

**Isolierung und Identifizierung von wachstumsfördernden
Substanzen für das weinrelevante Bakterium *Oenococcus
oeni* aus Fruchtsäften und Blattextrakten**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich **Biologie**
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sascha Theobald

Geb. am 27.11.1975 in Neustadt/Weinstraße

Mainz, Juli 2008

Tag der mündlichen Prüfung:

20. Februar 2009

知識は勤勉によって行為、
繁栄によって調査に成功が
運命に左右されるどんなに、
理由来る達される左右される。

**Das Wissen hängt vom Studium ab,
durch Taten kommt man zur Vernunft,
Wohlstand erreicht man durch Fleiß,
der Erfolg jedoch hängt ab vom Schicksal.**

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
3. Material und Methoden	13
3.1 Verwendete Bakterien-Stämme	14
3.2 Medien und Lösungen	14
3.2.1 Verwendete Medienzusätze	14
a) Fruchtsäfte und Extrakte	14
b) Aschelösungen der Säfte	15
c) Aminosäurenlösung	15
d) Vitaminlösung	16
e) Catechinmischung	16
f) Epigallocatechingallat-Lösung	16
3.2.2 Medien	17
a) Grundmedium	17
b) Saftmedien	18
c) Mineralstoffmedien und Medien mit Fraktionen der Festphasen-Extraktionen	18
d) <i>Leuconostoc oenos</i> -Medium der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig)	18
e) Synthetisches Basalmedium	19
3.2.3 Citrat-Phosphat-Puffer für die Kationentauscher-SPE	19
3.2.4 Inkubation der Oenokokken in Ringerlösung	19
3.3 Durchführung und Auswertung des Wachstums-Assays in Reagenzgläsern	20
3.4 Durchführung und Auswertung des Wachstums-Assays in Microtiterplatten	21
3.5 Färbung von <i>Oenococcus oeni</i> mit Sytox und DAPI	23
3.6 Durchführung der Festphasen-Extraktionen (SPE)	24
3.6.1 Festphasen-Extraktionen an einer C ₁₈ -Phase	25
3.6.2 Festphasen-Extraktionen an dem Kationentauscher SCX-2	25
3.6.3 Festphasen-Extraktionen an Polyamid (PA)	26
3.6.4 Festphasen-Extraktionen an dem Kunstharz XAD-7	26

3.6.5	Festphasen-Extraktionen an Strata-X	27
3.6.6	Festphasen-Extraktionen an IC-Chelate plus	28
3.6.7	Festphasen-Extraktionen an dem Anionentauscher SAX	28
3.6.8	Festphasen-Extraktionen an einer Carbon-Phase	29
3.7	Durchführung der Carotinoid-Extraktionen mittels Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)	29
3.8	Durchführung der Polyphenol-Extraktionen an Polyvinylpolypyrrolidon	30
3.9	Hydrolyse isolierter Oligosaccharide aus Mangoschalen- und Zitronen- mesokarp-Extrakt	30
3.10	Bestimmung der Enzymaktivitäten mit 4-Nitrophenol	31
3.11	Dünnschichtchromatographie zur Zucker-Identifizierung	32
3.12	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	33
3.12.1	Lösungsmittelvorbereitung für die HPLC	33
3.12.2	HPLC-UV/DAD	33
3.12.3	HPLC-RI	35
3.12.4	HPLC mit Fluoreszenzdetektor	37
3.13	Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	40
3.14	Massenspektrometrische Analysen (MS)	40
3.15	NMR-Analysen	40
4.	Ergebnisse	41
4.1	Wachstums-Screening der <i>Oenococcus oeni</i> -Stämme B2, B5 und B248 mit Säften und Blattextrakten als Additive	41
4.2	Wachstums-Screening verschiedener <i>Oenococcus oeni</i> -Stämme mit Saft- und Blattextraktzusätzen	44
4.2.1	Saft aus geschälten Tomaten und Tomatenschalen-Extrakt	44
4.2.2	Saft aus geschälten Mangos und Mangoschalen-Extrakt	46
4.2.3	Hagebutten-Extrakt	48
4.2.4	Zitronensaft und Extrakt von Zitronenmesokarp und Zitronenschale	50
4.2.5	verschiedene Konzentrationen von Weinblatt-Extrakt	51
4.3	Isolierung und Identifizierung von anorganischen Wachstumsfaktoren	52
4.3.1	Festphasen-Extraktionen	53
4.3.2	Mineralstoff-Analyse von Tomatensaft mittels Atomabsorptions- spektrometrie (AAS)	56

4.3.3	Einfluß von Mangan auf das Wachstum von Oenokokken	57
4.3.4	Wachstumstests mit verschiedenen Konzentrationen von Mangan	59
4.3.5	Wachstumstests mit 67 µm Mangan und 34 mM Mangan mit 20 <i>Oenococcus oeni</i> -Stämmen	61
4.3.6	Mangan-Analysen von weiteren Säften	63
4.3.7	Wachstum unter Zusatz von veraschten Säften	64
4.4	Isolierung und Identifizierung von organischen Wachstumsfaktoren für den Stamm B2	65
4.4.1	Wachstum von Stamm B2 mit Carotinoiden	65
4.4.2	Wachstum von Stamm B2 mit Polyphenolen	66
	a) Polyphenolische Wuchs- und Hemmstoffe für Oenokokken aus grünem Tee	67
4.4.3	Screening in Microtiterplatten mit Tomatensaft und Tomatenschalen- Extrakt als Ausgangsmaterial	71
4.4.4	Screening in Microtiterplatten mit Mangosaft und Mangoschalen-Extrakt als Ausgangsmaterial	73
	a) Identifizierung eines Wachstumsfaktors aus Mangoschalen-Extrakt mittels MS und NMR	74
	b) Identifizierung von Einzelzuckern aus Mangoschalen-Extrakt nach Hydrolyse mittels HPLC-RI und DC	85
	c) Wachstumstests mit den identifizierten Zuckern	87
	d) Ermittlung der Glykosidasen-Aktivität von <i>Oenococcus oeni</i> Stamm B2	88
4.4.5	Screening in Microtiterplatten mit Zitronenmesokarp-Extrakt als Ausgangsmaterial	90
	a) Identifizierung von Wachstumsfaktoren aus Zitronenmesokarp- Extrakt mittels MS und NMR	92
	b) Identifizierung von Einzelzuckern aus Zitronenmesokarp-Extrakt nach Hydrolyse mittels DC und HPLC-RI	93
4.4.6	Wachstumsversuche mit Cystein	95
4.4.7	Wachstumsversuche mit allen identifizierten Wachstumsfaktoren	96
4.4.8	Wachstumskurven von 4 <i>Oenococcus oeni</i> -Stämmen mit allen identifizierten fördernden Substanzen (ACM-Mix)	97

5. Diskussion	99
5.1 Wachstums-Screening von Säften und Blattextrakten als Additive mit verschiedenen <i>Oenococcus oeni</i> -Stämmen	99
5.2 Der anorganische Wachstumsfaktor Mangan	103
5.3 Die organischen Wachstumsfaktoren	108
5.3.1 Arabinose	108
5.3.2 Cystein	112
5.3.3 Polyphenole	112
6. Ausblick	115
7. Veröffentlichungen	116
8. Literatur	117
9. Anhang	133

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ACQ	6-Aminochinolyl-hydroxysuccinimidylcarbammat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Albumin aus Rinderserum
COSY	Correlation Spectroscopy
cv.	Kulturvarietät
CO₂	Kohlenstoffdioxid
d	Duplett im NMR-Spektrum
DABCO	1,1-Diazabicyclo[2.2.2]-octan
DAPI	4',6-Diamidino-phenylindol-hydrochlorid
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Doppelduplett im NMR-Spektrum
ddd	Dreifachduplett im NMR-Spektrum
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EGCG	Epigallocatechingallat
EtOH	Ethanol
H	Hagebutten-Extrakt
H₂O	Wasser
HMBC	Heteronuclear Multiple Band Correlations
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlations
Hz	Hertz
J	Kopplungskonstante
K₂HPO₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LDH	Lactatdehydrogenase
m	Multiplett im NMR-Spektrum
M	Molarität
MLF	Malolaktatfermentation
MnSO₄ x H₂O	Mangansulfat-Monohydrat
ms	Millisekunden

MS	Saft aus geschälten Mangos
MSE	Mangoschalen-Extrakt
MSK	Saft aus ungeschälten Mangos
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion
N	Normalität
Na₂CO₃	Natriumcarbonat
Na₂HPO₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH + H⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NMR	Kernresonanzspektrometrie
OD	optische Dichte
REM	Rasterelektronenmikroskop
R_f-Wert	Dividend aus Wanderstrecke der Probe und des Fließmittels
R_t	Retentionszeit
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
SPE	Festphasen-Extraktion
t	Triplet im NMR-Spektrum
TEAC	antioxidative Kapazität in Trolox-Äquivalenten
TFA	Trifluoressigsäure
TMAOH	Tetramethylammoniumhydroxid
TO	Saft aus geschälten Tomaten
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOK	Saft aus geschälten und fünffach aufkonzentrierten Tomaten
TPP	Thiaminpyrophosphat
TSE	Tomatenschalen-Extrakt
Tween 80	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
vergl.	vergleiche
WB	Weinblatt-Extrakt
z. B.	zum Beispiel
ZM	Extrakt aus Zitronenmesokarp
ZS	Saft aus geschälten Zitronen
ZSE	Zitronenschalen-Extrakt

1. Zusammenfassung

Neben Tomatensaft wurde eine Vielzahl von Säften und Blattextrakten als Medienzusätze auf Wachstumsförderung bei 30 verschiedenen *Oenococcus oeni*-Stämmen getestet. Es zeigte sich eine breite Wachstumsförderung bei allen Zusätzen mit Ausnahme von Zitronensaft, sodass die Wachstumsfaktoren keine tomatenspezifischen Inhaltsstoffe sein können und eher ubiquitär in der Pflanzenwelt vorkommen. Das Ausmaß der Wachstumsförderung war stammabhängig sehr unterschiedlich und Tomatensaft stellte keineswegs für alle Stämme den optimalen Medienzusatz dar. Durch Schälen der Früchte war eine für die Analytik hilfreiche Abtrennung schalenspezifischer Inhaltsstoffe möglich, wobei auch die Schalenextrakte großes Potential für die Suche nach Wachstumsfaktoren offenbarten und die Wichtigkeit einer Auftrennung der Frucht in die verschiedenen Fruchtbereiche betonte. Aus Tomatensaft konnte analytisch der anorganische Wachstumsfaktor Mangan identifiziert werden. Die größten Zelldichten der Oenokokken-Stämme wurden hierbei bei 67 μM und 34 mM Manganzusatz erreicht. Bei 13 von 20 getesteten Oenokokkenstämmen konnte bei Zusatz von 34 mM Mangan der Tomatensaft ersetzt werden, bei 4 Stämmen (z. B. Stamm B2) fehlten jedoch noch weitere Wachstumsfaktoren und bei 3 Stämmen (z. B. Stamm B120) kam es zu einem verfrühten Absterben. Da weitere Mineralstoffe sowie veraschte Säfte und Blattextrakte keinen positiven Einfluß auf die Oenokokken-Zelldichte hatten, wurde mittels semipräparativer HPLC nach zusätzlichen organischen Wachstumsfaktoren für den Stamm B2 gesucht. Hierzu wurde der nachfolgende Wachstums-Assay miniaturisiert und erfolgreich auf Microtiterplatten etabliert. Es gelang die Isolierung und Identifizierung eines wachstumsfördernden Trisaccharides aus Mangoschalen-Extrakt, das aus den Zuckern Glucose, Rhamnose und Arabinose bestand. Von den monomeren Zuckern erhöhte lediglich die Arabinose die Zelldichte, das Optimum lag bei 1,5 g/l. Auch aus Zitronenmesokarp-Extrakt war die Isolierung eines wachstumsfördernden arabinosehaltigen Disaccharides möglich, die Menge reichte jedoch noch nicht für eine genaue Identifizierung aus. Desweiteren erwies sich 1,5 g/l Cystein als wachstumsstimulierend. Ein Zusatz aller gefundenen Wachstumsfaktoren (34 mM Mangan, 1,5 g/l Arabinose und 1,5 g/l Cystein) ersetzte den Tomatensaft bei weiteren Oenokokken-Stämmen (z.B. Stamm B120) komplett, wobei bei allen Stämmen sogar eine schnellere Anzucht erfolgte. Neben dem Tomatensaft war auch der Zusatz von Hefeextrakt zum Grundmedium nicht mehr nötig, sodass ein neues vereinfachtes Medium für die Anzucht von Oenokokken mit komplexen Nährstoffansprüchen

vorgeschlagen werden konnte. Lediglich beim Stamm B2 zeigte sich noch ein OD-Unterschied von 0,2 in der stationären Phase, der nach Adsorptionsversuchen an Polyvinylpolypyrrolidon auf noch unidentifizierte Polyphenole im Tomatensaft zurückzuführen ist. Aus grünem Tee erwies sich das Polyphenol Epigallocatechingallat (EGCG) konzentrationsabhängig sowohl als Hemmstoff (>550 mg/l EGCG) als auch Wachstumsfaktor (400-500 mg/l EGCG) für den Oenokokken-Stamm B2. Der hemmende als auch der fördernde Einfluss auf das Wachstum wurde mittels Sytox/DAPI-Färbung bestätigt. Der sogenannte „Tomatensaft-Faktor“ ist also nicht eine spezielle Substanz, sondern das synergistische Zusammenwirken mehrerer einfacher Substanzen wie Mineralstoffe, Aminosäuren, Kohlenhydrate und Polyphenole. Auch sind die Oenokokken-Stämme bezüglich ihres Nährstoffbedarfes sehr unterschiedlich, sodass für jeden Stamm einzeln das optimale Substratspektrum ermittelt werden muss.

2. Einleitung

Phylogenetisch lassen sich Oenokokken in die Familie der Milchsäurebakterien (Lactobacteriaceae) einordnen. Sie sind morphologisch als ovale Kokken (0,5 – 1,0 µm x 0,7 – 1,5 µm, Deibel et al. 1974) mit einer Tendenz zur Paar- und Kettenbildung charakterisiert. Die Kettenlänge variiert von Abhängigkeit von der Wachstumsphase und dem Substrat (Abb. 1A und 1B). Ihre frühere Bezeichnung lautete *Leuconostoc oenos*, die Reklassifizierung als eigene Gattung *Oenococcus oeni* erfolgte auf Basis der 16S rRNA Sequenz (Dicks et al. 1995). Lange Zeit war man der Meinung, dass die Gattung der Oenokokken nur aus einer einzigen Art, nämlich *Oenococcus oeni* (Abb. 1C) besteht, da die zahlreichen Isolate aus Traubenmost und Rebenblättern ausnahmslos dieser Art zuzuordnen waren. Vor kurzem gelang es jedoch aus dem japanischem Schnaps Shochu eine zweite Art, *Oenococcus kitaharae* sp. nov., zu isolieren (Endo und Okada 2006).

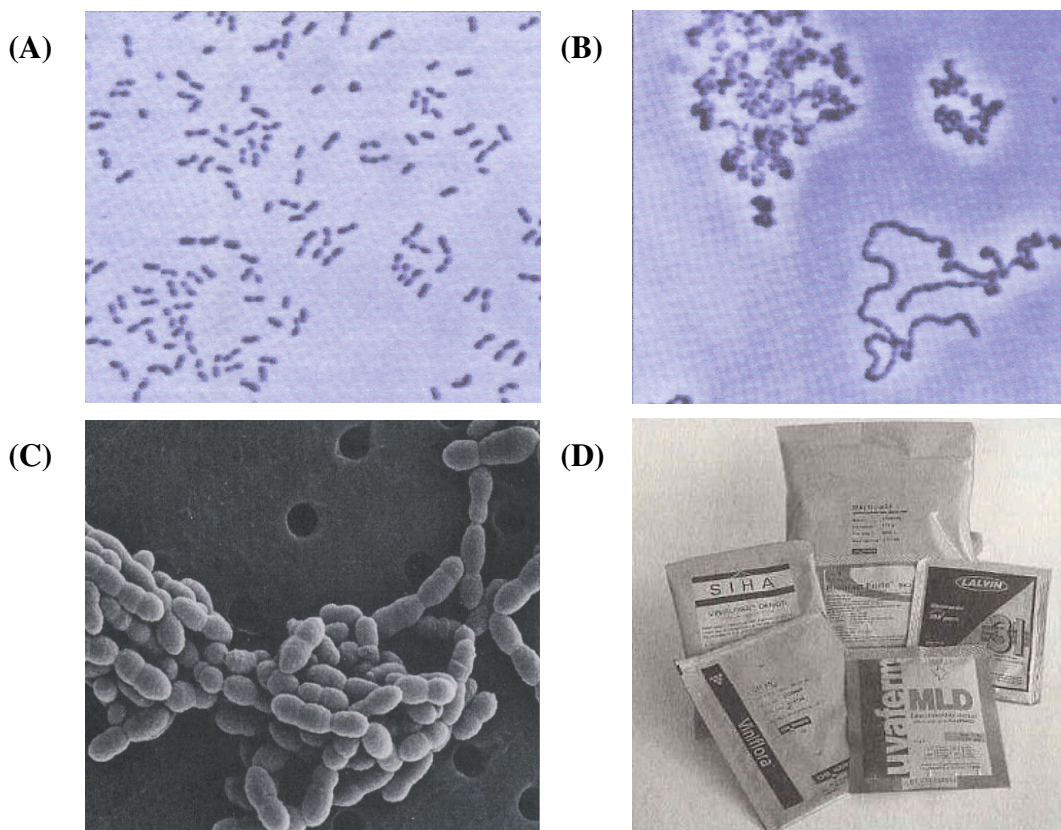


Abb. 1: *Oenococcus oeni*. (A) In einem frühen Vermehrungsstadium, Vergrößerung 1200x (Lüthi und Vetsch 1981). (B) Gegen Ende des Wachstums, Vergrößerung 1200x (Lemperle und Kerner 1982). (C) REM-Aufnahme (<http://www.agr.hokudai.ac.jp/jslab/journal151.html>). (D) Gefriergetrocknet als Starterkultur für den biologischen Säureabbau im Wein (Steidl und Leindl 2002).

Wie alle Milchsäurebakterien gehören die Oenokokken der Gruppe der grampositiven Bakterien an, die sich durch einen niedrigen GC-Gehalt und das Ausbleiben der Sporenbildung auszeichnen. Sie enthalten keine Hämine (Katalase, Cytochrome), haben keine Geißeln und sind obligate Gärer, die allerdings in Anwesenheit von Sauerstoff wachsen können. *Oenococcus oeni* zeichnet sich gegenüber anderen Milchsäurebakterien wie beispielsweise *Leuconostoc* insbesondere durch seine Acidophilie und hohe Alkohol-Toleranz aus, sodass ein Wachstum sowohl bei pH 3,0 als auch über 10 Vol.-% Ethanolgehalt noch möglich ist (van Vuuren und Dicks 1993, Versari et al. 1999). Dabei scheinen Stressproteine (Hitzeschock, Transport) und besondere Membranlipide („Lactobacillic acid“) eine positive Rolle zu spielen (Guzzo et al. 2000, Guerrini et al. 2001, Teixeira et al. 2002, Da Silveira et al. 2004, Chu-Ky et al. 2005, Coucheney et al. 2005).

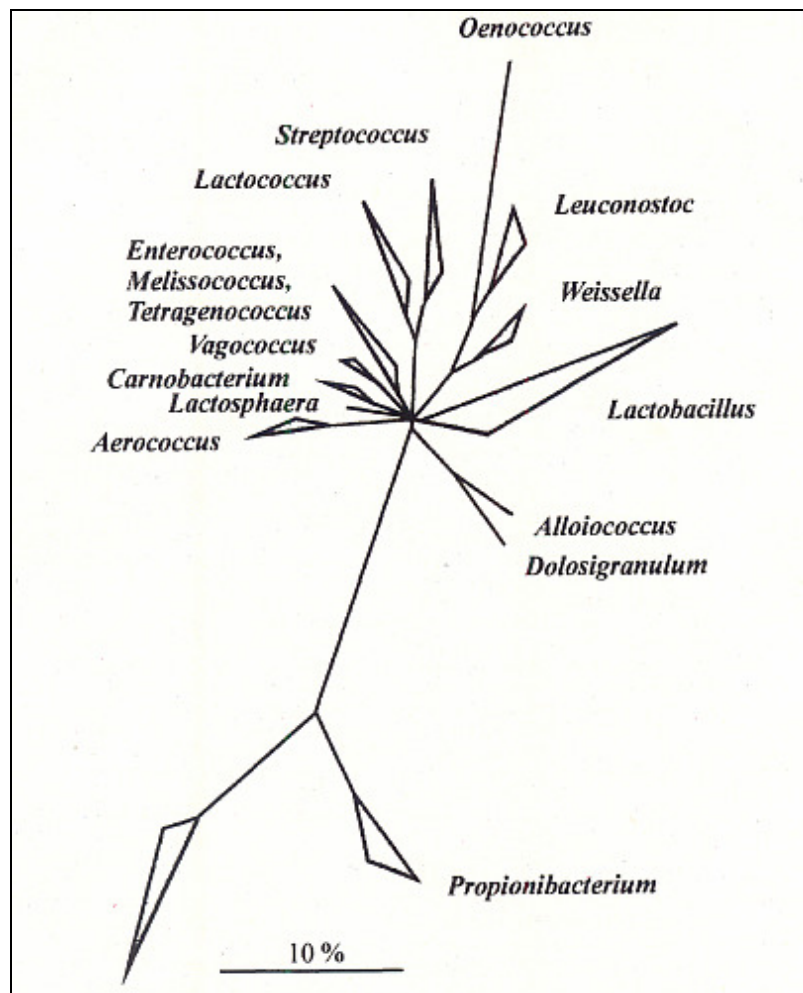


Abb. 2: Phylogenetische Gruppen der Milchsäurebakterien und verwandten grampositiven Bakterien mit niedrigem (oberer Teil) bzw. hohem (unterer Teil) GC-Gehalt in der DNA (modifiziert nach Schleifer und Ludwig, 1996). Der Maßstab entspricht einer phylogenetischen Distanz von 10%.

Oenokokken weisen relativ wenig DNA-Homologie mit allen anderen Gattungen der Milchsäurebakterien auf, genetisch besteht die höchste Ähnlichkeit zu den Gattungen *Leuconostoc* und *Weissella* (Stiles und Holzapfel 1997; Abb. 2). Aus diesen Gründen wurde *Oenococcus oeni* die Eigenschaft eines schnell evolvierenden Organismus zugeschrieben (Yang und Woese 1989). Dies wurde nach Sequenzvergleichen der Gene der DNA-abhängigen RNA-Polymerase allerdings in Frage gestellt (Morse et al. 1996).

Das besondere Interesse an dem Milchsäurebakterium *Oenococcus oeni* liegt in seiner Fähigkeit zur Weinveredelung. Es gehört zu den sogenannten malolaktischen Bakterien, die die Fähigkeit zur direkten Decarboxylierung der Äpfelsäure zu Milchsäure durch das Enzym Malatcarboxylyase, dem sogenannten Malolaktatenzym, besitzen (Caspritz und Radler 1983). Diese Fähigkeit ist in der biologischen Welt nur in einigen Gattungen von Milchsäurebakterien wie beispielsweise *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* und *Pediococcus* anzutreffen (Fugelsang 1997). Mit der Malolaktatfermentation (Abb. 3) ist *Oenococcus oeni* in der Lage, ein Membranpotential aufzubauen, und durch dieses mittels F_1F_0 -ATPase Energie für die Zelle zu konservieren (Poolman et al. 1991, Salema et al. 1996). Die Malolaktatfermentation ist keine Gärung im herkömmlichen Sinne, sondern eine Decarboxylierung. Dabei wird einfach protoniertes H-Malat über einen Carrier in die Zelle aufgenommen und durch das Malolaktatenzym decarboxyliert. Die Produkte des Malolaktatenzyms der Milchsäurebakterien sind Laktat und Kohlenstoffdioxid. Die Gene für den Malat-Transporter *mleP* und das Malolaktatenzym *mleA* oder *mleS* sind identifiziert und sequenziert worden (Labarre et al. 1996, Lonvaud-Funel 1999). Das entstandene Lactat verlässt die Zelle vermutlich durch Diffusion, wobei ein Proton über die Membran transportiert wird (Salema et al. 1994). Ob hier ein Carrier beteiligt ist, wurde noch nicht geklärt. Bei der Malolaktatfermentation wird nach diesem Mechanismus ein H^+ -Potential von $1 H^+$ pro Malat über der Membran aufgebaut. Das Potential wird dabei ausschließlich durch den Transport der Substrate und nicht durch die Decarboxylierungsreaktion gebildet. Damit wäre es möglich, 0,25 bis 0,3 Mol ATP pro Mol umgesetztes Malat zu bilden. Die Malolaktatgärung fördert somit das Zellwachstum bei Co-Fermentation mit Glucose durch Erhöhung der ATP-Ausbeute (Loubiere et al. 1992). Berichte, dass *Oenococcus oeni* auch mit Malat alleine Wachstum unterhalten kann, sind bisher nicht veröffentlicht worden.

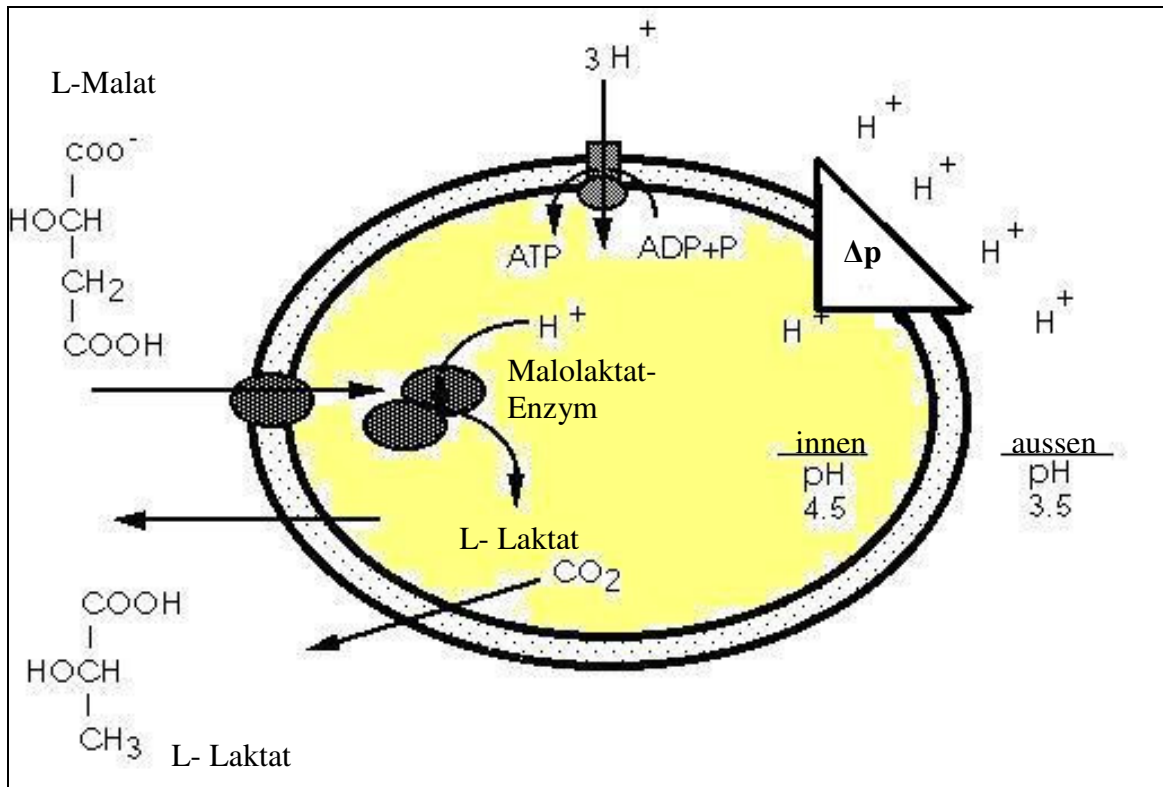


Abb. 3: Malolaktatfermentation bei *Oenococcus oeni*. Modifiziert nach Konings et al. 1997 (http://www.mm.helsinki.fi/users/lindstro/Opetus/Mikro_400/Seminaarityot/anne.html)

Im biologischen Säureabbau wird durch die Decarboxylierung der zweiwertigen Äpfelsäure (Malat) zur einwertigen Milchsäure (Laktat) der Gesamtsäuregehalt des Weines verringert und der pH-Wert wird angehoben, was zur mikrobiologischen Stabilität des Weines vor der Abfüllung in Flaschen beiträgt (Davis et al. 1985, van Vuuren und Dicks 1993). Der Vorteil gegenüber einer chemischen Entsäuerung besteht hauptsächlich darin, dass andere geschmackstragende organischen Säuren im Produkt erhalten bleiben. Der Einsatz von rekombinanten Hefestämmen zur Durchführung des BSA ist keine Alternative, da die Umsetzung von Malat in Laktat nur eine von zahlreichen biochemischen Reaktionen ist, die teilweise in erwünschten Nebenprodukten resultieren (Lonvaud-Funel 1999). Die meisten Weine enthalten 0,55 – 0,85 g/100g titrierbare Säure, die durch die Malolaktatfermentation (MLF) um 0,1 – 0,3 g/100g verringert werden kann (Bousbouras und Kunkee 1971, Giannakopoulos et al. 1984). In deutschen Mosten liegt sogar sorten- und reifeabhängig zwischen 0,9 – 2 g/100g Gesamtsäure vor (Bergner und Lemperle 1998). Vor allem in säurereichen Weinen nördlicher Anbauggebiete wie Deutschland, Frankreich und die östliche USA spielt die MLF durch *Oenococcus oeni* daher eine wichtige Rolle, während sie in säurearmen Weinen südlicher Anbauggebiete (z.B. Südafrika, Kalifornien und Australien) unerwünscht ist (Wibowo et al. 1985). Durch die zu starke Reduzierung der Gesamtsäure

könnte aus solchen Weinen ein flacher, abgestandener Wein entstehen und das Wachstum von unerwünschten Bakterien wie *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus casei* und *Lactobacillus brevis* gefördert werden (Abb. 4; Rankine und Bridson 1971). *Lactobacillus casei* bildet biogene Amine wie z.B. Histamin, *Pediococcus pentosaceus* stört den BSA durch Hemmung von *Oenococcus oeni* (Lonvaud-Funel und Joyeux 1993) und *Lactobacillus brevis* verursacht Mäuselton. In südlichen Anbaugebieten werden deshalb eher Hemmstoffe für den biologischen Säureabbau (BSA) gesucht, zumal dieser auch spontan erfolgen kann, da die Oenokokken auf den Trauben und den Blättern leben und bei der Lese sowie der weiteren Verarbeitung in den Most gelangen. In nördlichen Anbaugebieten wird der BSA hingegen meist durch den gezielten Einsatz von gefriergetrockneten *Oenococcus*-Starterkulturen eingeleitet, die auf dem Markt erhältlich sind und für unterschiedliche Einsatzbedingungen optimiert wurden (Abb. 1D).

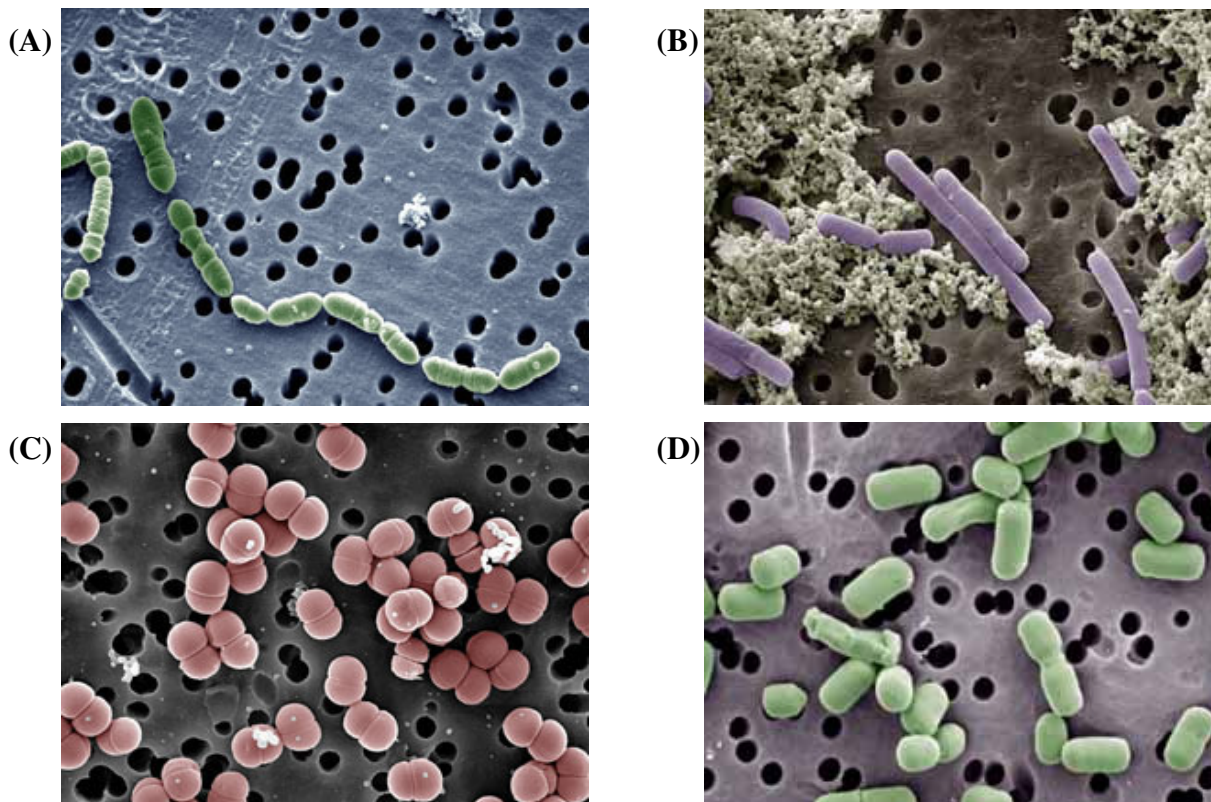


Abb. 4: REM-Aufnahmen erwünschter und unerwünschter Milchsäurebakterien im Wein (Falschfarben-Darstellung; Fotos: Jeff Broadbent, Utah State University). (A) *Oenococcus oeni*, (B) *Lactobacillus casei*, (C) *Pediococcus pentosaceus*, (D) *Lactobacillus brevis*

Neben der Entsäuerung sowie der erzielten bakteriellen Stabilität, zu der auch der Verbrauch von Nährstoffen sowie der Produktion von Bacteriocinen durch Milchsäurebakterien (Rojo-Bezares et al. 2007) beitragen, treten als Folge des BSA einige wichtige Aromaveränderungen

im Wein auf. Diese werden durch die Nebenprodukte der Milchsäurebakterien beim BSA verursacht. In Abhängigkeit von der verwendeten Gattung und auch Stamm der Milchsäurebakterien entstehen beispielsweise Essigsäure, Diacetyl, Acetoin, 2,3-Butandiol, Ethyllactat, Diethylsuccinat und Acrolein, die das Aroma je nach vorhandener Menge negativ beeinflussen können und unerwünscht sind. Auch Farbaufhellungen bei Rotweinen um bis zu 30% durch pH-Änderungen und Verlust an freien Anthocyanen bei Einsatz von *Leuconostoc* spp. wurden aufgrund falsch gewählter Bakterienstämme beobachtet (Vetsch und Lüthi 1964, Bauer 1992, Krieger 2002). Mannit-Stich kann auftreten, wenn Milchsäurebakterien im Wein vorhandene Fructose zu Mannit reduzieren (Jakob et al. 1997, Eder und Glatt 2000). Weiterhin können biogene Amine aus dem Aminosäurestoffwechsel der Milchsäurebakterien ein gesundheitliches Problem darstellen (Liu et al. 1996, Coton et al. 1998). Die Bildung von biogenen Aminen durch *Oenococcus oeni* ist jedoch sehr gering und hat keinen Einfluß auf Sensorik und Gesundheit (Moreno-Arribas et al. 2003, Pramateftaki et al. 2006, Costantini et al. 2006). *Oenococcus oeni* ist aufgrund seines Stoffwechsels unter den Milchsäurebakterien als Starterkultur am besten geeignet, obwohl auch die Oenokokken Nebenprodukte bilden können, die sich unter Umständen nachteilig auf das Aroma auswirken (Radler 1972, Lonvaud-Funel 1999, Dittrich und Großmann 2005).

