als ein individueller Prozess, der beginnend mit der Rebsorte, ihrem Standort und den dort vorherrschenden klimatischen Bedingungen bis zu der Steuerung und des Eingreifens durch den Winzer einer Vielzahl von Faktoren unterworfen ist. Diese Parameter beeinflussen selbstverständlich auch die Vielfalt und Zusammensetzung der Hefeflora, wodurch eine allgemeine Betrachtungsweise der Hefe-Diversität unmöglich scheint. Nichtsdestotrotz können

in allen Studien übereinstimmende Arten gefunden werden, die als dominante Arten oder „Schlüssel-Arten“ zu den unterschiedlichen Stadien der Weinbereitung identifiziert werden können.

Das Habitat „Traube“ ist für eine mikrobiologische Betrachtung der Weinbereitung insofern wichtig, als dass mit der Weinlese nicht nur die Traube in den Weinkeller gebracht wird, sondern auch die mit ihr assoziierte Mikroflora, sodass diese auch nach der Pressung die dominanten Spezies im Most stellt. Selbstverständlich ändert sich mit zunehmender Reifung der Traube auch die Hefe-Flora, nicht zu letzt aufgrund eines zunehmenden Austritts von zuckerhaltigem Saft aus den reifen Früchten. Lebendkeimzahlen auf unreifen Beeren sind relativ gering (10^2 bis 10^3 koloniebildende Einheiten/g), während auf reifen, kurz vor der Lese stehenden Beeren die Keimzahl auf bis zu 10^6 koloniebildende Einheiten ansteigen kann (Prakitchaiwattana et al 2004). Schon während des Reifungsprozess der Beere ändert sich die Hefe-Zusammensetzung. So konnten von unreifen Beeren vor allen Dingen Arten der Gattungen *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* und *Candida* isoliert werden (Fleet 2003). Diese finden sich auch an der Oberfläche von reifen Beeren, jedoch werden hier auch Vertreter der Gattungen *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia* und *Sporobolomyces* gefunden (Fleet 2003, Raspor et al 2006). *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida stellata* und *Candida zemplinina* stellen dabei die dominierenden Spezies dar, auch wenn die Hauptspezies innerhalb dieser Gruppe variieren kann (Bisson und Joseph 2009). Die Gattung *Saccharomyces*, die als eigentliche „Wein-Hefe“ hauptverantwortlich für die spätere alkoholische Gärung ist, spielt hingegen nur eine untergeordnete Rolle mit Zellzahlen zwischen 10 und 100 koloniebildenden Einheiten/g (Fleet 2003, siehe auch 1.2)

Die Verbreitung der genannten Gattungen kann als global betrachtet werden, da sie nicht nur in den klassischen Weinanbaugebieten gefunden wurden (Combina et al 2005, Hierro et al 2006b), sondern auch auf Trauben aus China (Li et al 2010) und Indien (Chavan et al 2009). Trotzdem können Variationen bezüglich der Arten dieser Gattungen, hier noch nicht erwähnte Arten sowie die generelle Verteilung der Spezies auftreten, was nicht zuletzt in den Bedingungen des Anbaugebiets begründet ist (Torija et al 2001). Weiter scheint die Rebsorte an sich einen Einfluss auf die Verbreitung bestimmter Arten zu haben (Clavijo et al 2010, Cordero-Bueso et al 2011).

Wie oben erwähnt steigt die mikrobielle Populationsdichte mit der Verfügbarkeit von Zucker, sodass auch Verletzungen der Beere am Rebstock zu Veränderungen der Hefe-Diversität führen. Verletzungen der Beerenhaut können wetterbedingt sein (Hagel) oder durch Insektenfraß und Pilzbefall hervorgerufen werden. Im Fall von Insektenfraß ist bekannt, dass Bienen, Wespen und Fruchtfliegen als Vektoren für Hefen fungieren (Bisson und Joesph 2009). Pilzbefall kann durch Hagel oder starkem Regen begünstigt werden und führt je nach dominierender Pilz-Spezies

und/oder dem Reifegrad der Trauben zu verschiedenen Fäulnissen (Kassemeyer 2009). Die durch den Pilzbefall verursachten Änderungen der physio-chemischen Zusammensetzung der Traube korreliert mit Variationen der Hefeflora, wie Nisiotou et al (2007) oder Barata et al (2008a,b) am Beispiel des im Weinberg häufig vorkommenden Pilzbefalls durch *Botrytis cinerea* zeigen konnten. Pilzbefall und Hefe-Diversität hängen auch insofern zusammen, als dass durch den Einsatz von Fungiziden im Weinberg auch die Hefe-Flora beeinflusst werden kann (Cus und Raspor 2008, Cadez et al 2010).

Alle diese genannten Parameter führen dazu, dass nicht nur die oben genannten „Haupt-Spezies“ gefunden werden können, sondern eine weit größere Vielfalt. So fassen Bisson und Joseph (2009) die Hefeflora auf Trauben auf 54 Spezies zusammen, die sich in folgende 24 Gattungen aufteilen: *Aureobasidium*, *Auriculibuller*, *Brettanomyces*, *Bulleromyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Torulaspora*, *Yarrowia*, *Zygoas* und *Zygosaccharomyces*.

Diese große Vielfalt an unterschiedlichen Spezies wird schließlich mit der Traubenlese in den Weinkeller gebracht. Auch hier hängt die Diversität im späteren Most wieder von verschiedenen Bedingungen ab, wie etwa Temperaturen bei der Lese, die Zeit bis zur Pressung des Leseguts, die Maischezeit und natürlich auch die Maische-Schwefelung (siehe auch Sturm et al 2006, Andorra et al 2008). Zusätzlich können durch Arbeitsgeräte wie Pressen, Gärtanks und ähnliches Hefen aus dem Weinkeller in die Maische oder den Most gebracht werden. So konnte bereits die Verbreitung von Wildhefen in alteingesessenen Weinkellern gezeigt werden (Santamaria et al 2005) sowie die Überlebensfähigkeit von *Saccharomyces cerevisiae*-Starterkulturen im Weinkeller und ihren Einfluss auf die Mostvergärung (Blanco et al 2011). Zusätzlich führt die Verwendung von Hefe-Starterkulturen (hauptsächlich *Saccharomyces cerevisiae*) zu einer völlig veränderten Zusammensetzung der Weinflora, da die künstliche Anhebung dieser Spezies gleichzeitig auch zu einer Unterdrückung der wilden Flora führen kann. Ohne den Einsatz von Starterkulturen dominieren allerdings die Hauptspezies der Traubenflora, auch wenn durch die Pressung der Trauben eine plötzliche Steigerung der Zuckerkonzentration stattfindet, was durchaus osmotischen Stress für die Hefen bedeutet.

Allgemein kann man von einer Lebendzellzahl von 10^6 bis 10^7 Zellen/ml im Most ausgehen (Heard und Fleet 1985), die die Gattungen umfassen, die auch zuvor auf Trauben die dominanten Spezies stellen, wie etwa *Hanseniaspora* spp., *Candida* spp., *Metschnikowia* spp., seltener auch *Pichia* spp., *Issatchenkia* spp. und *Kluyveromyces* spp. (Fleet 2003, Zott et al 2010). Die zuvor erwähnte und benötigte Osmotoleranz ist ein wichtiger Faktor für die Verteilung dieser Spezies gerade bei Weinen

mit sehr hoher Zuckerkonzentration, wie sie etwa bei Trauben mit Edelfäule zu finden ist. So nehmen *Hanseniaspora uvarum* und *Candida zemplinina* oder *C. stellata* eine zentrale Rolle in dieser Mikroflora ein (Mills et al 2002, Nisioutou et al 2007, Urso et al 2008). Gerade *Candida zemplinina* ist hierbei für ihre hohe Osmotoleranz bekannt (Sipiczki 2003, Csoma und Sipiczki 2008, Tofalo et al 2009)

Diese Hauptarten können allerdings auch unabhängig von extremen Zuckerkonzentrationen zu Beginn der Gärung gefunden werden (Van Keulen et al 2003, Zott et al 2008), wenn gleich auch andere Arten wie etwa *Rhodotorula* sp. die dominante Spezies darstellen können (Rementeria et al 2003). Weiter scheinen in diesem frühen Stadium der Weinbereitung die Temperaturen, denen der Most ausgesetzt ist, eine Rolle für die Zusammensetzung der Mikroflora zu spielen. So konnten Zott et al (2008) eine Dominanz von *Candida zemplinina* feststellen, wenn die Temperatur im Weinkeller oder Gärtank unter 15 °C sank, wohingegen bei höheren Temperaturen *Hanseniaspora uvarum* die beherrschende Spezies war.

Die genannten Spezies initiieren dann auch die alkoholische Gärung, sterben aber etwa in der Mitte der Fermentation ab und die eigentliche Wein-Hefe *Saccharomyces* spp. übernimmt ihre dominante Rolle während der restlichen Fermentation (Bisson und Joseph, 2009). Als ein hauptsächlicher Grund kann die geringere Ethanoltoleranz der Wildhefen im Vergleich zu *Saccharomyces* spp. angesehen werden. Allgemein kann davon ausgegangen werden, dass die dominante Wildflora, *Hanseniaspora*, *Candida* und *Metschnikowia* umfassend, tolerant ist gegenüber einem Ethanolgehalt von lediglich fünf bis sieben Volumenprozent (Fleet 2003), wenngleich eine Ethanoltoleranz allgemein als stammspezifisch gilt und durchaus Stämme von Arten dieser Gattungen bekannt sind, die höhere Ethanolkonzentrationen aushalten (Mills et al 2002). Allerdings sinkt die experimentell ermittelte Ethanoltoleranz mit steigenden Temperaturen und sinkenden pH-Werten, wie Gao und Fleet (1988) am Beispiel von *Hanseniaspora uvarum* und *Candida stellata* zeigten. Neben dem Effekt der Toxizität von Ethanol scheint auch der Parameter der schlechten Sauerstoffversorgung negativ auf die von den Trauben stammende Mikroflora zu wirken (Holm Hansen et al 2001), wodurch *Saccharomyces cerevisiae* durch ihre stark voranschreitende Gärung ein Milieu schafft, das ihre mikrobielle Konkurrenz schädigt. Weiter zeigten Nissen und Arneborg (2003), dass das Aufkommen von hohen Zelldichten von *Saccharomyces cerevisiae* zusätzlich die Überlebensfähigkeit der Wildhefen mindert. *Saccharomyces* sp. scheint also die vorherrschende Gattung bei erhöhtem Ethanolgehalt während der Gärung zu sein, wenn gleich sie nicht selten mit einem knappen Nährstoffangebot konfrontiert ist, da die zuvor aktive Mikroflora einen nicht geringen Anteil der in der Traube befindlichen Aminosäuren und Vitamine verbraucht hat. Auf der

anderen Seit führt die mit dem Tod einhergehender Zellyse dieser Hefen zu einer erneuten Verfügbarkeit von Nährstoffen für *Saccharomyces* sp. (Fleet 2003).

Ebenfalls abhängig von den steigenden Ethanolkonzentrationen können auch Sukzessionen innerhalb der *Saccharomyces*-Art beobachtet werden. So scheinen verschiedene Stämme sich in ihrer Dominanz abzuwechseln, was auf unterschiedliche Ethanoltoleranzen der einzelnen Stämme zurückgeführt wird (Bauer und Pretorius 2000).

Wenn auch *Saccharomyces*-Spezies die beherrschenden Arten am Ende der Fermentation sind und oft zu diesem Zeitpunkt die einzige isolierbare Spezies darstellen, so können dennoch auch andere Spezies die Bedingungen der Gärung gut überleben und einen Einfluss auf den Wein haben. Stämmen dieser Spezies ist wieder die hohe Ethanoltoleranz gemein, die oft verbunden ist mit einer Resistenz oder Toleranz gegenüber Sulfit, was in der Weinpraxis als Konservierungsmittel eingesetzt wird (siehe auch 1.4). Diese Spezies gelangen entweder als Mitglied der Traubenflora oder über das Equipment des Winzers in den Most (Ocon et al 2010). So konnten Torija et al (2001) *Schizosaccharomyces pombe* isolieren und *Zygosaccharomyces*-Arten dominierten die Mikroflora auch noch am Ende der alkoholischen Gärung (Nisiotou et al 2007). Auch die Spezies *Pichia fermentans* und *Pichia membranifaciens* konnten in Weinen mit einem ähnlichen Titer wie *Saccharomyces bayanus* nachgewiesen werden (Fleet et al 1984).

Die Mikroflora im Weinkeller selbst kann auch bei der späteren Lagerung und Reifung des Jungweins eine Rolle spielen. Durch das Umfüllen des Weins vom Gärtank in Fässer oder Tanks für die Reifung kann der Wein in Kontakt zur Luft kommen, was zu einer Oberflächen-Flora von oxidativen Hefen wie *Candida* oder *Pichia* führen kann (Fleet 2003). Auch wenn der Wein vor seiner Lagerung nochmals geschwefelt wird, können Mikroorganismen wie *Pichia* spp. und *Candida* sp. nachgewiesen werden, die offensichtlich eine höhere Sulfitresistenz besaßen wie *Saccharomyces* sp. (Fleet et al 1984). Auch *Zygosaccharomyces*-Arten wie *Zygosaccharomyces bailii* konnten gefunden werden (Ocon et al 2010). Generell gilt, dass die Lagerung und Reifung von Weinen in Stahlgefäßen weniger Hefe-Kontaminationen mit sich bringt, als die Verwendung von Holzfässern oder ähnliches, da erstere leichter zu reinigen sind. Allerdings kann bei beiden Gefäßtypen Mikroflora überleben und in den abgefüllten Wein gelangen. Ein prominenter Vertreter dieser Art der Kontamination ist *Brettanomyces* spp. (Joseph et al 2007). Auch bei einer Reifung des Weins in Flaschen kann die Hefe-Flora immer noch aktiv sein, so etwa wieder *Brettanomyces* spp. (Coloun et al 2010).

Generell sei aber bemerkt, dass der im Fass gefundenen Zelltiter selten Zellzahlen über 10^5 Zellen/ml übersteigt. Vor der Abfüllung in die Flasche wird der Wein gewöhnlich gefiltert, was einer Minimierung der Mikroflora zur Folge hat. So zeigten Millet und Lonvaud-Funel (2000) die Effizienz

der Filtration anhand einer Reduktion der Hefezellzahl von 7×10^4 auf 37 Zellen/ml. Allerdings konnte auch hier gezeigt werden, dass diese wenigen Zellen in der Lage sind, nach Inkubation des Weines erneut auf 1×10^4 Zellen/ml anzuwachsen. Selbst in abgefüllten, verkaufsfertigen Weinen wurden Hefen der Gattungen *Brettanomyces*, *Candida* und *Pichia* nachgewiesen (Jensen et al 2009). Es konnten auch die Gattungen *Saccharomyces* und *Saccharomycodes* gefunden werden (Fleet 2003).

Der gegebene Überblick über die Diversität von Hefen in den verschiedenen Stadien der Weinbereitung zeigt die große Vielfalt an Hefe-Spezies, die von den unterschiedlichsten äußeren Faktoren wie auch von noch nicht erwähnten Interaktionen der Spezies untereinander abhängig ist. Zudem muss abschließend betont werden, dass die Studien dieser Populationen nur so umfassend sein können wie die Methoden, die angewendet wurden. Da alle mikrobiologischen und molekularbiologischen Analysemethoden insofern fehlerhaft sind, als dass sie vorkommende Spezies übersehen können oder bestimmten Spezies eine zu große Rolle zuweisen, kann die Diversitätsforschung immer nur als ein aktueller Stand der Wissenschaft gesehen werden.

1.2 Die Gärer bei der Weinbereitung: *Saccharomyces cerevisiae* und die Mitglieder der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe

Die bereits vorgestellte Gattung *Saccharomyces* ist selbstverständlich von gesteigertem Interesse für die mikrobiologische Weinforschung, da die Arten *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus* und *S. paradoxus* mit der Weinbereitung assoziiert sein können und zumindest eine der genannten Arten im gärenden Most dominant ist. Zudem ist *Saccharomyces pastorianus* eine zusätzliche Art dieser Gattung, die in fermentierten Getränken wie Bier die alkoholische Gärung durchführt. Diese vier Spezies sind Mitglieder einer Untergruppe der Gattung, die als *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe klassifiziert ist.

Der Begriff „*sensu stricto*“, lateinisch für „im strengen Sinne“, impliziert schon eine enge Verbundenheit der Mitglieder dieser Gruppe, was sich in engen Verwandtschaftsverhältnissen der Arten untereinander manifestiert. Diese geringe evolutionäre Distanz und die daraus resultierenden geringen physiologischen – und dann oft stammspezifischen – Unterschiede dieser Gruppe führten im letzten Jahrhundert zu immer wieder neu aufgestellten Artenlisten, die im Laufe der Zeit durch Beachtung neuerer Methoden und Definitionen verschiedenste Veränderungen durchlaufen haben (Tabelle 1.1, Rainieri et al 2003). Als besonders einschneidende Umstellung ist die 1984 etablierte Rückklassifizierung der bis dato anerkannten 21 Spezies der *sensu stricto*-Gruppe auf die einzig verbleibende Spezies *Saccharomyces cerevisiae* zu nennen (Barnett et al 1983). Gründe hierfür waren das Aufkommen vieler verschiedener morphologischer und physiologischer Tests sowie die

Erkenntnis, dass die Gruppe sich kaum oder gar nicht auf diese Weise differenzieren lässt und Unterschiede schon auf Stamm-Niveau vorhanden sind.

Tabelle 1.1: Überblick über die Veränderung der Spezies-Vielfalt der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe aufgrund von taxonomischen Studien (verändert nach Rainieri et al 2003). Dabei handelt es sich bis 1998 um Reklassifizierungen bereits isolierter Stämme, während 2000 und 2010 neu isolierte Stämme als *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudravzevii* und *S. aboriculus* eingeordnet wurden.

| 1912 | 1952 | 1970 | 1984 | 1998 | 2000 | 2010 |
|---|--|--|----------------------|---|---|---|
| <i>S. cerevisiae</i> <i>S. ellipsoideus</i> <i>S. turbidans</i> <i>S. ilicis</i> <i>S. vordermanni</i> <i>S. sake</i> <i>S. cartilagenosus</i> <i>S. batatae</i> <i>S. tokyo</i> <i>S. yeddo</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. paradoxus</i> | <i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. paradoxus</i> <i>S. cariocanus</i> <i>S. mikatae</i> <i>S. kudravzevii</i> | <i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. paradoxus</i> <i>S. cariocanus</i> <i>S. mikatae</i> <i>S. kudravzevii</i> <i>S. aboriculus</i> |
| <i>S. willianus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. validus</i> | <i>S. willianus</i> | | | | | |
| <i>S. coreanus</i> | <i>S. coreanus</i> | <i>S. coreanus</i> | | | | |
| <i>S. carlbergensis</i> <i>S. monoacensis</i> | <i>S. carlbergensis</i> <i>S. uvarum</i> <i>S. logos</i> | <i>S. uvarum</i> | | | | |
| <i>S. uvarum</i> <i>S. logos</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i> | <i>S. bayanus</i> <i>S. oviformis</i> <i>S. beticus</i> <i>S. pastorianus</i> | <i>S. bayanus</i> | | | | |
| | <i>S. heterogenicus</i> | <i>S. heterogenicus</i> | | | | |
| | <i>S. chevalieri</i> <i>S. fructuum</i> | <i>S. chevalieri</i> | | | | |
| | <i>S. italicus</i> <i>S. steineri</i> | <i>S. italicus</i> | | | | |
| | <i>S. globosus</i> | <i>S. globosus</i> | | | | |
| | | <i>S. aceti</i> <i>S. prostoserdovi</i> <i>S. oleaginosus</i> <i>S. olaceus</i> <i>S. capensis</i> <i>S. diastaticus</i> <i>S. hispaniensis</i> <i>S. inusitatus</i> <i>S. norbensis</i> <i>S. abuliensis</i> <i>S. cordubensis</i> <i>S. gaditensis</i> <i>S. hispalensis</i> | | | | |

Auch die heutigen physiologischen Tests können nur wenige Arten taxonomisch voneinander trennen wie etwa mit Hilfe der Untersuchung eines aktiven Fructose-Transports, den *Saccharomyces bayanus* und *S. pastorianus* besitzen und der bei *Saccharomyces cerevisiae* und *S. paradoxus* nicht vorhanden ist (Tornai-Lehoczki et al 1996b). Durch die Einführung molekularbiologischer Methoden in der Hefe-Taxonomie und -Phylogenie konnte ein differenzierterer Einblick in die Verwandtschaftsverhältnisse dieser Gruppe gegeben werden.

Die mikrobiologische Art-Definition bei Bacteria und Archaea gründet auf molekularbiologischen Markern wie die Sequenz der 16S ribosomalen DNA und auf Genom-Ähnlichkeiten nahverwandter Spezies, wobei die 16S rDNA sich um 3 % unterscheiden und eine DNA-DNA-Hybridisierung unter 70 % liegen sollte, um von einer distinkten Spezies sprechen zu können (Staley 2006). In der Hefe-Taxonomie ist das Äquivalent zur 16S r-DNA-Analyse der Sequenzvergleich der 5.8S ribosomalen DNA und ihrer flankierenden ITS-Regionen (ITS = internal transcribed spacer). Zwischen den Spezies der *sensu stricto*-Gruppe besteht allerdings innerhalb dieser Sequenzen eine so große Übereinstimmung, sodass eine Auflösung auf Art-Niveau oft problematisch ist (Montrocher et al 1998). Auch die Gegenüberstellung anderer Gene für ribosomale RNA wie etwa die 26S oder 18S rDNA erlaubt nicht in allen Fällen eine exakte Art-Eingrenzung (Naumov et al 2000a, Kawahata et al 2007), was zeigt, dass die die Gruppe umfassenden Arten nah miteinander verwandt sind. Im Gegensatz dazu zeigen die Spezies signifikante Unterschiede bei DNA-DNA-Hybridisierungen untereinander. So weisen die in dieser Gruppe phylogentisch entferntesten Arten *Saccharomyces cerevisiae* und *S. bayanus* eine Reassoziationsrate von nur 62 % und die nah verwandten Arten *S. cerevisiae* und *S. paradoxus* von immerhin 85 % auf (Kao et al 2010). Allerdings wurde zwischen den Arten *Saccharomyces paradoxus* und *S. cariocanus* eine 97 %ige Verwandtschaft in Bezug auf die DNA-Reassoziationsrate gemessen, wodurch diese Methode nicht alleine ausschlaggebend für eine Art-Bestimmung sein kann (Kurtzmann 2006).

Daher gilt hier zusätzlich die eukaryotische Spezies-Definition, wonach eine Art sexuell isoliert sein muss, somit fertile Nachkommen nur innerhalb der Art entstehen können und Hybridisierungen mit anderen Arten mindestens zu sterilen Nachkommen führen müssen (Naumov et al 2000a). Dieser Umstand gilt für alle Arten der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe, die offensichtlich einer postzygotischen Isolation unterworfen sind (Liti et al 2006, Greig 2009). Eine Ausnahme bildet hier *Saccharomyces pastorianus*, der als Hybrid aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* betrachtet wird, keine fertilen Nachkommen erzeugen kann und trotzdem als Spezies geführt wird (Dunn and Sherlock 2008). Diese Möglichkeit der Hybridisierung zweier Arten der *sensu stricto*-Gruppe sowie die grundsätzlich mögliche asexuelle Vermehrung dieser Hefen stellt für Liti et al (2006) ein generelles Problem im Spezies-Konzept dieser Gruppe dar. Die große Anzahl an

Gen-Identitäten und/oder -Homologien innerhalb der einzelnen Arten verweist zudem auf die junge, evolutionäre Geschichte der *sensu stricto*-Gruppe und macht sie dadurch zu einem Modellsystem für Evolution und Ökologie (Replansky et al 2008). Auf der anderen Seite können – ungeachtet von Gen-Homologien – große genomische Unterschiede schon auf Stamm-Niveau beschrieben werden, was nach Vaughan-Martini et al (1993) und Liti et al (2005) auf die industrielle Anwendung vieler Hefe-Spezies der *sensu stricto*-Gruppe zurückzuführen ist. Die Autoren postulieren eine hohe Mutationsrate in Form von mitotischer Rekombination resultierend in Transpositionen und anderen genomischen Rearrangements durch eine ständige Kultivierung und eine hohe Replikationszahl in der industriellen Anwendung. Hinzu käme eine Exposition von diversen Stressfaktoren, die die Mutationen zusätzlich unterstützen.

Ungeachtet dieser Industrie-Stämme wurden die Arten *Saccharomyces cariocanus*, *S. mikatae* und die neu beschriebene Art *S. aboricolus* bisher nur aus natürlichen Habitaten isoliert. *Saccharomyces mikatae* und *S. aboricolus* stammen dabei aus dem asiatischen Raum und gelten nach bisherigen Erkenntnissen als endemische Arten (Sampaio und Gonzalves 2008). Beide wurden von Baumrinden, anderem Pflanzenmaterial oder aus Bäume umgebenden Böden isoliert (Naumov et al 2010). Im Gegensatz dazu wurde *Saccharomyces cariocanus* bisher nur in Assoziation mit Fruchtliegen in Brasilien gefunden (Naumov et al 2000a). Diese Art ist insofern kontrovers, als dass sie große genetische Ähnlichkeiten zur Spezies *Saccharomyces paradoxus* aufweist und zudem nach Hybridisierung mit dieser Art zwischen 77 bis 81 % vitale Sporen erzeugt, bei denen auch keine genetischen Defekte wie Aneuploidie gefunden wurden (Liti et al 2006). Dieser Widerspruch zur eukaryotischen Speziesdefinition veranlasste Liti et al (2005) *Saccharomyces cariocanus* als eine Subpopulation von *S. paradoxus* zu betrachten. Auch *Saccharomyces kudriavzevii* wurde erst 2000 zusammen mit *S. mikatae* und *S. cariocanus* beschrieben (Naumov et al 2000a) und galt ebenfalls als endemische Art für Japan. Sampaio und Gonzalves konnten allerdings 2008 das Vorkommen dieser Art auch an portugiesischen Eichenrinden aufzeigen, wengleich leichte genomische Varianzen zu der asiatischen Gruppe bestehen. Ferner treten zunehmend aus Most und Wein isolierte *Saccharomyces*-Stämme auf, die als Hybride Teile des Genoms von *S. kudriavzevii* enthalten (etwa Gonzalez et al 2006, Lopandic et al 2007).

Auch *Saccharomyces paradoxus* wurde zumindest schon einmal gesichert aus Wein isoliert (Redzepovic et al 2002) und wird seitdem auch als Starterkultur für die Wein-Industrie diskutiert (Arroyo-Lopez et al 2010, Orlic et al 2010, Eschstruth und Divol 2011). Häufiger wird diese Spezies aber in ihrem natürlichen Habitat Wald, besonders an Eichenrinden, auf der ganzen Welt gefunden (Sweeney et al 2004, Zhang et al 2010), weshalb ihr – vor Entdeckung drei weiterer Spezies 2000 –

der Status als alleinige „natürliche“ Spezies in der *sensu stricto*-Gruppe zugeschrieben wurde (Vaughan-Martini und Martini 1995).

Die drei restlichen Spezies der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe sind dagegen stark mit der Lebensmittelherstellung und besonders mit der Produktion alkoholhaltiger Getränke verknüpft.

So ist *Saccharomyces pastorianus* die Spezies, die für die Herstellung von untergärigem Lager-Bier verwendet wird (Saerens et al 2010). Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei *Saccharomyces pastorianus* nicht um eine Spezies, die alle Spezies-Defintionen erfüllt, da sie eine Hybrid-Natur aus den Genomen von *Saccharomyces cerevisiae* und *S. bayanus* aufweist (Bond 2009). Die Tatsache, dass obergärige Bierfermentationen in der Regel von *Saccharomyces cerevisiae* aber nie von *S. pastorianus* durchgeführt werden und die Adaption an tiefe Fermentationstemperaturen von *S. pastorianus*, veranlasste Dunn und Sherlock (2008) zu der Spekulation, dass der Ursprung dieser unmittelbaren, durch Hybridisierung erfolgten Speziation von *Saccharomyces pastorianus* mit dem Ursprung von Lager-Bier verbunden ist. Dieser Ursprung könnte im 16. Jahrhundert in Bayern stattgefunden haben, als aufgrund von Infektionsgefahren das Bierbrauen im Sommer verboten und so ausschließlich im Winter bei tiefen Temperaturen durchgeführt wurde. Ferner gilt *Saccharomyces pastorianus* als eine heterogene Spezies mit genomisch variablen Stämmen. So zeigten DNA-DNA-Hybridisierungsversuche von *S. pastorianus*-Stämmen mit *S. cerevisiae* bzw. *S. bayanus* ein breites Spektrum von 19 bis 71 % bzw. 67 bis 78 % Reassoziaton (Martini und Martini 1987).

Die ökologische Nische in Brauereien und im speziellen bei untergärgigen Bieren wird auch von der Spezies *Saccharomyces bayanus* besetzt, wobei ihr Vorkommen deutlich seltener ist wie das von *S. pastorianus* und *S. cerevisiae* (Jespersen et al 2000). Häufiger ist diese Hefe mit der Weinherstellung assoziiert und wurde schon aus Weinkellereien aus französischen Anbaugebieten, aus Italien, Spanien, Slowakai, Moldawien und Ungarn isoliert und beschrieben (Naumov et al 2000b, Sipiczki et al 2001, Naumov et al 2002, Demuyter et al 2004). Die Art *Saccharomyces bayanus* vereint ferner zwei Gruppen, die vor der Zusammenlegung zu einer Art in die Spezies *S. bayanus* und *S. uvarum* aufgeteilt waren. Diese Auftrennung wird von einigen Forschern durch den Zusatz „var. *bayanus*“ bzw. „var. *uvarum*“ aufrechterhalten. Diese zwei „Varianten“ zeigen zwar hohe Übereinstimmungen in ihrer DNA-Homologie, scheinen aber auch tatsächlich zumindest teilweise genetisch isoliert, da Paarungen untereinander nur zu semifertilen Hybriden führen (Naumov et al 2000b). Zudem spaltet sich die Spezies in eben diese beiden Gruppen, wenn die vorherrschenden Habitate betrachtet werden. So zählen zur Gruppe *Saccharomyces bayanus* var. *bayanus* der Typstamm der Spezies sowie Isolate aus Brauereien, während *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*-Stämme bisher nur im Wein nachgewiesen wurden (Naumova et al 2011). Durch Untersuchungen verschiedener Gene bei

den beiden Typen zeigten Nguyen und Gaillardin (2005) nicht nur die Unterschiedlichkeit, sondern stellten auch die Hypothese auf, dass *Saccharomyces bayanus* var. *bayanus* ein Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. bayanus* var. *uvarum* darstellt und warben für eine Wiedereinführung der Art *Saccharomyces uvarum*. Dies ist allerdings bis heute noch nicht geschehen.

Saccharomyces cerevisiae ist die wohl prominenteste Vertreterin der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe, was nicht nur in ihrer großen Dominanz in der Wein-, Bier- und Brotherstellungen begründet ist, sondern auch in ihrer Rolle als eukaryotischer Modell-Organismus in der Grundlagenforschung.

Kontrovers wurde und wird immer noch der Ursprung dieser Spezies diskutiert. Vaughan-Martini und Martini (1995) sehen in *Saccharomyces cerevisiae* keine natürliche Spezies, sondern eine anthropogen herbeigeführte. Gründe hierfür sehen sie in der vermehrten Beschreibung der Art an von Menschenhand geschaffenen Orten wie etwa dem Weinkeller und der im Gegensatz dazu fast nicht vorhandenen natürlichen Flora auf der Traube (Mortimer und Polsinelli 1999). Allerdings konnten Sampaio und Gonzalves (2008) *Saccharomyces cerevisiae* an Eichenrinde nachweisen und dies mit einer deutlich höheren Rate als an Trauben, wodurch *S. cerevisiae* ein natürliches Habitat zugeordnet werden konnte. *Saccharomyces cerevisiae* könnte demnach ihren Ursprung in einem natürlichen Habitat gefunden haben, dann aber eine anthropogene Domestifizierung erfahren haben, die zu den heutigen Stämmen in der Lebensmittelindustrie führen (Fay und Benavides 2005, Sicard und Legras 2011). Generell zeigen die Laborstämme von *Saccharomyces cerevisiae* ein ähnliches Chromosomenprofil, während die Gruppe der Wild-Stämme diverser ist, was Perez-Ortin et al (2002) auf chromosomale Rearrangements zurückführen. Zudem zeichnen sie sich nicht selten durch eine Polyploidie aus. Insgesamt können drei Cluster innerhalb dieser Wild-Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* ausgemacht werden, die mit den Habitaten „Wein“, „Bier“ und „Brot“ verknüpft sind. In die Gruppe „Wein“ werden 95 % aller aus Weinfermentationen isolierten Stämme weltweit eingeordnet (Legras et al 2007), was Sicard und Legras (2011) zu der Vermutung bringt, dass diese Stämme einen gemeinsamen Ursprung besitzen und dann mit Hilfe der menschlichen Zivilisation expandierten. Weiter wird der anthropogene Einfluss auf die Evolution von diesen Stämmen deutlich, als dass bestimmte phänotypische Eigenschaften von *Saccharomyces cerevisiae* in der Weinbereitung direkt gekoppelt sind mit dem Handwerk des Winzers. So weisen zum Beispiel eine große Anzahl dieser Hefe-Stämme im Gegensatz zu Wildstämmen Mutationen auf, die zu einer verbesserten Toleranz gegenüber Sulfit führen (Yuasa et al 2004).

Die genannten Beispiele zeigen die Komplexität der Art-Einteilung und -Begrenzung in der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe, aber auch das Interesse an einer definierten Art-Benennung. Die eindeutige Charakterisierung und so taxonomische Einordnung mit Hilfe von DNA-DNA-

Hybridisierungs- und Kreuzungs-Versuchen ist allerdings kompliziert und zeitintensiv. Daher gibt es ein weites Feld an Methodenforschung, um diese Spezies schneller und effizienter auflösen und einordnen zu können. Hierbei ist das so genannte Karyotyping, die Darstellung von Chromosomenprofilen mittels Pulsfeldelektrophorese, als eine in der Pilz-Taxonomie oft verwendete Methode zu nennen (Vaughan-Martini et al 1993, Tornai-Lehoczki und Dlačny 1996). Auch wurden Zymogramm-Techniken zur Detektion von spezifischen Isoenzymmustern nach elektrophoretischer Auftrennung als taxonomisches Mittel untersucht (Naumova et al 2003). Die meisten Systeme basieren allerdings auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), um bestimmte DNA-Sequenzen zu amplifizieren. So können dann durch verschiedene Restriktionsenzyme spezies- oder zumindest gruppen-spezifische Muster kreiert werden, die eine Zuordnung möglich machen (Redzepovic et al 2002). Weiter wurden Sequenz-Analysen verschiedener Gene auf ihre Unterscheidbarkeit hin untersucht (Montrocher et al 1998, Nardi et al 2006, Huang et al 2009) sowie die Kombination aus verschiedenen Genen (Kurtzman und Robnett 2003). Für einige Arten wie *Saccharomyces cerevisiae* und *S. bayanus* wurden zudem Primer für einen spezifischen PCR-Nachweis entwickelt (Josepa et al 2000, Torriani et al 2004, Huang et al 2008, de Melo Pereira et al 2010). Oft wird eine Fingerprinting-Methode angewendet, in der zufällig ausgewählte Primer ein spezies-spezifisches Bandenmuster erzeugen sollen. Diese so genannten RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) erlaubt Einblicke das gesamte Genom betreffend (Fernandez-Espinar et al 2003). Allerdings muss das System so gewählt sein, dass es sensitiv genug ist für eine Diskriminierung auf Art-Niveau, aber gleichzeitig nicht zu empfindlich, wodurch ein individuelles Muster auf Stamm-Ebene erzeugt würde.

1.3 Die natürliche Hefeflora: Das Risiko des Qualitätsverlustes

Natürlich sind die *Saccharomyces*-Spezies für die Weinbereitung unerlässlich, da sie verantwortlich für den größten Anteil an Alkohol im späteren Wein sind. Nichtsdestotrotz spielen auch die anderen, die so genannten „Wild-Hefen“, ihr Stoffwechsel und die dabei entstehenden Produkte eine Rolle bei der vielschichtigen Aromavielfalt des fertigen Weines. So können so genannten „Spontan-Gärungen“ mit Hilfe der natürlichen Mikroflora zu einem komplexeren Aromaprofil führen als mit *Saccharomyces*-Starterkulturen gesteuerte Fermentationen (Ciani et al 2010).

Der durch Spontangärung angestrebten Qualitätssteigerung der Weine steht die Gefahr von unerwünschten Effekten gegenüber. Diese können ebenfalls von der natürlichen Mikroflora und ihren Stoffwechselprodukten ausgelöst werden, zeigen sich zumeist in gustatorischen, olfaktorischen und visuellen Abstufungen der Weine und werden allgemein als „Weinfehler“

betrachtet. Die diese Weinefehler verursachende Mikroflora ist daher ein weiteres Feld in der mikrobiologischen Weinforschung.

Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass eine Einstufung von Hefen als „Schadhefen“ *per se* oft nicht möglich ist. So können etwa Organismen zwar das Potential, weinverderbend zu sein, mitbringen, aber in der Praxis so selten auftreten, dass die von ihnen ausgehende Gefahr gering bleibt. Weiter können bestimmte Stoffwechselprodukte in geringen Konzentrationen das Aroma des Weines steigern und erst ab einer bestimmten Menge zur Ungenießbarkeit führen. Zusätzlich wird diskutiert, ob Hefen schon dann als Schadhefen gelten, wenn sie etwa durch Nährstoff-Freisetzung das Wachstum von schädlichen Bakterien fördern (Loureiro und Malfeito-Ferreira 2003).

Direkt an den Primärstoffwechsel der Hefen gekoppelt sind Produkte wie Acetat, Acetaldehyd und ähnliches. So kann Wein mit einer Essigsäurekonzentration von über 1,08 g/l in Weißwein und 1,2 g/l in Rotwein nicht mehr zum Verkauf angeboten werden (Dittrich und Großmann 2005). Allgemein werden für hohe Acetat-Mengen die ebenfalls in Most und Wein vorkommenden Essigsäurebakterien verantwortlich gemacht, aber auch die natürliche Hefe-Flora mit Vertretern wie *Hanseniaspora* spp. können in größeren Mengen Acetat bilden (Granchi et al 2002, Loureiro und Malfeito-Ferreira 2003). Auch eigene Analysen von mit *Hanseniaspora uvarum* kultiviertem Traubensaft bestätigten eine hohe, stammabhängige Acetatproduktion zwischen 1,9 und 3 g/l. Ferner konnte hier auch *Brettanomyces bruxellensis* als Essigsäurebildner ausgemacht werden, wenn auch in vergleichbar geringeren Konzentrationen um die 1 g/l (Vigentini et al 2008). Dittrich und Großmann (2005) zählen zudem auch *Zygosaccharomyces* spp., *Metschnikowia pulcherrima* und *Saccharomyces ludwigii* zu den potentielle Acetat-Produzenten. Erhöhte Acetaldehyd-Mengen in Most und Wein spielen besonders in Hinblick auf den Einsatz des Konservierungsmittels SO₂ eine Rolle. Acetaldehyd vermag Schwefeldioxid zu binden und so seine antimikrobielle Wirkung zu verringern, wodurch weinverderbende Mikroorganismen besser überleben können (Herrero et al 2003). Zudem wirkt Acetaldehyd carcinogen (Lachenmeier et al 2009). Hefen akkumulieren Acetaldehyd während der alkoholischen Gärung, wenn ihre Redox-Balance gefährdet ist. Ferner können oxidative Hefen wie *Pichia* spp. und *Candida* spp. entstandenes Ethanol oxidieren und so Acetaldehyd erzeugen (Fleet 2003).

Für Bildung von Estern wie Ethylacetat und Isoamylacetat sind sowohl *Saccharomyces cerevisiae* als auch Wildhefen verantwortlich. Während diese in geringen Konzentrationen als fruchtig und positiv beurteilt werden, können sie ab einem Schwellenwert von 7,5 mg/l als stechender Lösungsmittelton empfunden werden (Bartowsky und Pretorius 2009). Rojas et al (2001) stellten eine hohe Produktion verschiedener Acetat-Ester bei *Pichia anomala* und *Hanseniaspora guilliermondi* fest

und auch bei *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum* und *Candida krusei* konnten erhöhte Konzentrationen gemessen werden (Guerzoni und Marchetti 1987).

Als weitere von Hefen verursachte Fehleraromen sind der Mäuselton, der Pferdeschweiß-Ton als auch allgemeine schwefelhaltige Verbindungen zu nennen. Der Mäuselton resultiert aus der Bildung von den Stickstoffverbindungen 2-Acetyltetrahydropyridin und 2-Acetyl-1-Pyrrolin (Snowdon et al 2006) und ist schon in geringsten Mengen (1 bis 2 µg/l) als unangenehm wahrnehmbar (Bartowsky und Pretorius 2009). Besonders Hefen der Gattung *Brettanomyces* werden mit diesen Stoffwechselprodukten in Verbindung gebracht (Heresztyn 1986). Ebenfalls sind in der Gattung *Brettanomyces* die Hauptverursacher des Pferdeschweiß-Tons zu finden, weshalb dieser nicht selten auch „Brett-Ton“ genannt wird. Hierbei werden durch die Hefe natürlich vorkommende Hydroxycimtsäuren wie p-Cumarsäure oder Ferulasäure decarboxyliert und reduziert, wodurch 4-Ethylphenol oder 4-Ethylguajakol entstehen. Diese enzymatische Reaktion wurde nicht nur bei *Brettanomyces*, sondern auch bei anderen weinrelevanten Hefen wie *Pichia guilliermondii* und *Candida* spp. festgestellt (Röder 2007). Schwefelverbindungen verursachen sensorische Abstufungen des Weines und gelten daher als Weinfehler. Hinzu kommt der geringe Geruchsschwellenwert, den diese Verbindungen im Wein besitzen (Bartowsky und Pretorius 2009). Obwohl dieser Fehler analytisch gut untersucht ist (Swiegers und Pretorius 2007) – auch in Hinblick auf Starterkulturen von *Saccharomyces cerevisiae* – ist über die Bildung dieser Produkte durch Wildhefen wenig bekannt. Allerdings konnten Moreiera et al (2008) die Bildung von Schwefelverbindungen durch *Hanseniaspora*-Spezies zeigen.

Neben qualitätsmindernden Stoffwechselprodukten kann auch das Wachstum von Hefen selbst als negativ wahrgenommen werden. Hierbei sind besonders Kontaminationen in bereits abgefüllten Weinen zu nennen, wo Wachstum zu Eintrübungen und Sedimentbildungen führen. Ferner führt ein Wiedereinsetzen der Gärung dieser Kontaminanten zu einer Reduktion der erwünschten Restsüße, als auch zu einer Gasbildung. Hefen, die zu diesem Zeitpunkt der Weinbereitung noch Stoffwechsel betreiben können, zeichnen sich wie schon in 1.1 beschrieben durch eine hohe Ethanol- und Sulfit-Toleranz aus. Hier sind vor allen Dingen *Zygosaccharomyces*-Arten, *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces ludwigii* zu nennen. Auch gilt zu diesem Zeitpunkt *Saccharomyces cerevisiae* als weinverderbend (Dittrich und Großmann 2005). Die Exposition des Weines an Luft – etwa bei der Abfüllung – kann zu einem Wachstum von oxidativen Hefen wie *Pichia* spp., *Candida* spp. und *Metschnikowia* spp. führen. Diese so genannten Kahlhefen bilden dann einen Film auf der Oberfläche des Weines und können die schon angeführten Stoffwechselprodukte bilden (Fleet 2003).

1.4 Verhinderung von Weinfehlern: Monitoring und Kontrolle von Mikroorganismen

Aus langer Tradition heraus wird die Kontrolle von unerwünschten Mikroorganismen durch das Schwefeln – dem Zusatz von Schwefeldioxid – von Most und Wein forciert. Hierbei ist nicht nur die mikrobizide Wirkung von SO_2 hervorzuheben, sondern auch andere positive Eigenschaften wie seine Wirkung als Antioxidants und der somit herbeigeführten Farbstabilität des Weines (Romano und Suzzi 1993). Die Dossage von Schwefeldioxid ist insofern schwierig, als dass die eingesetzte Menge nicht der tatsächlich wirkenden Menge entspricht. So steigt mit steigendem pH-Wert die Dissoziation von SO_2 zu Hydrogensulfit (HSO_3^-) und Sulfit (SO_3^{2-}). Da aber nur die molekulare Form von SO_2 eine biozide Wirkung zeigt, ist der Effekt in säurearmen Weinen geringer als bei Weinen mit einem pH-Wert unterhalb von 3,2 (Herrero et al 2003, Dittrich und Großmann 2005). Weiter binden Moleküle in Most und Wein Schwefeldioxid und minimieren zusätzlich seine Verfügbarkeit und Wirkung. Hierbei ist das schon bereits erwähnte Acetaldehyd zu nennen sowie Pyruvat und Ketoglutarat (Funk 2009).

Die Hemmung von Hefen durch Schwefeldioxid ist sehr unterschiedlich und ist nicht nur von Spezies zu Spezies variabel, sondern auch eine stammspezifische Eigenschaft. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die am Beginn der Gärung vorherrschenden Hefen empfindlicher gegenüber SO_2 sind als etwa *Saccharomyces cerevisiae*, die je nach Stamm eine SO_2 -Toleranz von über 1200 mg/l aufweisen können (Lustrato et al 2003). Dennoch zeichnen sich auch Wild-Hefen durch eine große Resistenz gegenüber dem Schwefeln aus, wie etwa Spezies der Gattungen *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces* und *Saccharomyces* (Dittrich und Großmann 2005).

Die Nachteile des Einsatzes von Schwefeldioxid werden komplementiert von möglichen gesundheitsschädlichen Folgen, weshalb die gesetzlich festgelegte Höchst-Dossage im Laufe der letzten 30 Jahre zunehmend reduziert wurde (Dahl et al 1986, Lustrato et al 2003) und zunehmend nach Alternativen oder zumindest Verstärkungen gesucht werden.

Für eine Kontrolle weinschädigender Bakterien ist seit Herbst 2001 Lysozym aus Hühnereiweiß bis zu maximal 500 mg/l in der Weinbereitung zugelassen (EG-VO 1622/2000). Dieses Enzym greift die Zellwand von grampositiven Bakterien an, indem die glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin des Peptidoglykans hydrolysiert wird. Die Folge ist ein Abbau der Zellwand und eine damit einhergehende Zelllyse des Bakteriums (Imoto 2001). Durch diese Wirkung soll Lysozym etwa einen unerwünschten Säureabbau durch das Milchsäurebakterium *Oenococcus oeni* verhindern oder beenden, als auch andere qualitätsmindernde Milchsäurebakterien während der Weinbereitung hemmen und so Most und Wein mikrobiologisch stabilisieren (Weiland, 2001).

Ein enzymatisches Pendant für die Wachstumskontrolle von Hefen gibt es bisher noch nicht auf dem Weintechnologie-Markt. Enzyme, die die Zellwand von Hefen angreifen können, ergeben sich aus der Zusammensetzung der Zellwand.

Diese macht etwa 10 bis 25 % der Zellmasse aus und besteht hauptsächlich aus Polysacchariden und einem geringeren Anteil verschiedener Proteine (10 bis 15 % der Zellwandtrockenmasse) (Aguilar-Uscanga und Francois 2003). Die polysaccharidalen Makromoleküle wiederum umfassen verschiedene Glucane wie β -1,3- und β -1,6-Glucan, Chitin sowie Mannoproteine. Während β -1,3-Glucan und Mannoproteine den größten prozentuellen Anteil der Zellwand ausmachen, kommen β -1,6-Glucan und Chitin in weit aus geringeren Mengen vor (β -1,6-Glucan: 5 bis 10 %, Chitin: 1,5 bis 6 % der Zellwandmasse) (Klis et al 2006).

Auch wenn die Menge der beteiligten Polymere überschaubar ist, so erfährt die Zellwandstruktur doch eine gewisse Komplexität, was auch begründet ist in den vielseitigen Wechselwirkungen der Einzelkomponenten (Abbildung 1.1).

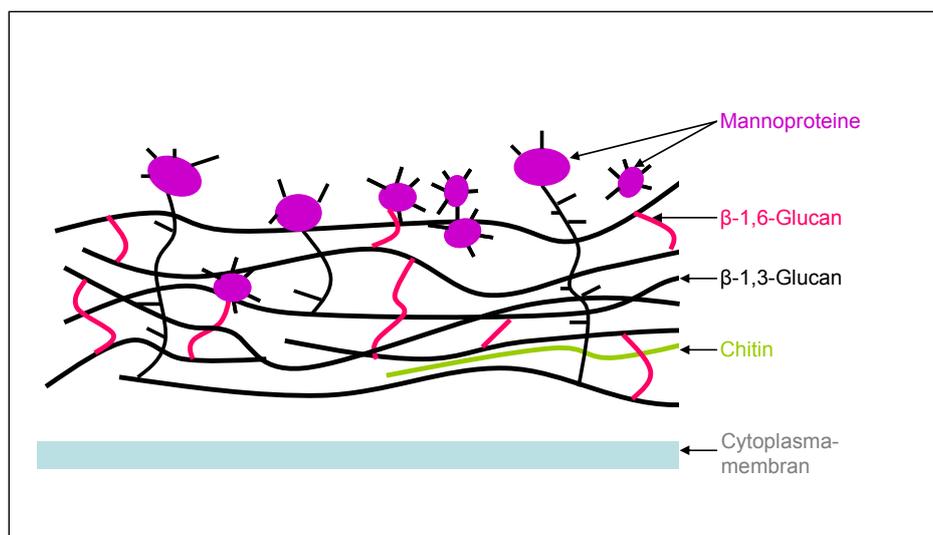


Abbildung 1.1 Schematischer Überblick über die Struktur der Zellwand von Hefen (nach Schreuder et al 1996). Mannoproteine bilden eine äußere, der Umwelt zugewandte Schicht, die vernetzt ist mit einer inneren Matrix bestehend aus langkettigen β -1,3-Glucanen und kurzkettenigen β -1,6-Glucanen sowie einem geringen Anteil an Chitin.

So bilden einzelne Stränge von aus etwa 1500 Monomeren bestehenden, wenig verzweigten β -1,3-Glucanen das innere Zellwand-Gerüst, wobei diese Glucane untereinander durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Dieses Geflecht verleiht der Zellwand ihre Elastizität und ist gleichzeitig ein Ort der Vernetzung mit den anderen Polymeren (Klis et al 2002). Diese Verbindung der Polymere wird auch besonders durch die deutlich kleineren β -1,6-Glucan-Polymere ermöglicht, die durch ihren hohen Verzweigungsgrad die Hauptkomponenten der

Zellwand miteinander verknüpfen (Lipke und Ovalle 1998). In diesem inneren Zellwandring kommen auch lineare Ketten aus β -1,4-verknüpften N-Acetylglucosamin-Resten (Chitin) vor. Allerdings befindet sich der größte Anteil dieses Chitins an den Sprossnarben der Hefe-Zellwand, sodass diesem Polymer eine geringere Rolle in der Zellwandstabilität zugeordnet werden muss (Kollar et al 1995).

Auf diesem dreidimensionalen Netzwerk aus Glucanen ist eine Schicht aus stark glykosylierten Mannoproteinen gelagert, die damit die Zelloberfläche darstellen und somit den direkten Kontakt zu der Umgebung und anderen Zellen (Lipke und Kurjan 1992). Gleichzeitig ist diese Schicht auch eine Barriere und verringert die Durchlässigkeit der Zellwand (de Nobel et al 1990a).

Der Kohlenhydratanteil dieser Proteine beträgt über 90 %, wobei es sich hierbei um α -1,6-verknüpfte Mannose-Einheiten handelt, die teilweise auch α -1,2- bzw. 1,3-Verzweigungen aufweisen. Der Proteinanteil der Mannoproteine ist zumeist über Serin oder Threonin an das Mannan gebunden. Die Mannoproteine selbst sind wiederum verbunden mit dem Glucan-Netzwerk im Inneren der Zellwand etwa durch O-glykosidische Bindungen an β -1,6-Glucanen. Auch direkte Bindungen an β -1,3-Glucane sind möglich (Klis et al 2002).

Ziele für einen Enzymangriff, der zu einem Zusammenbruch der Zellwand führt und somit zu einer Zellyse von Hefen, sind demnach vor allen Dingen die Glucane der Zellwand. Da hierbei das β -1,3-Glucan nicht nur den größten Anteil ausmacht, sondern zudem die wichtigste Funktion in der Stabilität übernimmt, scheint eine enzymatische Hydrolyse dieser Komponente als besonders vielversprechend, wenngleich auch die Spaltung der β -1,6-Glucane zu Zellysen führen kann (Gacto et al 2000). Ferner kann ein Abbau der Mannoproteinschicht durch Mannanasen, Mannosidasen und/oder Proteasen ebenfalls die Zellwandstruktur stören (Scott und Schekman 1980).

1.5 Ziele der Arbeit

Die Arbeit verfolgt im Hinblick auf die Hefeflora in der Weinbereitung mehrere Absichten.

Ein zentraler Punkt stellt die taxonomische Einordnung von *Saccharomyces*-Spezies in der Weinbereitung dar. Die Einordnung von nahverwandten und schwer zu unterscheidenden Spezies der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe sollte mittels eines Fingerprinting-Verfahrens verfolgt werden, um ein effektives, robustes und einfaches System für die Klassifizierung zu etablieren. Ferner sollte mit Hilfe dieses Systems bisher noch nicht klar identifizierte Stämme dieser Gruppe untersucht werden.

Durch die Entwicklung eines quantitativen PCR-Systems sollten Hefen der Gattungen *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* und *Brettanomyces* nicht nur erfasst, sondern auch ihr Zelltiter bestimmt werden. Die Anwendung eines solchen Verfahrens bietet ein schnelles und einfaches

Monitoring-System für die schnelle Detektion von Weinschädlingen (*Hanseniaspora* spp. und *Brettanomyces* spp.), aber auch die Kontrolle des erwünschten Wachstums von *Saccharomyces* spp. während der Weinbereitung. Das System sollte auf seine Durchführbarkeit im Milieu Most/Wein überprüft werden sowie mit herkömmlichen Zellzahl-Bestimmungen verglichen werden. Weiter war eine hohe Sensitivität gegenüber auch geringen Zellzahlen gewünscht.

Die Bekämpfung von unerwünschten Hefen in der Weinbereitung stellt ein weiteres Ziel dieser Arbeit dar. Hierfür wurde ein Screening nach zelllytischen Enzymen produzierenden Mikroorganismen durchgeführt. Der anschließenden Reinigung des lytischen Enzyms folgte eine Charakterisierung des Enzyms auch unter dem Einfluss von möglichen inhibitorischen Stoffen in Most und Wein. Daraufhin wurde die Wirkung des Enzyms auf die Zellwand von Hefen mit verschiedenen Methoden untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Chemikalien von folgenden Herstellern wurden benutzt:

- Acrylamid/Bisacrylamid Roth, Karlsruhe
- Agar Hartge Ingredients, Hamburg
- Aminocaprinsäure Sigma-Aldrich, Steinheim
- Ammoniumpersulfat Roth, Karlsruhe
- Anisaldehyd Merck, Darmstadt
- Äpfelsäure Serva, Heidelberg
- Azocasein Fluka, Buchs, Schweiz
- Borsäure Roth, Karlsruhe
- Butanol Merck, Darmstadt
- Calciumcarbonat Roth, Karlsruhe
- Calciumchlorid Merck, Darmstadt
- Casein Sigma-Aldrich, Steinheim
- Catechin Sigma-Aldrich, Steinheim
- Citronensäure Roth, Karlsruhe
- Coomassie Brillantblau R250 Roth, Karlsruhe
- Diammoniumhydrogencitrat Merck, Darmstadt
- Dikaliumhydrogenphosphat Roth, Karlsruhe
- Dimethylthiazotetrazolium Sigma-Aldrich, Steinheim
- Dinatriumhydrogenphosphat Roth, Karlsruhe
- 3,5-Dinitrosalicylsäure Sigma-Aldrich, Steinheim
- Eisensulfat Merck, Darmstadt
- Essigsäure Roth, Karlsruhe
- Ethanol Roth, Karlsruhe
- Ethanol, vergällt Mundo, Mainz
- Ethidiumbromid Roth, Karlsruhe
- Ethylendiamintetraacetat Roth, Karlsruhe
- Ferulasäure Roth, Karlsruhe
- Fleischextrakt Merck, Darmstadt
- Fructose Roth, Karlsruhe

- Gallussäure Roth, Karlsruhe
- Glucose Roth, Karlsruhe
- Glycerin Roth, Karlsruhe
- Glycin Roth, Karlsruhe
- Hefeextrakt (Typ 900) Hartge Ingredients, Hamburg
- Isopropanol Roth, Karlsruhe
- Kaliumchlorid Roth, Karlsruhe
- Kaliumdihydrogenphosphat Roth, Karlsruhe
- Kaliumdisulfit Merck, Darmstadt
- Kalium/Natrium-Tartrat Roth, Karlsruhe
- Kaliumnitrat Merck, Darmstadt
- Kupfersulfat Roth, Karlsruhe
- Magnesiumchlorid Roth, Karlsruhe
- Magnesiumsulfat Roth, Karlsruhe
- Mangansulfat Roth, Karlsruhe
- Mannitol Roth, Karlsruhe
- Methanol Roth, Karlsruhe
- Natriumacetat Roth, Karlsruhe
- Natriumazid Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid Roth, Karlsruhe
- Natriumdihydrogenphosphat Roth, Karlsruhe
- Natriumdodecylsulfat Roth, Karlsruhe
- Natriumnitrat Merck, Darmstadt
- Natriumsulfit Roth, Karlsruhe
- Natronlauge Roth, Karlsruhe
- Natronwasserglas Roth, Karlsruhe
- Pepton aus Casein (tryptisch verdaut) Roth, Karlsruhe
- Pepton aus Fleisch Roth, Karlsruhe
- Phenazinmethosulfat Sigma-Aldrich, Steinheim
- Phenol Roth, Karlsruhe
- Phenylmethylsulfonylfluorid Sigma-Aldrich-Aldrich
- Phosphorsäure Roth, Karlsruhe
- Salzsäure Roth, Karlsruhe

- Schwefelsäure Roth, Karlsruhe
- SDS Roth, Karlsruhe
- Natrium-lauroyl-sarcosinat Roth, Karlsruhe
- Sorbitol Merck, Darmstadt
- β -Mercaptoethanol Sigma-Aldrich, Steinheim
- Tetramethylethylendiamin Roth, Karlsruhe
- Toluol Roth, Karlsruhe
- Tomatensaft Neus, Freinsheim
- Traubensaft (Lindavia) Tucano, Bad Überkingen
- Trichloressigsäure Roth, Karlsruhe
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Roth, Karlsruhe
- Triton X – 100 Roth, Karlsruhe
- Tween 80 Merck, Darmstadt
- Zinksulfat Merck, Darmstadt

2.2 Biochemikalien, Enzyme und Kits

Biochemikalien, Enzyme und Kits von folgenden Herstellern wurden benutzt:

- PCR-Puffer (10x) Peqlab, Erlangen
- DNA-Probenpuffer Fermentas, St. Leon-Rot
- Agarose peqGold Standard-Agarose Peqlab, Erlangen
- Agarose, low melting Roth, Karlsruhe
- Agarose für PFGE Peqlab, Erlangen
- Anodenflüssigkeit 3 für IEF Serva, Heidelberg
- CalcoFluor-White M2R Sigma-Aldrich, Steinheim
- BC-Assay protein quantification kit Uptima, Monteluçon, Frankreich
- Bovines Serumalbumin (BSA) Roth, Karlsruhe
- Carboxymethyl (CM)-Cellulose Sigma-Aldrich, Steinheim
- Carboxymethyl (CM)-Pachyman Megazymes, Irland
- Cylcoheximid Sigma-Aldrich, Steinheim
- Dextran Roth, Karlsruhe
- DNA-Standard: „GeneRuler DNA Ladder Mix“ Fermentas, St. Leon-Rot
- DNeasy Blood & Tissue Kit Qiagen, Hilden
- dNTP-Mix Peqlab, Erlangen

- Enhancer Solution für PCR Peqlab, Erlangen
- HefaCell® Erbslöh, Geisenheim
- Kartoffel-Extrakt-Glucose-Bouillon Roth, Karlsruhe
- Kathodenflüssigkeit 10 für IEF Serva, Heidelberg
- Laminarin aus *Laminaria digitata* Sigma-Aldrich, Steinheim
- Lysozym aus Hühnereiweiß Sigma-Aldrich, Steinheim
- Lyticase aus *Arthrobacter luteus* Sigma-Aldrich, Steinheim
- Mastermix "RealMasterMix SYBR ROX" 5 Prime, Hamburg
- Oligonucleotide Eurofins MWG, Ebersberg
- PAGE Silver™-Silver Staining Kit Fermentas, St. Leon-Rot
- PCR Purification Kit Qiagen, Hilden
- Protein-Probenpuffer: „Rotiload1“ Roth, Karlsruhe
- Proteinase K Sigma-Aldrich, Steinheim
- Protein-Standard: „Page Ruler Prestained Protein Ladder plus“ Fermentas, St. Leon-Rot
- Protein-Standard: IEF Marker 3-10 Serva, Heidelberg
- Pustulan Roth, Karlsruhe
- Restriktionsenzyme *HaeIII* "fast digest" Fermentas
- Serva Violett 1-Pulver Serva, Heidelberg
- *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* Peqlab, Erlangen
- Trypsin aus Pankreas Merck, Darmstadt

2.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien von folgenden Herstellern wurden benutzt:

- Dialyseschläuche, Porengröße: 14 kDa Roth, Karlsruhe
- Elektroden-Dochte für IEF Serva, Heidelberg
- IEF-Gel, Servalyt Precotes 3-10 Serva, Heidelberg
- Kieselgelplatten Si 60 Merck, Darmstadt
- Membranfilter, 25 mm Syringe, 0,2 µm Fisher, Schwerte
- Microcon, YM10 Millipore, Eschborn
- Mikrotiterplatten, Microtest™ 96 Becton Dickinson, USA
- PVDF-Membran, 0,45 µm Millipore, Eschborn
- Reaktionsgefäße für qPCR Axygen, USA

- Vivaspin 20 Sartorius, Göttingen

2.4 Geräte und Hilfsmittel

Geräte und Hilfsmittel von folgenden Herstellern wurden benutzt:

- Applikator-Streifen für IEF Serva, Heidelberg
- Autoklav, Systec VE40 Systec GmbH, Wettenberg
- Blot-Apparatur, OWL HEP-1 Thermo Scientific, USA
- Brutschrank Köttermann, Uetze/Hänigsen
- Cross-Flow-Filtration Sartorius, Göttingen
- Cross-Flow-Filtration Kassette 0,1 μ m Sartorius, Göttingen
- Cross-Flow-Filtration Kassette 5 kDa Sartorius, Göttingen
- Dialysekapsel Roth, Karlsruhe
- Elektrophoresekammer (für PAGE) Sigma-Aldrich, Steinheim
- Elektrophoresekammer (für Agarosegele) Bio Rad, München
- Fluoreszenzmikroskop Keyence, Frankfurt/Main
- Fluoreszenzmikroskop, Filter „DAPI-B“ Keyence, Frankfurt/Main
- FPLC-Detektor Single Path Monitor UV-1 GE Healthcare, München
- FPLC-Pumpen Pump P-500 GE Healthcare, München
- FPLC-Mischzelle Flow Cell HR 10 GE Healthcare, München
- FPLC-Säule MonoQ GE Healthcare, München
- FPLC-Säule Sephadex G75 GE Healthcare, München
- FPLC-Fraktionensammler Frac-10 GE Healthcare, München
- Geldokumentationseinheit Vilber-Lourmat, Eberhardzell
- Glasplatten für Polyacrylamid-Gele Sigma-Aldrich, Steinheim
- Heizblock Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg
- HPLC Shimadzu, Kyoto, Japan,
- HPLC-Refraktometer, Refractive Index Detector 156 Beckman Coulter, Krefeld
- HPLC-Säule: Aminex® HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm Bio Rad, München
- IEF-Apparatur Multiphor II LKB, Bromma, Schweden
- LyovacGT2 Steris, Hürth
- Thermocycler Mastercycler gradient Eppendorf, Hamburg
- Thermocycler realplex² egradient S Eppendorf, Hamburg
- Mikroskop SM Lux Leitz, Wetzlar

- Mikrotitergerät, Titertex Multiskan PLUS
Dunn Labortechnik, Asbach
- Mischer Vibrofix VF1
IKA, Staufen
- pH-Meter CG840
Schott, Mainz
- Photometer Specord 50
Analytic Jena, Jena
- Pulsfeldgelelektrophorese Rotaphor
Biometra, Jena
- Rasterelektronenmikroskop ESEM XL30
Philips, Niederlande
- Reinstwasseranlage
Millipore, Eschborn
- Schüttler
New Brunswick Scientific, USA
- Software Bio1D
Vilber-Lourmat, Eberhardzell
- Spannungsgerät Consort E122
Consort, Turnhout, Belgien
- Ultraschallgerät
Branson sonifier, Danbury, USA
- Waagen
Sartorius, Göttingen
- Thoma-Zählkammer
Knittel Gläser, Braunschweig
- Zellhomogenisator
Braun, Melsungen
- Zentrifuge
Sigma, Osterode
- Zentrifuge 5415
Eppendorf, Hamburg
- Zentrifuge J2-MC
Beckmann Coulter, Krefeld

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Bakterien- und Hefestämme

Es wurden verschiedenste Hefe-Arten, Arten aus der Gruppe der Milchsäurebakterien und Essigsäurebakterien sowie Bakterienisolate aus dem Termitendarm kultiviert und untersucht (Tabelle 2.1, Tabelle 2.2)

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten und in der Institutsstammsammlung hinterlegten Hefestämme, ihre Stammbezeichnung sowie ihre Herkunft.

| Spezies | Stamm | Herkunft |
|--|-------|---|
| <i>Brettanomyces bruxellensis</i> | 573 | Wein aus New York, USA |
| | 2/6-6 | Dornfelder, Abenheim |
| | 600 | Dornfelder, Abenheim |
| | 604 | Carbenet-Sauvignon, Mettenheim |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | 527 | Forschungsanstalt Geisenheim hinterlegt als ATCC 66807 |
| | 474 | Dr. Dennert, isoliert von Apfel |
| | 469 | Dr. Dennert, isoliert von Birne |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 555 | M. Stark, Department of Biochemistry, University Dundee, Australien hinterlegt als IFO 1267 |
| | 495 | Dr. Sugisaki, Tokio, Japan |
| | 118 | Institut für Rebenzüchtung, Würzburg |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | 160 | Institute du Vin, Athen, Griechenland |
| | 152 | Apfel |
| <i>Pichia anomala</i> | 163 | Prof. Haccius |
| <i>Pichia farinosa</i> | 376 | Prof. Haccius |
| <i>Pichia fermentans</i> <i>var. fermentans</i> | 167 | Institute du Vin, Athen, Griechenland |
| <i>Pichia kluyverii</i> <i>var. kluyverii</i> | 393 | DLR Neustadt, isoliert aus Jungwein hinterlegt als ATCC 66809 |
| <i>Pichia membranifaciens</i> | 190.1 | Wein, Bingen |
| | 169 | TH Karlsruhe |
| | 227 | Wein |

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten und in der Institutsstammsammlung hinterlegten Hefestämme, ihre Stammbezeichnung sowie ihre Herkunft. (Fortsetzung)

| Spezies | Stamm | Herkunft |
|---|------------------------|---|
| <i>Saccharomyces bayanus</i> | DSM 70412 ^T | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, isoliert aus trüben Bier |
| | CBS 395 | Centraalbureau voor Schimmelcultures, Niederlande, isoliert aus Johannesbeersaft |
| | CBS 7001 | Centraalbureau voor Schimmelcultures, Niederlande, isoliert von <i>Mesophylax adopersus</i> |
| | 2/6-2 | Trockenhefepräparat Hefix 2000 |
| | 72 | DLR Mosel hinterlegt als CBS 429 |
| | 73 | Institute du Vin, Athen, Griechenland |
| | 656 | mit Trockenhefe SIHA 4 beimpfte Sektprobe |
| | 642 | Starterkultur LALVIN DV10 (Champagnerhefe) |
| | 24.3 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 80.46 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| <i>Saccharomyces bayanus</i> <i>x cerevisiae</i> | CBS 8614 | Centraalbureau voor Schimmelcultures, Niederlande, isoliert aus Cider |
| <i>Saccharomyces boulardii</i> | 2/5-68 | Perenterol |
| <i>Saccharomyces capensis</i> | 451C | J. Zorg |
| <i>Saccharomyces cariocanus</i> | CBS 8841 ^T | Centraalbureau voor Schimmelcultures, Niederlande, isoliert von <i>Drosophila</i> sp. |
| | NCYC 2821 | National Collection of Yeast Cultures, England isoliert von <i>Drosophila</i> sp. |
| | NCYC 2968 | National Collection of Yeast Cultures, England isoliert von <i>Drosophila</i> sp. |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | DSM 70449 ^T | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, isoliert aus obergärigem Bier |
| | 28 | Bayrische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Würzburg hinterlegt als CBS 8112 |
| | 29 | Bayrische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Würzburg hinterlegt als ATCC 48427 |
| | 33 | Bayrische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Würzburg hinterlegt als ATCC 48428 |

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten und in der Institutsstammsammlung hinterlegten Hefestämme, ihre Stammbezeichnung sowie ihre Herkunft. (Fortsetzung)

| Spezies | Stamm | Herkunft |
|---------------------------------|--|--|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 35 | Bayrische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Würzburg hinterlegt als ATCC 48429 |
| | 43 | Bayrische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Würzburg hinterlegt als ATCC 48510 |
| | 57 | Bayrische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Würzburg |
| | 58 | Bayrische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Würzburg |
| | 93 | Riesling, Weinsberg hinterlegt als ATCC 48470 |
| | 101 | Weißwein, Michelsbach hinterlegt als ATCC 48430 |
| | 149 | DLR Neustadt hinterlegt als ATCC 48431 |
| | 153 | afrikanisches Hefepräparat |
| | 379 | H. Kreil, München |
| | 397 | Food Research Institute, Norwich, Großbritannien hinterlegt als NCYC 1026 |
| | 461 | R. Palfree und H. Bussey hinterlegt als ATCC 42016 |
| | 462 | American Type Culture Collection, USA |
| | 535 | B. D. Wingfield, Universität Stellenbosch, Südafrika hinterlegt als ATCC 46029 |
| | 536 | B. D. Wingfield, Universität Stellenbosch, Südafrika hinterlegt als ATCC 48494-1 |
| | 328 | mit einer amerikanischen Trockenhefe vergorener Wein |
| | 559 | Forschungsanstalt Geisenheim |
| | 3209-2 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3001-11 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| 3001-12 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel | |
| 3002-8 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel | |
| 3002-9 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel | |

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten und in der Institutsstammsammlung hinterlegten Hefestämme, ihre Stammbezeichnung sowie ihre Herkunft. (Fortsetzung)

| Spezies | Stamm | Herkunft |
|-----------------------------------|-----------------------|---|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 3004-1 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3005-6 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3006-1 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3007-1 | gärende Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3010-11 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3211-1 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3212-5 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3212-6 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 2001-1 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 2008-7 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 2603-1 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | S17-2 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3201-3 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3205-8 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3211-2 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 3211-3 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| | 105.55 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| <i>Saccharomyces kudriavzevii</i> | CBS 8840 ^T | Centraalbureau voor Schimmelcultures, Niederlande, isoliert von faulendem Blatt |
| | NCYC 2969 | National Collection of Yeast Cultures, England isoliert von verfaulendem Blatt |
| | NCYC 3518 | National Collection of Yeast Cultures, England Kontamination in europäischer Brauerei |

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten und in der Institutsstammsammlung hinterlegten Hefestämme, ihre Stammbezeichnung sowie ihre Herkunft. (Fortsetzung)

| Spezies | Stamm | Herkunft |
|----------------------------------|-----------------------|---|
| <i>Saccharomyces mikatae</i> | CBS 8839 ^T | Centraalbureau voor Schimmelcultures, Niederlande, isoliert aus Boden |
| | NCYC 2970 | National Collection of Yeast Cultures, England isoliert von verfaulendem Blatt |
| | NCYC 2819 | National Collection of Yeast Cultures, England isoliert aus Boden |
| <i>Saccharomyces paradoxus</i> | CBS 432 ^T | Centraalbureau voor Schimmelcultures, Niederlande, isoliert aus Boden |
| | 30.53 | gärender Wein, Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel |
| <i>Saccharomyces pastorianus</i> | DSM 6580 ^T | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| | NCYC 529 | National Collection of Yeast Cultures, England Lager-Brauerei-Hefe |
| <i>Saccharomyces ludwigii</i> | 84 | DLR Mosel |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 82 | Prof. Haccius |
| | 81 | Institute du Vin, Athen, Griechenland |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i> | 182 | Bayrische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Würzburg |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | 427 | Dr. Naarden, Niederlande, isoliert aus Mandarinen hinterlegt als ATCC 56535 |
| | 74 | TH Karlsruhe |
| | 368 | Dr. Rankine, The Australian Wine Research Institute, Adelaide, Australien isoliert aus verdorbenem Wein |
| | 412 | Dr. Naarden, Niederlande, isoliert aus Organenkonzentrat |
| <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | 68 | erhalten von der DLR Mosel |

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten und in der Institutsstammsammlung hinterlegten Bakterienstämme, ihre Stammbezeichnung sowie ihre Herkunft.

| Spezies | Stamm | Herkunft |
|------------------------------|------------------------|--|
| <i>Delftia tsuruhatensis</i> | MV01 | <i>Zootermopsis angusticollis</i> |
| <i>Pediococcus damnosus</i> | DSM 20331 ^T | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, isoliert aus Lager-Bier |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | DSM 20054 ^T | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, isoliert aus Fäkalien |
| <i>Oenococcus oeni</i> | DSM 20252 ^T | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, isoliert aus Wein |
| <i>Acetobacter aceti</i> | DSM 3508 ^T | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, isoliert aus alkoholischer Lösung mit Essigstich |

2.5.2 Kultivierung von Bakterien und Hefen

Medien zur Anzucht von Milchsäurebakterien:

Tomatensaftmedium (nach Medium 368, DSMZ, 2011):

| | |
|--|----------|
| Pepton aus Fleisch | 5 g/l |
| Pepton aus Casein (tryptisch verdaut) | 20 g/l |
| Hefeextrakt | 5 g/l |
| Glucose | 5 g/l |
| Fructose | 5 g/l |
| Zitronensäure | 3 g/l |
| Tween 80 | 1 g/l |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,5 g/l |
| Tomatensaft | 250 ml/l |
| (Agar | 15 g/l) |

Der pH-Wert wurde auf 6,0 eingestellt.