Im Citratstoffwechsel werden Diacetyl, Acetoin und Acetat gebildet. Die anfänglichen Citratgehalte im Wein betragen größenordnungsmäßig 300 mg/l. Da die Schwellenwerte für die Wahrnehmung von Diacetyl und Acetoin in Weißwein durchschnittlich bei jeweils etwa 5 bzw. 500 mg/l (in Rotwein sind sie etwa doppelt so hoch) liegen, spielt im Citratstoffwechsel hauptsächlich Diacetyl (Konzentration im Wein normalerweise 5 – 10 mg/l) eine Rolle. Diacetyl ist für ein butterähnliches Aroma verantwortlich, das von den meisten Menschen bei zu hoher Konzentration als negativ empfunden wird. Einen bedeutenden Weinefehler stellt die Bildung von Essigsäure dar. Essigsäure wird vor allem aus Restzuckern gebildet. Dafür sind hauptsächlich heterofermentative Milchsäurebakterien wie *Oenococcus oeni* verantwortlich (Lonvaud-Funel 1999, Schneider 2000). Sie setzen Hexosen zu D-Lactat, Ethanol und CO₂ um. Unter bestimmten Stoffwechselsituationen werden oft beträchtliche Mengen an Acetat, und daran gekoppelt, weitere Produkte gebildet. Gehalte von mehr als 1 g/l D-Lactat gelten als Indikator für einen durch Milchsäurebakterien verdorbenen Wein. Weine mit Essigsäurekonzentrationen von mehr als 0,6 g/l haben den charakteristischen „Essigstich“ und zeichnen sich durch einen kratzigen Abgang aus. Ab einer Acetat-Konzentration von 1 g/l gilt ein Weißwein als nicht mehr verkäuflich (Rotwein ab 1,2 g/l). *Oenococcus oeni* macht wegen

seiner hervorragenden Adaptation an das Wein-Milieu den größten, oft sogar alleinigen Teil der Bakterienpopulation aus.

Oenococcus oeni gewinnt Energie mittels heterofermentativer Milchsäuregärung, da die Hauptenzyme der Glykolyse (Aldolase und Triosephosphat-Isomerase) fehlen. Dabei wird Glucose zu gleichen Mengen D-Lactat, Ethanol und CO₂ vergoren, während homofermentative Milchsäurebakterien (z. B. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, die *Pediococcus*-Arten) zu 90% Lactat bilden. Beispiele für weitere homofermentative Milchsäurebakterien sind *Leuconostoc cremoris*, *Lactobacillus brevis* und die *Weissella*-Arten. Die Stämme von *Oenococcus oeni* können von den nicht-acidophilen *Leuconostoc*-Arten durch ihre Fähigkeit zur Vergärung von Saccharose, Lactose und Maltose unterschieden werden (Garvie 1986). Fast alle Oenokokken-Stämme können Glucose und Fructose fermentieren, während unterschiedliche Ergebnisse zur Verwertung von Trehalose bekannt wurden (Garvie 1986, Pardo et al. 1988). Der Hexosestoffwechsel von *Oenococcus oeni* ist in Abb. 5 dargestellt. Glucose-6-phosphat wird im oxidativen Teil der Gärung über den Pentosephosphatweg zu Xylulose-5-phosphat und CO₂ oxidiert, wobei vier Reduktionsäquivalente (2x NAD(P)H + H⁺) entstehen. Xylulose-5-phosphat wird darauf durch eine TPP-abhängige Phosphoketolase in Glycerinaldehyd-3-phosphat und Acetyl-Phosphat gespalten (Phosphoketolaseweg). Das Endprodukt ist D-Lactat. Acetyl-Phosphat wird im reduktiven Teil der Fermentation zu Ethanol reduziert („Ethanolweg“), wodurch das aus dem oxidativen Teil stammende NADH wieder zu NAD⁺ reoxidiert wird und erneut für die Oxidation von Glucose-6-phosphat zur Verfügung steht. Zusätzlich zu dieser heterofermentativen Milchsäuregärung bildet *Oenococcus oeni* jedoch aus Glucose auch Erythrit und Essigsäure. Erythrit entsteht durch Isomerisierung von Glucose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat, welches durch Phosphoketolase in Erythrose-4-phosphat und Acetyl-Phosphat gespalten wird. Erythrose-4-phosphat wird zu Erythrit reduziert, und aus Acetyl-Phosphat entsteht Acetat, wobei die energiereiche Phosphatbindung durch die Acetatkinase in Form von ATP konserviert wird (Veiga-Da-Cunha et al. 1992, 1993). Die Erythritbildung stellt bei *Oenococcus oeni* einen Weg zur Reoxidation von NAD(P)H dar. Als Folge dient ein Teil des Acetyl-Phosphates nicht als Elektronenakzeptor für die Reoxidation von NAD(P)H und wird nach Dephosphorylierung und ATP-Bildung als Acetat ausgeschieden. Es war gezeigt worden, dass *Oenococcus oeni* den Erythritweg aufgrund einer Limitierung im Ethanolweg nutzt (Richter et al. 2000, 2001). Die Kapazität des Ethanolweges zur Reoxidation von NAD(P)H ist wegen der geringen spezifischen Aktivität der

Acetaldehyddehydrogenase zu niedrig, um alleine die Reoxidation des im Pentosephosphatweg gebildeten NAD(P)H zu bewerkstelligen. Die Acetaldehyddehydrogenase benötigt Coenzym A als Cofaktor. Durch einen Mangel an Coenzym A, der bei einer Unterversorgung mit Pantothersäure auftritt, wird die Limitierung des Substratumsatzes der Acetaldehyddehydrogenase sogar noch gravierender. Wenn *Oenococcus oeni* dagegen während des Wachstums ausreichend Pantothersäure zur Verfügung steht, wird die Bildung von Erythrit und Essigsäure fast vollständig unterdrückt. Der Erythritweg stellt somit einen Nebenweg dar, der eine Entsorgung der Reduktionsäquivalente bei Limitierung des Ethanolweges ermöglicht und somit höhere Stoffwechsel- und Wachstumsraten erlaubt. Die Ausscheidung von Essigsäure ist an die Bildung von Erythrit gekoppelt und kann durch die Verabreichung von Pantothersäure abgeschwächt werden. Die Aufnahme von Hexosen in die Zelle erfolgt mit hoher Affinität über einen Symport mit H^+ , aber mit sehr niedriger spezifischer Aktivität. Zusätzlich werden Hexosen mit ausreichender Aktivität über vermutlich erleichterte Diffusion in die Zelle transportiert, allerdings nur bei hohen Hexosekonzentrationen (Richter 2004).

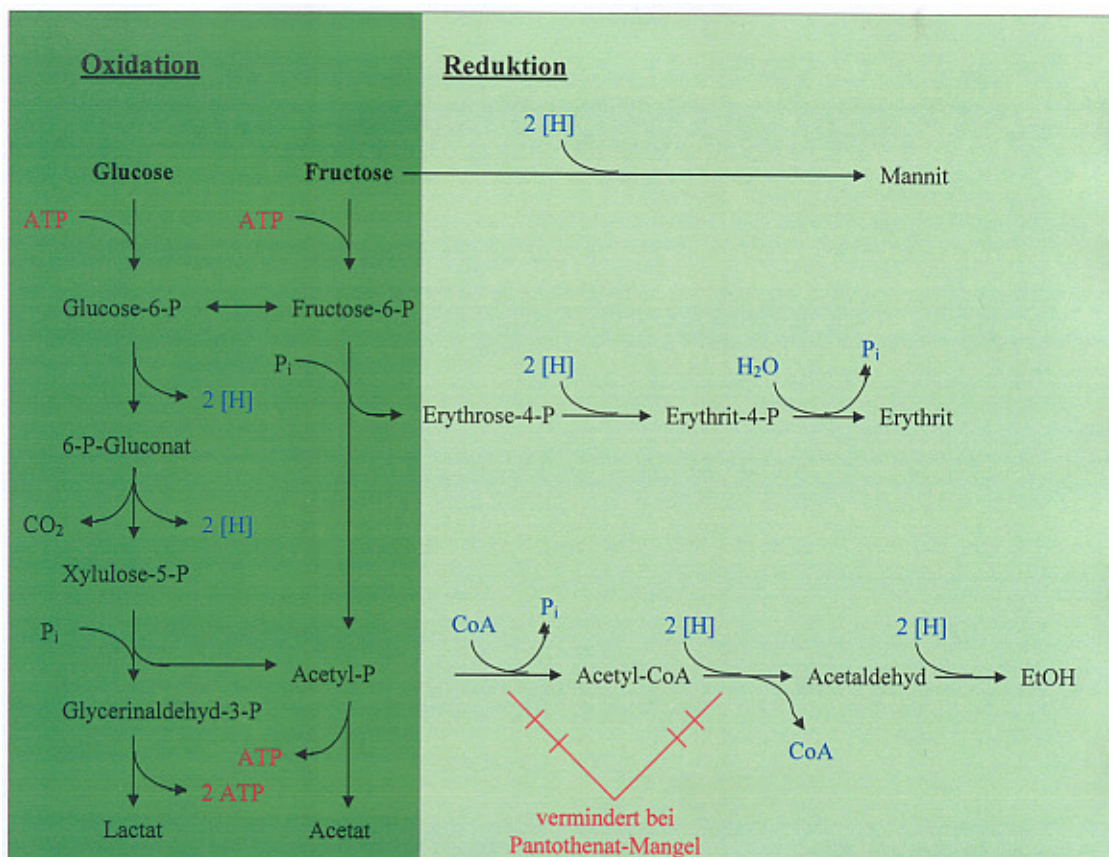


Abb. 5: Hexosestoffwechsel von *Oenococcus oeni* (Veiga-Da-Cunha et al. 1993, ergänzt nach Richter et al. 2001).

Fructose wird nach Phosphorylierung und Isomerisierung zu Glucose-6-phosphat ebenfalls im Phosphoketolaseweg umgesetzt. Allerdings dient ein großer Teil der Fructose (40 bis 90 Prozent) als Elektronenakzeptor und wird direkt zu Mannit reduziert. Dieser Anteil dient nicht der ATP-Erzeugung (Salou et al. 1994). Durch die Funktion von Fructose als alternativer Elektronenakzeptor wird die Notwendigkeit der NAD(P)H-Reoxidation über den Ethanolweg aufgehoben und ein Großteil des Acetyl-Phosphates nach ATP-Bildung als Acetat ausgeschieden. Der Anteil von Fructose, der zu Mannit reduziert wird, ist jedoch je nach experimentellen Bedingungen sehr unterschiedlich und dadurch auch die relative Menge an Essigsäure.

Da Oenokokken das Enzym Phosphoketolase besitzen, sollten sie die Fähigkeit zur Fermentation von Pentosen besitzen. Dennoch vergären einige Stämme keine Xylose und Arabinose (Garvie 1986). Einige Autoren schlugen deshalb vor, diese Stämme als *Leuconostoc gracile* zu reklassifizieren und empfahlen den Gattungsnamen *Leuconostoc oinos* für Xylose und Arabinose vergärende Stämme (Peynaud und Domercq 1968). Diese Nomenklatur setzte sich aufgrund der genetischen Ähnlichkeit der Stämme und der später erfolgten Umbenennung in *Oenococcus oeni* nie durch.

Wie viele nicht-acidophile Milchsäurebakterien produzieren Oenokokken ebenfalls extrazelluläre Polysaccharide (Garvie und Farrow 1980): 20 von 53 untersuchten Stämmen zeigten diese Eigenschaft in einem Medium mit 25% Traubensaft (Dicks et al. 1990). Die Produktion von Polysacchariden kann die Weinqualität und die Filtrierbarkeit beeinflussen (Wibowo et al. 1985).

Neben den Zuckern benötigen die Oenokokken zum Wachstum komplexe Substrate, die eine Vielzahl von Aminosäuren und Vitaminen enthalten (Garvie 1967). Oenokokken benötigen bis zu 16 Aminosäuren, nur Glutaminsäure und Valin scheinen nicht für alle Stämme notwendig zu sein. α -Aminobuttersäure, Asparagin und Lysin förderten bei keinem Stamm das Wachstum, können also synthetisiert werden (Weiller und Radler 1972). Alle Stämme brauchen die Vitamine Nicotinsäure, Pantothersäure, Folsäure und Thiamin. Mit Pyridoxol und Biotin wurde zumindest das Wachstum gefördert. Dagegen zeigten Inosit, Cobalamin und 4-Aminobenzoessäure keine fördernde Wirkung auf das Wachstum der untersuchten Bakterien. Der wachstumsfördernde Effekt der Hefe lässt sich damit ebenfalls erklären, dass die Hefe Aminosäuren und Vitamine produziert, welche die zum Teil auf den Hefezellen

sitzenden Bakterien benötigen (Dittrich 1987). Da beim Absterben der Zelle ihre Semipermeabilität zusammenbricht, diffundieren lösliche Zellinhaltsstoffe dann rasch in das äußere Medium. Die Autolyse, also der enzymatische Abbau hochmolekularer Zellinhaltsstoffe, speist diesen Stoffaustritt aus der toten Zelle fortwährend, sodass die Milchsäurebakterien nach dem Tode der Hefezellen erst recht von ihnen profitieren können. Im Gegensatz zum wenig beeinflussten Eiweißgehalt ist nach dem BSA eine starke Abnahme des organisch gebundenen Stickstoffes festzustellen. Sie erklärt sich aus der Zunahme des Ammoniak-Stickstoffes. Die Entstehung des Ammoniaks erfolgt durch *Oenococcus oeni* aus der Aminosäure L-Arginin, die in Mosten und Weinen in relativ hoher Menge (bis zu ca. 1 g/l) vorkommt. Dabei entsteht zunächst Harnstoff, der in Ammoniak zerfällt, sowie L-Ornithin, das durch die Aminosäure-Decarboxylase-Aktivität in das biogene Amin Putrescin umgewandelt werden kann. Die Bildung von Putrescin und vor allem Histamin ist jedoch bei Oenokokken nur schwach ausgeprägt und eher auf *Pediococcus cerevisiae*, *Pediococcus parvulus* und *Lactobacillus hilgardii* sowie eventuell Metabiose zurückzuführen (Landete et al. 2005, Mangani et al. 2005). Die biologische Funktion der Ornithin-Entstehung wie auch der Aminbildung ist wahrscheinlich die pH-Wert-Erhöhung des Substrates, wobei der Arginin-Abbau sogar beide Möglichkeiten vereinigt. Die Oenokokken können dadurch den pH-Wert etwas anheben und sich dann wieder vermehren, um noch mehr Kohlenhydrate umsetzen zu können (Dittrich 2005). Die Entstehung von Citrullin beim Arginin-Abbau sollte allerdings durch Deaktivierung der Oenokokken nach der Malolaktatfermentation vermieden werden, da Citrullin ein Vorläufer der carcinogenen Verbindung Ethylcarbammat ist (Terrade und Mira de Orduna 2006).

Zusätzlich sind noch weitere Wuchsstoffe besonderer Struktur notwendig, die beispielsweise in Fruchtsäften von Tomate und Traube vorkommen. Es ist schon sehr lange bekannt, dass der Zusatz von Fruchtsäften und Gemüse-Extrakten zum Medium das Wachstum von Milchsäurebakterien stark fördert. Zuerst beobachtete man 1924 die positiven Effekte von Tomatensaft auf das Wachstum von Milchsäurebakterien (Mickle 1924, Mickle und Breed 1925). Kuicken et al. (1943) beschrieben daraufhin einen hitze- und säureresistenten Wachstumsfaktor aus Tomatensaft, der selbst bei Erhitzen unter Rückfluß mit 8 N Schwefelsäure für 24 Stunden stabil blieb. Metcalf et al. (1946) beobachteten ebenfalls ein hitzestabiles Wachstumsstimulans für Milchsäurebakterien aus Tomatensaft, Kohl und anderen Gemüsen. Die Autoren zeigten, dass Thiamin teilweise für die erreichte höhere Zelldichte verantwortlich ist, aber wahrscheinlich mit einer noch unbekanntem hitzestabilen

Substanz zusammenwirkte. Auch in Spargelsaft fand man eine hitzestabile Substanz (kein Vitamin), die das Wachstum des Milchsäurebakteriums *Lactobacillus fermenti* förderte (Snell und Lewis 1953). Amachi et al. sowie Imamoto et al. isolierten und synthetisierten schließlich ein Glucosid der Pantothenensäure (Abb. 6) als Wuchsstoff aus Tomatensaft (Amachi und Yoshizumi 1969, Amachi et al. 1971, Imamoto et al. 1973).

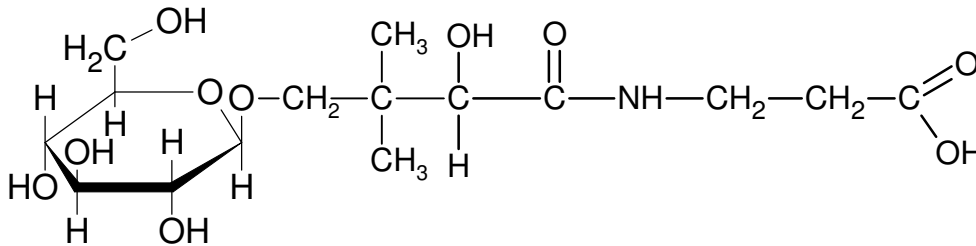


Abb. 6: 4'-O-(β-D-glucopyranosyl)-D (R)-pantothenensäure nach Amachi et al. 1971.

Pantothenensäure wirkt sich jedoch lediglich auf den Stoffwechselweg von *Oenococcus oeni* aus und bewirkt keine Wachstumsstimulierung. Sie dient lediglich als Bestandteil von Coenzym A als Cofaktor für einige Enzyme wie Acetaldehyddehydrogenase und Phosphotransacetylase, die bei der Ethanolbildung eine Rolle spielen (Richter et al. 2001). Eine Wachstumssteigerung konnte nicht bestätigt werden. Seither wird bis heute immer lapidar der Name „Tomatensaftfaktor“ für die Wachstumsfaktoren für Oenokokken aus den Fruchtsäften benutzt (Boulton et al. 1996, Lothar 1999). Die genauen chemischen Verbindungen sowie deren Struktur sind jedoch immer noch unbekannt.

Ein großes Problem beim Einsatz von *Oenococcus oeni* als Starterkultur für den Säureabbau ist immer noch das Überleben und die Vermehrung der Bakterien im Wein, da dieser häufig nicht alle dafür notwendigen Substanzen enthält. Eine problemlose Kultivierung war bisher nur in peptonhaltigen komplexen Medien mit Zusatz von z. B. Tomatensaft möglich (Garvie und Mabbitt 1967, De Man et al. 1960, Irrmann 1978). Starterkulturen, die unter diesen Bedingungen gewachsen sind, können jedoch den Geschmack des Weines nachteilig beeinflussen. Eine Zugabe dieser komplexen Stoffe zum Wein zur Stabilisierung der Oenokokken scheidet grundsätzlich aus. Deshalb ist es das Ziel dieser Untersuchungen, ein geeignetes Medium mit einer definierten Zusammensetzung von Einzelsubstanzen für die Produktion von Starterkulturen zu entwickeln. Dazu ist es notwendig, Wachstumsfaktoren aus Biomaterialien zu isolieren und zu charakterisieren. Durch dosisoptimierte Zugabe dieser Stoffe zu einem geeigneten Grundmedium könnten das Wachstum der Oenokokken sowie die

Zuverlässigkeit und die Geschwindigkeit des biologischen Säureabbaus verbessert werden. Auch eröffnen sich durch eine sichere Kultivierungsmethode neue Möglichkeiten für eine standardisierte Identifizierung und physiologischen Charakterisierung von Oenokokken mittels biochemischer Verfahren, ähnlich wie sie in der medizinischen Diagnostik für pathogene Mikroorganismen angewendet werden. Bisher sind diese Methoden wegen den sehr komplexen Nährstoffansprüchen und der damit verbundenen erschwerten Kultivierbarkeit der Oenokokken gescheitert.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Bakterien-Stämme

Es wurden folgende 30 verschiedene Stämme von *Oenococcus oeni* aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) verwendet:

B1, B2, B3, B4, B5, B64, B65, B66, B70, B120, B122, B139 (Typ-Stamm, DSM 20252), B211, B213, B217, B232, B233, B234, B235, B236, B237, B241, B242, B243, B244, B245, B246, B247, B248 und B249.

3.2 Medien und Lösungen

3.2.1 Verwendete Medienzusätze

a) Fruchtsäfte und Extrakte

Es wurde handelsüblicher Tomatensaft (Neu's Extra Klasse, Freinsheim) eingesetzt. Die weiteren Fruchtsäfte und Extrakte wurden selbst hergestellt. Das geschälte Obst wurde zunächst entsaftet (Entsafter AEG ESF 103 electronic). Nach Zentrifugation (30 min bei 4 °C und 4500 rpm; Heraeus Cryofuge, Hanau) wurde der Überstand durch einen Büchnertrichter vakuumfiltriert und bei -20 °C gelagert. Aus den Schalen (Zitrone, Tomaten, Mango cv. Haden) und dem Mesokarp der Zitrone wurde mittels Erhitzung (2 h) unter Rückfluss ein wässriger Extrakt hergestellt, der anschließend auf das Volumen des Fruchtfleischsaftes eingestellt wurde. Auf dieselbe Weise wurde der Extrakt aus grünen Weinblättern und Hagebuttenschalen hergestellt. Hier wurden die Extrakte jedoch größtmöglich aufkonzentriert, da kein Fruchtfleischsaft vorhanden war. Mangoschalen-Extrakt, Tomatenhaut-Extrakt sowie Heidelbeersaft wurden aufgrund einer starken Eigenfärbung zweifach verdünnt. Beim Grünen Tee (Meßmer, Seevetal) betrug die Erhitzungsdauer 20 min, um auch die langsamer extrahierbaren polyphenolischen Verbindungen zu erfassen.

b) Aschelösungen der Säfte

Um die organischen Inhaltsstoffe in Säften zu eliminieren, wurde eine Veraschung durchgeführt. Dabei wurde der Saft (in der Regel 15 ml) durch starkes Erhitzen in einem Quarzglasschälchen unter einer Infrarot-Lampe eingetrocknet und anschließend mehrere Stunden bei 650 °C im Muffelofen zu Kohlenstoff verascht. Durch Zugabe eines starken Oxidationsmittels wie 30%iger Wasserstoffperoxidlösung konnte der restliche Kohlenstoff in gasförmiges CO₂ überführt werden, wobei lediglich die Mineralstoffe zurückbleiben. Um die erhaltene weiße Asche in Lösung zu bringen, musste diese in Säure aufgenommen werden, wobei 1,2%ige Citronensäure verwendet wurde. Zur Erstellung des Mediums wurde ein Grundmedium (Kapitel 3.2.2a) ohne Citronensäure hergestellt und durch Zugabe der Aschelösung im Verhältnis von 1:4 die Endkonzentration an Citronensäure von 0,3% eingestellt. Nach pH 6-Einstellung mit 1 M Natronlauge und Ausfüllen mit destilliertem Wasser auf das Ausgangsvolumen wurde die Leitfähigkeit der Aschelösung im Vergleich zum unbehandelten Saft gemessen, um zu sehen, ob alle organischen Verbindungen gelöst werden konnten.

c) Aminosäurenlösung

Zusammensetzung (Weiller und Radler 1972):

L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure (je 0,3%),

DL- α - Alanin, L-Arginin-Hydrochlorid, Glycin, L-Histidin-Hydrochlorid, L-Leucin, L-Lysin-Hydrochlorid, L-Prolin (je 0,2%),

DL- α -Aminobuttersäure, L-Asparagin, L-Cystein, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Serin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Valin (je 0,1%).

Unter Erwärmen bei 60 °C wurden die Aminosäuren in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -18 °C.

d) Vitaminlösung

Zusammensetzung (Weiller und Radler 1972):

Pyridoxolhydrochlorid, Nicotinsäure, Calcium-D(+)-panthothenat, Riboflavin (je 100 mg),

Thiaminiumchlorid (50 mg),

Folsäure (20 mg),

4-Aminobenzoesäure (10 mg),

Cyanocobalamin, D(+)-Biotin, myo-Inosit (je 1mg).

Riboflavin wurde unter Erwärmen in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung von Folsäure erfolgte in 50 ml destilliertem Wasser unter Zusatz einiger Tropfen 1 M Natronlauge und die von Biotin in 10 ml einer Lösung von 0,2 g KH_2PO_4 und 0,2 g K_2HPO_4 . Die restlichen Vitamine wurden in 600 ml entionisiertem Wasser aufgenommen, mit den oben erwähnten Vitaminlösungen versetzt und auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$.

e) Catechinmischung

Ein flüssiger Rohextrakt von grünem Tee der folgenden Zusammensetzung wurde von DSM (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt:

- 77,5% Epigallocatechingallat (EGCG)
- 1,66% Citronensäure
- 1,41% Epicatechingallat (ECG)
- 0,82% Gallocatechingallat (GCG)

Die Lösung wurde mittels Büchnertrichter vakuumfiltriert und der pH-Wert wurde mit 2 M Salzsäure auf 4,5 eingestellt. Die so erhaltene Stammlösung wurde im Dunkeln unter Stickstoff-Atmosphäre bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Für die Wachstumstests mit *Oenococcus oeni* wurden Verdünnungsreihen angelegt, die sofort zu verwenden waren.

f) Epigallocatechingallat-Lösung

Epigallocatechingallat (EGCG) in Pulverform (Reinheit $> 99\%$) wurde von DSM (Basel, Schweiz) unter anaerober Atmosphäre zur Verfügung gestellt. Es wurde eine 0,1%ige Stammlösung in destilliertem Wasser unter Zusatz von 0,2% Ascorbinsäure bei pH 4,5 hergestellt, von der für die Wachstumstests Verdünnungsreihen analog der Catechinmischung zum Einsatz kamen. Ein Problem bei der Handhabung von EGCG war dessen Instabilität unter aeroben Bedingungen und während der Lagerung (Rode 2001). Die besten Resultate wurden durch Lagerung einer 0,1%igen wässrigen EGCG-Stammlösung unter Zusatz von 0,2% Ascorbinsäure als Oxidationsschutz im Dunkeln unter Stickstoff-Atmosphäre bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ erzielt. Auf diese Weise ist EGCG über einen Monat haltbar (Tab. 1). Eine Lagerung im Dunkeln bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und pH 4,5 war nicht ausreichend, da es so zu einem Abbau um 35% innerhalb von 32 Tagen kam.

Lagerungsbedingungen	EGCG-Gehalt nach 11 Tagen Lagerung	EGCG-Gehalt nach 32 Tagen Lagerung
0,1 % EGCG-Lösung (im Dunkeln, 4 °C, pH 4,5)	88%	65%
0,1 % EGCG-Lösung (im Dunkeln, 4 °C, pH 4,5) + 0,2 % Ascorbinsäure	100%	93%
0,1 % EGCG-Lösung unter Stickstoff (im Dunkeln, 4 °C, pH 4,5) + 0,2 % Ascorbinsäure	100%	100%

Tab. 1: Stabilität der EGCG-Stammlösung unter verschiedenen Lagerungsbedingungen.

3.2.2 Medien

a) Grundmedium

Zusammensetzung:

5 g/l Pepton aus Fleisch

5 g/l Hefeextrakt

20 g/l Trypton aus Casein

5 g/l Glucose

5 g/l Fructose

3 g/l Citronensäure

1 g/l Tween 80

0,5 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat

Von der kompletten Nährlösung wurden nach Einstellung auf pH 6 je 4 ml in Reagenzgläser gefüllt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

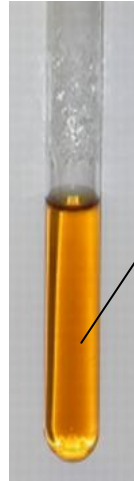
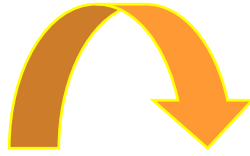
b) Saftmedien

25% (1 ml) Zusatz, pH 6:

Destilliertes Wasser als **Kontrolle**

Säfte wie z.B. Extrakt von grünem Tee
als **Test**

Tomatensaft als **positive Referenz**



75% (3 ml) Grundmedium, pH 6

Die auf Wachstumsförderung zu testenden Säfte und Extrakte wurden als 25%-Zusatz (v/v, pH 6) zum Grundmedium gegeben. Die Konzentrationsangaben der Zusätze in den Abbildungen und Tabellen bezogen sich immer auf das Naßgewicht der Schalen bzw. Blätter, lediglich beim grünen Tee und Tomatenhaut-Extrakt auf das Trockengewicht. Bei der Kontrolle betrug der Zusatz destilliertes Wasser. Von der kompletten Nährlösung wurden nach Einstellung auf pH 6 je 4 ml in Reagenzgläser gefüllt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

c) Mineralstoffmedien und Medien mit Fraktionen der Festphasen-Extraktionen

Die SPE-Eluate und Mineralstofflösungen wurden analog den Säften und Extrakten als 25%-Zusatz (pH 6) zum Grundmedium gegeben und wie in Kapitel 3.2.2 b) behandelt.

d) *Leuconostoc oenos*-Medium der DSMZ (Medium 59; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig)

Zusammensetzung:

10 g/l Caseinpepton, tryptisch verdaut

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l Glucose

5 g/l Fructose

3,5 g/l Ammoniumcitrat

1 ml/l Tween 80

0,2 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat

0,05 g/l Mangansulfat-Monohydrat

0,5 g/l Cysteinhydrochlorid-Monohydrat

100 ml/l filtrierter Tomatensaft

Von der kompletten Nährlösung wurden nach Einstellung auf pH 6 je 4 ml in Reagenzgläser gefüllt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

e) Synthetisches Basalmedium

Zusammensetzung:

5 g/l Glucose

5 g/l Fructose

3 g/l Citronensäure

1 g/l Tween 80

0,5 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat

100 ml/l Aminosäurenlösung (Zusammensetzung siehe Kap. 3.2.1c)

10 ml/l Vitaminlösung (Zusammensetzung siehe Kap. 3.2.1d)

Von der kompletten Nährlösung wurden nach Einstellung auf pH 6 je 4 ml in Reagenzgläser gefüllt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

3.2.3 Citrat-Phosphat-Puffer für die Kationentauscher-SPE

Zu einer 0,02 M Citronensäurelösung wurden 0,2 M Na₂HPO₄-Lösung zugegeben bis pH 3,5 erreicht wurde.

3.2.4 Ringerlösung zur Inkubation der Oenokokken

Zusammensetzung:

8 g/l Natriumchlorid

0,2 g/l Kaliumchlorid

0,2 g/l Calciumchlorid

1 g/l Natriumhydrogencarbonat

Nach Auffüllen mit destilliertem Wasser wurden je 10 ml Ringerlösung in Reagenzgläser überführt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

3.3 Durchführung und Auswertung des Wachstums-Assays in Reagenzgläsern

Aus den Stammkulturen der Oenokokken (in TSM, siehe Kap. 3.2.2a) wurden 0,1 ml Inokulum in 5 ml TSM gegeben (Abb. 1). Diese Vorkulturen wurden 4 Tage bebrütet, bevor 0,5 ml zum Entfernen der Reservestoffe in 10 ml Ringerlösung gegeben wurden. Die beimpften Ringerlösungen lagerten ebenfalls 4 Tage, dann erfolgte die Beimpfung durch Zugabe von je 0,1 ml der Oenokokken zu 4 ml steriler Testlösung. Die Aufbewahrung aller Kulturen einschließlich der Vorkulturen erfolgte immer in mit Wattestopfen verschlossenen Reagenzgläsern bei 25 °C im Brutschrank. Die Bakteriendichte in den Nährlösungen wurde über 10 Tage mittels Extinktionsmessung bei 546 nm in einem reagenzglasgängigen Photometer (Eppendorf-Photometer 1101 M) bestimmt. Der Abgleich erfolgte durch eine unbeimpfte Kontrolle des jeweiligen Mediums. Es wurden Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt und daraus der Mittelwert errechnet. Durch die Messung in Reagenzgläsern, die nicht wie Küvetten aus Planglas bestehen, sind Extinktionschwankungen von bis zu 0,05 möglich. Eine signifikanter Änderung aufgrund der Bakteriendichte wurde daher auf Extinktionsunterschiede $>0,1$ festgelegt, was dem doppelten Wert dieser Schwankungen entspricht.

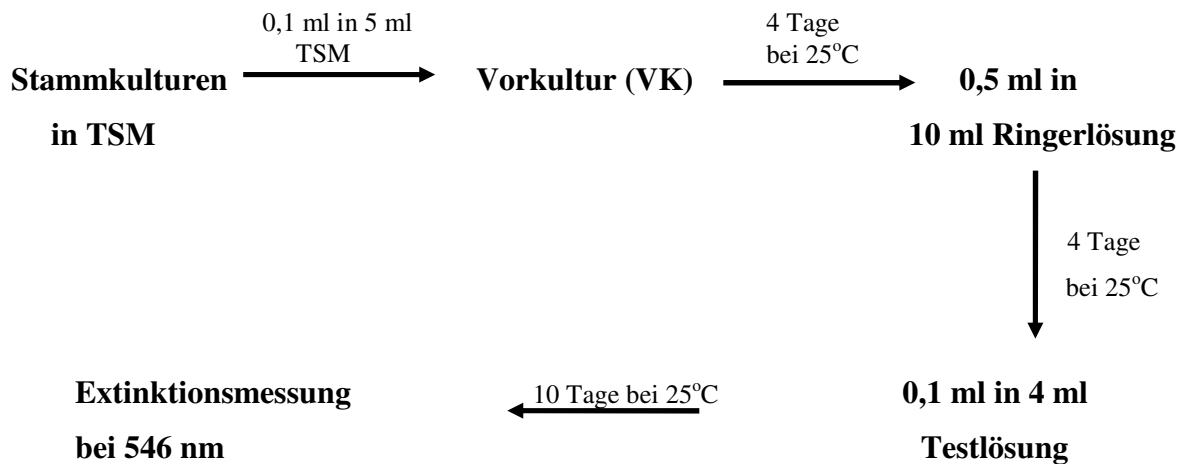


Abb. 1: Schematische Darstellung der Durchführung und Auswertung des Wachstumsassays in Reagenzgläsern.

3.4 Durchführung und Auswertung des Wachstums-Assays in Microtiterplatten

Die Fruchtsäfte und Blattextrakte, die das Wachstum der Oenokokken verstärkt haben, wurden mittels semipräparativer HPLC in Fraktionen aufgetrennt, um einzelne für diesen Effekt verantwortliche Substanzen isolieren und identifizieren zu können. Aufgrund des geringen Volumens der erhaltenen Fraktionen mussten die anschließenden Wachstumstests auf Microtiterplatten durchgeführt werden. Das Programm des Fraktionssammlers nach der semipräparativen HPLC (Kapitel 3.10.2) war so eingestellt, dass in 1 min 4 ml Eluat pro Röhrchen floss (Elutionszeit: 1 min). Die 60 Fraktionen (0 - 60 min.) wurden anschließend in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und mit einem Speed Vac Evaporator bis zur Trockne eingengt. Die Rückstände wurden in 100 µl destilliertem Wasser (entspricht Probevolumen der semipräparativen HPLC) aufgenommen und in Polypropylen-Microtiterplatten autoklaviert. Sowohl die Säfte und Extrakte (Tomatensaft, Tomatenschalen-, Mangoschalen- und Zitronemesokarp-Extrakt) als auch das Grundmedium wurden ebenfalls in Polypropylen-Microtiterplatten autoklaviert.