Das Medium wurde bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

Das Milchsäurebakterium *Oenococcus oeni* wurde in diesem Medium stehend bei 30 °C für etwa fünf Tage kultiviert.

MRS-Medium (nach Medium 11, DSMZ, 2011):

| | |
|---|----------|
| Pepton aus Casein (tryptisch verdaut) | 10 g/l |
| Fleischextrakt | 10 g/l |
| Hefeextrakt | 5 g/l |
| Glucose | 20 g/l |
| Tween 80 | 1 g/l |
| K ₂ HPO ₄ | 2 g/l |
| Natriumacetat | 5 g/l |
| (NH ₄) ₂ -Citrat | 2 g/l |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,2 g/l |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 0,05 g/l |
| (Agar | 15 g/l) |

Der pH-Wert wurde auf 6,5 eingestellt.

Das Medium wurde bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

Milchsäurebakterien wurden in diesem Medium als Standkultur bei 30 °C für zwei bis fünf Tage kultiviert.

Medium zur Anzucht von *Acetobacter aceti*:

YPM-Medium (Medium 360, DSMZ 2011):

| | |
|-------------|---------|
| Hefeextrakt | 5 g/l |
| Pepton | 3 g/l |
| Mannitol | 25 g/l |
| (Agar | 15 g/l) |

Das Medium wurde bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

Acetobacter aceti wurde schüttelnd bei 30 °C für etwa fünf Tage angezogen.

Medien zur Anzucht von Hefen:

GYP-Medium (nach Medium 852, DSMZ, 2011):

| | |
|--------------------|---------|
| Hefeextrakt | 10 g/l |
| Pepton aus Fleisch | 10 g/l |
| Glucose | 20 g/l |
| (Agar | 15 g/l) |

Das Medium wurde bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

Wenn nicht anders angegeben, wurden Hefen schüttelnd in diesem Medium bei 30 °C für etwa 18 Stunden angezogen.

Modifiziertes GYP-Medium:

Mit Hilfe eines modifizierten GYP-Mediums sollte untersucht werden, ob wiederholte Kultivierung von *Saccharomyces*-Stämmen unter Stressbedingungen eine Veränderung ihres Fingerprinting-Musters (SAPD-Muster, s. 2.6.3.2) hervorruft. Hierfür wurde 50%iges GYP-Medium so verändert, dass unterschiedliche Glucose-Konzentrationen und pH-Werte entstanden. Zudem wurde bei unterschiedlichen Temperaturen kultiviert (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3. Überblick über die Modifikationen eines 50 %iges GYP-Mediums.¹

| Variante | Glucosekonzentration | pH-Wert | Kultivierungstemperatur |
|----------|----------------------|-----------|-------------------------|
| 1 | 50 g/l | 3,0 (2,7) | 25°C (30 °C) |
| 2 | 50 g/l | 4,0 | 25°C (30 °C) |
| 3 | 200 g/l (300 g/l) | 4,0 | 25°C (30 °C) |
| 4 | 50 g/l | 4,0 | 15 °C (12 °C) |
| 5 | 200 g/l (300 g/l) | 3,0 (2,7) | 15 °C (12 °C) |

¹ Die Werte in Klammern beziehen sich auf Konzentrationen, die nach der 10. Kultivierung verwendet wurden.

Die jeweiligen Medien wurden mit 0, 1 % Inokulum beimpft und bei den entsprechenden Temperaturen für fünf Tage stehend inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die gewachsenen Hefen mit einem Inokulum von 0, 1 % in frisches Medium übertragen. Dies wiederholte sich für insgesamt 15 Kultivierungen, wobei ab der 10. Kultivierungsrunde die Bedingungen des jeweiligen Mediums verändert wurden (s. Tabelle 2.3).

Traubensaft:

Traubensaft wurde für 30 min im strömenden Dampf erhitzt und dann mit den jeweiligen Hefen beimpft.

Zusätzlich wurden Wachstumseigenschaften von *Saccharomyces*-Stämmen untersucht, indem 50 % Traubensaft modifiziert wurde (Tabelle 2.4). Hierbei wurde von einer Zuckerkonzentration des reinen Traubensaftes von 150 g/l ausgegangen, was der Packungsangabe des Herstellers entsprach. Diesem wurden verschiedene Zucker-Konzentrationen hinzugefügt, sowie der pH-Wert mit 100 mM McIlvaine-Puffer eingestellt. Zuckerlösungen wurden sterilfiltriert, bevor sie zu dem ausgedampften Traubensaft gegeben wurden. McIlvaine-Puffer wurden direkt zu dem Traubensaft gegeben und 30 min unter strömenden Dampf erhitzt.

Tabelle 2.4 : Auflistung der verschiedenen Anzuchsbedingungen für Hefen. Die Angaben beziehen sich auf die Endkonzentration des modifizierten Traubensaftes.

| Variante | Zuckerkonzentration (Glucose:Fructose, 1:1) | pH-Wert |
|----------|--|---------|
| 1 | 75 g/l | 3,25 |
| 2 | 200 g/l | 3,25 |
| 3 | 350 g/l | 3,25 |
| 4 | 75 g/l | 3,0 |
| 5 | 75 g/l | 2,6 |

Medien zur Anzucht von *Botrytis cinerea*:

Kartoffel-Extrakt-Glucose-Agar (nach Medium 129, DSMZ, 2011):

25 g der Kartoffel-Extrakt-Glucose-Mischung (Firma Merck) wurden in 1 l H₂O_{dest.} eingewogen, bei 121 °C und 2 bar für 20 min sterilisiert und Platten gegossen.

Botrytis cinerea wurde auf diesen Platten ausplattiert und für sieben Tage bei Raumtemperatur kultiviert.

Glucansynthese-Medium:

| | |
|--|----------|
| Glucose | 30 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 15 g/l |
| KNO ₃ | 12,5 g/l |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 5 g/l |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 1 mg/l |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 1 mg/l |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 40 µg/l |
| MnSO ₄ x 4 H ₂ O | 40 µg/l |

Das Medium wurde bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

Aus einer Plattenvorkultur von *Botrytis cinerea* (Kartoffel-Extrakt-Glucose-Agar) wurde steril mit dem Skalpell eine ca. 1 x 1 cm große Fläche ausgeschnitten und mit dieser das Glucansynthese-Medium beimpft. Die Kultivierung erfolgte in Schikanekolben bei 20 °C in einem Zeitraum von 14 Tagen, wobei die ersten zehn Tage der Anzucht schüttelnd erfolgten.

Medien zur Anzucht von *Delftia tsuruhatensis*:

LB-Medium (Medium 381, DSMZ, 2011):

| | |
|-------------|---------|
| Hefeextrakt | 5 g/l |
| Trypton | 10 g/l |
| NaCl | 10 g/l |
| (Agar | 15 g/l) |

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Das Medium wurde bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

Die Bakterien wurden schüttelnd bei 30 °C in diesem Medium kultiviert.

CYM-Medium (nach Stewart und Leatherwood, 1976):

| | |
|---------------------------------|---------|
| NaNO ₃ | 1 g/l |
| K ₂ HPO ₄ | 1 g/l |
| KCl | 0,5 g/l |
| MgSO ₄ | 0,5 g/l |
| Hefeextrakt | 0,5 g/l |
| Kohlenstoffquelle | 1 g/l |

Als Kohlenstoffquelle wurde zum einen das Präparat „HefaCell®“ der Firma Erbslöh, Geisenheim, verwendet. Hierbei handelt es sich laut Herstellerangaben um ein Hefezellwand-Präparat, das in der Weinpraxis die Versorgung der Weinhefe mit Nährstoffen verbessern und so die Gäraktivität steigern soll. In diesem Fall wurde HefaCell® direkt in das gelöste Medium gegeben und für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

Als weitere Kohlenstoffquelle wurden dem schon autoklaviertem Medium steril Zellen von *Zygosaccharomyces bailii* Stamm 74 zugefügt. Diese Hefe wurde für ca. 18 Stunden in GYP-Medium kultiviert, die Zellen abzentrifugiert und in sterilem Phosphatpuffer (10 mM, pH 5,9) gewaschen. Zellen, die 10 ml der GYP-Kultur entsprachen, wurden schließlich in 1 ml Phosphatpuffer aufgenommen und in 50 ml des CYM-Mediums überführt. Dies entsprach in etwa einer optischen Dichte (600 nm) von 1. Um ein Wachstum der Hefen in diesem Medium zu verhindern, wurde zusätzlich sterilfiltriertes Cycloheximid mit einer Endkonzentration von 2 mg/l hinzugefügt.

Beide Medien wurden mit 1 % einer Vorkultur beimpft und schüttelnd bei 30 °C kultiviert.

Stammhaltung von Mikroorganismen:

Für eine langfristige Haltung der verwendeten Mikroorganismen wurden diese auf Schrägagar-Röhrchen kultiviert und bei 4 °C gelagert. Weiter wurden die Zellen in den entsprechenden Medien mit zusätzlichen 20 % Glycerin bei -20 °C aufbewahrt.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 DNA-Isolierung

Die DNA von Bakterien und Hefen wurde mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits der Firma Qiagen extrahiert. Das Prinzip der hier durchgeführten DNA-Isolierung beruht auf einer Bindung der negativ geladenen DNA an einer Silika-Membran, die dann durch Einsatz eines Niedrigsalz-Systems wieder eluiert werden kann.

Enzymatischer Lyse-Puffer (DNA-Isolierung von grampositiven Bakterien):

| | |
|---------------------------|---------|
| EDTA | 0,6 g/l |
| TritonX-100 | 1,2 % |
| TRIS (mit HCl auf pH 8,0) | 2,4 g/l |

Der enzymatische Lyse-Puffer wurde direkt vor der Anwendung mit Lysozym (finale Konzentration 20 mg/ml) versetzt.

Sorbitol-Puffer (DNA-Isolierung von Hefen):

| | |
|--------------------------|-----------|
| Sorbitol | 182,2 g/l |
| EDTA | 29,2 g/l |
| β -Mercaptoethanol | 1,1 g/l |

Zu dem Sorbitol-Puffer wurde direkt vor der Anwendung 200 Units Lyticase pro Ansatz hinzugegeben.

Während bei der Isolierung von Bakterien-DNA die Inkubationszeiten denen der Herstellerangaben entsprachen, wurden bei der DNA-Isolierung von Hefen einige Modifikationen vorgenommen. Diese wurden genau eingehalten, um eine gleichmäßige und reproduzierbare DNA-Isolierung zu gewährleisten, was für die folgende quantitative PCR unabdinglich war. So betrug die Inkubation der Zellen in mit Lyticase versetztem Sorbitol-Puffer 60 min. Die entstandenen Sphaeroblasten wurden mit Proteinase-K und ATL-Puffer für drei Stunden inkubiert. Das finale Elutionsvolumen betrug immer 100 μ l. Hierbei wurde der Puffer AE verwendet.

2.6.2 Gelelektrophorese

1x-TBE-Puffer:

| | |
|----------|----------|
| TRIS | 10,8 g/l |
| Borsäure | 5,5 g/l |
| EDTA | 7,4 g/l |

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Ethidiumbromid-Lösung:

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| Ethidiumbromid | 100 μ l |
| H ₂ O _{dest.} | 1 l |

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden Agarose-Gele unterschiedlicher Konzentrationen (1 bis 2,5 % w/v) verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Agarose-Menge in 1 x -TBE-Puffer aufgekocht. Durch Hinzufügen von Natronwasserglas (finale Konzentration: 0,035 %) sollten DNA-Banden elektrophoretisch schärfer aufgetrennt werden.

Nach Erkalten des Agarose-Gels wurden die mit Ladepuffer versetzten Proben in die Taschen gegeben.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele zwischen 30 und 60 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Es folgte eine kurze Entfärbung in 1 x TBE für fünf Minuten. Das Gel wurde unter dem UV-Tisch betrachtet und fotografisch dokumentiert.

2.6.3 PCR-Methoden

2.6.3.1 Amplifikation der ITS- und 5.8S rDNA-Regionen aus Hefe-DNA

Für eine taxonomische Einordnung und eventuelle phylogenetischen Charakterisierung werden bei Mikroorganismen standardmäßig die Gene für die ribosomale RNA verwendet. Die Sequenzierung dieser konservierten Gene und der anschließende Vergleich in entsprechenden Datenbanken erlaubt eine Klassifizierung der Mikroorganismen auf Gattungs- und teilweise auch auf Art-Niveau. Da die für rRNA codierende DNA bei Hefen stark konserviert ist, wird zur Analyse oft die ITS-Region (ITS, internal transcribed spacer) hinzugezogen. Diese Region zeigt aufgrund geringerem evolutionären Druck eine höhere Variabilität, wodurch in den meisten Fällen eine Art-Zugehörigkeit bestimmt werden kann.

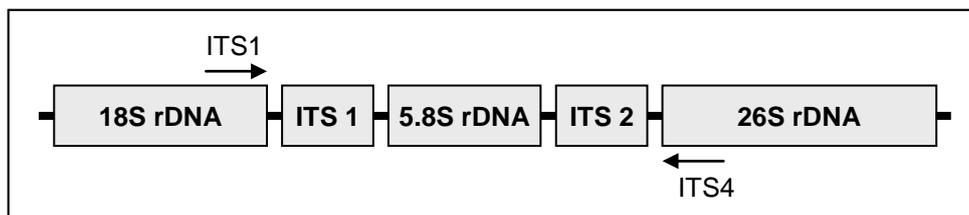


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der chromosomalen Anordnung der rRNA-Gene mit den dazwischen liegenden ITS-Regionen. Pfeile zeigen die ungefähren Bindungsstellen der Primer ITS1 und ITS4 (nach Röder, 2007).

Die hier verwendeten Primer ITS1 und ITS4 (White et al. 1990, Tabelle 2.5) binden am Ende der 18S-rDNA bzw. am Anfang der 26S-rDNA und schließen so zwei ITS-Regionen und die 5,8S-rDNA ein (Abbildung 2.1).

Tabelle 2.5: Die für eine Amplifizierung der 5.8S-rDNA und ITS-Regionen verwendeten Forward (for)- und Reverse (rev)-Primer.

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | Länge (bp) | GC (%) | T _m (°C) ¹ |
|-------------------------|----------------------|------------|--------|----------------------------------|
| ITS1 (for) | TCCGTAGGTGAACCGCGG | 19 | 63 | 61 |
| ITS4 (rev) ² | TCCTCCGCTTATTGATATGC | 20 | 45 | 55 |

¹ Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers

² Der Primer ITS4 diente gleichzeitig auch als Primer für Sequenzierungen dieser Region

Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes betrug:

| | |
|--------------------------------|-------|
| Primer (for) (10 µM) | 1 µl |
| Primer (rev) (10 µM) | 1 µl |
| dNTP-Mix (40 mM) | 1 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2 µl |
| PCR-Puffer (10 x) | 5 µl |
| Enhancer Solution (5 x) | 5 µl |
| Wasser | 31 µl |
| Taq-DNA-Polymerase (1 Unit/µl) | 2 µl |
| DNA | 2 µl |

Die Amplifikation des DNA-Bereiches erfolgte nach folgendem PCR-Programm (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: PCR-Programm für die Amplifizierung der 5.8S rDNA und ITS-Regionen.

| Reaktionsschritt | Temperatur (°C) | Zeit (min) | |
|-----------------------|-----------------|------------|-----------|
| Initial-Denaturierung | 95 | 5 | |
| Denaturierung | 94 | 1 | 35 Zyklen |
| Annealing | 55 | 1 | |
| Elongation | 72 | 1,5 | |
| Finale Elongation | 72 | 10 | |

Die entstandenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch überprüft (s. 2.6.2) und gegebenenfalls mit Hilfe von Restriktionsenzyme geschnitten oder – nach einer Aufreinigung – sequenziert.

2.6.3.2 SAPD-PCR

Die "Specifically Amplified Polymorphic DNA"-PCR (SAPD-PCR) ist eine von Fröhlich und Pfannebecker entwickelte DNA-Fingerprinting-Methode zur Artunterscheidung verschiedenster Organismen (Pfannebecker 2005, Fröhlich und Pfannebecker 2006 und 2007). Die hierfür konstruierten Primer haben ihren Ursprung in der Schnittstellen-Sequenz des Restriktionsenzym *NotI* (GCGGCCGC), wobei durch das einzelne Anfügen der Basen A, G, C und T am 5' der Schnittstellen-Sequenz insgesamt vier Primer generiert wurden (Tabelle 2.7). Diese werden in vier PCR-Ansätzen verwendet, wodurch für jede eingesetzte DNA vier spezifische DNA-Banden-Muster nach der Gelelektrophorese auftreten. Pfannebecker (2008) konnte etwa am Beispiel von

Pediokokken zeigen, dass die so generierten DNA-Bandenmuster spezifisch für eine Art ausfallen, sodass durch Einsatz von DNA bekannter Referenzorganismen auch die Identifizierung einer unbekanntes Kultur möglich ist.

Tabelle 2.7: Verwendete Primer für SAPD-PCR-Ansätze.

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | Länge (bp) | GC (%) | T _m (°C) ¹ |
|-------------|-------------------|------------|--------|----------------------------------|
| A-Not | AGCGGCCGCA | 10 | 80 | 48 |
| C-Not | AGCGGCCGCC | 10 | 90 | 52 |
| G-Not | AGCGGCCGCG | 10 | 90 | 52 |

¹ Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers

Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes betrug:

| | |
|--------------------------------|---------|
| Primer (50 µM) | 1 µl |
| dNTP-Mix (40 mM) | 1 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2 µl |
| PCR-Puffer (10 x) | 2,5 µl |
| Wasser | 12,5 µl |
| Taq-DNA-Polymerase (1 Unit/µl) | 1 µl |
| DNA | 5 µl |

Die Parameter während der PCR sind so gewählt, dass zum einen eine zu starke Variabilität des Bandenmusters – aufgrund von unspezifischen Primerbindungen – verhindert und zum anderen eine Reproduzierbarkeit bezüglich der Bindung der Primer gewährleistet wird (Pfannebecker 2008, Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: PCR-Programm für die Generierung eines SAPD-Fingerprinting-Musters.

| Reaktionsschritt | Temperatur (°C) | Zeit | | |
|-----------------------|-----------------|--------|-----------|-----------|
| Initial-Denaturierung | 95 | 5 min | | |
| Denaturierung | 94 | 1 min | | |
| Annealing | 35 | 1 min | | |
| Rampe ¹ | 35 (+ 0,5) | 12 s | 15 Zyklen | 35 Zyklen |
| Annealing | 42,5 | 1 min | | |
| Rampe ¹ | 42,5 (+ 1,5) | 12 s | 15 Zyklen | |
| Elongation | 72 | 5 min | | |
| Finale Elongation | 72 | 10 min | | |
| Elongation | 72 | 1,5 | | |
| Finale Elongation | 72 | 10 | | |

¹ schrittweise Erhöhung der Temperatur

Sechs Mikroliter des PCR-Produkts wurden für die Elektrophorese eingesetzt. Diese erfolgte in einem 1,5 %igen Gel (ca. 25 x 10 cm) bei 70 V für etwa drei Stunden. Der einstündigen Färbung folgte eine kurze Entfärbung. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert.

Das Bandenmuster einzelner Spezies wurde als Grundlage für die Generierung taxonomischer Stammbäume verwendet. Hierfür wurde die Software Bio-1D (Firma Vilber Lourmat) verwendet. Mit Hilfe dieses Programms konnten DNA-Banden mit dem ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Standards ihren Größen zugeordnet werden und in einer Matrix relativ zu ihrer Größe und abhängig von Banden aus anderen Spuren angeordnet werden. Diese Matrix wurde in Excel in eine binäre 1/0-Matrix umgesetzt (Abbildung 2.2) und in Word aus ihrer Spaltenform in Zeilenform transponiert. Hierbei wurden die generierten 1/0-Matrices aller durchgeführten PCRs eines DNA-Templates aneinandergefügt. Um mit den Sequenzen eine Distanzmatrix erstellen zu können, wurde die Zahlen „1“ und „0“ in „A“ bzw. „T“ umgeschrieben.

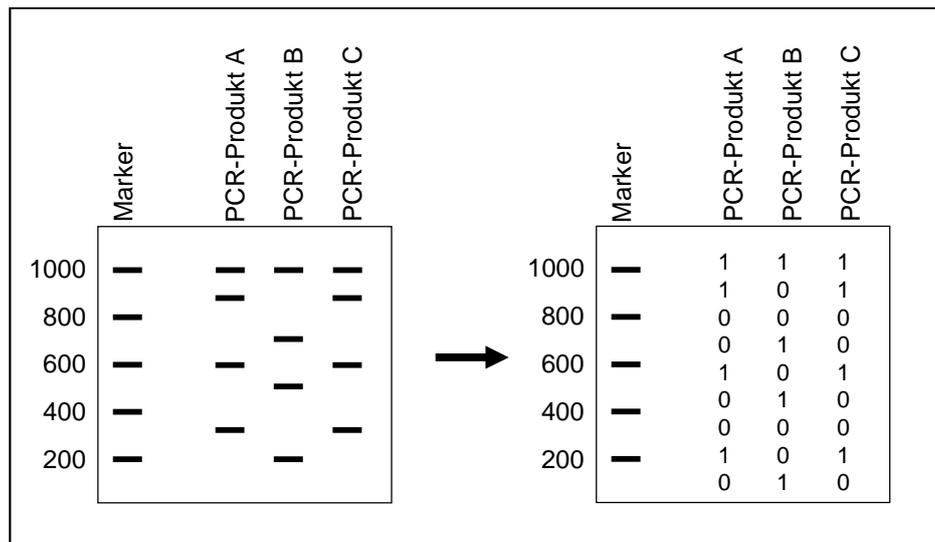


Abb. 2.2: Vereinfachte Darstellung der Umwandlung eines DNA-Banden-Musters in eine 1/0-Matrix. Den einzelnen Banden wurden mit Hilfe eines DNA-Markes eine Größe zugeordnet und diese in Abhängigkeit zu DNA-Banden anderer Spuren in eine 1/0-Matrix konvertiert.

Nach Berechnung einer Distanz-Matrix anhand des Jukes-Cantor-Algorithmus (Jukes und Cantor, 1969), wurde ein Stammbaum nach dem Neighbour-Joining-Algorithmus generiert.

2.6.3.3 Stammspezifischer Nachweis mittel δ -PCR

Transposable Elemente sind fester Bestandteil eukaryotischer Genome und spielen eine nicht unerhebliche Rolle bei der Veränderungen und Evolution dieser. Eine Gruppe dieser Elemente stellen die Retrotransposone dar, die etwa 3 % des Hefegenoms ausmachen (Mieczkowski et al 2006). Allein die Retrotransposon-Spezies TY1 kommt 217 Mal im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* vor (Kim et al 1998). TY1 wird flankiert von „direct repeat“-Elementen, der sogenannten δ -Regionen, wobei ein Element etwa 300 bp umfasst. Aufgrund der hohen Variabilität der Verteilung der TY1-Elemente (und somit auch der δ -Regionen) können Primer, die in diesen δ -Regionen binden, nach einer Amplifizierung ein stammspezifisches Muster von *Saccharomyces cerevisiae* erzeugen (Ness et al. 1993, Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Verwendete Primer für die Amplifizierung von δ -Regionen (Ness et al. 1993). for: Forward, rev: Reverse

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | Länge (bp) | GC (%) | Tm (°C) ¹ |
|------------------|---------------------|------------|--------|----------------------|
| δ 1 (for) | CAAAATTCACCTATWCTCA | 19 | 32 | 48 |
| δ 2 (rev) | GTGGATTTTTATTCCAACA | 19 | 32 | 48 |

¹ Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers

Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes betrug:

| | |
|--------------------------------|--------|
| Primer (for) (10 mM) | 2,5 µl |
| Primer (rev) (10 mM) | 2,5 µl |
| dNTP-Mix (40 mM) | 0,5 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1 µl |
| PCR-Puffer (10 x) | 2,5 µl |
| Wasser | 10 µl |
| Taq-DNA-Polymerase (1 Unit/µl) | 1 µl |
| DNA | 5 µl |

Die Parameter der PCR wurden analog zu denen von Ness et al. (1993) gewählt (Tabelle 2.10).

Tabelle 2.10: PCR-Programm für die Amplifizierung der δ -Regionen aus dem Genom von *Saccharomyces cerevisiae*.

| Reaktionsschritt | Temperatur (°C) | Zeit (min) | |
|-----------------------|-----------------|------------|-----------|
| Initial-Denaturierung | 95 | 5 | |
| Denaturierung | 94 | 0,5 | 4 Zyklen |
| Annealing | 42 | 0,5 | |
| Elongation | 72 | 2 | |
| Denaturierung | 94 | 0,5 | 30 Zyklen |
| Annealing | 45 | 0,5 | |
| Elongation | 72 | 2 | |
| Finale Elongation | 72 | 10 | |

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 2 %igem Agarosegel (Größe: ca. 25 x 10 cm) bei 70 V aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter dem UV-Licht betrachtet.

2.6.3.4 Spezifischer Nachweis von *S. cerevisiae* und *S. bayanus*

Torriani et al (2004) entwickelten ein spezifisches Nachweisverfahren für *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus* sowie Hybriden aus beiden Arten. Hierbei wurden artspezifische Primer entwickelt. Diese binden innerhalb einer YBR033w-Region, die nach Translation in ihre Proteinsequenz eine 100 %ige Sequenzidentität mit dem DNA-Bindeprotein ED 51 aus *Saccharomyces cerevisiae* Stamm S288c (Accession-Nummer NP_009589, Goffeau et al 1996) ergibt. Die Bindestellen der Primer

wurden so gewählt, dass die auftretenden PCR-Produkte von unterschiedlicher Sequenzlänge sind und deshalb in einem Multiplex-PCR-System eingesetzt werden können (Tabelle 2.11).

In dieser Arbeit wurde allerdings auf einen Multiplex-Ansatz verzichtet und die spezifischen Primer-Paare getrennt in parallelen Ansätzen verwendet.

Tabelle 2.11: Verwendete Primer für den spezifischen Nachweis von *S. cerevisiae* und *S. bayanus* (Torriani et al 2004). for: Forward, rev: Reverse

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | Länge (bp) | GC (%) | T _m (°C) ¹ |
|-------------|---------------------------|------------|--------|----------------------------------|
| YC1f (for) | CTTATGCTTGGAACCTCAAGACA | 23 | 44 | 59 |
| YC2r (rev) | AGAAGCAACAACAGCAACAACCCAA | 25 | 44 | 61 |
| YB1f (for) | AACGATATTAGAACATTCTCCAC | 24 | 38 | 58 |
| YB2 (rev) | GCTGTTGCAGACATAGTGTG | 20 | 50 | 57 |

¹ Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes war mit dem für die Amplifizierung der 5.8S-rDNA- und ITS-Regionen identisch (s. 2.6.3.1). In Tabelle 2.12 sind die gewählten Parameter für die Durchführung der PCR aufgelistet.

Tabelle 2.12: PCR-Programm für den Nachweis von *S. cerevisiae* und *S. bayanus*.

| Reaktionsschritt | Temperatur (°C) | Zeit (min) | |
|-----------------------|-----------------|------------|-----------|
| Initial-Denaturierung | 95 | 5 | |
| Denaturierung | 94 | 1 | 35 Zyklen |
| Annealing | 58 | 1 | |
| Elongation | 72 | 2 | |
| Finale Elongation | 72 | 10 | |

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1 %igem Agarosegel bei 100 V aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter dem UV-Licht betrachtet.

2.6.3.5 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR, auch Realtime-PCR) ist eine PCR-Methode, die in Echtzeit die Vermehrung eines DNA-Templates während der PCR detektiert und aufzeichnet. Das Prinzip der Vervielfältigung eines Templates ist identisch mit einer herkömmlichen PCR, allerdings ermöglicht

ein in der PCR eingesetzter Fluoreszenzfarbstoff die quantitative Bestimmung der DNA, wenn das fluoreszierende Signal proportional zur gebildeten DNA-Menge ist.

Fluoreszenz kann ausgelöst werden durch so genannte FRET-Sonden wie etwa TaqMan-Sonden. Diese Sonden besitzen am 5'-Ende einen Quencher, der aufgrund seiner räumlichen Nähe die Fluoreszenz eines Farbstoffes am 3'-Ende der Sonde unterdrückt. Im Elongationsschritt der PCR kann dann eine *Taq*-DNA-Polymerase mit 5'-3'-Exonucleaseaktivität vom 5'-Ende beginnend die Sonde abbauen, wodurch der Quencher entfernt wird und ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. In dieser Arbeit wurde allerdings das interkalierende Agens SYBR Green verwendet, das bei Einbringung in einer doppelsträngige DNA Fluoreszenz zeigt. Daher steigt am Ende der Elongationszeit der PCR – aufgrund steigender Doppelsträngigkeit der DNA – das Signal. Dies ist auch der Zeitpunkt der Messung der Fluoreszenzstärke im PCR-Ansatz bei jedem Zyklus. Nachteil dieses Farbstoffes ist seine geringe Spezifität. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch unspezifische PCR-Produkte detektiert werden. Daher wurde in dieser Arbeit nach jeder quantitativen PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wird nach Beendigung der PCR-Zyklen die Temperatur im Ansatz sukzessive erhöht. Bei einer für die zu untersuchenden DNA-Sequenz spezifischen Temperatur kommt es zur Denaturierung, SYBR Green wird freigesetzt und eine Abnahme der Fluoreszenz detektiert. Unspezifische Produkte besitzen aufgrund ihrer Größe und/oder Sequenz andere Schmelzpunkte und können so erkannt werden.

Durch die Zunahme des Fluoreszenzsignals bei fortschreitender PCR ergibt sich am Ende ein charakteristischer Kurvenverlauf, der die exponentielle Vermehrung von DNA-Fragmenten während der PCR wiedergibt. Diese exponentielle Amplifikation wird allerdings nicht über den gesamten Zeitraum der PCR aufrechterhalten. So kann zu Beginn der PCR keine konstante Verdopplungsrate erwartet werden, da hier aufgrund geringer Template-Mengen keine optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Ebenso kommt es am Ende des PCR-Laufs aufgrund von Produkthemmungen und verbrauchten Substraten zu der Bildung eines Plateaus und somit ebenfalls zu keiner konstanten Vermehrungsrate. Für eine quantitative Bestimmung muss daher ein Zeitpunkt der PCR ausgesucht werden, an dem zum ersten Mal eine exponentielle Phase in der DNA-Amplifizierung eintritt. Dies ist der so genannte „Cycle Threshold“-Wert (C_t -Wert). Er gibt die Zyklenzahl der PCR an, wenn erstmalig die Fluoreszenzstärke über ein Hintergrundrauschen hinweg und in einen exponentiellen Kurvenverlauf übergeht.

Die quantitative PCR wird häufig für Expressionsstudien von Genen verwendet, wobei hier zuerst RNA isoliert und diese in cDNA revers transkribiert werden muss, um dann die DNA-Menge bestimmen zu können. Allerdings bietet diese PCR-Technik auch die Möglichkeit einer Analyse

mikrobieller DNA in einer Probe. Hier gelingt nicht nur der Nachweis, sondern auch die Quantifizierung dieser Organismen. Besonders die Sukzession verschiedener Mikroorganismen während der Kultivierung einer Mischpopulation lässt sich so gut darstellen, was in den meisten Fällen mikrobiologisch mit entsprechenden Selektivmedien und Lebendzählbestimmungen nur bedingt möglich ist.

Konstruktion von Primern für die quantitative Bestimmung von Hefen

Die hier entwickelten Primer dienen dem Nachweis der Hefe-Gattungen *Brettanomyces*, *Hanseniaspora* und *Saccharomyces*. Diese wurden nach *in silico*-Analysen der 5.8S rDNA und ihren flankierenden ITS-Regionen von *Brettanomyces bruxellensis*, *Hanseniaspora uvarum* und verschiedenen *Saccharomyces*-Arten konstruiert. Einen Überblick über die Bindestellen der Primer bietet Abbildung 2.3.

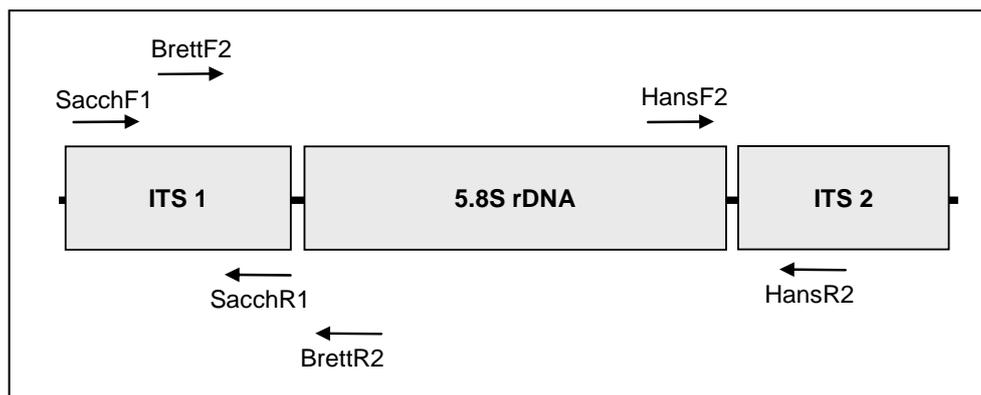


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Bindestellen für die bei der qPCR eingesetzten Primer. BrettF2, BrettR2 zum Nachweis für *Brettanomyces* sp., SacchF1, SacchR1 zum Nachweis von *Saccharomyces* sp., HansF2, HansR2 zum Nachweis von *Hanseniaspora* sp.

Tabelle 2.13 zeigt die Zusammensetzung und Charakteristika der einzelnen Primer.

Tabelle 2.13: Verwendete Primer für den Nachweis von *Brettanomyces* sp. (Brett), *Hanseniaspora* sp. (Hans) und *Saccharomyces* sp. (Sacch). for: Forward, rev: Reverse

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') | Länge (bp) | GC (%) | T _m (°C) ¹ |
|---------------|------------------------|------------|--------|----------------------------------|
| BrettF2 (for) | CAGGATGCTGGGCATAAGC | 19 | 58 | 59 |
| BrettR2 (rev) | GCTCTTCATCGACGCGAGAA | 20 | 55 | 60 |
| HansF2 (for) | GCACATTGCGCCCTTGAGCAT | 21 | 57 | 62 |
| HansR2 (rev) | ATCACAGCGAGAACAGCGTCTC | 22 | 55 | 62 |
| SacchF1 (for) | CTTGCTATTCCAAACAGTGAGA | 22 | 41 | 56 |
| SacchR1 (rev) | CGAAAATTCTTGTTTTTGACA | 21 | 29 | 50 |

¹ Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers

Überprüfung der Spezifität der entwickelten Primer

Die Spezifität der Primer wurde mittels einer herkömmlichen PCR überprüft. Hierbei diente DNA verschiedener weinrelevanter Bakterien und Hefen als Kontrollen.

Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes betrug:

| | |
|--------------------------------|---------|
| Primer (for) (10 mM) | 0,5 µl |
| Primer (rev) (10 mM) | 0,5 µl |
| dNTP-Mix (40 mM) | 0,5 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1 µl |
| PCR-Puffer (10 x) | 2,5 µl |
| Enhancer-Solution (5 x) | 2,5 |
| Wasser | 15,5 µl |
| Taq-DNA-Polymerase (1 Unit/µl) | 1 µl |
| DNA | 1 µl |

In Tabelle 2.14 sind die gewählten Parameter für die Durchführung der PCR aufgelistet.

Tabelle 2.14: PCR-Programm für den Nachweis von *Brettanomyces sp.*, *Hanseniaspora sp.* und *Saccharomyces sp.*

| Reaktionsschritt | Temperatur (°C) | Zeit (min) | |
|-----------------------|-----------------|------------|-----------|
| Initial-Denaturierung | 95 | 5 | |
| Denaturierung | 94 | 1 | 40 Zyklen |
| Annealing | 55 | 0,5 | |
| Elongation | 72 | 0,5 | |
| Finale Elongation | 72 | 10 | |

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1 %igem Agarosegel bei 100 V aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter dem UV-Licht betrachtet.

Quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde in einem Cycler der Firma Eppendorf (Thermocycler realplex²) durchgeführt. Die Reagenzien der PCR (Bezeichnung: Manual RealMasterMix SYBR ROX) wurden von der Firma 5Prime bezogen. Die Firma Axgen lieferte die Reaktionsgefäße.

Jeder Testansatz wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, wobei schon von jeder Probe zweimal DNA isoliert wurde, sodass insgesamt von jeder Probe vier qPCR-Läufe durchgeführt wurden.

Die Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes betrug:

| | |
|------------------------|--------|
| Primer (for) (10 mM) | 0,5 µl |
| Primer (rev) (10 mM) | 0,5 µl |
| Mastermix ¹ | 9 µl |
| Wasser | 9 µl |
| DNA | 1 µl |

¹ Ein Milliliter des Mastermixes (2,5 x) enthielt 125 µl SYBR-Solution (20 x).

In Tabelle 2.15 sind die gewählten Parameter für die Durchführung der qPCR aufgelistet.

Tabelle 2.15: qPCR-Programm für die quantitative Bestimmung von *Brettanomyces* sp., *Hanseniaspora* sp. und *Saccharomyces* sp.

| Reaktionsschritt | Temperatur (°C) | Zeit | |
|------------------------------------|-----------------|-----------|-----------|
| Initial-Denaturierung | 95 | 2 min | 40 Zyklen |
| Denaturierung | 95 | 20 s | |
| Annealing | 55 | 20 s | |
| Elongation ¹ | 68 | 20 s | |
| Denaturierung | 95 | 15 s | |
| Schmelzpunktanalyse ^{1,2} | 60 nach 95 | in 20 min | |

¹ Zeitpunkt der Fluoreszenz-Messung

² Schmelzpunktanalyse als schrittweise Erhöhung der Temperatur (beginnend bei 60 °C und endend bei 95 °C) in einem Zeitraum von 20 min

Für eine Quantifizierung der Zellzahl wurde eine Kalibrierungsgerade erstellt. Verwendet wurden hierfür die DNA von zwei Stämmen jeder Art, um die Einheitlichkeit einer Kalibrierungsgerade innerhalb einer Art zu überprüfen. Mittels Zählkammer wurde ein Zell-Titer von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt und von diesen Hefezellen DNA isoliert. Diese DNA wurde seriell bis zu 10^5 -fach verdünnt, was einer DNA-Menge von 2×10^2 Zellen/ml entsprach. Eine anschließende qPCR-Analyse ergab verschiedene C_t -Werte, die – gegen die logarithmisch eingesetzten Zellzahlen aufgetragen – als Kalibrierungsgerade dargestellt werden konnten. Diese Gerade bzw. ihre Steigung bildete die Grundlage der darauf folgenden Zellzahl-Berechnungen.

Die durch die quantitative PCR ermittelten Zellzahlen wurden im Allgemeinen überprüft durch die Quantifizierung der koloniebildenden Einheiten (KBE). Hierfür wurde – parallel zur DNA-Isolierung und qPCR – die zu analysierende Probe mit entsprechenden Verdünnungen auf GYP-Platten ausplattiert, für zwei bis drei Tage inkubiert und die Kolonien ausgezählt.

2.6.4 Restriktionsfragmentpolymorphismus (RFLP)

Durch einen Restriktionsverdau des PCR-Produktes nach Amplifizierung der 5.8S rDNA- und ITS-Regionen durch das Enzym *HaeIII* lassen sich die acht nah verwandten Arten der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppen zumindest in zwei Cluster auflösen. Dabei zeigen *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* und *S. cariocanus* vier Restriktionsfragmente, während *S. bayanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* und *S. pastorianus* drei Restriktionsfragmente zeigen, darunter eines von der gleichen Fragmentlänge wie in der ersten Gruppe (siehe auch Brito dos Santos et al 2007)

Der Restriktionsverdau wurde mit der Endonuclease *HaeIII* der Firma Fermentas durchgeführt. Hierfür wurden 8,5 µl eines PCR-Produktes (nach der Amplifizierung der 5.8S rDNA und ITS-

Regionen, s. 2.6.3.1) mit 1 µl 10x „FastDigest“-Puffer und 0,5 µl Restriktionsenzym vermischt und in einem Thermocycler für 20 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine 20minütige Inaktivierung bei 65 °C. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 2,5 %igen Agarose-Gel (Größe: ca. 25 x 10 cm) bei 70 V.

Nach einer Ethidiumbromid-Färbung wurde das Gel unter UV-Licht ausgewertet.

2.6.5 Karyotyping mittels Pulsfeldgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung ganzer Chromosomen für die Analyse ihrer Anzahl und Größe ist in der Hefe-Taxonomie eine gängige Methode (etwa bei Vaughan-Martini et al. 1993, Nguyen und Gaillardin 2005). Hierbei ist eine schonende DNA-Isolierung unabdingbar, da die Vollständigkeit ganzer Chromosomen gewährleistet sein muss. Daher werden die Zellen direkt in low-melting-Agarose gegossen und mit Hilfe der Enzyme Lyticase und Proteinase K lysiert. Die so Chromosomen enthaltenen Agarose-Stücke werden in ein Agarose-Gel gesetzt und mittels Pulsfeldelektrophorese aufgetrennt. Diese Form der Elektrophorese verwendet gepulste elektrische Felder anstelle des üblichen homogenen Feldes und kann dadurch auch eine Auftrennung von sehr großen DNA-Fragmenten – hier ganze Chromosomen – erreichen. In dieser Arbeit wurde das System RFE (rotating field electrophoresis) verwendet, bei dem eine Rotation des ansonsten homogenen elektrischen Feldes um das stationäre Agarosegel stattfindet, was zu Richtungswechseln der DNA bei der Elektrophorese führt und so zu ihrer effektive Auftrennung.

TEN-Puffer:

| | |
|------|----------|
| TRIS | 1,21 g/l |
| NaCl | 1 g/l |
| EDTA | 14,6 g/l |

Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

TE-Puffer I:

| | |
|------|----------|
| TRIS | 1,21 g/l |
| EDTA | 14,6 g/l |

Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

TE-Puffer II:

| | |
|------|----------|
| TRIS | 2,42 g/l |
| EDTA | 14,6 g/l |

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Proteinase K-Lösung:

| | |
|---------------------------|----------|
| EDTA | 29,2 g/l |
| SDS | 0,2 % |
| Sodium-lauroyl-sarcosinat | 1 % |
| Proteinase K | 1 g/l |

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Hefen wurden in GYP-Medium (s. 2.5.2) kultiviert. Fünf Milliliter dieser Kultur wurden abzentrifugiert, mit TEN-Puffer gewaschen und das Zellpellet in 100 µl TEN-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde auf 50 °C erwärmt und mit 150 µl Lyticase (655 Units/ml, gelöst in H₂O_{dest.}) und 250 µl einer – ebenfalls auf 50 °C erwärmten – 2%igen „low melting“-Agarose-Lösung (Firma Roth) vermischt und in eine spezielle Gießapparatur gegossen. Die so entstandenen Agarose-Blöckchen wurden mit dem Skalpell halbiert und in Eppendorf-Gefäßen mit 350 µl TE-Puffer I und 150 µl Lyticase-Lösung für vier Stunden bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lyticase-Lösung entfernt und mit H₂O_{dest.} gewaschen. Es folgte die Zugabe von 1 ml Proteinase K-Lösung und einer Inkubation über Nacht bei 50 °C. Die Proteinase K-Lösung wurde entfernt und die Agarose-Blöckchen dreimal mit TE-Puffer II für jeweils 30 min gewaschen. Anschließend wurden die Blöckchen in 950 µl TE-Puffer II und 50 µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Firma Sigma-Aldrich) aufgenommen.

Das verwendete Agarosegel enthielt bei einem Volumen von 150 ml und einer Größe von 20 x 20 cm 1,2 % PFGE-Agarose (Firma PeqLab) in 0,25 x TBE.

Die behandelten Agarose-Blöckchen wurden in die Taschen des Gels transferiert und mit 1% iger „low melting“-Agarose verschlossen. Die Elektrophorese selbst fand in 0,25 x TBE statt.

Die gewählten Parameter für die anschließende Elektrophorese waren:

| | |
|----------------------|---------------------|
| Gesamtlaufzeit | 24 h |
| Pulszeit | 100 - 23 s (linear) |
| Winkel | 110 - 99 ° (linear) |
| Spannung | 210 V |
| Temperatur | maximal 13 °C |
| Rotorgeschwindigkeit | 7 |

Nach der 24stündigen Elektrophorese wurde das Gel für 90 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt, für etwa 10 min in H₂O_{dest.} entfärbt und unter UV-Licht betrachtet.

2.6.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgt nach dem Prinzip der Kettenabbruchsynthese, die von Sanger et al (1992) entwickelt wurde.

Hierfür wurden PCR-Produkte mit Hilfe des „PCR Purifications Kit“ der Firma Qiagen aufgereinigt und als Auftragsarbeit von der Firma Eurofins MWG mit dem entsprechenden Primer sequenziert.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des „BC-Assay Protein Quantification Kits“ der Firma Uptima. Diese kolorimetrische Methode detektiert die durch Aminosäureseitenketten verursachte Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen bzw. die dann mögliche Bindung von Cu^{+} mit dem Chelatbildner Bicinchoninsäure (BCA). Die gemessene Extinktion bei 562 nm resultiert in einer Proteinkonzentration, die aufgrund einer Kalibrierungsgerade mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen berechnet werden kann.

2.7.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Methoden für eine Aufkonzentrierung von Kulturüberständen und angereinigten Proteinlösungen unterschied sich je nach dem eingesetzten Volumen. So wurden für geringe Volumina bis zu 30 ml Ultrafiltrationsverfahren angewandt. Bei Volumen bis zu 800 ml wurden die Proben mittels Gefriertrocknung (Lyophilisation) aufkonzentriert. Da für eine Enzymreinigung große Mengen an Kulturüberstand verwendet wurden, wurde hier eine Tangentialfiltration (Cross-Flow-Filtration) durchgeführt, um eine Konzentrierung zu erreichen.

2.7.2.1 Lyophilisation

Die Lyophilisation ist ein schonendes Verfahren zur Konzentrierung von Proteinlösungen. Dabei wird durch Sublimation das Lösungsmittel aus der gefrorenen Probe beseitigt und diese so getrocknet (Rehm 2002). Der durch Zentrifugation und Filtration (Ausschlussgröße: 0,2 μm) gewonnene Kulturüberstand wurde in Bechergläsern bei - 20 °C gefroren und anschließend lyophilisiert. Die getrocknete Probe wurde in einem geringen Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ aufgenommen und je nach Volumina in Dialysekapseln oder -schläuchen (Ausschlussgröße: 14000 Da) gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert.

2.7.2.2 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration benutzt eine Membran mit definierter Porengröße, um Proteine unterschiedlicher Größe zu trennen und die im Konzentrat enthaltenen Proteine anzureichern. Durch die Wahl einer Membran mit geringer Porengröße steht weniger die Trennung als die Anreicherung von Proteinen im Vordergrund. Zusätzlich können leicht Proteinlösungen durch das Nachspülen mit Wasser entsalzt werden.

Es wurden Filter der Firma Millipore und Sartorius mit einer Ausschlussgröße von 5 bzw. 10 kDa verwendet. Proben mit einem Volumen von bis zu 20 ml wurden mittels der Filtrationseinheiten der Firma Sartorius (Vivaspin 20) bei maximal 8000 x g filtriert und entsalzt. Für Proben mit einem Volumen von 1 ml und weniger wurden Filter der Firma Millipore (YM10) benutzt. Hierbei wurde bei 14000 x g filtriert und dialysiert.

2.7.2.3 Cross-Flow-Filtration

Die Cross-Flow-Filtration ist eine Querstromfiltration bei der eine Strömung entlang einer Membran fließt. Die dabei verwendeten hohen Geschwindigkeiten verhindern, dass es zu Ablagerungen von größeren Bestandteilen in der Lösung und somit zu einer verminderten Durchlässigkeit und Trenneffizienz kommt.

In diesem Fall wurden insgesamt 21 Kulturen mit je einem Volumen von 200 ml vereinigt. Die so erhaltene 4,2 l Kulturüberstand von *Delftia tsuruhatensis* MV01 wurden mittels Cross-Flow-Filtration auf 75 ml aufkonzentriert. Zuvor wurden Kulturüberstand und Zellen grob mittels Zentrifugation getrennt (17700 x g, 60 min). Für eine Entfernung kleinerer Zellpartikel sowie Reste des im Medium eingesetzten Präparats HefaCell® wurde im Cross-Flow-System über eine – das Membranmaterial PESU (Polyethersulfon) enthaltende – Kassette mit der Ausschlussgröße von 0,1 µm filtriert. Die eigentliche Aufkonzentrierung des Kulturüberstandes erfolgte mittels einer PESU-Kassette mit der Ausschlussgröße von 5 kDa. Der so angereicherte Kulturüberstand wurde mittels Ultrafiltration in der Kühlzentrifuge gegen die entsprechenden Puffer dialysiert (s. 2.7.2.2).

Genauere Details der Cross-Flow-Filtration sind Tabelle 2.16 zu entnehmen.

Tabelle 2.16: Parameter der Konzentrierung des Kulturüberstands mittels Cross-Flow-Filtration.

| Vorgang | Pumpen- zug | Eingang- druck | Retentat- druck | Permeat- druck | sonstiges |
|--|----------------|-------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------|
| Kassette: 0,1 µm | | | | | |
| Spülen der Kassette mit 10 l H ₂ O _{dest.} | 20 % | 2 bar | 0,5 bar | 0 bar | |
| Spülen der Kassette mit 5 l 0,9 % NaCl | 20 % | 2 bar | 0,5 bar | 0 bar | |
| Befeuchten der Membran mit Kulturüberstand | 5 % | 0,55 bar | 0 bar | 0,5 bar | Permeatventil zu; 15 min |
| Filtration | 9,5 % | 0,91 bar | 0 bar | 0,2 bar | Permeatventil gedrosselt |
| Kassette: 5 kDa | | | | | |
| Spülen der Kassette mit 10l H ₂ O _{dest.} | 20 % | 2 bar | 0,5 bar | 0 bar | |
| Spülen der Kassette mit 5 l 0,9 % NaCl-Lösung | 20 % | 2 bar | 0,5 bar | 0 bar | |
| Befeuchten der Membran mit Kulturüberstand | 7 % | 0,81 bar | 0 bar | 0,4 bar | Permeatventil zu, 15 min |
| Filtration | 14 % | 1,7 bar | 0,1 bar | 0,3 bar | Permeatventil gedrosselt |

Nach der Anwendung der Kassetten wurden diese mit 3 l auf 50 °C erwärmter 1 M NaOH-Lösung gespült (Pumpenzug: 2,8 %, Eingangsdruck: 0,27 bar, Retentatdruck: 0 bar, Permeatdruck: 0,2 bar, Permeatventil geschlossen). Die NaOH-Lösung wurde durch Spülen mit 5 l H₂O_{dest.} entfernt und die Kassetten in 20 % Ethanol aufbewahrt.

2.7.3 Proteinreinigung

Die Trennung eines gewünschten Proteins oder Enzyms aus einem Gemisch kann durch verschiedenste Methoden erreicht werden. In den meisten Fällen muss hierbei eine Kette von Reinigungsschritten vollzogen werden, um eine reine Proteinfraktion zu erreichen. Im vorliegenden Fall wurden neben der schon erwähnten Cross-Flow-Filtration zwei Säulenchromatographien in einem FPLC-System (FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography) der Firma Pharmacia (heute GE Healthcare) verwendet. Hierbei wurde so verfahren, dass der durch die Cross-Flow-Filtration aufkonzentrierte und schon vorgereinigte Kulturüberstand zunächst über eine Anionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt wurde. Aufgrund eines maximal einsetzbaren Volumens bei dieser Chromatographie von 2 ml wurde dieser Schritt mehrfach wiederholt. Identische, aktive Fraktionen dieser Läufe wurden vereinigt und aufkonzentriert. Diese Proben wurden wiederum mittels

Gelpermeationschromatographie aufgetrennt. Auch hier wurden mehrere Läufe durchgeführt, sodass auch hier eine Vereinigung gleicher Fraktionen und so eine Aufkonzentrierung möglich waren. Eine Übersicht gibt Abbildung 2.4.

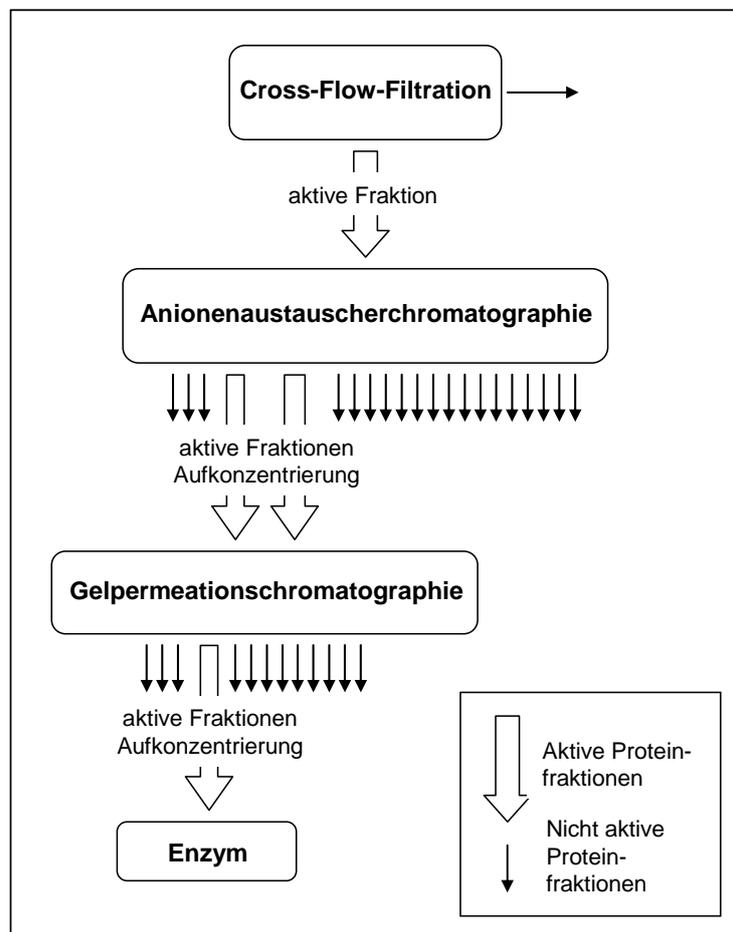


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der durchgeführten Reinigungsstrategie. Nach Cross-Flow-Filtration wurde der angereinigte Kulturüberstand mit Hilfe der Anionenaustauscherchromatographie aufgetrennt. Identische und aktive Fraktionen jedes Laufs wurden vereinigt, aufkonzentriert und mittels Gelpermeationschromatographie weiter fraktioniert, wodurch eine Fraktion mit dem gewünschten Enzym erreicht wurde.

2.7.3.1 Anionenaustauscherchromatographie

Proteine unterscheiden sich auf Grund ihrer unterschiedlichen Aminosäureseitenketten in ihrer Ladung bei unterschiedlichen pH-Werten. Wählt man den pH-Wert so, dass ein Teil der Proteine protoniert, ein anderer Teil deprotoniert vorliegt, kann eine Trennung erfolgen. Die Säulenmatrix des Anionenaustauschers trägt positiv geladene Gruppen (hier quartenäre Aminomethyl-Gruppen), an die negativ geladene Proteine binden können. Proteine mit einem höheren isoelektrischen Punkt sind bei dem eingestellten pH-Wert nicht negativ geladen, können nicht binden und werden

durchgewaschen. Nach der Bindung erfolgt eine Elution mit NaCl in erhöhter Konzentration. Cl⁻-Ionen werden gegen die negativ geladenen Proteine ausgetauscht; diese eluieren (Rehm 2002).

In dieser Arbeit wurde die Anionenaustauscher-Säule MonoQ HR 5/5 benutzt. Diese wurde zunächst mit 20 mM TRIS/HCl, pH 7,5, äquilibriert. Die ebenfalls gegen 20 mM TRIS/HCl, pH 7,5, dialysierte Enzymprobe wurde über eine 2 ml-Probenschleife auf die Austauschersäule gegeben. Die Durchflussrate während der Chromatographie betrug 1 ml/min. Die anschließende Proteinelution erfolgte mittels eines linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M (in 20 mM TRIS/HCl, pH 7,5). Die eluierte Proteinmenge wurde mit einem UV-Detektor bei 280 nm bestimmt und 36 Fraktionen à 1 ml gesammelt.

Jede Fraktion wurde auf ihre Enzymaktivität hin untersucht (s. 2.7.7.1).

Dieser Reinigungsschritt wurde insgesamt 24 x mit Kulturüberstand wiederholt, wodurch insgesamt 48 ml aufkonzentrierte Kulturüberstand fraktioniert wurden. Aufgrund fast identischer Chromatographien und Aktivitäten konnte jede einzelne Fraktion mit den entsprechenden Fraktionen aus anderen Läufen vereinigt werden, wodurch schließlich ein Volumen von 24 ml pro Fraktion vorlag. Diese vereinigte Fraktion wurde anschließend mittels Ultrafiltration auf 0,9 ml aufkonzentriert (s. 2.7.2.2).

2.7.3.2 Gelpermeationschromatographie

Die Trennung eines Proteingemisches aufgrund der unterschiedlichen Größe ihrer einzelnen Proteine kann durch eine Gelpermeationschromatographie (Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltrationschromatographie) erfolgen. Hierbei werden als Säulenmaterial Polymergranula (hier Sephadex) verwendet. Kleine Moleküle bzw. Proteine diffundieren in die poröse Oberfläche dieser Polymere und verweilen daher länger auf der Säule als große Proteine, die kaum oder gar nicht die Poren des Säulematerials passieren, daher schneller entlang der Säule wandern und früher eluieren können.

In dieser Arbeit wurde die Gelfiltrationssäule Sephadex G 75 HR 10/30 verwendet. Diese wurde zunächst mit einem 0,2 M NaCl enthaltenen Puffer (20 mM TRIS-HCl, pH 7,5) äquilibriert. Da durch den vorangegangenen Reinigungsschritt die zu trennende Enzymlösung bereits unter diesen Puffer-Bedingungen vorlag, konnte auf eine Umpufferung verzichtet werden. Die Enzymlösung wurde mit einer 0,2 ml-Probenschleife auf die Säule gegeben. Die Durchflussrate betrug hier 0,5 ml/min. Auch hier wurde der Protein-Durchfluss mit Hilfe der Messung der Extinktion bei 280 nm detektiert. Pro Gelfiltrationslauf wurden 20 Fraktionen à 1 ml gesammelt. Auch diese Fraktionen wurde auf ihre Enzymaktivität hin überprüft (s. 2.7.7.1) und gegebenenfalls erneut mittels Ultrafiltration aufkonzentriert (s. 2.7.2.2).

2.7.4 SDS-Gelelektrophorese

2.7.4.1 Denaturierende Gelelektrophorese

In Polyacrylamidgelen lassen sich Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung und Größe in einem elektrischen Feld auftrennen. Während in nativen Gelen neben der Größe der Proteine hauptsächlich ihre Nettoladung einen Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld hat, enthalten SDS-Gele das anionische Detergenz SDS, das mit seiner Bindung an Proteinen nicht nur denaturierend auf diese wirkt, sondern außerdem die natürliche Ladung der Proteine überdeckt. So erhalten die Proteine ein konstantes Ladungs- und Massenverhältnis, wodurch eine Auftrennung nach Proteinmasse möglich wird (Lämmli et al 1970).

Trenngelpuffer:

| | |
|------|------------|
| TRIS | 121,14 g/l |
|------|------------|

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt.

Sammelgelpuffer:

| | |
|------|------------|
| TRIS | 121,14 g/l |
|------|------------|

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6,8 eingestellt.

Kammerpuffer:

| | |
|-------------------|----------|
| TRIS | 3,0 g/l |
| Glycin | 14,4 g/l |
| 10%ige SDS-Lösung | 10 ml/l |

Proteinfärbelösung (Coomassie-Färbung):

| | |
|---------------------|----------|
| Ethanol | 500 ml/l |
| Eisessig | 100 ml/l |
| Coomassie Blue R250 | 500 mg/l |

Entfärbelösung (Coomassie-Färbung):

| | |
|----------|----------|
| Eisessig | 70 ml/l |
| Ethanol | 100 ml/l |

Fixierlösung (Silberfärbung):

| | |
|----------|----------|
| Ethanol | 500 ml/l |
| Eisessig | 100 ml/l |

Für die Herstellung eines 12,5 %iger Acrylamid-Trenngels wurden 1,1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ mit 1,5 Trenngelpuffer und 1,25 ml Acrylamid vermischt und entgast. Anschließend wurden 40 μl 10%ige SDS-Lösung, 3,3 μl TEMED und 32 μl einer 10%igen Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) hinzugefügt. Nach der Polymerisation wurde auf diese Trenngel-Schicht ein Sammelgel bestehend aus 1,23 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, 0,21 ml Sammelgelpuffer, 0,21 ml Acrylamid, 16,7 μl 10%ige SDS-Lösung, 1,7 μl TEMED und 17 μl 10%ige APS-Lösung gegossen.

Nach der Polymerisation wurde das Gel bis zur Verwendung bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert.

Das SDS-Gel wurde in der entsprechenden, mit Kammerpuffer gefüllten Gelkammer befestigt und mit den Proteinproben (22,5 μl mit 7,5 μl Probenpuffer Rotiload1 versetzt und bei 95 °C für 5 min erhitzt) befüllt. Als Größenstandard diente „PagerRuler™“ (Fermentas).

Wurden die Gele nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt, erfolgte eine 20minütige Inkubation mit der Proteinfärbelösung und eine weitere Inkubation für 20 min mit Entfärbelösung.

Bei Proteinlösungen mit einer zu erwartenden geringen Proteinkonzentration wurden die Acrylamidgele nach der Elektrophorese mit Hilfe des „Page Silver™ - Silver Staining Kit“ (Fermentas) gefärbt. Hierfür wurde das Gel nach Elektrophorese in die Fixierlösung überführt und für 60 min inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschriff mit 30%igem Ethanol für jeweils 20 min sowie eine Entfernung des Ethanols mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$. Die darauf folgende Färbung entsprach den Anweisungen des Herstellers.

2.7.4.2 Renaturierte Aktivitätsgele

Enzymaktivitäten können auch direkt nach einer elektrophoretischen Auftrennung nachgewiesen werden. Dieser Zymogramm-Technik liegt zugrunde, dass Enzyme in einem SDS-Gel erst ihrer Masse entsprechend aufgetrennt werden und anschließend – durch die Entfernung von SDS – wieder renaturiert und somit wieder aktiviert werden. Dadurch können Enzymaktivitäten nachgewiesen werden, indem das Gel auf ein für das Enzym katalysierbares Substrat gelegt wird. Dort wo eine enzymatische Reaktion stattfindet, ist die molekulare Masse des Enzyms einzuordnen.

Renaturierungspuffer:

| | |
|-------------------------------|----------|
| Isopropanol | 250 ml/l |
| Phosphatpuffer, 10 mM, pH 5,9 | 750 ml/l |

Substrat-Platte:

| | |
|-------------------------------|---------|
| Laminarin | 0,25 % |
| CalcoFluor-White ¹ | 0,001 % |
| Agarose | 2 % |
| Natriumacetatpuffer, pH 6 | 50 mM |

¹ nach dem Aufkochen und Abkühlen auf ca. 50 °C hinzugefügt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min in Renaturierungspuffer inkubiert. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 5.9) für je 20 min. Anschließend wurde das Gel auf die Substrat-Platte gelegt und bei 30 °C inkubiert. Die Enzymaktivität wurde unter UV-Licht als dunkler Hof sichtbar.

2.7.5 Isoelektrische Fokussierung

Proteine besitzen einen typischen isoelektrischen Punkt (pI) an dem ihre Nettoladung Null beträgt, da die Anzahl positiver und negativer Ladungen im Gesamtprotein gleich ist. Bei der isoelektrischen Fokussierung wird von niedermolekularen Ampholyten ein pH-Gradient aufgebaut. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes wandern die zwitterionischen Proteine zu dem pH-Wert, der ihrem pI entspricht. Demnach ist es möglich, Proteine bezüglich ihres isoelektrischen Punktes voneinander zu trennen (Awdeh et al 1968).

Fixierlösung:

| | |
|--------------------|------|
| Trichloressigsäure | 20 % |
|--------------------|------|

Serva Violet 17 Stammlösung 1:

| | |
|-----------------------------------|-----|
| Serva Violett 17-Pulver | 2 g |
| H ₂ O _{dest.} | 1 l |

Stammlösung 2:

| | |
|-----------------------------------|--------|
| 85%ige Phosphorsäure | 140 ml |
| H ₂ O _{dest.} | 860 ml |

Entfärbelösung:

| | |
|-----------------------------------|--------|
| 85%ige Phosphorsäure | 10 ml |
| H ₂ O _{dest.} | 990 ml |

Das IEF-Gel wurde auf die bereits auf 5 °C vorgekühlte Elektrophoreseeinheit gelegt. Die Elektrodendochte wurden mit Kathoden- bzw. Anodenflüssigkeit durchtränkt und auf die vorgeschriebenen Seiten des IEF-Gels angeordnet. Der Applikatorstreifen wurde mittig auf das Gel platziert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Spannungsgerätes eine Spannung von 2000 V (5 mA, 1 W) aufgebaut. War eine Spannung von 2000 V erreicht, wurden 8 µl der entsalzten Enzymlösung pro Tasche aufgetragen, sowie ein Proteinstandard (IEF-Marker 3-10, Serva).

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurde das Gel für 1 h in 200 ml Fixierlösung inkubiert und anschließend für 1 min in 200 ml Entfärbelösung. 100 ml der Stammlösung 1 wurden mit 100 ml der Stammlösung 2 vermischt und das Gel mit dieser Lösung überschichtet. Die Dauer der Färbung betrug 20 min. Danach wurde für etwa 10 min mit Entfärbelösung entfärbt bis der Hintergrund des Gels keine Färbung mehr aufwies. Das Gel wurde mit H₂O_{dest.} gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.7.6 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung erfolgte mittels Edman-Abbau (Edman und Begg 1967). Hierbei wird die N-terminale Aminosäure eines Peptids durch Phenylisothiocyanat markiert, abgespalten und mittels HPLC identifiziert. Dieser Zyklus lässt zehn bis 20 Wiederholungen zu, wodurch schrittweise eine Identifizierung des N-Terminus des zu untersuchenden Peptids herbeigeführt wird.

Die Sequenzierungen wurden von der Firma TopLab in Martinsried durchgeführt.

Als Vorbereitung für diese N-terminale Sequenzierung wurde die Enzymprobe mit Hilfe eines Semi-Dry-Blot-Verfahren (Kyhse-Anderson 1984) auf eine PVDF-Membran übertragen.

Kathodenpuffer:

| | |
|------------------|----------|
| TRIS | 0,30 g/l |
| Aminocaprinsäure | 0,52 g/l |
| Methanol | 20 ml/l |

Der pH-Wert wurde auf 9,4 eingestellt.

Anodenpuffer:

| | |
|----------|---------|
| TRIS | 3,6 g/l |
| Methanol | 20 ml/l |

Der pH-Wert wurde auf 10,4 eingestellt.

Färbelösung:

| | |
|----------------------|----------|
| Coomassie Blue R-250 | 1 g/l |
| Methanol | 500 ml/l |
| Essigsäure | 70 ml/l |

Entfärbelösung I:

| | |
|------------|----------|
| Methanol | 500 ml/l |
| Essigsäure | 70 ml/l |

Entfärbelösung II:

| | |
|------------|----------|
| Methanol | 900 ml/l |
| Essigsäure | 100 ml/l |

Zunächst wurde die Enzym-Probe mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.7.4.1). Die PVDF-Membran wurde für 1 h in Methanol, danach für 1 h im Kathodenpuffer gelegt. Auf die Edelstahlplatte der Blot-Apparatur wurden zwei in Kathodenpuffer eingeweichte Filterpapiere gelegt. Auf diese Filterpapiere folgte das Auflegen des SDS-Gels, gefolgt von der PVDF-Membran und zwei weiteren Filterpapieren (getränkt in Anodenpuffer). Der Transfer erfolgte bei 4 °C für 2 h. Die Stromstärke betrug 0,8 mA pro cm² Membran-Fläche. Nach der Übertragung der Proteine wurde die Membran in Wasser gewaschen und für 1 h in Methanol inkubiert. Dann folgte eine Proteinfärbung mit einer zweiminütigen Inkubation in der Färbelösung und einer anschließenden Entfärbung in den beiden Entfärbelösungen (je 10 min).

Die immobilisierten Proteinbanden auf der getrockneten PVDF-Membran konnten nun mit dem Skalpell ausgeschnitten und für eine N-terminale Sequenzierung verwendet werden.

2.7.7 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Messung von Enzymaktivitäten erfolgte an unterschiedlichen Substraten mit Hilfe verschiedener Methoden. Während die Darstellung der Enzymaktivität mittels Lochplatten aufgrund der leichten Handhabung bei hohen Probenaufkommen durchgeführt wurde, diente die Bestimmung von

reduzierenden Enden bzw. Zuckern (DNS-Test) einer quantitativen Aussage über die Enzymaktivität. Dünnschichtchromatographische Methoden wurden ebenfalls für ein Screening von Enzymaktivitäten verwendet sowie für eine Charakterisierung der Wirkungsweise.

2.7.7.1 Aktivitätstest mittels Plattendiffusionstests

Qualitative Bestimmung des Laminarin-Abbaus durch eine β -1,3-Glucanase

Laminarin aus der Braunalge *Laminaria digitata* ist ein β -1,3-verknüpftes Glucan aus 20 bis 30 Glucose-Einheiten. Pro Polymer kommen durchschnittlich 1,3 Seitenketten vor, bestehend aus einem β -1,6-verknüpften Glucoserest (Read et al 1996). Aufgrund seiner geringen Größe, Wasserlöslichkeit und – bedingt durch seinen kommerziellen Vertrieb – Reinheit eignet sich dieses Polymer besonders gut für die Analyse von Endo- β -1,3-Glucanasen.

In dieser Arbeit wurde Laminarin mit Hilfe von CalcoFluor-White angefärbt. CalcoFluor-White wird im Allgemeinen angewendet, um Zellwandbestandteile in Pilzen, Algen und höheren Pflanzen zu untersuchen, da es eine hohe Affinität zu den Polymeren Chitin und Cellulose zeigt. Auch andere Polymere können von CalcoFluor-White gefärbt werden (Herth und Schnepf 1980). Calcofluor-White wurde schon für die Detektion von Chitinasen verwendet (Zou et al 2002, Gohel et al 2004) und wurde in dieser Arbeit für die Untersuchung der Hydrolyse von Laminarin durch eine β -1,3-Glucanase verwendet.

Substrat-Platte:

| | |
|-------------------------------|---------|
| Laminarin | 0,25 % |
| CalcoFluor-White ¹ | 0,001 % |
| Agarose | 2 % |
| Natriumacetatpuffer (pH 6,0) | 50 mM |

¹ nach dem Aufkochen und Abkühlen auf ca. 50 °C hinzugefügt.

Die noch flüssige, Laminarin und CalcoFluor-White enthaltene Agarose-Lösung wurde in Petrischalen gegossen. Nach Erkalten wurden Löcher ausgestanzt und diese mit 50 μ l Enzymlösung befüllt. Es folgte eine Inkubation bei 30 °C. Ein Laminarin-Abbau konnte als dunkler Hof um den Auftrageort bei Betrachtung unter UV-Licht detektiert werden.

Als Kontrolle wurde hitzeinaktivierte Enzymlösung verwendet.

Bestimmung der Hefezell-Lyse durch lytische Enzyme mittels Plattendiffusionstests

Für eine Untersuchung einer größeren Anzahl von Mikroorganismen auf ihre Sensitivität gegenüber lytischen Enzymen eignen sich Lochplattentests aufgrund ihrer schnellen Durchführbarkeit besonders. Hierbei werden die zu lysierenden Zellen in Agarose eingegossen und die zu untersuchende Enzymlösung in zuvor gefertigte Löcher gestanzt, sodass diese zu den Zellen diffundieren und diese lysieren können (Bauer 2002, Blättel 2008). Im Zuge dieser Arbeit zeigte sich die Notwendigkeit der Verwendung von intakten Hefezellen, da Enzyme zwar die Zellwand beschädigter Zellen (etwa durch Gefriertrocknung und Autoklavieren) angreifen können, dies aber keine Aussage macht über ihre Lyse-Leistung an intakten Zellen.

Daher wurden aus einer Vorkultur Hefezellen abzentrifugiert und in 10 mM Phosphatpuffer (pH 5,9) gewaschen. Die Zellen wurden mit aufgekochter und auf 50 °C abgekühlter 2%iger Agarose-Lösung (in 10 mM Phosphatpuffer, pH 5,9) vermischt, sodass eine deutliche Trübung erkennbar war. 4 ml wurden auf einen Mikroskopier-Objektträger gegeben. Nach Erkalten der Agarose wurden Löcher ausgestanzt und diese mit 20 µl Enzymlösung befüllt. Es folgte eine Inkubation bei 30 °C in einer feuchten Kammer. Eine lytische Wirkung der Enzymlösung konnte als heller Hof um den Auftragehof detektiert werden.

Als Kontrolle wurde hitzeinaktivierte Enzymlösung verwendet.

2.7.7.2 Photometrische Aktivitätstests

Die Wirkung von Enzymlösungen auf ganze Zellen wurde quantitativ mittels Photometer bestimmt (Gacto et al 2000). Hierbei zeigte eine Abnahme der optischen Dichte (578 nm) einer Hefe-Suspension nach Zugabe von Enzymlösung eine lytische Aktivität der Enzyme an. Diese wurde ausgedrückt als prozentuale Abnahme der Zellsuspension im Vergleich zu einer Kontrolle (hitzeinaktivierte Enzymlösung).

Für den Test wurden Zellen einer 18 h alten Hefekultur abzentrifugiert und in 10 mM Natriumcitratpuffer (pH 4,0) gewaschen und in soviel dieses Puffers erneut aufgenommen, um eine optische Dichte von etwa 1,5 zu erreichen. Diese Zellsuspension (125 µl) wurde mit 100 µl Enzymlösung vermischt. Um Kontaminationen während der Inkubation zu vermeiden wurde analog zu Fleet und Phaff (1974) 25 µl Natriumazid (0,1 %) hinzugefügt.

Nach einer Inkubation wurde Triton-X mit einer finalen Konzentration von 0,1 % hinzu gegeben und für 15 min erneut inkubiert. Dieser Schritt sollte bei angegriffenen Zellen mit beschädigter Zellwand zu einer vollständigen Lyse führen, da bekannt ist, dass Hefen auch bei einem starken enzymatischen Abbau ihrer Zellwand die optische Dichte nur bedingt verringern (Mann et al 1978). Für eine Absicherung dieser Methode wurde die Vitalität von intakten Zellen ohne und mit Zugabe

von Triton-X untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass Triton-X keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit gesunder Zellen hat. 200 µl der inkubierten und mit Triton-X versetzten Zellsuspension wurde in Mikrotiterplatten gefüllt und die optische Dichte bei 578 nm bestimmt.

2.7.7.3 DNS-Test

Quantitativ wurde die durch Enzyme katalysierte Hydrolyse von Zuckerpolymeren mit Hilfe des DNS-Tests bestimmt (Miller 1959). Bei dieser kolorimetrischen Methode verursachen die reduzierenden Zucker in einer Probe eine Reduktion von 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) zu 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure, was sich photometrisch mit einer Extinktion bei 575 nm messen lässt.

So konnte der Abbau verschiedenster Zuckerpolymere durch Enzymlyse gemessen werden. Einen Überblick über die untersuchten Polymere sowie ihre chemische Zusammensetzung gibt Tabelle 2.17.

Tabelle 2.17: Auflistung der verwendeten Polymere und ihre Struktur.

| Polymer | Verknüpfung der Monomere ¹ |
|--|---|
| Laminarin | β-1,3:β-1,6 (Glc) |
| Cm-Pachyman | β-1,3 (Glc) |
| Xylan | β-1,4 (Xyl) |
| Pustulan | β-1,6 (Glc) |
| Cm-Cellulose | β-1,4 (Glc) |
| Dextran | α-1,6 (Glc) |
| Zellwand von Hefen | β-1,3:β-1,6 (Glc) / α-1,6: α-1,2 (Man) / β-1,4 (GlcNac) |
| Exopolysaccharid von <i>Botrytis cinerea</i> | β-1,3:β-1,6 (Glc) |

¹ Glc=Glucose, Xyl=Xylose, Man=Mannose, GlcNac=N-Acetylglucosamin

Substratlösung:

Je nach Versuch variierte die Zusammensetzung der Substratlösungen.

Als Standardtest wurden 0,25 % des zu untersuchenden Polymers (Laminarin, Mannan, etc.) in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 6,0) gelöst.

Für die Bestimmung des pH-Optimums der β -1,3-Glucanase wurde Laminarin in unterschiedlichen Puffern gelöst. Hierbei wurden für die pH-Werte 3,0 bis 4,0 Natriumcitratpuffer (50 mM), für die pH-Werte 4,5 bis 6,0 Natriumacetatpuffer (50 mM) und für die pH-Werte 7,0 und 8,0 Tris-HCl (50 mM) verwendet.

Die Aktivität der β -1,3-Glucanase unter weinrelevanten Bedingungen wurde bestimmt, indem der Laminarin-Lösung verschiedene Konzentrationen von Ethanol (1, 5, 10 und 17,5 % v/v) und Kaliumdisulfit (10, 50 und 100 mg/l) zugegeben wurde. Ebenso wurde verfahren, um den Einfluss phenolischer Verbindungen auf die Enzymaktivität zu untersuchen: Ein Gemisch aus Ferulasäure, Gallussäure und Catechin wurde in Endkonzentrationen von 5, 10 und 40 mg/l zugesetzt.

DNS-Reagenz:

| | |
|---------------------------------|---------|
| 3,5-Dinitrosalicylsäure | 10 g/l |
| NaOH | 20 g/l |
| Phenol | 2 g/l |
| Na ₂ SO ₃ | 0,5 g/l |
| K/Na-Tartrat | 400 g/l |

K/Na-Tartrat und NaOH wurden in 300 ml H₂O_{dest.} gelöst und unter Rühren und Erwärmung portionsweise 3,5-Dinitrosalicylsäure hinzu gegeben. Anschließend folgten die Zugabe von Phenol und Na₂SO₃ sowie das Auffüllen mit H₂O_{dest.} auf 1l.

Der DNS-Testansatz betrug 450 μ l der jeweiligen Substratlösung sowie 125 μ l H₂O_{dest.} und 125 μ l Enzymlösung. Nach erfolgter Inkubation wurden 50 μ l einer Glucoselösung (1 mg/ml) und 750 μ l DNS-Reagenz hinzugegeben. Es folgte ein 15minütige Inkubation der Probe im kochenden Wasserbad. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 575 nm bestimmt. Als Kontrolle diente ein identischer Versuchansatz mit hitzeinaktivierter Enzymlösung.

Die entsprechende Enzymaktivität wurde wie folgt definiert:

Ein Unit entspricht der Enzymmenge, die die Freisetzung von einem μ mol reduzierender Zucker in Form von Glucose (oder Mannose) pro Minute unter Standardbedingungen katalysiert.

Auch wasserunlösliche Polymere – wie die Zellwände verschiedener Hefe – wurden auf ihre Hydrolyse mittels DNS-Test überprüft. Hierfür wurden 0,25 % Substrat in 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 6,0) gegeben und mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Parameter: Output Control 6, Duty Cycle 60 %, Zeit 4 min) in eine stabile Suspension überführt, um so eine gleichmäßige Verteilung der

unlöslichen Polymere in die einzelnen Reaktionsgefäße zu gewährleisten. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Versuchsansatz wurden 550 µl dieser Polymersuspension mit 125 µl H₂O_{dest.} und 125 µl Enzymlösung inkubiert. Der Inkubation folgte ein Zentrifugationsschritt (14 000 x g, 15 min), um weiterhin unlösliche, große Fragmente vom Überstand abzutrennen. Mit 700 µl dieses Überstandes wurde wie oben verfahren.

2.7.7.4 Dünnschichtchromatographie

Die Hydrolyse-Produkte verschiedenster Polymere wurde auch dünnschicht-chromatographisch untersucht, da diese Methode die Möglichkeit bietet, kurzkettige Zuckeroligomere zu detektieren (Stahl 1967).

Sprühreagenz:

| | |
|----------------------|----------------|
| Ethanol | 90 ml |
| Anisaldehyd | 5 ml |
| Schwefelsäure, konz. | 5 ml |
| Essigsäure | einige Tropfen |

Die zu untersuchende enzymatische Reaktion wurde wie folgt angesetzt: Hundert Mikroliter einer wässrigen Polymerlösung (2 mg/ml) wurden mit 25 µl Natrium-Acetatpuffer (50 mM, pH 6,0) und 25 µl Enzymlösung inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben à 10 µl auf Kieselgel-Platten getropft. Als Kontrollen wurde zum einen die reine Polymerlösung als auch ein Versuchsansatz mit hitzeinaktiviertem Enzym mitgeführt, um zu gewährleisten, dass weder durch das zugesetzte Polymer noch durch die Enzymlösung Zuckermonomere in den Reaktionsansatz gebracht wurden.

Die Chromatographie erfolgte mit einem Laufmittel bestehend aus Butanol, Ethanol und Wasser im Verhältnis 5:3:2. Anschließend wurde die Platte getrocknet und mit dem Sprühreagenz besprüht. Nach nochmaligem Luftrocknen wurde die Platte schließlich bei 100 °C für einige Minuten entwickelt bis eine charakteristische Färbung entstand. Hierbei zeigte Glucose eine Blau-, Mannose eine Grün-Färbung.

2.8 Sonstige Methoden

2.8.1 Analyse der Zellwand von Hefen mittels mikroskopischer Methoden

Der Abbau der Zellwand durch die β -1,3-Glucanase wurde zum einen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops, zum anderen rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Fluoreszenzmikroskop

Wie schon in 2.7.7.1 erwähnt, dient der Fluoreszenzfarbstoff CalcoFluor-White auch der Analyse von Zellwandbestandteilen von Hefen (Plasek und Hoskova 2010).

Hierfür wurden Zellen analog zu 2.7.7.2 mit Enzymlösung versetzt. Nach einer 24stündigen Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen abzentrifugiert und in 50 μ l CalcoFluor-White-Lösung (0,01% in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 6.0) aufgenommen. Nach 30minütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe des DAPI-Filters „DAPI-B“ untersucht, wobei CalcoFluor-White eine Anregung von 440 nm und eine Emission von 510 nm aufweist (Röder 2007). Als Kontrolle diente ein identischer Versuchsansatz mit hitzeinaktiviertem Enzym.

Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) erlaubt aufgrund seiner großen Schärfentiefe die genaue Analyse von Oberflächen. Hier sollte die Oberfläche von Hefezellen nach Inkubation mit Enzymlösung untersucht werden.

Dafür wurden – wie unter 2.7.7.2 – Zellen mit Enzymlösung versetzt und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle diente wieder ein Ansatz mit hitzeinaktiviertem Enzym. Die Zellen wurde abzentrifugiert und für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet, d.h. chemisch fixiert, entwässert und getrocknet, um die Struktur der Zellen zu erhalten. Diese Arbeiten wurden am Institut für funktionelle und klinische Anatomie, Universität Mainz, durchgeführt. Einer ersten Fixierung mit 2,5 % Glutaraldehydlösung (in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) für 24 h folgte eine Nachfixierung mit 1 % gepuffertem Osmiumtetroxid für 1 h. Die anschließende Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Aceton-Reihe (30 bis 100 %). Da eine Lufttrocknung der Proben zu einer zu starken Oberflächenspannung an der Grenzfläche und zu einer Zerstörung der Zellstruktur führen würde, wurde eine „Kritisch-Punkt-Trocknung“ durchgeführt. Hierbei wird das durch die Entwässerung eingebrachte Aceton vollständig durch Kohlenstoffdioxid ausgetauscht, das mit einem kritischen Punkt von 31 °C und 73 bar bei Erwärmung auf diese Temperatur in die Gasphase übergeht, wodurch die Proben schadfrei getrocknet werden.

Die eigentliche Mikroskopie wurde an einem ESEM-Elektronenmikroskop (XL30) der Firma Philips am Institut für funktionelle und klinische Anatomie durchgeführt.

2.8.2 Quantitative Bestimmung von Zuckern, Säuren und Alkoholen

Für die Analyse von Zuckern, Säuren und Alkoholen – etwa in Traubensaft und gärendem Wein – wurde eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet. Mit Hilfe eines automatischen Probengebers kann die Probe entlang einer stationären Phase (hier Säule „Animex HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm“) wandern und wird schließlich mit Hilfe eines Detektorsystems (hier ein Refraktometer) erkannt.

Für die Herstellung der mobilen Phase (0,013 N Schwefelsäure) wurde zuvor ddH₂O sterilfiltriert und für 25 min im Exsikkator unter Vakuum entgast, bevor Schwefelsäure für eine finale Konzentration von 0,013 N hinzugefügt wurde.

Die zu analysierenden Proben wurde durch Zentrifugation (14000 x g, 30 min) von Partikeln befreit und direkt oder in entsprechenden Verdünnungen in der HPLC analysiert.

2.8.3 Zellwandpräparation

Für eine Untersuchung der zellwand-hydrolysierenden Eigenschaften der eingesetzten Enzyme wurden Zellwände von verschiedenen Hefen isoliert. Hierbei wurde nach dem Protokoll von Schleifer und Kandler (1967) vorgegangen. Hefezellen wurden insgesamt 48 h in GYP-Medium bei 30 °C schüttelnd kultiviert und durch Zentrifugation vom Kulturmedium getrennt. Die Zellen wurden mit so vielen Glasperlen vermischt bis eine zäh-flüssige Konsistenz entstand. Hiermit erfolgte der Zellaufschluss in einem gekühltem Zellhomogenisator (Firma Bühler) für 20 min. Wurden danach noch intakte Zellen im Mikroskop erkannt, wurde ein erneuter Zellaufschluss durchgeführt. Schließlich wurden die Zellfragmente mit Hilfe eines Büchnertrichtes und Filterpapier von den Glasperlen entfernt, wobei die Glasperlen gründlich mit Wasser gewaschen wurden.

Es folgten drei Waschschrte der rohen Zellwände mit Wasser (15000 x g, 30 min), bevor das Pellet in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,8) aufgenommen und diese Suspension mit 0,5 mg/ml Trypsin und einigen Tropfen Toluol versetzt wurde. Nach 20stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellwände erneut gründlich mit Wasser gewaschen (15000 x g, 30 min, vier Wiederholungen). War sensorisch noch Toluol in der Probe zu detektieren, wurden die Zellwände kurz auf etwa 120 °C erhitzt, um das restliche Toluol zu verflüchtigen. Anschließend wurde die Probe eingefroren und gefriergetrocknet.

2.8.4 Präparation des extrazellulären Glucans von *Botrytis cinerea*

Nach Kultivierung im Glucansynthese-Medium wurden die Zellen durch Zentrifugation (10000 x g, 90 min) entfernt. Der Überstand wurde mit dem dreifachem Volumen Ethanol über Nacht bei 4 °C gefällt. Das präzipitierte Exopolysaccharid wurde bei 4000 x g für 20 min abzentrifugiert, in wenig

$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ aufgenommen und gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ für 24 h dialysiert. Hierbei wurde auf einen häufigen Wechsel des Dialyse-Wassers geachtet, um später störende Zuckerbestandteile des Mediums vollständig zu entfernen. Es folgte eine Gefriertrocknung des Polymers.

Mittels Dünnschichtchromatographie wurde eine erfolgreiche Dialyse des Polymers überprüft. Da nach der Präparation eine Wasserlöslichkeit des Polymers nicht mehr vorlag, wurde der modifizierte DNS-Test für unlösliche Polymere verwendet (s. 2.7.7.3).

3 ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Teile. In einem ersten Teil werden Ergebnisse über die Differenzierung von *Saccharomyces*-Spezies aus der *sensu stricto*-Gruppe vorgestellt. Es folgt die Darstellung eines quantitativen PCR-Systems für die Zellzahlbestimmung der Gattungen *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* und *Brettanomyces* während der Weinbereitung. Der letzte Teil umfasst Untersuchungen eines Enzyms, das die Zellwand von Hefen angreift, und dessen möglicher Einsatz während der Weinbereitung.

3.1 Einordnung von Hefe-Stämmen in die *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe

3.1.1 Etablierung der Fingerprinting-Methode SAPD-PCR

Saccharomyces-Spezies aus dem nahverwandten *sensu stricto*-Komplex sind physiologisch gar nicht und molekularbiologisch oft schwer zu identifizieren und zu klassifizieren. Die bei der Taxonomie von Hefen übliche Sequenzierung der 5.8S rDNA und ihre flankierenden ITS-Regionen kann hier nicht immer eindeutige Unterschiede zwischen einzelnen Arten aufzeigen. Auch in dieser Arbeit wurden Sequenzen verschiedener *Saccharomyces*-Spezies aus der institutseigenen Stammsammlung mit bekannten Sequenzen aus Datenbanken verglichen, um einen phylogenetischen Stammbaum zu generieren (Abbildung 3.1).

Insgesamt konnte nach der Stammbaumkonstruktion zwei große Cluster unterschieden werden, die auf der einen Seite die Spezies *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus* und *S. mikatae* umfassten und auf der anderen die Arten *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. kudriavzevii* und *S. arboricolus*. Die einzelnen Arten können zwar voneinander getrennt werden und bilden mit Stämmen aus der institutseigenen Stammsammlung eigene Cluster, jedoch ist die phylogenetische Distanz gering. Eine Ausnahme in der Gruppierung auf Art-Niveau zeigen *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces pastorianus* und Hybride aus *Saccharomyces bayanus* und *cerevisiae*. Hier konnte kein artspezifisches Cluster gebildet werden. Vielmehr sind die Sequenzen des Typstamms von *Saccharomyces bayanus* und *Saccharomyces pastorianus* identisch, ein Umstand der durch den Hybridcharakter von *S. pastorianus* (Hybrid aus *S. bayanus* und *S. cerevisiae*) zu erklären ist. Auf der anderen Seite war die Sequenz des aus Wein isolierten *Saccharomyces bayanus*-Stamms 24.3 identisch mit den Sequenzen der Hybrid-Stämme CBS 8614 und 3211-2. Hierbei muss erwähnt werden, dass Stamm 24.3 und Stamm 3211-2 aus dem gleichen Weingut isoliert wurden. Eine nähere Charakterisierung der Stämme aus diesem Weingut sowie eine genauere Betrachtung der Einordnung von Interspezies-Hybriden findet sich im Kapitel 3.1.3.

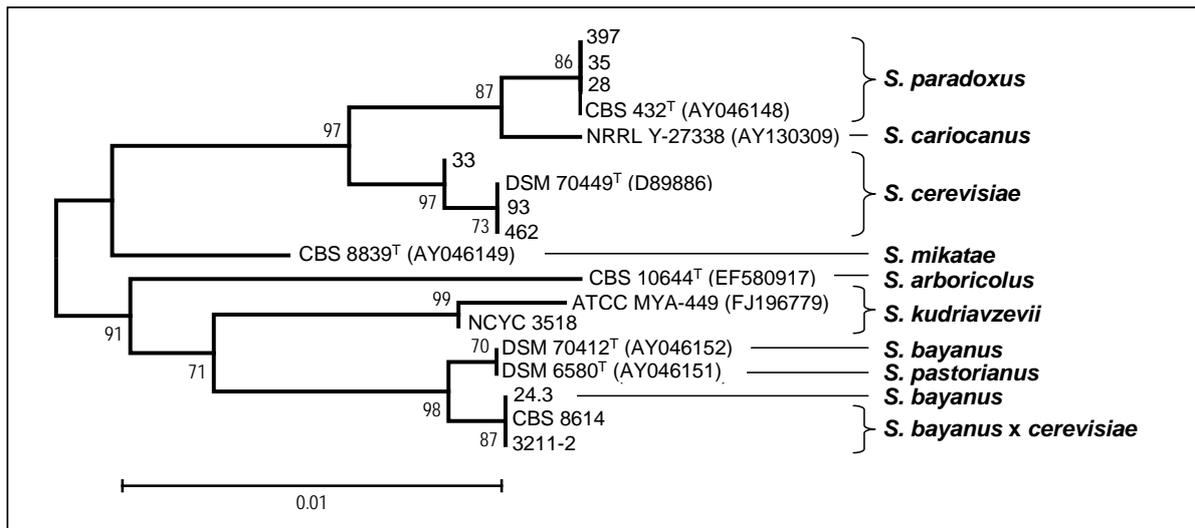


Abbildung 3.1: Phylogenetischer Stammbaum von Arten der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe.

Als zu vergleichende Sequenz diente die 5.8S rDNA und ihre benachbarten ITS-Regionen. Als statistische Methode wurde Neighbor-Joining verwendet, das Substitutionmodell war das Jukes-Cantor-Modell. Grundlage waren 18 Nukleotid-Sequenzen mit je 730 Positionen. Bootstrap-Werte (100 Replikate) sind in den Ast-Verzweigungen dargestellt. Der Maßstab entspricht einer phylogenetischen Distanz von 1 %. Wenn vorhanden sind Accessionnummern bei der jeweiligen Stammbezeichnung in Klammern aufgeführt. Typstämme sind mit einem T gekennzeichnet.

Die Arten der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe wiesen also in diesem Fall eine hohe Ähnlichkeit auf. Da sie aber meist größere, artspezifische Unterschiede bei DNA-DNA-Hybridisierungsversuchen zeigen, könnte eine Fingerprinting-Methode, die das gesamte Genom umfasst, größere Unterschiede zwischen den Arten feststellen.

Am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung wurde eine solche Methode von Pfannebecker (2005) entwickelt, mit deren Hilfe bereits erfolgreich verschiedene Mikroorganismen taxonomisch eingeordnet und auch phylogenetisch untersucht werden konnte (Pfannebecker 2008). Diese so genannte „Specific Amplified Polymorphic DNA – PCR“ (SAPD-PCR) beruht wie auch andere Fingerprinting-Methoden auf der Generierung von PCR-Produkten mit Hilfe von relativ unspezifisch bindenden Primern. Das so entstehende Bandenmuster von PCR-Produkten kann als Vergleich zwischen Arten dienen.

Abbildung 3.2 zeigt die elektrophoretische Auftrennung von mit Hilfe der SAPD-PCR erzeugten DNA-Amplifikaten verschiedener *Saccharomyces*-Stämme von. Es wurden insgesamt drei PCR-Ansätze durchgeführt mit den jeweiligen Primern „A-Not“, „C-Not“ und „G-Not“.

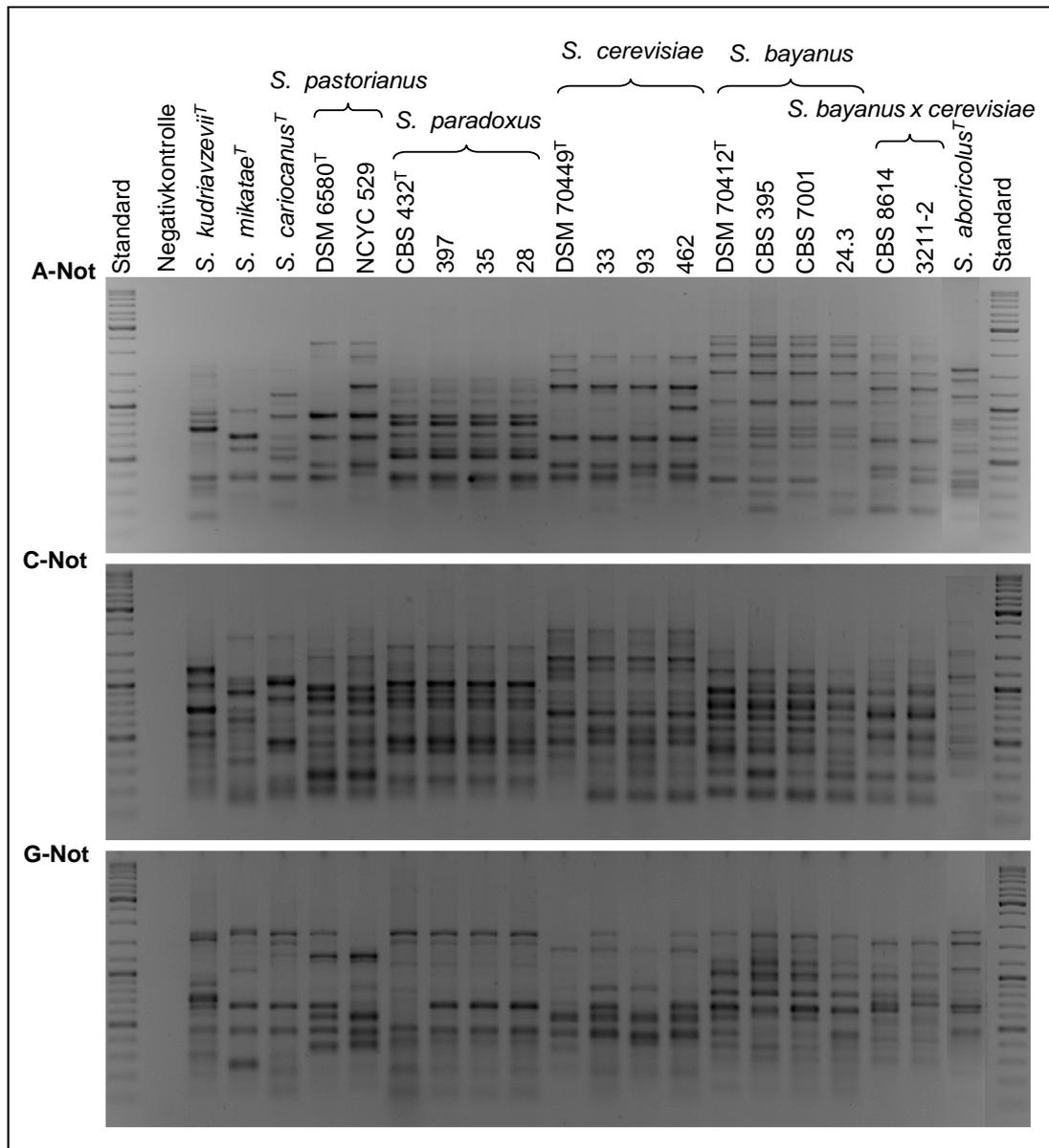


Abbildung 3.2: Durch SAPD-PCR generiertes Bandenmuster von *Saccharomyces*-Spezies der *sensu stricto*-Gruppe. Gezeigt werden SAPD-PCRs mit den verschiedenen Primern „A-Not“, „C-Not“ und „G-Not“ nach elektrophoretischer Auftrennung. Als Elektrophorese-Standard wurde GeneRuler DNA-Ladder-Mix (Fermentas) verwendet. Die Auftrennung der PCR-Produkte von *S. arboricolus*^T erfolgte separat und wurde hier eingefügt.

Bei der Verwendung jedes Primers konnten die acht Arten der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe anhand ihres Bandenmusters unterschieden werden.

Auch von den Arten *Saccharomyces kudriavzevii*, *S. mikatae* und *S. cariocanus* wurden verschiedene Stämme untersucht, um auch hier das Vorhandensein von speziesspezifischen Mustern zu überprüfen (Abbildung 3.3). Leider war es nicht möglich mehrere Stämme der relativ neuen Spezies *Saccharomyces arboricolus* einzusetzen, da nur der Typstamm käuflich zu erwerben war.

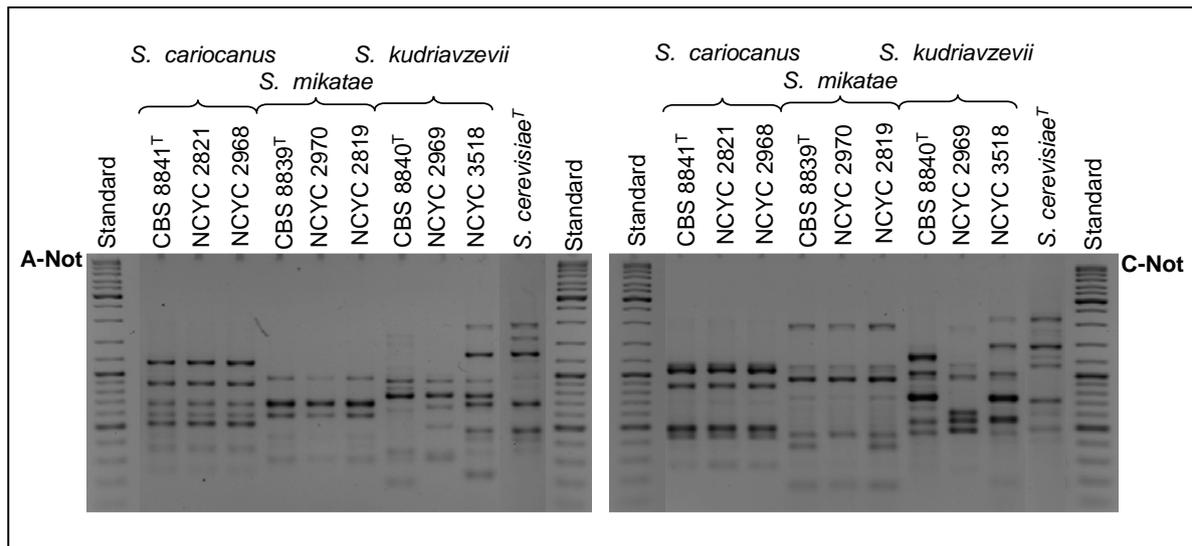


Abbildung 3.3: Vergleich der durch SAPD-PCR generierten Bandenmuster von verschiedenen Stämmen der Arten *Saccharomyces cariocanus*, *S. mikatae* und *S. kudriavzevii*. Gezeigt werden SAPD-PCRs mit den Primern „A-Not“ und „C-Not“ nach elektrophoretischer Auftrennung. Als Elektrophorese-Standard wurde GeneRuler DNA-Ladder-Mix (Fermentas) verwendet. Die Auftrennung der PCR-Produkte von *S. cerevisiae*^T wurde eingefügt, um einen Vergleich ziehen zu können.

Das Auftreten sowie die Verteilung von PCR-Produkten nach der elektrophoretischen Auftrennung waren bei Vertretern einer Art sehr ähnlich. Teilweise zeigten Stämme zusätzliche Banden (wie etwa der Typstamm von *Saccharomyces cerevisiae* bei der PCR mit „A-Not“) oder das Fehlen von Banden (wie etwa der Typstamm von *Saccharomyces paradoxus* bei der PCR mit „G-Not“) (s. Abbildung 3.2). Diese Unterschiede werden allerdings durch die größere Anzahl gemeinsamer Banden vernachlässigbar. Jeder Art innerhalb der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe war ein typisches Muster zuzuordnen, was besonders bei der Verwendung des Primers „A-Not“ deutlich wurde. Eine PCR mit dem Primer „G-Not“ führte zu einer höheren Variabilität des Bandenmusters bei verschiedenen Stämmen einer Art, wie am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae* zu erkennen war. Hier schienen der Typstamm und der Institutsstamm 93 ein gemeinsames Bandenmuster zu besitzen, sowie die Institutsstämme 33 und 462. Insgesamt führte also die Verwendung der Primer „A-Not“ und „C-Not“ zu besonders stabilen speziesspezifischen Bandenmustern. Dies konnte auch bei Stämmen der Arten *S. mikatae* und *S. cariocanus* gezeigt werden (s. Abbildung 3.3). Hier konnten im Fall von *S. cariocanus* keine stammspezifischen Unterschiede festgestellt werden, wohingegen die Stämme von *S. mikatae* bei Verwendung der Primer „C-Not“ leichte Varianzen zeigten. Anders verhielt es sich mit Stämmen von *Saccharomyces kudriavzevii*. Gerade der Stamm NCYC 3518 zeigte zwar ebenfalls *S. kudriavzevii*-spezifische Banden, allerdings wies der Stamm auch große Übereinstimmungen mit *S. cerevisiae* auf (siehe dafür auch 3.1.3).

Um die taxonomische Einordnung der *Saccharomyces*-Spezies auf Grundlage der oben beschriebenen DNA-Sequenzen einerseits und auf Grundlage des SAPD-Fingerprinting-Musters andererseits vergleichen zu können, wurden die SAPD-Bandenmuster mit Hilfe der Software „Bio 1D“ ausgewertet und in eine Matrix konvertiert, wodurch die Konstruktion eines Stammbaums möglich war (Abbildung 3.4).

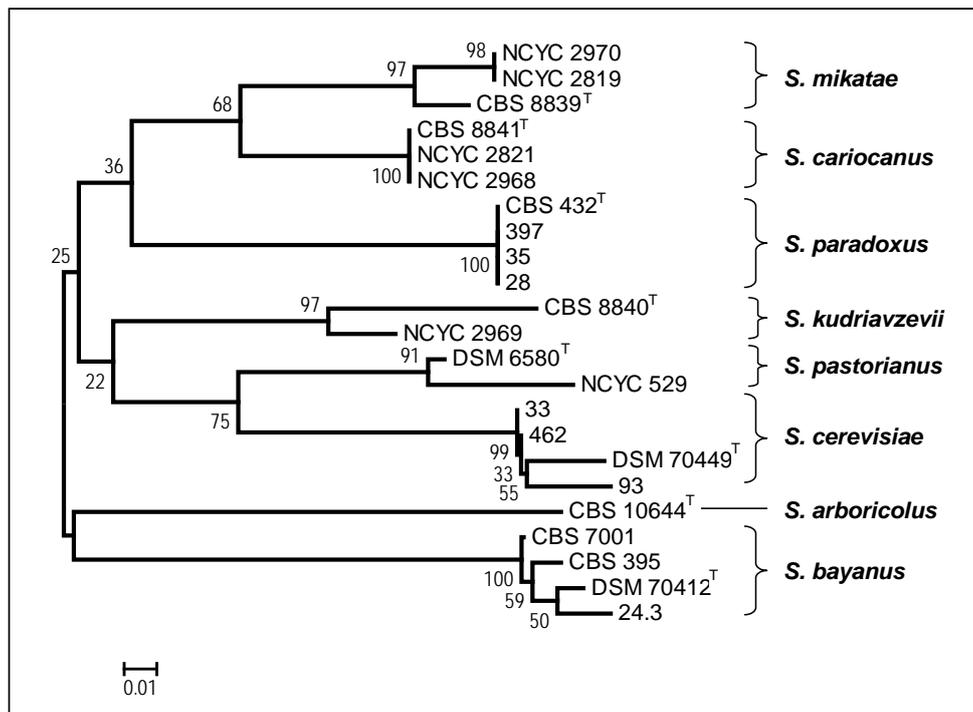


Abbildung 3.4: Cluster-Analyse von Spezies der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe auf der Basis der Fingerprinting-Methode SAPD-PCR. Es wurden PCRs mit den Primern „A-Not“ und „C-Not“ durchgeführt, die PCR-Amplifikate elektrophoretisch aufgetrennt und die entstandenen DNA-Banden zueinander verglichen. Unterschiede im Bandenmuster wurden ausgewertet und in eine 1/0-Matrix konvertiert. Als statistische Methode wurde Neighbor-Joining verwendet, das Substitutionmodell war das Jukes-Cantor-Modell. Grundlage waren Bandenmuster von 23 Stämmen, resultierend in je 125 Positionen. Bootstrap-Werte (100 Replikate) sind in den Ast-Verzweigungen dargestellt. Der Maßstab entspricht einer Distanz von 1 %. Typstämme sind mit einem T gekennzeichnet.

Die hier gezeigte Clusteranalyse auf Grundlage der SAPD-PCR zeigte im Vergleich zu dem auf ITS- und 5,8S-rDNA-Sequenz basierenden Stammbaum (s. Abbildung 3.1) zunächst deutlich größere Unterschiede und damit eine höhere Auflösung zwischen den einzelnen Arten, was an den verwendeten Maßstäben mit 1 % Distanz deutlich wird. Dies ist natürlich auf die Auswirkung von eine größeren Anzahl variabler Positionen bei einer gleichzeitig geringeren Anzahl von Gesamtpositionen auf Seiten der SAPD-PCR zurückzuführen. Die Cluster-Analyse der SAPD-PCR konnte alle Stämme einer Art einem Cluster zuweisen. Diese Spezies-Cluster waren deutlich von anderen Spezies-Clustern getrennt. Auch konnten die Spezies *Saccharomyces bayanus* und *S.*

pastorianus mit Hilfe der SAPD-PCR aufgelöst werden, was bei Analyse der ITS- und 5.8S rDNA-Sequenzen nicht gelang (s. Abbildung 3.1).

Insgesamt führten die Sequenzanalyse zum einen und die SAPD-PCR-Analyse zum anderen zu zwei unterschiedlich aufgebauten Stammbäumen. Während auch bei der SAPD-PCR die Arten *S. mikatae*, *S. cariocanus* und *S. paradoxus* eine Gruppe bildeten, wurde die nach Sequenzanalyse ebenfalls dieser Gruppe zugehörige Spezies *S. cerevisiae* hier in einem separaten Cluster mit *S. pastorianus* und *S. kudriavzevii* eingeordnet. *Saccharomyces arboricolus* und *Saccharomyces bayanus* bildeten nach SAPD-PCR-Analyse ein eigenes Cluster. Bei der Sequenzanalyse bildeten diese beiden Spezies zusammen mit *S. pastorianus* und *S. kudriavzevii* eine Gruppierung.

Die SAPD-PCR liefert also im Falle der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe eindeutigere Hinweise bezüglich der Spezies-Einordnung eines Stammes, als dies die gewöhnliche Sequenzierung und der Datenbank-Abgleich der ITS-5.8S-rDNA-Sequenz ermöglicht.

3.1.2 Art-Identifizierung von Instituts-Stämmen durch SAPD-PCR

Die Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung besteht seit Gründung des Instituts im Jahr 1966. Stämme der Gattung *Saccharomyces* wurden daher zum Teil vor Jahrzehnten isoliert und in dieser Stammsammlung hinterlegt. Eine Identifizierung erfolgte daher hauptsächlich durch eine physiologische Charakterisierung mit Hilfe des RapIDYeast Plus Systems (Remel). Da innerhalb der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe keine klare Unterscheidung bezüglich physiologischer Merkmale wie Substratverwertung gemacht werden können (Tornai-Lehoczki et al 1996b), sollten in dieser Arbeit *Saccharomyces*-Stämme aus der Stammsammlung neu klassifiziert werden. Dabei wurde als Methode die Fingerpinting-Methode SAPD-PCR herangezogen. Für eine Absicherung dieser Ergebnisse wurden zusätzlich ITS- und 5.8S rDNA-Regionen von Hefe-Stämmen sequenziert und mit der NCBI-Datenbank verglichen. War dies nicht der Fall wurde ein Restriktionsverdau des PCR-Amplifikats der 5.8S rDNA und den benachbarten ITS-Regionen mit Hilfe des Enzyms *HaeIII* durchgeführt. Mit Hilfe der entstandenen Restriktionsfragmente lässt sich die *sensu stricto*-Gruppe zumindest in zwei Cluster aufteilen. Hierbei bilden *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus* und *Saccharomyces cariocanus* die eine Gruppe (Typ I) und *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces kudriavzevii* und *Saccharomyces pastorianus* die andere (Typ II). Zusätzlich wurde mit entsprechenden Primern spezifische PCR-Produkte für *Saccharomyces cerevisiae* oder *Saccharomyces bayanus* erzeugt (Torriani et al 2004, s. 2.6.3.4), so dass hier eine zusätzliche Einordnung der Stämme möglich war.

Tabelle 3.1 zeigt die Identifizierung der untersuchten Hefen.

Tabelle 3.1: Art-Identifizierung von *Saccharomyces*-Stämmen aus der Stammsammlung des Instituts. Gezeigt wird die ursprüngliche Klassifizierung bei Hinterlegung in der Stammsammlung, die mögliche Reklassifizierung durch die Identifizierung mittels SAPD-PCR sowie – wenn vorhanden – das Ergebnis der BLAST-Suche mit ITS- und 5.8S rDNA-Sequenzen in der NCBI-Datenbank, das Restriktionsmuster dieses PCR-Amplifikats (Typ I, Typ II, siehe Erklärungen S. 74) und die Einordnung aufgrund eines artspezifisches PCR-Produkts für *S. cerevisiae* bzw. *S. bayanus* (nach Torriani et al 2004). (nd= nicht durchgeführt)

| Stamm | hinterlegt als | SAPD-Identifizierung ¹ | ITS-/5.8S rDNA BLAST ² | Restriktionsmuster | Einordnung durch PCR-Produkt |
|--------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------------|
| 2/6-2 | <i>S. bayanus</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | Typ I | <i>S. cerevisiae</i> |
| 72 | <i>S. bayanus</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | Typ I | <i>S. cerevisiae</i> |
| 73 | <i>S. bayanus</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | Typ I | <i>S. cerevisiae</i> |
| 642 | <i>S. bayanus</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | Typ I | <i>S. cerevisiae</i> |
| 656 | <i>S. bayanus</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 2/5-68 | <i>S. boulardii</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 451C | <i>S. capensis</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 28 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. paradoxus</i> | <i>S. paradoxus</i> | Typ I | - |
| 29 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 33 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 35 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. paradoxus</i> | <i>S. paradoxus</i> | Typ I | - |
| 43 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 57 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. bayanus</i> | <i>S. bayanus</i> | Typ II | <i>S. bayanus</i> |
| 58 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 93 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | Typ I | <i>S. cerevisiae</i> |
| 101 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 149 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | Typ I | <i>S. cerevisiae</i> |
| 153 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 379 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 397 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. paradoxus</i> | <i>S. paradoxus</i> | Typ I | - |
| 461 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 462 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | Typ I | <i>S. cerevisiae</i> |
| 535 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | Typ I | <i>S. cerevisiae</i> |
| 536 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | nd | <i>S. cerevisiae</i> |
| 328 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | Typ I | <i>S. cerevisiae</i> |
| 559 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | nd | nd | <i>S. cerevisiae</i> |

¹ Die SAPD-PCR erfolgte in drei PCR-Ansätzen mit den Primern „A-Not“, „C-Not“ und „G-Not“.

² Die durch den Datenbankabgleich (BLAST) ermittelte Art gibt nur das Ergebnis mit der höchsten Sequenzidentität bei größter Sequenzlänge wider.

Nach SAPD-PCR-Analysen wurden die Stämme der *Saccharomyces*-Arten *boulardii* und *capensis* als *Saccharomyces cerevisiae* eingeordnet. Dies ist insofern nicht verwunderlich als dass *S. capensis* inzwischen der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* zugeordnet wird (s. auch Tabelle 1.1) und *S. boulardii* schon immer zu der Spezies *S. cerevisiae* gezählt wurde.

Von den sechs in der Stammsammlung hinterlegten *Saccharomyces bayanus*-Stämmen konnte in keinem Fall die Art-Zugehörigkeit bestätigt werden. Alle Stämme zeigten das typische Fingerprinting-Muster für *Saccharomyces cerevisiae*. Hierbei ist Stamm 72, der auch in der niederländischen Stammsammlung hinterlegt ist (Stamm CBS 429), inzwischen schon als *Saccharomyces cerevisiae* reklassifiziert worden. Die anderen als *Saccharomyces bayanus* hinterlegten Stämme sind alle Isolate aus Starterkulturen verschiedener Getränketechnologiefirmen. So wurde der Stamm 2/6-2 aus dem Präparat Hefix® 2000 der Firma Erbslöh isoliert. Diese Starterkultur wurde als *Saccharomyces bayanus* geführt, ist aber zwischenzeitlich als „*Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*“ umbenannt. Gleiches gilt für Stamm 642, der aus dem Trockenhefe-Präparat Lalvin DV10 der Firma Lallemand isoliert wurde. Allerdings ist die Bezeichnung „*cerevisiae* var. *bayanus*“ nicht etabliert. Der Stamm 656 entspricht der Starterkultur SIHA 4 der Firma Begerow und wird hier noch als *Saccharomyces bayanus* geführt.

Fünfzehn der als *Saccharomyces cerevisiae* identifizierten Institutshefen konnten auch hier als solche klassifiziert werden. Wohingegen drei *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme durch SAPD-PCR und Sequenzierung als *Saccharomyces paradoxus* identifiziert wurden. Der Stamm 28 ist eine sogenannte „Killer-Hefe“, wurde von Trauben isoliert und in der niederländischen Stammsammlung als CBS 8112 hinterlegt (Pfeiffer und Radler, 1982). Dort wird er auch noch als *Saccharomyces cerevisiae* geführt, wenn auch dort inzwischen Sequenzierungen der ITS-Region und der 26S rDNA auf *Saccharomyces paradoxus* schließen lassen und somit die hier erbrachten Ergebnisse bestätigen. Stamm 35, der ebenfalls als Killer-Hefe in der amerikanischen Stammsammlung als ATCC 48429 hinterlegt ist, wurde dort noch nicht molekularbiologisch überprüft und wird als *Saccharomyces cerevisiae* geführt. Gleiches gilt für den Institutsstamm 397, der in der englischen Stammsammlung als NCYC 1026 hinterlegt ist und ebenfalls noch als *Saccharomyces cerevisiae* geführt wird.

Der als *Saccharomyces cerevisiae* hinterlegte Stamm 57 zeigte ein *Saccharomyces bayanus*-Muster und auch durch eine Sequenzierung konnte die Art *Saccharomyces cerevisiae* relativ klar ausgeschlossen werden, da Datenbankabgleiche die Zugehörigkeit zu *Saccharomyces bayanus* oder *Saccharomyces pastorianus* lieferten. Zusätzlich zeigte die PCR mit artspezifischen Primern lediglich ein für *Saccharomyces bayanus* typisches PCR-Produkt und keines, das der Art *Saccharomyces cerevisiae* angehört. Stamm 57 ist in der Institutssammlung zwar als *Saccharomyces cerevisiae* hinterlegt. Allerdings ist hier auch der Name „*Saccharomyces uvarum*“ vermerkt, der

zwischenzeitlich als *Saccharomyces bayanus* reklassifiziert wurde. Hintergründe über diese Bemerkung konnten nicht mehr recherchiert werden.

In allen Fällen konnte gezeigt werden, dass eine Identifizierung mittels SAPD-PCR mit den sonstigen, hier durchgeführten Untersuchungen – wie Sequenzierung, Restriktionsverdau und spezifische PCR-Produkte – übereinstimmt, sodass davon auszugehen ist, dass die SAPD-PCR eine geeignete Methode ist, um Stämme der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe in die verschiedenen Arten einzuordnen.

3.1.3 Auflösung von Hybrid-Stämmen und Untersuchung von Stämmen aus dem Weingut Heymann-Löwenstein

Durch die nahe Verwandtschaft der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe sind Hybridisierungen verschiedener Arten untereinander nicht ungewöhnlich (Liti et al 2006). Gerade auch bei Mostvergärungen werden immer wieder *Saccharomyces*-Stämme identifiziert, die eine Hybrid-Natur aufweisen. Der hier schon mitgeführte Hybrid aus *Saccharomyces bayanus* und *cerevisiae* Stamm CBS 8614 wurde ebenfalls aus Wein isoliert (Masneuf et al 1998).

Wie schon in Abbildung 3.2 zu erkennen, zeigte die DNA dieses Hybrids nach SAPD-PCR und elektrophoretischer Auftrennung eine eigenständige Verteilung der PCR-Produkte. Bei dem Vergleich dieses Bandenmusters mit den Mustern von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* fiel auf, dass bei diesem Hybrid DNA-Banden auftraten, die entweder der Spezies *S. cerevisiae* oder der Spezies *S. bayanus* zugeordnet werden konnten. Abbildung 3.5 verdeutlicht noch einmal das aus den Banden von *Saccharomyces bayanus* und *Saccharomyces cerevisiae* zusammengesetzte Muster dieses Hybrids.

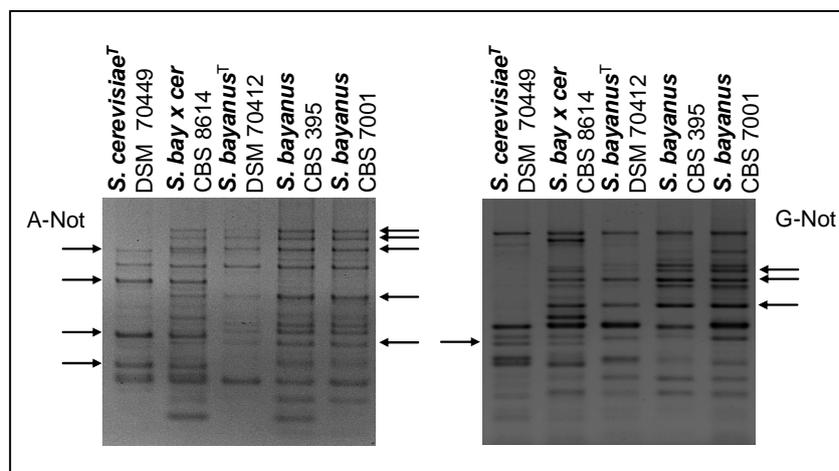


Abbildung 3.5: Vergleich der durch SAPD-PCR erzeugten Bandenmuster von *Saccharomyces cerevisiae*^T, Stämmen von *S. bayanus* und einem Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. bayanus*. Pfeile zeigen unterschiedliche DNA-Banden bei *Saccharomyces cerevisiae* als auch bei den Stämmen von *Saccharomyces bayanus*, die sich auch jeweils im Hybrid wieder finden lassen.

Eine ähnliche Verteilung der PCR-Produkt-Banden konnte auch bei dem Stamm NCYC 3518 festgestellt werden. Hierbei konnte ein zusammengesetztes Muster aus speziesspezifischen Banden von *Saccharomyces kudriavzevii* und *Saccharomyces cerevisiae* erkannt werden (s. Abbildung 3.3). Der Stamm NCYC 3518 wurde von der „National Collection of Yeast Cultures“ (England) bezogen und wird dort als *Saccharomyces kudriavzevii* geführt. Der Stamm ist nur in dieser Sammlung hinterlegt und es gibt keine weiteren verfügbaren Informationen.

Eine Einordnung der Stämme CBS 8614 und NCYC 3518 nach SAPD-PCR-Analyse ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Zusätzlich wurde ein aus Most vom Weingut Heynmann-Löwenstein isolierter Stamm (3211-2) mitgeführt, da er ein ähnliches Muster wie der Hybrid CBS 8614 aufwies.

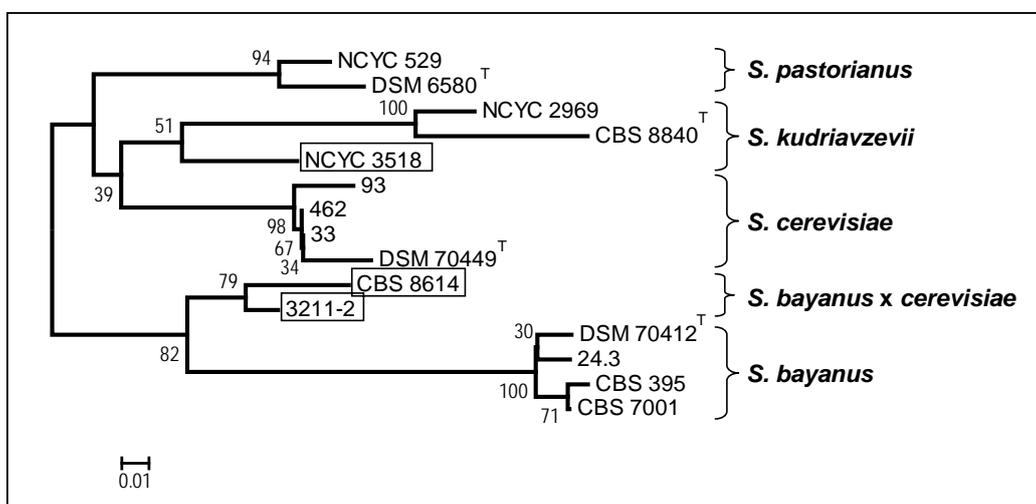


Abbildung 3.6: Cluster-Analyse von Spezies der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe auf der Basis der Fingerprinting-Methode SAPD-PCR. Es wurden PCRs mit den Primern „A-Not“ und „C-Not“ durchgeführt, die PCR-Amplifikate elektrophoretisch aufgetrennt und die entstandenen DNA-Banden zueinander verglichen. Unterschiede im Bandenmuster wurden ausgewertet und in eine 1/0-Matrix konvertiert. Als statistische Methode wurde Neighbor-Joining verwendet, das Substitutionmodell war das Jukes-Cantor-Modell. Grundlage waren Bandenmuster von 15 Stämmen, resultierend in je 125 Positionen. Bootstrap-Werte (100 Replikate) sind in den Ast-Verzweigungen dargestellt. Der Maßstab entspricht einer Distanz von 1 %. Typstämme sind mit einem T gekennzeichnet. Hybrid-Stämme sind umrandet.

Die Clusteranalyse zeigte eine deutliche Abgrenzung der untersuchten Stämme. Der als *Saccharomyces kudriavzevii* geführte Stamm NCYC 3518 bildete zwar mit den anderen Stämmen von *S. kudriavzevii* eine Gruppe, jedoch wird eine relative große Distanz deutlich. Die Stämme CBS 8614 und 3211-2 bildeten ebenfalls ein eigenes Cluster, das die geringste Distanz zur *Saccharomyces bayanus*-Gruppe aufwies.

Am Beispiel der hier aufgeführten Hybride aus *Saccharomyces bayanus* und *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8614 und 3211-2 wurde die Verteilung der Chromosomen mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese untersucht (Abbildung 3.7). In vorangegangenen Studien zeigte der Hybrid CBS

8614 sowohl *Saccharomyces cerevisiae*-ähnliche Chromosomen als auch *Saccharomyces bayanus*-ähnliche Chromosomen (Masneuf et al 1998). Dies könnte auch den Besitz von sowohl *Saccharomyces cerevisiae*-Banden als auch *Saccharomyces bayanus*-Banden nach der SAPD-PCR erklären.

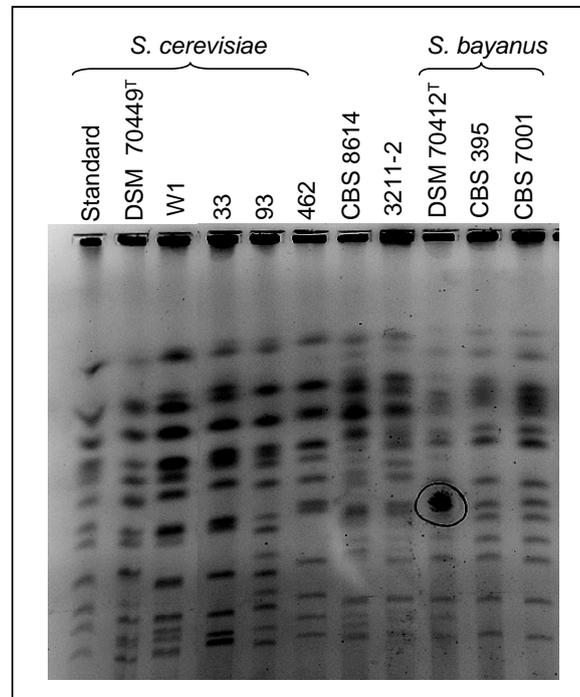


Abbildung 3.7: Pulsfeldgelelektrophorese von Hefechromosomen verschiedener *Saccharomyces*-Stämme. Neben Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* wurde auch der Hybrid aus beiden Arten (Stamm CBS 8614) und der Stamm 3211-2 aus dem Weingut Heynmann-Löwenstein aufgetragen.

Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* zeigten in dieser elektrophoretischen Auftrennung 14 Chromosomen. Chromosomen von *Saccharomyces bayanus* waren im hochmolekularen Bereich schlechter definiert. Auch Masneuf et al (1998) konnten hier keine optimale Auftrennung erreichen, da in diesem Bereich viele Chromosomen von ähnlicher Größe auftreten. Wie schon bei Masneuf et al (1998) konnten auch bei diesem Karyotyping einige Chromosomen der Hybride CBS 8614 und 3211-2 Chromosomen von *Saccharomyces cerevisiae* oder *Saccharomyces bayanus* zugeordnet werden. Allerdings waren die Ergebnisse nicht eindeutig, was wohl durch die Methode bedingt ist.

Weiter wurden die Stämme auf das Vorhandensein von speziespezifischen PCR-Produkten untersucht (nach Torriani et al 2004). Diese Methode ist ausgelegt für die Erkennung von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus*. Die Hybrid-Stämme CBS 8614 und 3211-2 zeigten in beiden Fällen ein PCR-Produkt, was wieder für ihren Hybrid-Charakter aus *S. cerevisiae* und *S. bayanus* spricht. Bei dem als *Saccharomyces kudriazzevii* hinterlegten Stamm NCYC 3518

konnte ein für *Saccharomyces cerevisiae*-spezifisches Produkt nachgewiesen werden. Hierdurch wurden die Natur dieses Stammes und die mit ihm verbundenen SAPD-PCR-Ergebnisse bestätigt.

Die Sequenzierung der 5.8S rDNA und ihrer flankierenden ITS-Regionen zeigte eine Einordnung von *S. bayanus x cerevisiae* CBS 8614 in der *Saccharomyces bayanus/pastorianus*-Gruppe. Die Sequenz des vermutlichen Hybrids, aber als *S. kudriavzevii* hinterlegten Stamms NCYC 3518 zeigte die größte Übereinstimmung mit Sequenzen aus anderen *S. kudriavzevii*-Stämmen (s. Abbildung 3.1). Allerdings zeigte das Chromatogramm der Sequenzierung das Vorhandensein einer zusätzlichen Sequenz und somit eine nicht einheitliche Ausprägung der Genkopien dieser Genfamilie (s. Anhang). Dieser Umstand und das zuvor erwähnte speziesspezifische Produkt für *S. cerevisiae* spricht für die Existenz eines auf *Saccharomyces cerevisiae* basierenden Teils des Genoms. Dieser Aspekt begegnet uns auch bei der Einordnung von aus Most isolierten *Saccharomyces*-Stämmen aus dem Weingut Heymann-Löwenstein und wird dort genauer besprochen.

Tabelle 3.2 fasst noch einmal die Charakteristika des bekannten Hybridstamms CBS 8614 und des vermeintlichen Hybridstamm NCYC 3518 zusammen.

Tabelle 3.2: Übersicht über die Typisierung von dem Hybrid *Saccharomyces bayanus x cerevisiae* Stamm CBS 8614 und dem möglichen Hybrid *Saccharomyces kudriavzevii x cerevisiae* Stamm NCYC 3518. Gezeigt wird die ursprüngliche Klassifizierung bei Hinterlegung in der Stammsammlung, die Einordnung der Stämme nach ihrem SAPD-Bandenmuster, das Ergebnis der BLAST-Suche mit ITS- und 5.8S rDNA-Sequenzen in der NCBI-Datenbank und das Vorhandensein eines artspezifischen PCR-Amplifikats (nach Torriani et al 2004).

| Stamm | hinterlegt als | SAPD-Identifizierung | ITS-/5.8S rDNA BLAST ¹ | Nachweis <i>S. bayanus</i> | Nachweis <i>S. cerevisiae</i> |
|-----------|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| CBS 8614 | <i>S. bayanus x cerevisiae</i> | <i>S. bayanus x cerevisiae</i> | <i>S. bayanus</i> | + | + |
| NCYC 3518 | <i>S. kudriavzevii</i> | <i>S. kudriavzevii x cerevisiae</i> | <i>S. kudriavzevii</i> ² | - | + |

¹ Die durch den Datenbankabgleich (BLAST) ermittelte Art gibt nur das Ergebnis mit der höchsten Sequenzidentität bei größter Sequenzlänge wider.

² Das Sequenzchromatogramm wies auf das Vorkommen einer zweiten Sequenz hin.

Generell konnte anhand dieser Stämme gezeigt werden, dass die SAPD-PCR geeignet ist, um Stämme, die genomische Teile verschiedener Spezies besitzen, zu erkennen. Dies war sowohl bei den Hybriden *Saccharomyces cerevisiae x bayanus*, als auch bei dem vermutlichen Hybrid aus *Saccharomyces cerevisiae x kudriavzevii* möglich.

Untersuchung von Stämmen aus dem Weingut Heymann-Löwenstein

Das Weingut Heymann-Löwenstein in Winningen an der Mosel produziert hauptsächlich Riesling und arbeitet seit einigen Jahren mit dem Institut für Mikrobiologie und Weinforschung zusammen, um die mikrobielle Diversität zu verschiedenen Zeitpunkten der Weinbereitung zu erforschen. Ab Jahrgang 2004 wurden aus verschiedenen Gärtanks des Weinguts Proben entnommen und Bakterien und Hefen isoliert. Die systematische Einordnung der Hefe-Isolate erfolgte dabei bis zum Jahr 2008 auf der Basis physiologischer Merkmale nach dem RapIDYeast Plus System (Remel). Nach 2008 wurde eine Identifizierung mittels Restriktionslängenpolymorphismus der ITS-Regionen und 5.8S rDNA und Sequenzierung dieser durchgeführt. In dieser Arbeit sollten nun diese *Saccharomyces*-Stämme erneut untersucht und mit Hilfe der SAPD-PCR identifiziert werden (Abbildung 3.8).

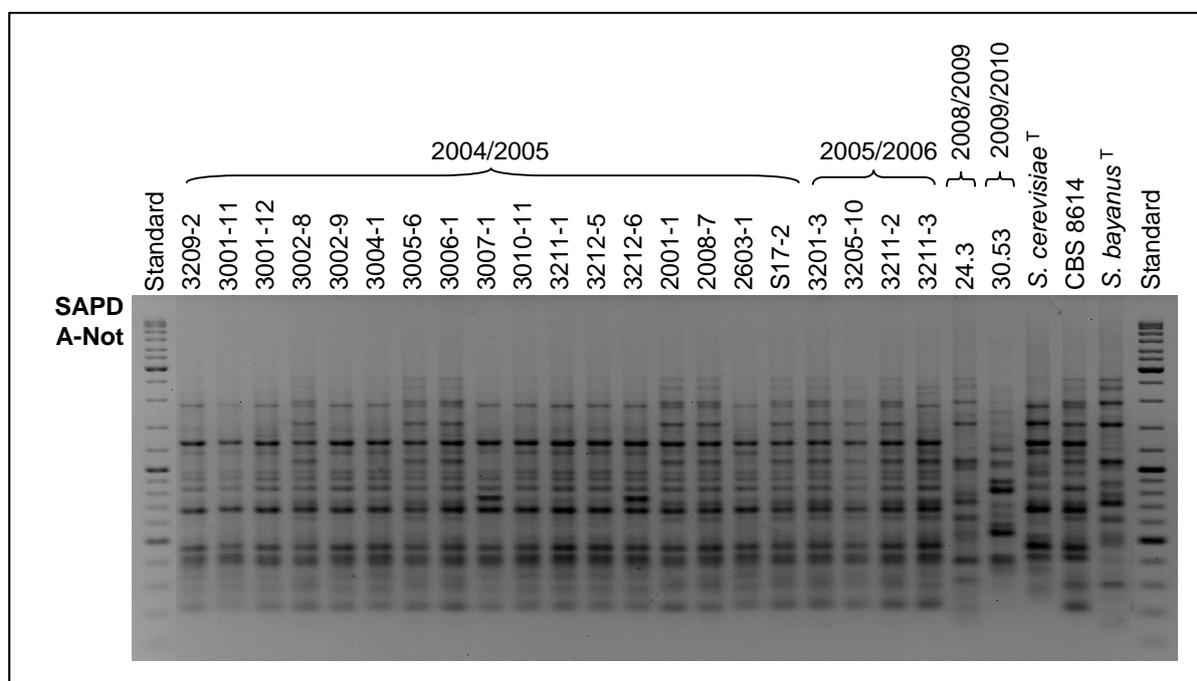


Abbildung 3.8: Durch SAPD-PCR generiertes Bandenmuster von *Saccharomyces*-Spezies aus dem Weingut Heymann-Löwenstein. Gezeigt wird beispielhaft die SAPD-PCR mit dem Primer „A-Not“ nach elektrophoretischer Auftrennung. Untersucht wurden verschiedene Isolate aus Most, Jungwein und Weinen der Jahrgänge 2004/2005, 2005/2006, 2008/2009 und 2009/2010. Die Typstämme von *S. cerevisiae* und *S. bayanus* sowie ein Hybrid aus diesen Arten (CBS 8614) wurden mitgeführt. Als Elektrophorese-Standard wurde GeneRuler DNA-Ladder-Mix (Fermentas) verwendet.

Die meisten Stämme (3209-2, 3001-11, 3001-12, 3002-9, 3004-1, 3007-1, 3010-11, 3211-1, 3212-5, 3212-6 und 2603-1) aus dem Jahrgang 2004/2005 zeigten insgesamt ein einheitliches Bandenmuster, das in großen Teilen dem Grundmuster des Typstamms von *Saccharomyces cerevisiae* entsprach. Allerdings konnten bei all diesen Stämmen besonders im niedermolekularen Bereich Banden detektiert werden, die nicht bei *Saccharomyces cerevisiae*^T zu finden waren. Die

Stämme 3002-8, 3005-6, 3006-1, 2001-1, 2008-7 und S17-2 aus diesem Jahrgang zeigten zwar ebenfalls in vielen Bereichen das *Saccharomyces cerevisiae*-spezifische Muster, hatten aber gleichzeitig auch Ähnlichkeiten mit dem Bandenmuster des Typstamms von *Saccharomyces bayanus*, hier vor allen Dingen im hochmolekularen Bereich. Insgesamt zeigten diese Bandenmuster die größte Übereinstimmung mit dem bereits vorgestellten Hybrid aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* (CBS 8614). Dieses Muster war auch bei allen Stämmen aus dem Jahrgang 2005/2006 zu erkennen. Der Stamm 24.3 aus dem Jahrgang 2008/2009 zeigte die größte Übereinstimmung mit *Saccharomyces bayanus*, während der Stamm 30.53 aus dem Jahrgang 2009/2010 große Ähnlichkeiten mit dem Typstamm von *Saccharomyces paradoxus* aufwies (zum Vergleich s. Abbildung 3.2).

Die erwähnten Stämme mit übereinstimmenden DNA-Banden aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* zeigten in allen durchgeführten SAPD-PCR-Ansätzen eine beinahe exakte Übereinstimmung mit dem Hybrid aus *Saccharomyces bayanus* und *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8614. Das exemplarisch mit Stamm 3211-2 durchgeführte Karyotyping konnte ebenfalls die große Ähnlichkeiten zwischen diesen Stämmen zeigen (s. Abbildung 3.7)

Zusätzlich wurde die Hybrid-Natur der genannten Stämme vom Weingut Heynmann-Löwenstein auf das Auftreten von für *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* spezifische PCR-Amplifikate hin untersucht (Abbildung 3.9).

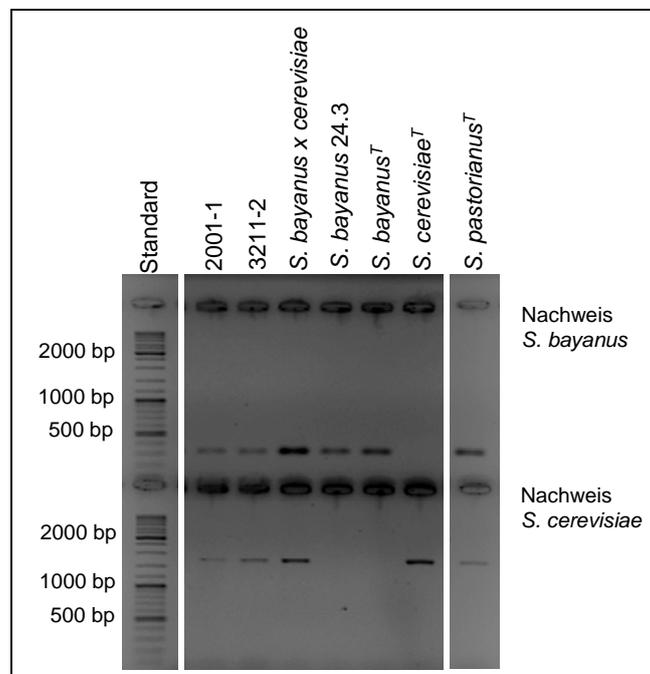


Abbildung 3.9: Nachweis von für *Saccharomyces bayanus* spezifischen und *Saccharomyces cerevisiae* spezifischen DNA-Fragmenten. Neben bekannten Arten wurden der Hybrid *Saccharomyces bayanus* x *cerevisiae* CBS 8614 und Isolate aus dem Weingut Heynmann-Löwenstein mitgeführt. Als Elektrophorese-Standard wurde GeneRuler DNA-Ladder-Mix (Fermentas) verwendet.

Wie auch der Hybrid CBS 8614 zeigten die hier exemplarisch abgebildeten Hefestämme 2001-1 und 3211-2 sowohl das zu erwartende PCR-Produkt für den Nachweis von *Saccharomyces cerevisiae* als auch das für *Saccharomyces bayanus*. Auch der Typstamm von *Saccharomyces pastorianus* wies beide PCR-Produkte auf, was ebenfalls mit seinem Status als Hybrid aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* begründet werden kann (Torriani et al 2004).

Bei allen vermeintlichen Hybriden vom Weingut Heymann-Löwenstein wurde ein Restriktionsverdau des Amplifikats aus aus 5.8S rDNA und ITS-Regionen durchgeführt. Alle Stämme konnten dem Restriktionsmuster II zugeordnet werden, was den Arten *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces kudriavzevii* und *Saccharomyces pastorianus* entspricht. Der Vergleich und die Einordnung dieser Sequenzen in einem Stammbaum zeigt Abbildung 3.10.

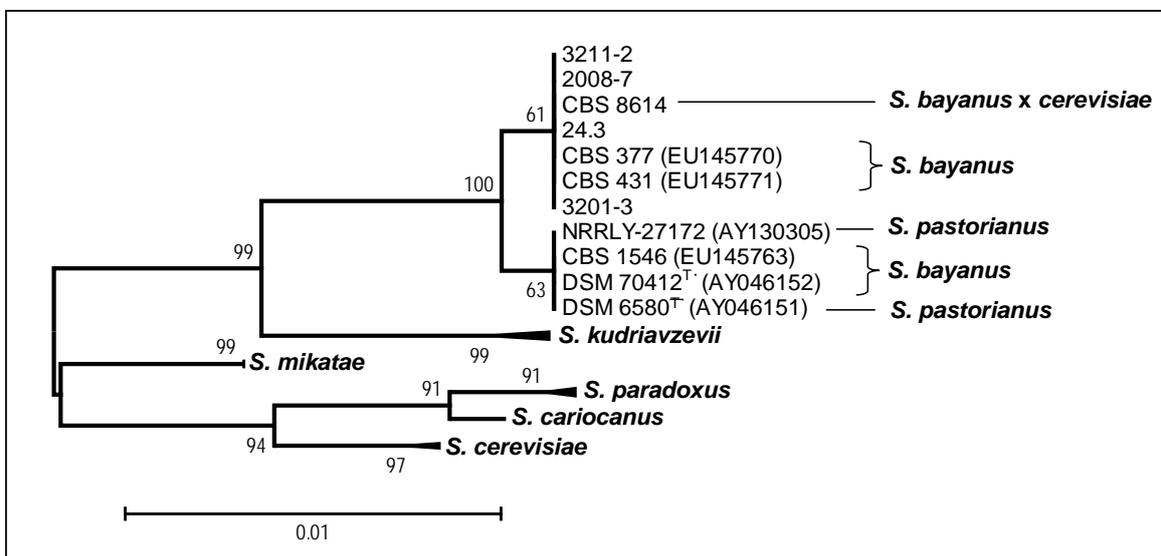


Abbildung 3.10: Phylogenetischer Stammbaum von Arten der *Saccharomyces sensu-stricto*-Gruppe zur Einordnung der Isolate aus dem Weingut Heymann-Löwenstein. Als zu vergleichende Sequenz diente die 5.8S rDNA und ihre benachbarten ITS-Regionen. Als statistische Methode wurde Neighbor-Joining verwendet, das Substitutionsmodell war das Jukes-Cantor-Modell. Grundlage waren 23 Nukleotid-Sequenzen mit je 727 Positionen. Bootstrap-Werte (100 Replikate) sind in den Ast-Verzweigungen dargestellt. Der Maßstab entspricht einer phylogenetischen Distanz von 1 %. Accessionnummern sind bei dem jeweiligen Taxon in Klammern aufgeführt, Typstämme mit einem T gekennzeichnet.