Nach Erkalten wurde das Grundmedium mit einer 8-Kanal-Pipette steril in die Polystyrol-Microtiterplatten überführt (150 µl pro Well als unbeimpfte Kontrolle für die photometrische Messung). Danach erfolgte die Beimpfung von 150 µl Grundmedium mit 3 ml Suspension des ausgehungerten Stammes B2. Jeweils 150 µl dieses beimpften Grundmediums wurden

ebenfalls in Wells der Polystyrol-Microtiterplatten pipettiert. Abschließend fügte man sowohl den beimpften als auch den unbeimpften Medien jeweils 50 µl der 60 autoklavierten HPLC-Fraktionen bzw. der jeweiligen autoklavierten Fruchtsäfte bei den Wachstumskontrollen zu (Tab.1 und 2). Die Microtiterplatten wurden in einer mit Wasser gefüllten DC-Kammer (gesättigte Atmosphäre) für 10 Tage bei 25 °C kultiviert. Danach wurden die Extinktionen nach Aufschütteln (Schüttler Typ SM5A von Bühler, Tübingen) in einem Titertek-Reader (Abb. 2) bei 620 nm gemessen.

Die Methode lieferte nur auf die beschriebene Art und Weise reproduzierbare Ergebnisse, da Polypropylenplatten aufgrund ihrer Trübung nicht für Extinktionsmessungen geeignet waren und die klaren Polystyrolplatten (Becton Dickinson Labware; Meylan Cedex, Frankreich) nicht autoklaviert werden konnten. Die äußeren Wells der Microtiterplatten blieben zur Vermeidung von Kontaminationen leer.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Fr. 1	Fr. 7	Fr.13	Fr.19	Fr.25	Fr.31	Fr.37	Fr.43	Fr.49	Fr.55	
C		Fr. 2	Fr. 8	Fr.14	Fr.20	Fr.26	Fr.32	Fr.38	Fr.44	Fr.50	Fr.56	
D		Fr. 3	Fr. 9	Fr.15	Fr.21	Fr.27	Fr.33	Fr.39	Fr.45	Fr.51	Fr.57	
E		Fr. 4	Fr.10	Fr.16	Fr.22	Fr.28	Fr.34	Fr.40	Fr.46	Fr.52	Fr.58	
F		Fr. 5	Fr.11	Fr.17	Fr.23	Fr.29	Fr.35	Fr.41	Fr.47	Fr.53	Fr.59	
G		Fr. 6	Fr.12	Fr.18	Fr.24	Fr.30	Fr.36	Fr.42	Fr.48	Fr.54	Fr.60	
H												

Tab. 1: Pipettierschema für die 60 erhaltenen Fraktionen der semipräparativen HPLC bei der Überführung in die Microtiterplatten (eine Platte beimpft, eine Platte unbeimpft).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		(GM)	GM	GM	(X)	(X)	X	X	(TSM)	(TSM)	TSM	
C		(GM)	GM	GM	(X)	(X)	X	X	(TSM)	(TSM)	TSM	
D		(GM)	GM	GM	(X)	(X)	X	X	(TSM)	(TSM)	TSM	
E		(GM)	GM	GM	(X)	(X)	X	X	(TSM)	(TSM)	TSM	
F		(GM)	GM	GM	(X)	(X)	X	X	(TSM)	(TSM)	TSM	
G		(GM)	GM	GM	(X)	(X)	X	X	(TSM)	(TSM)	TSM	
H												

Tab. 2: Pipettierschema für die Kontrollen (eingeklammert = unbeimpft). GM = Grundmedium, X = Grundmedium mit 25%-Zusatz der verwendeten HPLC-Saftprobe, TSM = Tomatensaftmedium.

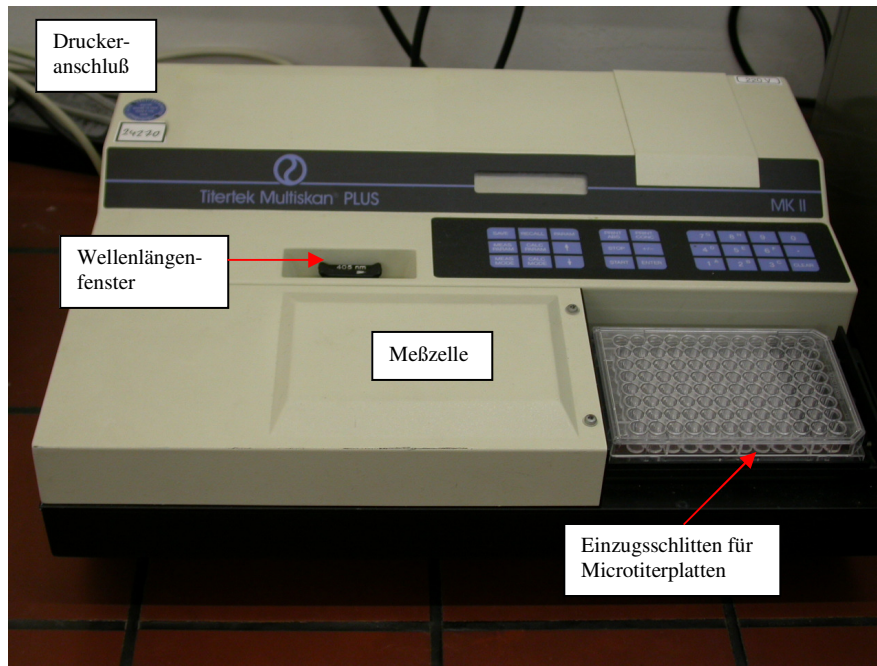


Abb. 2: Microtiter-Reader Titertek Multiskan Plus zur Auswertung der Wachstumstests auf Microtiterplatten.

3.5 Färbung von *Oenococcus oeni* mit Sytox und DAPI

Sytox (Molecular Probes Inc., Eugene, USA) ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der durch beschädigte Zellmembranen in die Bakterien gelangt und deren DNA durch Interkalation sichtbar macht. Lebende Zellen können Sytox ausschleusen, sodass nur tote Zellen angefärbt werden. DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) färbt hingegen sowohl tote als auch lebende Zellen. Durch Kombination von Sytox und DAPI kann also die Lebendzellzahl unter der Gesamtpopulation von Bakterien bestimmt werden (Roth 1997).

Nach 6 Tagen Inkubation bei 25 °C wurde jeweils 1 ml der Kulturmedien (Grundmedium und Grundmedium mit Zusatz der Catechinmischung) mit Ringerlösung bis 10^{-6} verdünnt. 1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} wurden 5 min bei 14000 g (Heraeus Sepatech Biofuge A, Hanau) abzentrifugiert. Der Rückstand wurde zweimal mit steriler Ringerlösung gewaschen und schließlich in 1 ml steriler Ringerlösung aufgenommen. Im Dunkeln wurden 1 µl Sytox-Stammlösung (6 µl Sytox und 10 µl steriles Wasser) zugegeben und mit der Bakteriensuspension gemischt. Nach 10 min Wartezeit konnte 50 µl DAPI zur Gegenfärbung zugefügt werden. Nach weiteren 10 min Wartezeit wurden die gefärbten Bakteriensuspensionen zu 10 ml Ringerlösung gegeben und durch Vakuumfiltration auf dem

Celluloseacetatfilter (Porengröße 0,2 µm) fixiert. Zur Vermeidung einer Ausbleichung wurde ein Tropfen DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane; Sigma, München) auf den Filter gegeben. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur Zählung im Fluoreszenzmikroskop (Axiophot 2; Zeiss, Göttingen) auf einem Objektträger im Dunkeln.

Zur Berechnung der Gesamtzellzahl G der Proben wurde die folgende Formel angewandt:

$$G = \frac{\pi \times \varepsilon \times F \times Z \times r^2 \times v^2}{0,016 \times L \times K^2}$$

ε = empirische Konstante = 1

F = Verdünnungsfaktor

r = Radius der Objektträgerfelder = 2,5 mm

v = Gesamtvergrößerung = 400x

L = auf Objektträger aufgetragenes Aliquot = 1000 µl

K = Kantenlänge des Zählrasters im Okular = 12,5 mm

Z = gezählte Zellen des gesamten Zählrasters

Das Einsetzen der Werte liefert die Formel:

$$G = \frac{\pi \times 1 \times F \times Z \times 2,5^2 \times 400^2}{0,016 \times 1000 \times 12,5^2}$$

3.6 Durchführung der Festphasen-Extraktionen (SPE)

Alle erhaltenen Fraktionen der im Folgenden aufgeführten Festphasen-Extraktionen wurden mit 1 M Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH 6 eingestellt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und auf das Probenausgangsvolumen aufgefüllt. Diese Lösungen wurden dann zu 25% dem Grundmedium (Kapitel 3.2.2a) für das Wachstumsassay zugesetzt.

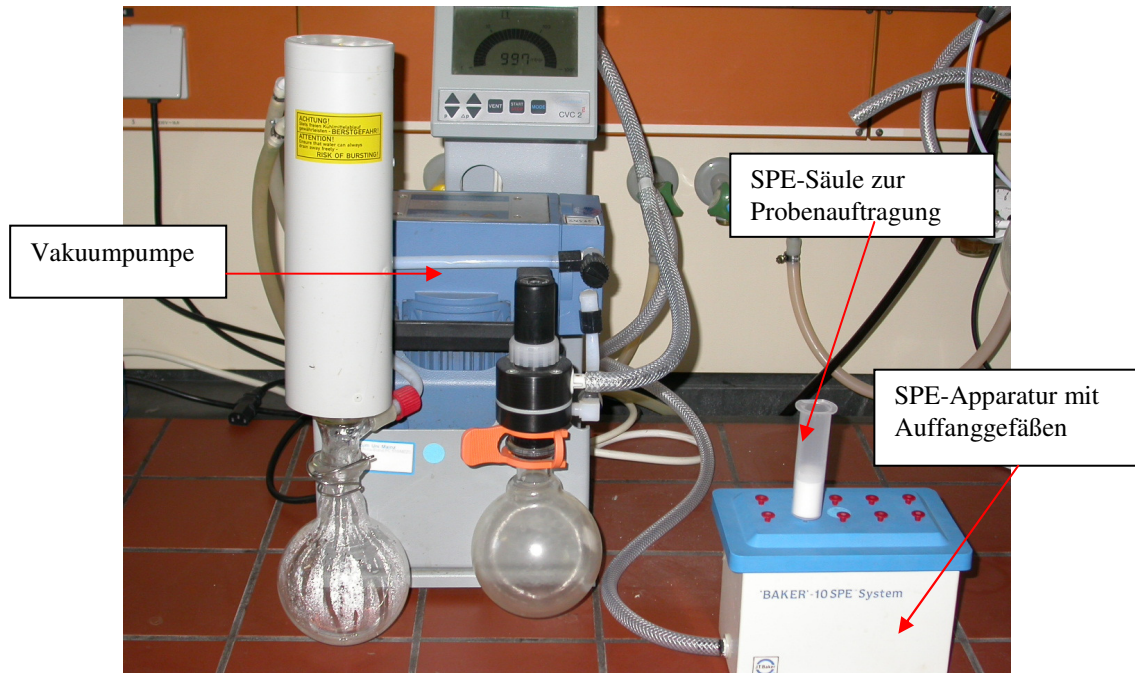


Abb. 3: Apparatur zur Festphasen-Extraktion mit Vakuumpumpe. Die Probe wurde auf die SPE-Säule aufgetragen und mittels angelegtem Vakuum über die stationäre Phase geleitet. Die durch die Elutionsschritte entstehenden Fraktionen wurden in Rundkolben unterhalb der Säule aufgefangen.

3.6.1 Festphasen-Extraktionen an einer C₁₈-Phase

Diese Extraktionen wurden mit fünffach konzentriertem Saft aus geschälten Tomaten, Saft aus geschälten Mangos sowie Mangoschalen- und Tomatenschalen-Extrakt durchgeführt. Verwendete SPE-Säule: Discovery DSC-18 (Octadecylsilica, 5g/20ml) von Supelco (Bellefonte, USA).

Konditionierung der Phase:	Nach Herstellerangaben mit Methanol und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser
Probenauftragung:	15 ml Probe pH 6 (PD)
Waschen der Säule:	3x 10 ml destilliertes Wasser (W1-3)
Elution:	12 ml 20% Methanol/80% destilliertes Wasser (E1)
	12 ml 40% Methanol/60% destilliertes Wasser (E2)
	12 ml 60% Methanol/40% destilliertes Wasser (E3)
	12 ml 80% Methanol/20% destilliertes Wasser (E4)
	12 ml 100% Methanol (E5)

(PD = Probendurchlauf, W1-3 = Waschlösungen, E1-5 = Eluate)

Es wurde eine Kontrolle mitgeführt, bei der 12 ml 100% Methanol am Rotationsverdampfer eingengt wurden.

3.6.2 Festphasen-Extraktion an dem Kationentauscher SCX-2

Der C₁₈-Probendurchlauf von fünffach konzentriertem Saft aus geschälten Tomaten wurde in einem anschließenden Versuch mittels Kationentauscher-SPE weiter fraktioniert. Verwendete SPE-Säule: SCX2 (Propylsulfonsäure, 5g/25ml) von Isolute (Grenzach-Wyhlen).

Die Probe wurde hierzu mit 0,2 M Salzsäure auf pH 3,5 eingestellt und die Leitfähigkeit mit destilliertem Wasser dem verwendeten Citrat/Phosphatpuffer angepasst (2,0 mS).

Konditionierung der Phase:	Nach Herstellerangaben mit Methanol und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser
Äquilibration:	2 mal 15 ml 20 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 3,5
Probenauftragung:	vorbehandelter C ₁₈ -Probendurchlauf (PD)
Waschen der Säule:	3 mal 15 ml 20mM Citrat/Phosphat-Puffer, pH 3,5 (W1-3)
Elution:	15 ml 20 mM Citrat/Phosphat-Puffer + 0,5 M NaCl (E1) 15 ml 20 mM Citrat/Phosphat-Puffer + 1 M NaCl (E2)

(PD = Probendurchlauf, W1-3 = Waschlösungen, E1-2 = Eluate)

Aufgrund des in den Waschlösungen sowie in Eluat 1 und 2 enthaltenen Salzes wurde jeweils eine Kontrolle durch Einengung der entsprechenden Menge Elutionsmittel mitgeführt.

3.6.3 Festphasen-Extraktion an Polyamid (PA)

Verwendete SPE-Säule: Chromabond PA (5g/20ml) von Macherey-Nagel, Düren.

Konditionierung der Phase:	Nach Herstellerangaben mit Methanol und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser
Probenauftragung:	20 ml Probe pH 6 (PD)
Waschen der Säule:	3 mal 10 ml destilliertes Wasser (W1-3)
Elution:	20 ml 50% Methanol/50% destilliertes Wasser (E1) 20 ml 100% Methanol (E2) 20 ml Aceton (E3)

(PD = Probendurchlauf, W1-3 = Waschlösungen, E1-3 = Eluate)

Es wurden Kontrollen mitgeführt, bei denen 20 ml 100% Methanol bzw. 20 ml Aceton am Rotationsverdampfer eingengt wurden.

3.6.4 Festphasen-Extraktion an dem Kunstharz XAD-7

Verwendete SPE-Säule (selbst gefüllt): Amberlite XAD-7 HP (5g/20ml) von Supelco (Bellefonte, USA).

Es handelt sich hierbei um ein nicht-ionisches aliphatisches Acrylpolymer mit großen Poren; das nicht-aromatische polare Komponenten (Ester, Ketone, etc.) von wässrigen Systemen und polare Komponenten aus nicht-wässrigen Systemen adsorbieren kann. Durch die relativ großen Poren ist dieses Material auch sehr gut zur Adsorption von großen Molekülen aus Pflanzen oder anderen natürlichen Quellen geeignet.

Entfernen der Salzlösung:	Spülen mit destilliertem Wasser
Konditionierung der Phase:	Nach Herstellerangaben mit Methanol und anschließend Spülen mit destilliertem Wasser
Probenauftragung:	5 ml Probe pH 6 (PD)
Waschen der Säule:	3 mal 15 ml destilliertes Wasser (W1-3)
Elution:	15 ml 5% Methanol/95% destilliertes Wasser (E1) 15 ml 20% Methanol/80% destilliertes Wasser (E2) 15 ml 35% Methanol/65% destilliertes Wasser (E3) 15 ml 50% Methanol/50% destilliertes Wasser (E4) 15 ml 65% Methanol/35% destilliertes Wasser (E5) 15 ml 80% Methanol/20% destilliertes Wasser (E6) 15 ml 100% Methanol(E7)

(PD = Probendurchlauf, W1-3 = Waschlösungen, E1-7 = Eluate)

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an eine Isolierung von Anthocyanen aus Früchten (Kuskoski et al., 2003). Es wurden eine Kontrolle mitgeführt, bei der 5 ml 100% Methanol am Rotationsverdampfer eingengt wurden.

3.6.5 Festphasen-Extraktion an Strata-X

Verwendete SPE-Säule: Strata-X (500mg/6ml) von Phenomenex, Aschaffenburg.

Es handelt sich um ein oberflächenmodifiziertes und patentiertes Styrol-Divinylbenzol-Polymer, das eine sehr gute Selektivität sowohl für polare als auch für unpolare Analyten besitzt.

Konditionierung der Phase:	Nach Herstellerangaben mit Methanol und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser
Probenauftragung:	4 ml Probe pH 6 (PD)
Waschen der Säule:	3x 4 ml 5% Methanol/95% destilliertes Wasser (W1-3)
Elution:	4 ml 20% Methanol/80% destilliertes Wasser (E1) 4 ml 40% Methanol/60% destilliertes Wasser (E2) 4 ml 60% Methanol/40% destilliertes Wasser (E3) 4 ml 80% Methanol/20% destilliertes Wasser (E4) 4 ml 100% Methanol (E5)

(PD = Probendurchlauf, W1-3 = Waschlösungen, E1-5 = Eluate)

Es wurde eine Kontrolle mitgeführt, bei der 4 ml 100% Methanol am Rotationsverdampfer eingengt wurde.

3.6.6 Festphasen-Extraktion an IC-Chelate plus

Verwendete SPE-Säule: IC-Chelate plus (1,5mg/4ml) von Alltech, München.

Die IC-Chelat Plus SPE diente der Entfernung von polyvalenten Metall-Ionen. Die Matrix bestand aus einem Styrol-Divinylbenzol-Copolymer mit Iminodiacetat-Ionen, die als Chelatgruppen polyvalente Metallionen binden. Das Probenmaterial wurde aus Kapazitätsgründen nacheinander über drei Säulen gegeben. Eine Elution fand nicht statt.

Konditionierung der Phase:	Nach Herstellerangaben durch Spülen mit destilliertem Wasser
Probenauftragung:	1 ml Probe pH 6 (PD)

(PD = Probendurchlauf)

3.6.7 Festphasen-Extraktion an dem Anionentauscher SAX

Verwendete SPE-Säule: Chromabond SB (500mg/6ml) von Phenomenex, Aschaffenburg.

Es handelt sich um ein oberflächenmodifiziertes und patentiertes Styrol-Divinylbenzol-Polymer, das eine sehr gute Selektivität sowohl für polare als auch für unpolare Analyten besitzt.

8 ml fünffach konzentrierter Saft aus geschälten Tomaten wurden mit 2 N Natronlauge auf pH 7 eingestellt und die Leitfähigkeit mit destilliertem Wasser dem verwendeten Phosphatpuffer angepasst (2,1 mS).

Konditionierung der Phase: Nach Herstellerangaben mit n-Hexan und nach Trocknen der Säule unter Vakuum mit Methanol. Anschließend Spülen mit destilliertem Wasser

Äquilibrierung: 2 mal 20 ml 20 mM Phosphat-Puffer pH 7

Probenauftragung: vorbehandelte Probe (PD)

Waschen der Säule: 4 mal 15 ml 20mM Phosphat-Puffer, pH 7 (W1-4)

Elution: 15 ml 20 mM Phosphat-Puffer + 0,5 M Na₂CO₃ (E1)
15 ml 20 mM Phosphat-Puffer + 1 M Na₂CO₃ (E2)

(PD = Probendurchlauf, W1-4 = Waschlösungen, E1-2 = Eluate)

Aufgrund des in den Waschlösungen sowie in Eluat 1 und 2 enthaltenen Salzes wurde jeweils eine Kontrolle durch Einengung der entsprechenden Menge Elutionsmittel mitgeführt.

3.6.8 Festphasen-Extraktion an einer Carbon-Phase

Verwendete SPE-Säule: Carbograph (Carbon, 1g/15ml) von Alltech, München. Die Carbograph-SPE dient der Trennung von sauren und basischen/neutralen Komponenten. Der primäre Retentionsmechanismus ist Reversed-Phase.

Konditionierung der Phase: Nach Herstellerangaben mit Dichlormethan/Methanol (80/20), Methanol und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser

Probenauftragung: 5 ml Probe pH 6 (PD)

Waschen der Säule: 4x 20 ml destilliertes Wasser (W1-4)

Elution: 5 ml Methanol, dann 20 ml CH₂Cl₂/Methanol (80/20) (E1)
20 ml CH₂Cl₂/Methanol (80/20) + 0,02 M TMAOH (E2)

(PD = Probendurchlauf, W1-4 = Waschlösungen, E1-2 = Eluate)

Aufgrund des in Eluat 1 (basische und neutrale Komponenten) und Eluat 2 (saure Komponenten) enthaltenen Salzes wurde jeweils eine Kontrolle durch Einengung der entsprechenden Menge Elutionsmittel mitgeführt.

3.7 Durchführung der Carotinoid-Extraktionen mittels Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)

5 g C₁₈-Bulkmaterial (Isolute Sorbent Technology Ltd., UK) wurden mit 5 g Wassermelonen-Fruchtfleisch homogenisiert und in eine leere Polypropylen-Kartusche mit Fritten gefüllt. Nach Waschen mit 60 ml destilliertem Wasser erfolgte die Elution der unpolaren Substanzen (z.B. Lycopin) mit 15 ml Dichlormethan. Die erhaltene Fraktion wurde nach Einengung bis zur Trockene in Tween 80 (Polyoxyethylensorbitanooleat) aufgenommen. Diese Lösung konnte für die Wachstumstests mit *Oenococcus oeni* eingesetzt werden, da Tween 80 im Grundmedium zur verbesserten Stoffaufnahme enthalten ist.

3.8 Durchführung der Polyphenol-Extraktionen an Polyvinylpolypyrrolidon

5 ml der auf pH 6 eingestellten Proben wurden mit 5 g Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) homogenisiert und in eine leere SPE-Kartusche gefüllt. Die Elution erfolgte mit 30 ml destilliertem Wasser. Die erhaltenen Durchläufe wurden nach pH-Kontrolle (pH 6) am Rotationsverdampfer auf das Ausgangsvolumen der Probe (5 ml) eingengt.

3.9 Hydrolyse der isolierten Oligosaccharide aus Mangoschalen- und Zitronenmesokarp-Extrakt

Bei der HPLC-Auftrennung der Fruchtsäfte und Blattextrakte, die das Wachstum der Oenokokken verstärken, konnte bei Mangoschalen- und Zitronenmesokarp-Extrakt jeweils eine Fraktion mit Oligosacchariden für diesen Effekt ausgemacht werden. Um Näheres über die Zusammensetzung der Oligosaccharide zu erfahren, wurde eine saure Hydrolyse durchgeführt, um die so erhaltenen Monosacchariden anschliessend mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-Analysen zu identifizieren.

Zur Kontrolle der Hydrolyse wurden zunächst wässrige Standardlösungen ($c = 200 \mu\text{g/ml}$) zweier Mustersubstanzen, Saccharose ($\beta\text{-D-Fructofuranosyl-}\alpha\text{-D-Glucopyranosid}$) und Maltotriose ($\text{O-}\alpha\text{-D-Glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-O-}\alpha\text{-D-Glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glucopyrano-}$

se), hergestellt. Von diesen Lösungen wurden jeweils 100 µl in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und 100 µl 4 M Trifluoressigsäure (TFA) zugegeben. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 90 min bei 100 °C im Trockenschrank hydrolysiert. Nach der Hydrolyse erfolgte die Neutralisation mittels 1%igem Ammoniakwasser und die Einengung bis zur Trockene in der Speed Vac. Ammoniakwasser und TFA haben den Vorteil, dass keine störenden Salze im Rückstand zurückbleiben. Der erhaltene Rückstand wurde in 100 µl destilliertem Wasser gelöst (Ausgangsvolumen der Probe) und die Neutralität der Lösung durch Aufträufeln eines Tropfens auf pH-Papier bestätigt. Die Neutralität muss insbesondere für die anschließende HPLC-Analyse gewährleistet sein, da die Säule (Phenomenex RPM Pb²⁺, siehe Kapitel 3.10.3) keine sauren pH-Werte verträgt.

3.10 Bestimmung der Enzymaktivitäten mit 4-Nitrophenol

Lösungen:

1. 0,14 M Natriumchlorid-Lösung: 8,18 g in 1000 ml
2. Substrat: 10 mg der jeweiligen 4-Nitrophenyl-Zuckerderivate in 10 ml 0,14 M Natriumchlorid-Lösung lösen. Lösung kühl und dunkel aufbewahren, maximal 24 Stunden haltbar.
3. Carbonat-Lösung: 10,6 g Natriumcarbonat (wasserfrei) in 100 ml destilliertem Wasser lösen.

Durchführung:

- 2 ml gewachsener Bakterienkultur (*Oenococcus oeni* Stamm B2 in Grundmedium) werden zu 1 ml der jeweiligen Substratlösung gegeben. Als Kontrolle dienen 2 ml Grundmedium ohne Organismen mit 1 ml Substratlösung und 2 ml Kultur mit 1 ml Natriumchlorid-Lösung ohne Substrat.
- Ansätze gut durchmischen und für 24 Stunden im Dunkeln bei 30°C inkubieren
- Reaktionsstop durch Zugabe von 1,5 ml Natriumcarbonatlösung (0,1 M)
- Abzentrifugieren und Überstand bei 400 nm gegen die Kontrolle ohne Organismen messen

Kalibrierung:

Die Kalibrierung erfolgte mit 4-Nitrophenol (1 mg/ml; Abb. 4):

Konzentration [µg/ml]	Medium [µl]	0,1 M Na ₂ CO ₃ [µl]	Standardlösung [µl]	OD _{400nm}
0	667	333	0	-0,028
25	642	333	25	0,434
50	617	333	50	0,897
75	592	333	75	1,595
100	567	333	100	1,968

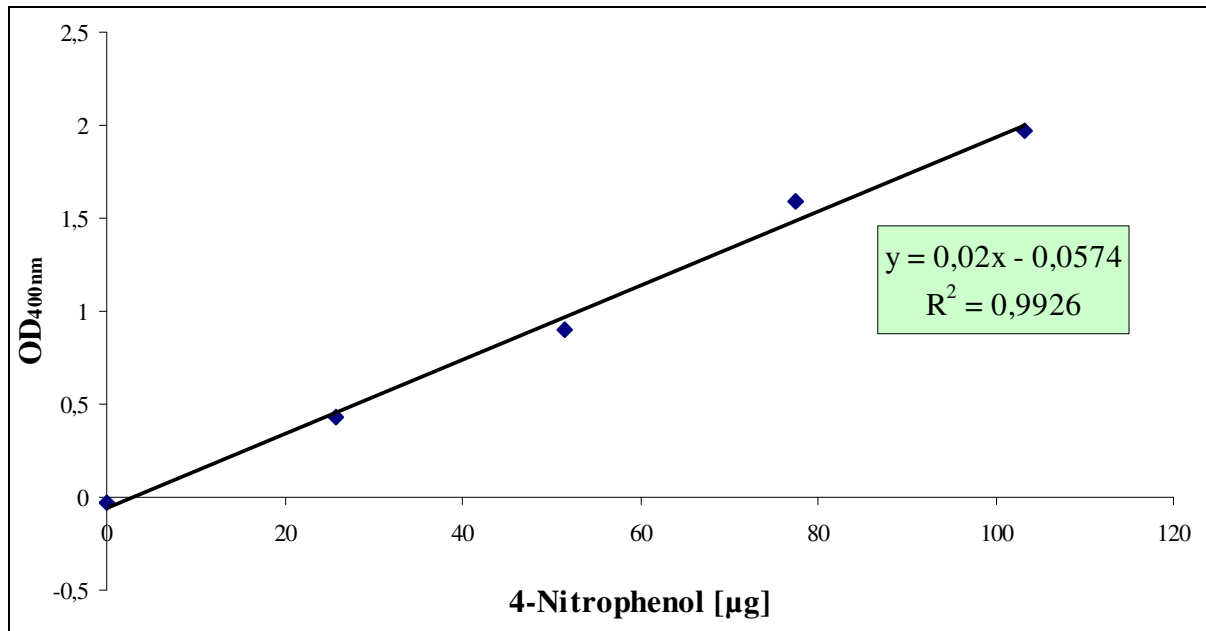


Abb. 4: Kalibrierungsgerade mit 4-Nitrophenol.

3.11 Dünnschichtchromatographie zur Zucker-Identifizierung

Die Dünnschichtchromatographie (DC) bietet sich als zusätzliche Absicherung zur Zucker-Identifizierung an, wenn in den HPLC-Chromatogrammen sehr ähnliche Retentionszeiten und somit überlagerte Peaks auftreten, die eine sichere Identifizierung nicht ermöglichen. Durch Einsatz von Sprühreagenzien können die Zucker nämlich nicht nur über ihre R_f -Werte, sondern auch aufgrund charakteristischer Färbungen identifiziert werden. Es wurden hierbei als stationäre Phase Kieselgur-Glasplatten (Kieselgur F₂₅₄, 20 x 20 cm; Merck, Darmstadt) verwendet, die vor dem Auftragen der Proben mit 0,02 M Natriumacetat-Lösung getränkt und an der Luft getrocknet wurden. Anschließend erfolgte die Aktivierung im Trockenschrank bei 90 °C für 60 min (Imprägnierung für Farbreaktion). Es wurden folgende Zucker-Standardlösungen angesetzt:

- je 25 mg Fructose und Glucose in 10 ml 20%igem wässrigen Ethanol
- je 50 mg Rhamnose, Ribose, Xylose, Arabinose, Sorbose, Mannose und Galactose in 10 ml 20%igem wässrigen Ethanol

Die DC-Platten wurden mit einer Startlinie 2cm über dem Plattenrand markiert. Das Volumen der aufgetragenen Standardlösungen betrug jeweils 5µl, bei den hydrolysierten Proben jeweils 20 µl. Die so vorbereiteten DC-Platten wurden in einer DC-Kammer mit der mobilen Phase n-Butanol / Eisessig / destilliertes Wasser (8/3/3) zweifach entwickelt. Nach Beendigung der Chromatographie wurden die Platten im Abzug an der Luft getrocknet und dann gleichmäßig mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (5 ml Anisaldehyd + 5 ml konzentrierte Schwefelsäure + 1 ml Eisessig in 90 ml Ethanol) besprüht. Dieses Sprühreagenz ist äußerst empfindlich und gibt bei Zuckern charakteristische Farben. Noch 0,05 µg Zucker sind hiermit nachweisbar (Stahl 1962). Die Entwicklung bis zur maximalen Farbintensität erfolgte in einer Zeit von ca. 15 min bei 105 °C im Trockenschrank, wobei die verschiedenen Zucker aufgrund ihrer substanzspezifischen Eigenschaften violette, blaue, graue oder grüne Verbindungen auf rosafarbenem Hintergrund bilden.

3.12 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

3.12.1 Lösungsmittelvorbereitung für die HPLC

Die eingesetzten Lösungsmittel müssen HPLC-Qualität haben, d.h. sie müssen partikelfrei sein, um ein Verstopfen der Säule zu verhindern. Mit Ausnahme von destilliertem Wasser lagen die im Versuch eingesetzten Lösungsmittel in HPLC-Qualität vor. Destilliertes Wasser musste zunächst durch einen Cellulose-Acetat-Filter einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und im Anschluss für 45 min in einem Exsiccator mit angeschlossener Ölpumpe durch Vakuum entgast werden. Während des Vorganges diente ein Magnetrührer der vollständigen Entgasung. Lösungsmittel wurden dagegen aufgrund ihrer leichten Flüchtigkeit im Ultraschallbad für 45 min entgast.

3.12.2 HPLC-UV/DAD

Eingesetzte Hard- und Software (Abb. 5):

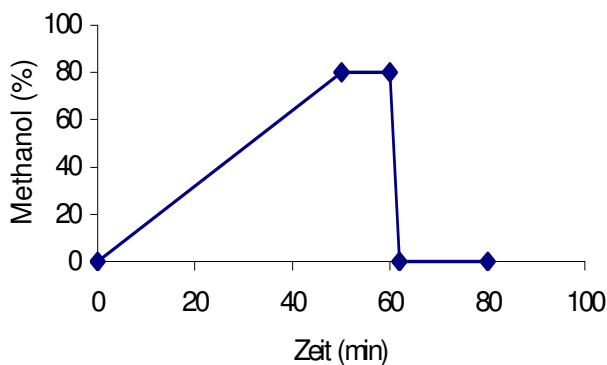
- Injektor: Shimadzu SIL-10 AD VP (Autosampler)
- Pumpen : Shimadzu LC-6A
- Detektor: Shimadzu SPD-M6A (Diodenarray-Detektor, Lichtquelle Deuteriumlampe)
- Säulenofen: ERC Gecko 2000 (Temperatur während der Läufe 35°C)
- Controller: Shimadzu SCL-6B
- Fraktionssammler: Pharmazia Frac-100 (war nur bei semipräparativen HPLC-Analysen angeschlossen)
- PC und Software Shimadzu Class M10 A



Abb. 5: HPLC-Anlage mit UV/Diodenarray-Detektor.

Analytische HPLC von Tomatenschalen-Extrakt und Tomatensaft:

Es wurde eine C₁₈-Säule (Supelco Supelcosil™ LC-18; 250mm x 4mm; Partikelgröße 5µm) und ein binäres Gradientenprogramm für die Elutionsmittel Methanol und Phosphorsäure (0,17%) gefahren. Das Probenvolumen betrug 20 µl. Die Zusammensetzung der mobilen Phase im Verlauf des Gradientenprogramms sah wie folgt aus:



0,1 min	0% Methanol
0,1-50 min	Anstieg auf 80% Methanol
50-60 min	80% Methanol
60-62 min	Abfall auf 0% Methanol
62-80 min	0% Methanol

Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min

Abb. 6: Zeitlicher Verlauf des HPLC-Gradienten

Semipräparative HPLC-Analyse von Tomatenschalen- und Mangoschalen-Extrakt:

Es wurde eine C₁₈-Säule (Supelco Supelcosil LC18; 250 x 10mm; Partikelgröße 5µm) und ein binäres Gradientenprogramm für die Elutionsmittel Methanol und 1% iger Essigsäure in Reinstwasser gefahren. Das Probenvolumen betrug 100 µl. Die Zusammensetzung der mobilen Phase im Verlauf des Gradientenprogramms entsprach Abb. 6, die Flussgeschwindigkeit betrug 4 ml/min.

Semipräparative HPLC-Analyse von Zitronenmesokarp-Extrakt:

Die Durchführung entsprach der semipräparativen HPLC-Analyse von Tomatenschalen- und Mangoschalen-Extrakt, es wurde lediglich Ammoniumacetat als Puffer anstelle von 1% iger Essigsäure in Reinstwasser benutzt.