Wie schon der Restriktionsverdau vermuten ließ, gruppieren sich die Isolate aus dem Weingut in das Cluster von *Saccharomyces bayanus* und *Saccharomyces pastorianus*. Die gleiche Gruppierung erfolgte auch bei dem Hybrid CBS 8614. Da das Fingerprinting-Muster eine Zugehörigkeit zu *Saccharomyces pastorianus* ausschließt, bleibt als Fazit, dass die hier untersuchten Hefen das genetische Material aus zwei Ausgangsarten – *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* – besitzen. Auch wenn der Vergleich der ITS- und 5.8S r-DNA-Region die Einordnung zu *Saccharomyces bayanus* aufzeigt, verdeutlichen die Fingerprinting-Analysen zusammen mit

spezifischen Nachweis beider Arten und dem Karyotyping eine Durchmischung des genetischen Materials.

Neben diesen Stämmen wurden die anderen isolierten *Saccharomyces*-Stämme vom Weingut Heynmann-Löwenstein mittels Restriktionsverdau der ITS- und 5.8S rDNA-Region untersucht. Hier konnte eine Diskrepanz zwischen dem SAPD-Fingerprinting-Muster und dem Restriktionsmuster festgestellt werden (Abbildung 3.11). Das SAPD-Fingerprinting-Muster bei diesen Stämmen zeigte eine hohe Ähnlichkeit zum Bandenmuster von *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen. Der Vergleich mit Typstämmen der anderen *Saccharomyces*-Arten brachte keine Gemeinsamkeiten. Im Gegensatz dazu konnte das Restriktionsmuster dieser Stämme keinem der beiden Restriktionsmuster-Gruppen zugeordnet werden.

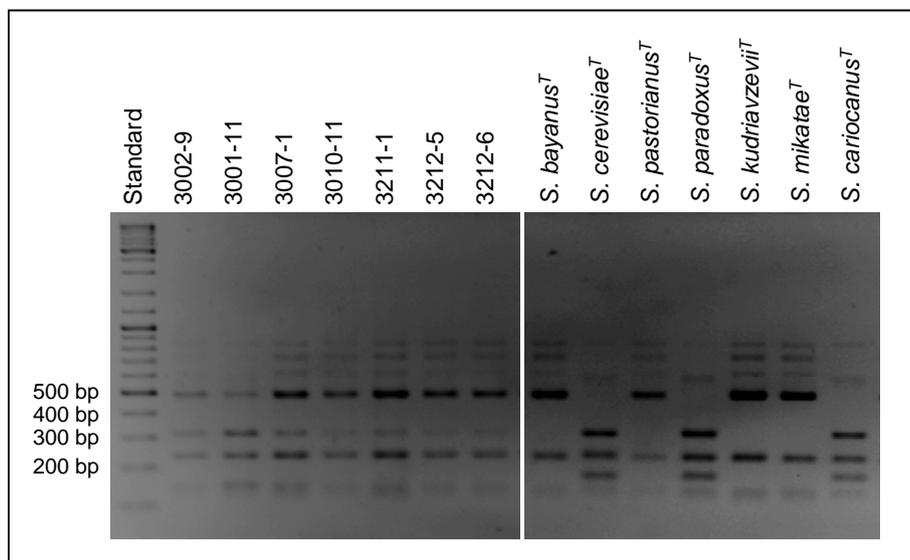


Abbildung 3.11: Elektrophoretische Auftrennung des Restriktionsverdaus der amplifizierten ITS- und 5.8S rDNA-Region mit dem Restriktionsenzym *HaeIII*. Gezeigt werden die Muster der Typstämmen aus der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe sowie Isolate aus dem Weingut Heynmann-Löwenstein.

Vielmehr muss man bei den hier untersuchten Stämmen von einer Mischung beider Restriktionsmuster sprechen. Anhand des SAPD-Fingerprintings der Stämme war davon auszugehen, dass zumindest ein Großteil des genetischen Materials der Art *Saccharomyces cerevisiae* angehört. Dies konnte mit spezifischen Primer für diese Art verdeutlicht werden. Bei allen diesen Stämmen konnte das für *Saccharomyces cerevisiae* spezifische DNA-Fragment amplifiziert werden. Der Test auf *Saccharomyces bayanus* blieb dagegen negativ.

Auch wenn das PCR-Amplifikat der 5.8S rDNA und der ITS-Regionen offensichtlich aus zwei unterschiedlichen Sequenzen bestand (s. Abbildung 3.11), wurde dieses trotzdem sequenziert, um hier mögliche Arteingrenzungen vornehmen zu können. Die Chromatogramme der Stämme 3002-9,

3001-11, 3007-1, 3010-11, 3211-1, 3212-5 und 3212-6 zeigten viele Überlagerungen von zumeist zwei Peaks pro Position (Abbildung 3.12).

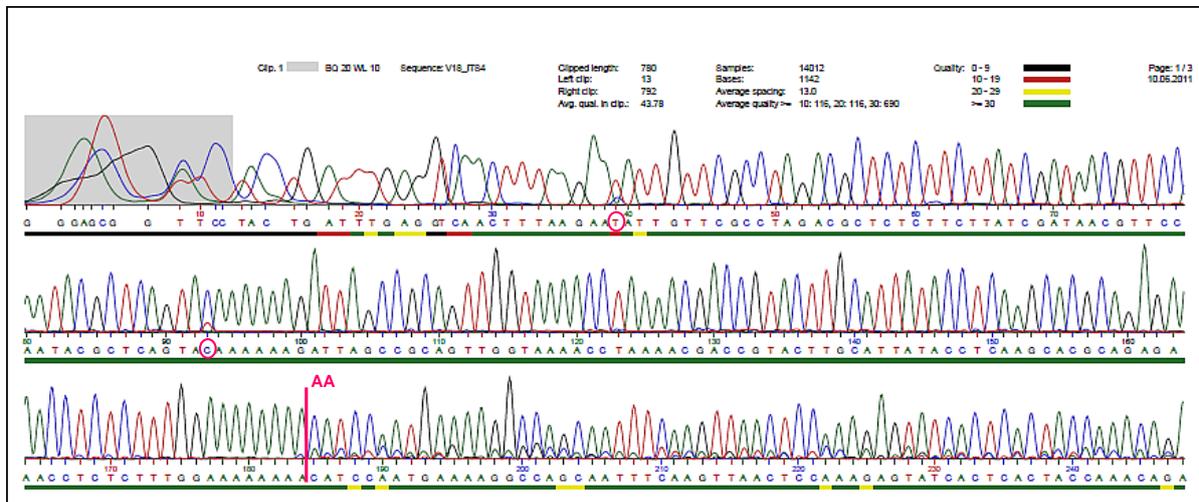


Abbildung 3.12: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung der ITS1-5.8S rDNA-ITS2-Region am Beispiel von Stamm 3211-1 aus dem Weingut Heymann-Löwenstein. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Reverse-Primer der PCR „ITS4“, sodass das Chromatogramm mit der ITS2-Region beginnt. Markiert sind Positionen im Chromatogramm, die nicht eindeutig festgelegt werden können (Kreise) sowie der Beginn einer Mischsequenz.

Die Dominanz der konkurrierende Peaks war analog zur Stärke des Restriktionsfragment-Musters in Abbildung 3.8: Während die Stämme 3209-2 und 3001-11 starke Mischungen aufwiesen, war etwa bei den Stämmen 3211-1 und 3010-10 deutlich eine dominantere Sequenz erkennbar. Daher konnten nur die Sequenzen der Stämme 3010-10, 3211-1, 3212-5 und 3212-6 mit der NCBI-Datenbank verglichen und mittels Stammbaum-Analyse eingeordnet werden. Hierbei wurden die von der Firma Eurofins MWG operon empfohlene Sequenz verwendet (Abb. 3.13).

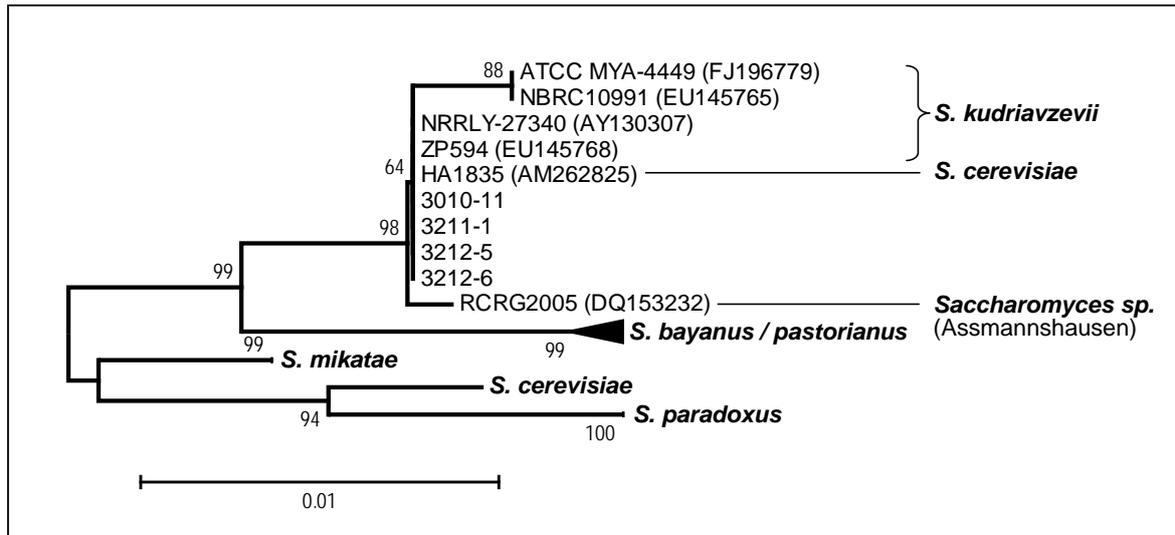


Abbildung 3.13: Phylogenetischer Stammbaum von Arten der *Saccharomyces sensu-stricto*-Gruppe zur Einordnung von Isolaten aus dem Weingut Heymann-Löwenstein. Als zu vergleichende Sequenz diente die 5.8S rDNA und ihre benachbarten ITS-Regionen. Als statistische Methode wurde Neighbor-Joining verwendet, das Substitutionsmodell war das Jukes-Cantor-Modell. Grundlage waren 23 Nukleotid-Sequenzen mit je 728 Positionen. Bootstrap-Werte (100 Replikate) sind in den Ast-Verzweigungen dargestellt. Der Maßstab entspricht einer phylogenetischen Distanz von 1 %. Wenn vorhanden sind Accessionnummern bei den jeweiligen Stämmen in Klammern aufgeführt.

Alle Stämme wurden in die Art *Saccharomyces kudriavzevii* eingeordnet. In dieser Gruppe war auch ein Vertreter von *Saccharomyces cerevisiae* zu finden (Stamm HA1835). Die von dieser Art verwendete Sequenz der ITS- und 5.8S-rDNA-Region ist allerdings in der NCBI-Datenbank als „*Saccharomyces kudriavzevii*-ähnliches Allel“ aufgeführt und der Stamm als möglicher Hybrid von *Saccharomyces cerevisiae* und *kudriavzevii* benannt (Lopandic et al 2007).

Bei dem Vergleich der Sequenz-Chromatogramme der Stämme aus dem Weingut Heymann-Löwenstein (als Beispiel siehe Abbildung 3.12) mit den entsprechenden Sequenzen der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe fiel auf, dass in dieser Mischsequenz zwei Sequenzen unterschieden werden können. Hierbei zeigte die dominante Sequenzabfolge die oben im Stammbaum abgebildete Homologie mit Sequenzen von *Saccharomyces kudriavzevii*. Die Konstruktion einer weiteren Sequenzabfolge war möglich. Diese war identisch mit der Sequenz von *Saccharomyces cerevisiae* (Abbildung 3.14).

| | | |
|---|--|-----|
| <i>S. kudriavzevii</i> (AY130307) | CTTTAAGAA <u>T</u> ATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCC | 50 |
| <i>Saccharomyces</i> sp. 3211-1 (2.Sequenz) | CTTTAAGAA <u>C</u> ATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCC | 50 |
| <i>Saccharomyces</i> sp. 3211-1 (1.Sequenz) | CTTTAAGAA <u>T</u> ATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCC | 50 |
| <i>S. cerevisiae</i> (GU256758) | CTTTAAGAA <u>C</u> ATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCC | 50 |
| <i>S. bayanus</i> (EU145763) | CTTTAAGAA <u>C</u> ATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTTC | 50 |
| <i>S. pastorianus</i> (AY130305) | CTTTAAGAA <u>C</u> ATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTTC | 50 |
| <i>S. paradoxus</i> (AB533544) | CTTTAAGAA <u>C</u> ATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCC | 50 |
| <i>S. mikatae</i> (AJ229064) | CTTTAAGAA <u>C</u> ATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATTGATAACGTTCC | 50 |
| | ***** | |
| <i>S. kudriavzevii</i> (AY130307) | AATACGCTCAGTA <u>C</u> AAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAAAC | 99 |
| <i>Saccharomyces</i> sp. 3211-1 (2.Sequenz) | AATACGCTCAGTA <u>T</u> AAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAAAC | 99 |
| <i>Saccharomyces</i> sp. 3211-1 (1.Sequenz) | AATACGCTCAGTA <u>C</u> AAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAAAC | 99 |
| <i>S. cerevisiae</i> (GU256758) | AATACGCTCAGTA <u>T</u> AAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAAAC | 99 |
| <i>S. bayanus</i> (EU145763) | AATACGCTCAGTA <u>C</u> AAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAAAC | 99 |
| <i>S. pastorianus</i> (AY130305) | AATACGCTCAGTA <u>C</u> AAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAAAC | 99 |
| <i>S. paradoxus</i> (AB533544) | AATACGCTCAGTA <u>C</u> AAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAAAC | 99 |
| <i>S. mikatae</i> (AJ229064) | AATACGCTCAGTA <u>C</u> AAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAAAC | 99 |
| | ***** | |
| <i>S. kudriavzevii</i> (AY130307) | GACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAA | 149 |
| <i>Saccharomyces</i> sp. 3211-1 (2.Sequenz) | GACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAA | 149 |
| <i>Saccharomyces</i> sp. 3211-1 (1.Sequenz) | GACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAA | 149 |
| <i>S. cerevisiae</i> (GU256758) | GACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAA | 149 |
| <i>S. bayanus</i> (EU145763) | GACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAA | 149 |
| <i>S. pastorianus</i> (AY130305) | GACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAA | 149 |
| <i>S. paradoxus</i> (AB533544) | GACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAA | 149 |
| <i>S. mikatae</i> (AJ229064) | GACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAA | 149 |
| | ***** | |
| <i>S. kudriavzevii</i> (AY130307) | AAAAA--ACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGA | 197 |
| <i>Saccharomyces</i> sp. 3211-1 (2.Sequenz) | AAAAA <u>AA</u> ACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGA | 197 |
| <i>Saccharomyces</i> sp. 3211-1 (1.Sequenz) | AAAAA--ACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGA | 197 |
| <i>S. cerevisiae</i> (GU256758) | AAAAA <u>AA</u> ACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGA | 199 |
| <i>S. bayanus</i> (EU145763) | AAAAA--ACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAGAGA | 197 |
| <i>S. pastorianus</i> (AY130305) | AAAAA--ACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAGAGA | 197 |
| <i>S. paradoxus</i> (AB533544) | AAAAA--ACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGA | 197 |
| <i>S. mikatae</i> (AJ229064) | A-AAA--ACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGA | 196 |
| | * * * | |

Abbildung 3.14: Alignment der Anfangssequenzen der ITS2-Region von verschiedenen *Saccharomyces*-Arten und dem Stamm 3211-2 aus dem Weingut Heynmann-Löwenstein. Gezeigt werden zwei Sequenzen des Stamms 3211-2, die aus dem Chromatogramm von Abbildung 3.11 hervorgehen. Sterne zeigen Übereinstimmungen bei allen Sequenzen, unterstrichene Positionen verdeutlichen Unterschiede zwischen *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces kudriavzevii* und so die Einordnung der zwei möglichen Sequenzen des Stamm 3211-2.

Man kann davon ausgehen, dass die „Misch-Sequenz“ der Stämme aus dem Weingut Heynmann-Löwenstein aus zwei Sequenzen besteht, die an Position 155 eine Deletion bzw. Insertion von zwei Adeninen zeigt. Eine Insertion dieser Nukleotide ist nur bei *Saccharomyces cerevisiae* zu finden. Dies – sowie die Unterschiedlichkeit an zwei weiteren Positionen – lässt vermuten, dass es sich bei den Stämmen um Mischungen aus dem *Saccharomyces cerevisiae*- und *Saccharomyces kudriavzevii*-Genomen handelt. Aufgrund des Fingerprinting-Musters der SAPD-PCR ist aber davon auszugehen, dass das Gros des genetischen Materials seinen Ursprung in der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* hat.

Untersuchung der genetischen Stabilität von Hybriden

Am Beispiel eines Stammes aus dem Weingut Heymann-Löwenstein sollte die genetische Stabilität der Hybride aus *Saccharomyces bayanus* und *Saccharomyces cerevisiae* untersucht werden. Hierfür wurde der Stamm 3211-2 wie auch der bereits bekannte Hybrid (Stamm CBS 8614), der Typstamm von *Saccharomyces cerevisiae* und der Typstamm von *Saccharomyces bayanus* über einen Zeitraum von 75 Tagen unter unterschiedlichen Bedingungen kultiviert. Neben verschiedenen Kultivierungstemperaturen wurden pH-Werte und Zuckerkonzentrationen verändert. Das Grundmedium entsprach dem Vollmedium GYP (s. 2.5.2, Tabelle 2.3). Alle fünf Tage wurden Zellen in frisches Medium überführt. Die Kultivierung erfolgte als Standkultur. Nach 15 Kultivierungen wurden die Hefen auf GYP-Platten ausgestrichen und nochmals in nicht modifiziertem GYP-Medium kultiviert und schließlich DNA isoliert. Die DNA wurde dann mittels der SAPD-Fingerprinting-Methode analysiert, sowie mit stammspezifischen δ -Primern (s. 2.6.3.3) (Abbildung 3.15).

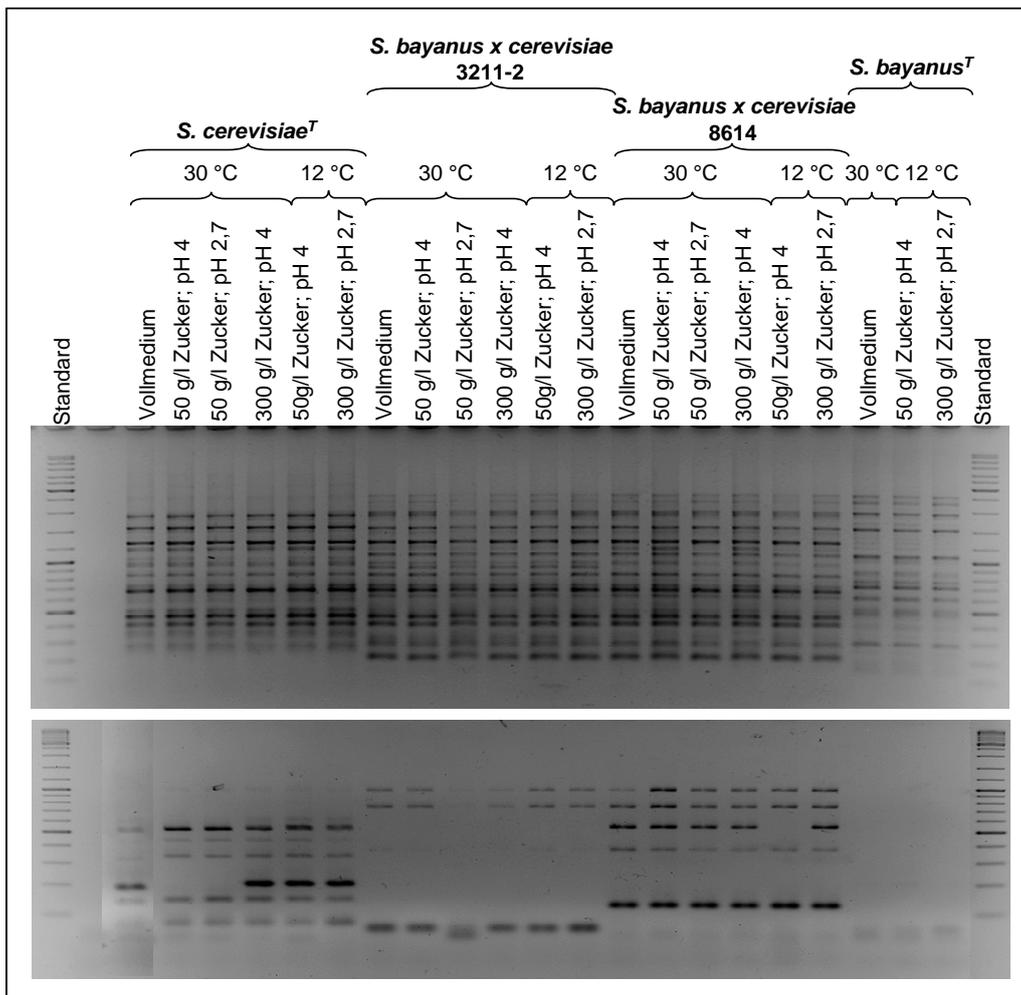


Abbildung 3.15: Genetische Stabilität von *Saccharomyces cerevisiae*^T, *Saccharomyces bayanus*^T und deren Hybride CBS 8614 und 3211-2 nach 15-maliger Kultivierung in den genannten Medien. Das obere Bild zeigt das Bandenmuster einer SAPD-PCR (Primer „A-Not“) nach elektrophoretischer Auftrennung, das untere Bild zeigt die entstandenen DNA-Banden nach Amplifizierung von δ -Regionen (Primer „ δ 1“ und „ δ 2“).

Die durch SAPD-PCR generierten DNA-Banden zeigten bei den einzelnen Stämmen das für die jeweilige Spezies typische Bandenmuster. Auch zeigten die Muster der Hybride wieder deutlich DNA-Banden von den zwei Arten *Saccharomyces cerevisiae* und *bayanus*. Die unterschiedlich angezogenen Kulturen einer Art wiesen jedoch keine Unterschiede bezüglich ihres SAPD-PCR-Musters auf. Anders bei der Amplifikation von δ -Regionen. So war bei *Saccharomyces cerevisiae* nach Kultivierung bei 30 °C, 50 g/l Zucker und einem pH-Wert von 2,7 und 4,0 eine – ansonsten stark ausgeprägte – DNA-Bande nicht mehr erkennbar. Dies war auch bei dem Hybrid CBS 8614 nach Kultivierung bei 12 °C, 50 g/l Zucker und pH 4,0 erkennbar. Hier konnten nur noch vier PCR-Produkte festgestellt werden. Bei dem Stamm 3211-2 aus dem Weingut Heynmann-Löwenstein konnte ebenfalls eine Veränderung nach Kultivierung bei 30 °C, 50 g/l Zucker und einem pH-Wert von 2,7 ermittelt werden: Hier schien es zu einer Verminderung der Größe bei dem kleinsten PCR-Produkt gekommen zu sein. *Saccharomyces bayanus* zeigte keine Banden bei dieser PCR, was insofern nicht verwunderlich war, da die eingesetzten Primer spezifisch für *Saccharomyces cerevisiae* sind. Allerdings lässt sich bei dem Stamm dieser Art feststellen, dass überhaupt nur Wachstum bei 12 °C möglich war. Bei 30 °C, Zuckerkonzentrationen von 50 bzw. 300 g/l und pH-Werten von 2,7 und 4,0 konnte schon nach wenigen Kultivierungszyklen kein Wachstum von *Saccharomyces bayanus* mehr erreicht werden.

Ferner bleibt festzustellen, dass die Unterschiede im δ -Muster keinem bestimmten Kultivierungsparameter zuzuordnen sind. Weder eine bestimmte Temperatur noch eine bestimmte Zuckerkonzentration oder ein bestimmter pH-Wert führte gehäuft zu einer Veränderung des Bandenmusters.

Untersuchung der Wachstumseigenschaften von Hybriden

Da die Hefen aus dem Weingut Heymann-Löwenstein offensichtlich über unterschiedliche Genom-Zusammensetzungen verfügten, wurden ihre Wachstumseigenschaften bei verschiedenen Parametern untersucht. Hierfür wurde 50 %iger Traubensaft auf Zuckerkonzentrationen zwischen 75 und 350 g/l und pH-Werte zwischen pH 2,6 und 3,25 eingestellt (s. 2.5.2, Tabelle 2.4). Die Kultivierung erfolgte stehend bei 20 °C und das Wachstum anhand der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Innerhalb des exponentiellen Wachstums wurde eine Generationszeit ermittelt (s. Anhang).

Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen dem Stamm 24.3 der Spezies *Saccharomyces bayanus*, den möglichen Hybriden aus *Saccharomyces bayanus* x *cerevisiae* (Stämme 3005-6 und 3211-2) und den möglichen Hybriden aus *Saccharomyces cerevisiae* und *kudriavzevii* (Stämme 3209-2, 3001-11, 3211-1 und 2603-1) festgestellt werden. Alle Stämme zeigten die geringsten Generationszeiten bei einem pH-Wert von 2,6. Eine zunehmende Erhöhung

der Zuckermenge im Traubensaft korrelierte mit einer Verlängerung der Lag-Phase, führte aber zu keinem verminderten Wachstum während der exponentiellen Phase. Eine Ausnahme bildete hier der vermeintliche Hybrid *Saccharomyces cerevisiae* x *kudriavzevii* 3209-2, der bei 350 g/l Zucker ein deutlich verlangsamtes Wachstum zeigte. Diese Eigenschaft ist aber nicht auf die anderen Stämme mit ähnlichen genetischen Mustern übertragbar, sondern scheint ein Merkmal auf Stamm-Niveau zu sein.

Es konnte insgesamt gezeigt werden, dass das SAPD-PCR-Fingerprinting eine geeignete Methode ist, um die nahverwandten und mit anderen Methoden nur schwer differenzierbaren Spezies der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe gesichert zu identifizieren. Weiter vermag die hier vorgestellte Methode interspezifische Hybride dieser Gattung zu erkennen, wenn beide Parental-Genome noch vergleichbar dominant im Hybrid-Genom vorhanden sind. Hybride, deren Genom zum größten Teil einem parentalen Elternteil entspricht, können weniger gut detektiert werden, wobei in diesen Fällen die SAPD-PCR Rückschlüsse über die Herkunft des Gros des genetischen Materials erlaubt. Die Fingerprinting-Methode zeigt zudem ein stabiles Bandenmuster auch über viele Hefegenerationen hinweg, wenn stammspezifische Variationen schon stattgefunden haben.

3.2 Bestimmung der Zellzahl von Hefen mittels quantitativer PCR

Die quantitative PCR wird zunehmend für die Analyse mikrobieller Populationen in den unterschiedlichsten Habitaten verwendet. Klassische mikrobiologische Methoden für die Untersuchung von Diversität, Interaktion oder Sukzession von Mikroorganismen sind nicht nur zeit- und arbeitsaufwendig. Sie sind auch dann gar nicht möglich, wenn in einer Mischpopulation Mikroorganismen auftreten, die physiologisch und morphologisch so hohe Ähnlichkeiten aufweisen, dass sie weder mikroskopisch noch physiologisch durch den Einsatz von Selektivmedien voneinander differenziert werden können.

In den Habitaten Traube, Most und Wein kommen eine Vielzahl unterschiedlicher Hefe-Arten vor, die phänotypisch oft ähnliche Eigenschaften besitzen, weshalb einzelne Arten in Mischkulturen nicht immer unterschieden werden können. In dieser Arbeit wurde ein quantitatives Realtime-PCR-System entwickelt, um die Gattungen *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* und *Brettanomyces* während der Weinbereitung nachweisen und ihren Titer bestimmen zu können.

3.2.1 Entwicklung eines qPCR-Systems für die Detektion von *Saccharomyces* spp., *Hanseniaspora* spp. und *Brettanomyces* spp.

Auf Grundlage des Sequenzabschnittes, der die 5.8S rDNA und ihre flankierenden ITS-Regionen umfasst, wurden Primer zum Nachweis von *Saccharomyces* spp., *Hanseniaspora* spp. und *Brettanomyces* spp. entwickelt (s. 2.6.3.5, Abbildung 2.3). Diese wurden so gewählt, dass sie in ein quantitatives PCR-System eingesetzt werden können. Ein Kriterium war demnach eine ähnliche Schmelztemperatur, um gleiche Annealing-Temperaturen und so den Einsatz aller drei Primer-Paare in einem PCR-Programm zu gewährleisten. Ferner wurde bei der Auswahl der Primer darauf geachtet, dass das entstehende Amplifikat die Größe von 200 bp nicht überschreitet, um eine Korrelation der durch SYBR-Green verursachten Fluoreszenz-Intensität mit der entstandenen Produktmenge zu gewährleisten.

Ein wichtiger Punkt bei der Entwicklung der Primer-Paare ist natürlich ihre Spezifität. Die gewählten Primer-Paare wurden mit allen Nukleotid-Sequenzen der NCBI-Datenbank verglichen. Es konnte eine mögliche Hybridisierung mit unerwünschter DNA und eine daraus resultierende Amplifikation unspezifischer Produkte ausgeschlossen werden. Neben diesen Untersuchungen wurde zusätzlich die Spezifität der Primer anhand von DNA weinrelevanter Mikroorganismen getestet. Hierbei wurden nicht nur DNA von Hefe-Arten verwendet, sondern auch DNA typischer Bakterien während der Weinbereitung (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Spezifität der ausgewählten Primer-Paare („SacchF1“ und „SacchR1“, „HansF2“ und „HansR2“, „BrettF2“ und „BrettR2“) für den Nachweis von *Saccharomyces* spp., *Hanseniaspora* spp. und *Brettanomyces* spp.

| Spezies | Stamm | PCR-Produkt | | |
|-----------------------------------|------------------------|--------------------|------------------|----------------------|
| | | SacchF1 SacchR1 | HansF2 HansR2 | Brett F2 Brett R2 |
| <i>Brettanomyces bruxellensis</i> | 600 | - | - | + |
| <i>Brettanomyces bruxellensis</i> | 604 | - | - | + |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | 527 | - | + | - |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | 474 | - | + | - |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | 555 | - | - | - |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | 160 | - | - | - |
| <i>Pichia anomala</i> | 163 | - | - | - |
| <i>Pichia farinosa</i> | 376 | - | - | - |
| <i>Pichia fermentans</i> | 167 | - | - | - |
| <i>Pichia kluyveri</i> | 393 | - | - | - |
| <i>Pichia membranifaciens</i> | 190.1 | - | - | - |
| <i>Saccharomyces bayanus</i> | DSM 70412 ^T | + | - | - |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 328 | + | - | - |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 2/6-2 | + | - | - |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | DSM 70449 ^T | + | - | - |
| <i>Saccharomycodes ludwigii</i> | 84 | - | - | - |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 81 | - | - | - |
| <i>Torulaspota delbrueckii</i> | 182 | - | - | - |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | 368 | - | - | - |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | 412 | - | - | - |
| <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | 68 | - | - | - |
| <i>Acetobacter aceti</i> | DSM 3508 ^T | - | - | - |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | DSM 20554 ^T | - | - | - |
| <i>Oenococcus oeni</i> | DSM 20252 ^T | - | - | - |
| <i>Pediococcus damnosus</i> | DSM 20331 ^T | - | - | - |

Wie in Tabelle 3.3 dargestellt konnten PCR-Amplifikate mit dem Primerpaar „SacchF1“ und „SacchR1“ nur bei den Spezies *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* erreicht

werden. Eine Spezifität dieser Primer auf Art-Niveau war auf Grund der großen Ähnlichkeit der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe im gewählten DNA-Bereich nicht möglich (siehe auch 3.1).

Die Verwendung der Primer „HansF2“ und „HansR2“ führte nur bei den zwei eingesetzten Stämmen von *Hanseniaspora uvarum* zu einem PCR-Produkt. Auch das Primer-Paar „BrettF2“ und „BrettR2“ war spezifisch und erzeugte nur bei den *Brettanomyces bruxellensis*-Stämmen ein Amplifikat. Beide Primer-Paare zeigten einen spezifischen Nachweis der Arten *Hanseniaspora uvarum* und *Brettanomyces bruxellensis* und auch die *in silico* durchgeführte Spezifitätsuntersuchungen ergaben nur Bindungen der Primer an DNA dieser Spezies. Der hier durchgeführte Spezifitäts-Test wurde allerdings nur mit diesen Arten und nicht mit anderen Arten der Gattungen durchgeführt, sodass im Folgenden von einer Spezifität auf Gattungsniveau ausgegangen wird.

Für eine quantitative Bestimmung von Zellzahlen mittels qPCR wurden Stämme der drei Arten kultiviert, mittels Zählkammer die Zellzahl bestimmt und auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Es folgte eine DNA-Isolierung und eine serielle Verdünnung der DNA um den Faktor 10^5 . Mit diesen unterschiedlichen DNA-Konzentrationen wurden qPCR-Läufe durchgeführt (Abbildung 3.16).

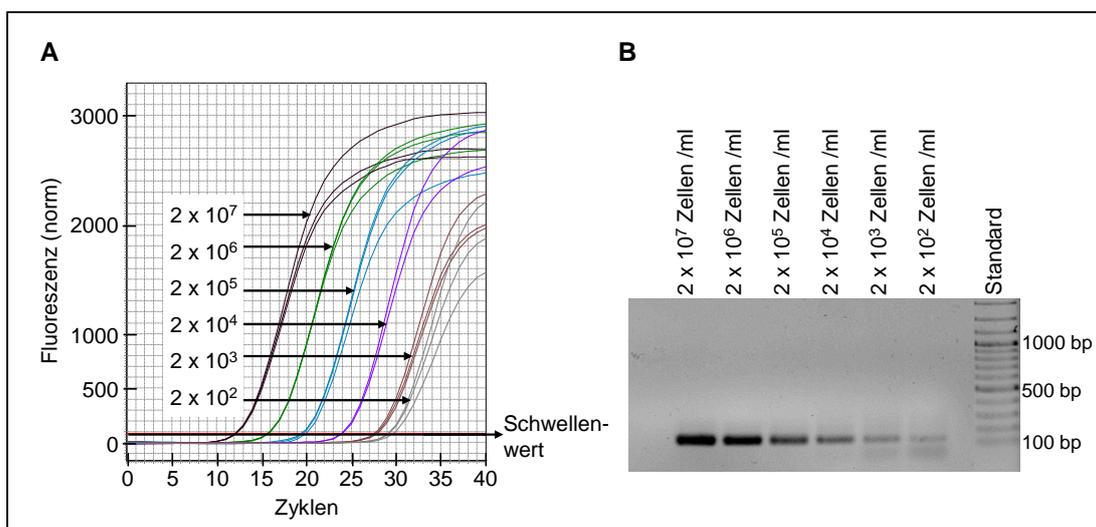


Abbildung 3.16: Amplifikation von DNA von 2×10^7 Zellen/ml bis 2×10^2 Zellen/ml am Beispiel von *Hanseniaspora uvarum* Stamm 527. A) Darstellung der Amplifikationskurven der DNA verschiedener Zellzahlen gemessen an der Fluoreszenzstärke nach jedem PCR-Zyklus. Es wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Der Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation ist als Schwellenwert gekennzeichnet. B) Elektrophoretische Auftrennung der entstandenen DNA-Amplifikate nach quantitativer PCR.

Die serielle Verdünnung der einzelnen DNA-Ansätze war an dem verzögerten Eintritt in die exponentielle Phase während der Amplifikation des DNA-Templates zu erkennen. Je weniger Template im Ansatz war, umso später stieg die an das Auftreten von doppelsträngiger DNA

gekoppelte Fluoreszenz über ein Hintergrundrauschen und somit über einen Schwellenwert. Der Zyklus, an dem die Kurve über den Schwellenwert tritt, gibt den C_t -Wert der jeweiligen DNA-Probe an. So besaß die DNA von 2×10^7 Zellen/ml einen C_t -Wert von 12,3, während die 2×10^3 Zellen/ml entsprechende DNA einen C_t -Wert von 27,9 erhielt. Die serielle Verdünnung der DNA hatte auch eine gleichmäßige Vergrößerung des C_t -Werts zur Folge, wobei dies nicht mehr bei DNA von 2×10^2 Zellen/ml gewährleistet werden konnte. Hier streuten auch die Dreifach-Bestimmungen am stärksten. Die endgültigen PCR-Produkte zeigten ebenfalls eine abnehmende Bandenstärke bei abnehmender DNA-Konzentration (Abbildung 3.16, B), wobei hier bis zur größten Verdünnung ein PCR-Produkt erkennbar war.

Da in diesem qPCR-System mit SYBR-Green als Fluoreszenzfarbstoff gearbeitet wurde, wurde nach Beendigung der eigentlichen PCR eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt, um eventuelle unspezifische Produkte detektieren zu können. Eine Schmelzkurve zeigt die Fluoreszenz-Intensität von SYBR-Green entlang einer Zeit-Achse, mit der eine schrittweise Erhöhung der Temperatur einhergeht. Der Schmelzpunkt T_m einer Probe befindet sich an dem Zeitpunkt und entsprechend zu der Temperatur, an dem der höchste Abfall der Fluoreszenzstärke in der Schmelzkurve detektiert wird. Eine Ableitung der Schmelzkurve führt dementsprechend zu einem Maximum bei einer bestimmten Temperatur, wodurch der Schmelzpunkt T_m gut graphisch dargestellt werden kann (Abbildung 3.17).

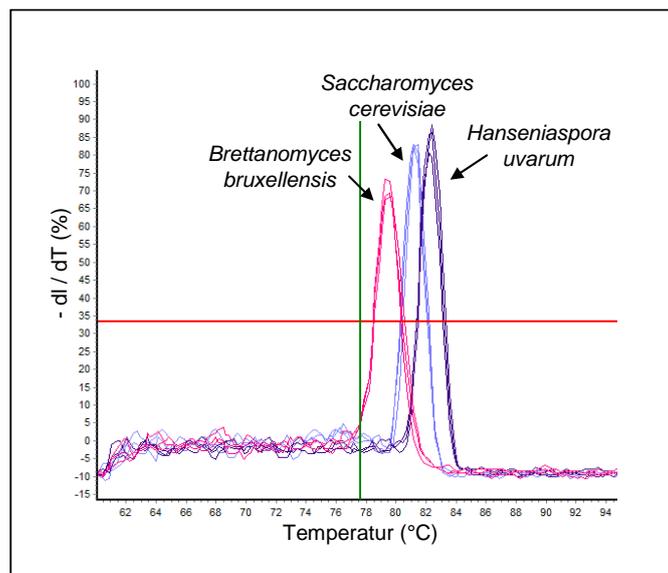


Abbildung 3.17: Schmelzpunkte der Amplifikate durch Einsatz der drei spezifischen Primer-Paare. Die Darstellung erfolgt als negative erste Ableitung der eigentlichen Schmelzkurve als eine Funktion der Temperatur ($-dI/dT$). Die Skalierung der y-Achse orientiert sich an dem höchsten Peak im gesamten Lauf (= 100%), der hier nicht dargestellt ist. Die drei Peaks resultierten aus drei PCR-Ansätzen, in denen jeweils einer der spezifischen Primer-Paare verwendet wurde. Für den jeweiligen, spezifischen PCR-Ansatz wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

Das Amplifikat von *Brettanomyces bruxellensis* zeigte den niedrigsten Schmelzpunkt, gefolgt vom Amplifikat von *Saccharomyces cerevisiae* und *Hanseniaspora uvarum*. Tabelle 3.4 gibt noch einmal die durchschnittlichen Schmelzpunkte an. Generell zeigten die einzelnen Stämme einer Art eine sehr gute Übereinstimmung ihres durchschnittlichen Schmelzpunktes, wenn auch Abweichungen der Messungen innerhalb eines Stammes von bis zu 0,8 °C möglich waren.

Tabelle 3.4: Schmelztemperaturen T_m der PCR-Produkte nach spezifischer Amplifizierung mit den jeweiligen Primern. Für die Berechnung des Durchschnitts (\emptyset) wurden für jeden Stamm 35 Messungen einbezogen. Außerdem werden die geringsten (min) und größten (max) Werte der Messungen gezeigt.

| Spezies | Stamm | T_m (\emptyset) | T_m (min) | T_m (max) |
|-----------------------------------|-------|-----------------------|-------------|-------------|
| <i>Brettanomyces bruxellensis</i> | 600 | 79,6 °C | 79,0 °C | 80,0 °C |
| | 604 | 79,5 °C | 79,1 °C | 80,3 °C |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 328 | 80,9 °C | 80,5 °C | 81,3 °C |
| | 2/6-2 | 80,6 °C | 80,1 °C | 81,4 °C |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | 527 | 82,3 °C | 81,8 °C | 82,9 °C |
| | 474 | 82,0 °C | 81,5 °C | 82,7 °C |

Für die zu untersuchenden Arten *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* und *Brettanomyces bruxellensis* wurden analog zu Abbildung 3.16 Verdünnungen von DNA, die einer Zellzahl von 2×10^7 Zellen/ml entsprach, hergestellt und in dem qPCR-System mit den entsprechenden Primern eingesetzt. Hieraus ergaben sich für unterschiedlichen DNA-Konzentrationen unterschiedliche C_t -Werte, die – gegen die Zellzahl in logarithmischer Skalierung aufgetragen – zu Kalibrierungsgeraden führten. Insgesamt wurden je zwei Stämme einer Art analysiert. Die DNA-Isolierung jedes Stammes erfolgte in Doppelbestimmung (Abbildung 3.18)

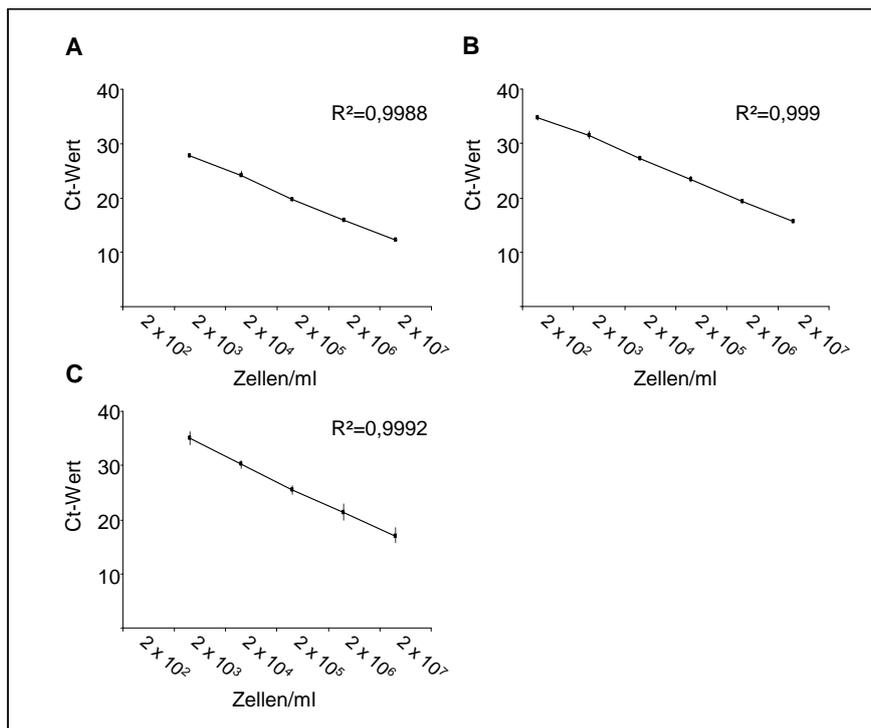


Abbildung 3.18: Kalibrierungsgeraden für die Bestimmung der Zellzahlen von *Hanseniaspora* spp. (A), *Brettanomyces* spp. (B) und *Saccharomyces* spp. (C) auf Grund von spezifischen C_t -Werten für DNA verschiedener Zellzahlen. Die Kalibrierungsgerade wurde anhand von zwei Stämmen der jeweiligen Arten durchgeführt. Ein Ansatz mit der jeweiligen DNA-Menge wurde dreifach analysiert. Der R^2 -Wert zeigt die Linearität der Gerade an und hat bei einer absoluten Gerade einen Wert von 1.

C_t -Werte von *Hanseniaspora uvarum* (Abbildung 3.18, A) und *Saccharomyces cerevisiae* (Abbildung 3.18, C) zeigten bei einer der Zellzahl 2×10^2 Zellen entsprechende DNA-Verdünnung keine optimale Einordnung in der ansonsten linearen Kalibrierungsgerade. Sie wurden daher nicht in diese einbezogen. Bei *Brettanomyces bruxellensis* (Abbildung 3.18, B) konnte hier ein C_t -Wert erreicht werden, der gut zu der ermittelten Kalibrierungsgerade passte. Generell zeigte die Linearität dieser Kalibrierung eine gleichmäßige Vervielfältigung des DNA-Templates während des qPCR-Laufs. Auch konnten zwischen einzelnen Stämme der Art *Brettanomyces bruxellensis* bzw. *Hanseniaspora uvarum* nahezu keine Unterschiede festgestellt werden. Die zwei eingesetzten Stämme von

Saccharomyces cerevisiae zeigten geringe Differenzen, wie die Fehlerbalken in ihrer Kalibrierungsgeraden aufzeigen.

Ausgehend von diesen Kalibrierungsgeraden und ermittelten C_t -Werten kann nun aus unbekanntem Proben die DNA-Menge bzw. Zellzahl der drei Hefen mit folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$\text{Hanseniaspora spp.:} \quad C_t\text{-Wert} = -1,7108 \ln(\text{Zellzahl/ml}) + 40,866$$

$$\text{Brettanomyces spp.:} \quad C_t\text{-Wert} = -1,6733 \ln(\text{Zellzahl/ml}) + 43,845$$

$$\text{Saccharomyces spp.:} \quad C_t\text{-Wert} = -1,9666 \ln(\text{Zellzahl/ml}) + 49,771$$

Mit Hilfe dieser Gleichungen wurde nun im Folgenden die Zellzahlen von Hefekulturen quantifiziert und mit anderen Techniken zur Bestimmung von Zellzahlen verglichen.

3.2.2 Quantifizierung von Hefe-Kulturen mittels quantitativer PCR

Durch die mit einer Kalibrierungskurve ermittelten Gleichungen kann aus Hefe-Kulturen mit einem unbekanntem Titer die Zellzahl ermittelt werden.

Um einen Vergleich zwischen der herkömmlichen Technik, die die Lebenszellzahl anhand koloniebildender Einheiten bestimmt, und der qPCR-Technik ziehen zu können, wurde mit Reinkulturen der drei Hefe-Arten gearbeitet. Bei Mischkulturen kann die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten nur zur einer Bestimmung der Gesamtkeimzahl führen, da die hier eingesetzten Hefe-Arten sich gar nicht anhand der Koloniefarbe unterscheiden lassen, wie im Fall von *Saccharomyces cerevisiae* und *Hanseniaspora uvarum*. Kolonien von *Brettanomyces bruxellensis* könnten eventuell von den anderen Arten aufgrund eines verlangsamten Wachstums und damit einer kleineren Koloniegröße zu einem bestimmten Kultivierungszeitpunkt unterschieden werden, jedoch ist dieses Merkmal fehleranfällig.

Daher wurden je zwei Stämme einer Art als Reinkultur angezogen und zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung ihre Zellzahl durch Ausplattieren und KBE-Bestimmung einerseits und durch DNA-Isolierung und PCR-Quantifizierung andererseits bestimmt (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Vergleich der Zellzahlen ermittelt anhand koloniebildender Einheiten und quantitativer PCR von Reinkulturen der Spezies *Hanseniaspora uvarum*, *Brettanomyces bruxellensis* und *Saccharomyces cerevisiae*. Die Hefen wurden in Vollmedium (GYP) kultiviert und zu drei Zeitpunkten Proben entnommen, die entsprechend analysiert wurden. Die Kultivierung der einzelnen Stämme erfolgte in Doppelbestimmung. Anhand dieser Doppelbestimmung wurde die in Klammer stehende Abweichung bestimmt. Auch dargestellt ist das gerundete Verhältnis der ermittelten Zellzahlen durch KBE zu der ermittelten Zellzahl durch qPCR.

| Spezies | Stamm | Zeit ¹ | Zellzahl /ml KBE (Abweichung) | Zellzahl /ml qPCR (Abweichung) | KBE/qPCR |
|------------------------|-------|-------------------|---|---|------------|
| <i>H. uvarum</i> | 527 | 14 h | $3,2 \times 10^7 (\pm 2,5 \times 10^6)$ | $1,3 \times 10^7 (\pm 1,5 \times 10^6)$ | 2,5 |
| | | 40 h | $4,7 \times 10^7 (\pm 4,5 \times 10^6)$ | $8,2 \times 10^7 (\pm 8,5 \times 10^6)$ | 0,6 |
| | | 64 h | $6,2 \times 10^7 (\pm 2,5 \times 10^6)$ | $6,1 \times 10^7 (\pm 5,1 \times 10^6)$ | 1,0 |
| <i>H. uvarum</i> | 474 | 14 h | $1,6 \times 10^7 (\pm 1,1 \times 10^6)$ | $2,6 \times 10^7 (\pm 1,9 \times 10^6)$ | 0,6 |
| | | 40 h | $2,4 \times 10^7 (\pm 1,2 \times 10^6)$ | $6,1 \times 10^7 (\pm 5,9 \times 10^6)$ | 0,4 |
| | | 64 h | $3,1 \times 10^7 (\pm 2,0 \times 10^6)$ | $5,4 \times 10^7 (\pm 6,5 \times 10^6)$ | 0,6 |
| <i>B. bruxellensis</i> | 600 | 30 h | $5,7 \times 10^6 (\pm 1,0 \times 10^6)$ | $5,5 \times 10^6 (\pm 1,3 \times 10^5)$ | 1,0 |
| | | 54 h | $8,4 \times 10^7 (\pm 6,5 \times 10^6)$ | $3,6 \times 10^7 (\pm 7,6 \times 10^6)$ | 2,5 |
| | | 73 h | $1,8 \times 10^8 (\pm 2,0 \times 10^7)$ | $7,6 \times 10^7 (\pm 1,1 \times 10^7)$ | 2,4 |
| <i>B. bruxellensis</i> | 604 | 30 h | $1,2 \times 10^7 (\pm 5,5 \times 10^5)$ | $7,9 \times 10^6 (\pm 1,1 \times 10^6)$ | 1,5 |
| | | 54 h | $1,2 \times 10^8 (\pm 1,6 \times 10^7)$ | $3,7 \times 10^7 (\pm 3,2 \times 10^5)$ | 3,2 |
| | | 73 h | $2,5 \times 10^8 (\pm 2,7 \times 10^7)$ | $6,2 \times 10^7 (\pm 2,5 \times 10^6)$ | 4,0 |
| <i>S. cerevisiae</i> | 328 | 20 h | $1,4 \times 10^7 (\pm 5,0 \times 10^5)$ | $1,2 \times 10^7 (\pm 1,0 \times 10^6)$ | 1,2 |
| | | 44 h | $3,5 \times 10^7 (\pm 5,0 \times 10^6)$ | $6,3 \times 10^7 (\pm 2,7 \times 10^6)$ | 0,6 |
| | | 64 h | $4,4 \times 10^7 (\pm 6,0 \times 10^6)$ | $7,7 \times 10^7 (\pm 2,2 \times 10^7)$ | 0,6 |
| <i>S. cerevisiae</i> | 2/6-2 | 20 h | $3,0 \times 10^6 (\pm 1,0 \times 10^5)$ | $4,3 \times 10^6 (\pm 5,6 \times 10^5)$ | 0,7 |
| | | 44 h | $3,0 \times 10^7 (\pm 1,2 \times 10^7)$ | $2,9 \times 10^7 (\pm 3,2 \times 10^4)$ | 1,0 |
| | | 64 h | $2,4 \times 10^7 (\pm 5,5 \times 10^6)$ | $3,0 \times 10^7 (\pm 1,0 \times 10^7)$ | 0,8 |

¹ Die Zeit entspricht dem Zeitpunkt der Kultivierung an dem Proben entnommen wurden.

Jede Bestimmung erfolgte von zwei Kulturen eines Stammes. Generell konnte bei beiden Methoden eine ähnliche Fehlerquote gemessen werden. Diese lag bei der KBE-Bestimmung im Durchschnitt bei $\pm 11,3\%$, bei den qPCR-Messungen bei $\pm 10,2\%$. Bei den Stämmen von *Hanseniaspora uvarum* waren die mit quantitativer PCR ermittelten Zellzahlen bis auf eine Ausnahme größer oder annähernd gleich. Gleiches konnte bei den Zellzahlen der *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen festgestellt werden. Anders bei den Stämmen von *Brettanomyces bruxellensis*: Hier war in allen Fällen die durch KBE ermittelte Zellzahl höher als die durch qPCR. Das Verhältnis der KBE-Zellzahlen zu qPCR-Zellzahlen stieg mit steigender Zellzahl im Testansatz. Der Vergleich der koloniebildenden

Einheiten dieser Kultivierungen mit den Kultivierungen der Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* und *Hanseniaspora uvarum* zeigt, dass im Fall von *Brettanomyces bruxellensis* generell höhere Lebendzellzahlen bei der Anzucht erreicht wurden. Die Diskrepanz zwischen KBE- und qPCR-Messungen war demnach bei einer Lebendzellzahl $\geq 8,4 \times 10^7$ Zellen/ml am höchsten. Eben solche Zellzahlen konnten nur bei den Stämmen von *Brettanomyces bruxellensis* erreicht werden.

Bisher wurden Zellzahlen mittels quantitativer PCR nur von Reinkulturen der jeweiligen Arten bestimmt. So konnte noch nicht ausgeschlossen werden, dass die spezifischen Primer einer Art weniger effektiv binden und somit eine geringere Amplifikation stattfindet, wenn sich neben der DNA der zu untersuchenden Art andere DNA im Testansatz befindet. Dies wurde untersucht, indem die Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* und *Brettanomyces bruxellensis* vermischt wurden, die Gesamt-DNA isoliert und eine qPCR-Analyse durchgeführt wurde. Hierfür wurden die Hefe-Stämme in Vollmedium (GYP-Medium) für 14 h schüttelnd bei 30 °C kultiviert und die Zellzahl mittels Zählkammer bestimmt. Es folgte eine Mischung von definierten Zellzahlen der drei Arten in drei unterschiedlichen Ansätzen. Hierbei wurden drei unterschiedliche Stadien der Weinbereitung simuliert. Es sollte die Situation in Most dargestellt werden (Mix A), in dem *Hanseniaspora uvarum* eine dominante Rolle einnimmt. In Mix B ist *Saccharomyces cerevisiae* die vorherrschende Spezies; eine Verteilung, wie sie im gärenden Jungwein zu finden ist. Mix C dagegen simuliert die Verhältnisse des komplett vergorenen Mostes: *Saccharomyces cerevisiae* stirbt ab und *Brettanomyces bruxellensis* kann hochwachsen und zeigt höhere Zellzahlen (Abbildung 3.19).

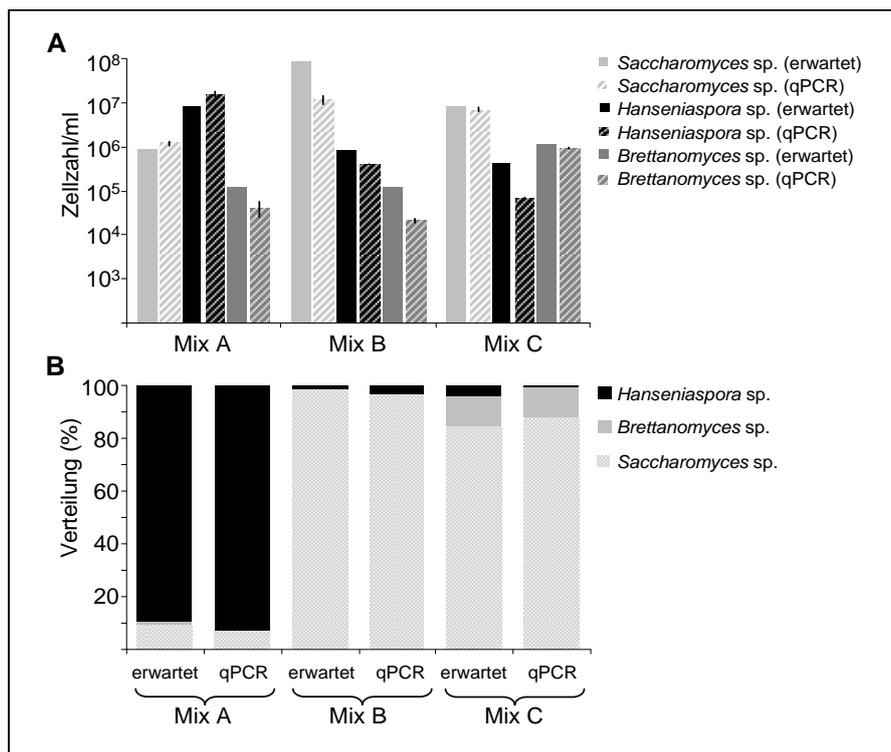


Abbildung 3.19: Vergleich der eingestellten Zellzahlen mit den durch qPCR ermittelten Zellzahlen von Mischkulturen aus *Saccharomyces cerevisiae* 328, *Hanseniaspora uvarum* 575 und *Brettanomyces bruxellensis* 600 im Vollmedium GYP. A) Darstellung der absoluten Zellzahlen/ml, B) Darstellung der prozentualen Verteilung der verschiedenen Arten auf Basis erwarteter bzw. mit qPCR ermittelter Gesamtzellzahlen. DNA-Isolierungen jedes Gemischs wurden zweifach durchgeführt. Die Ansätze mit den jeweiligen DNA-Mengen wurden ebenfalls zweifach durchgeführt.

In Mix A stimmten die durch qPCR ermittelten Zellzahlen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Hanseniaspora uvarum* gut mit den tatsächlichen Werten überein und waren leicht erhöht. *Brettanomyces bruxellensis* wurde mit einer geringeren Zellzahl wiedergefunden als ursprünglich eingesetzt. Ähnlich auch die Ergebnisse aus dem Zellmix C, nur dass hier bei *Hanseniaspora uvarum* geringere Zellzahlen ermittelt wurden, während der berechnete Titer von *Brettanomyces bruxellensis* annähernd dem der eingesetzten Menge entsprach. In Mix B waren die durch qPCR berechnete Zellzahlen bei allen Arten erniedrigt, besonders bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Brettanomyces bruxellensis*. Die eingesetzte Gesamtzellzahl war mit $8,9 \times 10^7$ Zellen/ml deutlich höher als in den anderen Ansätzen ($9,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Mix A, 1×10^7 Zellen/ml in Mix C). Die quantitative PCR ermittelte in diesem Mix eine Gesamtzellzahl von $1,2 \times 10^7$ Zellen/ml, was deutlich geringer war.

Werden die durch qPCR berechneten und tatsächlichen Gesamtzellzahlen als Grundlage für die Ermittlung der Art-Verteilung in einem Ansatz genutzt, wird etwa der Unterschied zwischen tatsächlicher Zellzahl und gemessener Zellzahl von *Saccharomyces cerevisiae* in Mix B geringer (Abbildung 3.19, B). Insgesamt kann bei dieser Darstellung von einer ähnlichen Verteilung der

Spezies nach qPCR-Analysen gesprochen werden, wenn auch die Darstellung insofern irreführend ist, als dass etwa bei Mix C höhere berechnete als tatsächliche Zellzahlen von *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, was aber den absoluten Werten (Abbildung 3.18, A) nicht entspricht.

Eine DNA-Isolierung, die Grundlage jeder quantitativen PCR ist, kann durch verschiedene Kultivierungsmedien verändert werden. So kann in unterschiedlichen Medien die Zellwand von Hefen unterschiedlich ausgeprägt sein und die Wirkung der bei der DNA-Isolierung eingesetzten zellwand-hydrolysierenden Enzyme erschwert werden. Da das hier vorgestellte qPCR-System die Flora von Most und Wein untersuchen soll, wurden Hefen in Traubensaft bei 20 °C als Standkultur für zwei Tage kultiviert, um mögliche Änderungen in der DNA-Isolierung oder auch PCR-Amplifikation, resultierend in veränderten qPCR-Ergebnissen, zu detektieren. Bis auf die Anzuchtbedingungen der Hefen war diese Untersuchung dem vorangegangenen Versuch analog und ist in Abbildung 3.20 zusammengefasst.

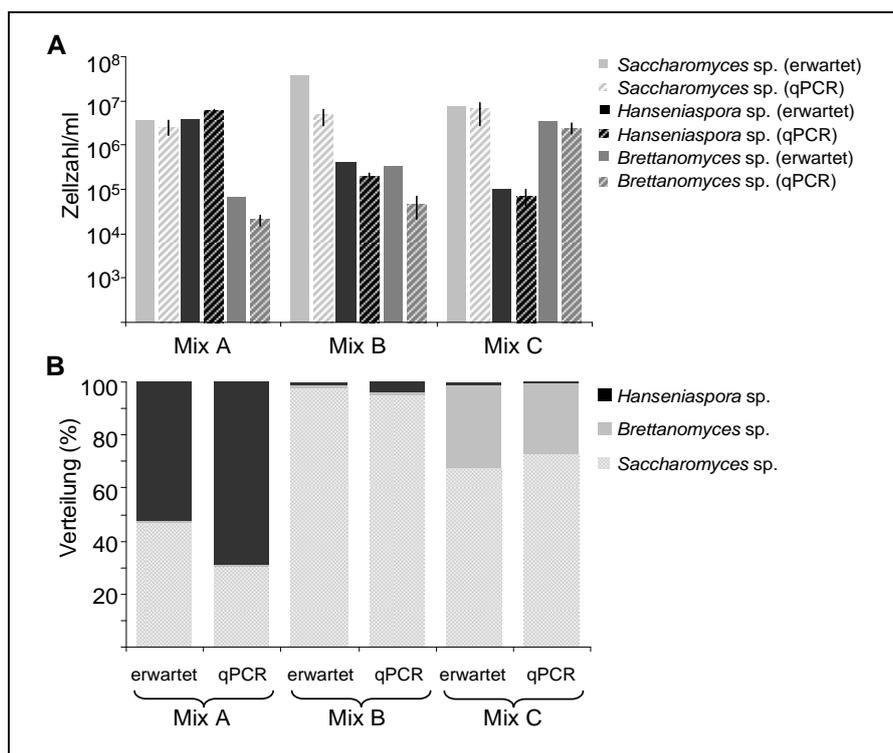


Abbildung 3.20: Vergleich der eingestellten Zellzahlen mit den durch qPCR ermittelten Zellzahlen von Mischkulturen aus *Saccharomyces cerevisiae* 328, *Hanseniaspora uvarum* 575 und *Brettanomyces bruxellensis* 600 im Traubensaft. A) Darstellung der absoluten Zellzahlen/ml, B) Darstellung der prozentualen Verteilung der verschiedenen Arten auf Basis erwarteter bzw. mit qPCR ermittelter Gesamtzellzahlen. DNA-Isolierungen jedes Gemischs wurden zweifach durchgeführt. Die Ansätze mit den jeweiligen DNA-Mengen wurden ebenfalls zweifach durchgeführt.

Allgemein konnten die gleichen Ergebnisse bezüglich der ermittelten Zellzahl der verschiedenen Arten erreicht werden wie auch im Vollmedium (siehe Abbildung 3.19). Auch hier in diesem Mix B wurden wieder geringere Zellzahlen per qPCR gemessen, als erwartet wurden. Besonders stark war dies auch wieder bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Brettanomyces bruxellensis* zu beobachten. Auch wurde in diesem Mix wieder eine höhere Gesamtzellzahl eingesetzt als bei den übrigen Gemischen. Diese konnte hier ebenfalls nicht durch die quantitative PCR erfasst werden. Auch die Verteilung der Arten auf Grundlage der ermittelten Zellzahlen bzw. der erwarteten war ähnlich. Allerdings zeigten hier die qPCR-Messungen einen größeren Anteil an *Hanseniaspora uvarum* im Hefen-Mix A als dies tatsächlich der Fall war (Abbildung 3.20, B).

Offensichtlich wurde in den vorangegangenen Versuchen mit Rein- und Mischkulturen teilweise ein zu hoher Zelltitel eingesetzt, mit der keine zuverlässige qPCR-Analyse mehr durchführbar war. Gründe für diese Limitierung könnten in der DNA-Isolierung zu finden sein. Die DNA-Isolierung der Firma Qiagen beruht auf einer enzymatisch durchgeführten Zellyse und anschließender Bindung der DNA an eine Silika-Membran. Durch den Einsatz hoher Zellzahlen könnte zum einen der enzymatische Verdau der Hefezellen unvollständig und zum anderen die Binde-Kapazität der Membran aufgebraucht sein. Daher wurden exemplarisch von verschiedenen Zellzahlen von *Saccharomyces cerevisiae* Stamm 328 DNA isoliert und eine quantitative PCR durchgeführt (Abbildung 3.21, A).

Zusätzlich sollte auch die minimale Nachweisgrenze von Zellen in diesem qPCR-System ermittelt werden. Auch hier wurde davon ausgegangen, dass der limitierende Faktor die DNA-Isolierung ist, da Tests mit DNA, die Zellzahlen von 200 bis 2000 Zellen/ml entsprachen, gute Amplifikate hervorgerufen hatten (s. Abbildung 3.18). Ein Schritt der DNA-Isolierung ist die Zentrifugation der zellwandfreien Protoplasten und das anschließende Abnehmen des Überstandes. Dies ist bei so geringen Zellkonzentrationen zwar möglich, handwerklich aber schwer durchzuführen. Hinzu kommt die Vermutung, dass so geringe DNA-Konzentrationen eine effektive Bindung bzw. Elution an die Silika-Membran erschweren können. Da im Habitat Most bzw. Wein selten so geringe Gesamtzellzahlen auftreten bzw. die Gesamtzellzahl durch Aufkonzentrierung der Probe künstlich und definiert erhöht werden kann, wurde von einer DNA-Isolierung von 200 oder 2000 Zellen/ml abgesehen. Vielmehr wurde dieser geringen Zellkonzentration Zellen einer anderen Spezies zugesetzt, wodurch sich die Gesamtzellzahl so erhöhte, dass von einer effektiven DNA-Isolierung ausgegangen werden konnte. Im in Abbildung 3.21, B dargestellten Testansatz wurden den zu untersuchenden Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* und *Brettanomyces*

bruxellensis jeweils 5×10^6 Zellen/ml der jeweiligen anderen Art zugesetzt und so nach DNA-Isolierung eine qPCR-Analyse durchgeführt.

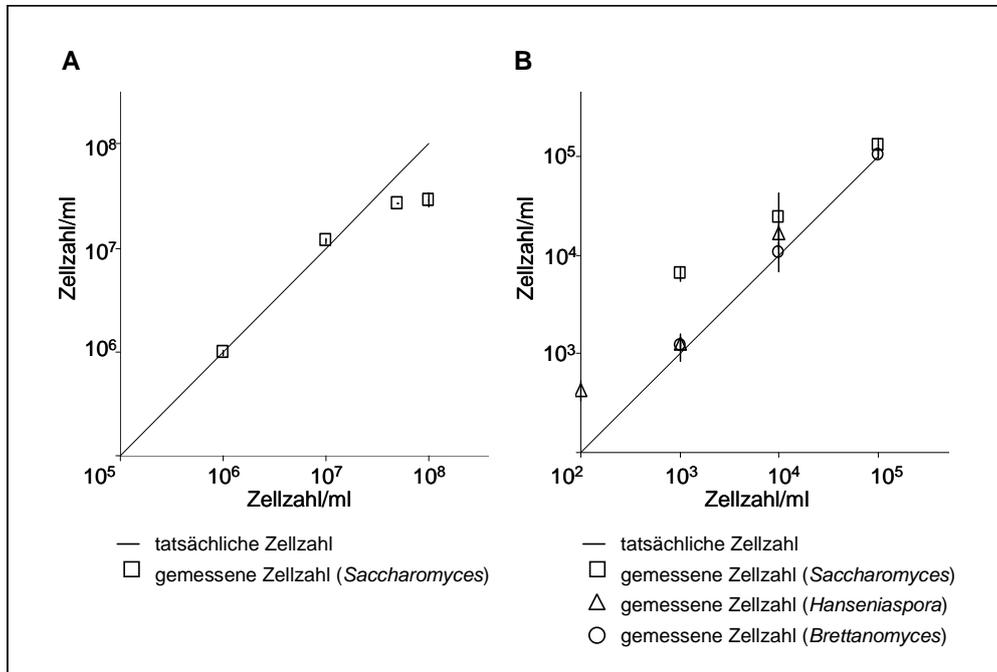


Abbildung 3.21: Nachweisgrenzen von Zellzahlen durch quantitative PCR. A) Maximal nachweisbare Zellzahlen am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae* 328. Zellzahlen wurden mittels Zählkammer eingestellt (1×10^6 bis 1×10^8 Zellen/ml), DNA isoliert und mit qPCR quantifiziert. B) Minimale nachweisbare Zellzahlen von *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm 2/6-2), *Hanseniaspora uvarum* (Stamm 527) und *Brettanomyces bruxellensis* (Stamm 604). Zellzahlen wurden mittels Zählkammer eingestellt (1×10^2 bis 1×10^5 Zellen/ml) und mit 5×10^6 Zellen/ml einer anderen Hefe-Art versetzt. Die x-Achse spiegelt die eingesetzte Zellzahl wider, die y-Achse die durch qPCR ermittelte. Die dargestellte Gerade stellt somit die optimale Wiederfindung der eingesetzten Zellzahlen dar.

Abbildung 3.21, A zeigt eine Unzuverlässigkeit der DNA-Isolierung bei hohen Zelltitern. Während bei einer Zellzahl von 1×10^6 und 1×10^7 Zellen/ml gute Ergebnisse erzielt wurden, die sehr nah an die tatsächlich eingesetzte Zellzahl heranreichten, wurde bei höheren Zellzahlen mit zunehmender eingesetzter Zellzahl zunehmende Abweichungen detektiert. Insgesamt konnte bis zu der hier gemessenen Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml beim Vergleich mit den eingesetzten Zellzahlen eine Gerade festgestellt werden, die dann in ein Plateau mündete. Auch zeigten die DNA von 1×10^8 Zellen/ml bzw. die entsprechenden qPCR-Ansätze die größten Abweichungen innerhalb der Dreifach-Bestimmungen, sodass man eventuell auch zusätzlich von Verunreinigungen der DNA ausgehen kann, die den PCR-Ablauf stören. Für folgende Zellzahlbestimmungen ist also eine Vorprüfung der Probe etwa mit Hilfe einer Zählkammer unerlässlich, um eine maximale Zellzahl bei der DNA-Isolierung nicht zu überschreiten und so eventuellen Ungenauigkeiten vorzubeugen.

Die in Abbildung 3.21, B dargestellte minimale Nachweisgrenze beruht auf der geringsten Zellmenge, die sich in einem Probengemisch befinden darf, um noch quantitativ mittels PCR nachweisbar zu sein. Es konnten bei allen untersuchten Hefe-Arten keine Abweichung bei einem Zelltiter von 10^5 Zellen/ml gefunden werden. *Brettanomyces bruxellensis* (Stamm 604) zeigte auch bei niedrigeren Zellkonzentrationen bis zu 10^3 Zellen/ml eine gute Korrelation mit den tatsächlich eingesetzten Zellmengen. Gleiches gilt bei *Hanseniaspora uvarum* (Stamm 527), wenn auch hier die gemessene Zellzahl bei 10^4 Zellen/ml leicht höher war als die tatsächlich in den Versuch eingebrachte. Bei diesem Stamm konnte zudem gezeigt werden, dass ein Zelltiter von 10^2 Zellen/ml per qPCR qualitativ nachweisbar war, jedoch die gemessene Zellzahl über der tatsächlichen lag. In diesem Bereich der Zellzahlen konnte kein Signal bei *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm 2/6-2) erreicht werden. Auch lagen hier die gemessenen Zellzahlen immer über den tatsächlichen, auch wenn dieser Unterschied mit der Erhöhung der eingebrachten Zellzahlen kontinuierlich geringer wurde. Generell konnte eine Korrelation dieses Detektionslimits mit der Nachweisgrenze von verdünnten DNA-Lösungen (s. Abbildung 3.18) festgestellt werden, wodurch aufgezeigt werden konnte, dass die DNA-Isolierung prinzipiell die Detektionsgrenze nicht einschränkt, wenn darauf geachtet wird, dass diese bei einer Gesamtzellzahl zwischen 10^6 und 10^7 Zellen/ml abläuft.

Es sollte nun die quantitative PCR zur Detektion und Quantifizierung der Hefen *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* und *Brettanomyces bruxellensis* in ihrem natürlichem Habitat Most sowie ihre Verteilung bzw. Sukzession während der alkoholischen Gärung eingesetzt werden. Hierfür wurde Traubensaft so mit den Stämmen beimpft, dass eine finale Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen/ml für *Saccharomyces cerevisiae*, 1×10^5 Zellen/ml für *Hanseniaspora uvarum* und 1×10^3 Zellen/ml für *Brettanomyces bruxellensis* vorlag. Dieses Verhältnis entspricht in etwa möglichen Keimzahlen im Most. Die Kultivierung erfolgte stehend, aber nicht strikt anaerob, bei $12\text{ }^\circ\text{C}$ über einen Zeitraum von 27 Tagen. Während der Kultivierung wurden Proben entnommen und die Gesamtzellzahl mittels Zählkammer, die koloniebildenden Einheiten durch Ausplattieren und die Zellzahl mittels quantitativer PCR bestimmt. Zusätzlich wurden die chemische Hauptparameter Glucose, Fructose und Ethanol per HPLC analysiert (Abbildung 3.22).

Abbildung 3.22, A zeigt die Gesamtzellzahl bestimmt durch die verschiedenen Techniken. Unabhängig von der Methode war eine rasche Zunahme der Zellzahl innerhalb der ersten sechs Tage zu verzeichnen, die ab diesem Zeitpunkt in ein Plateau mündete. Wie erwartet zeigten die koloniebildenden Einheiten die geringsten Werte. Zellzahlen, die mit Hilfe der quantitativen PCR ermittelt wurden, waren am ersten Probenstag größer als die Zellzahlen, die mit Hilfe der Zählkammer berechnet wurden. Danach zeigten die qPCR-Zellzahlen große Übereinstimmung mit

der Gesamtzellzahl per Zählkammer und pendelten sich schließlich zwischen den Werten der Zählkammer und den koloniebildenden Einheiten ein.

Die in Abbildung 3.22, B dargestellten chemischen Parameter zeigten den typischen Verlauf einer alkoholischen Gärung durch Hefen. Der anfängliche Gesamtzuckergehalt des Traubensaftes lag bei 154 g/l und teilte sich in 90 g/l Glucose und 64 g/l Fructose auf. Beide Zucker-Konzentrationen stagnierten in den ersten Tagen der Gärung und fielen dann rapide ab und konnten am 20. Tag nicht mehr detektiert werden. Mit der Abnahme der Zucker korrelierend stieg die Konzentration von Ethanol und erreichte an Tag 20 das Maximum von 103 g/l, was einem Volumenprozent von 13 % entsprach.

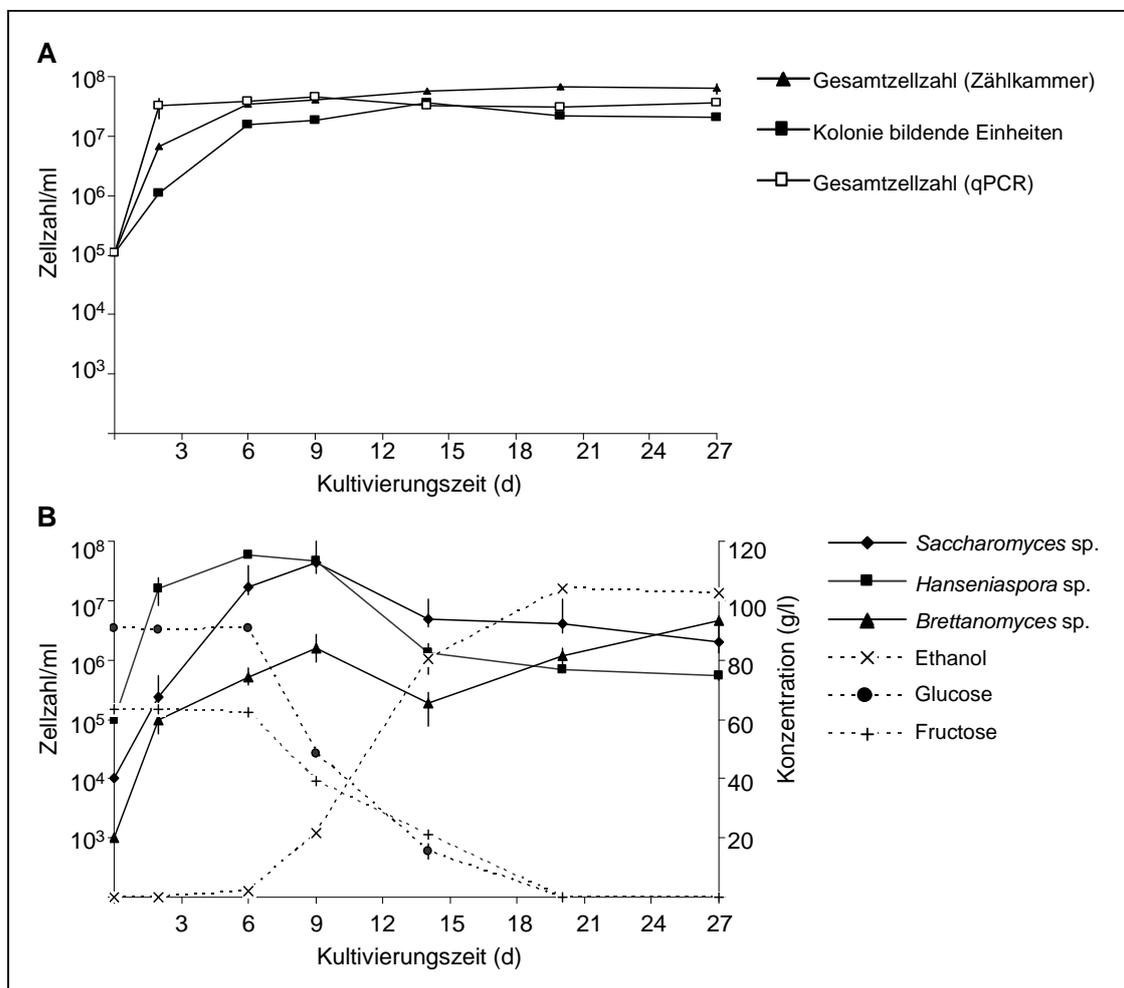


Abbildung 3.22: Mikrobielle Sukzession bei der Vergärung von Traubensaft. A) Vergleich der durch Zählkammer ermittelten Gesamtzellzahl und den koloniebildenden Einheiten mit der durch qPCR ermittelten Gesamtzellzahl. B) Darstellung der durch qPCR quantifizierten Zellzahlen von *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* und *Brettanomyces* sowie der Ethanol-, Glucose- und Fructose-Konzentration im Zeitraum von 27 Tagen. Die Bestimmung erfolgte aus zwei parallelen Ansätzen. qPCR-Analysen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Chemische Parameter wurden mittels HPLC bestimmt.

Die durch qPCR ermittelten Zellzahlen zeigten bei allen Hefe-Arten einen rapiden Anstieg in den ersten drei Tagen der Gärung. Während die Zellzahl von *Saccharomyces cerevisiae* weiter anstieg, erreichte die Zellzahl von *Hanseniaspora uvarum* schon an Tag 6 ihr Maximum und fiel dann ab Tag 9 ab. Zu diesem Zeitpunkt konnte auch der größte Anstieg in der Ethanolkonzentration festgestellt werden von 21,9 g/l (2,7 % v/v) an Tag 9 zu 80,3 g/l (10,5% v/v) an Tag 14. *Saccharomyces cerevisiae* erreichte früher die stationäre Phase, verblieb dort aber auch länger, um dann ebenfalls eine Reduktion der Zellzahl zu zeigen, die allerdings geringer ausfiel als bei *Hanseniaspora uvarum*. Auch *Brettanomyces bruxellensis* zeigte ein Maximum bezüglich seiner Zellzahlen an Tag 9. Danach sanken die Zellzahlen kurz, um wieder anzusteigen und ein Maximum am letzten Tag der Messung zu erreichen. Die hier ermittelte Zellzahl übertraf die Zellzahl von *Saccharomyces cerevisiae* und *Hanseniaspora uvarum* zu diesem Zeitpunkt. Insgesamt zeigte *Brettanomyces bruxellensis* ein langsames Wachstum, das aber über einen längeren Zeitraum anhielt, wodurch keine endgültige Abnahme der Zellzahl im Messzeitraum detektiert werden konnten. Anscheinend führten weder das versiegende Zuckerangebot noch die hohen finalen Ethanol-Konzentrationen zu einem raschen Wachstumsende.

3.3 Enzymatische Zellyse von weinrelevanten Hefen

Der Einsatz von Enzymen in der Weinbereitung ist verbreitet. So werden etwa Pektinasen verwendet, um Traubenhaut bzw. die Beerenzellwände zu hydrolysieren und zu schwächen, wodurch neben einer Freisetzung von aromaaktiven und farbgebenden Stoffen auch die Presszeit verkürzt und der eingesetzte Press-Druck vermindert werden soll. Der Zusatz von β -Glykosidasen soll laut Herstellern die Freisetzung von glykosidisch gebundenen Aromavorstufen fördern. Das Murein-hydrolysierende Enzym Lysozym darf in der Weinbereitung eingesetzt werden, um Bakterienwachstum zu kontrollieren oder das Wachstum von schädlichen Bakterien ganz zu unterdrücken. Bisher gibt es ein solches wachstumshemmendes Präparat allerdings nur für Bakterien; mögliche schädliche Hefe-Flora wird mit traditionellen Methoden wie dem Schwefeln bekämpft. Die Entwicklung eines Enzyms, das spezifisch die Zellwand von Hefen lysiert und so ihr Wachstum unterdrückt, war daher ein Ziel dieser Arbeit und wird im Folgenden vorgestellt.

3.3.1 Produktion und Sekretion von Zellwand-abbauenden Enzymen

In vorangegangenen Arbeiten am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung wurde die Biodiversität im Intestinaltrakt ausgesuchter Termiten-Spezies untersucht und verschiedenste Bakterien isoliert. Diese zeigten nicht selten glycanolytische Eigenschaften in Hinblick auf die Ausschüttung extrazellulärer Cellulasen (Wenzel et al 2002).

Aufgrund des hohen Anteils von β -1,3-Glucan in der Zellwand von Hefen wurden verschiedene dieser Bakterien auf ihr Potential β -1,3-Glucane abzubauen zu können analysiert. Hierbei konnte ein Bakterien-Stamm der Spezies *Delftia tsuruhatensis* (Stamm MV01) ausgemacht werden, der nicht nur das β -1,3-Glucan Laminarin hydrolysieren konnte, sondern zudem auch eine Aktivität gegenüber dem ebenfalls in der Hefezellwand vorkommenden Mannan zeigte.

Es konnte festgestellt werden, dass diese Aktivitäten des Bakteriums nicht vorlagen, wenn dieses in Vollmedium wie LB-Medium kultiviert wurde. Vielmehr schien eine Induktion durch die entsprechenden Polymere notwendig. Hierfür wurde dem Mangelmedium CYM, das bis auf geringe Mengen von Hefeextrakt keine weiteren Kohlenstoffquellen enthielt, verschiedene Induktoren zugefügt und nach Kultivierung die jeweiligen Aktivitäten im Kulturüberstand gemessen (Abbildung 3.23).

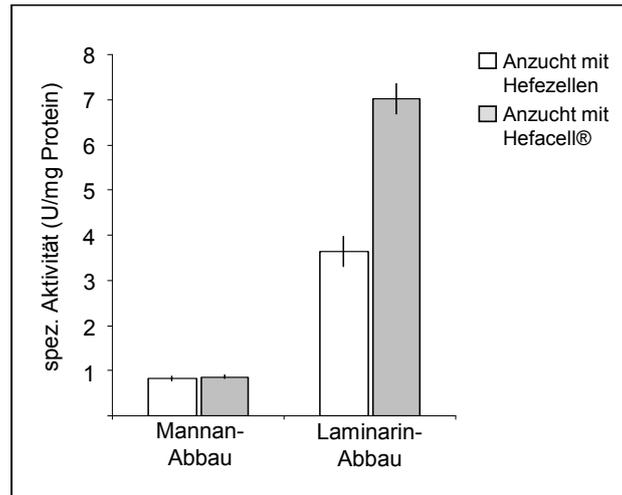


Abbildung 3.23: Spezifische β -Glucanase- und Mannanase-Aktivität von *Delftia tsuruhatensis* MV01 bei unterschiedlichen Anzuchtsmedien. Als Induktoren wurden zum einen Zellen von *Zygosaccharomyces bailii* (Stamm 427) und zum anderen das Hefezellwandpräparat Hefacell® verwendet. Die Anzucht erfolgte über drei Tage mit einem Kulturvolumen von 50 ml. Der erhaltene Kulturüberstand wurde mittels Gefriertrocknung 20 x konzentriert. Enzymaktivitäten wurden mittels DNS-Test bestimmt.

Beide Kulturüberstände zeigten eine gleiche Aktivität gegenüber dem Polymer Mannan. Unterschiede in der Enzymaktivität konnten dagegen bei der β -Glucanase-Aktivität ausgemacht werden. So wurde das β -1,3-Glucan Laminarin etwa zweimal effektiver durch den Kulturüberstand hydrolysiert, dem das Hefezellwandpräparat Hefacell® zugesetzt wurde. Es sei bemerkt, dass Aktivitäten gegen andere Polymere, die ebenfalls Bestandteil der Hefezellwand sind, in diesen Kulturüberständen nicht detektiert werden konnten, auch wenn *Delftia tsuruhatensis* MV01 grundsätzlich chitinolytische und proteolytische Aktivität zeigt (Larisika, 2010).

Auch dünnschichtchromatographisch konnte der Abbau der Polymere Laminarin und Mannan durch den mit Hefacell® produzierten Kulturüberstand dokumentiert werden (Abbildung 3.24). Während die Wirkung des Kulturüberstands im Falle von Laminarin mit der Entstehung mehrerer Signale einherging, konnte beim Abbau von Mannan nur ein Spot auf Höhe des Mannose-Standards detektiert werden. Zusätzlich konnte der Abbau der Zellwand der Hefe *Pichia fermentans* (Stamm 167) dargestellt werden. Nach Inkubation der Zellwand mit dem Kulturüberstand konnten verschiedene aber nicht klar definierte Signale mit Glucose typischer Färbung gefunden werden, sowie ein Signal, das die spezifische Färbung von Mannose aufwies.

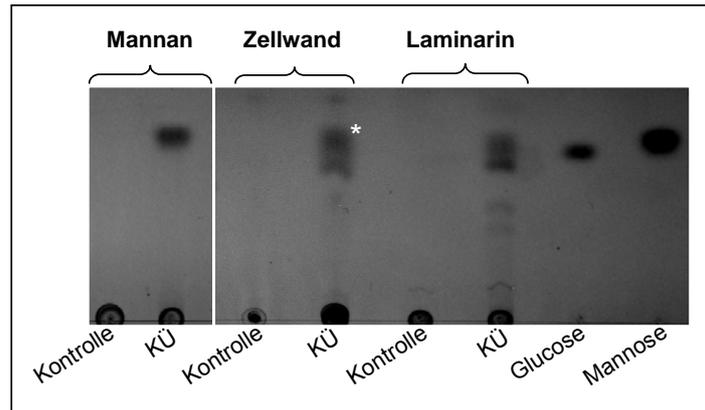


Abbildung 3.24: Dünnschichtchromatographische Darstellung der Hydrolyse der Polymere Laminarin und Mannan sowie der Zellwand der Hefe *Pichia fermentans* Stamm 167 durch Kulturüberstand von *Delftia tsuruhatensis* MV01. Als Kontrolle diente durch Hitze inaktivierter Kulturüberstand. Die Konzentration der Polymere betrug 1 mg/ml. Als Standard wurde Glucose bzw. Mannose (1 bzw. 2 mg/ml) mitgeführt. Zehn μ l von jeder Lösung wurden auf die Kieselgel-Platte aufgetragen. Die Markierung zeigt einen Mannose-Spot, der aufgrund unterschiedlicher Färbung im Vergleich zu Glucose unterschieden werden konnte. KÜ = Kulturüberstand.

Die durch unterschiedliche Induktoren gewonnenen Kulturüberstände wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Zellyse verschiedener Hefen auszulösen. Dies erfolgte mit Hilfe von Plattendiffusionstests (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Hefelytische Wirkung des aus verschiedenen Anzuchten (Induktion mit Hefezellen bzw. Induktion mit Hefezellwandpräpara Hefacell®) gewonnenen Kulturüberstands von *Delftia tsuruhatensis* MV01. Die Zellyse wurde mittels Plattendiffusionstests gemessen. Es wurden 20 μ l der konzentrierten Kulturüberstände verwendet. Die Inkubation erfolgte 16 Stunden. Gezeigt wird der Radius des Lysehoofs beginnend von den Grenzen des Auftrageorts des Kulturüberstands.

| Spezies | Stamm | Induktion mit Hefezellen | Induktion mit Hefacell® |
|----------------------------------|-------|--------------------------|-------------------------|
| | | Lysehof (cm) | Lysehof (cm) |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | 469 | 0,3 | 0,3 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | 495 | 0,2 | 0,2 |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 118 | 0,3 | 0,3 |
| <i>Pichia fermentans</i> | 167 | 0,2 | 0,2 |
| <i>Pichia membranifaciens</i> | 169 | 0,4 | 0,4 |
| <i>Pichia membranifaciens</i> | 227 | 0,3 | 0,3 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 101 | 0,2 | 0,2 |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 81 | 0,2 | 0,2 |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i> | 182 | 0 | 0 |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | 74 | 0,4 | 0,4 |
| <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | 68 | 0,3 | 0,3 |

Alle Hefen zeigten eine gewisse Sensitivität gegenüber den beiden Kulturüberständen. Eine Ausnahme bildete der Stamm von *Torulasporea delbrueckii*. Hier konnte keine Zellyse festgestellt werden. Ferner konnte keine Unterscheidung zwischen den beiden Kulturüberständen getroffen werden. Auch konnte bei den Hefen keine gattungsspezifische Eigenschaft in Form von besonderer Empfindlichkeit oder Resistenz gegenüber der lytischen Aktivität im Kulturüberstand festgestellt werden.

Auch wenn offensichtlich die unterschiedlichen Anzuchten zu keinem Effekt hinsichtlich der Aktivität gegenüber Hefezellen führten, so wurde dennoch im Weiteren mit dem Präparat Hefacell® als Induktor gearbeitet. Gründe waren die höhere Glucanase-Aktivität (s. Abbildung 3.23), als auch die einfache Handhabung des Zellwand-Präparats.

Für eine Reinigung und Charakterisierung der lytischen Enzyme war die Herstellung größerer Mengen Kulturüberstand essentiell. Abbildung 3.25 zeigt die Auswirkung des Einsatzes größerer Kulturvolumina auf die Enzymausbeuten.

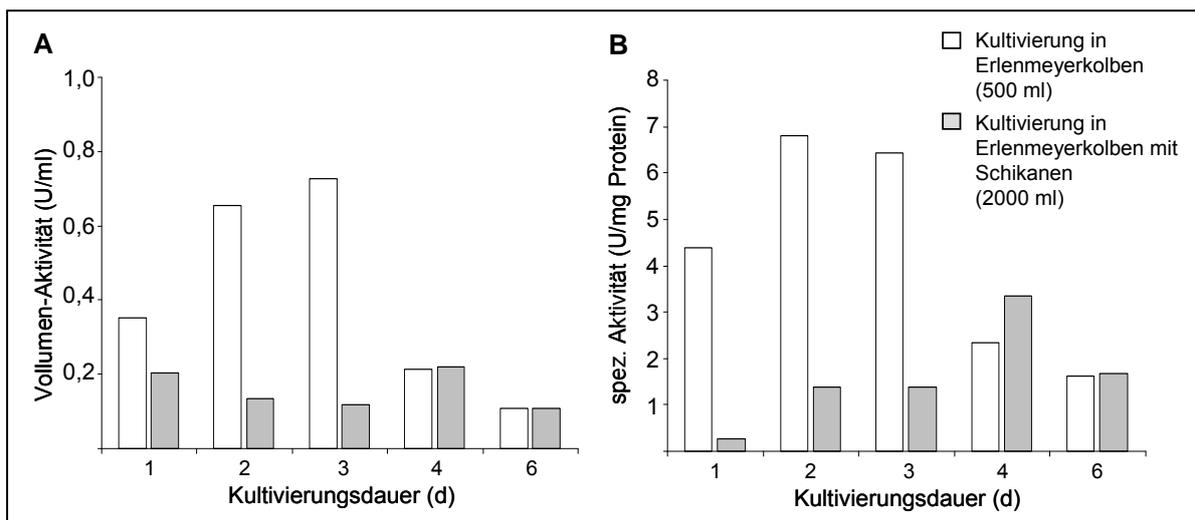


Abb. 3.25: Volumen-Aktivität (A) und spezifische Aktivität (B) der β -Glucanase von *Delftia tsuruhatensis* MV01 während der Kultivierung in unterschiedlichen Gefäßen und Volumina. Die Anzucht erfolgte über einen Zeitraum von sechs Tagen (d). An verschiedenen Tagen wurden Proben entnommen und der Kulturüberstand mittels Gefrierdrying 20 x konzentriert. Enzymaktivitäten wurden mittels DNS-Test bestimmt.

Die Kultivierung in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit einem Kulturvolumen von 200 ml zeigte die maximale spezifische Aktivität gegen das β -1,3-Glucan Laminarin am zweiten Tag der Kultivierung. Auch am dritten Tag konnten ähnlich hohe Werte erzielt werden. Diese Aktivitäten entsprachen in etwa auch den Aktivitäten bei Kultivierung im 50 ml-Maßstab (s. Abbildung 3.23). Bei Erhöhung des Kulturvolumen auf 800 ml (in einem 2000 ml-Schikanekolben) konnte zu keinem Zeitpunkt der beobachteten Kultivierung eine spezifische Aktivität über 3,3 Units/mg Protein detektiert werden. Diese maximale Aktivität war in etwa nur halb so groß wie die in geringeren Kulturvolumina. Auch

die Betrachtung der Volumen-Aktivität brachte ähnliche Ergebnisse. Der Einsatz großer Kulturvolumen brachte also in der Summe keine größeren Enzymausbeuten. Für eine Reinigung der lytischen Enzyme fand daher die Kultivierung im 200 ml-Maßstab statt.

3.3.2 Reinigung eines glucanolytischen Enzyms und partielle Reinigung eines Mannan-abbauenden Enzyms

Wie bereits erwähnt erfolgte die Kultivierung von *Delftia tsuruhatensis* MV01 im Minimalmedium CYM mit zugesetztem Hefezellwandpräparat. Einundzwanzig Kulturen à 200 ml Kulturvolumen wurden vereinigt, was einem Gesamtvolumen von 4,2 l entsprach. Für die hier gezeigte Proteinreinigung wurden hiervon 2,69 l verwendet. Die Reinigungsstrategie umfasste eine Aufkonzentrierung mittels Cross-Flow-Filtration, eine Dialyse und Pufferung durch herkömmliche Ultrafiltration und anschließende chromatographische Methoden mit einem FPLC-System zur Auftrennung verschiedener Proteinfractionen (siehe 2.7.2 und 2.7.3). Die durch diese chromatographischen Methoden (Anionenaustauscher- und Gelpermationschromatographie) gewonnenen Proteinfractionen hatten lediglich ein Volumen von einem Milliliter, wodurch eine Aktivitätsbestimmung mit Hilfe photometrischer Methoden (DNS-Test) nicht geeignet war. Durch den Einsatz von Screening-Methoden konnte nicht nur geringe Volumina der Proteinfractionen analysiert werden, auch war so die Analyse hoher Probenaufkommen möglich. Für die Detektion von β -Glucanasen wurde ein Plattendiffusionstest entwickelt, der als Substrat Laminarin enthielt. Dieses wurde mit CalcoFluor-White gefärbt. Ein Abbau des Laminarins konnte unter UV-Licht durch eine Abnahme der Fluoreszenz und so durch einen dunklen Hof um den Auftragepunkt erkannt werden. Mannanase-Aktivitäten wurden per Dünnschichtchromatographie durch den Nachweis des Hydrolyseprodukts Mannose nach Inkubation der Proteinfractionen mit Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae* ermittelt (Abbildung 3.26).

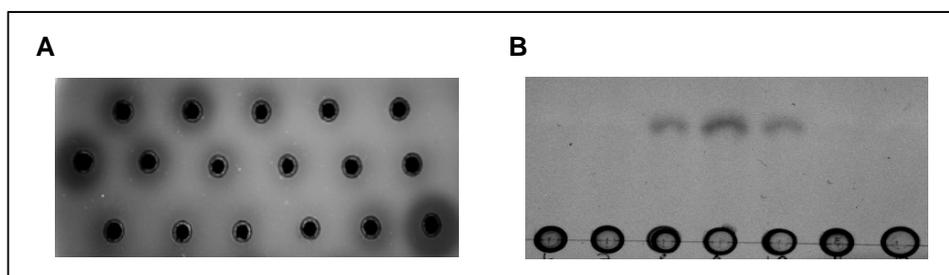


Abbildung 3.26: Prinzip des Screenings auf das Vorhandensein von β -Glucanasen und Mannanasen in Proteinfractionen. A) β -Glucanasen wurden mittels Plattendiffusionstest mit durch CalcoFluor-White gefärbtem Laminarin detektiert. Bei Betrachtung unter UV-Licht zeigt ein dunkler Hof um den Auftragepunkt der Enzymlösung die Hydrolyse von Laminarin. B) Produkte des enzymatischen Verdauens von Mannan durch Mannanasen in Proteinfractionen wurden dünnschichtchromatographisch ermittelt. Verglichen mit einem Mannose-Standard konnten die hier gezeigten Spots als Mannose identifiziert werden.

Der erste Reinigungsschritt erfolgte mit Hilfe einer Anionenaustauscher-Chromatographie bei einem pH-Wert von 7,5. Insgesamt wurden 24 FPLC-Läufe mit dem aufkonzentrierten und dialysierten Kulturüberstand durchgeführt, sodass – aufgrund der verwendeten 2ml-Probenschleife – ein Gesamtvolumen von 48 ml chromatographisch aufgetrennt wurde. Die Proteintrennung war in allen Probenläufen sehr ähnlich und auch Aktivitäten konnten in jedem Probenlauf den gleichen Fraktionen zugeordnet werden. Abbildung 3.27 zeigt daher exemplarisch am Beispiel eines Laufs die Proteinauftrennung nach Anionenaustauscherchromatographie.

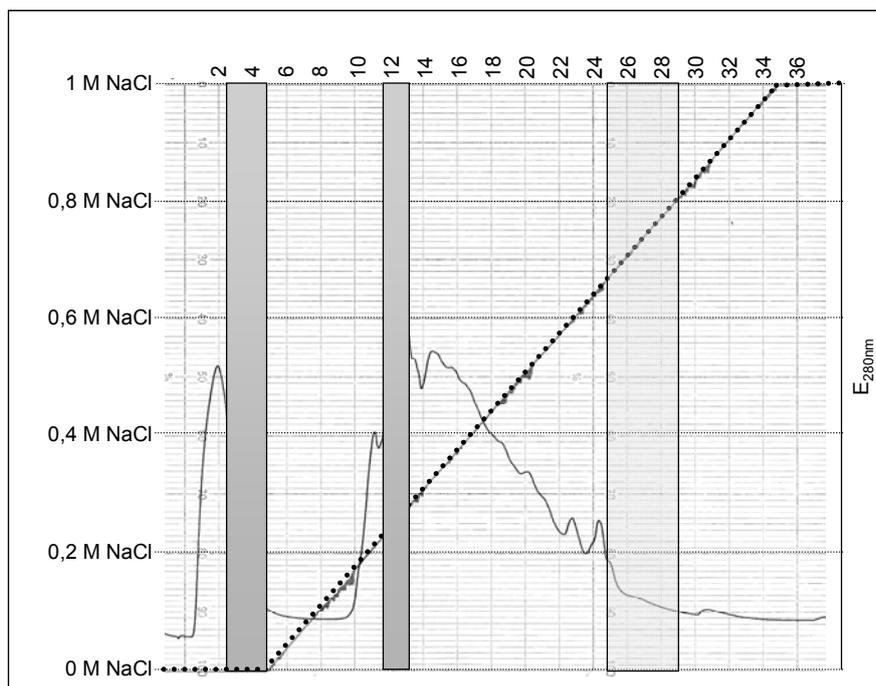


Abb. 3.27 : Anionenaustauscherchromatographie von aufkonzentriertem Kulturüberstand. Die Chromatographie wurde an der Säule MonoQ durchgeführt. Die Proteinelution erfolgte aufgrund eines linearen NaCl-Gradienten (0 bis 1 M NaCl, gestrichelte Linie). Der Kurvenverlauf entspricht der Stärke des Signals der Extinktionsmessung bei 280 nm und gibt Hinweise über relative Proteinkonzentrationen. Insgesamt wurden 36 Fraktionen à 1 ml nach der Chromatographie gesammelt. Dunkelgrau hinterlegte Fraktionen zeigen das Vorhandensein von β -glucanolytischer Aktivität, hellgrau hinterlegte Fraktionen das Vorhandensein von mannanolytischer Aktivität.

Plattendiffusionstests mit dem Substrat Laminarin zeigten in den Fraktionen 3 bis 5 und in den Fraktionen 12 und 13 glucanolytische Aktivität (Abbildung 3.27). Die Aktivität der frühen Fraktionen lässt eine ineffiziente Bindung der gesuchten Proteine vermuten. In Vorversuchen zeigte die Erhöhung des pH-Wertes auf 8,0 eine vollständige Bindung der glucanolytischen Aktivität an die Säule, jedoch fiel die Menge an nicht-bindenden Protein geringer aus, wodurch in aktiven Fraktionen von einem größeren Eintrag von Fremd-Protein ausgegangen werden musste. Um eine Reinigung zu erreichen, wurden daher auch die nicht an die Säule gebundenen Proteinfaktionen

verwendet. Fraktion 12 und 13 zeigten ebenfalls glucanolytische Aktivität und eluierten bei einer NaCl-Konzentration im Bereich von etwa 0,3 M.

Aktivität gegen Mannan konnte per Dünnschichtchromatographie in den Fraktionen 25 bis 29 festgestellt werden, wobei die Aktivität bei den Fraktionen 28 und 29 deutlich geringer ausfiel. Die aktiven Fraktionen eluierten bei NaCl-Konzentrationen zwischen 0,68 und 0,8 M.

Aktive Fraktionen jedes Laufs wurden so vereinigt, dass z.B. Fraktion 5 aus allen 24 Läufen zusammengefasst wurde. Die so erhaltenen 24 ml der jeweiligen Fraktion wurden mittels Ultrafiltration auf 0,9 ml eingengt.

Es folgte eine Gelpermeationschromatographie mit einer Sephadex G 75-Säule. Das auf die Säule gegebene Volumen betrug 200 μ l. Nicht bei allen Anionenaustauscher-Fraktionen konnte nach dieser Fraktionierung noch glucanolytische Aktivität festgestellt werden. Abbildung 3.28 zeigt am Beispiel der Anionenaustauscher-Fraktionen 4 und 13 (zur Orientierung s. Abbildung 3.27) ihre Auftrennung nach Gelpermeationschromatographie.

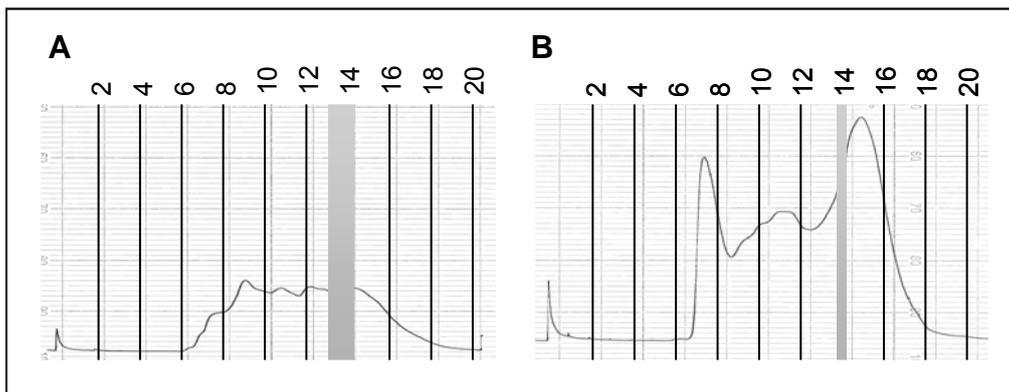


Abbildung 3.28: Gelpermeationschromatographie von Fraktionen nach Anionenaustauscherchromatographie. A) Chromatographie der Anionenaustauscher-Fraktion 4, B) Chromatographie der Anionenaustauscher-Fraktion 13. Die Chromatographie wurde an der Säule Sephadex G 75 durchgeführt. Der Kurvenverlauf entspricht der Stärke des Signals der Extinktionsmessung bei 280 nm und gibt Hinweise über relative Proteinkonzentrationen. Insgesamt wurden 20 Fraktionen à 1 ml gesammelt. Dunkelgrau hinterlegte Fraktionen zeigen das Vorhandensein von β -glucanolytischer Aktivität.

Eine Auftrennung des Proteingemischs erfolgte zwischen Fraktion 7 und 20. Die Chromatographie der Anionenaustauscher-Fraktion 4 zeigte geringere Intensitäten bei Messung der Extinktion bei 280 nm. Eine geringere Proteinmenge als in der Anionenaustauscher-Fraktion 13 (Abbildung 3.28, B) war schon anhand der Anionenaustauscherchromatographie zu vermuten (s. Abbildung 3.27). Bei beiden hier gezeigten Chromatographien konnten keine distinkten Protein-Peaks erkannt werden. Die glucanolytische Aktivität lag bei beiden Anionenaustauscher-Fraktionen nach Gelpermeationschromatographie in Fraktion 14, wobei bei Anionenaustauscher Fraktion 4

zusätzlich auch eine Aktivität in Fraktion 13 detektiert werden konnte. Die aktiven Fraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine durch eine sensitive Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 3.29).

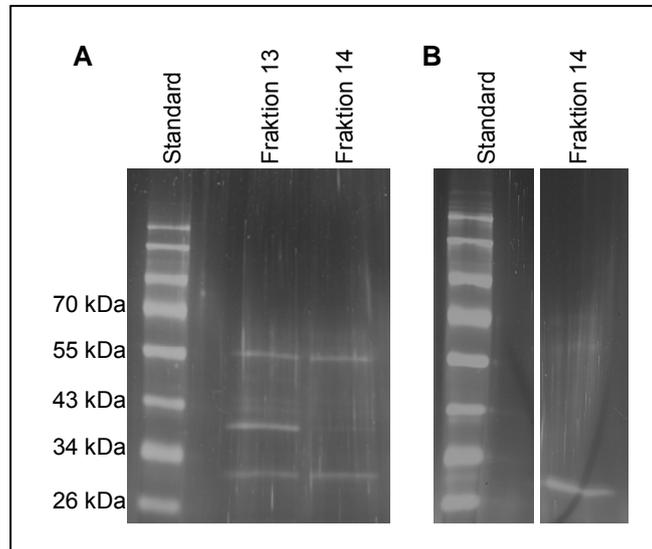


Abbildung 3.29: Glucanolytisch aktive Fraktionen der Gelpermeationschromatographie nach elektrophoretischer Auftrennung. A) Aktive Fraktionen 13 und 14 der Anionenaustauscher-Fraktion 4 (s. Abbildung 3.28, A), B) Aktive Fraktion 14 der Anionenaustauscher-Fraktion 13 (s. Abbildung 3.28, B). Die Elektrophorese erfolgte in einem 15% SDS-Gel. Es wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Als Elektrophorese-Standard wurde PageRuler Prestained Protein Ladder verwendet. Die hier gezeigte Darstellung ist eine Negativ-Darstellung.

Die Fraktionen der ursprünglichen Anionenaustauscher-Fraktion 4 zeigten drei (Fraktion 13) bzw. zwei (Fraktion 14) klar definierte Proteinbanden in einem Massenbereich zwischen etwa 30 und 55 kDa. Die Proteinbande mittlerer Größe konnte bei Fraktion 14 nicht mehr oder nur schwach erkannt werden. Die aktive Fraktion 14 der Anionenaustauscher-Fraktion 13 zeigte dagegen nur eine Proteinbande mit einer Masse zwischen 26 und 34 kDa. Diese war auch bei den Fraktion 13 und 14 der Anionenaustauscher-Fraktion 4 erkennbar. Das Vorkommen dieser Proteinbande in allen aktiven Fraktionen legte die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um das gesuchte glucanolytische Enzym handelte. Durch die Verwendung der sensitiven Silberfärbung war zudem davon auszugehen, dass die Fraktion 14 der Anionenaustauscher-Fraktion 13 eine reine Fraktion ohne Fremd-Protein darstellte. Im folgenden Kapitel (3.3.3) wird auf die Identifizierung und Charakterisierung dieses Proteins näher eingegangen.

Die Menge des in dieser Fraktion enthaltenen Proteins wurde bestimmt sowie auch die Aktivität der Fraktion gegen Laminarin mittels DNS-Test. So war eine Berechnung der spezifischen Aktivität möglich. Tabelle 3.7 stellt die einzelnen Schritte der Proteinreinigung noch einmal vor.

Tabelle 3.7: Zusammenfassung der Reinigung der β -Glucanase aus *Delftia tsuruhatensis* MV01. Dargestellt wird die Reinigung beginnend mit der Cross-Flow-Filtration des Kulturüberstands. Die Werte beziehen sich auf die Fraktion der Anionenaustauscher-Chromatographie (Fraktion 13) mit der durch anschließende Gelpermeationschromatographie eine Reinigung erzielt wurde. Andere, ebenfalls aktive Fraktionen wurden hier nicht beachtet. U = Units.

| Schritt | Volumen (ml) | Protein (mg) | Aktivität ¹ (U) | Spez. Aktivität (U/mg) |
|-----------------------------------|--------------|--------------|----------------------------|------------------------|
| Kulturüberstand | 2690 | 282 | 94,2 | 0,35 |
| Cross-Flow-Filtration | 48 | 40 | 81,4 | 3,19 |
| Anionenaustauscherchromatographie | 24 | 4,3 | 13,2 | 3,04 |
| Gelpermeationschromatographie | 1 | 0,034 | 0,34 | 10 |

¹ Die Aktivität bezieht sich auf das Gesamtvolumen der jeweiligen Probe.

Die Tabelle 3.7 zeigt, dass schon mit der Cross-Flow-Filtration eine Reinigung erfolgte, da hier im Vergleich zum zellfreien Kulturüberstand eine neunfache Steigerung der spezifischen Aktivität festzustellen war. Die Abnahme der Aktivität bezogen auf das Gesamtvolumen gibt allerdings Hinweise auf einen Verlust von β -Glucanase während dieser Aufkonzentrierung. Das Sinken der spezifischen Aktivität nach der Anionenaustauscherchromatographie lässt sich mit der Auswahl nur einer aktiven Fraktion begründen. Wären alle fünf aktiven Fraktionen (s. Abbildung 3.27) Grundlage dieser Berechnung, könnte von einer Steigerung der spezifischen Aktivität ausgegangen werden. Gleiches gilt für die Aktivität des Gesamtvolumens. Die nach Gelpermeationschromatographie erhaltene Fraktion (s. Abbildung 3.29, B) zeigte eine spezifische Aktivität von 10 U/mg. Insgesamt waren in dieser Probe nur noch 34 μ g Protein enthalten.

Wie schon erwähnt, besaß der Kulturüberstand neben einer β -glucanolytischen Aktivität auch eine mannanolytische. Diese konnte mittels Anionenaustauscherchromatographie gut von den glucanolytischen Aktivitäten getrennt werden (s. Abbildung 3.27). Auch mit diesen Fraktionen wurde eine weitere Reinigung durch eine Gelpermeationschromatographie versucht. Dabei wurde gleich vorgegangen wie auch schon bei der Reinigung der β -Glucanase: Die jeweiligen aktiven Fraktionen jedes Laufs wurden miteinander vereinigt und aufkonzentriert. Die so erhaltenen 24 ml der jeweiligen Fraktion wurden mittels Ultrafiltration auf 0,9 ml eingeengt. Abbildung 3.30 zeigt die Chromatogramme der Gelpermeationschromatographie dieser aktiven Fraktionen aus der Anionenaustauscherchromatographie.

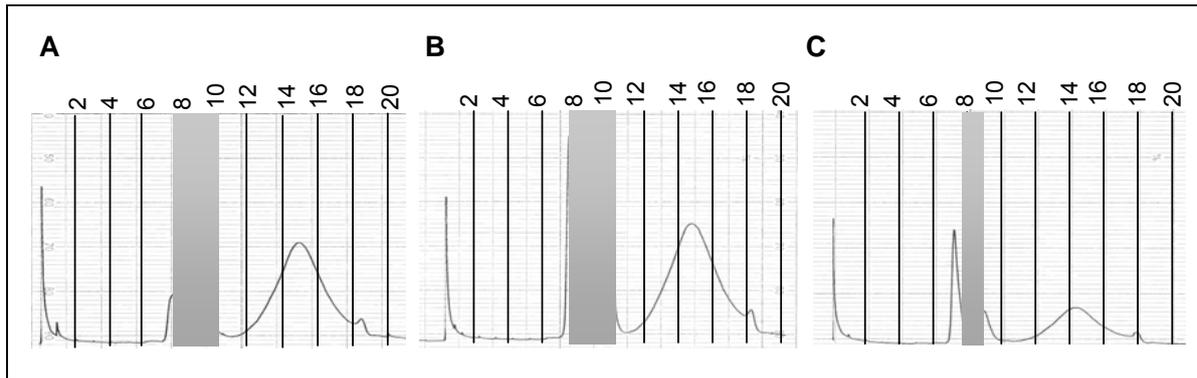


Abbildung 3.30: Gelpermeationschromatographie von Fraktionen nach Anionenaustauscherchromatographie. A) Chromatographie der Anionenaustauscher-Fraktion 25, B) Chromatographie der Anionenaustauscher-Fraktion 26, C) Chromatographie der Anionenaustauscher-Fraktion 27 (s. auch Abbildung 3.27). Die Chromatographie wurde an der Säule Sephadex G 75 durchgeführt. Der Kurvenverlauf entspricht der Stärke des Signals der Extinktionsmessung bei 280 nm und gibt Hinweise über relative Proteinkonzentrationen. Insgesamt wurden 20 Fraktionen à 1 ml gesammelt. Dunkelgrau hinterlegte Fraktionen zeigen das Vorhandensein von mannanalytischer Aktivität.

In allen Fällen konnte eine Aktivität gegen Mannan zwischen der 8. und 10. Fraktion festgestellt werden. Da bei diesen Chromatographien etwa bei der 7. Fraktion die eigentliche Proteinfractionierung begann, war von Proteinen mit großen Massen auszugehen. In allen drei ursprünglichen Anionenaustauscher-Fractionen konnten nach der Gelpermeationschromatographie die Mannanase-Aktivitäten keinem speziellen Protein-Peak zu geordnet werden. Die per Dünnschichtchromatographie ermittelten Aktivitäten sind auch noch einmal in Abbildung 3.31, A dargestellt. Abbildung 3.31, B zeigt die bereits vermuteten großen Proteinmassen in den aktiven Fraktionen. Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteinbanden zeigten Massen zwischen etwa 50 kDa und größer als 170 kDa, ein Größenbereich, der auf eine ungenügende Auftrennung schließen lässt. Als Grund für die nicht überzeugende Fraktionierung nach Proteinmassen kann die verwendete Säule der Gelpermeationschromatographie genannt werden. Sephadex G 75 eignet sich für die Auftrennung von Proteingrößen (berechnet für globuläre Proteine) von 3000 bis 80000 Dalton und ist demnach nicht ausreichend für Proteine in dem hier gezeigten Massenbereich. Da alle hier elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen eine Aktivität gegen Mannan besaßen, könnte das übereinstimmende Vorkommen von bestimmten Banden in allen Fraktionen auf die Mannanase schließen lassen. Dieses Vorgehen ist aber gewiss spekulativ.

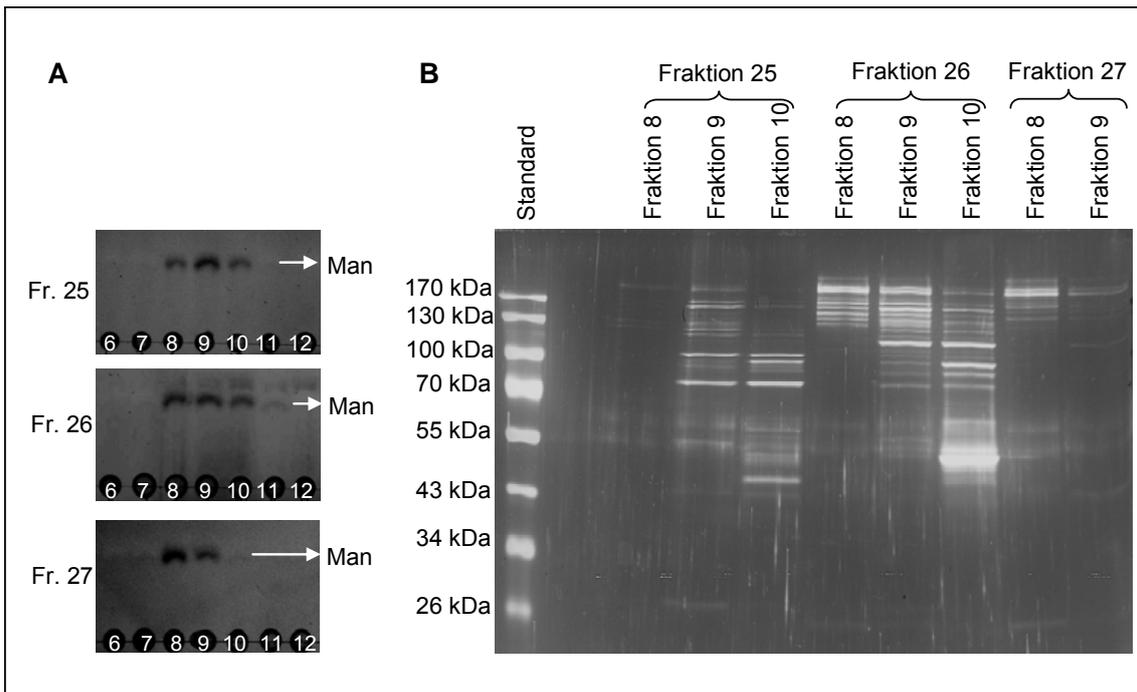


Abbildung 3.31: Mannan hydrolysierende Fraktionen der Gelpermeationschromatographie. A) Dünnenschichtchromatographischer Nachweis von mannanolytischer Aktivität von Fraktionen der Anionenaustauscher-Fraktion 25, 26 und 27 (s. auch Abbildung 3.30). Die hier dargestellten Spots entsprechen Mannose. B) Elektrophoretische Auftrennung dieser Fraktionen. Die Elektrophorese erfolgte in einem 10% SDS-Gel. Es wurde eine Coomassiefärbung durchgeführt. Als Elektrophorese-Standard wurde PageRuler Prestained Protein Ladder verwendet. Die hier gezeigte Darstellung ist eine Negativ-Darstellung.

Die gereinigten oder teilgereinigten Fraktionen mit glucanolytischer bzw. mannanolytischer Aktivität wurden auf ihre Aktivität gegen Hefezellen getestet, um aus schließen zu können, dass andere aktive Substanzen im Kulturüberstand für die bisher gemessene Zellyse verantwortlich sind (s. Tabelle 3.6). Dabei konnte im Falle der β -Glucanase aufgrund der geringen Ausbeuten nicht mehr auf die zuvor vorgestellte reine Fraktion zurückgegriffen werden. Vielmehr wurden aktive Fraktionen nach Gelpermeationschromatographie vereinigt (s. etwa Abbildung 3.29, A). Diese zeigten neben der vermuteten β -Glucanase auch geringe Mengen an Fremdprotein, jedoch keine verfälschenden Fremd-Aktivitäten wie etwa Mannanase-Aktivität. Gleich wurde mit den Fraktionen verfahren, die Mannanase-Aktivität enthielten. Auch diese wurden vereinigt und für den Test eingesetzt. Auch hier konnte nur mannanolytische Aktivität aber keine glucanolytische Aktivität festgestellt werden.

Diese glucanolytisch wirkende Fraktion einerseits und die mannanolytisch wirkende Fraktion andererseits wurden gegen die Substrate Laminarin, Mannan und die Zellwand von *Pichia fermentans* 167 getestet. Anschließend wurde durch Plattendiffussionstests die Aktivität gegen intakte Hefezellen bestimmt. Hiefür wurde auch ein Gemisch aus Glucanase- und Mannanase-Fraktionen eingesetzt (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Aktivität der Fraktionen mit glucanolytischer bzw. mannanolytischer Aktivität sowie ein Gemisch beider Aktivitäten gegen verschiedene Substrate. Die spezifische Aktivität gegen Laminarin, Mannan und Hefezellwand von *Pichia fermentans* 167 wurde photometrisch mittels DNS-Test bestimmt, die Aktivität gegen ausgesuchte Hefen mittels Plattendiffusionstest (Inkubationsdauer 16 Stunden).

| Aktivität | β -Glucanase | Mannanase | β -Glucanase + Mannanase ¹ |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|---|
| spezifische Aktivität (U/mg) gegen | | | |
| Laminarin | 7,06 (\pm 0,38) | 0,06 (\pm 0,03) | 3,56 |
| Mannan | 0,03 (\pm 0,02) | 1,46 (\pm 0,06) | 0,75 |
| Hefe-Zellwand | 4,11 (\pm 0,13) | 0,70 (\pm 0,06) | 2,41 |
| lytische Aktivität (cm) gegen | | | |
| <i>Pichia fermentans</i> 167 | 0,2 | 0 | 0,2 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 101 | 0,2 | 0 | 0,2 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 72 | 0,3 | 0 | 0,2 |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 81 | 0,3 | 0 | 0,2 |

¹ Das Gemisch aus Glucanase und Mannanase-Fraktion lag im Verhältnis 1:1 vor. Die spezifische Aktivität gegen Laminarin, Mannan und Zellwand ergab sich rechnerisch aus den gemessenen Werten der getrennten Fraktionen. Lytische Aktivität dieses Gemisches gegen Hefen wurde hingegen experimentell ermittelt.

Die oben erwähnte Verunreinigung der β -glucanolytischen Fraktion wird durch die Verringerung der spezifischen Aktivität gegen Laminarin im Vergleich zur reinen Fraktion (10 U/mg Protein) verdeutlicht. Die Mannanase enthaltene Fraktion zeigte eine spezifische Aktivität gegen Mannan von 1,46 U/mg, was einer ungefähre Verdopplung zum konzentrierten Kulturüberstands entspricht (s. auch Abbildung 3.23). Dies verdeutlicht den durch Säulenchromatographien erreichten Reinigungserfolg. Bei beiden Fraktionen wurden auch die jeweilig anderen Enzymaktivitäten gemessen. Diese waren allerdings sehr gering. So war Grundlage der ermittelten Mannanase-Aktivität in der Glucanase-Fraktion ein im DNS-Test ermittelter Extinktionsunterschied von 0,004 und kann dementsprechend vernachlässigt werden. Beide Fraktionen zeigten eine Aktivität gegen die Zellwand von *Pichia fermentans* 167. Dass hier durch die β -Glucanase-Fraktion höhere Aktivitäten erzielt wurden, als durch die Mannanase-Fraktion, kann zum einen in der ungleichen Verteilung der beiden Polymere in der Hefezellwand eine Begründung finden, als auch in der unterschiedlichen Wirkungsweise der Enzyme. So konnten bereits durch dünn-schicht-chromatographische Methoden Hinweise erhalten werden, dass die β -Glucanase im Kulturüberstand eher endoglykosidisch spaltet, während bei Inkubation des Kulturüberstandes oder

Proteinfraktionen mit Mannan stets nur das Produkt Mannose entstand, was auf eine exoglykosidische Hydrolyse hindeutet.

Bei der Ermittlung der Zellyse konnte hingegen große Unterschiede in der Wirkung der zwei Fraktionen festgestellt werden. Während die β -Glucanase-Fraktion alle Hefen lysieren konnte und dies mit vergleichbaren Werten wie bereits im Kulturüberstand tat, zeigte die Fraktion mit mannanolytischer Aktivität keinerlei Aktivität gegen die hier eingesetzten Hefen (s. Tabelle 3.8). Da die Wirkung einer Mannanase eventuell zwar keinen Einfluss auf die direkte Lyse von Zellen hat, aber durch ihre Aktivität Teile der Zellwand so geschädigt werden können, dass andere Enzyme effektiver angreifen können, wurde ein Gemisch aus beiden Fraktionen hergestellt. Hier wurden zum Teil gleiche oder leicht verringerte Lyse-Werte erzielt wie beim Einsatz der glucanolytischen Fraktion allein. Die Argumentation der Nicht-Vergleichbarkeit aufgrund unterschiedlicher Proteinmengen in beiden Ansätzen kann nicht greifen, da Versuche mit Gemischen aus Glucanase-Fraktion und Wasser im Verhältnis 1:1 die gleichen Ergebnisse lieferten (Daten nicht gezeigt).

Eine Wirkung der Mannanase auf die Zellwand konnte zwar bestätigt werden, jedoch keine direkte Auswirkung auf die Hefezelle selbst. Auch eine Aktivitätsverstärkung der Glucanase durch die Mannanase konnte nicht beobachtet werden, sodass davon auszugehen ist, dass dieses Enzym in der Zellyse von Hefen keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt.

Aus diesen Gründen wurde auf eine weitere Reinigung der mannanolytischen Fraktionen verzichtet und der Schwerpunkt auf die Charakterisierung der β -Glucanase gelegt.

3.3.3 Charakterisierung der β -Glucanase

Die Bestimmung der Masse der gereinigten β -Glucanase wurde elektrophoretisch mit Abgleich eines Proteinstandards bestimmt (Abbildung 3.32, A). Es ergab sich hierbei eine Masse von etwa 28000 Dalton. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Proteinbande mit der berechneten Masse tatsächlich dem gesuchten Enzym entsprach. Hierfür wurde mit Hilfe der Zymogramm-Technik die elektrophoretisch aufgetrennte und denaturierte β -Glucanase-Fraktion renaturiert und somit die Enzymaktivität wieder hergestellt. Durch Auflegen des Elektrophorese-Gels auf ein Substratgel bestehend aus mit CalcoFluor-White gefärbten Laminarin ließ sich eine Enzymaktivität an der Stelle im Gel feststellen, wo auch die Proteinbande mit der Masse von 28000 Dalton zu finden war (Abbildung 3.32, B).

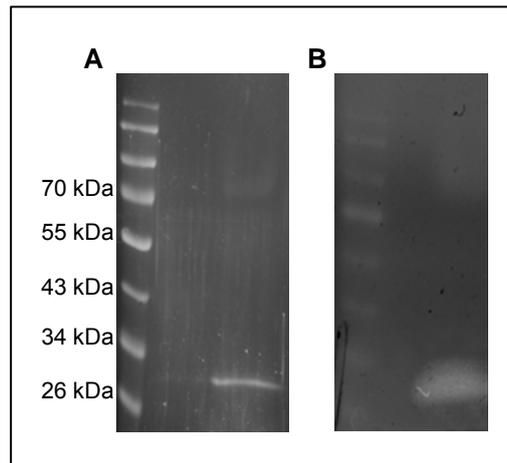


Abbildung 3.32: Elektrophoretische Auftrennung der β -Glucanase-Fraktion. A) Elektrophoretische Auftrennung und anschließende Proteinfärbung mit Coomassie, B) Elektrophoretische Auftrennung und anschließende Renaturierung und dreistündige Inkubation auf einem Substratbett aus gefärbtem Laminarin. Die Elektrophorese erfolgte in einem 15 % SDS-Gel. Als Elektrophorese-Standard wurde PageRuler Prestained Protein Ladder verwendet. Die hier gezeigte Darstellung ist eine Negativ-Darstellung.

Der isoelektrische Punkt des Enzyms wurde mittels isoelektrischer Fokussierung bestimmt. Nach Abgleich mit dem mitgeführten Standard konnte dieser auf 4,3 berechnet werden (Abbildung 3.33). Dies begründet auch die Wahl der Anionenaustauscherchromatographie als ersten Schritt in der Chromatographie-Reinigung und die Beobachtung in Vorversuchen, dass die Verwendung von Kationenaustauscherchromatographien zu keiner Bindung der Aktivität an die Säule führte.

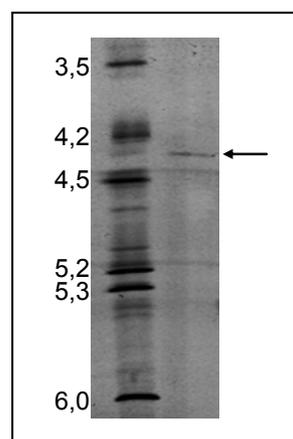


Abb. 3.33: Isoelektrische Fokussierung der β -Glucanase-Fraktion. Die linke Spur zeigt den Standard IEF Marker 3-10 (Serva), die rechte Spur die Probe. Der Pfeil kennzeichnet die Proteinbande der β -Glucanase. Die Proteinfärbung erfolgte mit Kristallviolett.

Zusätzlich wurde der N-Terminus bestimmt. Hierfür wurde die Glucanase-Fraktion elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die eigentliche Sequenzierung wurde als Auftragsarbeit von der Firma Toblab durchgeführt. Es konnten insgesamt 15 Aminosäuren

bestimmt werden. Diese wurden durch eine BLAST-Suche mit der NCBI-Datenbank verglichen (Tabelle 3.9)

Tabelle 3.9: N-terminale Sequenz der β -Glucanase von *Delftia tsuruhatensis* MV01 und ihr Abgleich mit der NCBI-Datenbank. Gezeigt werden Aminosäuresequenzen ausgewählter Arten aus verschiedenen Phyla, die Berechnung identischer und ähnlicher Aminosäuren sowie die von den jeweiligen Autoren zugefügte Beschreibung der Proteine. Sequenzen sind so dargestellt, dass sie als Alignment gelesen werden können. Hierbei zeigen unterstrichene Aminosäuren Ähnlichkeit mit der Aminosäure des N-Terminus von *D. tsuruhatensis* MV01 an der jeweiligen Position. Die Accessionnummern der Proteine sind in Klammern bei den jeweiligen Spezies angegeben. As = Anzahl der Aminosäuren.

| Spezies | Sequenz | Identität Ähnlichkeit As/As (%) | Beschreibung |
|---|---------------------------|---------------------------------------|--|
| <i>Delftia tsuruhatensis</i> MV01 | APGDLLWSDEFDGAA | - | - |
| <i>Cryptococcus laurentii</i> ¹ (P85238) | APGDLLWSDEFDGAA | 15/15 (100%) 15/15 (100%) | Endo-1,3- β -glucosidase |
| <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> ² (AAC38290) | APGDLLWSDEFDGAA | 15/15 (100%) 15/15 (100%) | β -1,3-Glucanase |
| <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> ² (YP_003679525) | APGDVVWSDEFDGAA | 13/15 (87%) 13/15 (87%) | Mitglied der Glykosid- Hydrolase-Familie 16 |
| <i>Arthrobacter aurescens</i> ² (YP_946579) | APGKLVWSDEF <u>NG</u> PA | 11/15 (73%) 12/15 (80%) | Mitglied der Glykosid- Hydrolase-Familie 16 |
| <i>Solibacter usitatus</i> ³ (ABJ83802) | ----LLWSDD <u>FN</u> GAA | 9/11 (82%) 11/11 (100%) | Mitglied der Glykosid- Hydrolase-Familie 16 |
| <i>Acidobacterium</i> sp. ³ (YP_004210159) | ----LVWSDEF <u>FN</u> GAA | 9/11 (82%) 10/11 (91%) | Mitglied der Glykosid- Hydrolase-Familie 16 |
| <i>Sphingomonas</i> sp. ⁴ (ZP_01301529) | ----LVWSDEFDGA- | 9/10 (90%) 9/10 (90%) | Endo-1,3- β -D- Glucosidase |
| <i>Glaciecola</i> sp. ⁴ (ZP_03559897) | ----LVWSDEFDGTA | 9/11 (82%) 9/11 (82%) | Endo-1,3- β -D- Glucosidase |
| <i>Pedobacter saltans</i> ⁵ (YP_004274995) | --- <u>N</u> LLWADEFD-G- | 8/10 (80%) 9/10 (90%) | Mitglied der Glykosid- Hydrolase-Familie 16 |
| <i>Robiginitalea biformata</i> ⁵ (YP_003195888) | --- <u>E</u> LVWSDEFDGDA | 9/12 (75%) 10/12 (83%) | β -Glucanase |

¹ Mitglied der Eukaryota (Phylum Basidiomycota), ² Mitglied des Phylums Actinobacteria, ³ Mitglied des Phylums Acidobacteria, ⁴ Mitglied des Phylums Proteobacteria, ⁵ Mitglied des Phylums Bacteroidetes.

Die hier gezeigten Sequenzen anderer Taxa sind Bestandteile von Proteinen, die, wenn sie nicht näher beschrieben sind, zumindest konservierte Protein-Domänen der Glykosid-Hydrolase-Familie

16 besitzen. Diese Enzymfamilie beinhaltet Enzyme wie β -Agarasen, Endo- β -1,3-1,4-Glucanase, Endo- β -Galactosidasen und auch Endo- β -1,3-Glucanasen.

Die BLAST-Ergebnisse sind nur für die Proteinsequenzen von *Cryptococcus laurentii*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Norcardiopsis dassonvillei* und *Arthrobacter aurescens* statistisch abgesichert, insofern als dass der Vergleich der Proteinsequenz mit der Sequenz von *Delftia tsuruhatensis* MV01 einen E-Value-Wert größer 0,22 lieferte. Dennoch kann von einer gewissen Verwandtschaft aller Sequenzen zu der Sequenz von *Delftia tsuruhatensis* ausgegangen werden, da die übereinstimmenden Sequenzen alle an Aminosäurepositionen im Bereich von 31 bis 51 der jeweiligen Enzyme gefunden wurden. Da die Enzyme aber als Exoenzyme charakterisiert sind, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Aminosäuresequenzen um Vorstufen-Sequenzen inklusive eines Signalpeptids handelt, das der Sekretion aus der Zelle dient. So zeigte etwa die Analyse des Proteins von *Acidobacterium* sp. eine wahrscheinliche Signalpeptid-Schnittstelle zwischen den Aminosäure-Positionen 26 und 27. Die mit *Delftia tsuruhatensis* übereinstimmende Aminosäuresequenz befindet sich hingegen an Position 36, stellt also gewissermaßen den Anfang des fertigen Exoenzyms dar. Eine Ausnahme bei dieser Recherche ist *Solibacter usitatus*. Das hier gezeigte Enzym besteht aus 1039 Aminosäuren und die BLAST-Suche ergab Treffer der N-terminalen Sequenz von *Delftia tsuruhatensis* ab der 804. Aminosäure dieses Enzyms. Hierbei stellt allerdings der Anfang der Sequenz konservierte Domänen der Glykosid-Hydrolase-Familie 10 dar. Die Sequenzähnlichkeiten mit der Glykosid-Hydrolase-Familie 16, die die β -1,3-Glucanasen enthält, beginnen erst in dem Bereich in dem auch die Übereinstimmung mit dem N-Terminus von *Delftia tsuruhatensis* gefunden wurde.

Die taxonomische Einordnung der hier gezeigten Arten erstreckt sich über verschiedenste Phyla der Eubakterien sowie hin zu den Eukaryoten. Der N-Terminus von *Delftia tsuruhatensis* MV01 zeigte geringere Ähnlichkeiten zu den Aminosäuresequenzen von Bakterien aus dem eigenem Phylum (Proteobacteria) als mit Sequenzen aus dem Phylum Actinobacteria und der Sequenz aus der Hefe *Cryptococcus laurentii*. Die identischen Sequenzen aus dem Actinobakterium *Cellulosimicrobium cellulans* und der eukaryotischen Hefe *Cryptococcus laurentii* indizieren eine Verteilung dieser Sequenz über eine große phylogenetische Distanz.

Der N-Terminus des hier charakterisierten Enzyms von *Delftia tsuruhatensis* MV01 konnte also in die Enzymgruppe der Glykosid-Hydrolase-Familie 16 eingeordnet werden. Die dünnschicht-chromatographische Untersuchung mit dem β -1,3-Glucan Laminarin lieferte zusätzlich Hinweise über die Art der Spaltung durch diese β -Glucanase (Abbildung 3.34). Die folgenden Charakterisierungen des Enzyms wurden nicht mehr mit einer reinen Fraktion der β -Glucanase durchgeführt, sondern mit einem teilgereinigtem Präparat nach Anionenaustauscher-

Chromatographie. Hier konnten allerdings störende Enzymaktivitäten ausgeschlossen werden, wie etwa zusätzliche Glucanase- oder andere Hefezellwand-hydrolysierende Aktivitäten.

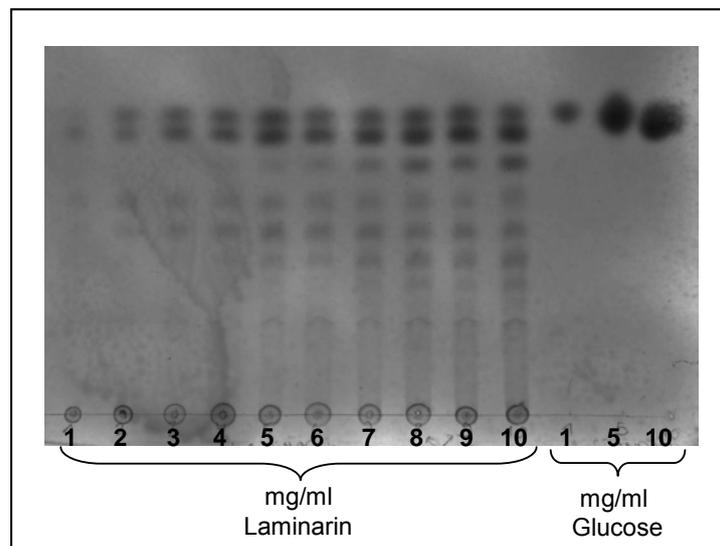


Abbildung 3.34: Abbau von Laminarin unterschiedlicher Konzentrationen durch die β -Glucanase. Die Konzentration des im Ansatz eingesetzten Laminarins betrug zwischen 1 und 10 mg/ml. Als Standard wurde Glucose (1, 5 und 10 mg/ml) mitgeführt. Zehn μ l von jeder Lösung wurden auf die Kieselgel-Platte aufgetragen. Die Inkubation der Enzymansätze erfolgte über Nacht bei 30 °C.

Die Dünnschichtchromatographie zeigte zum einen, dass auch bei einer Konzentration von 10 mg/ml Laminarin dieses effektiv von der β -Glucanase gespalten wurde und es nicht zu einer Hemmung durch eine zu große Menge an Substrat kam. Nach Auftrennung des mit Enzym inkubierten Substrats konnten neben dem Monomer Glucose insgesamt acht Produkte nachgewiesen werden. Da diese dünnschichtchromatographische Trennung auch aufgrund von Molekülgrößen funktioniert, kann bei Signalen mit geringeren Laufweiten von Glucose-Oligomeren wie Dimeren, Trimeren etc. ausgegangen werden. Hierbei kann nicht beginnend von Glucose auf Dimere, Trimere, Tetramere und so weiter geschlossen werden, da Laminarin nicht nur aus β -1,3-glykosidisch verknüpfter Glucose besteht, sondern auch β -1,6 Seitenketten trägt. Danach könnten verschiedene Variationen von β -1,3-1,6-verknüpften Oligomeren entstanden sein. Durch das Auftreten von Oligomeren kann allerdings von einer endoglykosidischen Aktivität des Enzyms gesprochen werden, was den Befund anhand des N-Terminus bestätigt.

Bisher durchgeführte Untersuchungen zeigten eine Aktivität der Endo- β -Glucanase gegenüber dem Glucan Laminarin. Es sollte daher auch die Wirkung auf andere Substrate getestet werden, um einen Überblick über die Spezifität der Glucanase zu erhalten (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10: Substratspektrum der Endo- β -Glucanase von *Delftia tsuruhatensis* MV01. Gezeigt sind die relativen Aktivitäten des Enzyms (%) gegenüber verschiedenen Substraten verglichen mit seiner Aktivität gegenüber Laminarin. Die Werte wurden mittels DNS-Test in Doppelbestimmung ermittelt. Außerdem werden die Art und die Verknüpfung der Monomere der einzelnen Substrate dargestellt. Glc = Glucose, Xyl = Xylose, EPS = Exopolysaccharid.

| Substrat | Verknüpfung der Monomere | Aktivität |
|---------------------------------|----------------------------------|------------------|
| Laminarin | β -1,3: β -1,6 (Glc) | 100 % (\pm 9) |
| Cm-Pachyman | β -1,3 (Glc) | 135 % (\pm 3) |
| Xylan | β -1,4 (Xyl) | 0 |
| Pustulan | β -1,6 (Glc) | 0 |
| Cm-Cellulose | β -1,4 (Glc) | 0 |
| Dextran | α -1,6 (Glc) | 0 |
| EPS (<i>Botrytis cinerea</i>) | β -1,3: β -1,6 (Glc) | 18 (\pm 0,3) |

Tabelle 3.10 zeigt, dass eine Wirkung der Endo- β -Glucanase spezifisch war. So konnte keine Aktivität bei Polymeren festgestellt werden, wenn Zuckerart, Isomerform und/oder eigentliche Verknüpfung der Monomere abwich von der β -1,3-Struktur. Die größere Aktivität gegenüber Carboxymethyl-Pachyman im Vergleich zu Laminarin lässt den Schluss zu, dass die Endo- β -Glucanase spezifisch für β -1,3-Verbindungen ist, da Pachyman ein reines β -1,3-Glucan ohne Seitenketten ist. Auch das Exopolysaccharid von *Botrytis cinerea*, bestehend aus β -1,3-Glucan mit β -1,6-Glucose-Seitenketten, konnte von dem Enzym hydrolysiert werden, wenn auch in einem nur geringem Maße.

Die Ermittlung des pH-Optimums der Endo- β -1,3-Glucanase von *Delftia tsuruhatensis* MV01 wurde ebenfalls durch die enzymatische Hydrolyse des Glucans Laminarin ermittelt (Abbildung 3.35). Das Enzym wirkte am stärksten bei einem pH-Wert von 4,0. Schon pH-Werte von 0,5 über- und unterhalb dieses Optimums sorgten für einen Aktivitätsverlust. Während pH-Werte zwischen 5,0 und 7,0 zu relativ stabilen Aktivitäten (zwischen 67 und 64 % relative Aktivität) führten und erst bei pH 8,0 ein stärkerer Abfall der Aktivität zu erkennen war, führten pH-Werte kleiner als das Optimum stärker zu einem Aktivitätsverlust.

Im Milieu Wein muss von pH-Werten von etwa 3,0 ausgegangen werden. Der Einsatz der Endo- β -1,3-Glucanase in dieser Umgebung wäre gleichbedeutend mit einer 68 % geringeren Aktivität als unter optimalen Bedingungen.