3.12.3 HPLC-RI

Eingesetzte Hard- und Software (Abb. 7):

- Injektor: Beckman 340 Organizer
- Pumpe : Shimadzu LC-10 ADVP
- Brechungsindex-Detektor: ERC-7515 B
- Säulenofen: Knauer
- Schreiber: Shimadzu C-R8A

Analytik von Fructose, Glucose, organischen Säuren und Ethanol in Fruchtsäften:

Es wurde eine Ionentauschersäule (Aminex HPX 87H, 300 x 7,8 mm) und ein isokratisches Trennprogramm mit dem Elutionsmittel 0,013 N Schwefelsäure verwendet (Pfeiffer und Radler, 1985). Das Probenvolumen betrug 5 µl. Die Flußgeschwindigkeit lag bei 0,6 ml/min über die Trennsäule und 0,1 ml/min über die Referenz-Meßzelle. Die Ofentemperatur betrug 65 °C an der Trennsäule und 40 °C an der optischen Bank des Detektors.

Analytik von Zuckern in hydrolysierten HPLC-Fraktionen von Fruchtsäften und Blattextrakten:

Es wurde eine Ionentauschersäule (Phenomenex RPM Pb²⁺, 8% Pb, 300 x 7,8 mm, Partikelgröße 8 µm) und ein isokratisches Trennprogramm mit Reinstwasser als Elutionsmittel verwendet. Das Probenvolumen betrug 5 µl. Die Flußgeschwindigkeit lag bei 0,6

ml/min über die Trennsäule und 0,1 ml/min über die Referenz-Meßzelle. Die Ofentemperatur betrug 80 °C an der Trennsäule und 40 °C an der optischen Bank des Detektors.

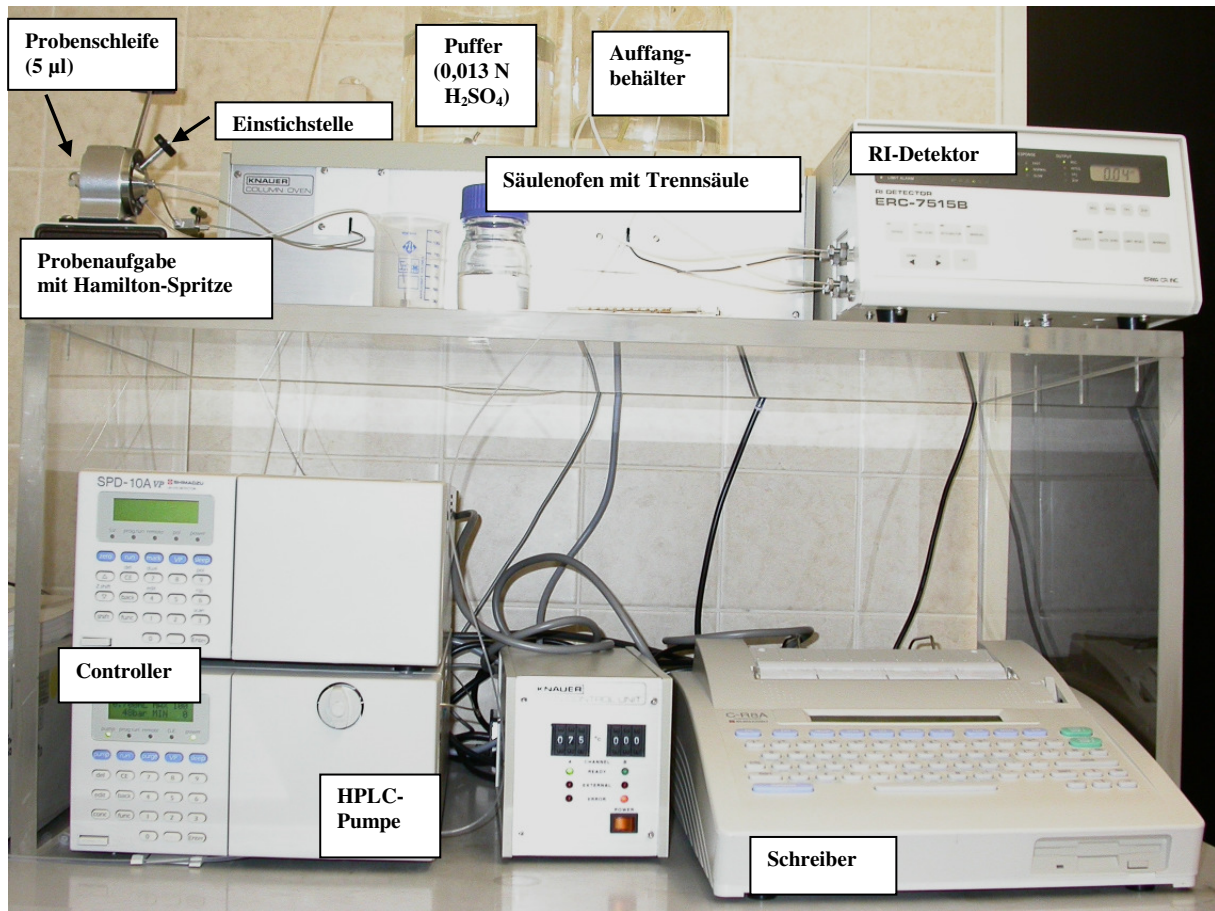


Abb. 7: HPLC-Anlage mit Brechungsindex-Detektor

3.12.4 HPLC mit Fluoreszenzdetektor

Eingesetzte Hard-und Software (Abb. 8):

- Injektor: Beckman 340 Organizer
- Pumpen : Beckman Modell 112
- Fluoreszenz-Detektor: Shimadzu RF-535
- Säulenofen: Knauer
- Controller: Beckman Modell 420
- Schreiber: Shimadzu C-R8A

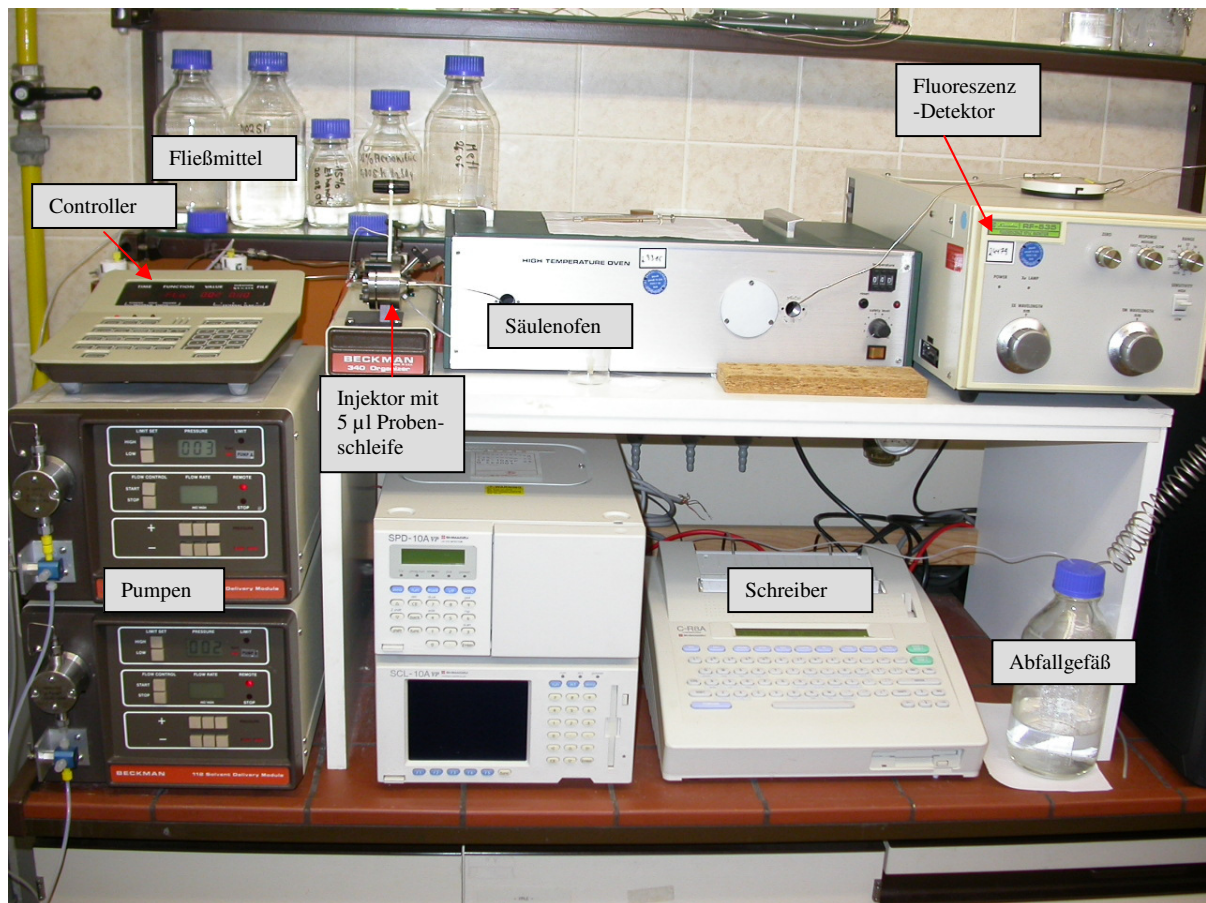


Abb. 8: HPLC-Anlage mit Fluoreszenz-Detektor

Analytik von Cystein in Tomatensaft:

a) Derivatisierung

Die Derivatisierung von Cystein durch ACQ (6-Aminochinoly-N-hydroxysuccinimidylcarbamate, Abb. 9) und die Durchführung der HPLC-Analyse erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Alle verwendeten Lösungen und Chemikalien waren Fertigreagenzien und wurden aus dem AccQTag Reagenzien-Kit (Waters, Eschborn) entnommen. 20 µl Derivatisierungsreagenz wurden zusammen mit 70 ml Boratpuffer und 10 µl Cystein-Standardlösung ($c = 0,1 \text{ g/l}$) in destilliertem Wasser in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend durch Vortexen gemischt. Bei der Probe wurden 10 µl käuflicher Tomatensaft (100fach mit destilliertem Wasser verdünnt) anstelle der Standardlösung eingesetzt. Nach 45 min Inkubation der Reaktionsmischung bei Raumtemperatur war die Derivatisierung abgeschlossen. Das entstandene stabile Harnstoff-Derivat (Abb. 9) fluoresziert stark bei 395 nm und kann bei Raumtemperatur über 1 Woche aufbewahrt werden. In einer langsameren Reaktion hydrolysierte das überschüssige Reagenz zu 6-Aminochinolin, N-Hydroxysuccinimid und Kohlenstoffdioxid.

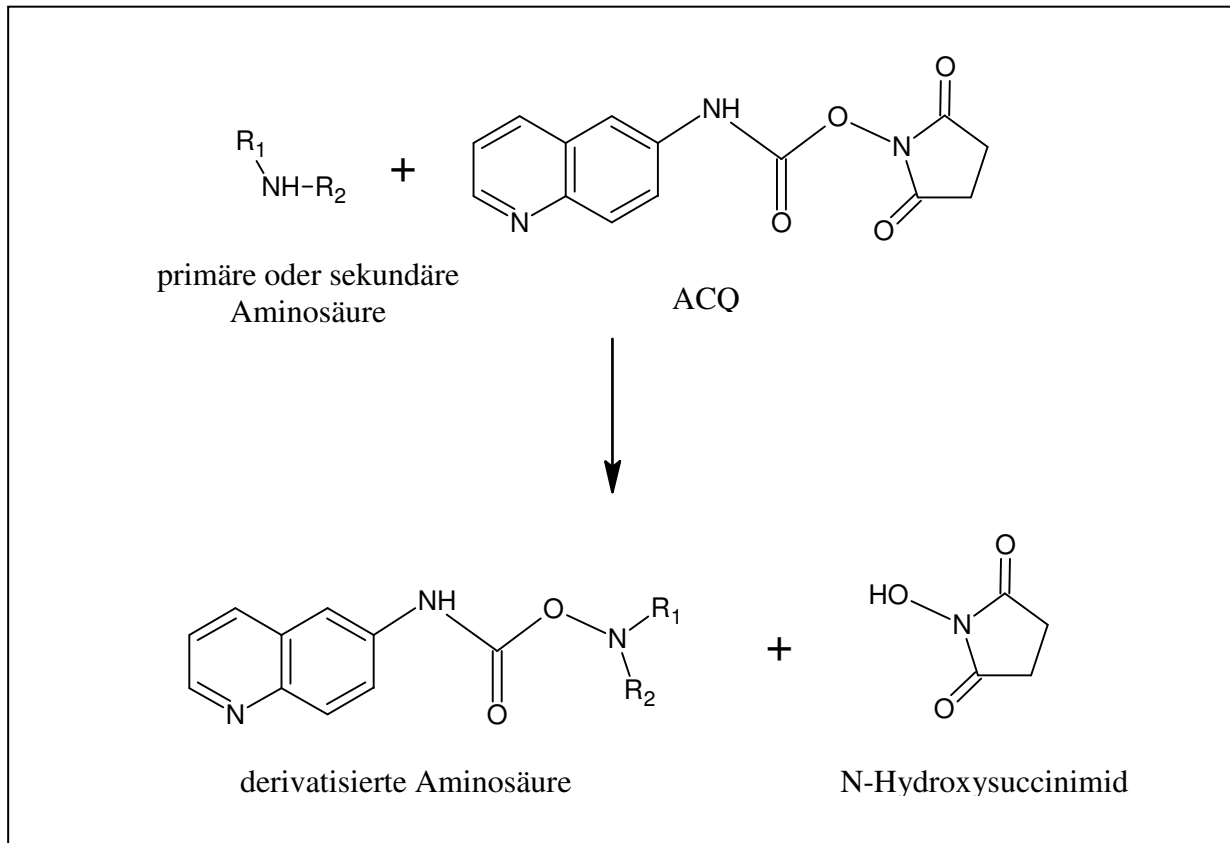


Abb. 9: Derivatisierung von Aminosäuren mit ACQ.

b) HPLC-Analyse

Es wurde eine C_{18} -Säule (Supelco Supelcosil™ LC-18; 250mm x 4mm; Partikelgröße 5 μm) und ein binäres Gradientenprogramm für die Elutionsmittel Acetonitril/Wasser (60/40; Eluent B) und Natriumacetatlösung (10fach verdünnter Eluent A aus dem AccQTag Reagenzien-Kit) angewendet. Das Probenvolumen betrug 5 μl . Beim Fluoreszenzdetektor wurden folgende Parameter eingestellt: Extinktion 250 nm, Emission 395 nm, Probenrate 5 pts/sec und Zeitkonstante 0,5/sec. Die Zusammensetzung der mobilen Phase im Verlauf des Gradientenprogramms sah wie folgt aus:

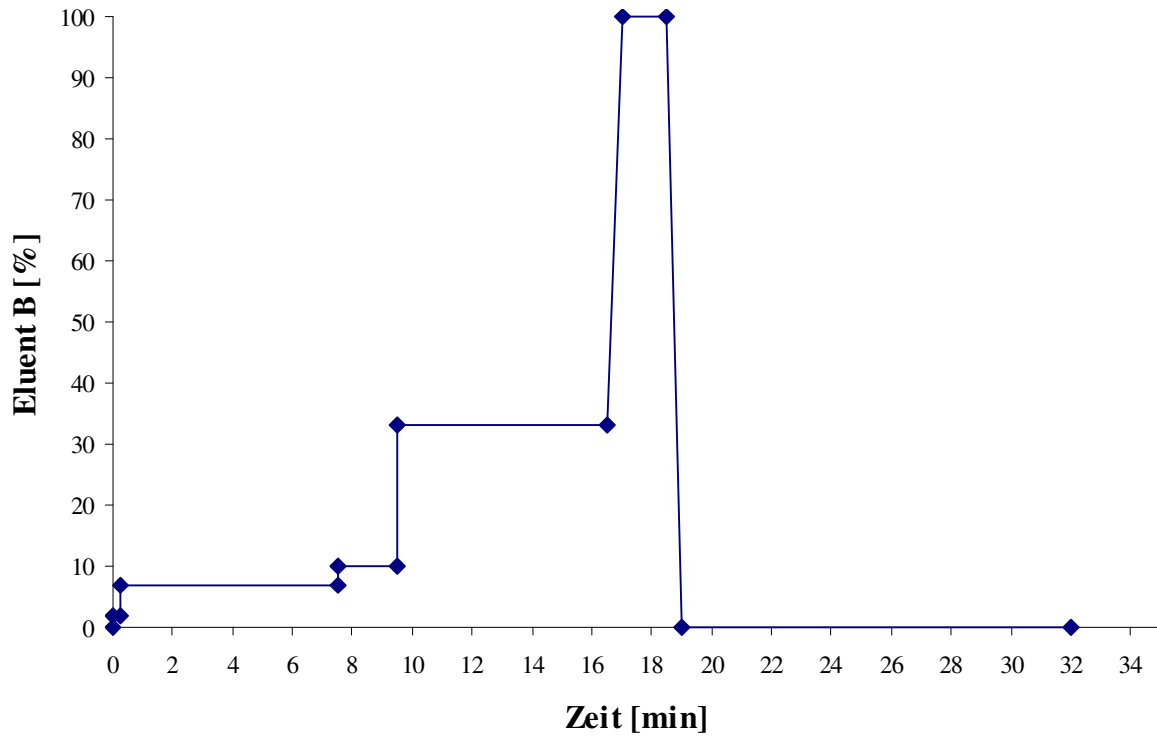


Abb. 10: zeitlicher Verlauf des HPLC-Gradienten

0 min	100% Eluent A / 0% Eluent B
0 – 0,25 min	98% Eluent A / 2% Eluent B
0,25 – 7,5 min	93% Eluent A / 7% Eluent B
7,5 – 9,5 min	90% Eluent A / 10% Eluent B
9,5 – 16,5 min	67% Eluent A / 33% Eluent B
16,5 – 17 min	0% Eluent A / 100% Eluent B
17 – 18,5 min	0% Eluent A / 100% Eluent B
18,5 – 19 min	100% Eluent A / 0% Eluent B
19 – 32 min	100% Eluent A / 0% Eluent B

3.13 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Die Mineralstoffe der Säfte wurden nach Zugabe von 7,5 ml 65% Salpetersäure, 2 ml 30% Wasserstoffperoxid und destilliertem Wasser mit folgendem Mikrowellenprogramm aufgeschlossen: 700 W, 75 °C (2.3 min); 500 W, 130 °C (5.3 min); 1000 W, 200 °C (16 min). Die Messung erfolgte bei Mangan mittels Graphitrohr und Lachgas/Acetylen-Flamme, alle anderen Elemente wurden mit einer Luft/Acetylen-Flamme atomisiert. Die Messung erfolgte am Institut für anorganische Chemie an der Universität Mainz.

3.14 Massenspektrometrische Analysen (MS)

Die Massendetektion wurde mit einem Waters Micromass LCT mit angeschlossenem Agilent 1100 HPLC-System bei Sanofi-Aventis im Industriepark Frankfurt-Höchst durchgeführt (einschließlich Sample-Manager, Pumpen-Systeme, 2 x 50 mm Phenomenex Luna C₁₈ (3 µm) Säule und Dioden-Array-Detektor). Es wurde ein Lösungsmittel-Gradient von 5% Acetonitril (wässrig) zu 100% Acetonitril innerhalb von 20 min benutzt. Die Fließmittel waren mit 6,5 mM Ammoniumacetat auf pH 4,5 gepuffert. Für die MS/MS Messungen wurden die wässrigen Proben direkt in einen Bruker Esquire 3000plus Ion Trap eingespritzt.

3.15 NMR-Analysen

Die nach mehreren HPLC-Läufen gesammelten Fraktionen 13 des Mangoschalenextrakts (Abb. 15) wurden vereint. Das isolierte Material (2,9 mg) wurde in 0,5 ml D₂O mit ein paar Tropfen Aceton-d₆ gelöst. Die ¹H- und ¹³C-NMR Messungen wurden an einem Bruker Avance AV400 NMR-Gerät mit 5mm BBI-z Gradient-Probenkopf) an der Universität Siegen durchgeführt, die HSQC- und HMBC-Messungen an einem Varian VNMRs-600 Gerät mit 5 mm Triple Resonanz Kaltprobenkopf sowie die COSY- und TOCSY-Messungen an einem Varian VNMRs-600 Gerät mit 3 mm Triple Resonanz Probenkopf im Varian Applab in Darmstadt.

4. Ergebnisse

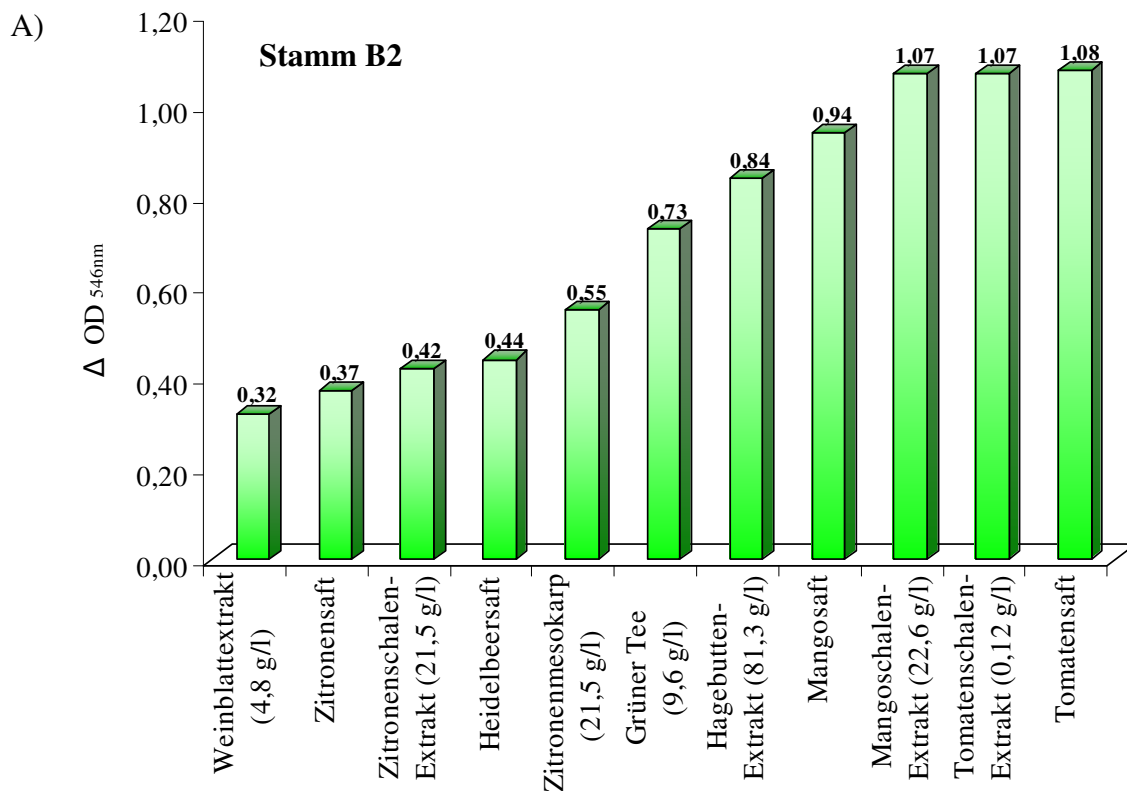
4.1 Wachstums-Screening der verschiedenen *Oenococcus oeni*-Stämme mit Säften und Blattextrakten als Additive

Zunächst wurde eine Vielzahl von Säften und Blattextrakten als Medien-Additive auf Wachstumsförderung von *Oenococcus oeni* getestet. Ziel war herauszufinden, ob der Tomatensaft die optimale Ausgangssubstanz zur Identifizierung des Wachstumsfaktors ist, oder ob es andere Säfte gibt, die noch besser wirken. Nach Zugabe der Extrakte zum Grundmedium und Beimpfung mit *Oenococcus oeni* Stamm B2, B5 bzw. B248 wurde in einem Wachstums-Assay die Bakteriendichte nach 10 Tagen mittels Extinktionsmessung bei 546 nm ermittelt. Es wurden Säfte ausgewählt, die möglichst viele Inhaltsstoffe der Tomate enthielten, mit dem Ziel anhand der Zelldichte eine Substanzklasse des Wachstumsfaktors erkennen zu können. So wählte man carotinoidhaltige Proben wie Hagebutten-Extrakt (Lycopin), aber auch polyphenolreiche Früchte wie Zitronen (Flavanone), Heidelbeeren (Anthocyane), Weinblattextrakt und grüner Tee (Catechine) sowie die Mango (Flavone). Bei der Mango liegt ebenso eine Publikation vor, wonach *Oenococcus oeni* bereits in Mango-Konserven detektiert wurde (Ethiraj und Suresh 1985). Außerdem wurden von Tomaten, Mangos und Zitronen wässrige Schalenextrakte hergestellt, da viele bioaktive Inhaltsstoffe von Früchten, wie beispielsweise phenolische Verbindungen, hauptsächlich in der Schale vorkommen (Bocco et al., 1998; Gorinstein et al., 2001; Leontowicz et al., 2003) und so eine leichte Vorabtrennung von übrigen Matrixbestandteilen möglich wäre. Die Tests wurden mit den Stämmen B2, B5 und B248 ausgeführt, weil diese aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften gut als Starterkulturen geeignet wären.

Von 11 Proben zeigten bei den Stämmen B2 und B248 sieben Zusätze zum Wachstumsmedium eine Extinktionssteigerung von mindestens 0,5 gegenüber der Kontrolle, bei Stamm B5 waren es drei Zusätze (Abb. 11). Beim Stamm B2 lagen die Maxima bei Tomatensaft ($\Delta OD_{546nm} = 1,08$) sowie Tomatenschalen- und Mangoschalen-Extrakt ($\Delta OD_{546nm} = 1,07$), die Minima bei Weinblatt-Extrakt ($\Delta OD_{546nm} = 0,32$) und Zitronensaft ($\Delta OD_{546nm} = 0,37$). Es war erkennbar, dass die Fruchtfleischsäfte eine ähnliche Bakteriendichte wie ihre verdünnten Schalen-Extrakte erreichten, also deutlich wachstumsfördernd sind (z.B. Mangosaft mit $\Delta OD_{546nm} = 0,94$). Bei Stamm B248 zeigte sich ebenfalls eine breitgefächerte Wachstumsförderung durch die Saftzusätze, wobei das Maximum bei Tomatensaft ($\Delta OD_{546nm} = 0,77$) und das Minimum bei Zitronensaft ($\Delta OD_{546nm} = -0,05$) lag. Stamm b5 zeigte

Ergebnisse

im Vergleich zu den anderen beiden Stämmen insgesamt eine schlechtere Wachstumsförderung. Nur bei Zusatz von Tomatensaft ($\Delta OD_{546nm} = 0,96$), Tomatenschalen-Extrakt ($\Delta OD_{546nm} = 0,91$) und Mangosaft ($\Delta OD_{546nm} = 0,80$) war eine gute Stimulierung erkennbar. Mangoschalen-Extrakt ($\Delta OD_{546nm} = 0,31$) wirkte gegenüber Mangosaft eher schlecht, Zitronensaft gar hemmend ($\Delta OD_{546nm} = -0,58$). Es konnte sich somit aufgrund der Wirksamkeit von vielen Säften bei dem Wachstumsfaktor nicht ausschließlich um einen tomatenspezifischen Pflanzeninhaltsstoff handeln. Es schienen jedoch große Unterschiede zwischen den verschiedenen Oenokokken-Stämmen zu bestehen.



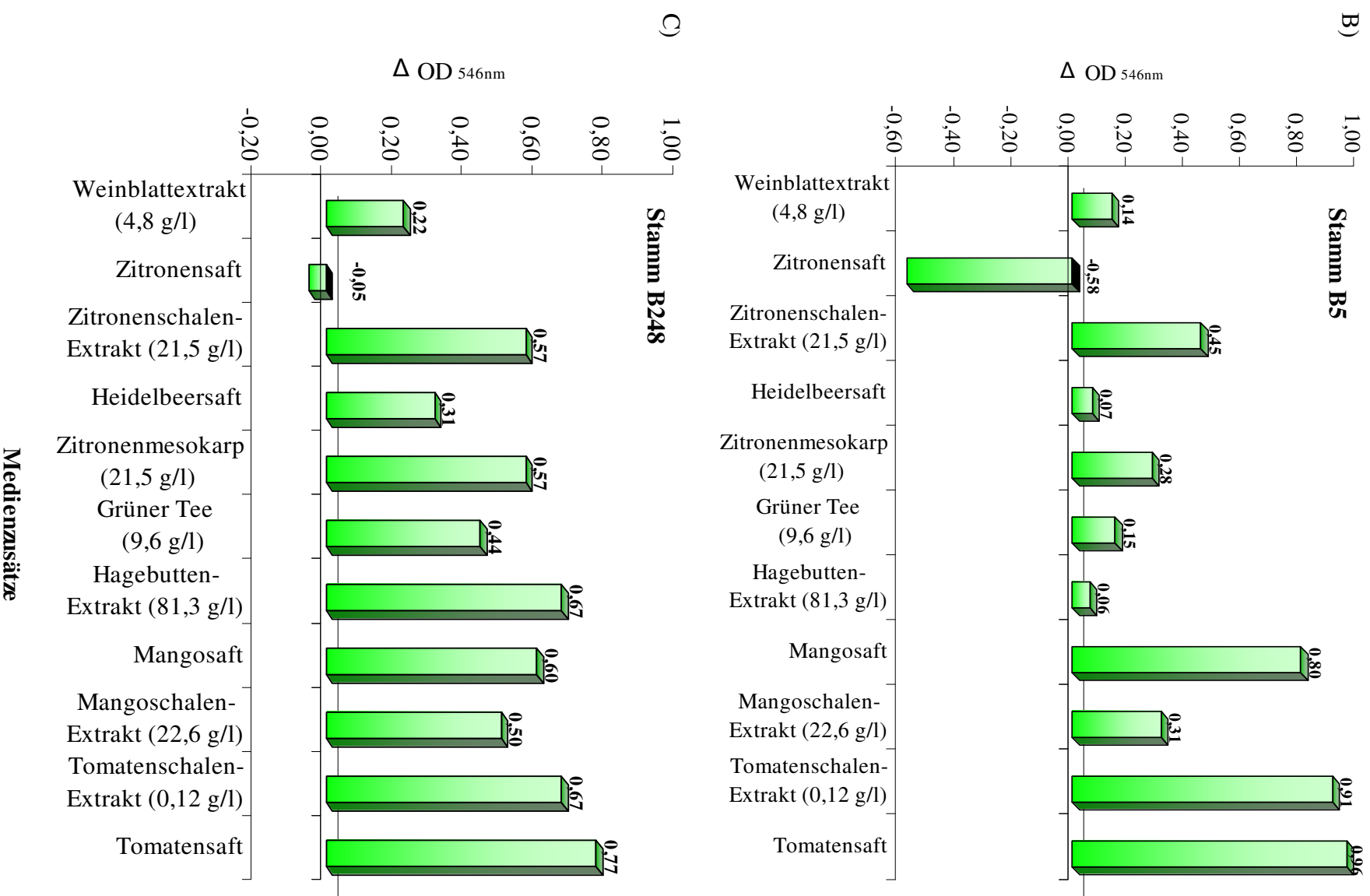


Abb. 11: Wachstumstests mit *Seneciocephala oeni* Stamm B2, B5 und B248 mit verschiedenen Säften als Medienzusatz. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 546 nm.

4.2 Wachstums-Screening verschiedener *Oenococcus oeni*-Stämme mit Saft- und Blattextraktzusätzen

Aufgrund der in Kapitel 4.1 offensichtlichen stammspezifischen Unterschiede wurden 27 weitere Oenokokken-Stämme getestet, um zu sehen, ob größere einheitliche Gruppen bezüglich des Verhaltens gegenüber Saftzusätzen im Nährmedium auszumachen sind. Dazu wurden einige Säfte als Zusatz ausgewählt, die in Kapitel 4.1 eine auffallend große Wachstumssteigerung verursacht hatten und damit gute Voraussetzungen zur Isolierung eines Wachstumsfaktors lieferten. Aber auch Additive wie beispielsweise Zitronensaft und Weinblattextrakt, der nur eine geringe Wachstumsförderung verursachte, wurde weiter untersucht, da hier in anderen Konzentrationsbereichen eventuell gar eine Hemmung der Zellvermehrung wie beim Zitronensaft eintreten könnte. Die Isolierung von Hemmstoffen wäre für säurearme Weine südlicher Breiten geeignet, um eine spontan einsetzende Malolaktat-Fermentation unterdrücken zu können.

4.2.1 Saft aus geschälten Tomaten und Tomatenschalen-Extrakt

Da der Tomatensaft und auch der Tomatenschalen-Extrakt das Wachstum der Stämme B2, B5 und B248 am besten verstärkten (Kapitel 4.1.1), sollte festgestellt werden, ob der Wachstumsfaktor lokal in einem bestimmten Bereich der Frucht vorkommt oder auf alle Fruchtbereiche verteilt ist. Einige Polyphenole kommen beispielsweise nur in der Schale vor, was auch Untersuchungen von Tomatensaft und Tomatenschalen-Extrakt mittels HPLC-UV/DAD bestätigten (Abb.12 und Anhang 1).

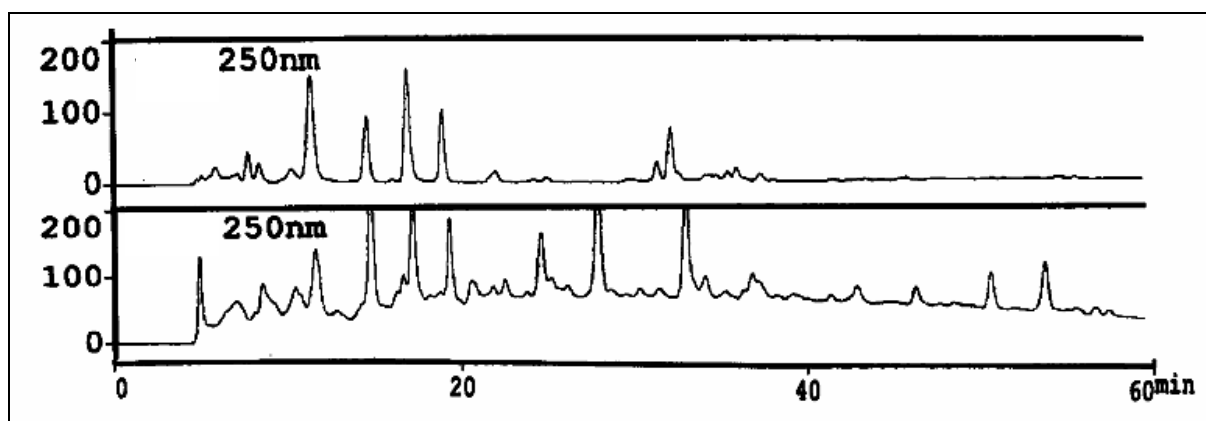


Abb. 12: HPLC/UV-Chromatogramme von Tomatensaft (oben) und Tomatenschalen-Extrakt (unten) bei 250 nm. Die kompletten HPLC/UV-DAD-Chromatogramme befinden sich im Anhang.

Der Fruchtfleischsaft der geschälten Tomaten wurde zudem am Rotationsverdampfer fünffach aufkonzentriert und im Nährmedium mit 30 *Oenococcus oeni*-Stämmen untersucht, um die Auswirkung einer höheren Konzentration der Inhaltsstoffe im Vergleich zum Ausgangssaft zu sehen (Tab. 2). Eine höhere Aufkonzentrierung war aufgrund der Viskosität nicht möglich. Der unbehandelte Fruchtfleischsaft wurde lediglich bei den Stämmen B4, 5, 70, 211, 236 und 248 getestet. Diese Stämme sind bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit für die Oenokokken repräsentativ. B4 und B5 wachsen langsam, B211 hat eine mittlere Wachstumsgeschwindigkeit und B236 sowie B248 wachsen schnell an. Der Stamm B70 ist ein spezieller Stamm, weil er auch schon im Grundmedium zu halten ist und bei fast allen Untersuchungen mit Oenokokken eine Sonderstellung einnimmt.