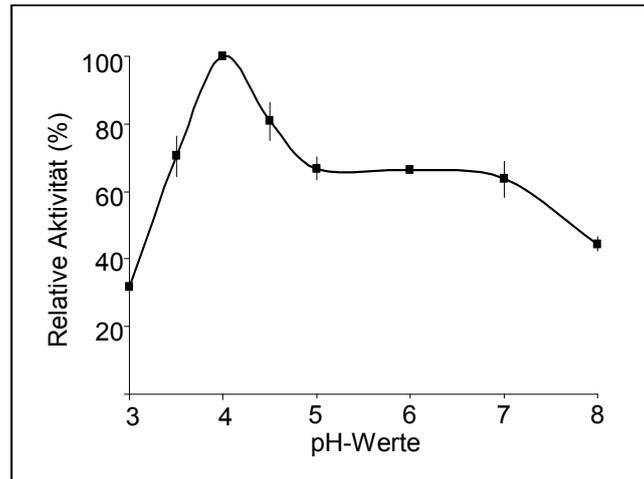


Abbildung 3.35: Ermittelttes pH-Optimum der Endo- β -1,3-Glucanase von *Delftia tsuruhatensis* MV01. Gezeigt sind die relativen Aktivitäten (%) gegen Laminarin verglichen mit der höchsten Aktivität bei pH 4,0. Die Werte wurden mittels DNS-Test in Doppelbestimmung ermittelt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C.

Zusätzlich wurde die optimale Temperatur für die Enzymaktivität bestimmt (Abbildung 3.36, A). Der Kurvenverlauf der relativen Aktivität der Endo- β -1,3-Glucanase zeigte ein klares Maximum bei 50 °C. Schon eine Erniedrigung der Temperatur auf 37 °C bzw. eine Erhöhung auf 60 °C führte zum Verlust von etwa der Hälfte der Aktivität (56 % relative Aktivität bei 37 °C bzw. 51 % relative Aktivität bei 60 °C). Trotzdem konnten noch bei 80 °C Aktivitäten festgestellt werden (etwa 14 % relative Aktivität), während eine Erniedrigung der Temperatur auf 10 °C eine relative Aktivität von 3 % brachte, was im DNS-Test photometrisch kaum mehr messbar war.

Bei einem möglichen Einsatz in der Weinbereitung wäre die Endo- β -1,3-Glucanase zumeist Temperaturen unterhalb von 25 °C ausgesetzt. Die niedrigen Aktivitäten bei diesen Temperaturen indizieren eine Ineffizienz der Glucanase. Allerdings muss bedacht werden, dass die hier vorgestellten Messungen bei den unterschiedlichen Temperaturen auf einer 15minütigen Inkubationszeit des Enzyms mit dem Substrat basierte. Da diese kurze Verweildauer des Enzyms in keiner Weise einer praktischen Anwendung in der Weinbereitung entsprach, wurden die Inkubationszeiten auf zwei Stunden erhöht und der Abbau von Laminarin bei niedrigen Temperaturen ermittelt (Abbildung 3.36, B).

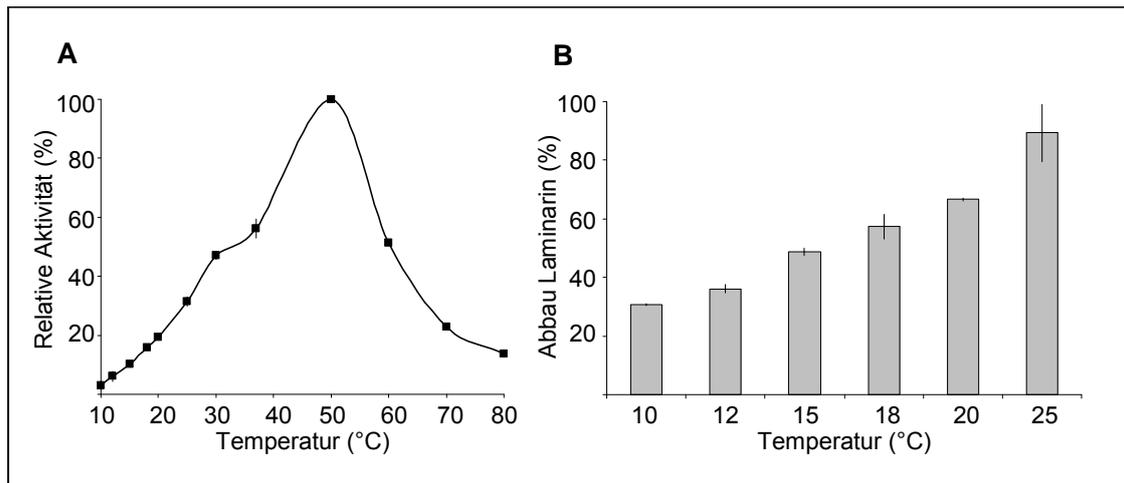


Abb. 3.36: Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Endo- β -1,3-Glucanase. A) Ermitteltes Temperaturoptimum. Gezeigt sind die relativen Aktivitäten gegen Laminarin verglichen mit der höchsten Aktivität bei 50 °C. Die Werte wurden mittels DNS-Test in Doppelbestimmung ermittelt. Die Inkubation erfolgte bei dem pH-Optimum pH 4,0. Die Inkubationsdauer betrug 15 min. B) Abbau von Laminarin bei niedrigen Temperaturen. Gezeigt ist der prozentuale Abbau des eingesetzten Laminarin, wenn ein Abbau von 100 % dem vollkommenen Abbau zu Glucose-Monomeren entspricht. Der Versuchsansatz entsprach dem von B). Allerdings wurde die Inkubationszeit auf 2 h erhöht.

Durch eine Erhöhung der Inkubationszeit wurde deutlich, dass die Endo- β -1,3-Glucanase auch bei 25 °C Laminarin zu einem großen Prozentsatz abbauen kann. Die schrittweise Erniedrigung der Temperatur führte auch zu einer schrittweisen Erniedrigung der Abbau-Rate von Laminarin. Dieser Verlauf war analog zu dem Verlauf der relativen Aktivität bei der kürzeren Inkubationszeit (s. Abbildung 3.36, A). Temperaturen, die in Weinkellern und ergo auch bei der Vergärung vorkommen, liegen meist zwischen 12 und 25 °C. Auch bei 12 °C zeigte die Endo- β -1,3-Glucanase immerhin noch eine Abbaurate von 36 %.

Die Aktivität eines Enzyms bei unterschiedlichen Temperaturen hängt nicht zu letzt auch mit ihrer Stabilität bei diesen Temperaturen zusammen. So zeigen Enzyme zwar oft bei höheren Temperaturen maximale Aktivitäten, was sich auch durch schnellere Molekülbewegungen bei diesen Temperaturen begründen lässt. Die schnellere Umsetzung führt dann insgesamt zu größeren Aktivitäten, auch wenn das Enzym durch die höheren Temperatur schnell zerstört und inaktiviert wird. Dieser Zusammenhang wurde auch hier untersucht und ist in Abbildung 3.37 dargestellt.

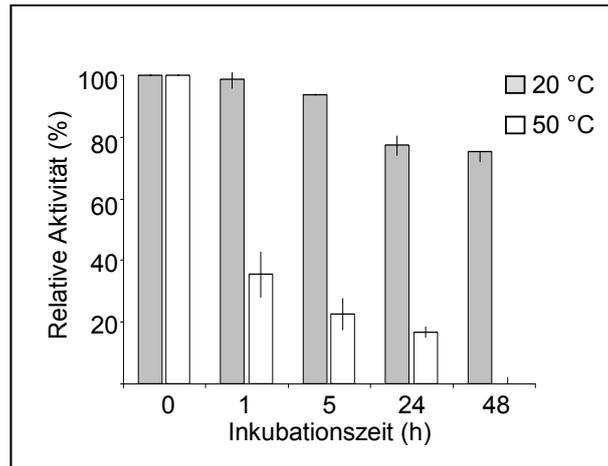


Abb. 3.37: Thermostabilität der Endo- β -1,3-Glucanase. Das Enzym wurde bei 20 °C bzw. 50 °C gelagert und nach bestimmten Zeitabständen (1 bis 48 h) in einem DNS-Test eingesetzt. Gezeigt sind die relativen Aktivitäten gegen Laminarin verglichen mit der Aktivität unter Normalbedingungen, d.h. ohne Inkubation des Enzyms bei den entsprechenden Temperaturen (0 h). Die Werte wurden mittels DNS-Test in Doppelbestimmung ermittelt. Die Inkubation erfolgte bei pH 4,0 und 37 °C. Die Inkubationsdauer betrug 30 min.

Wie erwartet zeigte schon eine einstündige Inkubation des Enzyms bei 50 °C einen Aktivitätsverlust von über 65 %. Nach 48 Stunden konnte gar keine Aktivität mehr festgestellt werden. Anders bei einer Lagerung bei 20 °C. Während nach einstündiger und selbst nach fünfstündiger Inkubation kein oder nur ein geringer Aktivitätsverlust gemessen werden konnte (94 % Aktivität nach fünfstündiger Inkubation), kam es nach 48 Stunden zu einer Herabsetzung der Aktivität. Diese Verringerung betrug allerdings auch nur 25 % und war im Vergleich zur 24stündigen Inkubation nur geringfügig höher. Daraus lässt sich schließen, dass die Endo- β -1,3-Glucanase auch unter Weinbedingungen mit Temperaturen ≤ 20 °C lange stabil bleibt.

Wie schon oben erwähnt, sollte der Einsatz der Endo- β -1,3-Glucanase von *Delftia tsuruhatensis* MV01 auf einen möglichen Einsatz in der Weinbereitung untersucht werden. Nicht nur geringe pH-Werte und Temperaturen machen das Milieu Wein aus, auch andere Inhaltsstoffe können sich auf Enzymaktivitäten auswirken. Daher wurden mögliche Veränderungen der Enzymaktivität durch den Zusatz verschiedener Konzentrationen an Ethanol, Sulfid und Phenolen analysiert (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11: Einfluss verschiedener weinrelevanter Parameter auf die Enzymaktivität der Endo- β -1,3-Glucanase. Gezeigt sind die relativen Aktivitäten gegen Laminarin verglichen mit der Aktivität ohne Zusatz. Zugewetzt wurden verschiedene Ethanol- und Kaliumdisulfitkonzentrationen und verschiedenen Konzentrationen aus einem Phenol-Gemisch, bestehend aus Ferulasäure, Gallussäure und Catechin im gleichen Mengenverhältnis. Die Werte wurden mittels DNS-Test in Doppelbestimmung ermittelt. Die Inkubation erfolgte bei pH 4,0 und 20°C für 60 min.

| Parameter | Konzentration | Relative Aktivität |
|-----------|---------------|--------------------|
| Ethanol | 1 % (v/v) | 100 % (\pm 0,4) |
| | 5 % (v/v) | 101 % (\pm 1,3) |
| | 10 % (v/v) | 97 % (\pm 5,7) |
| | 17,5 % (v/v) | 104 % (\pm 2,7) |
| Sulfit | 10 mg/l | 80 % (\pm 3,3) |
| | 50 mg/l | 79 % (\pm 1,5) |
| | 100 mg/l | 95 % (\pm 4,8) |
| Phenole | 5 mg/l | 97 % (\pm 3,5) |
| | 10 mg/l | 99 % (\pm 2,9) |
| | 40 mg/l | 101 % (\pm 1,9) |

Es konnten keine Unterschiede in der Aktivität ausgemacht werden, wenn dem Ansatz Ethanol bis zu einer Konzentration von 17,5 % (v/v) hinzugefügt wurde. Auch der Zusatz des Phenolgemischs in den unterschiedlichen Konzentrationen brachte keine Änderung der Enzym-Aktivität. Kaliumdisulfit zeigte bei Konzentrationen von 10 und 50 mg/l einen Einfluss auf die Enzym-Aktivität. Hier konnten Aktivitätsverluste von etwa 20 % verzeichnet werden. Die Aktivität nahm bei steigender Sulfit-Menge allerdings wieder zu: Mit 100 mg/l Kaliumdisulfit konnte etwa die gleiche Aktivität erzielt werden wie ohne Zusatz.

Die Aktivität der Endo- β -1,3-Glucanase zeigte sich bei den hier eingesetzten weintypischen Parametern also recht stabil. Im folgenden Kapitel wird die Wirkungsweise dieses Enzyms auf die Zellwand von weinrelevanten Hefen beschrieben.

3.3.4 Aktivität der β -1,3-Glucanase gegen die Zellwand von Hefen

Die Wirkung der Endo- β -1,3-Glucanase gegen verschiedene Hefen konnte sowohl schon anhand des Kulturüberstands von *Delftia tsuruhatensis* als auch des reinen Enzym-Präparats mit Hilfe von Plattendiffusionstests gezeigt werden (s. Tabelle 3.6 und Tabelle 3.8). Dünnschicht-chromatographisch konnte bereits der Abbau der Hefezellwand durch den Kulturüberstand dokumentiert werden (s. Abbildung 3.24). Dieser Abbau der Zellwand wurde auch noch einmal quantitativ erfasst und in Bezug zur Glucanase-Aktivität gegen Laminarin unter Standardbedingungen gesetzt (Tabelle 3.12).

Tabelle 3.12: Abbau von Zellwänden verschiedener Hefen durch die Endo- β -1,3-Glucanase. Gezeigt sind die relativen Aktivitäten verglichen mit der Aktivität gegenüber Laminarin. Die Werte wurden mittels DNS-Test in Doppelbestimmung ermittelt. Die Inkubation erfolgte bei pH 4,0 und 37 °C für 15 min.

| Substrat/Zellwand | Relative Aktivität |
|---|--------------------|
| Laminarin | 100 % (\pm 9) |
| <i>Pichia fermentans</i> Stamm 167 | 67 % (\pm 1,5) |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> Stamm 427 | 58 % (\pm 1,3) |
| <i>Saccharomyces ludwigii</i> Stamm 84 | 47 % (\pm 1,1) |
| <i>Brettanomyces bruxellensis</i> Stamm 2/6-6 | 58 % (\pm 2,8) |

Generell wurden geringere Aktivitäten im Vergleich zum Standardsubstrat Laminarin gemessen. Wird allerdings bedacht, dass die Hefezellwand zwar zu einem großen Teil jedoch nicht ausschließlich aus β -1,3-Glucan besteht (im Fall von *Saccharomyces cerevisiae* wird von einem Anteil von 50 bis 55 % ausgegangen, Klis et al 2006), so werden die gemessenen Aktivitäten zugunsten eine höheren Effizienz des Enzyms relativiert. Ferner wurden Unterschiede in der Enzymaktivität gegenüber den verschiedenen Hefe-Arten festgestellt. Die Aktivität der Endo- β -1,3-Glucanase gegenüber der Zellwand von *Saccharomyces ludwigii* Stamm 84 fiel am geringsten aus, wohingegen die Zellwand von *Pichia fermentans* Stamm 167 scheinbar am stärksten hydrolysiert wurde. Natürlich können auch hier artspezifische Unterschiede in der Zellwandzusammensetzung eine Rolle spielen.

Die Wirkung der Endo- β -1,3-Glucanase von *Delftia tsuruhatensis* MV01 zeigte auch die mikroskopische Untersuchung ausgewählter Hefestämme. Hierfür wurde die Zellwand der Hefen nach 24stündiger Inkubation mit dem Enzym bzw. einer Kontrolle mit CalcoFluor-White gefärbt und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abbildung 3.38)

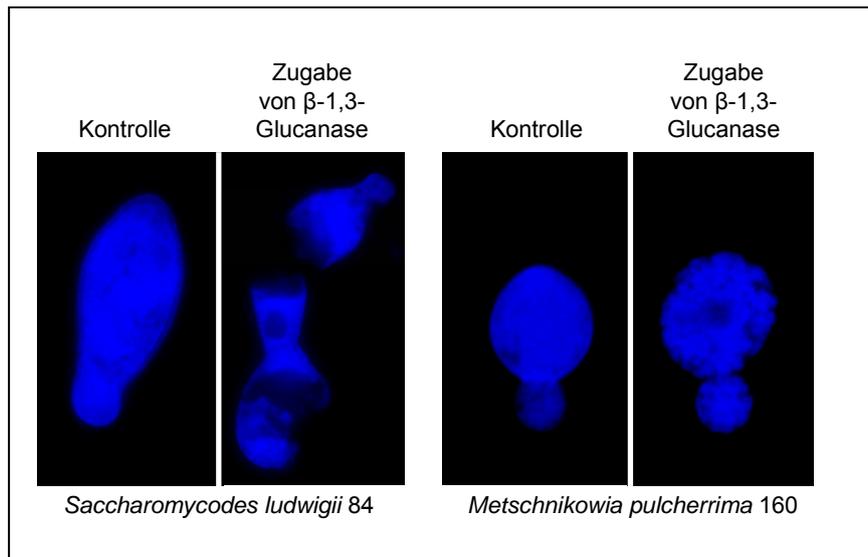


Abbildung 3.38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der durch Wirkung der β -1,3-Glucanase angegriffenen Zellwand der Hefen *Saccharomyces ludwigii* Stamm 84 (links) und *Metschnikowia pulcherrima* Stamm 160 (rechts). Nach Inkubation von 125 μ l der Hefesuspension mit 100 μ l der β -1,3-Glucanase (3 U/mg) bei 30 °C für 24 h folgte eine Calcofluor-White-Färbung. Als Kontrolle wurde durch Hitze inaktiviertes Enzym eingesetzt. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einer Anregung bei 440 nm und einer Emission bei 510 nm.

Die Inkubation der Zellen mit der Glucanase resultierte in einer sichtbaren Veränderung der anfärbbaren Zellwand beider Hefe-Stämme. Während in den Kontrollansätzen eine gleichmäßige Blaufärbung der Zellen zu erkennen war, zeigten die mit β -1,3-Glucanase behandelten Zellen eine unregelmäßigere Blaufärbung. Im Fall der Hefe *Metschnikowia pulcherrima* konnten verschiedene Stellen auf der Zelloberfläche ausgemacht werden, die eine geringere oder keine Blaufärbung aufwiesen. Dies war auch bei *Saccharomyces ludwigii* der Fall, sogar noch in einem stärkeren Ausmaß. Zusätzlich war hier offensichtlich die ganze Zelle auseinander gebrochen.

Auswirkungen auf die Zelloberfläche nach Einwirkung der Endo- β -1,3-Glucanase konnten zusätzlich auch durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen analysiert werden. Hierfür wurde die Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* Stamm 81 mit dem Enzym inkubiert (Abbildung 3.39). Die Tiefenschärfe des Rasterelektronenmikroskops optimiert die plastische Darstellung von Oberflächen, wodurch Unterschiede der Zelloberfläche zwischen der Kontrolle und den mit Enzym behandelten Hefen besonders deutlich wurden. Während die Hefen im Kontrollansatz eine glatte Oberfläche besaßen, zeigten die mit Enzym behandelten Zellen eine raue und löchrige Struktur. Offensichtlich gab es Stellen an der Zelloberfläche, die stärker von dem Enzym angegriffen wurden. Vereinzelt konnte festgestellt werden, dass Zellen quer zu ihren Längsform aufgerissen waren.

Insgesamt konnte von einer Ähnlichkeit der beiden mikroskopischen Methoden gesprochen werden, da beide Methoden die lokale Auflösung der Zelloberfläche zeigten und nicht etwa eine gleichmäßige Verringerung der Zellwand oder ähnliches.

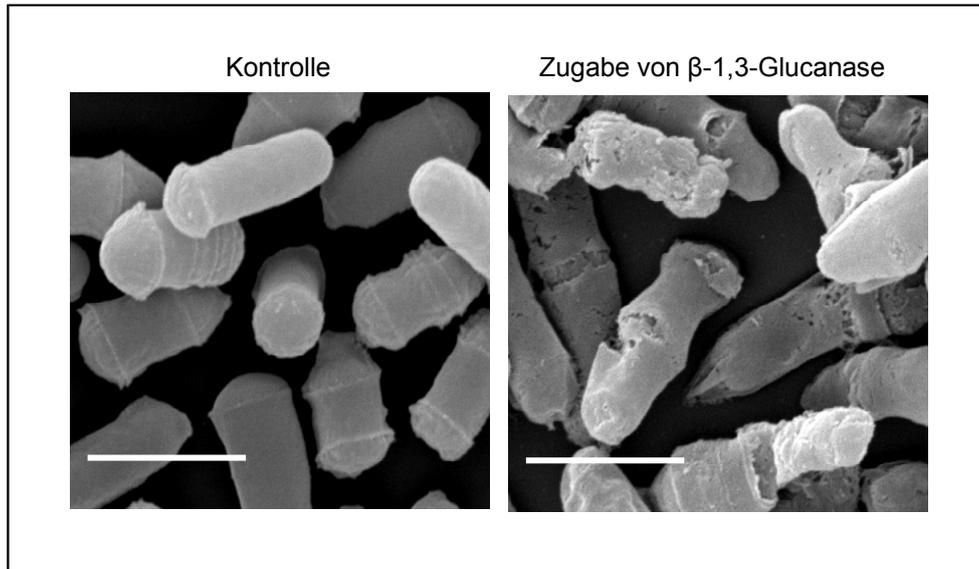


Abbildung 3.39: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der angegriffenen Zelloberfläche von *Schizosaccharomyces pombe* Stamm 82 nach Inkubation mit β -1,3-Glucanase (rechts). Es wurden 125 μ l der Hefesuspension mit 100 μ l der β -1,3-Glucanase (3 U/mg) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde durch Hitze inaktiviertes Enzym eingesetzt (links). Der Balken entspricht 5 μ m.

Die Wirkung der Endo- β -1,3-Glucanase auf eine Hefezellsuspension wurde außerdem photometrisch bestimmt. So konnte zum einen die Wirkung auf verschiedene Arten getestet werden. Zum anderen war so eine quantitative Bestimmung möglich, was nur bedingt mit Plattendiffusionstests erreicht werden kann. Hefezellen wurden hierfür in Natriumcitrat-Puffer (10 mM, pH 4.0) aufgenommen und mit Enzym versetzt. Nach 24stündiger Inkubation konnte bei Messung der optischen Dichte bei 578 nm kaum eine Verringerung im Vergleich zu einem Kontrollansatz festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt). Die zuvor durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen zeigten aber sehr wohl eine Auflösung der Zellwand (s. Abbildung 3.38 und Abbildung 3.39). Diese konnte aber offensichtlich nicht photometrisch dargestellt werden, da die angegriffenen Hefen weiterhin in ihrer Zellstruktur vorlagen und somit zu keiner oder kaum messbaren Trübungsveränderung der Zellsuspension führten. Dieser Sachverhalt ist auch schon in der Literatur bekannt (Mann et al 1978, Bauer 2003). Daher wurde nach Inkubation mit der Endo- β -1,3-Glucanase das Agens TritonX-100 zugesetzt. Dies löste eine Zelllyse von bereits angegriffenen Zellen aus, wodurch eine Verminderung der optischen Dichte erreicht wurde und somit eine quantitative Messung der Zelllyse per Photometer.

Am Beispiel von *Schizosaccharomyces pombe* Stamm 82 wurde untersucht, ob TritonX-100 bereits alleine zu einer Zelllyse bei intakten Zellen und somit zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt. Hierfür wurden die Kolonie bildenden Einheiten nach Behandlung mit Endo- β -1,3-Glucanase und nach Behandlung mit dem Enzym und anschließendem Einsatz von TritonX-100 bestimmt. In beiden Ansätzen konnte eine Lebendzellzahl von $2 \times 10^5 (\pm 0,12)$ Zellen/ml gefunden werden, unabhängig

von dem Zusatz von TritonX-100. Im Vergleich zu einem Kontrollansatz mit $5,9 \times 10^5$ ($\pm 0,1$) Zellen/ml entsprach dies in beiden Fällen einem Vitalitätsverlust von 66,1 %. Der Vergleich dieser Zellyse mit der photometrisch gemessenen Zellyse nach Zusatz von TritonX-100 (Abbildung 3.40) zeigt, dass der durch KBE-Messung erreichte Wert größer war als der photometrisch ermittelte (66,1 % Zellyse nach KBE-Bestimmung, 52 % Zellyse nach Trübungsmessung). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die photometrischen Dichte-Messungen zumindest grob der tatsächlichen Zellyse entspricht.

Diese Messungen der optischen Dichte sind in Abbildung 3.40 dargestellt.

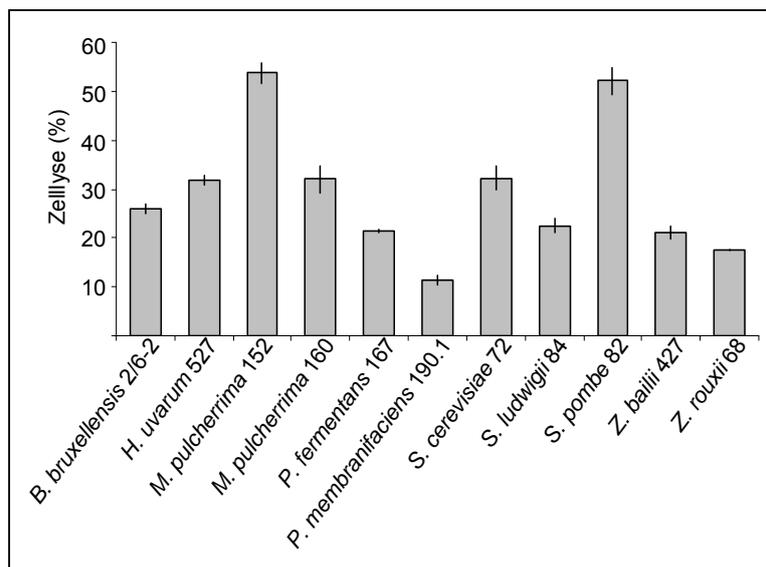


Abbildung 3.40: Wirkung der Endo- β -1,3-Glucanase auf verschiedene weinrelevante Hefen. Gezeigt wird die Abnahme der optischen Dichte einer Hefezellsuspension im Vergleich zu einem Kontroll-Ansatz (hitzeinaktiviertes Enzym), ausgedrückt als % Zellyse. Die Zellen wurden in Natriumcitratpuffer (10 mM, pH 4,0) mit Enzym für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 0,1 % TritonX-100 wurde die optische Dichte bei 578 nm bestimmt.

Die Abnahme der optischen Dichte (Zellyse) war innerhalb der untersuchten Hefe-Arten variabel und zeigte die höchsten Werte bei der Hefe *Metschnikowia pulcherrima* Stamm 152 (54 % Zellyse) und *Schizosaccharomyces pombe* Stamm 82 (52 % Zellyse). Die geringste Lyse war bei *Pichia membranifaciens* zu verzeichnen (12 % Zellyse). Ebenfalls variabel waren die erreichten Werte innerhalb einer Spezies (vgl. Stamm 152 und Stamm 160 von *Metschnikowia pulcherrima*), sodass auch keine spezies-abhängige Präferenz des Enzyms ausgemacht werden konnte.

Die hier gezeigten Messungen wurden an Hefen durchgeführt, die zuvor im Vollmedium GYP bei 30 °C schüttelnd für 18 Stunden kultiviert wurden. Es ist bekannt, dass sich Zellwandzusammensetzungen – etwa das Verhältnis der einzelnen Polymere zueinander – als auch das Mengenverhältnis der Zellwand zur Zelle selbst nicht nur variabel sind beim Vergleich von Arten

oder Stämmen, sondern dass auch die beim Wachstum vorherrschenden Bedingungen eine Rolle spielen können (McMurrough und Rose 1967, Shimoï et al 1998). Zusätzlich kann die Wachstumsphase der Hefe ein entscheidendes Kriterium für ihre Sensitivität gegenüber zellwandabbauenden Enzymen sein. Dies sollte auch hier untersucht werden. Hierfür wurden verschiedene Hefen zum einen wie oben in Vollmedium schüttelnd kultiviert und zum anderen in Traubensaft als Standkultur. Nach 18 h bzw. 72 h Kultivierung wurden Zellen entnommen, in Puffer gewaschen und unter Standardbedingungen mit der Endo- β -1,3-Glucanase inkubiert. So konnte der Einfluss der Wachstumsphase als auch der Einfluss des die wachsenden Zellen umgebenden Milieus auf die Wirksamkeit der Endo- β -1,3-Glucanase untersucht werden (Abbildung 3.41)

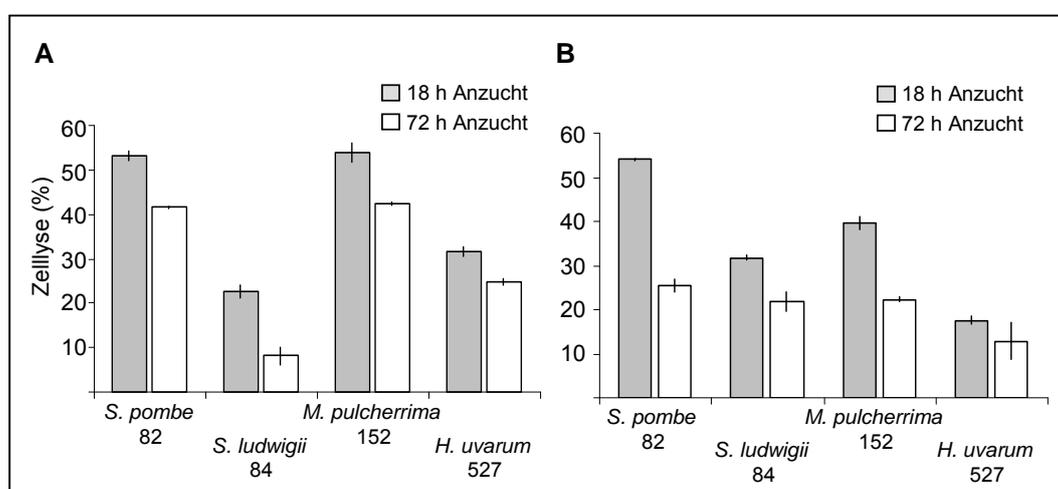


Abbildung 3.41: Einfluss der Wachstumsphase verschiedener Hefen auf deren Sensitivität gegenüber der β -1,3-Glucanase. A) Zellyse von Hefen aus unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten (18 h Anzucht bzw. 72 h Anzucht) im Vollmedium GYP. B) Zellyse von Hefen aus unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten (18 h Anzucht bzw. 72 h Anzucht) im Traubensaft. Gezeigt wird die Abnahme der optischen Dichte einer Hefezellsuspension im Vergleich zu einem Kontroll-Ansatz (hitzeinaktiviertes Enzym), ausgedrückt als % Zellyse. Die Zellen wurden in Natriumcitratpuffer (10 mM, pH 4,0) mit Enzym für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 0,1 % TritonX-100 wurde die optische Dichte bei 578 nm bestimmt.

Abbildung 3.41 zeigt die verringerte Aktivität der Endo- β -1,3-Glucanase auf Zellen, die 72 Stunden kultiviert wurden im Vergleich zu Zellen aus der frühen exponentiellen Phase. Diese Korrelation der Resistenz der Zellen gegenüber der lytischen Aktivität der Glucanase mit der Wachstumsphase bei der Kultivierung konnte sowohl im Vollmedium (Abbildung 3.41, A) als auch im Traubensaft (Abbildung 3.41, B) festgestellt werden. Natürlich kann ein Vergleich bezüglich verschiedener Wachstumsphasen zwischen den Hefen untereinander nur gezogen werden, wenn gewährleistet ist, dass die Hefe-Stämme zum Zeitpunkt der Probenentnahme alle in der gleichen Wachstumsphase waren. Dies konnte im GYP-Medium angenommen werden, da hier alle untersuchten Hefen ein vergleichbares Wachstum zeigten. Im Traubensaft muss zwischen zwei Gruppen unterschieden

werden. Während *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces ludwigii* ein ähnliches Wachstum aufwiesen, zeigten die zwei anderen untersuchten Stämme von *Metschnikowia pulcherrima* und *Hanseniaspora uvarum* ein deutlich verlangsamtes Wachstum, sodass bei der Probenentnahme nach 18 h Kultivierung hier gerade erst der Übergang von der lag-Phase in die exponentielle verzeichnet werden konnte. Nichtsdestotrotz war auch bei diesen Hefen die Tendenz einer höheren Sensitivität gegenüber der β -1,3-Glucanase im frühen Wachstumsstadium erkennbar. Ein Trend konnte nicht erfasst werden, verglich man die Wirkung der Glucanase auf Zellen, die in Vollmedium bzw. Traubensaft gezüchtet wurden. Die Lysierbarkeit der Zellen, die in der frühen exponentiellen Phase (18 h) gewonnen wurden, war im Traubensaft bei *Schizosaccharomyces pombe* Stamm 81 in etwa gleich (53 bzw. 54 %) und bei dem Stamm von *Saccharomyces ludwigii* erhöht (22 % Zelllyse im Vollmedium, 32 % im Traubensaft). Im Gegensatz dazu war hier die Wirkung des Enzyms bei *Metschnikowia pulcherrima* und *Hanseniaspora uvarum* schlechter. In der Wachstumsphase nach 72 h konnten im GYP-Medium angezogene Hefen besser lysiert werden, als im Traubensaft kultivierte. Eine Ausnahme bildete hier allerdings der Stamm von *Saccharomyces ludwigii*, mit dem in dieser Wachstumsphase im Vollmedium schlechte Lyse-Werte erzielt wurden (8 %) im Vergleich zur Traubensaft-Anzucht (22 %).

Die Untersuchungen zeigten die große Individualität einzelner Hefestämme bezüglich der Wirkung der Endo- β -1,3-Glucanase auf ihre Zellwand. Zudem konnten die komplexen und dynamischen Änderungen dieser Wirkung in Hinblick auf Veränderlichkeiten der Zellen durch unterschiedliche Parameter aufgezeigt werden.

Insgesamt konnte eine Aktivität der Endo- β -1,3-Glucanase gegen die Zellwand verschiedener mit der Weinbereitung assoziierter Hefen festgestellt werden. So konnten alle in verschiedenen Tests eingesetzten Hefen – mit Ausnahme eines Stammes – von dem glucanolytischen Enzym lysiert werden.

4 DISKUSSION

4.1 Identifizierung von Spezies der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe

Die Mitglieder der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe umfassen die acht Spezies *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* und *S. arboricolus* und zeichnen sich durch ihre hohe Verwandtschaft und Ähnlichkeit zueinander aus. Durch die zusätzlich hohe Stammvariabilität der einzelnen Spezies wird eine Identifizierung unbekannter Stämme durch klassische physiologische Tests erschwert. So können etwa *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus* und *S. pastorianus* mit den üblichen Fermentations- und Assimilationssubstraten zwar von den restlichen Mitglieder dieser Gruppe unterschieden werden, jedoch ist eine Spezies-Einordnung innerhalb dieser vier Arten so nicht möglich (Naumov et al 2000a, Antunovics et al 2005). Eine genaue Identifizierung auf Spezies-Niveau ist in den meisten Fällen erreichbar mit DNA-DNA-Reassoziations-Versuchen (Kao et al 2010) oder mittels Hybridisierung des unbekanntes Isolats mit bekannten Spezies und die Überprüfung der Vitalität der folgenden Sporen (Naumov et al 2000a, 2010). Um diese arbeitsintensiven Bestimmungen zu ersetzen, wurden in der Vergangenheit verschiedenste – meist molekularbiologische – Methoden auf ihre Anwendbarkeit auf die *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe untersucht.

Das hier beschriebene Fingerprinting-Verfahren SAPD-PCR beruht auf ein von Pfannebecker und Fröhlich entwickeltes Primer-System (Fröhlich und Pfannebecker 2006, 2007), dessen Sequenz aus der Schnittstelle des Restriktionsenzym *NotI* besteht und wo durch Anfügen einzelner Nukleotide verschiedene Primer verwendet werden können. Mit Hilfe dieser Primer und einem komplexen PCR-Programm konnte Pfannebecker (2008) bereits zeigen, dass sich die Methode eignet, um verschiedene Arten der Mikrobiota in Most und Wein einzuordnen. So ließen sich etwa auf bakterieller Seite Oenokokken und verschiedene Pediokokken auf Art-Niveau differenzieren. Zudem wurde die SAPD-PCR zur Unterscheidung verschiedener eukaryotischer Spezies wie verschiedene Hefen, Rebsorten und Mäuse hinzugezogen. Sebastian et al (2011) nutzten diese Methode, um aus Wein isolierte, biogene Amin-bildende Milchsäurebakterien zu identifizieren.

4.1.1 SAPD-PCR: Differenzierung von *Saccharomyces* spp. mittels DNA-Fingerprinting

In dieser Arbeit konnte erneut dargelegt werden, dass die Sequenzunterschiede der 5.8 S rDNA und ihrer flankierenden ITS-Regionen nur bedingt ausreichen, um Spezies der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe zu identifizieren. Durch die geringen Unterschiede war hier die taxonomische Distanz im generierten Stammbaum äußerst gering und die Typstämme der Arten *Saccharomyces bayanus*

und *S. pastorianus* ließen sich überhaupt nicht trennen. Auch wurde der Hybrid aus *Saccharomyces bayanus* und *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm CBS 8614) zu *Saccharomyces bayanus*-Stämmen eingeordnet, wodurch seine tatsächliche genetische Ausstattung verdeckt blieb. Diese geringe Unterscheidbarkeit – auch bei anderen rRNA-Genen und Spacer-Bereichen – wurde bereits in verschiedenen Publikationen diskutiert (etwa Oda et al 1997, Montrocher et al 1998, Naumov et al 2000a). Manzano et al (2004) versuchten mit Hilfe einer Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese die geringen Sequenzunterschiede der ITS2-Region sichtbar zu machen, was ihnen bei *Saccharomyces bayanus* und *S. pastorianus* nicht gelang. Zudem ist diese Methode arbeitsintensiv und handwerklich schwierig. Generell befinden Edwards-Ingram et al (2004) die Erkenntnisse nur eines Gens oder DNA-Region als nicht ausreichend für eine taxonomische Einordnung dieser Gruppe und schlagen als Methode eine „Comparative Genomic Hybridization“ vor. Die Verwendung von DNA-Microarrays ist aber nach wie vor eine nicht gängige Methode und zu aufwendig für eine Schnellidentifizierung.

Die oben genannte, auf DNA-Sequenzen beruhende, hohe Verwandtschaft der Hefen der *sensu stricto*-Gruppe steht eine höhere Variabilität bezüglich ihrer Chromosomen gegenüber. So versuchten Vaughan-Martini et al (1993) eine Differenzierung der Arten *Saccharomyces bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* und *S. pastorianus* mittels Chromosomen-Muster und konnten hier aber zum Teil nicht garantieren, dass ähnliche aber nicht identische Karyotypen zu der gleichen Spezies gehören. Auch scheinen *Saccharomyces mikatae*-Stämme bezüglich ihrer Chromosomen eine eher heterogene Gruppe zu sein (Liti et al 2005).

Die großen Gen-Homologien auf der einen Seite und die Unterschiede der Chromosomengrößen auf der anderen basieren auf der postulierten Speziation der Arten dieser Gruppe. So herrscht zwischen den Spezies eine postzygotische, reproduktive Isolation, da diese zwar miteinander hybridisieren, aber keine fertilen Nachkommen erzeugen können (Greig 2009). Diese postzygotische Barriere gründet auf großen Chromosomen-Rearrangements während der Speziesbildung. Hierdurch kommt es bei der Meiose zweier unterschiedliche Chromosomensätze zur Bildung von Multivalenten, was nach Segregation der Centromere zu aneuploiden Gameten führt. Da diese postzygotische Isolation unnötige Ressourcen kostet, gehen Forscher davon aus, dass eine präzygotische Isolation folgen wird, woraus Wolfe (2003) den Schluss zieht, dass die *sensu stricto*-Hefen noch am Anfang ihrer Speziation stehen. Wie Fischer et al (2000) zeigen konnten, sind diese Chromosomen-Rearrangements zumeist reziproken Translokationen mit DNA-Längen zwischen 42 und 1060 kb. Im Vergleich zum *Saccharomyces cerevisiae*-Genom werden diese Translokationen bei *S. cariocanus*, *S. mikatae* und *S. bayanus* gefunden, wohingegen bei *S. paradoxus* und *S. kudriavzevii* die Karyotypen kolinear zu dem von *Saccharomyces cerevisiae* sind, was wiederum zeigt, dass

chromosomale Rearrangements nicht die alleinige Ursache für eine Speziesbildung bei *Saccharomyces* spp. sind.

Aufgrund dieser starken chromosomalen Veränderungen der verschiedenen Spezies der *sensu stricto*-Gruppe scheint ein das ganze Genom umfassendes Fingerprinting-System als sinnvoll, da hier relativ willkürlich ausgewählte Primer zu speziesspezifischen PCR-Produkten führen könnten und so eine klarere Einordnung der Arten möglich wäre.

In dieser Arbeit gelang es mit Hilfe der SAPD-PCR alle acht Spezies der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe zu unterscheiden. Durch die SAPD-PCR und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate konnte jeder *Saccharomyces*-Art ein spezifisches Bandenmuster zugeordnet werden. Der Vergleich zwischen dem mit Hilfe der SAPD-PCR generierten Stammbaum und dem auf ITS- und 5.8S rDNA-Sequenzen basierendem Stammbaum zeigte nicht nur die signifikantere Trennung der Arten auf Seiten der SAPD-PCR, sondern auch die vorher nicht durch DNA-Sequenzen erreichte Separation von *Saccharomyces pastorianus* und *S. bayanus*. Während die Analyse der DNA-Sequenzen eine Einordnung von *Saccharomyces pastorianus* in die *Saccharomyces bayanus*-Gruppe erbrachte, wurde hier ein separates Cluster für *S. pastorianus* erstellt, das sich näher an der *S. cerevisiae*-Gruppe anordnete. Dass *Saccharomyces pastorianus* als Hybrid aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* gilt, wird durch das Zusammenlegen beider Methoden besonders gut deutlich. *Saccharomyces pastorianus* besitzt zwei Typen von Chromosomen, einen „*S. cerevisiae*-Typ“ und einen „*S. bayanus*-Typ“ (Saerens et al 2010). Dies konnte auch mit SAPD-PCR erzeugten PCR-Amplifikaten beobachtet werden: Es konnten sowohl *S. cerevisiae*-Banden als auch – wenn auch im geringeren Maße – *S. bayanus*-Banden erkannt werden.

Anhand verschiedener Stämme einer Art konnte gezeigt werden, dass das SAPD-Bandenmuster keinen großen Stamm-Unterschieden unterworfen ist. Dies ist zum Teil konträr mit anderen Fingerprinting-Verfahren, die für die Differenzierung der Spezies der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe eingesetzt wurden. Eine übliche Fingerprinting-Methode ist hierbei die „Randomly amplified Polymorphic DNA“-PCR (RAPD-PCR, auch „Single Primer Amplification Reaction“, SPAR) mit einem Set unterschiedlichster Primer. Brito dos Santos et al (2007) stellten bei Verwendung dieser Methode fest, dass *Saccharomyces pastorianus*-Stämme eine große Heterogenität des Bandenmusters aufwiesen. Auch bei der SAPD-PCR konnten Unterschiede in der Bandenverteilung zwischen den getesteten Stämmen festgestellt werden, jedoch in einem sehr viel geringeren Maße. Ferner zeigten sich stammspezifische Unterschiede bei *Saccharomyces bayanus* (Torriani et al 1999), die bei dem hier vorgestellten System kaum zu detektieren waren. Bei der Verwendung von sechs Dekamer-Primern für RAPD-PCRs konnten Ferndandez-Espinar et al (2003) ebenfalls eine Heterogenität in der *Saccharomyces pastorianus*-Gruppe ausmachen, genauso wie in der

Saccharomyces paradoxus-Gruppe. Auch im Fall von *Saccharomyces paradoxus* zeigten sich die durch SAPD-PCR generierten Bandenmuster einheitlich auf Stamm-Niveau. Allerdings muss erwähnt werden, dass Unterschiede im RAPD-Muster bei Fernandez-Espinar et al (2003) mit den unterschiedlichen Isolierungsorten einherging. Die hier verwendeten Stämme von *Saccharomyces paradoxus* stammen alle aus Europa und auch bei Fernandez-Espinar et al (2003) bildeten die europäischen Stämme ein homogenes Cluster. Zusätzlich konnten die Forscher zwei Cluster von *Saccharomyces bayanus* ausmachen. So trennten sich die *Saccharomyces bayanus*-Stämme von den weintypischen Stämmen, die häufig als Subspezies „*uvarum*“ klassifiziert werden. Gleiches stellten auch de Barros Lopes et al (1998) mit dem auf Intron-Spleißstellen-Sequenzen beruhendem Primer-System fest. Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde der Typstamm von *Saccharomyces bayanus* verwendet sowie der frühere Typstamm von *Saccharomyces uvarum* (CBS 395). Es konnte allerdings keine Aufspaltung dieser Subtypen festgestellt werden. Dies und die doch wenigen detektierten Stammunterschiede innerhalb einer Art deuten darauf hin, dass die hier vorgestellte SAPD-PCR weniger sensitiv auf stammspezifische Unterschiede reagiert, als dies Fingerprinting-Methoden wie RAPD-PCR augenscheinlich tun.

Ein Problem von Fingerprinting-Methoden, die auf „zufällig“ ausgewählten Primern basieren, ist die Reproduzierbarkeit der Bandenmuster. Dies ist etwa bei der RAPD-PCR beschrieben (Fernandez-Espinar et al 2003). Die SAPD-PCR zeichnet sich dagegen durch ihre große Stabilität aus. So konnte hier gezeigt werden, dass das spezifische Muster eines Stammes auch nach häufigem Kultivieren konstant bleibt. Das von Pfannebecker entwickelte SAPD-PCR-Programm, das „eine langsame Erhöhung der Temperatur zwischen Annealing und Elongation des Primers“ vorsieht, verbessert die Reproduzierbarkeit (Pfannebecker 2008). Auch zeigten sich die Ergebnisse unabhängig von vorkommenden Varianzen bei der DNA-Isolierung, wobei zu bemerken ist, dass mit zunehmendem Alter der DNA auch die Bandenstärke der PCR-Produkte abnimmt. Weiter empfiehlt es sich, die hier verwendete DNA-Isolierungsmethode und Taq-Polymerase beizubehalten.

Mittels SAPD-PCR war es möglich, eine gesicherte Aussage zur Identität von *Saccharomyces*-Stämmen in der institutseigenen Stammsammlung zu treffen. Zusätzliche Untersuchungen wie Sequenzierung der ITS- und 5.8S rDNA-Sequenz, Restriktionsmuster dieses DNA-Fragments und/oder speziesspezifischer Nachweis per PCR untermauerten die per SAPD-PCR gemachten Einordnungen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die im Institut durchgeführten physiologischen Tests zur taxonomischen Charakterisierung stets zu *Saccharomyces cerevisiae* führten. Dies war zwar in den meisten Fällen korrekt, führte aber auch zu Fehlbestimmungen. Als Beispiel seien hier die als *S. cerevisiae* hinterlegten Stämme zu nennen, die nach SAPD-PCR-Analyse und Sequenzanalyse eindeutig als *S. paradoxus* bestimmt wurden. Diese Identität ist insofern

bemerkenswert, als dass bisher nur einmal *Saccharomyces paradoxus* mit Wein in Verbindung gebracht wurde. Lediglich Redzepovic et al (2002) gelang es, *S. paradoxus* in einem kroatischen Weinkeller zu isolieren. Die hier neu identifizierten Stämme 28 und 35 wurden von Trauben bzw. aus Wein isoliert (www.cbs.knaw.nl/collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS%20strain%20database&Name=CBS+8112&Fields=All&ExactMatch=T; www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=48429&Template=fungiYeast). Stamm 397 stammt aus dem Food Research Institute in Norwich und wurde aus Bier isoliert (www.ncyc.co.uk/yeast-ncyc-1026.html). Eine direkte Beschreibung von *Saccharomyces paradoxus* in Bier konnte hier nicht gefunden werden, wenngleich diese Spezies dennoch am Rande erwähnt wird (Wenning und Hutzler 2011). Selbstverständlich könnten Stämme in verschiedenen Schritten von Isolierung bis Stammhaltung vertauscht worden sein, aber gerade Stamm 28, der zusätzlich in der niederländischen Stammsammlung CBS hinterlegt ist und wo Sequenzanalysen dort ebenfalls auf *S. paradoxus* schließen lassen, verfestigt die tatsächliche Isolierung eines *S. paradoxus*-Stamms von Trauben. Bei diesem Stamm kommt hinzu, dass dieser bereits auf die Fähigkeit, so genannte Killertoxine, zu produzieren überprüft wurde und diese näher untersucht wurden (Pfeiffer und Radler 1984, Schmidt und Radler 1987). Die Bildung von Killertoxinen durch *Saccharomyces paradoxus* ist nicht wirklich erforscht. Die aus kroatischem Wein isolierten Stämme von Redzepovic et al (2002) zeigten jedenfalls keine Toxin-Produktion. Andererseits beschreibt Naumov (1985) in einem russischen Artikel die Existenz eines Toxins des K3-Typs bei *S. paradoxus*. Das bei Stamm 28 charakterisierte Killertoxin entspricht hingegen einem eigenen Typus KT28 (Schmidt und Radler 1987). In jüngster Vergangenheit wird der Einsatz von *Saccharomyces paradoxus* als Starterkultur in der Weinbereitung diskutiert, etwa wegen seiner ausgeprägten Pektinase-Aktivität (Eschstruth und Divol 2011), seiner gesteigerten Glycerin- und verminderten Acetat-Produktion (Orlic et al 2010). Auch der hier untersuchte *S. paradoxus*-Stamm 35 zeigte im Vergleich zu *S. cerevisiae*-Stämmen eine erhöhte Glycerinbildung (Radler und Schtitz 1982).

Weiter fiel bei der Analyse der Institutsstämme auf, dass die von verschiedenen Herstellern als *Saccharomyces bayanus* deklarierten Starterkulturen (zumindest zum Zeitpunkt der Aufbewahrung in der Stammsammlung) mit Hilfe der SAPD-PCR als *Saccharomyces cerevisiae* eingeordnet werden konnten. Diese Erfahrungen konnte bereits Pfannebecker (2008) machen. Bei diesen Starterkulturen handelt es sich um Hefen, empfohlen für die Sektherstellung aber auch für den Einsatz bei Gärstockungen. Letzteres spricht gegen die Benennung als *Saccharomyces bayanus*, sondern vielmehr für *S. cerevisiae*, da *S. cerevisiae* eine höhere Ethanoltoleranz besitzt (Arroyo-Lopez et al 2010, Masneuf-Pomerade et al 2010). Weiter wird diesen Starterkulturen in der Produktbeschreibung auch eine Kaltgärfähigkeit zugeschrieben, was unter Umständen ein

Charakteristikum für die cryophile Hefe *Saccharomyces bayanus* ist. Jedoch konnten Masneuf-Pomerade et al (2010) zeigen, dass auch Stämme von *S. cerevisiae* diese Eigenschaft besitzen können. Insgesamt kann festgestellt werden, dass es sich bei den Starterkulturen molekularbiologisch um *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme handelt, die gewünschte und selektionierte Eigenschaften besitzen. Inzwischen hat auch zumindest die Firma Erbslöh ihre Starterkultur Hefix2000 (entspricht dem hier untersuchten Stamm 2/6-2) in *Saccharomyces cerevisiae* umbenannt, wenngleich noch immer mit dem Zusatz „*bayanus*“.

4.1.2 Interspezifische Hybride: Detektion durch SAPD-PCR?

Aufgrund der oben bereits erwähnten ausschließlichen postzygotischen Isolation der Mitglieder der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe ist das Vorkommen von Hybriden aus zumeist zwei verschiedenen Spezies nicht ungewöhnlich. So konnten etwa Hefen, die aus dem genetischen Material aus *Saccharomyces bayanus* und *S. cerevisiae* bestehen, schon aus italienischen, ungarischen, französischen und spanischen Weinen isoliert werden (Masneuf et al 1998, Demuyter et al 2004, Antunovics et al 2005, Le Jeune et al 2007). Auch Hybride aus den Spezies *Saccharomyces cerevisiae* und *S. kudriavzevii* wurden bereits aus Wein isoliert und charakterisiert (Gonzalez et al 2006, 2008, Lopandic et al 2007).

Was die Genom-Struktur dieser Hybrid-Hefen betrifft, so können die parentalen Anteile im Hybrid sehr unterschiedlich sein. Etwa können Hybride durch Verpaarung diploider bzw. haploider Partner allotetraploid oder allodiploid sein und so Chromosomen und Allele beider Elternteile enthalten. Ebenso kommen Alloaneuploidien vor, bei denen Teile eines Partners in Form eines zusätzlichen Chromosom vorliegen, oder mosaikartige, chimäre Chromosomen (Sipiczki 2008).

Da die DNA-Fingerprinting-Methode SAPD-PCR das ganze Genom und nicht nur einzelne Gene berücksichtigt, konnten hiermit Hybride aus *Saccharomyces bayanus* und *S. cerevisiae* (Stamm CBS 8614) als auch aus *Saccharomyces cerevisiae* und *S. kudriavzevii* (Stamm NCYC 3518) detektiert werden. Diese zeigten ein DNA-Bandenmuster nach der SAPD-PCR, das artspezifische Banden beider Elternteile enthielt. Während der Hybrid *Saccharomyces bayanus* x *cerevisiae* CBS 8614 in der Literatur schon untersucht ist und seine Hybrid-Natur bereits bestätigt ist (Masneuf et al 1998), wurde der Stamm NCYC 3518 als Kontaminant von Bier isoliert und lediglich als *Saccharomyces kudriavzevii* in der englischen Stammsammlung hinterlegt. Publikationen zu diesem Stamm existieren nicht. Sowohl die „Mischsequenz“ der ITS und 5.8S rDNA aus *Saccharomyces kudriavzevii* und *S. cerevisiae*, als auch das für *S. cerevisiae*-spezifische PCR-Produkt belegen allerdings die Mischung des Genoms mit sowohl *S. kudriavzevii*- als auch *S. cerevisiae*-Anteilen. Diese falsche bzw. nicht vollständige Klassifizierung bei Hinterlegung des Stamms belegt noch einmal die Schwierigkeit

der Identifizierung von *Saccharomyces sensu stricto*-Stämmen. Auch Querol und Bond (2009) berichten über die oft falsch getroffene Einordnung von Hybriden aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces kudriavzevii*; so identifizierten etwa Schütz und Gafner (1994) aufgrund des Karyotyps *S. cerevisiae* x *kudriavzevii* nur als *S. cerevisiae*. Auch Gonzalez et al (2008) reklassifizierten den als *Saccharomyces cerevisiae* in der englischen Stammsammlung hinterlegten Stamm NCYC 447 als *S. cerevisiae* x *kudriavzevii*.

Im Fall des Hybrids *Saccharomyces bayanus* x *cerevisiae* CBS 8614 konnten Masneuf et al (1998) bereits zeigen, dass dieser Stamm sowohl *S. cerevisiae*- als auch *S. bayanus*-Chromosomen sowie sowohl das *S. cerevisiae*-Allel als auch das *S. bayanus*-Allel für das Gen MET2 besitzt. De Baros Lopez (2002) bestätigten ebenfalls den Hybrid-Charakter dieses Stammes. Auch in dieser Arbeit konnte mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese eine mögliche Chromosomen-Mischung beider Spezies dargestellt werden, genauso wie der Hybrid-Charakter dieses Stamms aufgrund der Amplifikation von *S. cerevisiae*- bzw. *S. bayanus*-spezischen Genombereichen. Allerdings zeigten Groth et al (1999), dass der Stamm CBS 8614 zwar hauptsächlich aus den zwei oben genannten Spezies besteht, aber zusätzlich auch noch *S. kudriavzevii*-Anteile enthält. Dieser *S. kudriavzevii*-ähnliche Anteil bezieht sich ausschließlich auf die mitochondriale DNA. Dieser geringe Anteil an *S. kudriavzevii*-DNA konnte jedoch nicht in der SAPD-PCR erkannt werden. Nichtsdestotrotz konnte mit der SAPD-PCR die bisherigen Erkenntnisse bestätigt werden, dass der Stamm CBS 8614 zu mehr oder weniger gleichen Teilen aus den zwei parental Genomen besteht. Allerdings konnte diese Heterozygotie nicht bei dem DNA-Bereich der ITS-Regionen und der 5.8S rDNA festgestellt werden. Hier wurde nur die Sequenz von *Saccharomyces bayanus* ermittelt. Dies war auch bei dem von Johnston et al (2000) und Naumov et al (2000c) untersuchtem Hybrid *Saccharomyces bayanus* x *cerevisiae* Stamm S6U der Fall, der als ansonsten allotetraploider Stamm nur das *S. bayanus*-Allel für den ITS- 5.8S rDNA-Bereich enthielt. Es kann spekuliert werden, dass die Vereinheitlichung der rDNA-Elemente hin zur Homozygotie ein Resultat von mitotischer Rekombination an diesen tandemartig angeordneten, etwa 150 – 200 Genkopien umfassenden Cluster ist (Casper et al 2008).

Ein dem Stamm CBS 8614 sehr ähnlicher Hybrid-Charakter konnte auch bei Stämmen gefunden werden, die vom Institut für Mikrobiologie und Weinforschung aus Gärtanks des Weinguts Heymann-Löwenstein isoliert wurden. Das SAPD-Muster dieser Stämme war annähernd identisch mit dem Muster von CBS 8614 und am Beispiel eines Stammes (3211-2) konnte gezeigt werden, dass auch das Chromosomenprofil nahezu übereinstimmend war. Die Sequenzierung der ITS- und 5.8S rDNA-Region ergab ebenfalls die Sequenz von *Saccharomyces bayanus*. Stämme mit diesen molekularbiologischen Charakteristika konnten zu etwa 35 % im Weinjahrgang 2004/2005 isoliert werden und im Jahrgang 2005/2006 zeigten alle vier isolierten Stämme diese Eigenschaften.

Den Hefestämmen mit diesem SAPD-PCR-Muster standen im Jahrgang 2004/2005 eine andere Gruppe gegenüber, deren SAPD-PCR-Profil die größte Ähnlichkeit mit dem von *Saccharomyces cerevisiae* besaß. Allerdings zeigten diese Stämme eine heterogene Sequenz bezüglich der ITS- 5.8S rDNA-Region, was das Restriktionsmuster belegte. Nach Sequenzierung konnte festgestellt werden, dass die dominantere Nukleotid-Abfolge *Saccharomyces kudriavzevii* zuzuordnen war, wenngleich auch die für *S. cerevisiae* typische Sequenz ermittelt werden konnte. Beim Vergleich der *S. kudriavzevii*-Sequenz mit Sequenzen aus der Datenbank fiel die große Übereinstimmung mit Sequenzen von dem als *Saccharomyces cerevisiae* eingeordneten Stamm HA 1835 und dem Stamm *Saccharomyces* sp. Stamm Assmannshausen auf. Stamm HA 1835 wurde von Lopandic et al (2007) beschrieben und ist ein Hybrid aus *Saccharomyces cerevisiae* und *S. kudriavzevii*. Die Forscher vermuten, dass dieser Hybrid wahrscheinlich aneuploid ist. Zudem weist auch hier das rDNA-Cluster eine Heterogenität auf, da die ITS- und 5.8S rDNA-Region und die D1/D2-Region der 26 S rDNA sowohl aus *S. kudriavzevii*-Allelen als auch aus *S. cerevisiae*-Allelen besteht. Gleiches gilt für den als Starterkultur eingesetzten Stamm Assmannshausen (Bradburry et al 2006). Bei diesen Stämme sowie weiteren Starterkulturen (Lalvin W46, DSM Femicru VB1, Anchor Vin7) ist davon auszugehen, dass bis auf die rDNA das restliche Genom aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt (Sipizki et al 2008). Dies würde auch im Fall der hier untersuchten Stämme das zu *Saccharomyces cerevisiae* ähnliche SAPD-Fingerprinting-Muster erklären. Belloch et al (2009) untersuchten die Starterkulturen *Saccharomyces cerevisiae* x *kudriavzevii* W27 und deren Chromosomenzusammensetzung und konnten bei vielen Chromosomen eine Mosaikstruktur ausmachen. Gonzalez et al (2008) postulierten einen Trend zur Erhaltung des *S. cerevisiae*-Genoms und zur Reduktion der *S. kudriavzevii*-Anteile in diesen Hybriden.

Die hier vorgestellte Komplexität der genomischen Verteilung der Elternspezies in einem Hybrid macht die Möglichkeit aber auch die Grenzen einer Detektion durch SAPD-PCR deutlich. Während Hybride zum Teil sehr gut erkannt wurden, konnten Stämme mit nur einem sehr geringen Anteil eines Hybridisierungspartner kaum erkannt werden. Andererseits spiegeln die im Falle von *Saccharomyces cerevisiae* x *kudriavzevii* erzeugten Bandenmuster dennoch wider, dass das Gros des genetischen Materials *Saccharomyces cerevisiae* entstammt, was etwa durch Sequenzierung der ITS-5.8S rDNA-Region nicht deutlich wurde. Eine das gesamte Genom umfassende Fingerprinting-Methode scheint hier noch die besten „Erfolgsaussichten“ zu haben, wenngleich zusätzliche Methoden wie die molekularbiologische Untersuchung bestimmter Loci unterstützen und erweitern können.

Die Untersuchung der vom Weingut Heymann-Löwenstein isolierten *Saccharomyces*-Stämme zeigte die augenscheinliche Verbreitung von Hybriden. Offensichtlich scheinen gerade aus Weingütern an

der nördlichen Grenze, an der Weinbau noch möglich ist (wie Nord-Frankreich, Österreich, Schweiz und Ungarn), vermehrt Hybride aus *S. cerevisiae* und *S. bayanus* bzw. *S. kudriavzevii* isoliert zu werden (Belloch et al 2009). So ist gerade *Saccharomyces bayanus* bekannt für seine Kältetoleranz, weshalb Naumov et al (2000b) eine Dominanz dieser Spezies in nördlichen Anbaugebieten, bei einer Weinlese im späten Herbst und bei Gärungen mit niedriger Temperatur feststellten. Auch Demuyter et al (2004) konnten diese Spezies vermehrt in Weinen aus einem nördlichen Anbaugebiet in Ungarn isolieren. *Saccharomyces kudriavzevii* wurde bisher noch nicht im Wein beschrieben, jedoch zeigen die aus Japan isolierten Stämme sowie *S. cerevisiae* x *kudriavzevii*-Stämme ebenfalls gute Gäreigenschaften bei niedrigen Temperaturen (Tronchonie et al 2009). Die als Starterkultur erwerbbaaren und oben schon erwähnten *S. cerevisiae* x *kudriavzevii*-Stämme Lalvin W 27 und W 46 durchführen eine optimale Gärung bei 15 °C, können aber auch noch bei 10 °C vergären (Sütterlin et al 2003). Interessanterweise fermentiert auch das Weingut Heymann-Löwenstein bei niedrigen Temperaturen unterhalb von 15 °C, sodass auch hier von einer Kälteadaptation der Hefestämme auszugehen ist.

Andere positive Eigenschaften sind bei Hybriden aus *Saccharomyces cerevisiae* und *S. bayanus* ebenfalls dem „*bayanus*-Anteil“ zuzuordnen, wie etwa die verringerte Produktion von Acetat oder die vermehrte Bildung von Glycerin. *Saccharomyces cerevisiae*-typische Eigenschaften wären hingegen etwa die größere Ethanoltoleranz. Allerdings zeigen nicht alle aus Wein isolierten Hybrid-Stämme diese vereinigten positiven Eigenschaften beider Eltern, sondern können etwa auch das Temperaturoptimum von *S. cerevisiae* übernommen haben (Sipiczki 2008). Die Bildung sekundärer Produkte durch *Saccharomyces*-Hybride wurde ebenfalls schon untersucht. So zeigte der schon erwähnte *Saccharomyces cerevisiae* x *kudriavzevii* Stamm HA 1835 ebenfalls eine verringerte Acetatbildung und zudem eine vermehrte Bildung von Komponenten, die zu einem fruchtigen und blumigen Aroma führen, wie bestimmte Alkohole und Ester (Lopandic et al 2007, Gangl et al 2009). Auch Bellon et al (2011) konnten eine gesteigerte Aromavielfalt durch ihren künstlichen erzeugten Hybrid aus *Saccharomyces cerevisiae* und *S. kudriavzevii* ausmachen; zudem zeigte er eine Ethanoltoleranz über 14 % und eine Osmotoleranz von 25 % Zucker, was der parentale *S. kudriavzevii*-Stamm nicht erreichte.

Auch in dieser Arbeit wurden mögliche Wachstumsunterschiede der isolierten Hybrid-Stämme *Saccharomyces cerevisiae* x *bayanus* und *S. cerevisiae* x *kudriavzevii* sowie der 2008/2009 isolierte *S. bayanus*-Stamm bei veränderten pH-Werten und Zuckerkonzentrationen untersucht. Es konnten hier allerdings keine verschiedenen Eigenschaften gefunden werden, die einer bestimmten genetischen Konstitution zugeordnet hätten werden können. Die Ähnlichkeit des Phänotyps trotz unterschiedlicher Genotypen könnten eventuell im Umstand begründet sein, dass alle Stämme aus

dem gleichen Weingut isoliert wurden und somit dem gleichen Selektionsdruck unterworfen waren, sodass zumindest bei diesen beiden Parametern keine Unterschiede festzustellen sind.

Während der Vergärung kommt es im Weingut Heymann-Löwenstein nicht selten zu zum Teil Monate andauernden Gärstockungen, die bisher noch nicht verstanden sind und die keine offensichtliche Ursachen wie Nährstoffmangel oder schlechtes Glucose-Fructose-Verhältnis haben. Die Identifizierung der vorgestellten Hybrid-Stämme verleitet zu der Spekulation, dass sie und ihre genetische Ausstattung verantwortlich für die Unterbrechung der Gärung sind.

Die Fitness von Hybrid-Stämmen ist umstritten. Generell wird mit Hybriden eine größere Genom-Instabilität assoziiert, da die in der Zelle vereinten Genome miteinander rekombinieren können. So können etwa allodiploide Stämme aneuploid werden, wenn sie durch mitotische Rekombination Chromosomen während der vegetativen Vermehrung verlieren (Sipiczki 2008). Alloaneuploidie kann wiederum mit phänotypischen Defekten verbunden sein (Querol und Bond 2008). In Most und Wein sind die Hefen verschiedenen Stress-Faktoren wie Ethanol, Acidität, osmotischem Druck und Sulfit ausgesetzt, die wiederum zu verstärkten Mutationen führen können (Ebina und Levin 2007). Um zu untersuchen, ob die Exposition von Weinfaktoren eine steigende Mutationsrate zur Folge hat und ob Hybrid-Stämme davon stärker betroffen sind, wurde sowohl der *Saccharomyces cerevisiae* x *bayanus* Hybrid CBS 8614 als auch der aus dem Weingut isolierte Hybrid 3211-2 sowie *S. cerevisiae*^T und *S. bayanus*^T unter verschiedenen Bedingungen über einen Zeitraum von 75 Tagen kultiviert. Es konnte hierbei zwar festgestellt werden, dass der Typstamm von *Saccharomyces bayanus* im Gegensatz zu den anderen Stämmen nicht in der Lage war unter bestimmten Bedingungen zu wachsen und es zeigten sich sowohl bei *Saccharomyces cerevisiae* als auch bei den beiden Hybriden jeweils eine Veränderung des δ -Musters bei jeweils einem Parameter. Jedoch konnte keinem Stamm eine besonders hohe Veränderlichkeit noch ein bestimmter Parameter als Auslöser dieser nachgewiesen werden. Auch Kunicka-Styczynska und Raykowska (2011) untersuchten diesen Aspekt bei Hybriden. Sie untersuchten die Genomstabilität nach 50 bis 190 Generationen und stellten gerade unter Anaerobiose große Veränderungen in den chromosomalen Bandenmustern von Hybriden fest. Wahrscheinlich haben die in dieser Arbeit untersuchten Stämme bereits eine Genomstabilisierung in ihrem natürlichen Milieu erfahren und zeigen deshalb eine ähnliche Rate an sich auf das Genom auswirkende Mutationen wie die *Saccharomyces*-Typstämme.

Sowieso konnten bestimmte Stämme aus dem Weingut Heymann-Löwenstein nicht direkt mit Gärstockungen in Verbindung gebracht werden, zumal zum Teil Stämme mit Hybridcharakter auch nach dem Wiedereinsetzen der Gärung isoliert wurden.

Unabhängig davon zeigt die Diversität der *Saccharomyces*-Stämme im Weingut Heymann-Löwenstein über einen Zeitraum von fünf Jahren nicht nur das gehäufte Vorkommen von Hybriden

in diesem Weinkeller, sondern auch die Adaption der Hefe-Stämme an die klimatisch kälteren Bedingungen im Weinberg sowie ihre Adaption an die vom Weingut durchgeführte Gärung bei niedrigen Temperaturen. Das Vorkommen von Hybriden aus *Saccharomyces cerevisiae* und *S. kudriavzevii* in deutschen Anbaugebieten ist bisher noch nicht publiziert, wenngleich der Name „Assmannshausen“ einer solchen Hybrid-Starterkultur eine Isolierung im Rheingau impliziert.

4. 2 Quantitative PCR: Untersuchung mikrobieller Populationen in der Weinbereitung

Die quantitative PCR (qPCR) wird zunehmend verwendet um mikrobielle Ökologie in den verschiedensten Habitaten zu untersuchen, weil sie ein robustes und sensitives System darstellt, das sich zusätzlich durch hohe Reproduzierbarkeit auszeichnet (Smith and Osborn 2009). Kulturabhängige Methoden hingegen können Ergebnisse insofern verzerren, als dass eine Detektion aller Mikroorganismen aus dem zu untersuchenden Habitat nur dann erfolgen kann, wenn Kulturbedingungen so gewählt sind, dass sie den Ansprüchen der Mikroorganismen genügen. Durch die Begrenztheit an Kulturmedien kann oft nur eine Minderheit der tatsächlichen Mikrobiota dargestellt werden (Hugenholtz et al 1998). Ferner ist diese Methode nicht nur zeit- und arbeitsintensiv, sondern kann auch keine quantitative Aussage über die Verteilung der Mitglieder des untersuchten Habitats machen (Carraro et al 2011). Die Isolierung einer Gesamt-DNA einer mikrobiellen Population kann auf den Schritt der Kultivierung verzichten. Eine Identifizierung oder Einordnung erfolgt dann meist über die Amplifizierung von allgemeinen Gen-Sequenzen (etwa 16 S rDNA) und der anschließenden Charakterisierung durch Klonierung und Sequenzierung, Restriktionsanalysen oder Denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (Nocker et al 2007). Allerdings können auch hier keine genauen Aussagen über die in der Probe vorliegenden Zellzahlen der Mitglieder des Habitats gemacht werden. Dies ist nicht zuletzt der Grund, warum für ökologische Studien immer mehr die Methode der qPCR herangezogen wird, entweder um grob einen Gesamtüberblick über Domänen, Phyla oder Klassen zu erhalten oder um spezifische Organismen oder typische Gene in einem Habitat nachzuweisen (als Beispiele etwa Suzuki et al 2004, Moin et al 2009, Bachar et al 2010, Swan et al 2010 und Bacchetti De Gregoris et al 2011). Praktische Anwendung findet die qPCR vor allem auch in der medizinischen Mikrobiologie als diagnostisches Nachweissystem von Krankheitserregern wie *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* oder auch *Aspergillus*-Spezies (Faber et al 2009, Janse et al 2010, McCulloch et al 2011). Zusätzlich können pathogene Spezies wie *Candida* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp. und *Pseudomonas* spp. auch bei der Qualitätskontrolle von Lebensmitteln durch diese Methode erkannt werden (Leblanc-Maridor et al 2011, Makino et al 2010, Reynisson et al 2008,

Wolffs et al 2004). Auch für den Nachweis von mikrobiellen Schädlingen in der Lebensmittelbereitung wurden bereits spezies-spezifische qPCR-Systeme entwickelt, etwa für verschiedene Hefen in Orangensaft (Renard et al 2008) oder für die für Fischverderb verantwortlichen Pseudomonaden (Reynisson et al 2008).

Das hier beschriebene System dient der Detektion und Quantifizierung der mit der Weinbereitung assoziierten Hefen *Hanseniaspora* spp., *Saccharomyces* spp. und *Brettanomyces* spp.. Hierdurch ist eine Anwendung in ökologischen Studien denkbar, da die Gattungen *Hanseniaspora* und *Saccharomyces* die dominanten Spezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Weinbereitung stellen, als auch eine Anwendung als Detektionssystem für Weinschädlinge wie im Fall von *Hanseniaspora* als auch besonders *Brettanomyces*.