Die OD_{546nm} des Ansatzes mit dem Fruchtfleischsaft lag bei den Stämmen B4, B5 und B70 im Bereich des käuflichen Tomatensaftes, der durch die Herstellung auch Inhaltsstoffe der Tomatenschalen beinhalten kann. Eine Aufkonzentrierung des Fruchtfleischsaftes führte bei allen Stämmen zu einer eindeutigen Extinktionssteigerung der Kulturlösung, was auf eine suboptimale Konzentration des Wachstumsfaktors in der Tomate schließen lässt. Bei den Stämmen B211, B236 und B248 wirkte bereits der pure Fruchtfleischsaft besser als der käufliche Tomatensaft. Dies bestätigte der Versuch mit Tomatenschalen-Extrakt zumindest für den Stamm B248. Die Bakteriendichte lag bei Zusatz von Tomatenschalen-Extrakt bei den meisten deutlich über Tomatensaft, konnte jedoch durch aufkonzentrierten Fruchtfleischsaft meist noch etwas übertroffen werden.

1. Der Tomatenschalen-Extrakt erzielte die höchste Bakteriendichte, aufkonzentrierter Fruchtfleischsaft wirkte besser als Tomatensaft (7 *Oenococcus oeni*-Stämme, 23%):
B122, B217, B232, B233, B242, B243 und B246.
2. Der aufkonzentrierte Fruchtfleischsaft erzielte eine höhere bzw. gleich hohe Bakteriendichte wie der Tomatenschalen-Extrakt, Tomatensaft wirkte schlechter (16 *Oenococcus oeni*-Stämme, 54%):
B1, B3, B64, B70, B120, B139, B211, B213, B234, B235, B236, B237, B241, B244, B245 und B247.
3. Der aufkonzentrierte Fruchtfleischsaft erzielte die höchste Bakteriendichte, der Tomatenschalen-Extrakt wirkte nur ähnlich bzw. schlechter als Tomatensaft (7 *Oenococcus oeni*-Stämme, 23%):
B2, B4, B5, B65, B66, B248 und B249.

Stamm	OD _{546nm} bei Zusatz von				
	Wasser	TSE	TOK	TO	TS
B1	0,66	1,85	1,98		1,41
B2	0,37	1,49	2,11		1,54
B3	0,55	1,72	2,02		1,35
B4	0,45	1,42	1,84	1,19	1,32
B5	0,41	1,32	1,96	1,41	1,37
B64	0,47	1,71	1,90		1,35
B65	0,43	0,83	1,81		1,43
B66	0,30	1,66	2,04		1,72
B70	1,24	1,85	2,17	1,74	1,69
B120	0,46	1,49	1,87		1,18
B122	0,66	1,93	1,82		1,37
B139	0,11	1,24	1,39		0,82
B211	0,64	1,96	2,28	1,70	1,47
B213	0,62	1,81	1,90		1,25
B217	0,00	1,67	1,23		0,92
B232	0,00	1,57	1,39		1,07
B233	0,75	2,01	1,85		1,08
B234	0,74	1,95	1,95		1,62
B235	0,64	1,95	1,89		1,50
B236	0,78	1,81	2,02	1,70	1,42
B237	0,62	1,66	1,70		1,10
B241	0,90	2,04	2,09		1,57
B242	0,00	1,69	1,53		1,24
B243	0,62	1,98	1,79		1,46
B244	0,00	1,62	1,65		1,13
B245	0,09	1,62	1,62		1,22
B246	0,00	1,67	1,33		1,03
B247	0,57	2,01	1,96		1,59
B248	0,67	1,27	2,02	1,60	1,37
B249	0,64	1,48	1,96		1,83

Tab. 2: Wachstumstest von 30 verschiedenen *Oenococcus oeni*- Stämmen mit Tomatenschalen-Extrakt (TSE), fünffach konzentriertem Saft aus geschälten Tomaten (TOK), Saft aus geschälten Tomaten (TO) und Tomatensaft (TS) als Medienzusatz. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 546 nm.

4.2.2 Saft aus geschälten Mangos und Mangoschalen-Extrakt

Wie sich in Kapitel 4.1.1 herausstellte wirkten Zusätze aus der Mango neben der Tomate ebenfalls stark wachstumsfördernd auf die getesteten Stämme (mit Ausnahme von Mangoschalen-Extrakt bei Stamm B5). Deshalb wurde die Mango auf 30 verschiedene *Oenococcus oeni*-Stämme getestet, um herauszufinden, welche dieser Präparate auf die meisten Stämme besser wirkt und somit das optimale Ausgangsmaterial für weitergehende

Untersuchungen liefert. Zusätzlich zu dem Fruchtfleischsaft (MS) und dem Mangoschalen-Extrakt (MSE) wurde Saft aus ungeschälten Mangos (MSK) hergestellt und im Wachstums-Assay eingesetzt. Eine Aufkonzentrierung des Fruchtfleischsaftes machte aufgrund der hohen Viskosität keinen Sinn. Auch hier lassen sich die *Oenokokken*-Stämmen bezüglich der getesteten Zusätze (Tab. 3) in Gruppen einteilen:

1. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen dem Saft aus geschälten Mangos und Tomatensaft feststellbar (16 *Oenococcus oeni*-Stämme, 54%):
B4, B5, B64, B65, B66, B70, B120, B139, B233, B234, B235, B236, B237, B242, B243 und B246.
2. Tomatensaft erzielte eine höhere Bakteriendichte als der Saft aus geschälten Mangos (7 *Oenococcus oeni*-Stämme, 23%):
B2, B213, B232, B245, B247, B248 und B249.
3. Der Saft aus geschälten Mangos erzielte eine höhere Bakteriendichte als Tomatensaft (7 *Oenococcus oeni*-Stämme, 23%):
B1, B3, B122, B211, B217, B241 und B244.

Fast alle Stämme bevorzugten Mangosaft gegenüber dem Schalenextrakt, dies ist ein Unterschied zu der Tomate (siehe Kapitel 4.1.2). Nur 4 Stämme (B2, B65, B244 und B247) machten hier eine Ausnahme, wobei B2 und B247 mit dem Schalenextrakt sogar besser als mit dem Saft wuchsen. Das kann auf einen erhöhten Bedarf an Polyphenolen bei diesen Stämmen hindeuten, da auch schon der Tomatenschalen-Extrakt eine große Extinktionssteigerung verursachte. Der Mangoschalenextrakt könnte hingegen auch Hemmstoffe beinhalten, da der Saft aus ungeschälten Früchten eine erheblich geringere Bakteriendichte als der Saft aus dem Fruchtfleisch erzielte, die sogar etwas unterhalb des Schalenextraktes lag.

Die Säfte aus geschälten Mangos und Tomaten waren gleichwertig, hier ist eine eindeutige Abhängigkeit vom getesteten *Oenokokken*-Stamm feststellbar. Aufkonzentrierter Tomatensaft blieb aber hinsichtlich der Zelldichte unerreicht.

Stamm	OD _{546nm} bei Zusatz von				
	Wasser	MS	MSE	MSK	TS
B1	0,69	1,60	1,30		1,38
B2	0,38	1,32	1,45		1,46
B3	0,70	1,45	1,19		1,30
B4	0,55	1,25	0,90	0,78	1,35
B5	0,60	1,40	0,95	0,98	1,35
B64	0,36	1,35	1,06		1,35
B65	0,49	0,98	0,98		0,92
B66	0,58	1,42	1,02		1,50
B70	1,15	1,45	1,25	1,30	1,35
B120	0,51	1,50	1,23		1,50
B122	0,42	1,15	0,85		0,89
B139	0,20	0,95	0,69		0,90
B211	0,48	1,50	1,15	0,95	1,35
B213	0,50	1,27	1,25		1,40
B217	0,02	0,88	0,50		0,70
B232	0,21	1,00	0,75		1,15
B233	0,59	1,50	1,30		1,55
B234	0,75	1,50	1,30		1,55
B235	0,52	1,40	1,13		1,45
B236	0,76	1,45	1,25	1,00	1,50
B237	0,14	0,94	0,60		0,85
B241	0,75	1,60	1,35		1,40
B242	0,17	1,25	0,83		1,20
B243	0,68	1,55	1,35		1,55
B244	0,24	1,35	1,35		1,20
B245	0,14	1,07	0,69		1,25
B246	0,08	1,10	0,60		1,10
B247	0,52	1,05	1,35		1,45
B248	0,60	1,20	1,10	0,78	1,45
B249	0,55	1,22	1,10		1,50

Tab. 3: Wachstumstests von 30 verschiedenen *Oenococcus oeni*- Stämmen mit Saft von geschälten Mangos (MS), Mangoschalenextrakt (MSE), Saft von ungeschälten Mangos (MSK) und Tomatensaft (TS) als Medienzusatz. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 546 nm.

4.2.3 Hagebutten-Extrakt

Neben den polyphenolreichen Früchten zeigte auch die Zugabe von polyphenolarmem Hagebutten-Extrakt zum Grundmedium eine hohe Extinktionssteigerung im Screening mit dem Stamm B2 ($\Delta OD_{546nm} = 0,94$) und B248 ($\Delta OD_{546nm} = 0,67$; siehe Kapitel 4.1.1), nicht jedoch bei Stamm B5. Hagebutten beinhalten wie die Tomate Carotinoide (Lycopin), die

ebenfalls an der Wachstumsförderung der *Oenokokken* beteiligt sein können. Aus diesem Grund wurde auch die Wirkung von Hagebutten-Extrakt auf das Wachstum der anderen *Oenokokken*-Stämme untersucht (Tab. 4).

Stamm	OD _{546nm} bei Zusatz von		
	Wasser	H	TS
B1	0,80	1,04	1,54
B2	0,38	1,15	1,44
B3	0,81	1,00	1,49
B4	0,60	0,84	1,46
B5	0,69	0,75	1,47
B64	0,48	1,02	1,44
B65	0,13	0,64	0,91
B66	0,71	1,15	1,48
B70	1,11	1,14	1,51
B120	0,44	1,04	1,27
B122	0,47	0,80	1,17
B139	0,17	0,77	1,15
B211	0,35	1,15	1,55
B213	0,55	0,84	1,39
B217	0,00	0,79	0,86
B232	0,15	0,66	1,37
B233	0,65	1,13	1,50
B234	0,80	1,01	1,53
B235	0,61	0,79	1,43
B236	0,76	1,03	1,44
B237	0,16	0,72	1,29
B241	0,91	1,10	1,54
B242	0,07	1,05	1,29
B243	0,78	1,18	1,49
B244	0,19	0,77	1,48
B245	0,06	0,70	1,22
B246	0,08	1,00	1,22
B247	0,50	1,30	1,39
B248	0,58	1,27	1,47
B249	0,53	1,36	1,43

Tab. 4: Wachstumstests von 30 verschiedenen *Oenococcus oeni*- Stämmen mit Hagebutten-Extrakt (H) und Tomatensaft (TS) als Medienzusatz. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 546 nm.

Es zeigte sich bei allen Stämmen eine Wachstumsförderung durch Hagebutten-Extrakt, die jedoch im Vergleich immer niedriger war als mit Tomatensaft. Die Stämme B217, B247 und B249 vermehrten sich hierbei sehr gut, die Stämme B5 und B70 wiesen kaum eine Reaktion

auf. Ein positiver Einfluß von Carotinoiden auf das Oenokokken-Wachstum wird in Kapitel 4.4.1 weitergehend untersucht.

4.2.4 Zitronensaft und Extrakt von Zitronenmesokarp und Zitronenschale

Die Bestandteile der Zitrone wurden als Medienzusatz weiter untersucht, da der Zitronensaft im Unterschied zum Extrakt aus der Schale bzw. aus dem Mesokarp das Wachstum von Stamm B248 nicht förderte und bei Stamm B5 hemmend wirkte. Solch große Unterschiede in den Ergebnissen innerhalb der verschiedenen Bereiche einer Frucht wurden nur bei der Zitrone beobachtet.

Die Extrakte vom Zitronenmesokarp und der Zitronenschalen förderten das Wachstum aller Stämme (Tab. 5). Die OD_{546nm} von Tomatensaft wurde jedoch nur bei den *Oenococcus oeni*-Stämmen B217 und B249 erreicht, im Falle von Zitronenmesokarp zusätzlich bei den Stämmen B246 und B247. Zitronenschalen-Extrakt wirkte bei den Stämmen B1, B3, B5, B64, B120, B233, B236, B242 und B243 besser als der Zusatz des Extraktes von Zitronenmesokarp, bei den Stämmen B65, B139, B211, B213, B234, B245, B246 und B247 hingegen schlechter. Bei den übrigen Stämmen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, d.h. $\Delta OD_{546nm} < 0,1$ (entspricht doppelter Fehlerbreite bei der Messung in Reagenzgläsern). Das Wachstum der Oenokokken mit Zusatz von Zitronensaft war dagegen sehr heterogen:

Bei 10 Oenokokken-Stämmen trat eine deutlich größere Bakteriendichte auf:

B2, B70, B120, B211, B213, B233, B234, B236, B241 und B249.

Bei 10 Oenokokken-Stämmen blieb das Wachstum unbeeinflusst:

B3, B64, B217, B232, B242, B243, B245, B246, B247 und B248.

Bei 10 Oenokokken-Stämmen trat eine deutliche geringere Bakteriendichte auf:

B1, B4, B5, B65, B66, B122, B139, B235, B237 und B244.

Stamm	OD _{546nm} bei Zusatz von				
	Wasser	ZS	ZSE	ZM	TS
B1	0,80	0,63	1,30	1,09	1,54
B2	0,38	0,69	0,88	0,90	1,44
B3	0,81	0,90	1,21	1,01	1,49
B4	0,60	0,23	0,93	0,93	1,46
B5	0,69	0,00	1,14	0,93	1,47
B64	0,48	0,48	1,12	0,93	1,44
B65	0,13	0,00	0,68	0,84	0,91
B66	0,71	0,01	1,14	1,07	1,48
B70	1,11	1,32	1,32	1,38	1,51
B120	0,44	1,17	1,10	0,75	1,27
B122	0,47	0,00	1,07	1,13	1,17
B139	0,17	0,05	0,68	0,82	1,15
B211	0,35	1,14	1,06	1,20	1,55
B213	0,55	0,95	0,73	0,86	1,39
B217	0,00	0,00	0,98	0,94	0,86
B232	0,15	0,20	0,93	1,01	1,37
B233	0,65	1,33	1,13	1,01	1,50
B234	0,80	1,35	1,09	1,23	1,53
B235	0,61	0,00	0,89	0,93	1,43
B236	0,76	1,24	1,04	0,91	1,44
B237	0,16	0,00	0,90	0,99	1,29
B241	0,91	1,32	1,10	1,13	1,54
B242	0,07	0,00	1,07	0,69	1,29
B243	0,78	0,80	1,32	1,05	1,49
B244	0,19	0,00	1,12	1,03	1,48
B245	0,06	0,00	0,81	1,05	1,22
B246	0,08	0,01	1,02	1,14	1,22
B247	0,50	0,53	1,12	1,34	1,39
B248	0,58	0,55	1,17	1,17	1,47
B249	0,53	1,04	1,37	1,46	1,43

Tab. 5: Wachstumstests von 30 verschiedenen *Oenococcus oeni*- Stämmen mit Zitronensaft (ZS), Zitronenschalenextrakt (ZSE), Extrakt von Zitronenmesokarp (ZM) und Tomatensaft (TS) als Medienzusatz. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 546 nm.

4.2.5 Verschiedene Konzentrationen von Weinblatt-Extrakt

Der Zusatz von Weinblatt-Extrakt (c =2,8 g/ml) bewirkte bei den Stämmen B2 und B248 mit Ausnahme des Zitronensaftes die schwächste Wachstumsförderung und auch bei Stamm B5 war der Effekt sehr gering. Daher wurden nun verschiedene Konzentrationen von Weinblatt-Extrakt im Grundmedium an ausgewählten Oenokokken-Stämmen getestet, um zu sehen, ob auch eine Hemmung der Oenokokken-Stämme durch Weinblatt-Extrakt möglich ist, was für

die Unterbindung des spontanen Säureabbaus in Weinen südlicher Breiten eventuell interessant wäre. Man konnte bei hohen Konzentrationen eine Hemmung und bei geringen Konzentrationen eine Förderung des Wachstums feststellen (Tab. 6). Das Ausmaß der Effekte hing von dem verwendeten Oenokokken-Stamm ab. Besonders gravierend war die Hemmung bei den Stämmen B236 und vor allem B70. Bei den Stämmen B2, B5 und B248 zeigte der Extrakt hingegen auch in sehr hohen Konzentrationen nur geringe negative Effekte auf das Wachstum. Bei Stamm B211 zeigte sich lediglich eine Absenkung der OD_{546nm} von 0,02, was innerhalb der Fehlerbreite bei der Extinktionsmessung in Reagenzgläsern liegt. Bei allen Stämmen war der fördernde Einfluß bei Zusatz von Weinblattextrakt in geringen Konzentrationen (0,18 – 0,70 g/ml) zum Grundmedium zwar erkennbar, jedoch vom Ausmaß nicht mit Säften oder anderen untersuchten Extrakten vergleichbar.

Stamm	OD _{546nm} mit verschiedenen Medienzusätzen					
	Wasser	Tomaten-saft	Weinblatt-Extrakt [3,52 g/ml]	Weinblatt-Extrakt [0,70 g/ml]	Weinblatt-Extrakt [0,35 g/ml]	Weinblatt-Extrakt [0,18 g/ml]
B2	0,35	1,03	0,24	0,72	0,60	0,56
B5	0,33	1,27	0,25	0,47	0,56	0,61
B70	1,03	1,35	0,34	1,01	1,09	1,16
B211	0,26	1,37	0,24	0,59	0,57	0,44
B236	0,62	1,35	0,39	0,96	1,02	1,02
B248	0,48	1,35	0,40	0,70	0,73	0,68

Tab. 6: Wachstum von Oenokokken-Stämmen unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von Weinblattextrakt im Vergleich zu Tomatensaft. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 546 nm.

4.3 Isolierung und Identifizierung von anorganischen Wachstumsfaktoren

Wie aus den Wachstumsversuchen aus Kapitel 4.1 hervorgeht empfehlen sich insbesondere die Stämme B2 und B248 aufgrund der breitgefächerten starken Förderung durch Saft- und Blattextraktzusätze für die weiterführende Analytik der Wachstumsfaktoren. Bei Stamm B5 war die erzielte Zelldichte durch Zusatz von Säften insgesamt geringer (Abb. 7). Als Ausgangssubstanzen wurden nach den erhaltenen Ergebnissen aus Kapitel 4.1 Bestandteile der Tomate und der Mango ausgewählt

4.3.1 Festphasen-Extraktionen

Fünffach konzentrierter Saft von geschälten Tomaten wurde zunächst über eine C₁₈-SPE-Säule aufgetrennt, um etwas über die Polarität der aktiven Wachstumssubstanzen aussagen zu können. Die einzelnen erhaltenen Fraktionen wurden dann zum Grundmedium zugegeben und nach Beimpfung in einem Wachstumsassay auf Stimulierung getestet. Die wachstumsfördernde Fraktion war der Probendurchlauf, was auf polare Stoffe rückschließen läßt. Analoge Ergebnisse erbrachten auch weitere Proben wie beispielsweise Mangosaft und Mangoschalen-Extrakt (Tab. 7).

Additive zum Grundmedium	OD _{546nm}		
	TOK	MS	MSE
Wasser	0,75	0,78	0,56
C ₁₈ -PD	2,11	1,51	1,72
C ₁₈ -W1	1,60	1,15	1,30
C ₁₈ -W2	1,51	0,93	0,97
C ₁₈ -W3	1,31	0,80	0,83
C ₁₈ -E1	1,14	0,91	1,05
C ₁₈ -E2	1,00	0,85	0,90
C ₁₈ -E3	1,05	0,77	0,60
C ₁₈ -E4	0,88	0,79	0,62
C ₁₈ -E5	0,80	0,88	0,62
TOK	2,16		
MS		1,45	
MSE			1,16
TSE			

Tab. 7: Wachstum von *Oenococcus oeni* mit den SPE-Fractionen von TOK (5-fach konzentrierter Fruchtfleischsaft der Tomate), MS (Saft aus geschälten Mangos) und MSE (Mangoschalen-Extrakt) nach Auftrennung an C₁₈-Material (PD = Probendurchlauf, W1-W3 = Waschlösungen, E1-E5 = Eluate). Der Wachstumstest mit TOK wurde mit Stamm B2 durchgeführt, bei MS und MSE wurde Stamm B248 verwendet. Die Extinktionsmessung erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 10 d bei 25 °C.

Mit den Zusätzen der Festphasenfraktionen von Tomatenschalen-Extrakt war in den dadurch stark gefärbten Nährmedien keine Messung der optischen Dichte mehr möglich, sodaß eine Auswertung durch Ausplattieren auf Tomatensaft-Agar notwendig wurde. Auch hier war die Wachstumsförderung im Probendurchlauf zu finden. Da die unterschiedlichen Proben mit guter Wachstumsstimulierung aus Kapitel 4.1 keinerlei signifikante Unterschiede hinsichtlich der C₁₈-SPE zeigten wurden die weiteren SPE-Analysen mit fünffach konzentriertem Saft aus geschälten Tomaten durchgeführt. Eine Festphasen-Extraktion an polarem Polyamid sowie an dem Kunstharz XAD-7 und dem Styroldivinylbenzol-Polymer Strata-X (Tab. 8) bewirkten

allerdings ebenso wenig eine Anreicherung der stimulierenden Komponenten wie an den Festphasenmaterialien Kohlenstoff und dem Anionentauscher SAX (Trimethylpropylammoniumchlorid).

Additive zum Grundmedium	OD _{546nm}		
	PA	XAD-7	Strata-X
Wasser	0,70	0,58	0,69
PD	2,05	0,82	2,00
W1	0,69	1,70	1,71
W2	0,69	0,88	0,74
W3	0,62	0,69	0,69
E1	0,70	0,75	0,67
E2	0,69	0,87	0,66
E3	0,75	0,58	0,70
E4		0,64	0,68
E5		0,64	0,67
E6		0,62	
E7		0,56	
TOK	2,11	2,00	2,05

Tab. 8: Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2 mit den SPE-Fractionen von TOK (5-fach konzentrierter Fruchtfleischsaft der Tomate) nach Auftrennung an Polyamid (PA), dem Kunstharz XAD-7 und Styrol-Divinylbenzol-Polymer Strata-X (PD = Probendurchlauf, W1-W3 = Waschlösungen, E1-E7 = Eluate). Die Extinktionsmessung erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 10 d bei 25 °C.

Lediglich an dem Kationentauschermaterial SCX-2 konnte eine Retention erreicht werden. Als Probe wurde der Probendurchlauf der C₁₈-SPE verwendet, weil hier schon eine Vorabtrennung von unpolaren Inhaltsstoffen stattgefunden hat. Man kann jedoch auch direkt fünffach konzentrierten Saft aus geschälten Tomaten an SCX-2 auftrennen. Der Wachstumsfaktor wurde hier in Eluat 1 gefunden (Abb. 13). Es muss sich bei der gesuchten Substanz somit um eine polare positiv geladene Verbindung handeln. Eine Auftrennung von destilliertem Wasser über SCX-2 zeigte in den Fraktionen beim anschließenden Wachstumsassay keine Stimulierung, sodaß sichergestellt war, daß keine Elution von Substanzen aus der stationären Phase eine Auswirkung auf die Oenokokken hat.

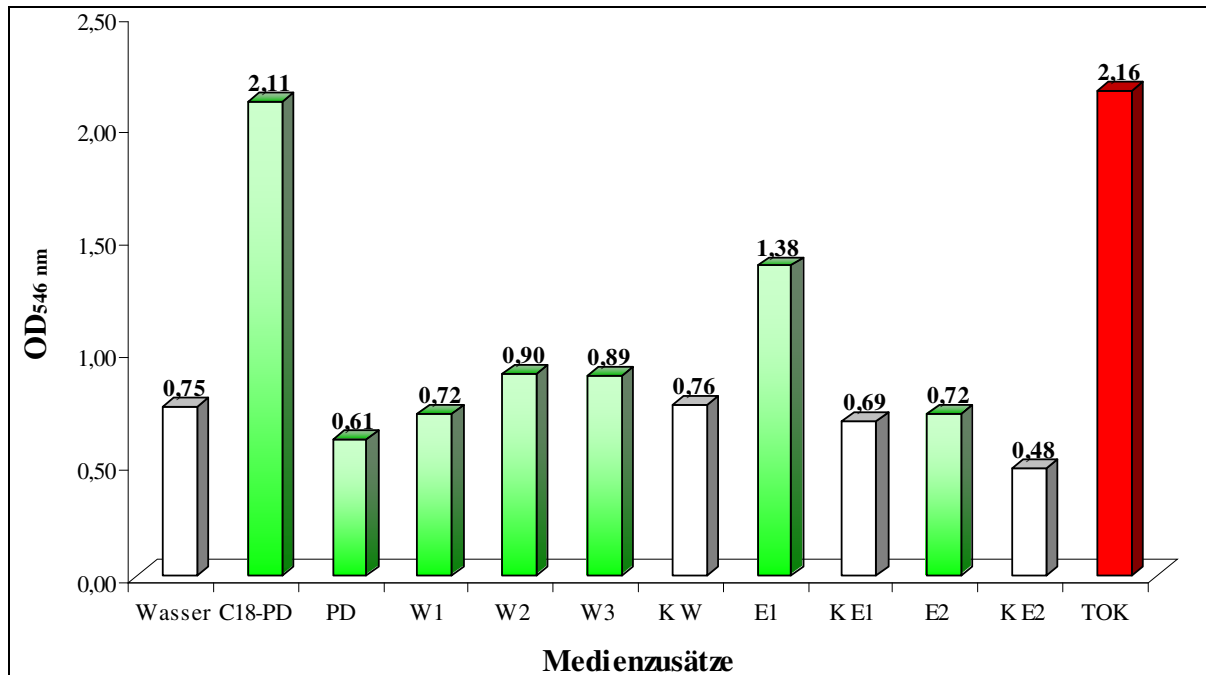


Abb. 13: Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2 mit Nährmediensatz von Fraktionen des C₁₈-Probendurchlaufes von TOK (fünffach konzentrierter Fruchtfleischsaft der Tomate) nach Auftrennung an dem Kationentauscher SCX2. (PD = Probendurchlauf, W1-W3 = Waschlösungen, KW = Kontrolle für Waschlösungen, E1-E2 = Eluate, KE1-KE2 = Kontrollen für Eluat 1 bzw. Eluat 2).

HPLC-Untersuchungen dieses fördernden Eluats 1 erbrachten sowohl bei Brechungsindex- als auch bei UV/Diodenarray-Detektoren lediglich Signale für Citratpuffer ($R_t = 7,39$ min) und den Natriumchlorid-Zusatz ($R_t = 5,20$ min) im Citratpuffer und Glucose ($R_t = 8,32$ min; Abb. 14). Diese Substanzen waren aber bereits im Grundmedium in ausreichender Menge vorhanden wie Wachstumstests mit höheren Konzentrationen dieser Stoffe zeigten. Da die bisher bestimmten Eigenschaften aus den Festphasen-Extraktionen und HPLC-Untersuchungen auf Mineralstoffe zuträfen, wurde eine weitere Festphasenextraktion mit der stationären Phase IC-Chelat Plus zur Entfernung von polyvalenten Metall-Ionen durchgeführt. Es zeigte sich im Probendurchlauf keinerlei Wachstumsförderung mehr ($\Delta OD_{546nm} = 0,03$), was diese Vermutung erhärtete. Eine Elution der absorbierten Substanzen fand nicht statt.

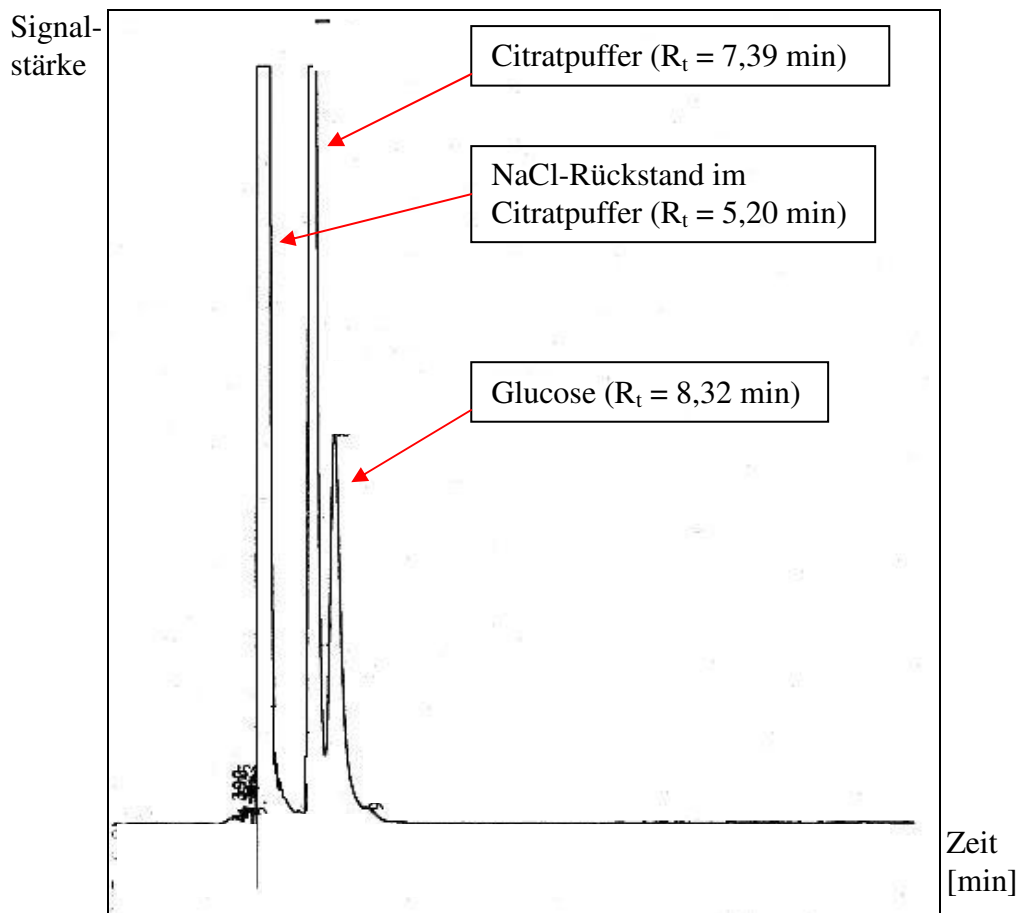


Abb. 14: HPLC/RI-Chromatogramm des wachstumsfördernden Eluates 1 der SCX 2-Fraktion nach Auftrennung an einer Aminex HPX 87H-Säule.

4.3.2 Mineralstoff-Analyse von Tomatensaft mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Da Kationen Eigenschaften besitzen, die auf die erhaltenen Versuchsergebnisse aus Kapitel 4.3.1 zutrafen, wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) deren Gehalt in käuflichem Tomatensaft und selbst hergestelltem Saft aus geschälten Tomaten bestimmt (Tab. 9). Die Unterschiede waren jedoch eher gering und kommen durch viele Faktoren (Sorte, Klimabedingungen, Herstellung) zustande.

Saft	Ca	Zn	K	Fe	Mn	Mg	Cu
Tomatensaft (käuflich)	1 mM	47 µM	64 mM	64 µM	9 µM	4 mM	3 µM
Tomatensaft (ohne Schale)	600 µM	31 µM	40 mM	43 µM	11 µM	5 mM	6 µM

Tab. 9: Mineralstoffgehalt von käuflichem Tomatensaft und schalenfreiem Tomatensaft. Cobalt und Nickel waren unterhalb der Detektionsgrenze (< 1 µM).

Anschließend wurden dem käuflichen Tomatensaft analoge Mineralstoff-Lösungen im Wachstums-Assay an Stamm B2 und B248 getestet (Tab. 10). Die beiden Stämme zeigten im Verhalten keine Unterschiede. Es stellte sich heraus, dass nur Mangan positiv wirkte (Erhöhung der OD_{546nm} um 0,23 auf 0,98 bei Stamm B2 und um 0,18 auf 0,95 bei Stamm B248). Dieses Ergebnis bestätigten anschließende Wachstumstests an Stamm B248 mit der gesamten Mineralstoffkombination, bei der nur Mangan ausgelassen wurde. Alle Mineralstoffe zusammen ohne Mangan bewirkten lediglich eine zu vernachlässigende Erhöhung der Zelldichte um 0,04 (Stamm B2) bzw. 0,05 (Stamm B248). Der ermittelte Mangan-Gehalt betrug im Grundmedium nur 1 µM.

Zusätze zum Grundmedium	OD _{546nm}	
	Stamm B2	Stamm B248
H ₂ O (Kontrolle)	0,75	0,77
Eisen (64 µM)	0,67	0,73
Zink (47 µM)	0,63	0,73
Kupfer (4 µM)	0,81	0,73
Kalium (64 mM)	0,66	0,79
Calcium (1 mM)	0,75	0,83
Mangan (10 µM)	0,98	0,95
Magnesium (4 mM)	0,79	0,79
Mineralstoff-Kombination ohne Mangan	0,79	0,82
Tomatensaft	1,69	1,71

Tab. 10: Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2 und B248 mit Mineralstoff-Zusätzen. Als Mineralsalze wurden Chloride verwendet. Die Mineralstoffkonzentration entspricht den Konzentrationen im Tomatensaft (Tab. 9). Inkubationsdauer: 10 Tage.

4.3.3 Einfluß von Mangan auf das Wachstum von Oenokokken

Es wurden Wachstumskurven von 30 verschiedenen Oenokokkenstämmen aufgenommen, um eventuelle stammspezifische Unterschiede zu erkennen. Die Mangankonzentration betrug 4 µM im Medium, entsprechend einem 25%igen Zusatz des Mangangehaltes von käuflichem Tomatensaft zum Grundmedium. Im Hinblick auf eine Manganstimulierung (4 µM) lassen

Ergebnisse

sich die getesteten Oenokokken-Stämme formal in 2 Gruppen einteilen (Tab. 11): Gruppe 1 (24 Stämme): Manganzusatz bewirkte eine deutliche Stimulierung des Wachstums, Gruppe 2 (6 Stämme): Manganzusatz zeigte im Vergleich zum Grundmedium keine Stimulierung oder gar eine Hemmung.

Stämme	OD _{546nm} bei Zusatz von		
	Wasser	4 µM Mangan	TS
Gruppe 1			
B1	0,79	1,13	1,42
B2	0,51	0,80	1,44
B3	0,66	0,88	1,32
B4	0,48	0,96	1,45
B64	0,48	0,66	1,30
B65	0,61	0,90	1,30
B66	0,75	1,12	1,50
B70	1,18	1,53	1,64
B120	0,41	0,67	1,25
B122	0,63	0,96	1,43
B139	0,49	0,60	1,16
B211	0,63	0,79	1,58
B213	0,51	1,10	1,43
B232	0,70	0,93	1,36
B233	0,62	0,87	1,26
B234	0,66	1,23	1,46
B235	0,43	1,07	1,43
B236	0,55	1,08	1,47
B241	0,71	1,31	1,65
B243	0,76	1,12	1,38
B246	0,66	1,07	1,46
B247	0,54	0,97	1,16
B248	0,50	0,94	1,20
B249	0,56	1,05	1,20
Gruppe 2			
B5	0,71	0,67	1,50
B217	0,26	0,00	0,76
B237	0,73	0,66	1,25
B242	0,73	0,76	1,32
B244	0,81	0,85	1,33
B245	0,74	0,46	1,26

Tab. 11: Wachstum von 30 verschiedenen *Oenococcus oeni* -Stämmen mit einem Manganzusatz von 4 µM. Das Mangan wurde als Chlorid zugesetzt. Inkubationsdauer: 10 Tage.