4.2.1 Amplifikationsspezifität der Ziel-DNA

Als Target der PCR wurde die die 5.8S rDNA bzw. ihre umgebenden ITS-Regionen (ITS = internal transcribing spacer) gewählt, da hier eine ausreichende Variabilität der DNA-Sequenzen vorliegt, um durch eine Bindung von Primern einen spezifischen Nachweis der gewünschten Arten zu gewährleisten. Auch Hierro et al (2007) nutzten die Amplifizierung dieser DNA-Region als Nachweissystem, wenngleich auch oft die D1/D2-Domänen der 26S rDNA für die spezifische oder allgemeine Detektion von Hefen in Most und Wein üblich ist (Hierro et al 2006a, Rawsthorne und Phister 2006). Die Spezifität der hier konstruierten Primer wurde sowohl *in silico* durch Datenbank-Recherchen als auch *in vitro* mit DNA verschiedenster, in der Weinbereitung vorkommenden Hefe- und Bakterienarten überprüft. Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass im Fall von *Hanseniaspora uvarum* und *Brettanomyces bruxellensis* keine direkten Mitglieder dieser Gattungen auf eine Amplifizierung untersucht wurden, wenngleich *in silico* keine Übereinstimmung der Primer mit DNA anderer Arten gefunden werden konnten (Primer-Blast, www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Bei den für den Nachweis von *Saccharomyces* spp. generierten Primer zeigte der Spezifitätstest *in silico* als auch *in vitro* eine mögliche Amplifikation von allen Arten der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe. Dies war aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeiten der Mitglieder dieser Gruppe auch nicht anders zu erwarten (s. auch 4.1). Auch Hierro et al (2007) konnten kein speziesspezifisches qPCR-System für *Saccharomyces cerevisiae* entwickeln.

Der Einsatz mehrerer Stämme einer Art bei den durchgeführten Spezifitätstests zeigte einen weiteren Vorteil der verwendeten Ziel-DNA. Diese ist zwar üblicherweise – mit Ausnahme der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe – variabel auf Spezies-Niveau, ist aber konserviert genug, als dass keine stammabhängigen Variationen vorliegen und DNA von Stämmen einheitlich amplifiziert

wurden. Demgegenüber stehen ebenfalls für die Wein-Analyse vorgestellte Primer für *Oenococcus oeni*, die auf Grundlage von *O. oeni*-spezifischen DNA-Banden nach Generierung eines Fingerprinting-Musters konstruiert wurden (Solieri und Giudici 2010). Diese willkürliche Auswahl von genomischen Sequenzen als Basis für einen speziesspezifischen Nachweis bedarf der Überprüfung einer hohen Anzahl verschiedener Stämme, um die tatsächliche Spezifität darzustellen. Gleiches gilt für die Detektion von Mikroorganismen durch den Nachweis verschiedener proteincodierender Gene. Auch hier muss empirisch der Beweis eines ubiquitären Vorkommens des Gens bei verschiedenen Stämmen einer Art erbracht werden (Mule et al 2006), es sei denn die Spezifität des Nachweissystems fokussiert sich nur auf Stämme, die den durch das Gen codierten Phänotyp zeigen. So entwickelten Nannelli et al (2008) eine auf qPCR basierte Methode zum Nachweis von biogene Amine bildenden Lactobazillen in Wein, genauso wie die Quantifizierung von Exopolysaccharid produzierenden Milchsäurebakterien in Cider (Ibarburu et al 2010). Problematisch ist ein solcher quantitativer Nachweis, wenn die Kopienzahl der nachzuweisenden Gene nicht bekannt oder variabel ist.

Diese Schwierigkeit kann sich auch bei der hier verwendeten rDNA bzw. ITS-Regionen ergeben. So ist die Gen-Kopienzahl der ribsomalen DNA-Cluster bei *Hanseniaspora uvarum* und *Brettanomyces bruxellensis* nicht bekannt. Durch Genom-Sequenzierungen und anderen Untersuchungen konnte bei *Saccharomyces cerevisiae* auf Chromosom XII das rDNA-Cluster bestimmt werden. Hierbei wird von 150 bis 200 Genkopien ausgegangen, wobei die tatsächliche Anzahl nicht nur schwierig durch Sequenzierung zu bestimmen ist, sich zusätzlich auch noch variabel auf Stamm-Niveau zeigt (Kim et al 2006, James et al 2009). Nichtsdestotrotz zeigten die hier ermittelten Kalibrierungsgeraden keine Varianz bezüglich der zwei untersuchten Stämme einer Art, was zeigt, dass eine mögliche Unterschiedlichkeit der Genkopie-Zahl zwischen verschiedenen Stämmen so gering ausfällt, als dass sie Einfluss auf die spätere Quantifizierung haben könnte. Die größten – wenn auch immer noch geringen – Abweichungen wurden bei den untersuchten Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* festgestellt. Im Falle dieser Hefe-Art können zusätzliche Abweichungen bezüglich der Genkopien auftreten, weil hier Stämme nicht selten Polyploidien aufweisen (Querol und Bond 2009).

Die Spezifität der jeweiligen Primer-Paare für die ausgewählte Zielsequenz und die Anwendbarkeit auf verschiedene Stämme einer Art wurden zusätzlich durch Schmelztemperatur-Versuche untermauert. Hier konnten speziesspezifische, stammunabhängige Schmelztemperaturen gemessen werden, die auch bei unterschiedlichen PCR-Ansätzen, DNA-Konzentrationen u. ä. konstante Werte zeigten.

4.2.2 Parameter des qPCR-Systems: Stabilität, Effizienz, Reproduzierbarkeit und Sensitivität

Die berechneten Kalibrierungsgeraden für eine spätere Quantifizierung beruhten auf der DNA-Isolierung von 2×10^7 Zellen/ml und der anschließenden seriellen Verdünnung dieser. Die aus der qPCR resultierenden C_t -Werte ergaben nach Zuordnung zu den jeweilig anzunehmenden Zellzahlen Kalibrierungsgeraden, die in allen drei Fällen einen R^2 -Wert von 0,999 aufwiesen. Dieser hohe Wert verweist auf die große Linearität der Geraden und ist ein Indikator für ein stabiles qPCR-System. Die lineare Beziehung zwischen C_t -Wert und Zellzahl konnte im Fall von *Brettanomyces bruxellensis* bis zur einer DNA-Verdünnung 2×10^2 Zellen/ml entsprechend aufrechterhalten werden, im Fall von *Saccharomyces cerevisiae* und *Hanseniaspora uvarum* nur bis 2×10^3 Zellen/ml. Geringere DNA-Konzentrationen führten zu einem zu nicht in der Kalibrierungsgerade liegenden C_t -Werten. Zusätzlich führten Negativ-Kontrollen, die statt Template-DNA PCR-Wasser enthielten, teilweise auch zu Amplifikationen bei C_t -Werten > 37 Zyklen, ein Umstand, der bei der Verwendung von SYBR Green nicht ungewöhnlich ist (Mule et al 2006). Smith und Osborn (2009) kritisieren in ihrem Review das Vorenthalten solcher falsch-positiver Ergebnisse in der Literatur und empfehlen als minimale Detektionsgrenze von DNA die Verdünnung anzugeben, die einem C_t -Wert entspricht, der etwa 3,3 Zyklen von der Negativ-Kontrolle entfernt ist. Entsprechend wurde hier verfahren, wenngleich auch bei geringeren DNA-Ausgangsmengen nach Amplifizierung PCR-Produkte elektrophoretisch nachgewiesen werden konnten.

Ein weiterer Faktor für die Qualität eines PCR-Systems ist seine Effizienz, die Beschreibung des Grads der Amplifizierung für einen PCR-Zyklus. So ist bei einer Steigung der Kalibrierungsgerade von -3,32 die PCR-Effizienz bei 100 %, da hier eine Verdopplung der DNA-Menge zu einer Abnahme des C_t -Werts um einen Zyklus führt, was einer vollständigen Verdopplung der DNA-Menge während eines PCR-Zyklus entspricht. Die Effizienz der hier beschriebenen qPCR-Systeme lag im Fall von *Brettanomyces* spp. und *Hanseniaspora* spp. bei 80 %, während das System von *Saccharomyces* spp. zu einer Effizienz von nur 67 % führte. Ähnliche Effizienzen können auch bei Systemen aus der Literatur gefunden werden, so etwa bei der Detektion von *Oenococcus oeni* (79 bis 84 % Effizienz, Solieri und Giudici 2010), *Saccharomyces* spp. und *Hanseniaspora* spp. (71 bis 78 % Effizienz, Hierro et al 2007) oder allgemein Hefen (77 %, Andorra et al 2010). Im Fall von dem System für *Saccharomyces* spp. brachten Veränderungen der PCR-Parameter wie Erhöhung der Denaturierungszeit oder Erniedrigung der Annealingtemperatur keine verbesserte Effizienz.

Die Isolierung von DNA ist ein wichtiger Parameter, der die Grundlage für Reproduzierbarkeit und Stabilität des qPCR-Systems darstellt. Verschiedene Isolierungsmethoden können dabei zu verschiedenen gemessenen Zellzahlen führen (s. etwa Cankar et al 2006, Demeke und Jenkins 2010). Das hier verwendete Isolierungsprinzip mit Silikamembranen wird häufig verwendet, wenn

die DNA in späteren qPCR-Analysen eingesetzt werden soll, da durch das Prinzip der DNA-Bindung an die Membran verschiedene PCR-Inhibitoren ausgewaschen werden können. So verwendeten Ibarburu et al (2010) diese Methode für die DNA-Extraktion von Milchsäurebakterien aus Cider und Hierro et al (2006a) isolierten hiermit DNA aus Hefezellen in Wein. Auch in dieser Arbeit konnte mit Hilfe dieser Methode DNA gewonnen werden, die keine Störeffekte auf die spätere PCR hatte.

Zudem konnte durch eine zweifache DNA-Isolierung einer Zellprobe festgestellt werden, dass die isolierte DNA-Menge in beiden Fällen sehr ähnlich war, wodurch sehr geringe Abweichungen bei der späteren qPCR auftraten.

Durch das Zusammenfügen verschiedener – zuvor quantitativ erfasster – Hefestämme in einer Probe und anschließender Isolierung der Gesamt-DNA konnte zudem festgestellt werden, dass die Zellyse aller Hefe-Arten mit einer ähnlichen Aktivität stattfand und nicht etwa bestimmte Arten bei der DNA-Isolierung bevorzugt wurden. Zum Teil zeigten allerdings *Brettanomyces bruxellensis* und *Hanseniaspora uvarum* in diesen Mischkulturen nach qPCR-Analyse geringere Zellzahlen als die zuvor eingestellten, jedoch nicht in einer Regelmäßigkeit, die auf eine ineffiziente DNA-Isolierung dieser Spezies gegenüber anderen schließen lässt. Auch eine Interferenz der DNA der verschiedenen Organismen in einem qPCR-Ansatz konnte ausgeschlossen werden, sodass diese Schwankungen zwischen tatsächlicher und gemessener Zellzahl wohl als systemimmanent zu betrachten sind.

Bezüglich der eingestellten und mit qPCR ermittelten Zellzahlen aus Kulturen in Vollmedium und Traubensaft konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die Stabilität des qPCR-Systems auch bei in Traubensaft angezogenen Kulturen ist insofern wichtig, als dass im Traubensaft Stoffe wie Polysaccharide und Polyphenole vorliegen, die inhibitorisch auf die Amplifikation der DNA während der PCR wirken können (Wilson 1997). Diese störenden Faktoren wurden schon bei verschiedenen Untersuchungen von Mikroorganismen in Traubensaft und Wein beschrieben (Cocolin et al 2001, Prakitchaiwattana et al 2004). Hierro et al (2006a) zeigten bei ihrer Vorstellung eines qPCR-Systems für die Detektion von Hefen in Wein eine Störung der PCR und eine damit einhergehende geringere Effizienz und Sensitivität bei Zellen aus Weiß- und Rotwein. Um eine Inhibition der PCR durch Traubeninhaltsstoffe zu vermeiden, fügten Martorell et al (2005) Bovines Serum Albumin (BSA) dem qPCR-Ansatz hinzu, um spezifisch *Saccharomyces cerevisiae* nachweisen zu können. Solche Zusätze waren in dieser Arbeit nicht notwendig, da offensichtlich die hier verwendete DNA-Isolierungsmethode ausreichend reine DNA erzeugte.

Die Kapazität der DNA-Isolierung ist ebenfalls ein entscheidender Parameter für die Erfassung von Zelldichten bei einer späteren qPCR-Analyse. So konnte festgestellt werden, dass bei Zelldichten $\geq 5 \times 10^7$ Zellen/ml eine weniger effektive DNA-Extraktion stattfindet, wodurch die qPCR geringere

Zellzahlen detektiert als die eigentlich eingesetzten. Dies ist auf die Bindekapazität der Silikamembran zurückzuführen. Diese ist laut Herstellerangaben limitiert auf 5×10^7 Hefe-Zellen (www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=527); die Verwendung von höheren Zellzahlen führt nicht nur zu einer ineffizienten DNA-Bindung an die Membran, sondern auch zu einer Herabsetzung der Reinheit der späteren DNA-Lösung (www.qiagen.com/HB/DNeasy96Tissue). Da die ermittelte obere Nachweisgrenze von Zellen in einer Probe der Limitierung nach Herstellerangaben entsprach, ist davon auszugehen, dass die Bindungskapazität der Silikamembranen als alleinige Ursache für diese maximale Grenze ist und nicht etwa andere Faktoren wie der durch Enzyme katalysierte Zellaufschluss.

Der Nachweis von geringen Zellzahlen wird nicht nur durch die hohen C_t -Werte im qPCR-System beschränkt, sondern ebenfalls durch die DNA-Isolierung. So besteht das Protokoll der DNA-Isolierung aus mehreren Zentrifugationsschritten (etwa das Pelletieren von durch Lytikase-Verdau entstandenen Protoplasten), die sich bei geringen Zelldichten als handwerklich schwierig gestalten. Auch die Bindung der freigesetzten DNA an die Silikamembran kann bei diesen Zellzahlen verringert sein. Der Hersteller empfiehlt bei Proben mit weniger als 10000 Kopien den Zusatz von Fremd-DNA, um die Bindung an die Membran zu optimieren (www.qiagen.com/HB/DNeasy96Tissue). Die angeführten Probleme wurden in dieser Arbeit umgangen, indem der zu untersuchenden Probe mit geringen Zellzahlen Hefezellen einer anderen Spezies mit einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml hinzugefügt wurden. So konnte zum einen ein optimales Pelletieren während der Probenvorbereitung und der enzymatische Zellwandhydrolyse gewährleistet werden, als auch eine optimale Bindung der freigesetzten DNA an der Membran. Der Zusatz von anderen Organismen für eine Erhöhung der DNA-Extraktionseffizienz wurde bereits beschrieben (Hierro et al 2007).

Bei allen hier eingesetzten Stämmen der Arten *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis* und *Hanseniaspora uvarum* konnte eine optimale Korrelation zwischen eingesetztem Zelltitel und durch qPCR gemessenen Zellzahlen zwischen 2×10^7 und 1×10^4 Zellen/ml festgestellt werden, wobei *Saccharomyces cerevisiae* bei 1×10^4 Zellen/ml die größten Abweichungen zeigte. Dieser Stamm konnte auch noch mit 1×10^3 Zellen/ml detektiert werden, wenngleich nicht mehr richtig quantitativ erfasst werden. Diese relativ hohe Nachweisgrenze ist hier nicht der DNA-Isolierung zuzuordnen, da schon bei der Bestimmung der Kalibrierungsgeraden mit verdünnter DNA-Lösung aufgrund von hohen C_t -Werten hier ein Detektionslimit zu beobachten war. Sowohl *Brettanomyces bruxellensis* als *Hanseniaspora uvarum* konnten mit Zellzahlen von 1×10^3 Zellen/ml sehr gut quantitativ erfasst werden; *Hanseniaspora uvarum* zeigte auch bei eingesetzten 1×10^2 Zellen/ml ein Signal in der qPCR, wenngleich dieses nicht genau die tatsächliche Zellzahl darstellte. Da durch den Zusatz von Fremd-Hefen eine Limitierung der DNA-Isolierung ausgeschlossen werden

konnte, beruhen diese minimalen Nachweisgrenzen allein auf der Kapazität der qPCR mit den für sie konstruierten Primern.

Ein Vergleich der hier vorgestellten Sensitivität des qPCR-Systems mit Literaturwerten gestaltet sich insofern als schwierig, als dass verschiedene Systeme der qPCR als auch verschiedene Annahmen zur Erfassung der Sensitivität gemacht wurden. So verwendeten beispielsweise Renard et al (2008) für ihren vorgestellten Nachweis von *Hanseniaspora* und *Saccharomyces* in Orangensaft ein Elutionsvolumen von nur 20 µl bei ihrer DNA-Isolierung, was einer fünffachen Konzentrierung im Vergleich des hier eingesetzten Elutionsvolumen entspricht. Auch die Menge der im PCR-Ansatz verwendeten Template-DNA kann innerhalb der verschiedenen Systeme stark variieren und zwischen 8 % und 50 % des PCR-Ansatzes ausmachen (etwa Rawsthorne und Phister 2006 bzw. Makino et al 2010). Ein weiterer, schon oben erwähnter Punkt ist die Verwendung von Negativ-Kontrollen. So korrigierten Hierro et al (2006a) bei ihrem Nachweis von Hefen die Sensitivität ihres Systems auf 1×10^3 Zellen/ml Wein, weil die Negativ-Kontrollen bei einem C_t -Wert von etwa 36 positive Signale zeigten. Auch Mule et al (2006) erwähnen Signale in der Negativ-Kontrolle nach 36 bis 38 Zyklen, wodurch ihr Detektionslimit für *Aspergillus carbonarius* auf Trauben ebenfalls erhöht wurde. Andere Publikationen über Zellzahlbestimmungen von Mikroorganismen in Wein und anderen Lebensmitteln führen diese falsch-positiven Signale der Negativ-Kontrollen nicht an.

Aufgrund der auch hier gelegentlich auftretenden Signale in der Negativ-Kontrolle wurde in dieser Arbeit die minimale Quantifizierungsgrenze bei *Saccharomyces cerevisiae* auf 1×10^4 Zellen/ml gesetzt und bei *Hanseniaspora uvarum* und *Brettanomyces bruxellensis* auf 1×10^3 Zellen/ml gesetzt, wenngleich im Falle von *Hanseniaspora uvarum* und *Brettanomyces bruxellensis* – entweder bei DNA-Verdünnung oder Verdünnungen der Zellen – auch der Nachweis von 10^2 Zellen/ml möglich war. Gleiches gilt auch bei Zellzahlen von 1×10^3 bei *Saccharomyces cerevisiae*. Da die hier gewonnenen Werte aber keine genaue Linearität zu der Kalibrierungsgerade aufwiesen, können sie nicht als genau gelten, sondern nur ein Hinweis auf das Vorkommen dieser Spezies in einer Probe sein. Gleich verfahren auch Wolffs et al (2004) bei ihrer Detektion von *Yersinia enterocolitica* in Schweinefleisch und bezeichnen die Erkennung dieser geringen Zellzahlen als „semiquantitativ“. Die in der Literatur beschriebenen Detektionsgrenzen für Hefen in der Weinbereitung liegen im Fall von Hierro et al (2006a bzw. 2007) zwischen 10^6 und 10^3 bzw. 10^2 Zellen/ml; andere Autoren erreichen noch sensitivere Werte kleiner als 100 Zellen/ml (Rawsthorne und Phister 2006, Salinas et al 2009) oder sogar geringer als 10 Zellen/ml (Phister und Mills 2003, Martorell et al 2005). Im Falle von anderen Organismen im Wein konnte etwa *Oenococcus oeni* mit $2,2 \times 10^2$ Zellen nachgewiesen werden (Solieri und Giudici 2010), genauso wie 5×10^2 Milchsäurebakterien (Neeley et al 2005). Zusammenfassend ist also die minimale Nachweisgrenze

des hier verwendeten qPCR-Systems höher als bei anderen Systemen. Dies kann eventuell mit der verringerten PCR-Effizienz begründet werden, wodurch DNA-Proben aus geringen Zelldichten schneller hohe C_t -Werte erreichen, die dann mit möglichen Signalen der Negativ-Kontrolle überschneiden. Dies wäre besonders bei *Saccharomyces cerevisiae* der Fall. Auf der anderen Seite sind die in anderen Studien angegebenen Effizienzen auch nicht deutlich erhöht im Vergleich zu den hier ermittelten (s.o.). Die Konsequenz, die sich aus diesen ermittelten Limitierungen für die praktische Untersuchung einer Most- oder Weinprobe ergeben, wird im Folgenden noch ausführlicher besprochen.

4.2.4 Quantifizierung von Hefepopulationen

Die mit Hilfe des entwickelten qPCR-Systems quantifizierten Zellzahlen wurden mit Lebendzellzahlen verglichen, wenn die untersuchten Kulturen nur eine Spezies enthielten. Für die Gegenüberstellung der qPCR-Ergebnisse mit den tatsächlichen Zellzahlen in Mischpopulationen, wurde die Gesamtzellzahl der jeweiligen Arten bestimmt und anschließend definierte Zellzahlen zusammengefügt. Eine Lebendzellzahlbestimmung war in Mischkulturen aufgrund der nicht vorhandenen Differenzierbarkeit der Arten nicht möglich.

Im Vergleich mit der Lebendzellzahl erzielten die qPCR-Messungen etwa für Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* stets gleiche oder leicht höhere Zellzahlen. Gleiches war auch bei Kulturen von *Hanseniaspora uvarum* festzustellen, wenngleich zu einem Zeitpunkt die koloniebildenden Einheiten erhöht waren ($3,2 \times 10^7$ Zellen/ml im Gegensatz zu $1,3 \times 10^7$ Zellen/ml [qPCR]). Ausgenommen dieser Abweichung lag das durchschnittliche Verhältnis zwischen KBE-Bestimmung und qPCR-Messung bei diesen Arten bei 0,79, wodurch im Schnitt die qPCR etwa 20 % mehr Zellen erkannte als die KBE-Bestimmung. Auf Seiten der Lebendzellzahl-Bestimmung sind diese Unterschiede auf die Limitierung von nur vollkommen vitalen Zellen zurückzuführen. Das qPCR-System hingegen funktioniert auf Grundlage von vorliegender DNA. Durch die Verwendung der oben beschriebenen DNA-Isolierungsmethode mit verschiedenen Pelletierungsschritten von ganzen Zellen kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass frei gewordene DNA in Lösung ebenfalls detektiert wurde. Außerdem beschreiben Neeley et al (2005), dass in Wein der Großteil an DNA zell-assoziiert ist und nicht frei vorliegt. Als problematisch kann angesehen werden, dass das qPCR-System auch nicht mehr vitale, aber noch intakte Zellen detektiert. Dieser Umstand könnte durch eine Behandlung der Zellprobe mit Ethidium-monoazidbromid umgangen werden (Andorra et al 2010). Diese Moleküle können in letale, beschädigte Zellen eindringen und kovalent an Nukleinsäuren binden, wodurch nach DNA-Isolierung keine Amplifikation während einer PCR stattfinden kann.

Im Fall von *Brettanomyces bruxellensis* konnte in diesem Versuch stets höhere Lebendzellzahlen als mit qPCR ermittelt werden. Der Grund für diese Diskrepanz ist in der maximalen Zellmenge zu finden, mit der eine effektive DNA-Isolierung möglich ist. Hier hätten geringere Volumina der Kultur für die DNA-Isolierung eingesetzt werden müssen.

Dieser Umstand kann auch als Ursache für die mit qPCR quantifizierten Zellzahlen von Mischpopulationen in Vollmedium und Traubensaft gesehen werden. Während in den Zellmischungen, die mehr Zellen als 5×10^7 Zellen/ml enthielten, stets geringere Werte per qPCR gemessen wurden als die tatsächlichen Zellzahlen, zeigten die Zellmischungen mit geringeren Zelldichten nach qPCR-Analyse ähnliche Werte, mit wenigen, bereits erwähnten Ausnahmen (s. 4.2.2).

Generell wurden die hier gefundenen Varianzen bezüglich der unterschiedlichen Methoden (Gesamtzellzahl, KBE, qPCR) auch in der Literatur beschrieben (siehe etwa Hierro et al 2006a, Rawsthorne und Phister 2006, Hierro et al 2007) und müssen als gegeben hingenommen werden.

Die gute Dokumentation von dynamischen Hefepopulationen während der Weinbereitung mit Hilfe des qPCR-Systems zeigte die Vergärung von Traubensaft mit zuvor eingestellten Zellzahlen der drei Arten *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis* und *Hanseniaspora uvarum*. Auch hier lieferten die durch qPCR gemessene Zellzahlen große Übereinstimmung mit Lebendzellzahl und Gesamtzellzahl der verschiedenen Most- und Weinproben. Auch wird hier erneut deutlich, dass die Aussagekraft einer Zellzahlbestimmung mit klassischen Methoden wenig Einblick in die Dynamik der einzelnen Hefearten erlaubt. Mit Hilfe des qPCR-Systems konnte hingegen die bereits in der Literatur beschriebenen Veränderlichkeiten der verschiedenen Arten bezüglich ihres Wachstums während der Gärung dargestellt werden. So konnte etwa die bekannte Sensitivität gegenüber Ethanol von *Hanseniaspora uvarum* gezeigt werden (Fleet 2003), genauso wie das zwar langsame, aber stetige Wachstum und die hohe Ethanoltoleranz von *Brettanomyces bruxellensis* (Dittrich und Großmann 2005).

Grundsätzlich eignet sich das qPCR-System für die Untersuchung dieser Hefespezies zu den unterschiedlichsten Zeitpunkten der Weinbereitung. Die Grenzen der quantitativen Bestimmung liegen hierbei zwischen 2×10^7 Zellen/ml und etwa 1×10^3 Zellen/ml (*Hanseniaspora* spp. und *Brettanomyces* spp.) bzw. 1×10^4 Zellen/ml im Fall von *Saccharomyces* spp. Auch wenn die untere Detektionsgrenze auf den ersten Blick als relativ hoch erscheint, so muss doch festgehalten werden, dass A) solch geringe Zellzahlen die Ausnahme in der Mostvergärung darstellen oder B) geringe Zellzahlen dieser Spezies auch durch Aufkonzentrierung der Probe erfasst werden können, wenn die Gesamtzellzahl der Hefepopulation dies erlaubt. So sind in der Literatur etwa auf Trauben Gesamtkeimzahlen zwischen 10^2 und 10^6 KBE/g beschrieben (Praktichaiwattana et al 2004). Eine so

mögliche zwanzigfache Konzentrierung dieser Probe würde mit der hier beschriebenen DNA-Isolierungsmethode durchführbar sein und könnte zu einer Detektion der in geringeren Dichten vorkommenden Arten wie *Saccharomyces* spp. und *Brettanomyces* spp. führen. So machte *Saccharomyces cerevisiae* etwa 0,1 % der Mikrobiota auf der Traube aus (Mortimer und Polsinoli 1999), wenngleich auch noch geringere Zellzahlen von dieser Spezies berichtet werden (Fleet 2003). Mit einer hier beschriebenen, gesicherten Sensitivität des qPCR-Systems von 1×10^4 Zellen/ml könnten durch eine zwanzigfache Aufkonzentrierung der Probe theoretisch 5×10^2 Zellen/ml *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden.

Ähnlich könnte auch verfahren werden, um Kontaminationen in bereits abgefüllten Weinen zu detektieren. In diesem Stadium können etwa *Saccharomyces cerevisiae* und *Brettanomyces bruxellensis* auftreten und weinverderbend wirken. Da generell hier von einer geringen Zellpopulation auszugehen ist (Millet und Lonvaud-Funel 2000), kann eine Aufkonzentrierung der Probe zur Erkennung und Quantifizierung dieser Spezies führen. So wiesen Andorra et al (2010) in verschiedenen Weinen *Saccharomyces cerevisiae* zwischen 10^2 und 5×10^4 Zellen/ml und *Brettanomyces bruxellensis* zwischen 20 und 2×10^4 Zellen/ml nach. Phister und Mills (2003) fanden *Brettanomyces bruxellensis* mit Zellzahlen zwischen 10^2 und 10^4 Zellen/ml in Weinen. Ein schnelles Erkennen von *Brettanomyces bruxellensis* während der Reifung von Wein kann insofern wichtig sein, als dass Coulon et al (2010) in ihrer Studie zeigten, dass *Brettanomyces bruxellensis* nach einer Lagerung des Weines von 130 Tagen von einer anfänglichen Zellzahl zwischen 10 und 100 Zellen/ml auf über 10^6 Zellen/ml angewachsen war, was mit einem drastischen Anstieg des „Pferdeschweiß“-Aromas korrelierte. Grundsätzlich wird eine signifikante Produktion dieser weinverderbenden phenolischen Verbindungen mit einer Zellzahl von mindestens 10^3 Zellen/ml in Verbindung gebracht (Chatoneet et al 1995).

Während der Vergärung des Mostes kommen Zelldichten vor, die zumeist eine Konzentrierung der Probe nur beschränkt möglich machen ohne an die obere Grenze der DNA-Isolierung zu stoßen. Hier wären demnach die tatsächlichen Nachweisgrenzen des qPCR-Systems zu beachten, wobei das weniger sensitive System für *Saccharomyces* spp. hier nicht mit Einschränkungen zu rechnen hat, da in diesem Stadium der Weinbereitung die Gattung *Saccharomyces* eine dominante Rolle spielt (Bisson und Joseph 2009).

Das hier vorgestellte qPCR-System kann demnach zeitnah Hefen der Gattungen *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* und *Brettanomyces* erfassen und quantifizieren. Mikrobielle Studien über die Verteilung dieser Gattungen während der Weinbereitung werden so möglich ohne den Einsatz von langwierigen Kultivierungen auf Selektivmedien oder ähnliches. Die durch qPCR erfolgte Quantifizierung unterliegt nur geringen Schwankungen und ist den üblichen Methoden wie

Lebendzellzahlbestimmung ähnlich. Zusätzlich ermöglicht diese schnelle und sensitive Detektion den Nachweis des Weinschädlings *Brettanomyces bruxellensis* und könnte somit als Qualitätsmonitoring in der Weinbereitung Verwendung finden.

4.3 Einsatz von Enzymen als Wachstumskontrolle von Wildhefen

Unerwünschte, da die Qualität des Weines herabsetzende Hefen werden traditionell durch eine Schwefelung von Most und Wein bekämpft. Dieses Mittel kann aber gegebenenfalls nicht ausreichend sein, da verschiedene Hefe-Arten und -Stämme sich zum Teil resistent gegenüber diesem mikrobiziden Agens zeigen (Dittrich und Großmann 2005). Während für die Kontrolle von weinverderbenden Milchsäurebakterien schon seit 2001 das Enzym Lysozym eingesetzt werden kann, wurde bisher noch kein entsprechendes Enzym für die Hemmung von Hefen diskutiert.

In dieser Arbeit sollte nach möglichen zellwand-hydrolysierenden Enzymen gesucht werden und diese gereinigt und protein-biochemisch charakterisiert werden. Ferner wurde die Wirkung des isolierten Enzyms auf die Zellwand von Wildhefen untersucht.

4.3.1 Zellwand-abbauende Enzyme

Viele Mikroorganismen können unter gegebenen Umständen lytische Enzyme produzieren und in ihre Umwelt abgeben. Aufgrund der Zellwandstruktur von Hefen kann es sich bei diesen lytischen Enzymen um β -Glucanasen (wie β -1,3- oder β -1,6-Glucanasen), Mannanasen, Chitinasen und oder Proteasen handeln (Salazar und Aseno 2007). Der wohl bekannteste zelllytische Enzym-Komplex stammt aus dem Bakterium *Cellulosimicrobium cellulans* (früher: *Oerskovia xanthineolytica* oder *Arthrobacter luteus*), der aus verschiedenen beteiligten Enzymen bestehen kann, in allen Fällen aber eine β -1,3-Glucanase enthält (Mann et al 1978, Ferrer et al 1996). Von diesem Bodenbakterium stammt auch das kommerziell erhältliche Präparat Lytikase, das etwa für den Zellaufschluss bei DNA-Isolierungen eingesetzt wird und das die erwähnte β -1,3-Glucanase sowie eine Protease enthält (Scott und Shekman 1980). Die Eigenschaft der Sekretion von polymer-abbauenden Enzymen, die gleichzeitig auch lytisch auf Hefezellen wirken, ist offensichtlich stark gekoppelt mit der besetzten ökologischen Nische und der hierdurch notwendigen Nutzbarmachung von Nährstoffen durch Hydrolyse von Polymeren. So zeigen viele Bodenbakterien oder an der Zersetzung von Pflanzenmaterial beteiligte Bakterien die Fähigkeit extrazelluläre hydrolytische Enzyme zu produzieren wie etwa Myxobakterien (Yamanaka et al 1993), *Micromonospora* (Monreal et al 1967, Gacto et al 2000), Streptomyceten (Shi et al 2010), Paenibazillen (Hong und Meng 2003) oder Bazillen (Rombouts und Phaff 1976, Takanaka und Watanabe 1995). Auch vermögen viele

Pilzspezies wie *Trichoderma harzianum* oder *T. virens* diese Enzyme zu bilden (Vazquez-Garciduenas et al 1998, Djonovic et al 2007).

Das hier untersuchte Bakterium ordnet sich in die Gattung *Delftia* ein und wurde im Rahmen einer Forschungsarbeit zur Mikroflora des Intestinaltrakts der Termiten *Zootermopsis angusticollis* angereichert. Da Bakterien und Pilze in diesem Darmtrakt in Kontakt mit pflanzlichen Polymeren wie Cellulose treten, ist die Ausschüttung von polymerabbauenden Enzymen verbreitet (Wenzel et al 2002). Der hier untersuchte Stamm *Delftia tsuruhatensis* MV01 zeigte ebenfalls das Potential hydrolytische Enzyme zu bilden, wie Proteasen und Chitinasen (Larisika 2010). Unter den hier gewählten Anzuchtbedingungen konnte zudem die Produktion von β -1,3-Glucanasen als auch α -Mannosidasen erzielt werden. Dieses Potential ist für diese Spezies bis dato nicht in der Literatur beschrieben, wenngleich Jorgensen et al (2009) den Abbau des die Bakterienzellwand ausmachenden Polymers Peptidoglykan durch die Spezies *Delftia tsuruhatensis* und *D. lacustris* publizierten. Han et al (2005) konnten zusätzlich die Wirkung von *Delftia tsuruhatensis* als Mittel für die Kontrolle von pflanzenpathogenen Pilzen wie *Alternaria*, *Botrytis* und *Fusarium* zeigen, wobei der Grund für die Wachstumshemmung nicht analysiert wurde.

Delftia tsuruhatensis MV01 bildete in Vollmedium keine der gemessenen extrazellulären Enzyme. Erst der Einsatz von Hefezellen oder Hefezellwand-Präparat als alleinige Kohlenstoffquelle führte zu einer Induktion der Enzymproduktion. Die induzierende Wirkung durch das Weglassen von leichter zugänglichen Kohlen- und Stickstoffquellen ist in der Literatur bekannt, genauso wie der Ersatz dieser durch Zellwände oder entsprechende Polymere (Brönecke und Fiedler 1994, Sachslehner et al 1998, Donzelli und Harmann 2001, Bara et al 2003). Im Vergleich der beiden Induktoren führte der Einsatz des Hefezellwandpräparats Hefacell® zu einer höheren Ausbeute an Glucanase-Aktivität, ein Umstand, der eventuell durch den Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen des eigentlichen Stimulus zu erklären ist. Andererseits konnten keine Unterschiede die Mannanase-Aktivität betreffend festgestellt werden. Ein Unterschied bezüglich der Stärke der durch diese Kulturüberstände erzeugten Zelllysen verschiedener Hefen war ebenfalls nicht vorhanden. Mann et al (1987) konnten ebenfalls eine höhere Glucanase-Aktivität bei *Oerskovia xanthineolytica* durch eine Induktion von Zellwänden anstelle von ganzen Hefezellen erreichen. Dies drückte sich allerdings auch in einer höheren lytischen Aktivität aus.

Die dünnschichtchromatographische Darstellung der durch die Wirkung des Kulturüberstandes entstandenen Hydrolyseprodukte zeigte eine Wirkung der β -Glucanase und Mannanase nicht nur auf die gereinigten Polymere Mannan und Laminarin, sondern auch auf die Zellwand von *Pichia fermentans*. Weiter konnte eine Zelllyse verschiedener Hefe-Spezies durch den lytischen

Kulturüberstand dokumentiert werden, was insofern wichtig ist, als dass β -1,3-Glucanasen nicht *per se* zellytisch wirken müssen (Ferrer et al 1996).

Bei dem im Kulturüberstand befindlichen Mannan-hydrolysierenden Enzym könnte es sich um eine Mannosidase handeln, da dünnschichtchromatographisch nur die Freisetzung von Mannose-Monomeren erkannt wurden. Mannose war auch das einzige entstehende Produkte bei der Hydrolyse durch die von Bagiyani et al (1997) beschriebene α -Mannosidase von *Oerskovia* sp. Generell sind in der Literatur nur Mannanasen bekannt, die exomannanolytisch auf α -Mannan wirken und etwa α -1,2-, α -1,3- und α -1,6-Bindungen hydrolysieren (z.B. McLellan et al 1970, Malek und Berry 1995, Athanasopoulos et al 2005). Trotz der vermeintlich beschränkten Wirkung dieser Enzyme auf die äußere Mannanschicht der Zellwand von Hefen, wird diesen Enzymen dennoch eine fördernde Wirkung für eine Zellyse zugeschrieben. So zeigten McLennan et al 1970, dass durch die Aktivität der von ihnen isolierten Mannase aus *Bacillus circulans* die β -Glucanschicht der Zellwand zugänglicher wird für dort angreifende Enzyme. Allgemein gilt diese äußere Mannoproteinschicht als der Faktor für die Durchlässigkeit der Zellwand und somit auch für die Durchlässigkeit von Glucanasen (DeNobel et al 1990b). In dieser Arbeit konnten die im Kulturüberstand von *Delftia tsuruhatensis* MVO1 befindliche β -Glucanase und Mannosidase durch Säulenchromatographie getrennt und so die lytische Wirkung der einzelnen Enzyme untersucht werden. Dabei wurde festgestellt, dass die genannte Mannosidase keinen Einfluss auf die Lyse intakter Hefezellen hat, wenngleich sie bei Inkubation mit präparierten Zellwänden Mannose freisetzte. Ferner konnte auch keine synergistische Wirkung bei Inkubation beider Enzyme mit Zellen gemessen werden, sodass nicht von einer die β -Glucanase unterstützenden Wirkung gesprochen werden kann.

Somit war die bei dieser Kultivierung produzierte β -1,3-Glucanase das einzige Enzym, das eine Zellyse bei Hefen auslöste, weshalb dieses gereinigt und näher untersucht wurde.

4.3.2 Charakterisierung der β -1,3-Glucanase

Die Reinigung der β -1,3-Glucanase erfolgte nach Cross-Flow-Anreicherung mittels Anionenaustauscher- und anschließender Gelpermeationschromatographie. Diese konnte nur erfolgreich durchgeführt werden, indem aktive Fraktionen nach der Anionenaustauscherchromatographie getrennt behandelt und getrennt in den nächsten Reinigungsschritt eingesetzt wurden, anstatt alle aktiven Fraktionen zu vereinigen und mittels Gelpermeationschromatographie aufzutrennen. Dieser Umstand führte natürlich zu einem Enzymverlust, der sich im aufgeführten Reinigungsprotokoll widerspiegelt. Es konnte aber so eine reine Proteinfraktion erreicht werden, die nach gelelektrophoretischer Auftrennung und sensitiver Silberfärbung keine weiteren Proteine enthielt. Mit Hilfe der Zymogramm-Technik konnte der Proteinfraktion eine Glucanase-Wirkung

korrespondierend zu der Proteinmasse nachgewiesen werden, was die „Laminarinase“-Wirkung des Proteins belegte. Schließlich konnte die ermittelte N-terminale Sequenz des isolierten Enzyms und die so mögliche Einordnung in die Enzymfamilie 16 der Glykosid-Hydrolasen die Identität des Enzyms endgültig bestätigen. Eine Eingrenzung innerhalb dieser Enzymfamilie konnte erbracht werden, indem gezeigt wurde, dass das gereinigte Enzym spezifisch β -1,3-glykosidische Bindungen hydrolysiert und diese Hydrolyse endoglykosidisch geschieht. Mit diesen Charakteristika ist das hier isolierte Protein in die Enzymgruppe mit dem systematischen Namen „3- β -D-Glucan Glucanohydrolase“ mit der EC-Nummer 3.2.1.39 einzuordnen, die definiert ist mit der spezifischen Fähigkeit Laminarin und Pachyman zu hydrolysieren (BRENDA-Enzyme Database, www.brenda-enzymes.org).

Die Endo- β -1,3-Glucanase von *Delftia tsuruhatensis* MV01 wirkte mit einer spezifischen Aktivität von 10 Units/mg Enzym und Laminarin als Substrat. Diese Aktivität ist höher als beispielsweise die Aktivität einer Endo- β -1,3-Glucanase von *Bacillus circulans* (4,1 U/mg; Rombouts und Phaff 1976), von *Bacillus clausii* (6,2 U/mg; Miyanishi et al 2003) oder von *Flavobacterium dormitator* (2,4 U/mg, Nagata et al 1990). Trotzdem sind viele Endo- β -1,3-Glucanasen charakterisiert, die höhere spezifische Aktivitäten erzielen. So zeigt etwa die Glucanase von *Cellulosimicrobium cellulans* eine Aktivität von 49,1 U/mg (Salazar et al 2006), die von *Pyrococcus furiosus* eine Aktivität von 127 U/ml (Ilari et al 2009) und eine aus einem *Paenibacillus*-Stamm isolierte Endo- β -1,3-Glucanasen erreichte sogar 286 U/ml (Hong und Meng 2003).

Die Masse der hier isolierten Endo- β -1,3-Glucanase wurde elektrophoretisch bestimmt und betrug ca. 28 kDa. Der isoelektrische Punkt des Proteins wurde mit 4,3 berechnet, wodurch die Reinigungsstrategie mittels Anionenaustauscherchromatographie bestätigt wurde. Die β -1,3-Glucanasen, deren N-Terminus mit dem der Endo- β -1,3-Glucanase von *Delftia tsuruhatensis* MV01 verglichen wurden, zeigten zumeist ein berechnete Masse (ausgehend von dem anzunehmenden N-Terminus nach Sekretion aus der Zelle) größer als 40 kDa (etwa *Cellulosimicrobium cellulans* [Salazar und Asenjo 2007], *Arthrobacter aureescens* [Monogodin et al 2006], *Acidobacterium* sp., *Pedobacter saltans*). Die Glucanasen von *Nocardiopsis dassonvillei* (Sun et al 2010), *Sphingomonas* sp., und *Robiginitalea biformata* (Oh et al 2009) hatten ähnliche Massen und im Falle von *N. dassonvillei* und *R. biformata* konnten auch ähnliche isoelektrische Punkte berechnet werden (4,6 und 4,7). Hierbei muss allerdings bedacht werden, dass die aufgrund von Aminosäuresequenzen berechneten isoelektrische Punkte natürlich von den tatsächlichen abweichen können. Weitere Vergleiche mit diesen Glucanasen können aber leider nicht gezogen werden, da diese nur aufgrund von Genomsequenzierungen in Datenbanken hinterlegt sind, aber keiner biochemischen Charakterisierung unterzogen wurden.

Die hier vorgestellte Endo- β -1,3-Glucanase besaß ein pH-Optimum bei 37 °C von pH 4,0. Zudem war das Enzym über den gesamten gemessenen pH-Bereich aktiv, auch wenn bei pH 3,0 und pH 8,0 die geringsten Aktivitäten erzielt wurden (32 bzw. 44 % relative Aktivität). Dieser relativ niedrige, optimale pH-Wert ist in der Literatur eher selten beschrieben, wengleich Galan et al (1999) eine Endo- β -1,3-Glucanase des Basidiomyceten *Agaricus bisporus* beschreiben, die ein ähnliches Optimum besitzt. Auch die von El-Katatny et al (2001) isolierte Glucanase aus *Trichoderma harzianum* hat ein Optimum bei pH 4,5. Ein pH-Optimum von pH 5,0 bzw. 5,5 wurden bei den Glucanasen von *Rhizotonia solani* (Vijayendra und Kashiwagi, 2009) bzw. *Streptomyces sioyaensis* (Hong et al 2002) gezeigt. Die kommerziell für die Lyse von Hefezellen eingesetzten Glucanasen haben dagegen meist ein höheres pH-Optimum wie etwa die Enzyme von *Cellulosimicrobium cellulans* (Optimum zwischen pH 7,5 und 8,0) oder *Rhizoctonia* sp. (Optimum zwischen 6 und 7) (Salazar und Asenjo 2007).

Das gemessene Temperaturoptimum lag bei einer Inkubationsdauer von 15 min bei 50 °C. Die relativen Aktivitäten bei Temperaturen unter 25 °C waren innerhalb dieser Inkubationsdauer gering. Generell ist eine solche Aktivitätsreduktion zu erwarten, wenn die untersuchten Temperaturen zwischen 25 und 35 °C unterhalb des Optimums der Glucanase liegen. Allerdings sind auch Glucanasen von Spezies der Gattungen *Flavobacter* und *Pedobacter* bekannt, die zwar ein Temperaturoptimum von 30 °C besitzen, aber selbst bei 5 °C noch 50 % aktiv sind (Rasmussen et al 2008).

Es konnte hier allerdings auch gezeigt werden, dass mit der Erhöhung der Inkubationszeit auch das Maß des Polymerabbaus erhöht wurde, wodurch eine Inaktivierung des Enzyms bei diesen Temperaturen ausgeschlossen werden konnte. Zudem zeigte sich die Glucanase bei 20 °C stabil über einen Zeitraum von fünf Stunden und auch nach 24 bzw. 48 Stunden konnte nur ein geringfügiger Aktivitätsverlust von ca. 25 % gemessen werden. Im Gegensatz dazu führte bei 50 °C bereits eine einstündige Einwirkung dieser Temperatur zu einem Aktivitätsverlust von über 65 %. Auch El-Katatny et al (2001) beschreiben eine vergleichbare Instabilität ihrer untersuchten Glucanase bei 50 °C, nämlich eine Halbwertszeit von 38 min bei dieser Temperatur. Bei der säuretoleranten Glucanase von *Rhizoctonia solani* konnte eine noch stärkere Empfindlichkeit bei höheren Temperaturen festgestellt werden: Das Enzym war bei 60 °C sofort inaktiv (Vijayendra und Kashiwagi, 2009).

4.3.3 β -1,3-Glucanase: Einsatz in der Weinbereitung?

Das Problem der Enzym-Instabilität bei hohen Temperaturen stellt sich in der Weinbereitung nicht, da üblicherweise Mostvergärungen zwischen 15 und 25 °C durchgeführt werden. Auch noch tiefere

Temperaturen – unterhalb von 15 °C – können Praxis sein (Dittrich und Großmann 2005). Wie bereits erwähnt, zeigte die Endo- β -1,3-Glucanase bei diesen Temperaturen eine Verlangsamung ihrer Abbau-Rate. Dieser Umstand ist aber insofern unproblematisch, da bei einem möglichen önologischen Einsatz mit langen Einwirkzeiten des Enzyms zu rechnen ist.

Schwieriger erscheint dagegen die Betrachtung der Enzymwirkung bei niedrigen pH-Werten. In Most und Wein ist mit einem pH-Wert unter 4,0 und somit auch unterhalb des pH-Optimums der Endo- β -1,3-Glucanase zu rechnen (Waite und Daeschel 2007). Eine pH-Wert von etwa 3,0 würde somit zu einer Reduktion der Enzymaktivität um 68 % führen. Trotzdem scheint die Glucanase mit ihrem pH-Optimum von 4,0 gerade für den Einsatz in säurearmen Weinen geeignet.

Weitere in Most und Wein vorherrschende Parameter können Enzymaktivitäten stören und minimieren. So könnte etwa die durch die Gärung steigende Ethanolkonzentration und die denaturierende Eigenschaft dieses Agens schlechtere Enzymwirkungen hervorrufen. Ein solcher Effekt konnte bei der hier vorgestellten Glucanase jedoch nicht beobachtet werden, ein Umstand der für eine generelle hohe Stabilität von extrazellulären Enzymen spricht. So konnten auch Inouye et al (2007) an einer extrazellulären Protease aus *Streptomyces caespitosus* die gute Stabilität bei steigenden Ethanolkonzentrationen zeigen. Esti et al (2011) untersuchten dagegen den Einsatz von Bromelain – ein proteolytischer Extrakt aus Ananas – in der Weinbereitung und nannten Ethanol als einen kompetitiven Inhibitor für die Protease-Aktivität.

Die stärkste Inhibierung der Enzymaktivität konnten diese Autoren allerdings bei Zugabe von bis zu 25 mg/l Schwefeldioxid beobachten und vermuteten eine Inaktivierung ihres Enzympräparats durch die von SO₂ verursachte Lösung von Disulfidbrücken im Enzym. Vergleichbares konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Zwar sank auch hier die Enzymaktivität, allerdings in einem sehr viel geringeren Maße. Auch konnte keine steigende Inaktivierung mit steigender Kaliumdisulfit-Konzentration festgestellt werden. Tatsächlich war die Aktivität der Glucanase bei 100 mg/l Sulfit höher als bei 50 mg/l – ein Umstand, der nicht erklärt werden kann.

Neben diesen genannten Agenzien ist bekannt, dass auch Traubenhinhaltsstoffe Enzymaktivitäten herabsetzen können. Gerade am Beispiel von Lysozym konnten Rawel et al (2001) als auch Rohn et al (2002) zeigen, dass dieses Enzym mit Phenolen unter Bildung kovalenter Bindungen als auch unter Bildung nicht-kovalenter Wechselwirkungen reagiert und dadurch inaktiviert werden kann. Auch andere Enzyme wie α -Amylasen und Trypsin waren betroffen. Die hier beispielhaft eingesetzten Phenole Ferulasäure, Gallussäure und Catechin können als stellvertretend für die große Anzahl verschiedener phenolischer Verbindungen in der Traube gelten, da diese in den meisten Fällen in Trauben, Most und Wein vorhanden sind (Dietrich und Pour-Nikfardam 2009). Eine Zugabe dieser Substanzen von sogar 40 mg/l brachten keine Veränderungen in der Aktivität

der hier vorgestellten Endo- β -1,3-Glucanase. Das Enzym scheint keinen negativen Einfluss durch diese Substanzen zu erfahren. Gleiche Ergebnisse erzielten auch Esti et al (2011) mit dem Protease-Extrakt aus Ananas.

Die Wirkung der Endo- β -1,3-Glucanase von *Delftia tsuruhatensis* MV01 gegenüber Hefezellen wurde auf verschiedene Arten untersucht. Zunächst konnte mit Hilfe des DNS-Tests die Freisetzung von reduzierenden Zuckern nach Inkubation des Enzyms mit Zellwänden verschiedener Hefen dargestellt werden. Im Vergleich zu der Enzymaktivität gegenüber dem β -1,3(1,6)-Glucan Laminarin waren die Enzymaktivitäten gegenüber den Hefezellwänden geringer. Dies ist insofern nicht erstaunlich, als dass A) der Anteil von β -1,3-Glucan in der Zellwand geringer ist als im Polymer Laminarin und B) das β -1,3-Glucan in der Zellwand – aufgrund der strukturellen Komplexität der Zellwand insgesamt – schwerer zugänglich ist. Sowohl die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von mit Calcofluor-White gefärbten Zellen also auch die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten Unterbrechungen in der Zellwandstruktur der verschiedenen Hefen. Die Zellwand schien hierbei nicht völlig aufgelöst zu sein, sondern partiell abgebaut. Ähnliche Aufnahmen konnten auch bei der enzymatischen Zellyse von *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* gemacht werden (Osumi 1998, Kiseleva et al 2007). Auch die Behandlung von sensitiven Hefezellen mit der aus *Tetrapisispora phaffii* stammenden β -1,3-Glucanase zeigte im Rasterelektronenmikroskop Zellen mit einer rauhen Oberfläche und einer unregelmäßigen Form (Comitini et al 2009).

Für eine quantitative Analyse der Zellyse wurden Messungen der optischen Dichte bei 578 nm durchgeführt. Wie schon anhand der mikroskopischen Aufnahmen der angegriffen Zellen vermutbar, führte die Hydrolyse der Zellwand durch die β -1,3-Glucanase nicht ohne weiteres zu einer Abnahme der optischen Dichte. Auch Mann et al (1978) und Bauer (2002) beschreiben diesen Umstand. Der Einsatz des Agens TritonX-100 führte zu einer vollständigen, photometrisch messbaren Zellyse von durch die Glucanase angegriffenen Zellen. Hierbei konnte gewährleistet werden, dass bei nur bereits durch die Glucanase beschädigte Zellen eine Zellyse durch TritonX-100 ausgelöst wurde. Die Wirkung der Endo- β -1,3-Glucanase auf die verschiedenen Hefe-Spezies war zum Teil variabel. Während einige Arten stark lysiert wurden (etwa *Metschnikowia pulcherrima* Stamm 152 und *Schizosaccharomyces pombe* Stamm 82), hatte die Glucanase auf andere Zellen wie *Pichia membranifaciens* (Stamm 190.1) oder *Zygosaccharomyces rouxii* (Stamm 68) einen nur geringeren Effekt. Auch wenn die Daten der Zellyse nicht genau mit den ermittelten Aktivitäten gegen die Zellwand dieser Hefen übereinstimmen, könnten dennoch Unterschiede in der Zellwandkomposition die verschiedenen Empfindlichkeiten der Hefe-Stämme erklären. So zeigten Nguyen et al (1998), dass der Anteil der Zellwand am Trockengewicht der Zellen sowie das

Verhältnis zwischen Polysaccharid- und Proteinanteil zwar bei verschiedenen Arten sehr ähnlich ist, dass aber der Anteil an den durch chemische Verfahren isolierten Fraktionen (alkalilöslich, alkaliunlöslich) verschieden sein kann. Auch der Chitinanteil war etwa bei Stämmen von *Debaryomyces hansenii* hoch (7,74 % der Zellwand) im Vergleich zu Stämmen von *Hanseniaspora uvarum* (0,18 bis 0,47 % der Zellwand). All dies impliziert Variationen in der Gesamtarchitektur der Zellwand verschiedener Spezies und Stämme. Auch Pribylova et al (2007) stellten eine stammabhängige Sensitivität gegenüber β -1,3-Glucanasen bei *Zygosaccharomyces rouxii* fest, was verdeutlicht, dass eine Glucanase nicht allgemein wirksam sein kann gegen eine Hefe-Art oder allgemein Hefen.

Die enzymatische Zellyse wird verkompliziert durch den dynamischen Aufbau der Hefe-Zellwand unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. So ist die Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* bei unterschiedlichen Anzuchten und Substratverfügbarkeiten verschieden (McMurrough und Rose 1967) und auch die Wachstumsphase kann entscheidend sein für eine Sensitivität gegenüber β -1,3-Glucanasen (Shimoi et al 1998). In dieser Arbeit wurde daher der Vergleich der β -1,3-Glucanase-Aktivität gegenüber Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen und gegenüber Zellen aus unterschiedlichen Anzuchten, nämlich Vollmedium und Traubensaft, gezogen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Wirksamkeit des Enzyms sich bei Zellen verringerte, die über 72 Stunden kultiviert wurden und somit am Beginn der stationären Phase waren. Dies ist übereinstimmend mit bisherigen Untersuchungen. Danach soll in der stationären Phase die Zellwand nicht nur dicker, sondern auch weniger permeabel für Makromoleküle sein (Klis et al 2002). Die Wirkung des Enzyms gegenüber in Vollmedium bzw. Traubensaft angezogenen Zellen war nicht einheitlich. Im Fall von *Saccharomyces ludwigii* waren die Zellen aus der Traubensaftkultivierung sensitiver, im Fall von *Metschnikowia pulcherrima* und *Hanseniaspora uvarum* zeigten diese sich hier resistenter. De Nobel et al (1990a) beschreiben eine höhere β -1,3-Glucanase-Resistenz von Zellen, die in Minimalmedium angezogen wurden im Vergleich zu Vollmedium-Kultivierungen und ermittelten eine geringe Zellwand-Porosität bei Zellen aus Minimalmedium. Auch scheint hier die Menge an β -1,6-Glucan und Chitin zuzunehmen (Aguilar-Uscanga und Francois 2003). In dieser Publikation konnte auch gezeigt werden, dass Zellen eine größere Resistenz gegenüber β -1,3-Glucanase besaßen, wenn sie zuvor bei einem pH-Wert von 3,5 anstelle von 5,5 kultiviert wurden. Zusätzlich beobachteten Morris et al (1986) eine steigende Resistenz gegenüber enzymatischem Zellwandverdau bei Zellen aus hypertonen Lösungen im Vergleich zu hypotonischen Lösungen. Betrachtet man nun Traubensaft als ein hypertones Minimalmedium mit einem geringen pH-Wert von etwa 3,5, so scheint die Sensitivität gegenüber β -

1,3-Glucanasen bei Hefezellen weniger stark ausgeprägt zu sein. Dies konnte zumindest im Fall von *Metschnikowia pulcherrima* und *Hanseniaspora uvarum* auch in dieser Arbeit dargestellt werden.

Auch wenn die absoluten Aktivitäten der Endo- β -1,3-Glucanase von *Delftia tsuruhatensis* MV01 bezüglich verschiedenen Hefen-Arten und -Stämmen und Zellwandausprägungen schwanken, so konnte doch gezeigt werden, dass alle hier untersuchten 21 Hefestämme sensitiv gegenüber dem Enzym sind, mit Ausnahme eines Stammes von *Torulasporea delbrueckii*.

Gerade in Hinblick auf den zunehmenden Trend weniger Schwefeldioxid in der Weinbereitung einzusetzen und der Resistenz einiger weinverderbenden Hefen gegenüber diesem Konservierungsmittel, könnte eine enzymatische Wachstumskontrolle auf dem zukünftigen Weintechnologie-Markt eine Rolle spielen.

So stellten Comitini et al (2004) bereits ein Killertoxin aus *Tetrapisipora phaffii* vor, das β -1,3-glycanolytisch wirkt, spezifisch die Zellwand von Hefen angreift und in der Weinbereitung angewendet werden soll. Problematisch ist bei Killertoxinen allgemein, dass diese zwar sehr aktiv gegen Killer-sensitive Stämme wirken, diese Wirkung aber tatsächlich nur auf diese Stämme beschränkt ist. Bei diesem Killertoxin wären dies Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* (Comitini et al 2009) und *Hanseniaspora uvarum* (Comitini et al 2010), wobei betont werden muss, dass eine Aktivität tatsächlich nur gegen sensitive Stämme dieser Arten gerichtet ist.

In der Weinbereitung sind bereits Enzympräparate zugelassen, die unter anderem auch β -1,3-glycanolytische Aktivitäten enthalten. Diese Enzymmischungen bestehen hauptsächlich aus Pektinasen (Pektinesterase, Polygalakturonase und Pektinlyase) für eine verbesserte Extraktion der Traubenhaltstoffe, können aber auch Glucanasen enthalten, um bei Botrytis-infiziertem Lesegut und der dadurch ansteigenden Viskosität der Maische eine verbesserte Filtration zu ermöglichen. Der Einsatz von kommerziellen Enzym-Präparaten für eine Wachstumskontrolle von weinverderbenden Wildhefen konnte bereits gezeigt werden (Enrique et al 2010). Das dort verwendete Präparat brachte eine erfolgreiche Inhibierung von Hefen wie *Zygosaccharomyces bailii* und *Brettanomyces bruxellensis*. Allerdings musste das Präparat mit der zwanzigfachen Menge als vom Hersteller empfohlen eingesetzt werden, was zu einem Proteineintrag von bis zu einem Gramm pro Liter in Most und Wein führen würde. Dieser Eintrag zum einen und die nicht vorhersehbaren Aktivitäten der noch im Präparat enthaltenen Enzyme, können den Einsatz solcher Präparate problematisch werden lassen.

Die hier eingesetzten Mengen der Endo- β -1,3-Glucanase waren in vorgestellten Tests so gering (etwa 70 μ g/ml), dass selbst eine Konzentrierung – und damit einhergehend verbesserte Lysewirkung – nur zu einer geringen Proteinbelastung in Most und Wein führen würde. Für eine weitere Steigerung der Lyseaktivität wäre die Kombination mit anderen spezifisch zelllytisch

wirkenden Enzymen denkbar, da die meisten kommerziellen Präparate für Zellysen von Hefen ebenfalls aus mehreren, synergistisch wirkenden Enzymen bestehen (Salazar und Asenjo 2007).

Neben der Wirkung gegen potentiell weinschädliche Hefen, konnte auch eine Wirkung der β -1,3-Glucanase gegen *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden. Es ist allerdings nicht anzunehmen, dass diese Hefe, die während der alkoholischen Gärung eine so dominante Rolle mit schnellen Generationszeiten einnimmt, im Zeitraum der akuten Gärung von dem Enzym gehemmt werden könnte. Allerdings könnte das Enzym für eine schnellere und gesteigerte Autolyse von *Saccharomyces cerevisiae* nach der alkoholischen Gärung eingesetzt werden. Diese Autolyse ist etwa bei der Sektherstellung oder traditionellen Reifung des Weines auf der sich absetzenden Hefe („sur lies“) erwünscht, da hiervon das Weinaroma profitieren soll (Martinez-Rodriguez et al 2001, Guilloux-Benatier und Chassagne 2003). Zudem werden der so ebenfalls freigesetzten Mannoproteinschicht der Hefezellwand erwünschte önologische Eigenschaften zu geschrieben, wie die Adsorption von Toxinen wie Ochratoxin A, die Verhinderung von Tarat-Kristallisation oder die Vorbeugung von Trub (Dupin et al 2000, Caridi 2006).

Das hier charakterisierte Enzym könnte also bei verschiedenen Fragestellungen und in verschiedenen Phasen der Weinbereitung eingesetzt werden.

5 AUSBLICK

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Fingerprinting-Methode SAPD-PCR geeignet ist, um nah verwandte, schwer zu differenzierende Hefe-Stämme zu identifizieren. Die Untersuchung ausgewählter *Saccharomyces*-Stämme aus der institutseigenen Stammsammlung offenbarte in einigen Fällen falsche Klassifizierungen, weshalb sich weitere Analysen von noch nicht per SAPD-PCR charakterisierten Stämmen in dieser Stammsammlung lohnen könnte, nicht zuletzt weil diese Arbeit gezeigt hat, dass interessante und bis dato noch nicht beachtete Eigenschaften mit anderen, nicht-*cerevisiae* Spezies verbunden sein können. Auch könnten mit dieser Methode bisher nicht erkannte Hybride detektiert werden, wie dies hier im Fall der Isolate des Weinguts Heymann-Löwenstein geschah. Das Potential dieser Hybride – auch im Hinblick auf einen eventuellen Einsatz als Starterkultur – wurde hier nur am Rande untersucht. Gerade Charakteristika wie Cryophilie, Zuckerverwertung und die Bildung sekundärer Fermentationsprodukte scheinen interessant. Für eine Identifizierung von Spezies der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe direkt aus Most und Wein, bleibt die SAPD-PCR insofern aufwendig, als dass sie auf der Verwendung von Reinkulturen basiert. Die Entwicklung eines Multiplex-PCR-System auf Grundlage von speziesspezifischen SAPD-Banden könnte zu einer direkten und schnellen Identifizierung führen. Auch wären so unter Umständen eine Detektion von Hybriden möglich, wenngleich nur mit Reinkulturen.

Neben einem Multiplex-PCR-System könnten auch auf SAPD-PCR basierende speziesspezifische Primer konstruiert werden, die in einer quantitativen PCR eingesetzt werden. Die hier vorgestellten qPCR-Primer können bisher nur die Gattung *Saccharomyces* erkennen und quantifizieren. Gerade die zeitnahe Titer-Bestimmung durch qPCR erlaubt dem Winzer ein sicheres und schnelles Monitoring seiner Gärung. In dieser Arbeit konnte mit dieser Methode auch der Weinschädling *Brettanomyces bruxellensis* quantifiziert werden. Die Konstruktion weiterer Primer, die spezifisch Schadhefen wie etwa *Zygosaccharomyces* spp. u. a. erkennen, ist wünschenswert.

Durch die frühe und schnelle Detektion von Schadhefen kann mit geeigneten Mitteln eine Ausbreitung dieser bekämpft werden. Die hier isolierte und charakterisierte β -1,3-Glucanase konnte aufgrund geringer Enzymausbeuten nur eingeschränkt unter praxisnahen Gesichtspunkten getestet werden. Ein tatsächlicher Einsatz in kontaminierten Wein könnte die Wirkung des Enzyms besser beschreiben. So könnte die Dossage der β -1,3-Glucanase erhöht werden oder ihre Wirkung in Kombination mit anderen lytischen Enzymen wie Proteasen oder Chitinasen getestet werden, um eine optimale Wachstumshemmung von Schadhefen gewährleisten zu können. Auch ein Einsatz des Enzyms zur Förderung der Autolyse von *Saccharomyces cerevisiae* nach der Gärung, um aroma-steigernde Komponenten aus der Zelle zu lösen, wäre denkbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ein Teil dieser Arbeit umfasste die Identifizierung der nahverwandten Mitglieder der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe. Durch den Einsatz des DNA-Fingerpinting-Systems SAPD-PCR konnten alle die Gruppe umfassenden Spezies anhand spezifischer Bandenmuster nachgewiesen werden, wodurch eine Einordnung dieser schwer zu differenzierenden Arten möglich war. Die Differenzierung zwischen den einzelnen Spezies war in jedem Fall deutlicher als dies die Sequenzierung der 5.8S rDNA und ihre flankierenden ITS-Regionen vermochte. Die SAPD-PCR zeichnete sich zudem durch eine geringe Muster-Varianz bei verschiedenen Stämmen einer Art aus und konnte zuverlässig unbekannte Stämme bestimmen und bereits hinterlegte Stämme neu klassifizieren. Zudem konnte mit Hilfe dieses Systems Hybride aus *Saccharomyces cerevisiae* und *S. bayanus* bzw. *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* detektiert werden, wenn diese Hybride aus relativ gleichen genomischen Anteilen der Eltern bestanden. Die untersuchten Hybrid-Isolate aus dem Weingut Heymann-Löwenstein *Saccharomyces cerevisiae* x *kudriavzevii* zeigten hingegen ein eher *Saccharomyces cerevisiae*-typisches Bandenmuster und konnte nicht sofort als Hybride durch die SAPD-PCR erkannt werden. Die SAPD-PCR konnte aber hier genutzt werden, um die Herkunft des größten Anteils des Hybrid-Genoms zu bestimmen.

Zusätzlich wurde ein quantitatives PCR-System entwickelt, um die Gattungen *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* und *Brettanomyces* in Most und Wein detektieren und quantifizieren zu können. Die hierfür entwickelten Primer zeigten sich spezifisch für die untersuchten Arten, sodass eine falsche Quantifizierung durch unspezifische PCR-Amplifikate anderer Hefe-DNA ausgeschlossen werden konnte. Schmelzpunkt-Analysen zeigten ebenfalls die Spezifität der Primer. Durch die serielle Verdünnung definierter DNA-Mengen konnte für alle drei Systeme eine Kalibrierungskurve erstellt werden, mit Hilfe derer die tatsächlichen Quantifizierungen durchgeführt werden können. Der Vergleich zwischen koloniebildenden Einheiten und den durch qPCR erhaltenen Zellzahlen stellte eine ähnliche oder höhere Sensitivität des PCR-Systems heraus. Durch die Analyse von definierten Mischkulturen aller drei Spezies konnte zudem eine Interferenz der Primer mit anderer DNA ausgeschlossen werden. Auch konnte so gezeigt werden, dass das qPCR-System auch bei Zellen aus Traubensaft funktioniert und nicht beeinträchtigt wird durch eventuelle Inhibitoren. Die Analyse der Zellzahlen zeigte allerdings, dass bei einer zu großen Zelldichte die DNA-Isolierung weniger effizient ist und dadurch im qPCR-System geringere Zellzahlen als tatsächlich vorkommende gemessen werden. Tests hierzu zeigten, dass die maximale Zellzahl nicht 2×10^7 Zellen/ml übersteigen darf. Die minimale Detektionsgrenze lag je nach Art zwischen 1×10^2 Zellen/ml und 1×10^3 Zellen/ml, wobei die geringsten Zellzahlen zwar noch eine Detektion, aber zumeist keine verlässlich

quantitativen Aussagen ermöglichten. Zudem konnte eine effektive DNA-Isolierung dieser geringen Zellzahlen nur erreicht werden, wenn die Zellzahl durch artfremde Hefen künstlich erhöht wurde. Die Analyse einer Most-Vergärung mit den drei Spezies zeigte schlussendlich, dass die quantitative PCR sicher und schnell Veränderungen und Sukzessionen detektiert und so ein geeignetes Mittel darstellt, um Populationsdynamiken während der Weinherstellung zu beobachten.

Der letzte Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Inhibierung von Schadhefen durch zellwandhydrolysierende Enzyme. Es konnte hierbei eine endoglykosidisch wirkende β -1,3-Glucanase aus dem Bakterium *Delftia tsuruhatensis* isoliert werden. Diese besaß eine ungefähre Masse von 28 kDa, einen isoelektrischen Punkt von ca. 4,3 und wirkte mit einer spezifischen Aktivität von 10 U/mg Protein gegen das Glucan Laminarin. Zudem zeigte das Enzym ein Temperaturoptimum von 50 °C und ein pH-Optimum bei pH 4,0. Die optimale Wirkung im sauren Milieu ist bei einem Einsatz in der Weinbereitung sinnvoll, wenngleich auch gezeigt werden konnte, dass eine weitere Erniedrigung des pH-Wertes eine schnelle Inaktivierung des Enzyms zur Folge hatte. Bei weinrelevanten Temperaturen arbeitete das Enzym zwar verlangsamt, konnte aber durch Erhöhung der Inkubationszeit ebenfalls effektiv wirken. Zudem zeichnete es sich durch eine hohe Thermostabilität bei 20 °C aus. Weinparameter wie erhöhte Konzentrationen an Ethanol, Phenolen und Sulfit beeinflussten die Wirkung des Enzyms nicht oder nur wenig. Neben der allgemeinen Wirkung gegen β -1,3-Glucane konnte hier auch gezeigt werden, dass ebenso gut die β -1,3-Glucane in der Zellwand verschiedenen Hefe hydrolysiert wurden. Fluoreszenzmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Hefezellen nach Inkubation mit der β -1,3-Glucanase zeigten zusätzlich die Zerstörung der Zelloberfläche der Hefen. Die lytische Wirkung des Enzyms wurde per Lochplattentests und photometrisch an verschiedenen weintypischen Hefen getestet. Hierbei zeigten sich stammspezifische Unterschiede in der Sensitivität gegenüber dem Enzym. Außerdem konnte festgestellt werden, dass sowohl Wachstumsphase als auch Medium der Hefen Einfluss auf deren Zellwand hat und somit auch auf die Wirkung des Enzyms.

7 LITERATUR

- Aguilar-Uscanga B, François JM (2003) **A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation.** Lett Appl Microbiol. 37:268-274.
- Andorrà I, Landi S, Mas A, Guillamón JM, Esteve-Zarzoso B (2008) **Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques.** Food Microbiol. 25:849-856.
- Andorrà I, Esteve-Zarzoso B, Guillamón JM, Mas A (2010) **Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR.** Int J Food Microbiol. 144:257-262.
- Antunovics Z, Irinyi L, Sipiczki M (2005) **Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must.** J Appl Microbiol. 98:971-979.
- Arroyo-López FN, Salvadó Z, Tronchoni J, Guillamón JM, Barrio E, Querol A (2010) **Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments.** Yeast. 27:1005-1015.
- Athanasopoulos VI, Niranjan K, Rastall RA (2005) **The production, purification and characterisation of two novel alpha-D-mannosidases from *Aspergillus phoenicis*.** Carbohydr Res. 340:609-617.
- Awdeh ZL, Williamson AR, Askonas BA (1968) **Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins.** Nature. 219:66-67.
- Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG (2011) **Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa.** J Microbiol Methods. 86:351-356.
- Bachar A, Al-Ashhab A, Soares MI, Sklarz MY, Angel R, Ungar ED, Gillor O (2010) **Soil microbial abundance and diversity along a low precipitation gradient.** Microb Ecol. 60:453-461.
- Bagiyan FG, Eneyskaya EV, Kulminskaya AA, Savel'ev AN, Shabalin KA, Neustroev KN (1997) **The action of alpha-mannosidase from *Oerskovia* sp. on the mannose-rich O-linked sugar chains of glycoproteins.** Eur J Biochem. 249:286-292.
- Bara MT, Lima AL, Ulhoa CJ (2003) **Purification and characterization of an exo-beta-1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*.** FEMS Microbiol Lett. 219:81-85.
- Barata A, González S, Malfeito-Ferreira M, Querol A, Loureiro V (2008a) **Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts.** FEMS Yeast Res. 8:1008-1017.
- Barata A, Seborro F, Belloch C, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V (2008b) **Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot.** J Appl Microbiol. 104:1182-1191.
- Barnett JA, Payne RW und Yarrow, D (1983) **Yeasts: Characteristics and Identification.** Cambridge University Press, Cambridge. 2. Auflage.
- Bartowsky EJ, Pretorius IS (2009) **Microbial Formation and Modification of Flavor and Off-Flavor Compounds in Wine.** In: König H, Uden G, Fröhlich J (ed), Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1. Auflage. 209-233.