4.3.4 Wachstumstests mit verschiedenen Konzentrationen von Mangan

An vier ausgewählten Stämmen wurde das Wachstum mit unterschiedlichen Manganzusätzen über einen weiten Konzentrationsbereich getestet, da die vorkommende Konzentration im Tomatensaft möglicherweise nicht der optimalen Dosis entspricht. Es wurden hierzu der Stamm B2, B248 und B213 verwendet, der schon mit 4 µM Mangan eine Erhöhung der OD_{546nm} von 0,59 aufweist, sowie der Stamm B245 aus Gruppe 2 (Tab. 11). Leichte Verschiebungen dieser Extinktions-Optima durch Zusatz verschiedener Mangan-Konzentrationen waren in Abhängigkeit von dem verwendeten Oenokokkenstamm sowie dem verwendeten Mangansalzen zu beobachten. Ein Mangangehalt von 8,6 mM (Stamm B213) oder 34,3 mM (Stamm B2, B245 und B248) im Kulturmedium zeigte bei den vier Stämmen unter Berücksichtigung der exponentiellen Phase die besten Wachstumsergebnisse (Tab. 12).

c(Mn) im Medium	OD _{546nm}							
	Stamm B2		Stamm B213		Stamm B245		Stamm B248	
	exp. 1)	stat. 3)	exp. 1)	stat. 2)	exp. 3)	stat. 4)	exp. 1)	stat. 5)
0 µM	0,06	0,31	0,07	0,51	0,18	0,37	0,19	0,49
1,0 µM	0,06	0,37	0,12	0,64	0,02	0,57	0,27	0,64
2,1 µM	0,05	0,43	0,05	0,73	0,00	0,23	0,22	0,69
4,2 µM	0,06	0,50	0,08	0,92	0,00	0,00	0,25	0,78
8,4 µM	0,04	0,49	0,14	1,32	0,00	0,07	0,25	0,90
16,8 µM	0,04	0,49	0,28	1,67	0,00	0,34	0,24	0,86
33,5 µM	0,07	0,49	0,38	1,27	0,00	0,00	0,44	0,82
67,0 µM	0,06	0,50	0,92	1,40	0,37	0,68	0,52	0,87
134,1 µM	0,06	0,35	0,79	1,40	0,20	0,72	0,53	0,88
268,2 µM	0,05	0,38	0,83	1,35	0,00	0,56	0,45	0,78
536,4 µM	0,03	0,60	0,80	1,25	0,00	0,63	0,35	0,79
1,1 mM	0,43	0,64	1,06	1,39	0,48	0,72	0,66	0,94
2,1 mM	0,49	0,69	1,02	1,40	0,64	0,66	0,61	0,94
4,3 mM	0,41	0,71	1,08	1,40	0,58	0,65	0,70	0,97
8,6 mM	0,52	0,76	1,18	1,40	0,64	0,60	0,91	1,00
17,2 mM	0,69	0,81	1,12	1,43	0,77	0,74	1,01	1,02
34,3 mM	0,71	0,83	0,85	1,44	0,89	0,89	1,11	1,16
68,7 mM	0,68	0,80	0,24	1,45	0,79	0,84	1,09	1,14
137,3 mM	0,70	0,80	0,01	0,16	0,00	0,42	0,89	1,08
274,6 mM	0,69	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
546,2 mM	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tomatensaft	0,70	1,25	0,42	1,39	0,96	1,23	0,93	1,19

Tab. 12: Wachstum der verschiedenen *Oenococcus oeni*-Stämme mit unterschiedlichen Manganchlorid-Konzentrationen. Inkubationszeiten: ¹⁾ 3 Tage, ²⁾ 6 Tage, ³⁾ 10 Tage, ⁴⁾ 13 Tage, ⁵⁾ 5 Tage.

Bei letzterer Konzentration konnte allein durch Manganzusatz bei den zwei Stämmen B213 und 248 die gleiche Zelldichte wie Tomatensaft erreicht werden. Ein weiterer Stimulierungspunkt lag bei allen vier Stämmen bei einem Manganzusatz von 67,0 μM (vergl. Stamm B245, exponentielle Phase), wobei dieser Effekt bei Stamm B2 nur sehr schwach hervortritt. Bei Stamm B213 ließ sich das Ergebnis mit Tomatensaft durch den Zusatz von Mangan im weiten Konzentrationsbereich von 33,5 μM – 34 mM erreichen und sogar verbessern, was sich insbesondere in einer kürzeren lag-Phase äußerte (Abb. 15). Bei Stamm B248 ließ sich Tomatensaft durch den Zusatz von 34 – 137 mM ersetzen. Bei den Stämmen B2 und B245 wirkt der Manganzusatz zwar fördernd, erreicht aber nie die durch Tomatensaft erzielte Zelldichte.

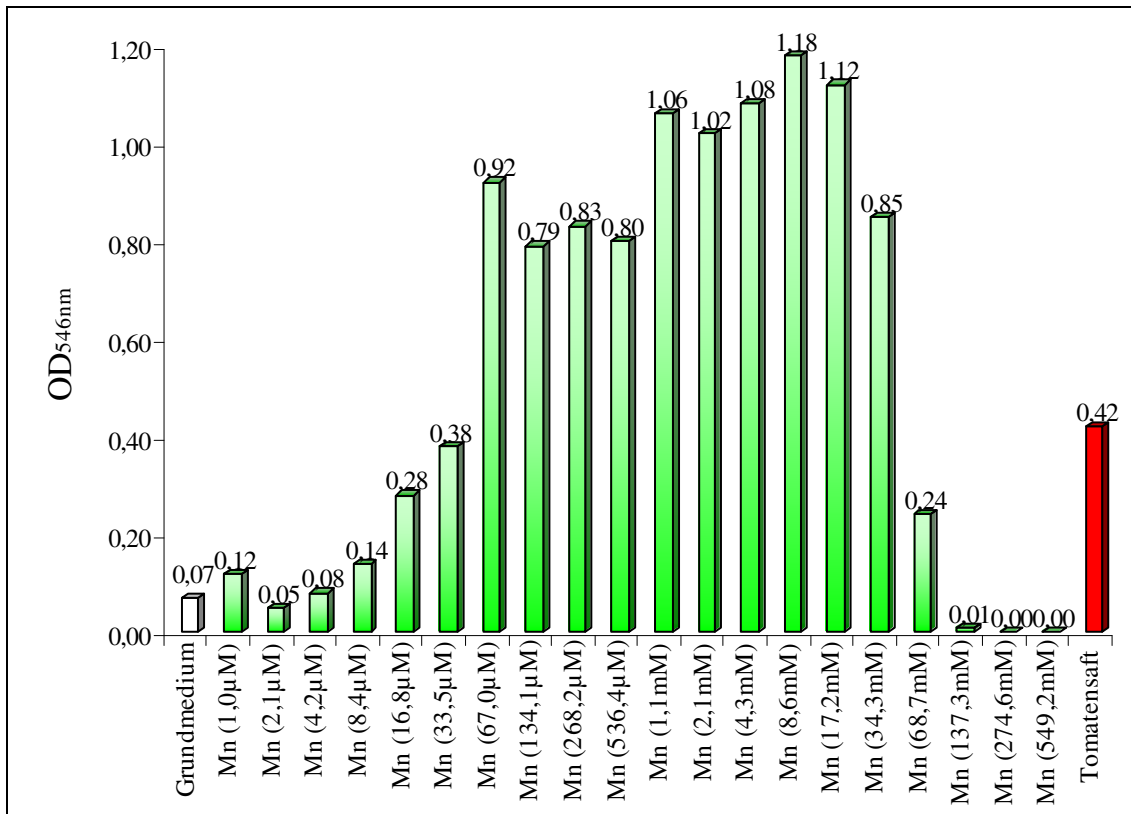


Abb. 15: Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B213 mit unterschiedlichen Manganchlorid-Konzentrationen in der exponentiellen Phase nach 3 Tagen.

4.3.5 Wachstumskurven mit 67 µM und 34 mM Mangan von 20 *Oenococcus oeni* Stämmen

Aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 4.2.4 wurden bei 17 weiteren Oenokokken-Stämmen Wachstumskurven aufgenommen, um zu sehen, ob der Tomatensaft durch die beiden optimalen Manganzusätze von 67,0 µM und 34,3 mM ersetzbar ist (Tab. 13). Bei 13 Stämmen (65%) wurde eine ähnliche Wachstumsstimulierung wie mit Tomatensaft erzielt. Außerdem wurden 3 Stämme (B120, B232, B233) gefunden, bei denen es mit Mangan nach anfänglicher Wachstumsförderung zu einem frühzeitigen Absterben kam, und bei 4 Stämmen (B2, B211, B245 und B249) konnte Mangan trotz Wirksamkeit nicht den Tomatensaft ersetzen (Abb. 16).

Stamm	OD _{546nm}								
	exponentielle Phase				stationäre Phase				
	GM	67 µM Mn	34,3 mM Mn	TSM	GM	67 µM Mn	34,3 mM Mn	TSM	
a)	B5	0,05	0,13	0,27	0,27	0,28	0,92	1,02	1,13
	B64	0,05	0,21	0,42	0,63	0,36	0,54	0,59	0,64
	B65	0,19	0,76	1,08	0,53	0,38	0,88	1,20	1,21
	B66	0,00	0,21	0,54	0,37	0,62	1,14	1,24	1,51
	B70	0,95	1,53	1,55	1,41	1,15	1,70	1,80	1,65
	B122	0,16	0,60	1,14	0,60	0,66	1,00	1,22	1,37
	B213	0,07	0,92	0,85	0,42	0,51	1,40	1,44	1,39
	B234	0,16	0,39	0,92	0,47	0,63	1,60	1,37	1,72
	B235	0,11	0,51	0,59	1,07	0,41	1,38	1,45	1,63
	B236	0,04	0,74	1,03	0,38	0,54	1,41	1,35	1,66
	B241	0,27	1,29	1,34	1,29	0,68	1,63	1,47	1,77
	B243	0,15	0,89	1,36	1,11	0,76	1,28	1,49	1,59
	B248	0,19	0,52	1,11	0,93	0,49	0,87	1,16	1,19
b)	B2	0,06	0,06	0,71	0,70	0,31	0,50	0,83	1,25
	B211	0,09	0,23	0,97	1,06	0,55	1,07	0,92	1,49
	B245	0,18	0,37	0,89	0,96	0,37	0,68	0,89	1,23
	B249	0,16	0,41	0,92	0,79	0,54	0,89	1,09	1,50
c)	B120	0,14	0,51	0,75	0,85	0,38	0,13	0,30	0,94
	B232	0,00	0,73	1,13	1,26	0,77	0,07	0,40	1,35
	B233	0,08	0,34	0,80	0,35	0,42	0,23	0,29	0,93

Tab. 13: Wachstum von 20 verschiedenen *Oenococcus oeni* Stämmen mit zwei ausgewählten Manganchlorid-Konzentration nach 10 Tagen Inkubation.

- a) Wachstumsstimulierung vergleichbar mit Tomatensaftzusatz
- b) Wachstumsstimulierung geringer als Tomatensaftzusatz
- c) Wachstumsstimulierung nur am Anfang der Zellvermehrung

Ergebnisse

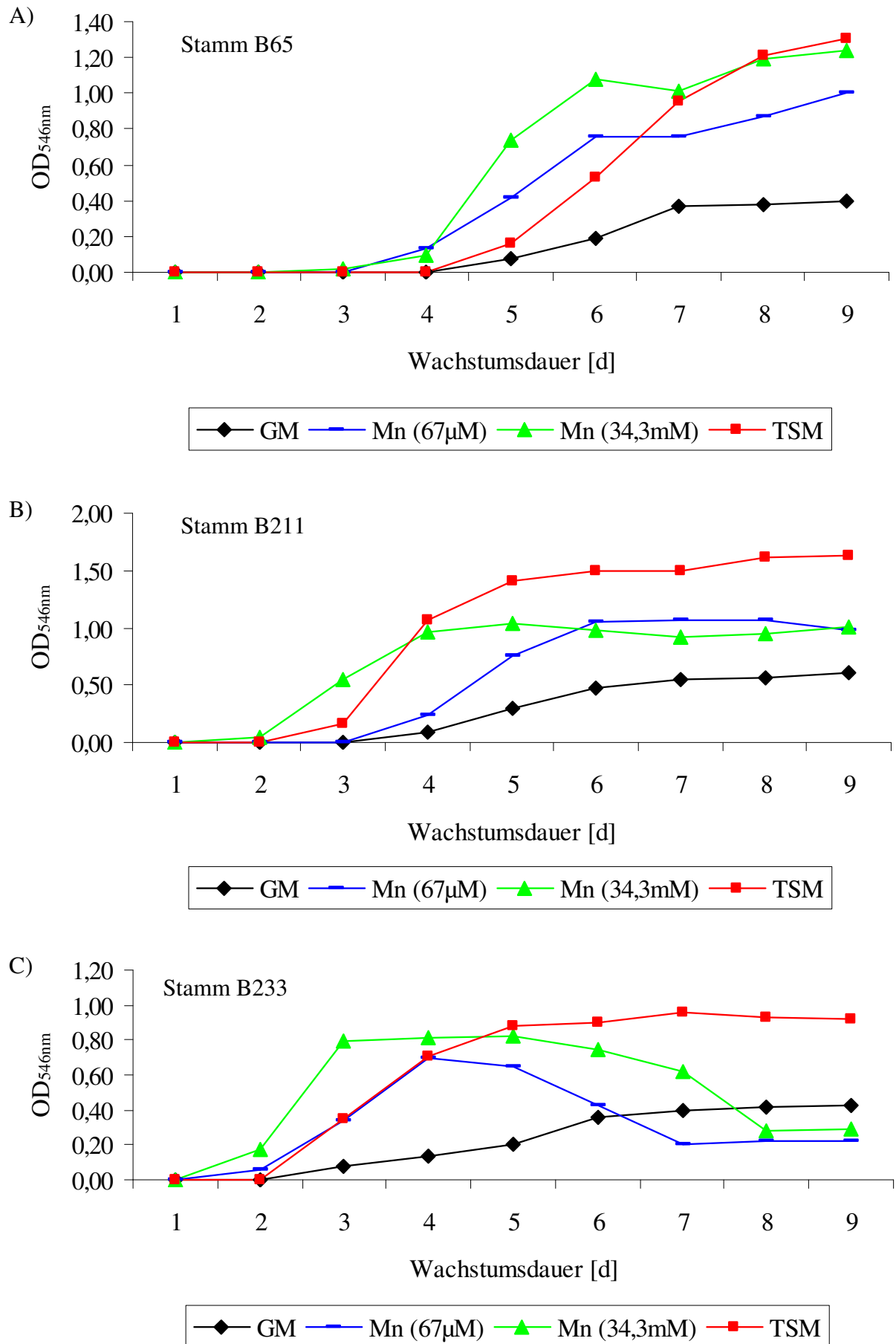


Abb. 16: Wachstumskurven von *Oenococcus oeni* Stamm B65 (A), B211 (B) und B233 (C) mit den Mangan-Konzentrationen von 67µM und 34,3 mM.

4.3.6 Mangan-Analysen von weiteren Säften

Da sich bei den vorangegangenen Ergebnissen herausstellte, dass von den Mineralstoffen in Tomatensaft nur Mangan wachstumsfördernd ist, wurde auch in weiteren Säften sowie im Eluat 1 der Kationentauscher-SPE an SCX-2 mit fünffach konzentriertem Saft aus geschälten Tomaten der Mangengehalt mittels AAS bestimmt (Tab. 14).

Säfte	Mineralstoffgehalt [μM]								
	Mn	Ca	Cu	Zn	K	Mg	Fe	Co	Ni
Zitronenmesokarp (21,5 g/l)	0,6	2330	4,3	4,9	5230	1580	19,6	1,9	2,0
Zitronenschalen-Extrakt (21,5 g/l)	1,3	1540	1,6	9,7	14410	1813	6,3	0,6	2,7
Mangosaft	1,3	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
grüner Tee (9,4 g/l)	3,3	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
Zitronensaft	4,4	475	2,4	8,0	12256	717	5,4	0,6	3,6
Tomatensaft	10,0	350	2,2	10,3	16744	967	17,9	0,6	3,2
Mangoschalen-Extrakt (22,6 g/l)	12,7	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
Hagebutten-Extrakt (81,3 g/l)	14,9	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
Heidelbeersaft	30,9	763	2,2	10,8	9308	646	4,8	0,3	3,4
Eluat 1 der Kationentauscher-SPE (SCX-2) von TOK	41,8	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb

Tab. 14: Mineralstoffgehalt in Fruchtsäften und Extrakten nach Atomabsorptionsspektrometrie (nb = nicht bestimmt). TOK = fünffach konzentrierter Saft aus geschälten Tomaten.

Die Wachstumsstimulierung der Säfte (siehe Abb. 7) korrelierte jedoch nicht mit dem Mangengehalt und war in allen Säften gegenüber den beiden ermittelten Maxima suboptimal. So beinhaltete der wenig wirksame Heidelbeersaft beispielsweise am meisten Mangan (30,9 μM) während Tomatensaft (9 μM) sowie Mangoschalen-Extrakt (12,7 μM) und Saft aus geschälten Mangos (1,3 μM) weniger enthielten. Dies deutete auf weitere wachstumsfördernde bzw. hemmende Inhaltsstoffe neben dem Mangan hin. Interessant war auch die Beobachtung, dass der Mangengehalt vom Extrakt des Zitronenmesokarps vernachlässigbar gering ist (0,6 μM). Es ist deutlich erkennbar, dass sich das Mangan (41,8 μM) vom fünffach konzentrierten Saft aus geschälten Tomaten im wachstumsfördernden Eluat 1 der Kationentauscher-SPE an SCX-2 befindet.

4.3.7 Wachstum unter Zusatz von veraschten Säften

Um herauszufinden, ob beim Zitronenmesokarp andere anorganische Substanzen für die Wachstumsstimulierung verantwortlich sind, wurde eine in der Zusammensetzung analoge Mineralstoffkombination als Nährmedienzusatz an Stamm B2 getestet. Diese Mineralstoffkombination erzielte lediglich eine Erhöhung der Zelldichte um 0,09, während der Zusatz von Zitronenmesokarp eine Steigerung von 0,50 verursachte. Hier scheinen also organische Substanzen wirksam zu sein. Dies bestätigten auch Wachstumsversuche, bei denen die anorganischen Bestandteile von den Säften nach deren Veraschung als Medienzusatz im Vergleich zu den Komplettsäften untersucht wurden (Tab. 15). Bei allen Stämmen ist die Wachstumsförderung durch Zusatz von Zitronenmesokarp-Extrakt deutlich höher als von dessen Asche. Nur bei den Stämmen B213 und B248 bewirkte der Zusatz der Aschelösung von Zitronenmesokarp noch eine leichte Erhöhung der Zelldichte von 0,14 bzw. 0,17. Bei den Stämmen B2, B245 und B249 hingegen, bei denen auch Mangan nur wenig bewirkte (Tab. 13), zeigte die Aschelösung keinen Effekt, die optische Dichte lag im Bereich des Grundmediums. Damit schieden auch weitere nur in Spuren enthaltene Kationen als Wachstumsfaktoren aus, die in der getesteten Mineralstoffkombination nicht enthalten waren. Bei der Aschelösung von Tomatensaft zeigte sich bei Stamm B248 durch den Mangangehalt hingegen ein deutlicher Anstieg der Extinktion um 0,69 gegenüber der Kontrolle. Auch in der Tomate müssen neben dem Mangan aber noch weitere organische Wachstumsfaktoren vorhanden sein, da die ΔOD_{546nm} zwischen Tomatensaft und dessen Asche 0,22 betrug.

Medienzusatz	OD _{546nm} nach 10 d				
	Stamm B2	Stamm B213	Stamm B245	Stamm B248	Stamm B249
Wasser	0,70	0,55	0,35	0,51	0,62
Zitronenmesokarp (21,5 g/l)	1,01	0,82	0,67	1,09	1,32
Asche von Zitronenmesokarp (21,5 g/l)	0,73	0,69	0,34	0,68	0,66
Tomatensaft				1,42	
Asche von Tomatensaft				1,20	

Tab. 15: Wachstum von verschiedenen *Oenococcus oeni* Stämmen mit Aschelösungen von Zitronenmesokarp-Extrakt und Tomatensaft im Vergleich zu den unbehandelten Säften.

4.4 Isolierung und Identifizierung von organischen Wachstumsfaktoren

Die Suche nach zusätzlichen Wachstumsfaktoren organischer Natur wurde nur an dem Stamm B2 durchgeführt, da dieser einer der wenigen Stämme war, bei dem die durch Nährmedienzusatz von Tomatensaft erreichte Zelldichte auch durch die beiden Mangankonzentrationen von 67 μM und 34,3 mM (Kapitel 4.2.5) nicht ersetzt werden konnte. Die große Diversität der unterschiedlichen Oenokokken-Stämme hinsichtlich der zum Wachstum benötigten Substanzen war bereits klar aus den in den Kapiteln 4.1 und 4.2 dargelegten Ergebnissen erkennbar.

4.4.1 Wachstum von Stamm B2 mit Carotinoiden

Im Vergleich zum Tomatensaft wirkte sich auch Hagebutten-Extrakt sehr positiv auf das Wachstum von *Oenococcus oeni* aus (Abb. 11 bei Stamm B2: $\Delta \text{OD}_{546\text{nm}} = 0,84$). Hagebutten enthalten wie Tomaten Lycopin, das zu den Carotinoiden zählt. Diese Substanzklasse wurde daher intensiver untersucht. Da das Lycopin bei der Tomate erst im Laufe der Reifung entsteht (Fraser et al. 1994) und grüne Tomaten stattdessen viele Glykoalkaloide enthalten (Friedman 2002), wurde sowohl Saft aus frischen grünen Tomaten als auch aus halbreifen Tomaten hergestellt und im Wachstums-Assay getestet. Zusätzlich wurde aus Wassermelonen-Fruchtfleisch mittels C_{18} -MSPD und Petrolether ein weiterer lycopinhaltigen Extrakt hergestellt. Dieser konnte ebenso wie die Vergleichssubstanz β -Carotin in Tween 80 gelöst und so ins Medium eingebracht werden. Es zeigte sich, dass Saft aus grünen Tomaten nach 10 Tagen sogar eine höhere Zelldichte ($\Delta \text{OD}_{546\text{nm}} = 1,02$) als der Saft aus roten Tomaten ($\Delta \text{OD}_{546\text{nm}} = 0,80$) erreichte, sodass es sich bei den Wuchsstoffen aus Hagebutten-Extrakt nicht um Carotinoide handeln konnte. Dieses Ergebnis bestätigte der Vergleich zwischen dem Extrakt aus Wassermelonen-Fruchtfleisch und Wassermelonensaft: Saft mit polaren Komponenten wirkte fördernd ($\Delta \text{OD}_{546\text{nm}} = 0,38$), der lycopinhaltige Extrakt ($\Delta \text{OD}_{546\text{nm}} = 0,06$) nicht. Auch β -Carotin zeigte keinerlei Wirkung. Carotinoide konnten somit als Wachstumsfaktoren für Oenokokken ausgeschlossen werden.

4.4.2 Wachstum von Stamm B2 mit Polyphenolen

Besonders polyphenolreiche Schalen-Extrakte bewirkten im Screening eine hohe Bakteriendichte (Abb. 11: Mangoschalen- und Tomatenschalen-Extrakt), wobei bei den Schalen-Extrakten noch die zweifache Verdünnung (wegen Trübung) berücksichtigt werden muss. Polyphenole könnten also ebenso als organische Wachstumsfaktoren wirken.

Deshalb wurden Tomatenschalen-Extrakt und Tomatensaft sowie polyphenolreiche Säfte und eine Catechinmischung mit dem Hauptbestandteil Epigallocatechingallat (EGCG, 490 mg/l) mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) behandelt, um die polyphenolischen Substanzen zu adsorbieren. Die Wachstumsförderung der erhaltenen Präparate wurde mit der von unbehandelten Säften verglichen (Abb. 17).

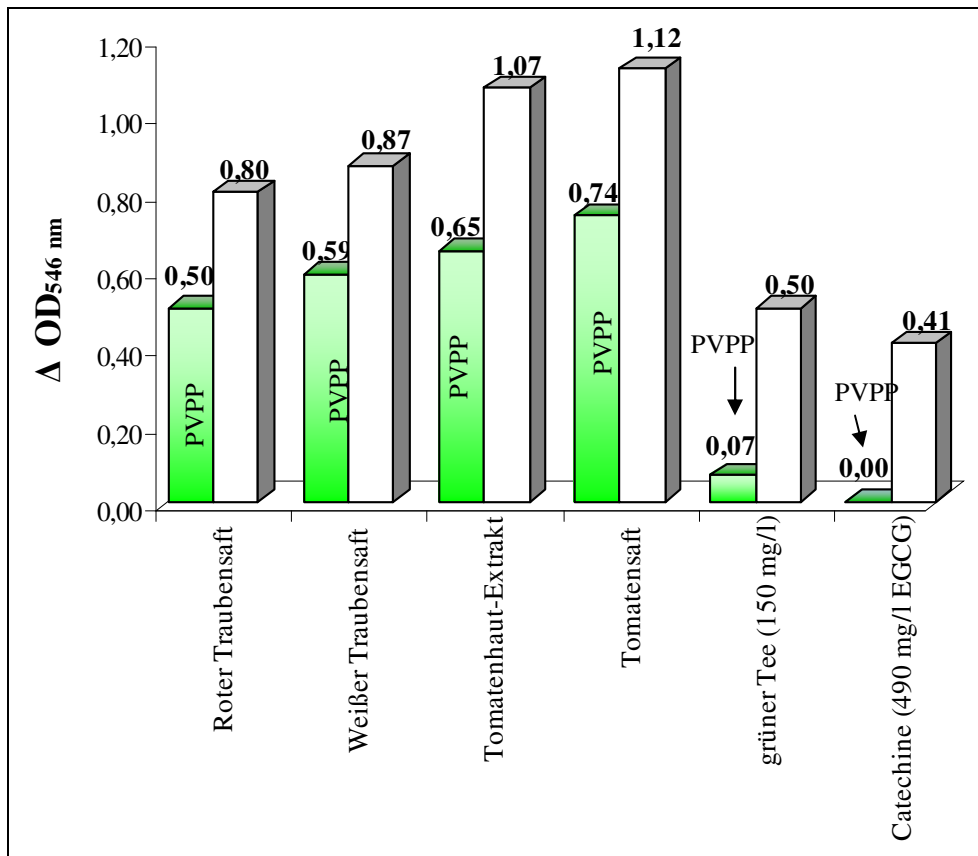


Abb. 17: Wachstumstest von *Oenococcus oeni* Stamm B2 mit PVPP-behandelten Säften (grün gefärbte Säulen) und deren unbehandelten Kontrollen (weiß gefärbte Säulen). Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 546 nm.

Alle Durchläufe der Proben wiesen in der stationären Phase nach PVPP-Behandlung geringere Bakteriendichten auf als der unbehandelte Saft. Tomatenschalen-Extrakt erzielte eine Extinktionssteigerung von 0,65, die unbehandelte Kontrolle hingegen 1,07. Roter und weißer Traubensaft sowie Tomatensaft erbrachten analoge Ergebnisse. Bei dem eingesetzten grünen Tee und der Catechinmischung war im polyphenolfreien Durchlauf sogar keine signifikante Wachstumsförderung erkennbar ($\Delta OD_{546nm} = 0,07$ bei grünem Tee und $\Delta OD_{546nm} = 0$ bei der Catechinmischung). Eine Elution der adsorbierten Polyphenole war nur im Basischen mit 1%iger wässriger Natronlauge möglich, was allerdings teilweise zur Zersetzung führte. Ein Wachstumstest erübrigte sich aufgrund des hohen Salzgehaltes der Probe. Die Wirkung von Catechinen aus grünem Tee wurde jedoch im folgenden Kapitel weitergehend untersucht.

a) Polyphenolische Wuchs-und Hemmstoffe für Oenokokken aus grünem Tee

Grüner Tee hat einen hohen Gehalt an polyphenolischen Substanzen (Abb. 18), die bis zu 25 – 30% des Trockengewichts ausmachen können. Wie in Kapitel 4.3.7 b) erkennbar wurde, haben diese Substanzen einen Einfluß auf das Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2. Es wurden deshalb verschiedene Konzentrationen einer Catechinmischung aus grünem Tee (DSM Basel, Schweiz) als Additiv zum Grundmedium zugegeben, um die optimale Konzentration für diesen Effekt herauszufinden (Tab. 15). Die Catechinmischung bestand zu 77,5% aus EGCG. Es war bis zu einer Konzentration von 400 mg/l EGCG kein signifikanter Effekt auf das Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2 erkennbar. Bei einer Konzentration über 543 mg/l EGCG zeigte sich jedoch eine starke Hemmung, bei 621 und 724 mg/l EGCG war diese etwas abgeschwächt erkennbar. Nur im engen Konzentrationsbereich von 400 – 500 mg/l EGCG war eine Wachstumsförderung durch Erhöhung der optischen Dichten bei 546 nm bis ca. 0,3 zu beobachten.

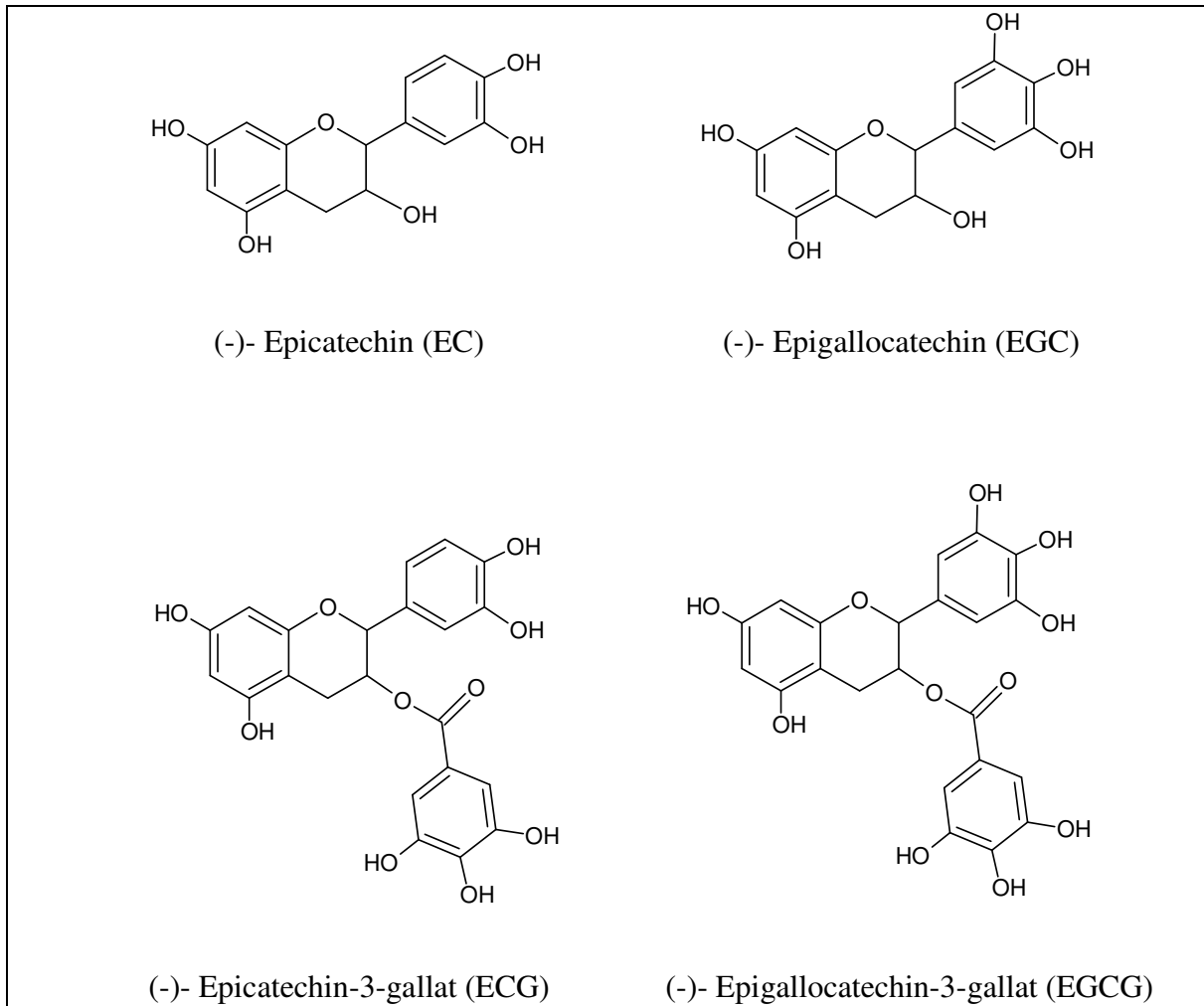
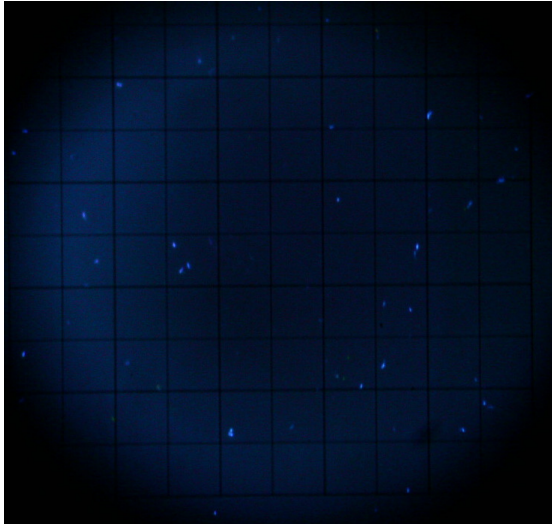


Abb. 18: Strukturformeln einiger polyphenolischer Substanzen aus grünem Tee

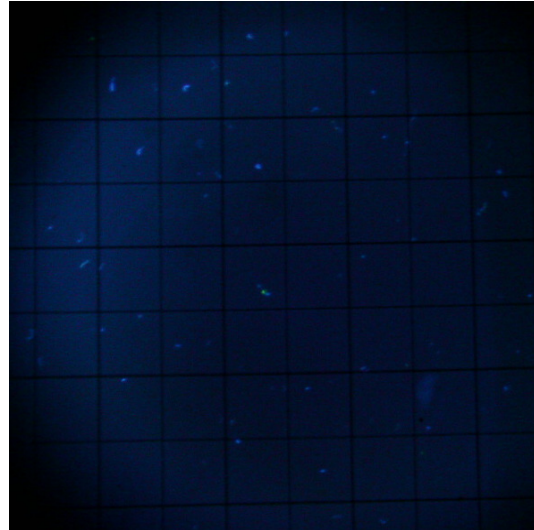
Konzentration von EGCG im Grundmedium [mg/l]	OD _{546nm}
34	0,13
136	0,14
242	0,12
335	0,19
395	0,22
435	0,32
483	0,51
543	0,06
621	0,18
724	0,17
869	0
1086	0
2172	0

Tab. 15: Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2 in Gegenwart verschiedener Konzentrationen einer Catechinmischung. Die Konzentrationen bezogen sich auf den Gehalt an EGCG, das 77,5% der Catechinmischung ausmacht. OD_{546nm} wurde nach 6 Tagen Inkubation bei 25 °C gemessen. Die Kontrolle mit Wasser als Zusatz zum Grundmedium ergab eine OD_{546nm} von 0,19 und in Tomatensaftmedium wurde eine OD_{546nm} von 1,37 erreicht.

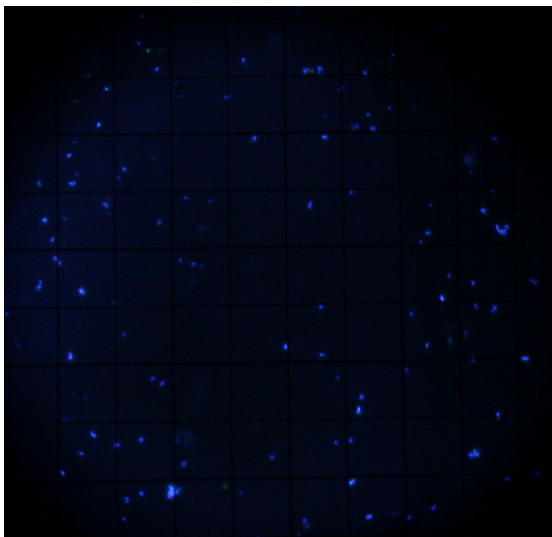
Zur Bestätigung des erhöhten Bakterientiters wurde zusätzlich eine Anfärbung der toten Zellen mit Sytox (grün) und eine Gegenfärbung mit DAPI (blau) durchgeführt (Abb. 19). Der Bakterientiter im Grundmedium betrug $2,57 \times 10^8$ (Sytox: $0,12 \times 10^8$), im Grundmedium mit 543 mg/l EGCG $2,21 \times 10^8$ (Sytox: $0,16 \times 10^8$) und in Grundmedium mit 483 mg/l EGCG $4,41 \times 10^8$ (Sytox: $0,10 \times 10^8$). Grün angefärbte, also tote, Zellen waren nur vereinzelt sichtbar.



**Grundmedium mit Catechinmischung
(543 mg/l EGCG)
(DAPI: $2,21 \times 10^8$ /ml; Sytox: $0,16 \times 10^8$ /ml)**



**Grundmedium ohne Catechinmischung
(DAPI: $2,57 \times 10^8$ /ml; Sytox: $0,12 \times 10^8$ /ml)**



**Grundmedium mit Catechinmischung
(483 mg/l EGCG)
(DAPI: $4,41 \times 10^8$ /ml; Sytox: $0,10 \times 10^8$ /ml)**

Abb. 19: Sytox/DAPI-Färbung der Bakterienkulturen von *Oenococcus oeni* Stamm B2 nach Wachstum in Grundmedium und in Grundmedium mit verschiedenen Konzentration der Catechinmischung (483 bzw. 543 mg/l EGCG).

Anschließend wurde reines EGCG (Reinheit > 99%; DSM Basel, Schweiz) in verschiedenen Konzentrationen als Additiv zum Grundmedium zugegeben, um zu sehen, ob die Ergebnisse mit denen der Catechinmischung korrelierten. Die optimale Konzentration lag analog bei 490 mg/l EGCG, was sich besonders in einer verkürzten lag-Phase und damit verbundenen schnelleren Anwachsen der Bakterien zeigte (Tab. 17). Die OD_{546nm} betrug nach 6 Tagen bereits 0,57, während in der Kontrolle lediglich 0,29 erreicht wurden. Der hemmende Effekt von EGCG zeigte sich bei Konzentrationen ab 600 mg/l EGCG. Diese Werte bestätigten nochmals die erzielten Ergebnisse mit der Catechinmischung.

Konzentration von EGCG im Grundmedium [mg/l]	OD _{546 nm}	
	nach 6 Tagen	nach 10 Tagen
15	0,36	0,62
31	0,39	0,61
61	0,39	0,62
123	0,42	0,61
245	0,46	0,71
490	0,57	0,93
600	0,05	0,10
700	0,05	0,06
1000	0,01	0,05
1800	0	0

Tab. 17: Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2 in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von EGCG. OD_{546nm} wurde nach 6 und 10 Tagen Inkubation bei 25 °C gemessen. Die Kontrolle mit Wasser als Zusatz zum Grundmedium ergab eine OD_{546nm} von 0,29 nach 6 Tagen und 0,56 nach 10 Tagen, in Tomatensaftmedium wurde eine OD_{546nm} von 1,50 nach 6 Tagen und 1,84 nach 10 Tagen erreicht.

Als Mechanismus für den wachstumsfördernden Effekt von EGCG auf *Oenococcus oeni* Stamm B2 ist der Mangantransport in Form von Chelatbildung in die Zellen möglich. Dieser Vermutung wurde durch Zugabe von 34 mM Mangan mit 483 mg/l EGCG zum Grundmedium nachgegangen. Nach 6 Tagen Inkubationszeit ergab die Addition von 34 mM Mangan eine OD_{546nm} von 1,17 und zusammen mit der Catechinmischung 1,27. In der stationären Phase nach 10 Tagen Inkubationszeit war die OD_{546nm} der Catechinmischung mit 34 mM Mangan sogar um 0,14 niedriger als die von 34 mM Mangan ohne Catechine. EGCG wirkte also nicht als Mangantransporter. Die antioxidative Wirkung von EGCG als Radikalfänger und die damit verbundene reduzierte Atmosphäre im Reagenzglas wäre eine weitere mögliche Erklärung für den Einfluß auf *Oenococcus oeni*. Die Inkubation von *Oenococcus oeni* Stamm B2 mit 483 mg/l EGCG im Grundmedium unter Stickstoff-

Atmosphäre zeigte eine etwas geringere OD_{546nm} von 0,38 im Vergleich zu der Kultivierung unter aeroben Bedingungen ($OD_{546nm} = 0,55$), d.h. die Wirkung von EGCG im Anaeroben war schwächer. Eine direkte Korrelation zwischen der durch ABTS⁺-Assay (Pellegrini et al. 1999) ermittelten antioxidativen Kapazität von Substanzen und der Wachstumsförderung bei Oenokokken lag jedoch nicht vor. So bewirkte eine 1 mM wässrige Lösung von OPC (oligomere Proanthocyanidine) mit einer antioxidativen Kapazität von 4,08 TEAC keinerlei erhöhte Zelldichte, während eine 1 mM wässrige Lösung von EGCG lediglich eine antioxidative Kapazität von 2,26 TEAC besaß.

4.4.3 Screening in Microtiterplatten mit Tomatensaft und Tomatenschalen-Extrakt als Ausgangsmaterial

Um organische Einzelsubstanzen aus Fruchtsäften und Blattextrakten isolieren und vor allem identifizieren zu können, ist eine feine Auftrennung in zahlreiche Fraktionen nötig. Hierzu stand eine semipräparative HPLC-Anlage mit C₁₈-Trennsäule sowie ein Fraktionssammler zur Verfügung. Versuche mit der Analyse an einer polaren Polyethylenglykol-Trennsäule zeigten keine befriedigende Auftrennung der Proben. Es durften für die semipräparativen HPLC-Analysen mit Gradientenprogramm allerdings nur leicht flüchtige Puffer verwendet werden, da die zurückbleibenden Salze nach der Aufkonzentrierung ansonsten das Wachstum der Oenokokken beeinflusst hätten. Das maximale Probenvolumen für diese Anlage betrug 100 µl, sodass die erhaltenen Fraktionen als Additiv für das anschließende Wachstums-Assay in Reagenzgläsern viel zu gering war. Aus diesem Grund wurde eine Miniaturisierung des Wachstumstests auf Microtiterplatten etabliert (siehe Kapitel 3.4).

Die nach der semipräparativen HPLC an C₁₈-Material erhaltenen Fraktionen zeigten nach Zusatz zum Nährmedium leider sowohl bei fünffach konzentriertem Saft aus geschälten Tomaten (TOK; Abb. 20) als auch bei Tomatenschalen-Extrakt (Abb. 21) lediglich in den Fraktionen 4 und 5 eine signifikante Erhöhung der Zelldichte.

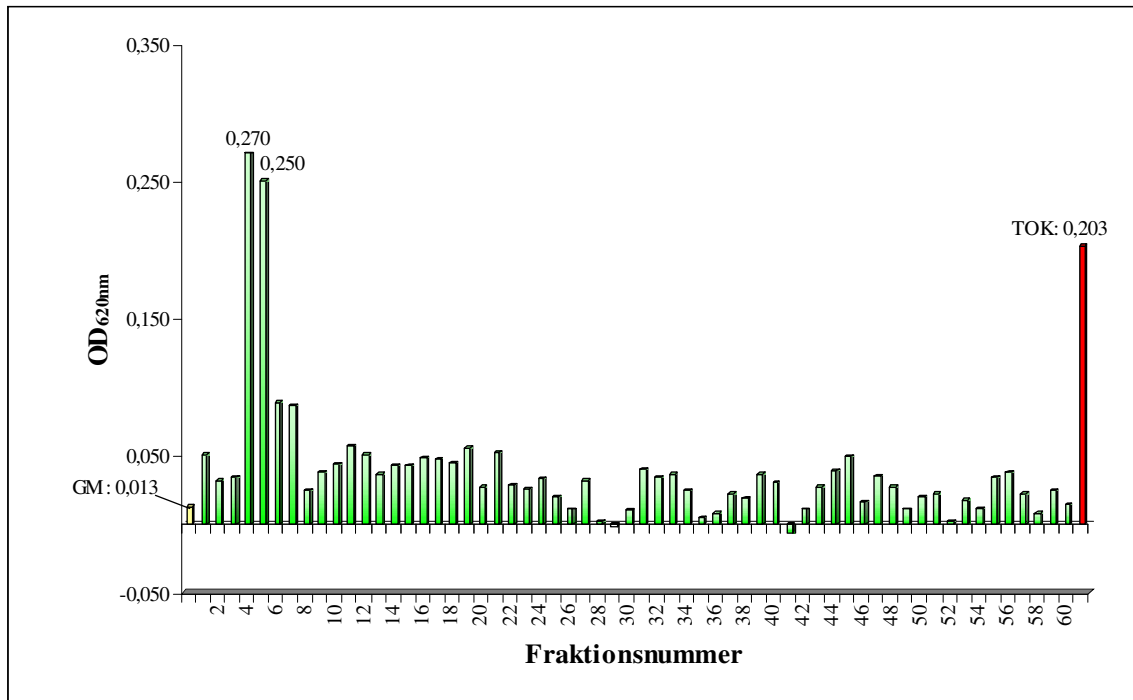


Abb. 20: Wachstumstest in Microtiterplatten mit *Oenococcus oeni* Stamm B2. Die 60 erhaltenen Fraktionen von fünffach konzentriertem Saft aus geschälten Tomaten (TOK) nach Auftrennung an einer semipräparativen C₁₈-HPLC-Säule wurden als Medienzusatz verwendet. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 620 nm.

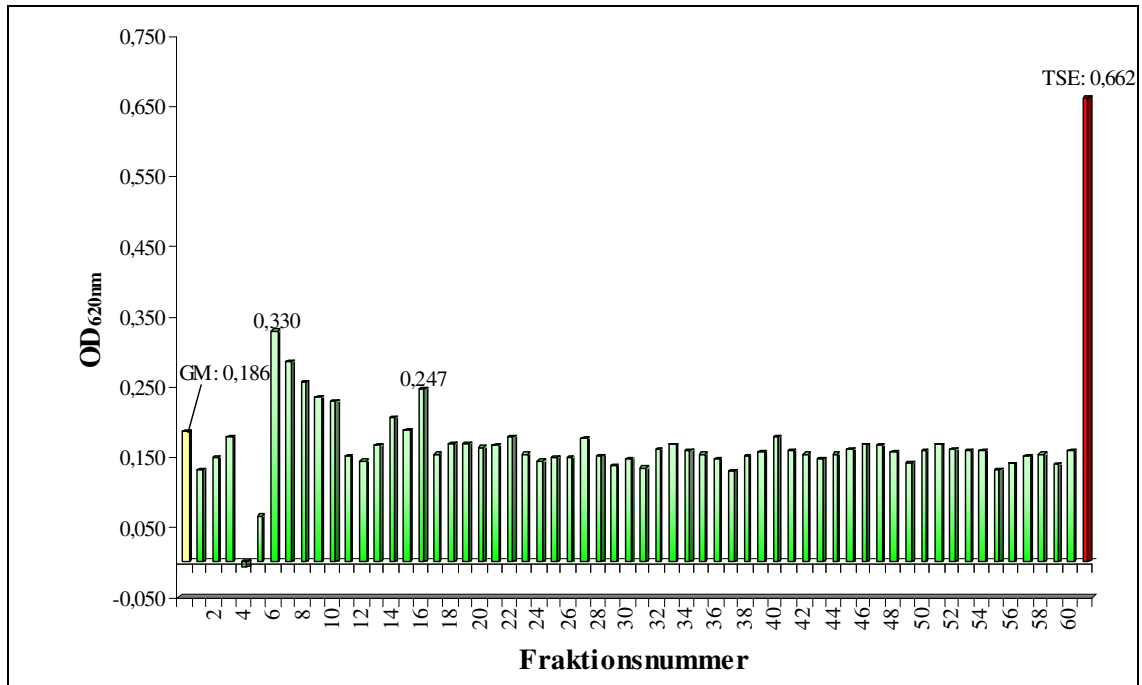


Abb. 21: Wachstumstest in Microtiterplatten mit *Oenococcus oeni* Stamm B2. Die 60 erhaltenen Fraktionen aus Tomatenschalen-Extrakt (TSE) nach Auftrennung an einer semipräparativen C₁₈-HPLC-Säule wurden als Medienzusatz verwendet. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 620 nm.

Die OD_{620nm} der Fraktionen 4 und 5 von TOK übertraf mit 0,270 bzw. 0,250 sogar die OD_{620nm} von nicht aufgetrenntem TOK mit 0,203. Generell war festzustellen, dass das Wachstum auf Microtiterplatten mit TOK als Additiv weniger effektiv als in Reagenzgläsern war. Die OD_{620nm} der Fraktion 4 von Tomatenschalen-Extrakt zeigte mit 0,330 eine deutliche Steigerung gegenüber der Kontrolle (0,186), blieb jedoch unter der nicht aufgetrennten Probe (0,662). Die leichte Erhöhung der Zelldichte in Fraktion 16 auf 0,247 war nicht signifikant und ließ sich in weiteren Tests nicht reproduzieren. Die Wachstumsförderung in den Fraktionen 4 und 5 ging auf das bereits identifizierte Mangan zurück, das am unpolaren C_{18} -Material nicht retentiert wurde und mit den ersten Fraktionen eluierte. Wie anhand der Retentionszeiten der im Anhang gezeigten Chromatogramme erkennbar ist eluierten die ersten Substanzen in Fraktion 4, in den Fraktionen 1-3 waren aufgrund des Totvolumens der HPLC-Anlage noch keine Probenbestandteile enthalten. Für die Identifizierung von organischen Faktoren waren die Fraktionen 4 und 5 nicht geeignet, da hier eine Vielzahl von nicht retentierten Stoffen eluiert und somit nicht die nötige Reinheit vorliegt. Auch weitere Versuche mit dem schonenderen Ammoniumacetat anstelle von 1% Essigsäure um einen eventuell hydrolyseempfindlichen Wachstumsfaktor zu schützen sowie der Einsatz einer Polyethylenglykol-HPLC-Säule zur Auftrennung polarer Verbindungen blieben erfolglos. Dasselbe Resultat ergab auch der Zusatz von Mangan in alle erhaltenen HPLC-Fraktionen, um einen Stoff zu erkennen, der nur im Zusammenspiel mit diesem Mineralstoff seine Wirkung entfaltet.

4.4.4 Screening in Microtiterplatten mit Mangosaft und Mangoschalen-Extrakt als Ausgangsmaterial

Aus Tomatenextrakten konnten bisher keine weiteren Wachstumsfaktoren bis zur Homogenität isolieren werden (siehe Kapitel 4.4.3). Daher wurde die Suche nach wachstumssteigernden Verbindungen auch in Saft aus geschälten Mangos und Mangoschalenextrakt intensiviert, die nach Zugabe zum Grundmedium ebenfalls hohe Zelldichten bei Oenokokken bewirkte. Nach Auftrennung der Proben über eine semipräparative C_{18} -HPLC-Säule zeigte sich ein erhöhtes Wachstum mit den Fraktionen 4 und 5, die auf Mangan zurückzuführen waren. Bei dem Saft aus geschälten Mangos waren keine weiteren Erkenntnisse ersichtlich (siehe Anhang 3 und 4). Darüber hinaus konnte jedoch eine signifikante Wachstumssteigerung mit Fraktion 13 von Mangoschalen-Extrakt

erzielt werden (Abb. 22; Chromatogramm: siehe Anhang 5). Die optische Dichte dieser Kultur übertraf sogar jene mit dem kompletten Mangoschalenextrakt, was darauf hindeutet, dass die Mangofrucht auch wachstumshemmende Substanzen enthielt. Der wachstumsstimulierende Effekt musste durch eine organische Verbindung verursacht worden sein, da anorganische Substanzen von der C₁₈-Säule viel früher eluierten (Fraktionen 4 und 5).

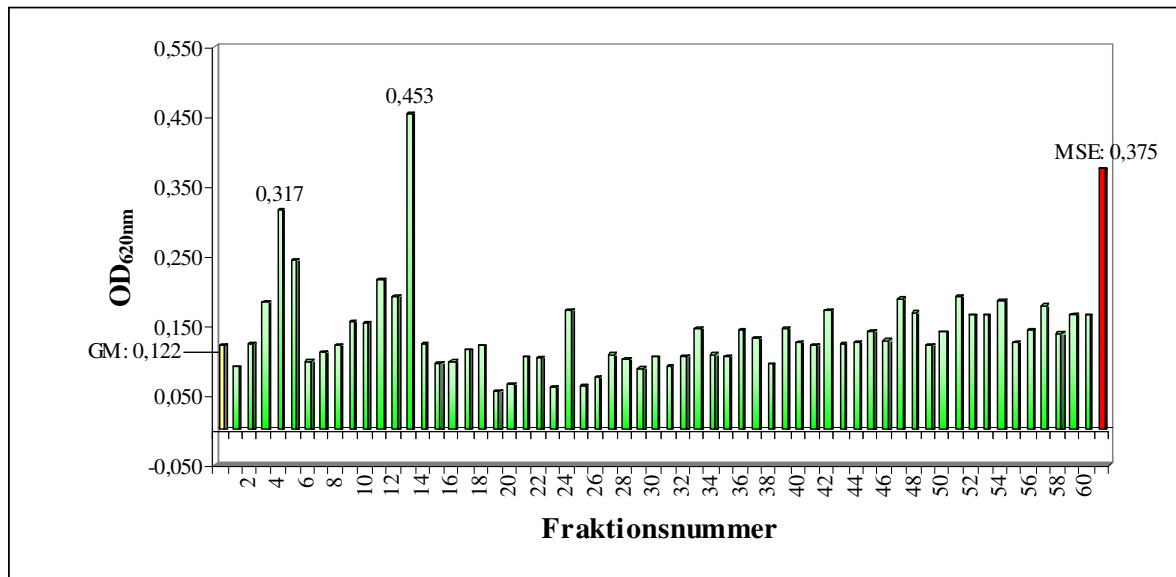


Abb. 22: Wachstumstest in Microtiterplatten mit *Oenococcus oeni* Stamm B2. Die 60 erhaltenen Fraktionen aus Mangoschalen-Extrakt (MSE) nach Auftrennung an einer semipräparativen C₁₈-HPLC-Säule wurden als Medienzusatz verwendet. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 620 nm.

a) Identifizierung eines Wachstumsfaktors aus Mangoschalen-Extrakt mittels MS und NMR

Um Näheres über diesen organischen Wachstumsfaktor herauszufinden, wurde in semipräparativen HPLC-Läufen jeweils die Fraktion 13 aufgefangen und nach Aufkonzentrierung bis zur Trockene eine Massenspektrometrie (MS) sowie eine ¹H-NMR-Messung durchgeführt. Bei der MS im negativen Modus (M-H⁺) zeigte sich ein Massenpeak bei m/z = 493, d.h. die Substanz hat eine Masse von 494 g/mol. Im positiven Modus (M+Na⁺) bestätigte sich dieses Ergebnis durch einen Peak bei m/z = 517 (Abb. 23).

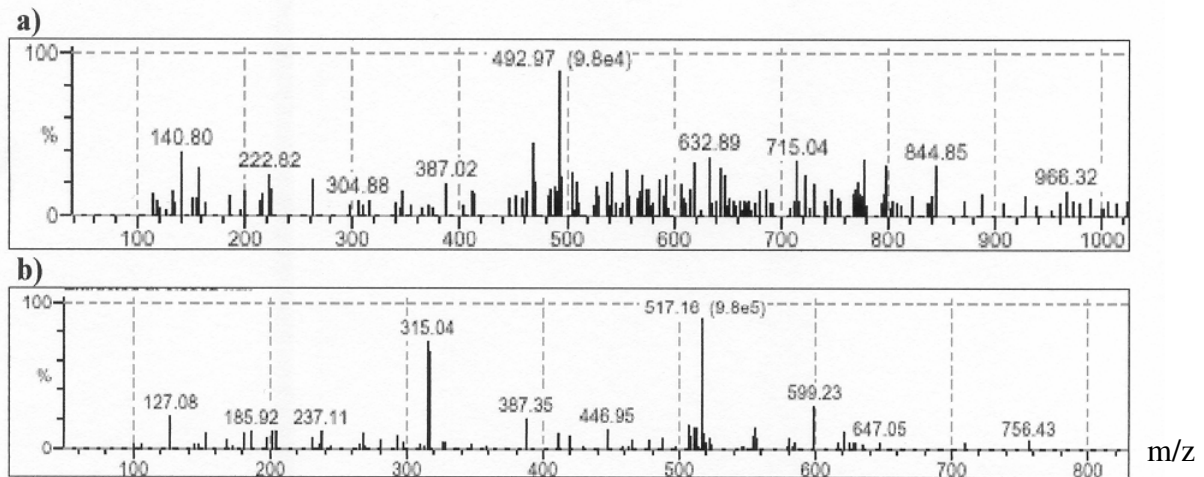


Abb. 23: Massenspektrometrie der gereinigten Substanz von Fraktion 13 (Abb. 22) des Mangoschalens extrakts. (a) Negativ-Mode, M-H⁺; (b) Positiv-Mode, M+Na⁺.

Sowohl bei der ¹H-NMR als auch bei der ¹³C-NMR traten gut aufgelöste (scharfe) und ein paar schlecht aufgelöste (unscharfe) Signale auf (Abb. 24). Es zeigten sich in den ¹H-NMR-Spektren keine Signale im aromatischen Bereich. Die Signale bei $\delta_C = 3,25 - 3,90$ ppm im ¹H-NMR-Spektrum, sowie die vier scharfen Signale bei $\delta_C = 50 - 73$ ppm im ¹³C-NMR-Spektrum sind typisch für C-OH-Gruppen (Tab. 18). Die breiten Signale sind eventuell auf noch vorhandene Verunreinigungen zurückzuführen. Aufgrund der ¹H- und ¹³C- chemischen Verschiebungen sowie den MS-Daten lag die Vermutung nahe, dass es sich um ein Trisaccharid (3 Signale mit typischer chemischer Verschiebung für anomere Protonen) oder um ein Polyol handelt.

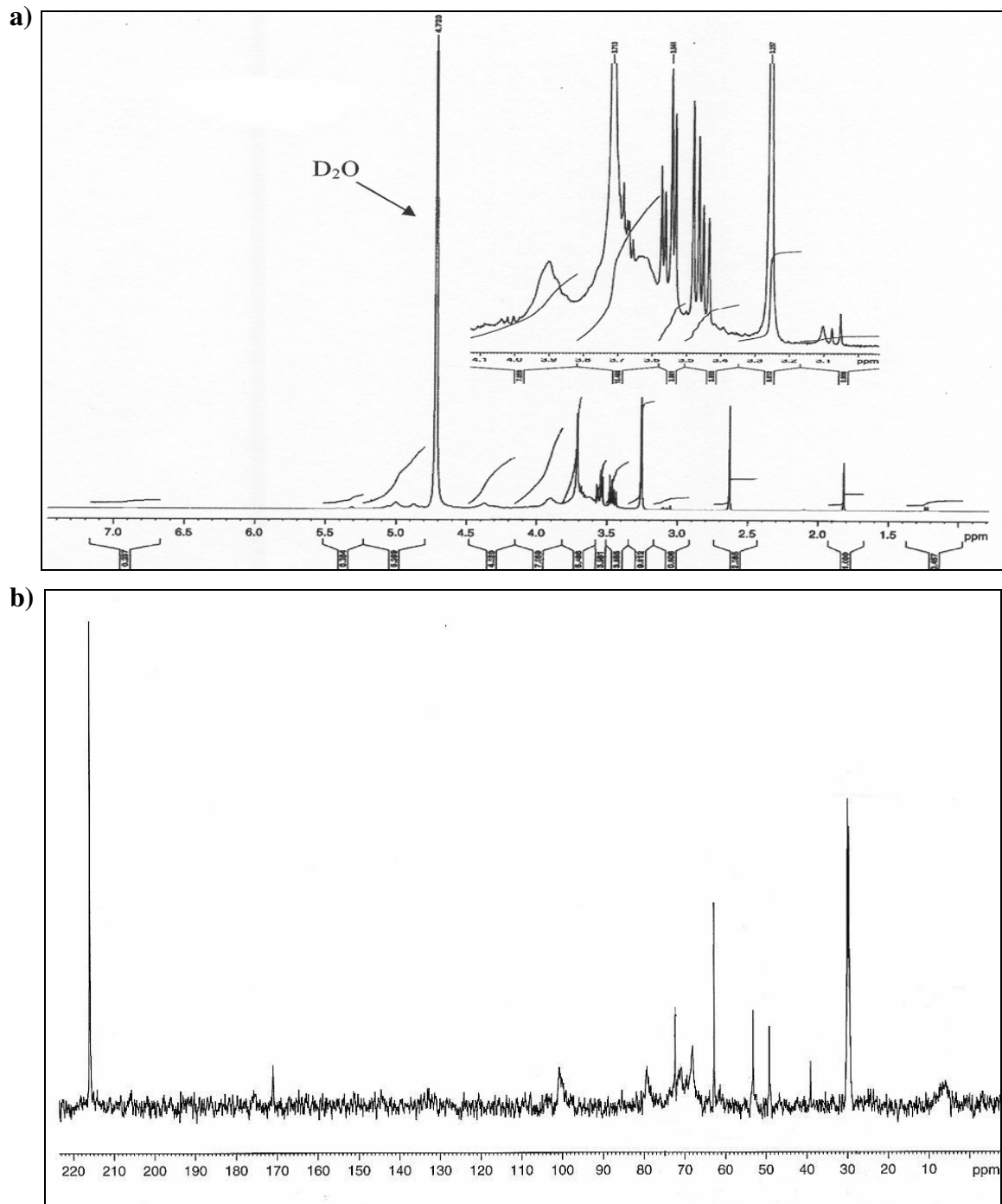


Abb. 24: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Analyse der gereinigten Substanz von Fraktion 13 (Abb. 18) des Mangoschalenextrakts.

a) ^1H -NMR-Analyse, b) ^{13}C -NMR-Analyse

C-Atomtyp	¹³ C-NMR δ _C in ppm	¹ H-NMR δ _H in ppm
C	170,99 (verbreitert)	-
CH	100,77 (breit)	5,29
CH	79,30 (breit)	(4,37)
CH	72,50 (scharf)	3,68
CH	70,75 (sehr breit)	(4,99)
CH	68,09 (breit)	3,90
CH ₂	62,82 (scharf)	3,55 und 3,46
CH	53,19 (scharf)	3,71
CH ₃	49,19 (scharf)	3,25
CH	39,06 (scharf)	2,62

Tab. 18: ¹H- und ¹³C- chemische Verschiebungen der gereinigten Substanz von Fraktion 13 (Abb. 22) des Mangoschalenextrakts.

Leider ermöglichte die geringe Substanzmenge noch nicht die Ermittlung der genauen Struktur, weshalb nochmals in einem zweiten Ansatz vermehrt Substanz isoliert wurde. Es konnten durch 68 HPLC-Läufe 2,9 mg Präparat erhalten werden. Durch weitere spezielle NMR-Techniken wie HMBC (Heteronuclear Multiple Band Correlations; siehe Anhang 6), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlations, siehe Anhang 7), COSY (Correlation Spectroscopy; Abb. 25a) und TOCSY (Total Correlation Spectroscopy; Abb. 25b) konnte nun eine Mischung aus 27% α-Arabinose und 73% β-Glucose sowie α-Glucose und Spuren von unidentifizierten Zuckern detektiert werden. Aufgrund der langen Präparationszeit, die durch das fortwährende Sammeln der HPLC-Läufe entstanden ist, hatte sich die Verbindung in ihre Untereinheiten zersetzt, sodass nur Einzelzucker identifiziert werden konnten.

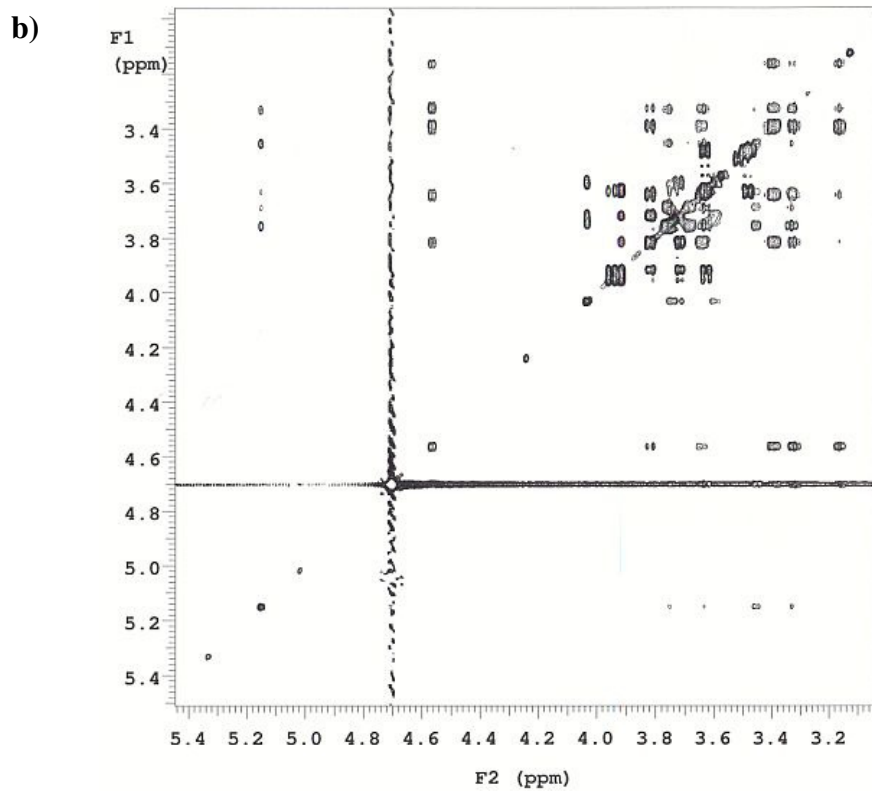
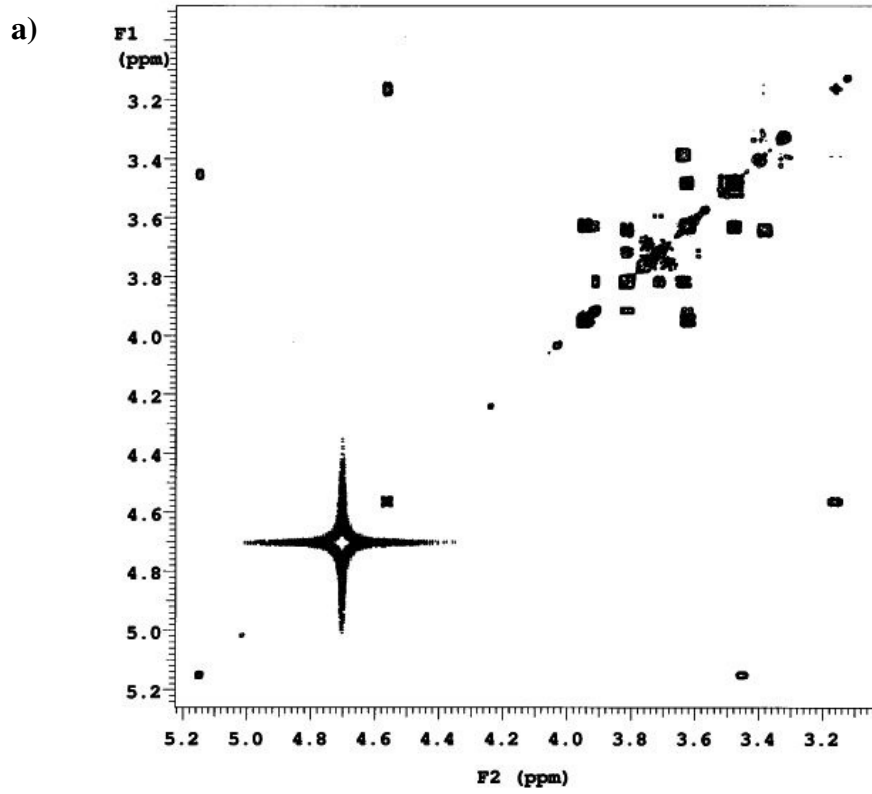


Abb. 25: Homonukleare 2D-NMR-Spektren (600 MHz) der gereinigten Substanz von Fraktion 13 (Abb. 8) des Mangoschalenextrakts.
a) COSY-Spektrum, b) TOCSY-Spektrum

α -Arabinose

Die Kopplungskonstanten aus dem 1D-TOCSY-Spektrum mit selektiver Anregung des anomeren Protons (5,15 ppm; Mischzeit = 150 ms; Abb. 26) zeigten die folgenden korrespondierenden Signale:

$$\delta_{\text{H}} = 5,15 \text{ d (3,8 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,76 \text{ ddd (10,7 Hz; 5,4 Hz; 2,1 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,69 \text{ dd (6,8 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,63 \text{ dd (9,5 Hz und 9,4 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,45 \text{ dd (9,8 Hz und 3,8 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,33 \text{ dd (9,9 Hz und 9,3 Hz)}$$

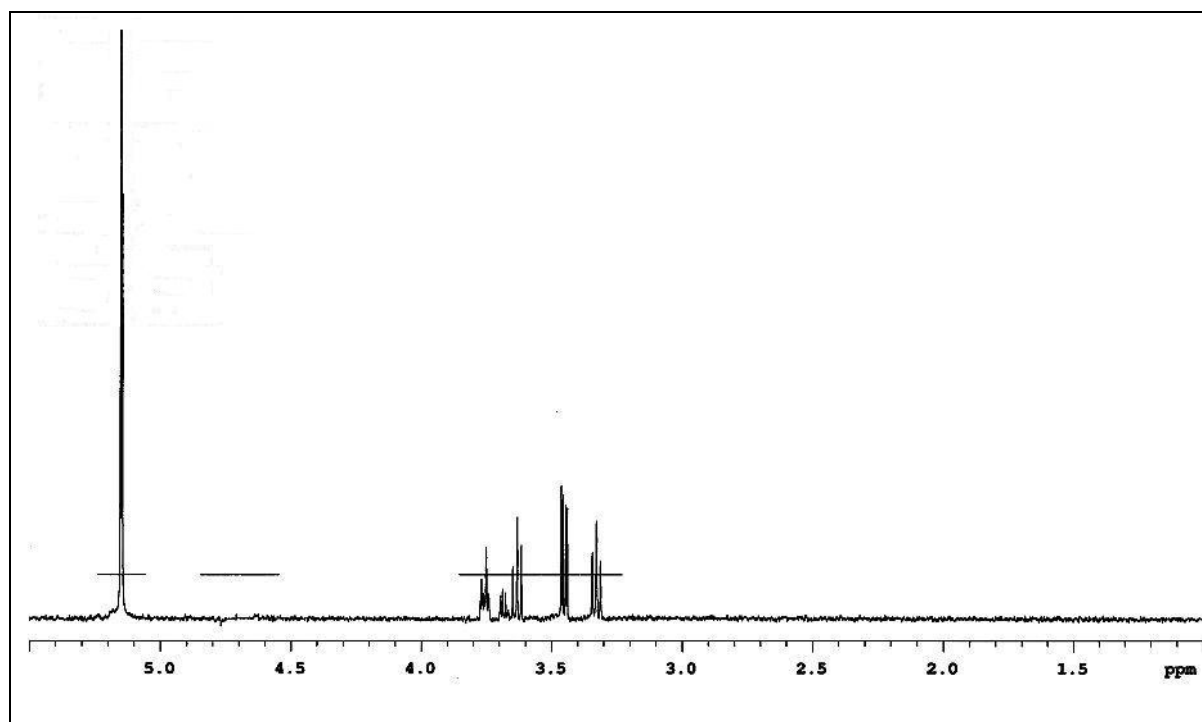


Abb. 26: 1D-TOCSY-Spektrum mit selektiver Anregung des anomeren Protons (5,15 ppm; Mischzeit = 150 ms).