- Bauer FF, Pretorius IS (2000) **Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine—a review.** S Afr J Enol Vitic. 21:27–51.
- Bauer N (2002) **Curdlanase, ein extrazelluläres hefelytisches Enzym von Streptomyceten.** Doktorarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Belloch C, Pérez-Torrado R, González SS, Pérez-Ortín JE, García-Martínez J, Querol A, Barrio E (2009) **Chimeric genomes of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*.** Appl Environ Microbiol. 75:2534-2544.
- Bellon JR, Eglinton JM, Siebert TE, Pollnitz AP, Rose L, de Barros Lopes M, Chambers PJ (2011) **Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines.** Appl Microbiol Biotechnol. 91:603-612.
- Bisson LF, Joseph CML (2009) **Yeasts.** In: König H, Uden G, Fröhlich J (ed), Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1. Auflage. 47-60.
- Blanco P, Orriols I, Losada A (2011) **Survival of commercial yeasts in the winery environment and their prevalence during spontaneous fermentations.** J Ind Microbiol Biotechnol. 38:235-239.
- Blättel V (2008) **Isolierung bakteriolytischer Streptomyceten und Charakterisierung der beteiligten Exoenzyme.** Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Bond U (2009) **Chapter 6: The genomes of lager yeasts.** Adv Appl Microbiol. 69:159-182.
- Bradbury JE, Richards KD, Niederer HA, Lee SA, Rod Dunbar P, Gardner RC (2006) **A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains.** Antonie Van Leeuwenhoek. 89:27-37.
- Brito dos Santos SK, Moreira Brasílio AC, Valente Brasileiro BTR, Simoes, DA, Alves da Silva-Filho E, de Morais M (2007) **Identification of yeasts within *Saccharomyces sensu stricto* complex by PCR-fingerprinting.** W J Microbiol Biotechnol. 23:1613-1620.
- Brönneke V, Fiedler F (1994) **Production of bacteriolytic enzymes of *Streptomyces globisporus* regulated by exogenous bacterial cell walls.** Appl Environ Microbiol. 60:785-791.
- Cadez N, Zupan J, Raspor P (2010) **The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries.** FEMS Yeast Res. 10:619-630.
- Cagniard-Latour CC (1837) **Mémoire sur la fermentation vineuse.** Annales de chimie et de physique. 68:206-222.
- Cankar K, Stebih D, Dreo T, Zel J, Gruden K (2006) **Critical points of DNA quantification by real-time PCR—effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms.** BMC Biotechnol. 14:37.
- Caridi A (2006) **Enological functions of parietal yeast mannoproteins.** Antonie Van Leeuwenhoek. 89:417-422.
- Carraro L, Maifreni M, Bartolomeoli I, Martino ME, Novelli E, Frigo F, Marino M, Cardazzo B (2011) **Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing.** Res Microbiol. 162:231-239.

- Casper AM, Mieczkowski PA, Gawel M, Petes TD (2008) **Low levels of DNA polymerase alpha induce mitotic and meiotic instability in the ribosomal DNA gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae***. PLoS Genet. 4:e1000105.
- Chatonnet P, Dubourdieu D, Boidron JN (1995) **The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines**. Am J Enol Vitic. 46:463–468.
- Chavan P, Mane S, Kulkarni G, Shaikh S, Ghormade V, Nerkar DP, Shouche Y, Deshpande MV (2009) **Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India**. Food Microbiol. 26:801-808.
- Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P (2010) **Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking**. FEMS Yeast Res. 10:123-133.
- Clavijo A, Calderón IL, Paneque P (2010) **Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region**. Int J Food Microbiol. 143:241-245.
- Cocolin L, Heisey A, Mills DA (2001) **Direct Identification of the Indigenous Yeasts in Commercial Wine Fermentations**. Am J Enol Vitic. 52:1:49-53 (2001)
- Combina M, Mercado L, Borgo P, Elia A, Jofré V, Ganga A, Martinez C, Catania C (2005) **Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina**. J Appl Microbiol. 98:1055-1061.
- Comitini F, Di Pietro N, Zacchi L, Mannazzu I, Ciani M (2004) ***Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization**. Microbiology. 150:2535-2541.
- Comitini F, Mannazzu I, Ciani M (2009) ***Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific beta-glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall**. Microb Cell Fact. 8:55.
- Comitini F, Ciani M (2010) **The zymocidal activity of *Tetrapisispora phaffii* in the control of *Hanseniaspora uvarum* during the early stages of winemaking**. Lett Appl Microbiol. 50:50-56.
- Cordero-Bueso G, Arroyo T, Serrano A, Tello J, Aporta I, Vélez MD, Valero E (2011) **Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries**. Int J Food Microbiol. 145:132-139.
- Coulon J, Perello MC, Lonvaud-Funel A, de Revel G, Renouf V (2010) ***Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles**. J Appl Microbiol.108:1450-1458.
- Csoma H, Sipiczki M (2008) **Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation**. FEMS Yeast Res. 8:328-336.
- Cus F, Raspor P (2008) **The effect of pyrimethanil on the growth of wine yeasts**. Lett Appl Microbiol. 47:54-59.
- Dahl R, Henriksen JM, Harving H (1986) **Red wine asthma: a controlled challenge study**. J Allergy Clin Immunol. 78:1126-1129.

- De Barros Lopes M, Soden A, Martens AL, Henschke PA, Langridge P (1998) **Differentiation and species identification of yeasts using PCR.** *Int J Syst Bacteriol.* 48:279-286.
- De Barros Lopes M, Bellon JR, Shirley NJ, Ganter PF (2002) **Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species.** *FEMS Yeast Res.* 1:323-331.
- De Melo Pereira GV, Ramos CL, Galvão C, Souza Dias E, Schwan RF (2010) **Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of *Saccharomyces* genus: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*.** *Lett Appl Microbiol.* 51:131-137.
- De Nobel JG, Klis FM, Munnik T, Priem J, van den Ende H (1990a) **An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*.** *Yeast.* 6:483-490.
- De Nobel JG, Klis FM, Priem J, Munnik T, van den Ende H (1990b) **The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast.* 6:491-499.
- Demeke T, Jenkins GR (2010) **Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits.** *Anal Bioanal Chem.* 396:1977-1990.
- Demuyter C, Lollier M, Legras JL, Le Jeune C (2004) **Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery.** *J Appl Microbiol.* 97:1140-1148.
- Dietrich H, Pour-Nikfardam MS (2009) **Influence of phenolic compounds and tannins on wine-related microorganisms.** In: König H, Uden G, Fröhlich J (ed), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1. Auflage. 307-334.
- Dittrich HH, Großmann M (2005) **Mikrobiologie des Weines.** Ulmer-Verlag Stuttgart. 3. Auflage.
- Djonović S, Vittone G, Mendoza-Herrera A, Kenerley CM (2007) **Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing beta-1,3- and beta-1,6-glucanase genes.** *Mol Plant Pathol.* 8:469-480.
- Donzelli BG, Harman GE (2001) **Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1.** *Appl Environ Microbiol.* 67:5643-5647.
- Dunn B, Sherlock G (2008) **Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*.** *Genome Res.* 18:1610-1623.
- Dupin IV, McKinnon BM, Ryan C, Boulay M, Markides AJ, Jones GP, Williams PJ, Waters EJ (2000) ***Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action.** *J Agric Food Chem.* 48:3098-1305.
- Ebina H, Levin HL (2007) **Stress management: how cells take control of their transposons.** *Mol Cell.* 27:180-181.
- Edman P, Begg G (1967) **A protein sequenator.** *Eur J Biochem.* 1: 80-91.

- Edwards-Ingram LC, Gent ME, Hoyle DC, Hayes A, Stateva LI, Oliver SG (2004) **Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex.** Genome Res. 14:1043-1051.
- El-Katatny MH, Gudelj M, Robra KH, Elnaghy MA, Gübitz GM (2001) **Characterization of a chitinase and an endo-beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*.** Appl Microbiol Biotechnol. 56:137-143.
- Enrique M, Ibáñez A, Marcos JF, Yuste M, Martínez M, Vallés S, Manzanares P (2010) **Beta-glucanases as a tool for the control of wine spoilage yeasts.** J Food Sci. 75:41-45.
- Eschstruth A, Divol B (2011) **Comparative characterization of endo-polygalacturonase (Pgu1) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under winemaking conditions.** Appl Microbiol Biotechnol. 91:623-634.
- Esti M, Benucci I, Liburdi K, Garzillo AM (2011) **Effect of wine inhibitors on free pineapple stem bromelain activity in a model wine system.** J Agric Food Chem. 59:3391-3397.
- Faber J, Moritz N, Henninger N, Zepp F, Knuf M (2009) **Rapid detection of common pathogenic *Aspergillus* species by a novel real-time PCR approach.** Mycoses. 52:228-233.
- Fay JC, Benavides JA (2005) **Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*.** PLoS Genet. 1:66-71.
- Fernández-Espinar M, Barrio E, Querol A (2003) **Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex.** Yeast. 20:1213-1226.
- Ferrer P, Hedegaard L, Halkier T, Diers I, Savva D, Asenjo JA (1996) **Molecular cloning of a lytic beta-1,3-glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica* LLG109. A beta-1,3-glucanase able to selectively permeabilize the yeast cell wall.** Ann N Y Acad Sci. 782:555-565.
- Fischer G, James SA, Roberts IN, Oliver SG, Louis EJ (2000) **Chromosomal evolution in *Saccharomyces*.** Nature. 405:451-454.
- Fleet GH, Phaff HJ (1974) **Lysis of yeast cell walls: glucanases from *Bacillus circulans* WL-12.** J Bacteriol. 119:207-219.
- Fleet GH, Lafon-Lafourcade S, Ribereau-Gayon F (1984) **Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines.** Appl Environ Microbiol. 48:1034-1038.
- Fleet GH (2003) **Yeast interaction and wine flavour.** Int J Food Microbiol. 86:11-22.
- Fröhlich J, Pfannebecker J (2006). **Spezies-unabhängiges Nachweisverfahren für biologisches Material. Deutsche Patentanmeldung DE 10 2006 022 569 A1.**
- Fröhlich J, Pfannebecker J (2007) **Species-independent DNA fingerprint analysis with primers derived from the *NotI* identification sequence.** Patent application WO 2007/131776.
- Funk ER (2009) **Weinqualität sichern durch richtige Schwefelung – Hinweise für die Praxis.** Infodienst der Landwirtschaftsverwaltung Baden-Württemberg.

- Gacto M, Vicente-Soler J, Cansado J, Villa TG (2000) **Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells.** J Appl Microbiol. 88:961-967.
- Galán B, García Mendoza C, Calonje M, Novaes-Ledieu M (1999) **News & notes: production, purification, and properties of an endo-1, 3-beta-glucanase from the basidiomycete *Agaricus bisporus*.** Curr Microbiol. 38:190-193.
- Gangl H, Batusic M, Tscheik G, Tiefenbrunner W, Hack C, Lopandic K (2009) **Exceptional fermentation characteristics of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*.** N Biotechnol. 25:244-251.
- Gao C, Fleet GH (1988) **The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*.** J Appl Microbiol. 65:405-409.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) **Life with 6000 genes.** Science. 274:563-567.
- Gohel V, Chaudhary T, Vyas P, Chhatpar HS (2004) **Isolation and identification of marine chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol.** Indian J Exp Biol. 42:715-720.
- Gonzalez SS, Barrio E, Gafner J, Querol A (2006) **Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations.** FEMS Yeast Res. 6:1221-1234.
- González SS, Barrio E, Querol A (2008) **Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing.** Appl Environ Microbiol. 74:2314-2320.
- Granchi L, Ganucci D, Messini A, Vincenzini M (2002) **Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes.** FEMS Yeast Res. 2:403-407.
- Greig D (2009) **Reproductive isolation in *Saccharomyces*.** Heredity. 102:39-44.
- Groth C, Hansen J, Piskur J (1999) **A natural chimeric yeast containing genetic material from three species.** Int J Syst Bacteriol. 49:1933-1938.
- Guerzoni E, Marchetti R (1987) **Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers.** Appl Environ Microbiol. 53:571-576.
- Guilloux-Benatier M, Chassagne D (2003) **Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine.** J Agric Food Chem. 51:746-751.
- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W (2005) **Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens.** Syst Appl Microbiol. 28:66-76.
- Heard GM, Fleet GH (1985) **Growth of Natural Yeast Flora during the Fermentation of Inoculated Wines.** Appl Environ Microbiol. 50:727-728.

- Heresztyn T (1986) **Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines.** Am J Enol Vitic. 37:127-132.
- Herrero M, García LA, Díaz M (2003) **The effect of SO₂ on the production of ethanol, acetaldehyde, organic acids, and flavor volatiles during industrial cider fermentation.** J Agric Food Chem. 51:3455-3459.
- Herth W, Schnepf E (1980) **The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils.** Protoplasma. 105:129-133.
- Hierro N, Esteve-Zarzoso B, González A, Mas A, Guillamón JM (2006a) **Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine.** Appl Environ Microbiol. 72:7148-7155.
- Hierro N, González A, Mas A, Guillamón JM. (2006b) **Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration.** FEMS Yeast Res. 6:102-111.
- Hierro N, Esteve-Zarzose B, Mas A, Guillamoon JM (2007) **Monitoring of *Saccharomyces* and *Hansenia* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR.** FEMS Yeast Res. 7:1340-1349.
- Holm Hansen E, Nissen P, Sommer P, Nielsen JC, Arneborg N (2001) **The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*.** J Appl Microbiol. 91:541-547.
- Hong TY, Cheng CW, Huang JW, Meng M (2002) **Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3-beta-glucan.** Microbiology. 148:1151-1159.
- Hong TY, Meng M (2003) **Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3-beta-glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil.** Appl Microbiol Biotechnol. 61:472-478.
- Huang CH, Lee FL, Tai CJ (2008) **A novel specific DNA marker in *Saccharomyces bayanus* for species identification of the *Saccharomyces sensu stricto* complex.** J Microbiol Methods. 75:531-534.
- Huang CH, Lee FL, Tai CJ (2009) **The beta-tubulin gene as a molecular phylogenetic marker for classification and discrimination of the *Saccharomyces sensu stricto* complex.** Antonie Van Leeuwenhoek. 95:135-142.
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR (1998) **Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity.** J Bacteriol. 180:4765-4774.
- Ibarburu I, Aznar R, Elizaquível P, García-Quintáns N, López P, Munduate A, Irastorza A, Dueñas MT (2010) **A real-time PCR assay for detection and quantification of 2-branched (1,3)-beta-D-glucan producing lactic acid bacteria in cider.** Int J Food Microbiol. 143:26-31.
- Ilari A, Fiorillo A, Angelaccio S, Florio R, Chiaraluce R, van der Oost J, Consalvi V (2009) **Crystal structure of a family 16 endoglucanase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* - structural basis of substrate recognition.** FEBS J. 276:1048-1058.
- Imoto,T (2001) **Lysozyme.** Encyclopedia of Life Science. John Wiley & Sons. 1-5.

- Inouye K, Shimada T, Yasukawa K (2007) **Effects of neutral salts and alcohols on the activity of *Streptomyces caespitosus* neutral protease.** J Biol Chem. 142:317-324.
- James SA, O'Kelly MJ, Carter DM, Davey RP, van Oudenaarden A, Roberts IN (2009) **Repetitive sequence variation and dynamics in the ribosomal DNA array of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by whole-genome resequencing.** Genome Res. 19:626-635.
- Janse I, Hamidjaja RA, Bok JM, van Rotterdam BJ (2010) **Reliable detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification.** BMC Microbiol. 10:314.
- Jensen SL, Umiker NL, Arneborg N, Edwards CG (2009) **Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa*, and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines.** Food Microbiol. 26:915-921.
- Jespersen L, van der Kühle A, Petersen KM (2000) **Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts.** Int J Food Microbiol. 60:43-53.
- Johnston JR, Baccari C, Mortimer RK (2000) **Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis.** Res Microbiol. 151:583-590.
- Jorgensen NO, Brandt KK, Nybroe O, and Hansen M (2009) ***Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium.** Int J Syst Evol Microbiol. 59:2195-2199.
- Josepa S, Guillamon JM, Cano J (2000) **PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers.** FEMS Microbiol Lett. 193:255-259.
- Joseph CML, Kumar G, Su E, Bisson LF (2007) **Adhesion and biofilm production by wine isolates of *Brettanomyces bruxellensis*.** Am J Enol Vitic. 58: 373-378.
- Kao KC, Schwartz K, Sherlock G (2010) **A genome-wide analysis reveals no nuclear dobzhansky-muller pairs of determinants of speciation between *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*, but suggests more complex incompatibilities.** PLoS Genet. 6:e1001038.
- Kassemeyer H, Berkelmann-Löhnertz B (2009) **Fungi of Grapes.** In: König H, Uden G, Fröhlich J (ed), Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1. Auflage. 61-88.
- Kawahata M, Fujii T, Iefuji H (2007) **Intraspecies diversity of the industrial yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* based on analysis of the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) regions and the D1/D2 region of 26S rDNA.** Biosci Biotechnol Biochem. 71:1616-1620.
- Khyse-Andersen J (1984) **Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.** J Biochem Biophys Methods. 10:203-209.
- Kim JM, Vanguri S, Boeke JD, Gabriel A, Voytas DF (1998) **Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence.** Genome Res. 8:464-478.

- Kim YH, Ishikawa D, Ha HP, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S (2006) **Chromosome XII context is important for rDNA function in yeast.** *Nucleic Acids Res.* 34:2914-2924.
- Kiseleva E, Allen TD, Rutherford SA, Murray S, Morozova K, Gardiner F, Goldberg MW, Drummond SP (2007) **A protocol for isolation and visualization of yeast nuclei by scanning electron microscopy (SEM).** *Nat Protoc.* 2:1943-1953.
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S (2002) **Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiol Rev.* 26:239-256.
- Klis FM, Boorsma A, De Groot PW (2006) **Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast.* 23:185-202.
- Kollár R, Petráková E, Ashwell G, Robbins PW, Cabib E (1995) **Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-->3)-glucan.** *J Biol Chem.* 270:1170-1178.
- Kunicka-Styczyńska A, Rajkowska K (2011) **Physiological and genetic stability of hybrids of industrial wine yeasts *Saccharomyces sensu stricto* complex.** *J Appl Microbiol.* 110:1538-1549.
- Kurtzman CP, Robnett CJ (2003) **Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex' determined from multigene sequence analyses.** *FEMS Yeast Res.* 3:417-432.
- Kurtzman CP (2006) **Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods.** *Mycoscience.* 47:65-71.
- Kützing FT (1837) **Mikroskopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter, nebst mehreren andern dazu gehörigen vegetabilischen Gebilden.** *Journ. prakt. Chem.* 11:385-409.
- Lachenmeier DW, Kanteres F, Rehm J (2009) **Carcinogenicity of acetaldehyde in alcoholic beverages: risk assessment outside ethanol metabolism.** *Addiction.* 104:533-550.
- Laemmli UK (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* 227:680-685.
- Larisika M (2010) **Biochemische Charakterisierung des Exopolysaccharids von *Pediococcus parvulus* B399, sowie dessen Hydrolyse durch eine neue β -1,3-Glucanase aus *Delftia* sp. MV01.** Doktorarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Le Jeune C, Lollier M, Demuyter C, Erny C, Legras JL, Aigle M, Masneuf-Pomarède I (2007) **Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*.** *FEMS Yeast Res.* 7:540-549.
- Leblanc-Maridor M, Beaudeau F, Seegers H, Denis M, Belloc C (2011) **Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by real-time PCR in pure cultures and in complex samples.** *BMC Microbiol.* 11:113.
- Legras JL, Merdinoglu D, Cornuet JM, Karst F (2007) **Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history.** *Mol Ecol.* 16:2091-2102.
- Li SS, Cheng C, Li Z, Chen JY, Yan B, Han BZ, Reeves M (2010) **Yeast species associated with wine grapes in China.** *Int J Food Microbiol.* 138:85-90.

- Lipke PN, Kurjan J. (1992) **Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins.** Microbiol Rev. 56:180-194.
- Lipke PN, Ovalle R (1998) **Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges.** J Bacteriol. 180:3735-3740.
- Liti G, Peruffo A, James SA, Roberts IN, Louis EJ (2005) **Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex.** Yeast. 22:177-192.
- Liti G, Barton DB, Louis EJ (2006) **Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*.** Genetics. 174:839-850.
- Lopandic K, Gangl H, Wallner E, Tscheik G, Leitner G, Querol A, Borth N, Breitenbach M, Prillinger H, Tiefenbrunner W (2007) **Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*.** FEMS Yeast Res. 7:953-965.
- Loureiro V, Malfeito-Ferreira M (2003) **Spoilage yeasts in the wine industry.** Int J Food Microbiol. 86:23-50.
- Lustrato G, Alfano G, Belli C, Grazia L, Iorizzo M, Maiuro L, Massarella F, Zanardini E, Ranalli G (2003) **Controlling grape must fermentation in early winemaking phases: the role of electrochemical treatment.** J Appl Microbiol. 95:1087-1095.
- Makino H, Fujimoto J, Watanabe K (2010) **Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for detection and enumeration of yeasts of public health interest in dairy products.** Int J Food Microbiol. 140:76-83.
- Malek MA, Berry DR (1995) **Isolation and partial characterization of yeast mannan hydrolysing enzymes from bacterial isolates.** Microbios. 83:229-241.
- Mann JW, Jeffries TW, Macmillan JD (1978) **Production and ecological significance of yeast cell wall-degrading enzymes from *Oerskovia*.** Appl Environ Microbiol. 36:594-605.
- Manzano M, Cocolin L, Longo B, Comi G (2004) **PCR-DGGE differentiation of strains of *Saccharomyces sensu stricto*.** Antonie Van Leeuwenhoek. 85:23-27.
- Martínez-Rodríguez AJ, Carrascosa AV, Polo MC (2001) **Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system.** Int J Food Microbiol. 68:155-160.
- Martini AV, Martini A (1987) **Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*.** Antonie Van Leeuwenhoek. 53:77-84.
- Martorell P, Querol A, Fernandez-Espinar MT (2005) **Rapid Identification and Enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Wine by Real-Time PCR.** Appl Environ Microbiol. 11:6823-6830.
- Masneuf I, Hansen J, Groth C, Piskur J, Dubourdieu D (1998) **New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains.** Appl Environ Microbiol 64:3887-3892.

- Masneuf-Pomarède I, Bely M, Marullo P, Lonvaud-Funel A, Dubourdieu D (2010) **Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains.** Int J Food Microbiol. 139:79-86.
- McCulloch E, Lucas C, Ramage G, Williams C (2011) **Improved early diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time PCR to prevent chronic colonisation in a paediatric cystic fibrosis population.** J Cyst Fibros. 10:21-24.
- McGovern PE, Glusker DL, Exner LJ, Voigt MM (1996) **Neolithic resinated wine.** Nature 381:480-481.
- McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, Nuñez A, Butrym ED, Richards MP, Wang CS, Cheng G, Zhao Z, Wang C. (2004) **Fermented beverages of pre- and proto-historic China.** Proc Natl Acad Sci U S A. 101:17593-17598.
- McLellan WL Jr, McDaniel LE, Lampen JO (1970) **Purification of phosphomannanase and its action on the yeast cell wall.** J Bacteriol. 102:261-270.
- McMurrough I, Rose AH (1967) **Effect of growth rate and substrate limitation on the composition and structure of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*.** Biochem J. 105:189-203.
- Mieczkowski PA, Lemoine FJ, Petes TD (2006) **Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** DNA Repair. 5:1010-1020.
- Miller GL (1959) **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Anal Chem 31:426-428.
- Millet V, Lonvaud-Funel A (2000) **The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage.** Lett Appl Microbiol. 30:136-141.
- Mills DA, Johannsen EA, Cocolin L (2002) **Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations.** Appl Environ Microbiol. 68:4884-4893.
- Miyanishi N, Hamada N, Kobayashi T, Imada C, Watanabe E (2003) **Purification and characterization of a novel extracellular beta-1,3-glucanase produced by *Bacillus clausii* NM-1 isolated from ezo abalone *Haliotis discus hannai*.** J Biosci Bioeng. 95:45-51.
- Moin NS, Nelson KA, Bush A, Bernhard AE (2009) **Distribution and diversity of archaeal and bacterial ammonia oxidizers in salt marsh sediments.** Appl Environ Microbiol. 75:7461-7468.
- Mongodin EF, Shapir N, Daugherty SC, DeBoy RT, Emerson JB, Shvartzbeyn A, Radune D, Vamathevan J, Riggs F, Grinberg V, Khouri H, Wackett LP, Nelson KE, Sadowsky MJ (2006) **Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1.** PLoS Genet. 2:e214.
- Monreal J, De Uruburu F, Villaneuva, JR (1967) **Lytic action of beta(1-3)-glucanase on yeast cells.** J Bacteriol. 94:241-244.
- Montrocher R, Verner MC, Briolay J, Gautier C, Marmeisse R (1998) **Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences.** Int J Syst Bacteriol. 48:295-303.

- Moreira N, Mendes F, Guedes de Pinho P, Hogg T, Vasconcelos I (2008) **Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must.** Int J Food Microbiol. 124:231-238.
- Morris GJ, Winters L, Coulson GE, Clarke KJ (1986) **Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** J Gen Microbiol. 132:2023-2034.
- Mortimer R, Polsinelli M (1999) **On the origins of wine yeast.** Res Microbiol. 150:199-204.
- Mulè G, Susca A, Logrieco A, Stea G, Visconti A (2006) **Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes.** Int J Food Microbiol. 111 Suppl 1:S28-34.
- Nagata S, Maru I, Ishihara F, Misono H, Nagasaki S (1990) **Cloning and expression of endo-beta-1,3-glucanase gene from *Flavobacterium dormitator* in *Escherichia coli* and characterization of the gene product.** Agric Biol Chem. 54:2675-26780.
- Nannelli F, Claisse O, Gindreau E, de Revel G, Lonvaud-Funel A, Lucas PM (2008) **Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods.** Lett Appl Microbiol. 47:594-599.
- Nardi T, Carlot M, De Bortoli E, Corich V, Giacomini A (2006) **A rapid method for differentiating *Saccharomyces sensu stricto* strains from other yeast species in an enological environment.** FEMS Microbiol Lett. 264:168-173.
- Naumov GI (1985) **Comparative genetics of yeasts. XXIII. Unusual inheritance of toxin formation in *Saccharomyces paradoxus batschinskaia*.** Genetika. 21:1794-1798.
- Naumov GI, James SA, Naumova ES, Louis DJ, Roberts IN (2000a) **Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudravzevii* and *Saccharomyces mikatae*.** Int J Syst Evol Microbiol. 50:1931-1942.
- Naumov GI, Masneuf I, Naumova ES, Aigle M, Dubourdieu D (2000b) **Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations.** Res Microbiol. 151:683-691.
- Naumov GI, Naumova ES, Masneuf I, Aigle M, Kondratieva VI, Dubourdieu D (2000c) **Natural polyploidization of some cultured yeast *Saccharomyces sensu stricto*: auto- and allotetraploidy.** Syst Appl Microbiol. 23:442-449.
- Naumov GI, Naumova ES, Antunovics Z, Sipiczki M (2002) ***Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary.** Appl Microbiol Biotechnol. 59:727-730.
- Naumov GI, Naumova ES, Masneuf-Pomarède I (2010) **Genetic identification of new biological species *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai.** Antonie Van Leeuwenhoek. 98:1-7.
- Naumova ES, Bulat SA, Mironenko NV, Naumov GI (2003) **Differentiation of six sibling species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex by multilocus enzyme electrophoresis and UP-PCR analysis.** Antonie Van Leeuwenhoek. 83:155-166.

- Naumova ES, Naumov GI, Michailova YV, Martynenko NN, Masneuf-Pomarède I (2011) **Genetic diversity study of the yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* reveals introgressed subtelomeric *Saccharomyces cerevisiae* genes.** Res Microbiol. 162:204-213.
- Neeley ET, Phister TG, Mills DA (2005) **Differential real-time PCR assay for enumeration of lactic acid bacteria in wine.** Appl Environ Microbiol. 71:8954-8957.
- Ness C, Lavalley F, Dubourdiou D, Aigle M, Dulau L (1993) **Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction.** J Sci Food Agric. 62:89-94.
- Nguyen TH, Fleet GH, Rogers PL (1998) **Composition of the cell walls of several yeast species.** Appl Microbiol Biotechnol. 50:206-212.
- Nguyen HV, Gaillardin C (2005) **Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species.** FEMS Yeast Res. 5:471-483.
- Nisiotou AA, Spiropoulos AE, Nychas GE (2007) **Yeast Community Structure and Dynamics in Healthy and Bortyitis-Affected Grape Must Fermentations.** Appl Environ Microbiol. 73: 6705-6713.
- Nissen P, Arneborg N (2003) **Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*.** Arch Microbiol. 180:257-263.
- Nocker A, Burr M, Camper AK (2007) **Genotypic microbial community profiling: a critical technical review.** Microb Ecol. 54:276-89.
- Ocón E, Gutiérrez AR, Garijo P, López R, Santamaría P (2010) **Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time.** Food Microbiol. 27:1023-1027.
- Oda Y, Yabuki M, Tonomura K, Fukunaga M (1997) **A phylogenetic analysis of *Saccharomyces* species by the sequence of 18S-28S rRNA spacer regions.** Yeast. 13:1243-1250.
- Oh HM, Giovannoni SJ, Lee K, Ferriera S, Johnson J, Cho JC (2009) **Complete genome sequence of *Robiginitalea biformata* HTCC2501.** J Bacteriol. 191:7144-7145.
- Orlić S, Arroyo-López FN, Huić-Babić K, Lucilla I, Querol A, Barrio E (2010) **A comparative study of the wine fermentation performance of *Saccharomyces paradoxus* under different nitrogen concentrations and glucose/fructose ratios.** J Appl Microbiol. 108:73-80.
- Osumi M (1998) **The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation.** Micron. 29:207-233.
- Pérez-Ortín JE, Querol A, Puig S, Barrio E (2002) **Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains.** Genome Res. 12:1533-1539.
- Pfannebecker J (2005) **Entwicklung einer PCR-Methode zur Stammanalyse von pro- und eukaryotischen Mikroorganismen aus Wein.** Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Pfannebecker J (2008) **Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Art- und Stamm-Identifizierung pro- und eukaryotischer Organismen.** Doktorarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

- Pfeiffer P, Radler F (1982) **Purification and Characterization of Extracellular and Intracellular Killer Toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Strain 28.** J Gen Microbiol. 128:2699-2706.
- Pfeiffer P, Radler F (1984) **Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2.** Arch Microbiol. 137:357-361.
- Phister TG, Mills DA (2003) **Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine.** Appl Environ Microbiol. 69:7430-7434.
- Plasek J, Hoskova B (2010) **Solvatochromic effect in the optical spectra of calcofluor and its relation to fluorescent staining of yeast cell walls.** J Fluoresc. 20:343-352.
- Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH, Heard GM (2004) **Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes.** FEMS Yeast Res. 4:865-877.
- Pribylová L, Farkas V, Slaninová I, de Montigny J, Sychrová H (2007) **Differences in osmotolerant and cell-wall properties of two *Zygosaccharomyces rouxii* strains.** Folia Microbiol. 52:241-245.
- Querol A, Bond U (2009) **The complex and dynamic genomes of industrial yeasts.** FEMS Microbiol Lett. 293:1-10.
- Radler F, Schtitz H (1982) **Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*.** Am. J. Enol. Vitic. 33:36-40.
- Rainieri S, Zambonelli C, Kaneko Y (2003) ***Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, Genetic Diversity and Evolution.** J Biosci Bioeng. 96: 1-9
- Rasmussen MA, Madsen SM, Stougaard P, Johnsen MG (2008) ***Flavobacterium* sp. strain 4221 and *Pedobacter* sp. strain 4236 beta-1,3-glucanases that are active at low temperatures.** Appl Environ Microbiol. 74:7070-7072.
- Raspor P, Milek DM, Polanc J, Možina SS, Čadež N (2006) **Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia.** Int J Food Microbiol. 109:97-102.
- Rawel HM, Kroll J, Rohn S (2001) **Reactions of phenolic substances with lysozyme – physicochemical characterization and proteolytic digestion of the derivatives.** Food Chem. 72:59-71.
- Rawsthorne H, Phister TG (2006) **A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices.** Int J Food Microbiol. 112:1-7.
- Read SM, Currie G, Bacic A (1996) **Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry.** Carbohydr Res. 281:187-201.
- Redzepović S, Orlić S, Sikora S, Majdak A, Pretorius IS (2002) **Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards.** Lett Appl Microbiol. 35:305-310.
- Rehm H (2002) **Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics.** Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin. 5. Auflage.

- Rementeria A, Rodriguez JA, Cadaval A, Amenabar R, Muguruza JR, Hernando FL, Sevilla MJ (2003) **Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country, North Spain).** Int J Food Microbiol. 86:201-207.
- Renard A, Gómez di Marco P, Egea-Cortines M, Weiss J (2008) **Application of whole genome amplification and quantitative PCR for detection and quantification of spoilage yeasts in orange juice.** Int J Food Microbiol. 126:195-201.
- Replansky T, Koufopanou V, Greig D, Bell G (2008) ***Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology.** Trends Ecol Evol. 23:494-501.
- Reynisson E, Lauzon HL, Magnusson H, Hreggvidsson GO, Marteinson VT (2008) **Rapid quantitative monitoring method for the fish spoilage bacteria *Pseudomonas*.** J Environ Monit. 10:1357-1362.
- Röder C (2007) **Entwicklung von molekularen Sonden für die sichere Identifizierung von Hefen der Gattung *Brettanomyces*, *Dekkera*.** Doktorarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Rohn S, Rawel HM, Kroll J (2002) **Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes.** J Agric Food Chem. 50:3566-3571.
- Rojas V, Gil JV, Piñaga F, Manzanares P (2001) **Studies on acetate ester production by non-*saccharomyces* wine yeasts.** Int J Food Microbiol. 70:283-289.
- Romano P, Suzzi G. (1993) **Sulfur dioxide and wine microorganisms.** In: Wine Microbiology and Biotechnology. Fleet GH (ed). Harwood Academic Publishers. 373-393.
- Rombouts FM, Phaff HJ (1976) **Lysis of yeast cell walls. Lytic beta-(1 leads to 3)-glucanases from *Bacillus circulans* WL-12.** Eur J Biochem. 63:121-130.
- Sachslehner A, Nidetzky B, Kulbe KD, Haltrich D (1998) **Induction of Mannanase, Xylanase, and Endoglucanase Activities in *Sclerotium rolfsii*.** Appl Environ Microbiol. 64:594-600.
- Saerens SM, Duong CT, Nevoigt E (2010) **Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits.** Appl Microbiol Biotechnol. 86:1195-1212.
- Salazar O, Basso C, Barba P, Orellana C, Asenjo JA (2006) **Improvement of the lytic properties of a beta-1,3-glucanase by directed evolution.** Mol Biotechnol. 33:211-219.
- Salazar O, Asenjo JA (2007) **Enzymatic lysis of microbial cells.** Biotechnol Lett. 29:985-994.
- Salinas F, Garrido D, Ganga A, Veliz G, Martínez C (2008) **Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine.** Food Microbiol. 26:328-332.
- Sampaio JP, Gonçalves P (2008) **Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*.** Appl Environ Microbiol. 74:2144-2152.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1992) **DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. 1977.** Biotechnology. 24:104-108.
- Santamaría P, Garijo P, López R, Tenorio C, Rosa Gutiérrez A (2005) **Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation.** Int J Food Microbiol. 103:49-56.

- Schlegel HG (1992) **Allgemeine Mikrobiologie**. Thieme-Verlag Stuttgart, New York. 7. Auflage.
- Schleifer KH, Kandler O (1967) **On the chemical composition of the cell wall of streptococci. I. The amino acid sequence of the murein of *Str. thermophilus* and *Str. faecalis***. Arch Mikrobiol. 57:335-364.
- Schmitt M, Radler F (1987) **Mannoprotein of the Yeast Cell Wall as Primary Receptor for the Killer Toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Strain 28**. J GenMicrobiol. 133:3347-3354.
- Schreuder MP, Mooren AT, Toschka HY, Verrips CT, Klis FM (1996) **Immobilizing proteins on the surface of yeast cells**. 14:115-120.
- Schütz M, Gafner J (1994) **Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis**. Lett Appl Microbiol. 19:253–257.
- Schwann T (1837) **Vorläufige Mitteilung, betreffend Versuche über die Weingährung und Fäulnis**. Annalen der Physik und Chemie. 41:184-193.
- Schwartz M (2001) **The life and works of Louis Pasteur**. J Appl Microbiol. 91: 597-601.
- Scott JH, Schekman R (1980) **Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis**. J Bacteriol. 142:414-423.
- Sebastian P, Herr P, Fischer U, König H (2011) **Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Occurring in Must and Wine**. S Afr J Enol Vitic. 32: im Druck.
- Shi P, Yao G, Yang P, Li N, Luo H, Bai Y, Wang Y, Yao B (2010) **Cloning, characterization, and antifungal activity of an endo-1,3-beta-D-glucanase from *Streptomyces* sp. S27**. Appl Microbiol Biotechnol. 85:1483-1490.
- Shimoi H, Kitagaki H, Ohmori H, Iimura Y, Ito K (1998) **Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance**. J Bacteriol. 180:3381-3387.
- Sicard D, Legras JL (2011) **Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex**. C R Biol. 334:229-36.
- Sipiczki M, Romano P, Lipani G, Miklos I, Antunovics Z (2001) **Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery**. Antonie Van Leeuwenhoek. 79:97-105.
- Sipiczki M (2003) ***Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines**. Int J Syst Evol Microbiol. 53:2079-2083.
- Sipiczki M (2008) **Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts**. FEMS Yeast Res. 8:996-1007.
- Smith CJ, Osborn AM (2009) **Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology**. FEMS Microbiol Ecol. 67:6-20.
- Snowdon EM, Bowyer MC, Grbin PR, Bowyer PK (2006) **Mousy off-flavor: a review**. J Agric Food Chem. 54:6465-6474.

- Solieri L, Giudici P (2010) **Development of a sequence-characterized amplified region marker-targeted quantitative PCR assay for strain-specific detection of *Oenococcus oeni* during wine malolactic fermentation.** Appl Environ Microbiol. 76:7765-7774.
- Stahl E (1967) **Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch.** Springer Verlag, Berlin. 2. Auflage.
- Staley JT (2006) **The bacterial species dilemma and the genomic phylogenetic.** Phil. Trans. R. Soc. 361:1899-1909.
- Stewart BJ, Leatherwood JM (1976) **Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*.** J Bacteriol. 128:609-615.
- Sturm J, Grossmann M, Schnell S (2006) **Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations.** J Appl Microbiol. 101:1241-1248.
- Sun H, Lapidus A, Nolan M, Lucas S, Del Rio TG, Tice H, Cheng JF, Tapia R, Han C, Goodwin L, Pitluck S, Pagani I, Ivanova N, Mavromatis K, Mikhailova N, Pati A, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Chang YJ, Jeffries CD, Djao OD, Rohde M, Sikorski J, Göker M, Woyke T, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Klenk HP (2010) **Complete genome sequence of *Nocardiopsis dassonvillei* type strain (IMRU 509).** Stand Genomic Sci. 3:325-336.
- Sütterlin K, Hoffmann-Boller P, Baumgärtner D, Gafner J (2003) **Die drei Wädenswiler Reinzuchtheften – eine Erfolgsgeschichte.** Schweiz. Z. Obst-Weinbau.21: 6-8.
- Suzuki Y, Inagaki F, Takai K, Nealson KH, Horikoshi K (2004) **Microbial diversity in inactive chimney structures from deep-sea hydrothermal systems.** Microb Ecol. 47:186-196.
- Swan BK, Ehrhardt CJ, Reifel KM, Moreno LI, Valentine DL (2010) **Archaeal and bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California hypersaline lake, the Salton Sea.** Appl Environ Microbiol. 76:757-768.
- Sweeney JY, Kuehne HA, Sniegowski PD (2004) **Sympatric natural *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* populations have different thermal growth profiles.** FEMS Yeast Res.4:521-525.
- Swiegers JH, Pretorius IS (2007) **Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast.** Appl Microbiol Biotechnol. 74:954-960.
- Tanaka H, Watanabe T (1995) **Glucanases and chitinases of *Bacillus circulans* WL-12.** J Ind Microbiol. 14:478-483.
- Tofalo R, Chaves-López C, Di Fabio F, Schirone M, Felis GE, Torriani S, Paparella A, Suzzi G (2009) **Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must.** Int J Food Microbiol. 130:179-187.
- Toriya MJ, Rozès N, Poblet M, Guillamón JM, Mas A (2001) **Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years.** Antonie Van Leeuwenhoek. 79:345-352.
- Tornai-Lehoczki J, Dlačny D (1996a) **An opportunity to distinguish species of *Saccharomyces sensu stricto* by electrophoretic separation of the larger chromosomes.** Lett Appl Microbiol. 23:227-230.

- Tornai-Lehoczki J, Péter G, Dlačny D, Deák T (1996b) **Some remarks on "a taxonomic key for the genus *Saccharomyces*" (Vaughan Martini and Martini 1993)**. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 69:229-233.
- Torriani S, Zapparoli G, Suzzi G (1999) **Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine**. *Diversity of Saccharomyces strains from Amarone wine*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 75:207-215.
- Torriani S, Zapparoli G, Malacrinò P, Suzzi G, Dellaglio F (2004) **Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR**. *Lett Appl Microbiol*. 38:239-244.
- Tronchoni J, Gamero A, Arroyo-López FN, Barrio E, Querol A (2009) **Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation**. *Int J Food Microbiol*. 134:237-243.
- Urso R, Rantsiou K, Dolci P, Rolle L, Comi G, Cocolin L (2008) **Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods**. *FEMS Yeast Res*. 8:1053-1062.
- Van Keulen H, Lindmark DG, Zeman KE, Gerlosky W (2003) **Yeasts present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling**. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 83:149-154.
- Vaughan-Martini A, Martini A, Cardinali G (1993) **Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces***. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 63:145-156.
- Vaughan-Martini A, Martini A (1995) **Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism**. *J Ind Microbiol*. 14:514-522.
- Vázquez-Garcidueñas S, Leal-Morales CA, Herrera-Estrella A (1998) **Analysis of the beta-1,3-Glucanolytic System of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum***. *Appl Environ Microbiol*. 64:1442-1446.
- Vigentini I, Romano A, Compagno C, Merico A, Molinari F, Tirelli A, Foschino R, Volonterio G (2008) **Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions**. *FEMS Yeast Res*. 8:1087-1096.
- Vijayendra SV, Kashiwagi Y (2009) **Characterization of a new acid stable exo-beta-1,3-glucanase of *Rhizoctonia solani* and its action on microbial polysaccharides**. *Int J Biol Macromol*. 44:92-97.
- Waite JG, Daeschel MA (2007) **Contribution of wine components to inactivation of food-borne pathogens**. *Journal of Food Science*. 72:286-291.
- Weiand J (2001) **Mit Lysozym den BSA im Griff?** *Das Deutsche Weinmagazin*. 23:14-17.
- Wenning M, Hutzler M (2011) **Who ist who? Identifizierung von Hefen in der Brauindustrie**. *Brauindustrie*. 4:18-21.
- Wenzel M, Schönig I, Berchtold M, Kämpfer P, König H (2002) **Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis***. *J Appl Microbiol*. 92:32-40.

-
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.** Academic Press Inc. 315-322.
- Wilson IG (1997) **Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.** Appl Environ Microbiol. 63:3741-3751.
- Wolfe K (2003) **Evolutionary biology: Speciation reversal.** Nature. 422:25-26.
- Wolffs P, Knutsson R, Norling B, Rådström P (2004) **Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR.** J Clin Microbiol. 42:1042-1047.
- Yamanaka S, Kanbe S, Fudo R (1993) **Lysis of basidiomycetous yeast, *Rhodotorula glutinis* caused by *Myxobacteria*.** J Gen Appl Microbiol. 39:419-427.
- Yuasa N, Nakagawa Y, Hayakawa M, Iimura Y (2004) **Distribution of the sulfite resistance gene *SSU1-R* and the variation in its promoter region in wine yeasts.** J Biosci Bioeng. 98:394-397.
- Zhang H, Skelton A, Gardner RC, Goddard MR (2010) ***Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* reside on oak trees in New Zealand: evidence for migration from Europe and interspecies hybrids.** FEMS Yeast Res. 10:941-947.
- Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I (2008) **Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking.** Int J Food Microbiol. 125:197-203.
- Zott K, Claisse O, Lucas P, Coulon J, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I (2010) **Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR.** Food Microbiol. 27:559-567.
- Zou X, Nonogaki H, Welbaum GE (2002) **A gel diffusion assay for visualization and quantification of chitinase activity.** Mol Biotechnol. 22:19-23.

8 ANHANG

Sequenzen der ITS- 5.8S rDNA-Region

Die Sequenzen entsprechen der von der Firma Eurofins MWG empfohlenen Nukleotid-Abfolge.

Saccharomyces cerevisiae Stamm 33 (782 bp)

CGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTAAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTT
 CTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAG
 TTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATAC
 AACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACA
 AACACAAACAATTTTATTTATTTTATTAAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAAAATA
 TAAAAAATTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTG
 AATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTG
 TTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTTGCT
 GGCCTTTTCAATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTGC
 TTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCG
 TCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCAGTAG

Saccharomyces cerevisiae Stamm 93 (784 bp)

CGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTAAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTT
 CTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAG
 TTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATAC
 AACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACA
 AACACAAACAATTTTATCTATTTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAAAATA
 TAAAAAATTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTG
 AATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTG
 TTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTTGCT
 GGCCTTTTCAATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTGC
 TTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGC
 GTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCAGGTAG

Saccharomyces cerevisiae Stamm 462 (783 bp)

TCGAAGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTAAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTT
 CTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAG
 TTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATAC
 AACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACA
 AACACAAACAATTTTATCTATTTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAAAATA
 TAAAAAATTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTG
 AATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTG
 TTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTTGCT
 GGCCTTTTCAATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTGC
 TTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGC
 GTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCAGGTA

Saccharomyces cerevisiae Stamm 43 (783 bp)

TCGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTAAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTT
 ACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTA
 GTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATA
 CAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAAC
 AAACACAAACAATTTTATCTATTTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAAAAT
 ATTTAAAAATTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGT
 GAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCT
 GTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTTGC
 TGGCCTTTTCAATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTGC
 GTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAG
 CGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCATGT

***Saccharomyces cerevisiae* Stamm 101 (784 bp)**

ATCGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTT
TACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTA
AGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAAT
ACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAA
CAAACACAAACAATTTTATCTATTCAATTAATTTTGTCAAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAA
TATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATG
TGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCAGGGGGCATGCC
TGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTG
CTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGT
CGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAG
CGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCAGGTA

***Saccharomyces cerevisiae* Stamm 29 (748 bp)**

ATCGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTT
TACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTA
AGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAAT
ACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAA
CAAACACAAACAATTTTATCTATTCAATTAATTTTGTCAAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAA
TATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATG
TGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCAGGGGGCATGCC
TGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTG
CTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGT
CGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGA
CGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCATGT

***Saccharomyces bayanus* Stamm 24.3 (782 bp)**

ATCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGATATTGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTT
TACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGC
AAATTTCTTTCTTGCTATTCCAAACAGTGAGACTTCTCTGTTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATA
CAACACACTGTGGAGTTTTTATACTTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCTTCGAGCAATCGAGCCCAGAGGTAACAA
ACACAAACAATTTTATTTATTCAATTAATTTTGTCAAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAAATA
ATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGT
GAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCAGGGGGCATGCC
GTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTCTGGAGTTAACTTGAAATTG
TGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGT
GTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTGTACTGAGCGTATTGAAACGTTATCGATAAGAAGAGAG
GTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCAGGT

***Saccharomyces bayanus* Stamm 57 (776 bp)**

GGCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGATATTGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAG
CTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCT
TGCAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACAGTGAGACTTCTCTGTTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCA
ATACAACACACTGTGGAGTTTTTATACTTTTGCAACTTTTTCTTTGGGTTTCGAGCAATCGAGCCCAGAGGTAA
CAAACACAAACAATTTTATTTATTCAATTAATTTTGTCAAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAA
ATAATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCAGGGGGCATG
CCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTCTGGAGTTAACTTGAAAT
TGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACG
GTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTGTACTGAGCGTATTGAAACGTTATCGATAAGAAGAG
AGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTC

Saccharomyces paradoxus Stamm 28 (788 bp)

TGACTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAGGAGCATGAGAGC
 GCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGTCCGGCCTGCGCTTAAGTGC CGGGTCTTGCTTGGC
 TTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTATTGTTATAGGACAATTA AAAACCGTT
 TCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGAGGCCCAGA
 GGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAAACAAGAATTTTCGTAAC TGAAAATTT
 TAAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAC
 GTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCAGGGGG
 CATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTG
 AAATTGCTGGCCTTTTTATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAG
 TACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTGTA CTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGA
 AGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCAGT

Saccharomyces paradoxus Stamm 397 (787 bp)

ACTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAGGAGCATGAGAGC
 TTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGTCCGGCCTGCGCTTAAGTGC CGGGTCTTGCTTGGCTT
 GTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTATTGTTATAGGACAATTA AAAACCGTTTC
 AATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGAGGCCCAGAGG
 TAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAAACAAGAATTTTCGTAAC TGAAAATTTTA
 AAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT
 AATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCAGGGGGCA
 TGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAA
 ATTGCTGGCCTTTTTATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTA
 CGGTGCTTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTGTA CTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAG
 AGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCAGTA

Saccharomyces paradoxus Stamm 35 (788 bp)

GCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAGGAGCATGAGAGC
 TTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGTCCGGCCTGCGCTTAAGTGC CGGGTCTTGCTTGGCTT
 GTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTATTGTTATAGGACAATTA AAAACCGTTTC
 AATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGAGGCCCAGAGG
 TAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAAACAAGAATTTTCGTAAC TGAAAATTTTA
 AAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT
 AATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCAGGGGGCA
 TGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAA
 ATTGCTGGCCTTTTTATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTA
 CGGTGCTTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTGTA CTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAG
 AGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCAGTA

Saccharomyces bayanus x cerevisiae Stamm 3211-2 (782 bp)

ATCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGATATTGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTT
 TACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGCCTGCGCTTAAGTGC CGGGTCTTGCTAGGCTTGC
 AAATTTCTTTCTTGCTATTCCAAACAGTGAGACTTCTCTGTTTTTTGTTATAGGACAATTA AAAACCGTTTCAATA
 CAACACACTGTGGAGTTTTTATACTTTTGCAACTTTTTCTTTGGCCTTCGAGCAATCGAGCCCAGAGGTAACAA
 ACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAAACAAGAATTTTCGTAAC TGAAAATTTTAAAAATA
 ATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGT
 GAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCT
 GTTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTGGTAGTGAGTGATACTCTCTGGAGTTAACTTGAAAATTGC
 TGGCCTTTTTATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTC
 GTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTGTA CTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGC
 GTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCATGT

***Saccharomyces bayanus x cerevisiae* Stamm 2008-7 (785 bp)**

AACTGATTTGAGGTCAACTTTAAGAACATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTTCAATACGC
 TCAGTACAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAG
 AGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAGAGAGTATCACT
 CACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCAAGGGGGCGCAA
 TGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCA
 TCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATTATTTTTAAAAATTTCCAGTTACGAAAATTTCTT
 GTTTTTGACAAAAATTTAATGAATAAAATAAAATTTGTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCTCGATTGCTCGAAGCCC
 AAAGAAAAAGTTGCAAAAGTATAAAAACTCCACAGTGTGTTGTATTGAAACGGTTTTAATTGTCTTATAACAAA
 AACAGAGAAGTCTCACTGTTTGGAAATAGCAAGAAAGAAATTTGCAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGCGCA
 GGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTTCTTGCCAGTAAAAGCTCTCACGCTCTTGCCAAAAACAAAAAAT
 CCAATATCAAATTTATTAATTTCTTTAATGATCCTTCCGCAGTA

***Saccharomyces bayanus x cerevisiae* Stamm 3201-3 (783 bp)**

ACGTGATTTGAGGTCAACTTTAAGAACATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTTCAATACGC
 TCAGTACAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAG
 AGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAGAGAGTATCACT
 CACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCAAGGGGGCGCAA
 TGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCA
 TCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATTATTTTTAAAAATTTCCAGTTACGAAAATTTCTT
 GTTTTTGACAAAAATTTAATGAATAAAATAAAATTTGTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCTCGATTGCTCGAAGCCC
 AAAGAAAAAGTTGCAAAAGTATAAAAACTCCACAGTGTGTTGTATTGAAACGGTTTTAATTGTCTTATAACAAA
 AACAGAGAAGTCTCACTGTTTGGAAATAGCAAGAAAGAAATTTGCAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGCGCA
 GGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTTCTTGCCAGTAAAAGCTCTCACGCTCTTGCCAAAAACAAAAAAT
 CCAATATCAAATTTATTAATTTCTTTAATGATCCTTCCGCAG

***Saccharomyces cerevisiae x kudriavzevii* Stamm 3010-11 (753 bp)**

CCTGATTTGAGGTCAACTTTAAGAATATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTTCAATACGCT
 CAGTACAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGA
 GAAACCTCTCTTTGGAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGAGTATCACTC
 ACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCAAGGGGGCGCAAT
 GTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCA
 CGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATTATTTTTAAAAATTTCCAGTTACGAAAATTTCTTGT
 TTTTGACAAAAATTTAATGAATAAAATAAAATTTGTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCTCCGATTGCTCGACAGCCC
 AAAGAAAAAGTTGCAAAAGTATAAAAACTCCACAGTGTGTTGTATTGAAACGGTTTTGATTGTCTTATAACAAA
 AACAGAGAAATCTCTCACTGTTTGGAAATAGCAAGAAAGAACTTGCAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGCG
 CAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTACTTGCCAGTAAAAGCTCTCACGCTCTTGCCAAAAACAAACA
 ATCCATTTTCAA

***Saccharomyces cerevisiae x kudriavzevii* Stamm 3211-1 (780 bp)**

TACTGATTTGAGGTCAACTTTAAGAATATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTTCAATACGC
 TCAGTACAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAG
 AGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAGAGTATCACT
 CACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCAAGGGGGCGCAA
 TGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCA
 TCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATTATTTTTAAAAATTTCCAGTTACGAAAATTTCTTG
 TTTTTGACAAAAATTTAATGAATAAAATAAAATTTGTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCTCCGATTGCTCGACAGCC
 CAAAGAAAAAGTTGCAAAAGTATAAAAACTCCACAGTGTGTTGTATTGAAACGGTTTTGATTGTCTTATAACAAA
 AAACAGAGAAATCTCTCACTGTTTGGAAATAGCAAGAAAGAACTTGCAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGC
 GCAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTACTTGCCAGTAAAAGCTCTCACGCTCTTGCCAAAAACAAACA
 AATCCATTTTCAAATTTATTAATTTCTTTAATGATCCTT

***Saccharomyces cerevisiae* x *kudriavzevii* Stamm 3212-5 (783 bp)**

ACCTGATTTGAGGTCAACTTTAAGAATATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGC
 TCAGTACAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAG
 AGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAAGAGTATCACT
 CACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCAAGGGGGCGCAA
 TGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCA
 TCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATATTTTTTAAAATTTCCAGTTACGAAAATTTCTTG
 TTTTTGACAAAAATTTAATGAATAAAATAAAATTTGTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCTCCGATTGCTCGACAGCC
 CAAAGAAAAAGTTGCAAAGATATAAAAACTCCACAGTGTGTTGTATTGAAACGGTTTTGATTGTCCTATAACAA
 AAACAGAGAAATCTCTCACTGTTTGAATAGCAAGAAAGAACTTGCAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGC
 GCAGGCCCGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTACTTGCCAGTAAAAGCTCTCACGCTCTTGCCAAAAACAAACA
 AATCCATTTTCAAATTATTAATTTCTTTAATGATCCTTCGA

***Saccharomyces cerevisiae* x *kudriavzevii* Stamm 3212-6 (784 bp)**

ACCTGATTTGAGGTCAACTTTAAGAATATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGC
 TCAGTACAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAG
 AGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAAGAGTATCACT
 CACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCAAGGGGGCGCAA
 TGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCA
 TCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATATTTTTTAAAATTTCCAGTTACGAAAATTTCTTG
 TTTTTGACAAAAATTTAATGAATAAAATAAAATTTGTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCTCCGATTGCTCGACAGCC
 CAAAGAAAAAGTTGCAAAGATATAAAAACTCCACAGTGTGTTGTATTGAAACGGTTTTGATTGTCCTATAACAA
 AAACAGAGAAATCTCTCACTGTTTGAATAGCAAGAAAGAACTTGCAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGC
 GCAGGCCCGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTACTTGCCAGTAAAAGCTCTCACGCTCTTGCCAAAAACAAACA
 AATCCATTTTCAAATTATTAATTTCTTTAATGATCCTTCGA

***Saccharomyces cerevisiae* x *kudriavzevii* Stamm 3007-1 (499 bp)**

TTTAAGAATATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGCTCAGTACAAAAAGATTA
 GCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAA
 AAAAAACATCCCATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTTACTCCCAAGAGTATCACTCACTACCAAACAGAATGT
 TTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCAAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCG
 ATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGA
 GATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATATTTTTTAAAATTTCCAGTTACGAAAATTTCTTGTTTTTGACAAAAATTTAA
 TGAATAAAATAAAATTTGTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCTCCGATTGCTCGACAGC

***Saccharomyces cerevisiae* x *kudriavzevii* Stamm 3001-11 (407 bp)**

TTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGCTCAGTATAAAAAAGATTAGCCGCAGTTG
 GTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAAACA
 TCCAATGAAAAGGCCAGCATTTTCAAGTTAACTCCAAAAGAGTATCACTCACTACCAAACAAAATGTTTGAAAAA
 GAAATGACGCTCAAACGGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCA
 CGGAATTCGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTT
 GTTGAAAGTTTTTAATATTTTTTAAAATTTCCAGTTACA

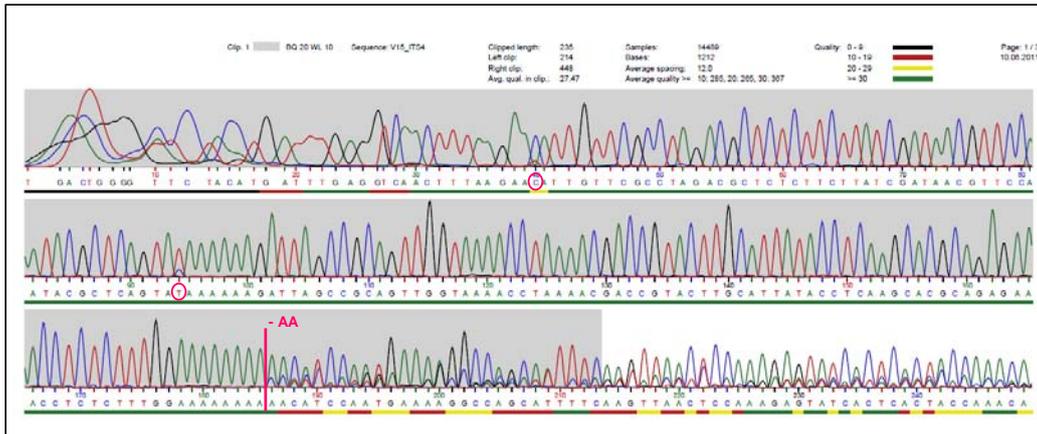
***Saccharomyces cerevisiae* x *kudriavzevii* Stamm NCYC 3518 (787 bp)**

TGATTTGAGGTCAACTTTAAGAATATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGCTCG
 TACAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAA
 ACCTCTCTTTGGAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTAACTCCAAAAGAGTATCACTCACT
 ACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCTGGAATACCAAGGGGGCGCAATGTG
 CGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGA
 TCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATATTTTTTAAAATTTCCAGTTACGAAAATTTCTTGTTTT
 TGACAAAAATTTAATGAATAAAATAAAATTTGTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCTCCGATTGCTCGACACCCAAA
 GAAAAAGTTGCAAAGATATAAAAACTCCACAGTGTGTTGTATTGAAACGGTTTTGATTGTCCTATAACAAAAAC
 AGAGAAATCTCTCACTGTTTGAATAGCAAGAAAGAACTTGCAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGCGCAG
 GCCCGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTACTTGCCAGTAAAAGCTCTCACGCTCTTGCCAAAAACAAACAAATC
 CATTTTCAAATTATTAATTTCTTTAATGATCCTTCGACAGTAC

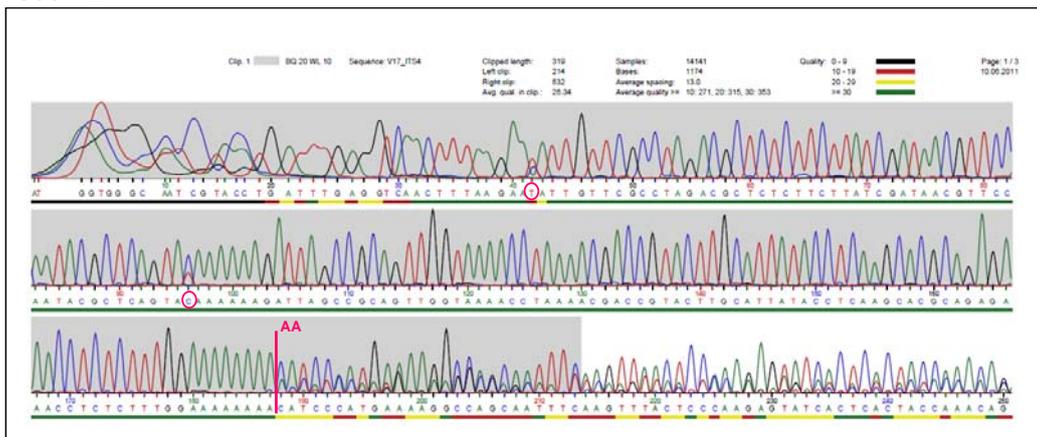
Sequenzierungen der ITS- 5.8S rDNA-Region

Ausschnitte von Chromatogramme der Sequenzierung der ITS1-5.8S rDNA-ITS2-Region von DNA der *Saccharomyces cerevisiae* x *kudriavzevii*-Hybride vom Weingut Heymann-Löwenstein und von Stamm NCYC 3518 beginnend mit der ITS2-Region.

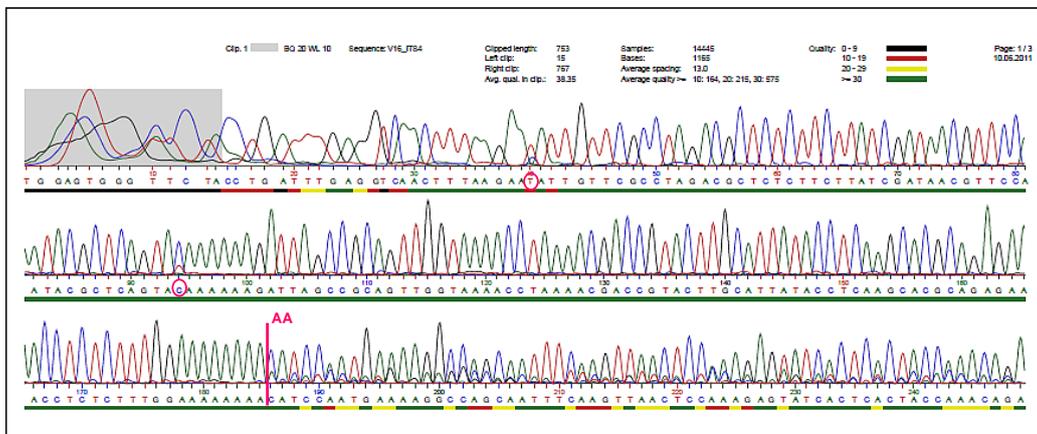
Stamm 3001-11:



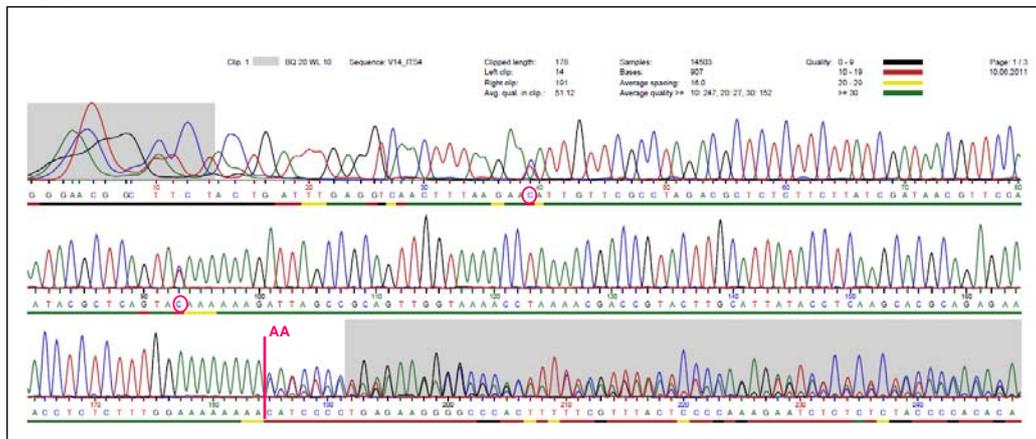
Stamm 3007-1:



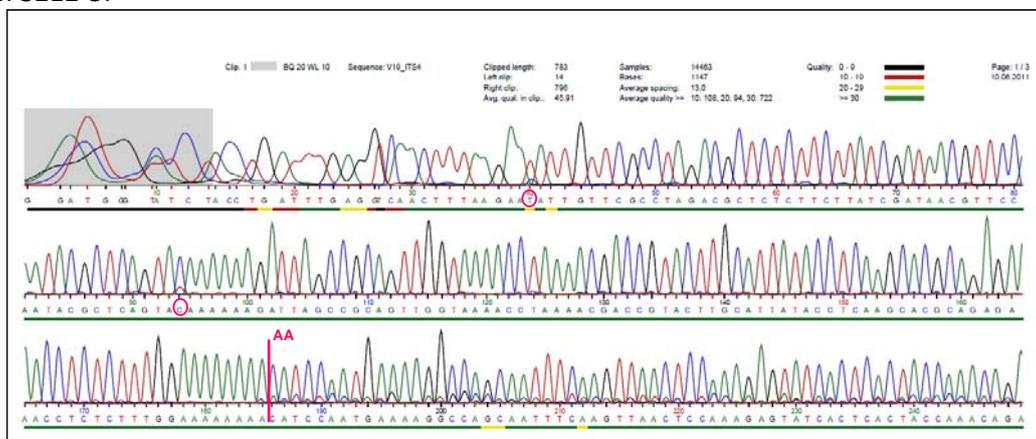
Stamm 3010-11:



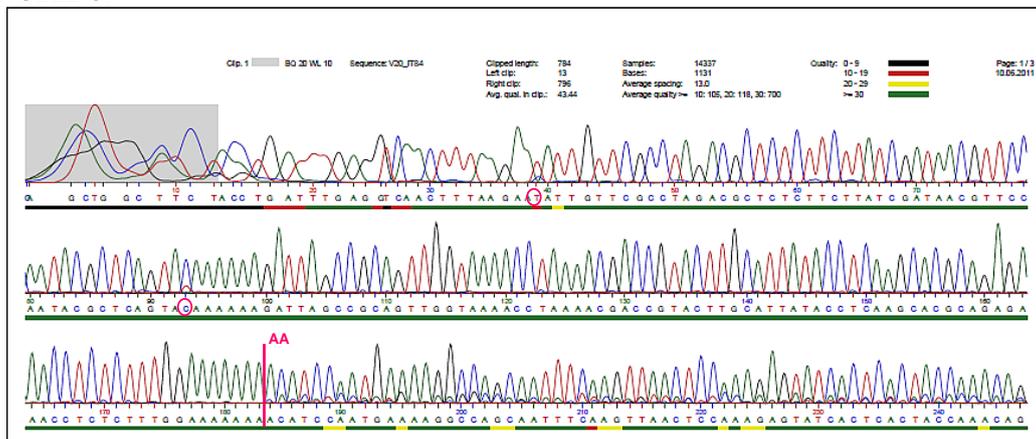
Stamm 3209-2:



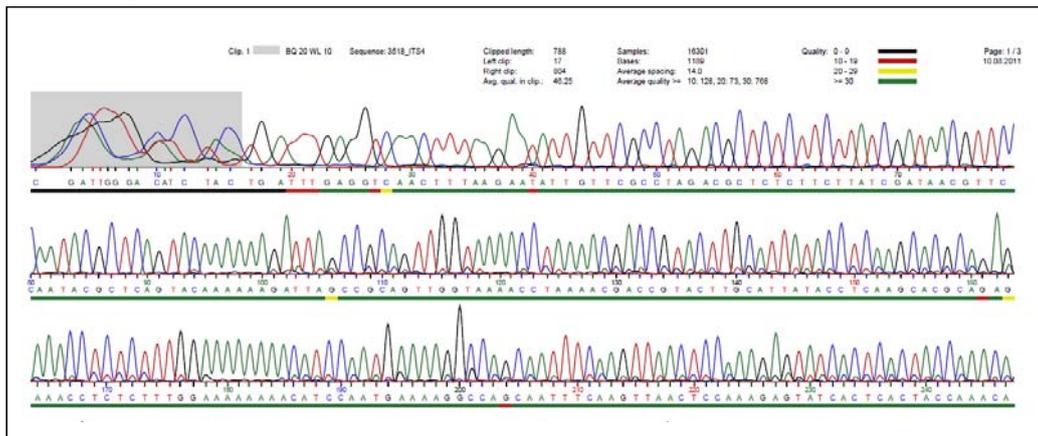
Stamm 3212-5:



Stamm 3212-6:

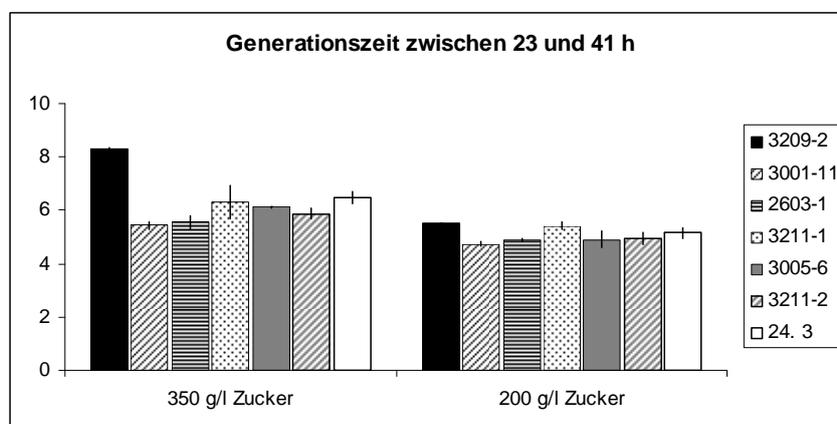
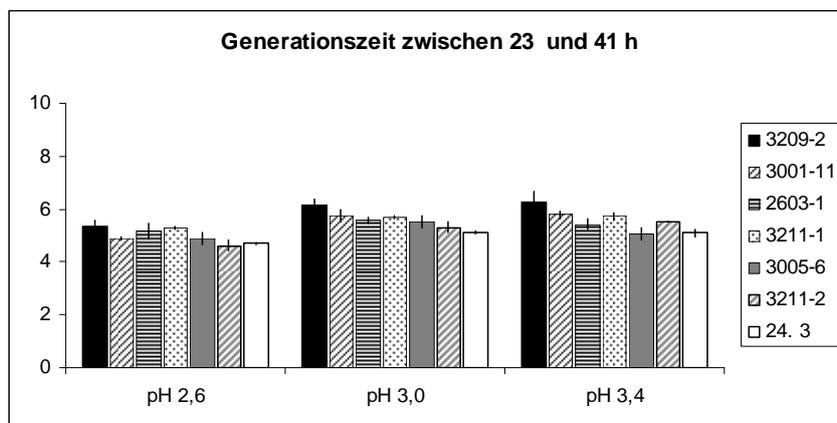


Stamm NCYC 3518:



Generationszeit der Stämme vom Weingut Heynmann-Löwenstein unter verschiedenen Bedingungen

Untersucht wurden die Generationszeiten von *Saccharomyces bayanus* (Stamm 24.3), *S. bayanus x cerevisiae* (Stämme 3005-6, 3211-2) und *S. cerevisiae x kudriazvevii* (Stämme 3209-2, 3211-1, 3001-11, 2603-1) bei unterschiedlichen pH-Werten und Zuckerkonzentrationen.



ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die dem Sinn und Wortlaut anderen Quellen entnommen wurden, sind durch Angabe kenntlich gemacht.

Verena Blättel