Homonukleare 2D NMR-Spektren (600MHz):

δ_{H} [ppm]	COSY [ppm]	TOCSY [ppm]
5,15	3,45	3,76; 3,45; 3,33
3,76	3,69	5,15; 3,76; 3,69; 3,63; 3,45; 3,33
3,69	3,77	3,63; 3,45; 3,33
3,63		
3,45	5,15; 3,33	5,15; 3,75; 3,33
3,33	3,45	5,15; 3,75; 3,63

Heteronukleare 2D NMR-Spektren:

δ_c [ppm]	HSQC [ppm]	HMBC (optimiert für J=8 Hz) [ppm]	HMBC (optimiert für J=4 Hz) [ppm]
92,06	5,15	1J	1J; 3,76; (3,63)
72,86	3,63	5,15; 3,45; 3,33	5,15; (3,76); 3,45; 3,33
71,35	3,45	5,15; 3,68; 3,63; 3,33	5,15; 3,68; 3,33
69,56	3,33	3,69; 3,62	3,62
60,50	3,76/3,69	-	3,32

Tab. 19: Kopplungen der Arabinose aus den homo- und heteronuklearen NMR-Spektren der gereinigten Substanz von Fraktion 13 (Abb. 8) des Mangoschalenextrakts.

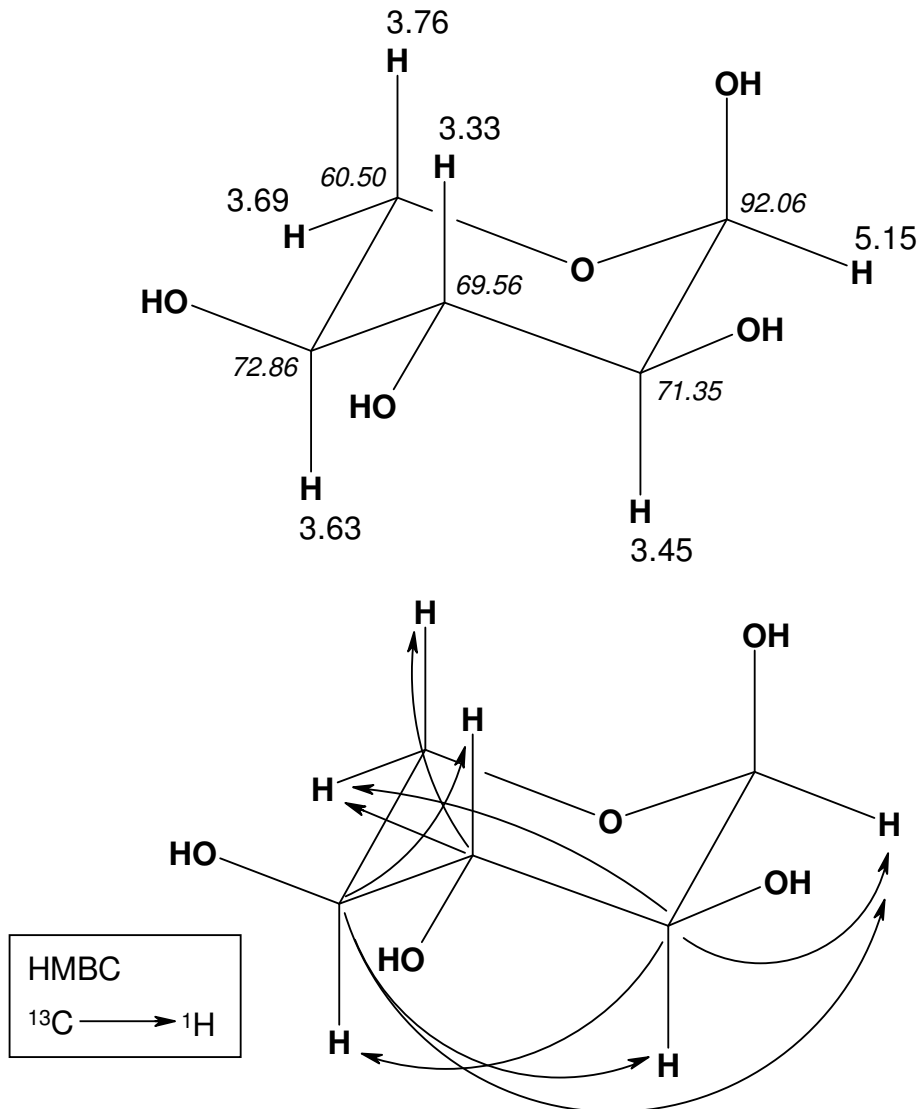


Abb. 27: Signalzuordnung der α -Arabinose mittels HSQC und HMBC-Kopplungen

β -Glucose

Die Kopplungskonstanten aus dem 1D-TOCSY-Spektrum mit selektiver Anregung des anomeren Protons (4,56 ppm; Mischzeit = 150 ms; Abb. 28) zeigten die folgenden korrespondierenden Signale:

$$\delta_{\text{H}} = 4,56 \text{ d (8,0 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,81 \text{ dd (12,3 Hz und 2,3 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,64 \text{ dd (12,3 Hz und 5,8 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,40 \text{ dd (9,4 Hz und 9,1 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,38 \text{ ddd (9,8 Hz; 5,8 Hz und 2,2 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,32 \text{ dd (9,4 Hz und 8,0 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,16 \text{ dd (9,4 Hz und 8,0 Hz)}$$

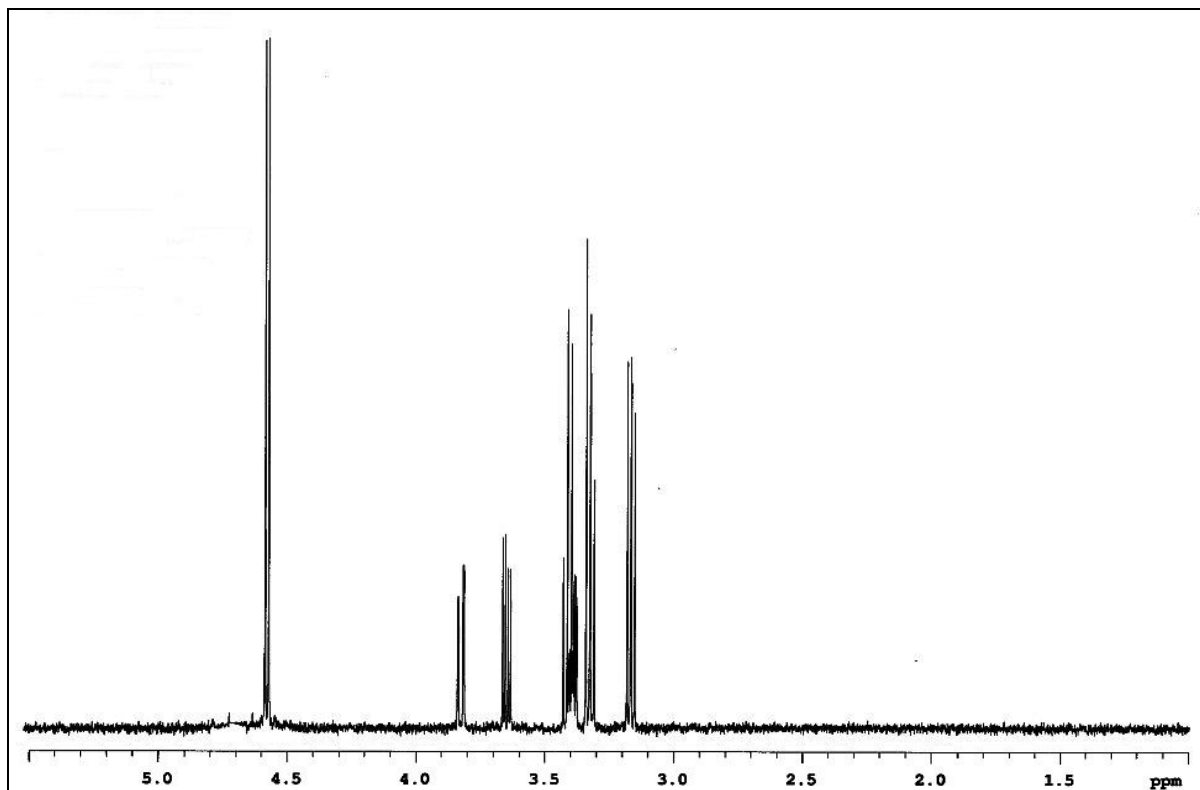


Abb. 28: 1D-TOCSY-Spektrum mit selektiver Anregung des anomeren Protons (4,56 ppm; Mischzeit = 150 ms).

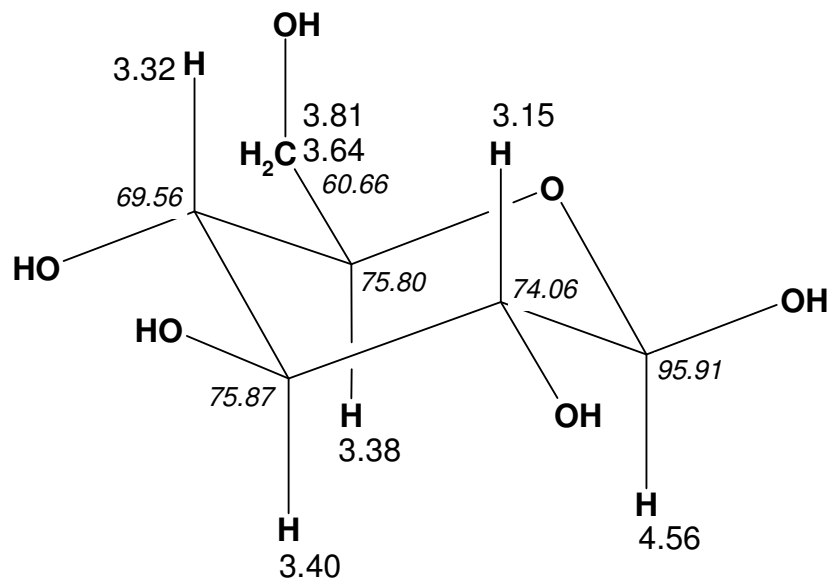
Homonukleare 2D NMR-Spektren (600MHz):

δ_H [ppm]	COSY [ppm]	TOCSY [ppm]
4,56	3,16	3,81; 3,64; 3,40; 3,32; 3,16
3,81	3,64	4,56; 3,64; 3,39; 3,33
3,64	3,82; 3,38	4,56; 3,81; 3,39; 3,33
3,40	3,32; 3,26	4,56; 3,82; 3,64; 3,32; 3,26
3,38	3,64	4,56; 3,82; 3,64; 3,32; 3,26
3,32	3,40; 3,38	4,56; 3,38
3,16	4,56; 3,40	4,56; 3,38

Heteronukleare 2D NMR-Spektren:

δ_C [ppm]	HSQC [ppm]	HMBC (optimiert für J=8 Hz) [ppm]	HMBC (optimiert für J=4 Hz) [ppm]
95,91	4,56	1J; 3,40; 3,16	1J; 3,40; 3,16
75,87	3,40	4,56; 3,40	4,56; 3,31
75,80	3,38	-	3,15
74,06	3,16	3,40	3,40
69,56	3,32	3,64; 3,40	3,62; 3,40
60,66	3,82; 3,64	1J; 3,32	3,32

Tab. 20: Kopplungen der β -Glucose aus den homo- und heteronuklearen NMR-Spektren der gereinigten Substanz von Fraktion 13 (Abb. 8) des Mangoschalenextrakts.



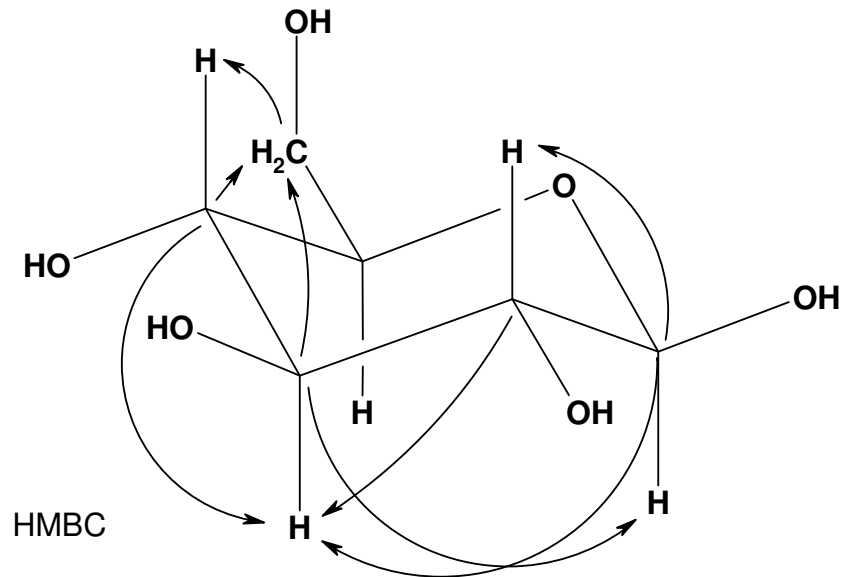


Abb. 29: Signalzuordnung der β -Glucose mittels HSQC und HMBC-Kopplungen.

α -Glucose

Die Kopplungskonstanten aus dem 1D-TOCSY-Spektrum mit selektiver Anregung des anomeren Protons (5,28 ppm; Mischzeit = 150 ms; Abb. 30) zeigten die folgenden korrespondierenden Signale:

$$\delta_{\text{H}} = 5,28 \text{ d (3,9 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,83 \text{ dd (10,0 Hz und 9,2 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,70 \text{ dd (10,6 Hz und 10,5 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,63 \text{ dd (9,6 Hz und 9,6 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,43 \text{ dd (10,0 Hz und 3,9 Hz), aus HSQC: CH}_2\text{-Gruppe mit 3,48 ppm.}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,34 \text{ dd (9,6 Hz und 3,9 Hz)}$$

Das Signal bei 5,28 ppm überlagerte mit einem anderen Signal.

Andere Signale aus dem 1D-TOCSY-Spektrum zu 5,28 ppm (überlagernde Signale):

$$\delta_{\text{H}} = 3,72 \text{ dd (3,7 Hz und 2,9 Hz)}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,52 \text{ m}$$

$$\delta_{\text{H}} = 3,29 \text{ t (9,3 Hz)}$$

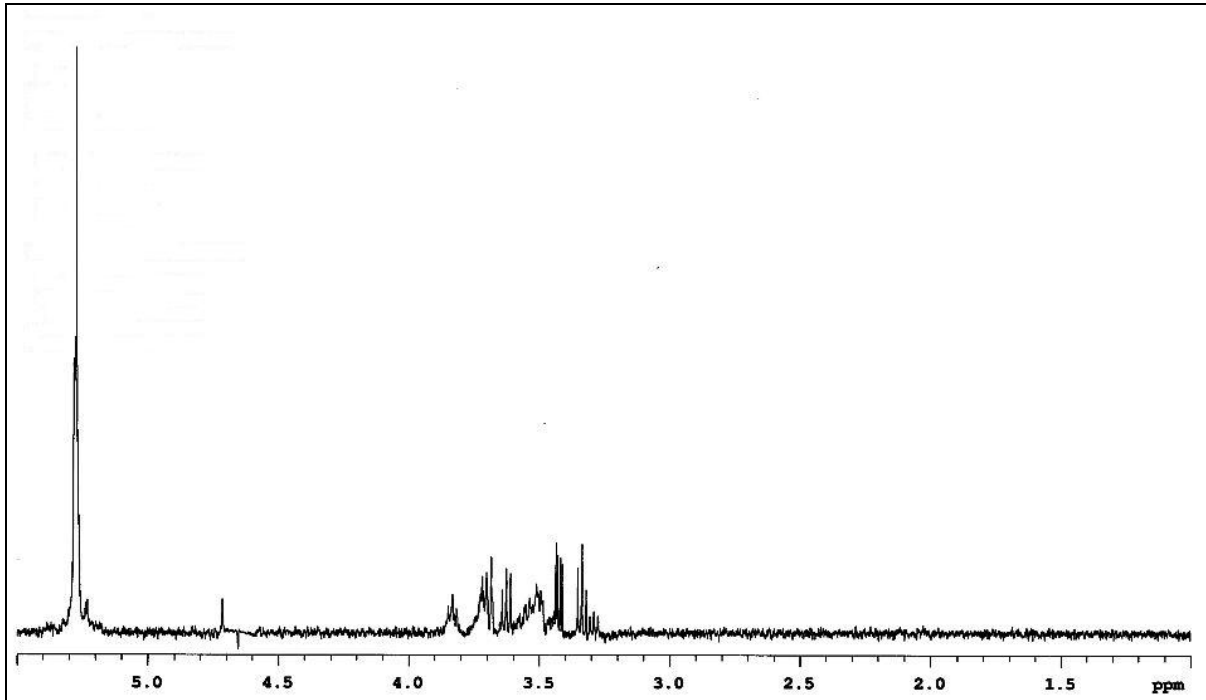


Abb. 30: 1D-TOCSY-Spektrum mit selektiver Anregung des anomeren Protons (5,28 ppm; Mischzeit = 150 ms).

Weitere Informationen aus anderen NMR-Spektren:

1D-TOCSY zu 4,03 ppm: 4,00 ppm; 3,92 ppm; 3,75 ppm; 3,72 ppm und 3,59 ppm.

HSQC-Korrelationen zu diesen Signalen:

4,03 ppm → 75,03 ppm / 3,92 ppm → 69,17 ppm / 3,75 ppm → 71,42 ppm / 3,72 ppm → 62,28 ppm / 3,59 ppm → 62,28 ppm

HMBC-Korrelation: 104,39 ppm → 4,03 ppm; 3,58 ppm.

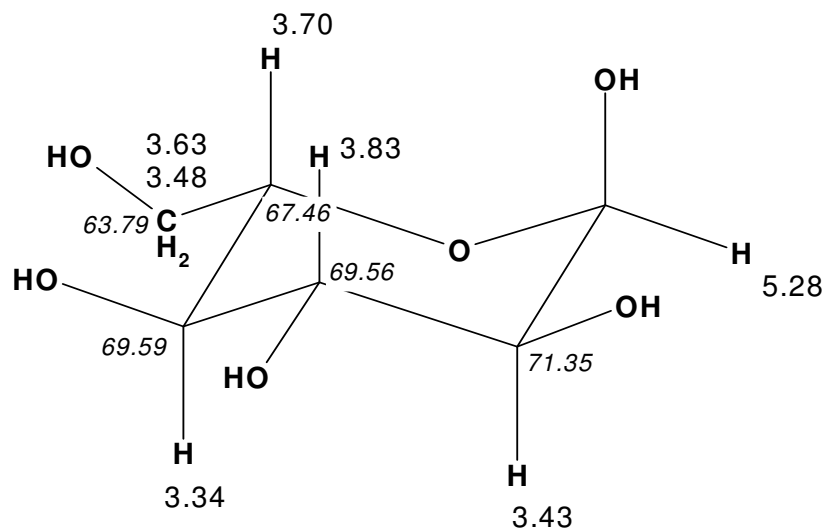


Abb. 31: Signalzuordnung der α -Glucose.

Desweiteren waren Hinweise auf einen weiteren Zucker mit Methylgruppe vorhanden, der sich jedoch nicht genauer identifizieren ließ.

b) Identifizierung von Einzelzuckern in Fraktion 13 von Mangoschalen-Extrakt nach Hydrolyse mittels HPLC-RI und DC

Um den noch nicht identifizierbaren Zucker des Trisaccharides neben α -Arabinose und β -Glucose zu ermitteln wurde eine Hydrolyse der Fraktion 13 von Mangoschalen-Extrakt in 2 M TFA (90 min. bei 100 °C) ausgeführt. Das Hydrolysat wurde mittels einer HPLC-Säule für Monosaccharide (Rezex RPM-Pb²⁺) und Brechungsindex-Detektor analysiert. Es konnten für Einzelzucker relevante Signale bei $R_t = 14,53$ min, 16,60 min und 17,90 min detektiert werden (Abb. 32). Der Peak bei $R_t = 9,58$ min. stammt von Acetat-Rückständen aus der semipräparativen HPLC, die sich aufgrund der vielfach vereinten Läufe anhäuferten und sich im Vakuum nicht mehr komplett verflüchtigen ließen. Die Signale vor $R_t = 14$ min sind für Einzelzucker nicht relevant, da Glucose als erstes Monosaccharid bei $R_t = 14,39$ min eluiert (siehe Anhang 8). Durch Vergleich der Retentionszeiten mit den Standard-Zuckerlösungen kommen folgende Zucker für die genannten Peaks in Frage:

$R_t = 14,53$ min: Glucose oder 2-Deoxyglucose

$R_t = 16,60$ min: Rhamnose, Sorbose oder Galactose

$R_t = 17,90$ min: Arabinose, Mannose oder Fructose.

Aufgrund der bereits erhaltenen NMR-Daten kann der Peak bei 14,53 min Glucose und der Peak bei 17,90 min Arabinose zugeordnet werden. Zur weiteren Identifizierung des dritten Peaks wurde eine Dünnschichtchromatographie auf Kieselgurplatten durchgeführt. Die Zuordnung der Spots zu den einzelnen Zuckern erfolgte mittels R_f -Wert und Färbung nach Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz (Stahl 1962, Matissek et al. 1992). Dieser DC-Nachweis war sehr empfindlich und konnte noch 0,05 μ g Zucker nachweisen. Aufgrund der erhaltenen Spots aus dem Hydrolysat von Fraktion 13 des Mangoschalen-Extraktes konnte hierbei neben Glucose und Arabinose noch eindeutig Rhamnose detektiert werden (Tab. 21). Dies stimmte auch mit den Hinweisen aus der NMR überein, da es sich bei Rhamnose um einen Zucker mit Methylgruppe handelt.

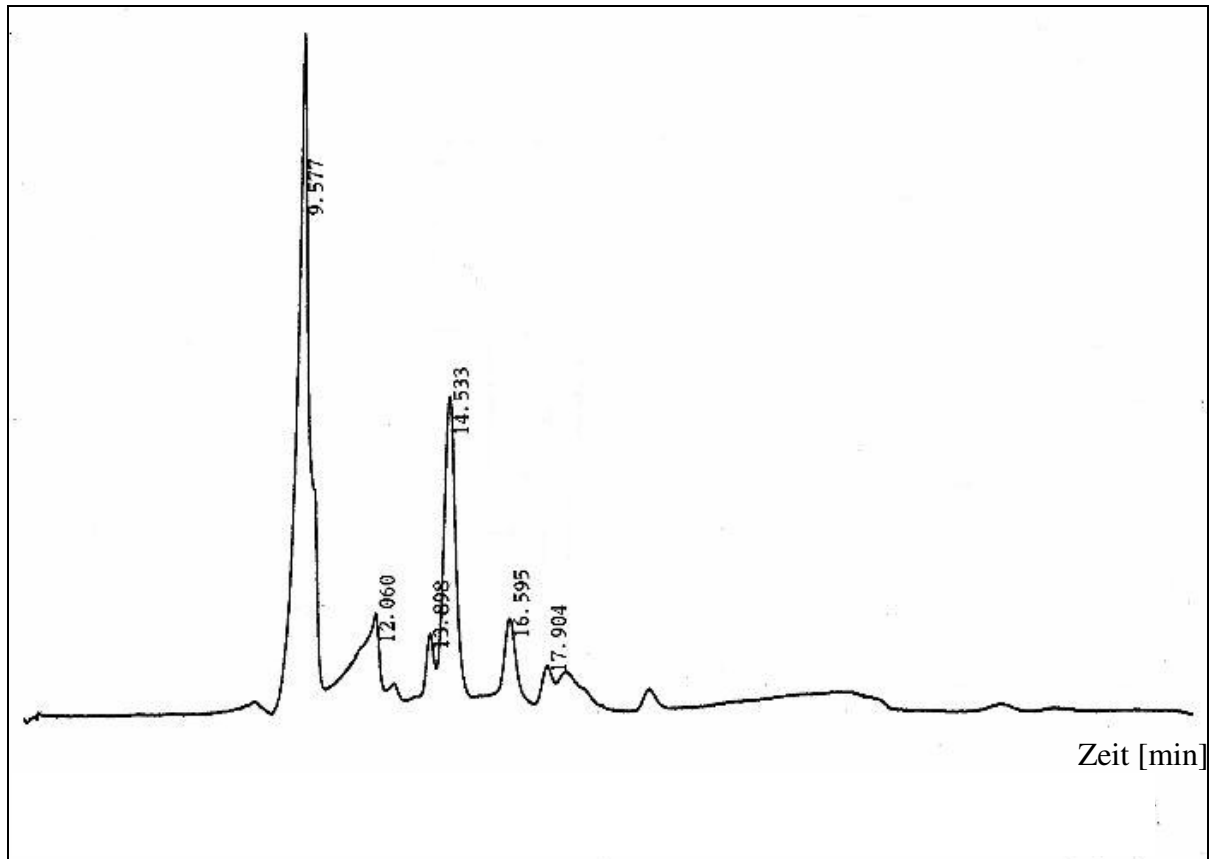


Abb. 32: HPLC-Chromatogramm des Hydrolysates der Fraktion 13 von Mangoschalens-Extrakt nach Auftrennung an einer Rezex RPM-Pb²⁺-Säule.

Probe	Laufstrecke [cm]	R _f -Wert	Farbe
Ribose	14,5	0,76	Blaugrün
Fructose	9,2	0,48	Violett
Glucose	6,5	0,34	Blaugrün
Arabinose	10,4	0,54	Gelbgrün
Mannose	9,4	0,49	Grün
Galactose	4,8	0,25	Grün
Rhamnose	17,6	0,92	Blaugrün
Xylose	15,9	0,83	Grün
Sorbose	9,8	0,51	Violett
Hydrolysat von Fraktion 13 des Mangoschalens-Extraktes	6,5 / 10,1 / 17,9	0,34 / 0,53 / 0,94	Blaugrün / Gelbgrün / Blaugrün

Tab. 21: Zuckeranalysen des Hydrolysates von Fraktion 13 des Mangoschalens-Extraktes mittels Dünnschichtchromatographie und Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühreagenz.

Bei der Quantifizierung war noch zu beachten, dass sich die Zucker bei der sauren Hydrolyse mit TFA teilweise zersetzen bzw. umlagern (Belitz und Grosch 1992). Das Ausmaß ist dabei bei jedem Zucker unterschiedlich groß wie anhand einer Testreihe mit

Zuckerstandardlösungen ($c = 1 \text{ g/l}$) herausgefunden wurde. Die verbliebenen Zuckerkonzentrationen wurden nach der Hydrolyse mittels HPLC an Rezex RPM-Pb²⁺ ermittelt: Von Glucose waren noch 62,58 % nachweisbar, von Rhamnose 33,89 % und von Arabinose 25,89 %.

c) Wachstumstests mit den identifizierten Zuckerstandards

Es wurden mit den in Kapitel 4.3.4b) identifizierten Zuckern Arabinose und Rhamnose Tests auf Wachstumsförderung mit und ohne Manganzugabe an dem Stamm B2 durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche Konzentrationen verwendet. Glucose war bereits in ausreichender Menge im Grundmedium enthalten, zusätzliche Additive bewirkten keine Änderung der Zelldichte. Sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Mangan ergab sich nur bei Arabinose eine wachstumsstimulierende Wirkung (Tab. 22), nicht aber bei Rhamnose. Die D-Arabinose bewirkte in einem Konzentrationsbereich von 0,2 - 2 g/l einen konstanten OD-Anstieg von 0,21 - 0,27. Eine analoge Ausführung des Versuches mit L-Arabinose ergab keine signifikanten Unterschiede zu D-Arabinose. Die OD-Steigerung war bei D-Arabinose etwas höher. Bei zusätzlicher Addition von 34 mM Mangan lässt sich ein schwach synergistischer Effekt mit 1,5 g/l D-Arabinose erkennen. Bisher getestete Oligosaccharide wie z.B. Melezitose, Melibiose, Pektin sowie Arabinogalactan wirkten nicht wachstumsfördernd.

Konzentration der Additive im Grundmedium	$\Delta \text{OD}_{546\text{nm}}$
D-Arabinose (0,2 g/l)	0,21
D-Arabinose (0,5 g/l)	0,24
D-Arabinose (1 g/l)	0,25
D-Arabinose (1,5 g/l)	0,27
D-Arabinose (2 g/l)	0,27
L-Arabinose (0,2 g/l)	0,03
L-Arabinose (0,5 g/l)	0,07
L-Arabinose (1 g/l)	0,13
L-Arabinose (1,5 g/l)	0,15
L-Arabinose (2 g/l)	0,20
D-Arabinose (2 g/l) + 34 mM Mangan	0,27
D-Arabinose (0,2 g/l) + 34 mM Mangan	0,55
D-Arabinose (0,5 g/l) + 34 mM Mangan	0,50
D-Arabinose (1 g/l) + 34 mM Mangan	0,55
D-Arabinose (1,5 g/l) + 34 mM Mangan	0,73
D-Arabinose (2 g/l) + 34 mM Mangan	0,47

Konzentration der Additive im Grundmedium	Δ OD _{546nm}
L-Rhamnose (0,2 g/l)	-0,01
L-Rhamnose (0,5 g/l)	0
L-Rhamnose (1 g/l)	-0,01
L-Rhamnose (1,5 g/l)	-0,01
L-Rhamnose (2 g/l)	0
L-Rhamnose (0,2 g/l) + 34 mM Mangan	0,37
L-Rhamnose (0,5 g/l) + 34 mM Mangan	0,39
L-Rhamnose (1 g/l) + 34 mM Mangan	0,38
L-Rhamnose (1,5 g/l) + 34 mM Mangan	0,38
L-Rhamnose (2 g/l) + 34 mM Mangan	0,35
Melezitose (1 g/l)	0,05
Melibiose (1 g/l)	0,03
Pektin (1 g/l)	0,02
Arabinogalactan	0,05
34 mM Mangan	0,42
Tomatensaft	0,96

Tab. 22: Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2 unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von D-Arabinose, L-Arabinose, L-Rhamnose, Oligosacchariden sowie 34 mM Mangan. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 546 nm. Der Zusatz von Mangan erfolgte als Mangansulfat.

d) Ermittlung der Glykosidasen-Aktivität von *Oenococcus oeni* Stamm B2

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurden die Enzymaktivitäten von *Oenococcus oeni* Stamm B2 zur möglichen Spaltung von Oligosacchariden anhand 4-Nitrophenyl-Zuckerderivaten untersucht (Tab. 23).

Eingesetzte Substratlösung	OD _{400nm}	Freigesetztes Aglykon [µg/Reaktionsansatz]
4-Nitrophenyl-β-D-xylopyranosid	0,498	27,77
4-Nitrophenyl-α-L-arabinofuranosid	0,275	16,62
4-Nitrophenyl-β-L-arabinofuranosid	0,249	15,32
4-Nitrophenyl-α-D-glucopyranosid	0,579	31,82
4-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid	0,893	47,52
4-Nitrophenyl-α-D-mannopyranosid	0,366	21,17
4-Nitrophenyl-α-D-galactopyranosid	0,799	42,82
4-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid	0,221	13,92
4-Nitrophenyl-β-D-fucopyranosid	0,360	20,87
4-Nitrophenyl-β-D-glucuronopyranosid	0,454	25,57
4-Nitrophenyl-β-L-rhamnopyranosid	0,412	23,47
4-Nitrophenyl-β-D-cellubiosid	0,448	25,27

Tab. 23: Extinktionen des freigesetzten 4-Nitrophenols durch Glykosidase-Aktivitäten von *Oenococcus oeni* Stamm B2. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 24 h bei 400 nm.

Es war deutlich erkennbar, dass *Oenococcus oeni* Stamm B2 über ein breites Spektrum an Glykosidasen verfügt. Alle eingesetzten Substratlösungen wurden gespalten, lediglich in der Intensität gab es Unterschiede (Abb. 33). Die Aktivität bezüglich 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid war am größten (47,53 μ g freigesetztes Aglykon), gefolgt von 4-Nitrophenyl- α -galactopyranosid (42,82 μ g) und 4-Nitrophenyl- α -glucopyranosid (31,82 μ g). Am geringsten waren die Aktivitäten bezüglich 4-Nitrophenyl- β -galactopyranosid (13,92 μ g), 4-Nitrophenyl- β -arabinofuranosid (15,32 μ g) und 4-Nitrophenyl- α -arabinofuranosid (16,62 μ g).

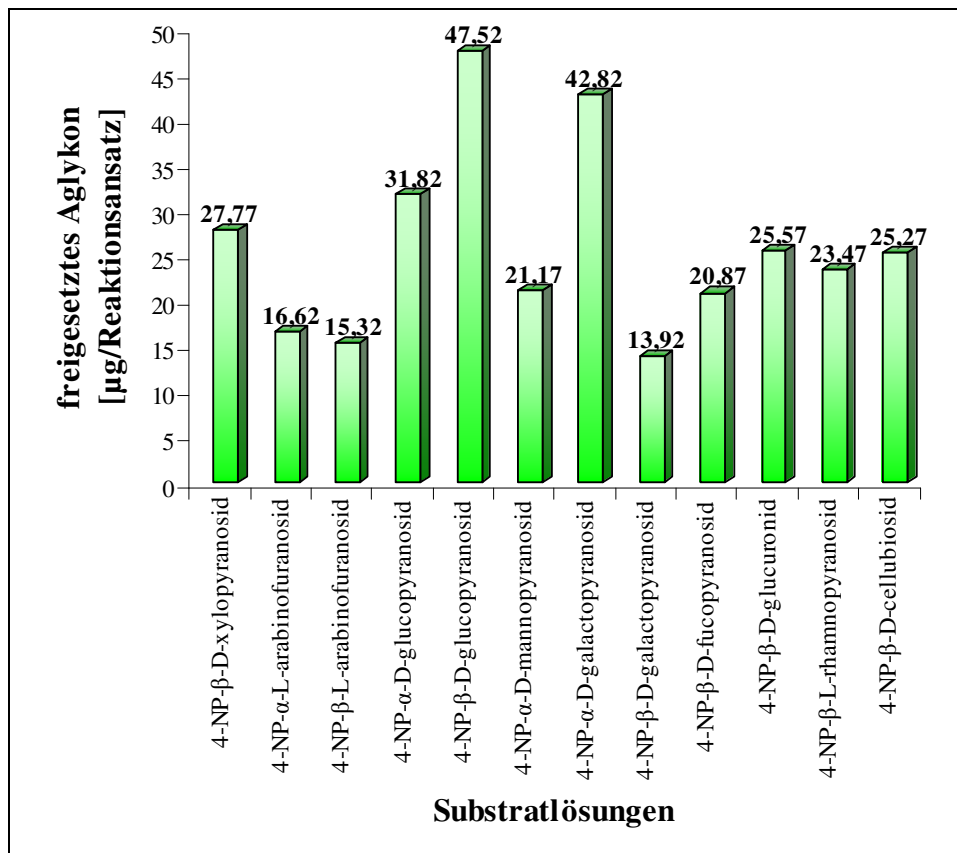


Abb. 33: Freigesetztes 4-Nitrophenol durch Glykosidase-Aktivitäten von *Oenococcus oeni* Stamm B2 (NP = Nitrophenyl).

4.4.5 Screening in Microtiterplatten mit Zitronenmesokarp-Extrakt als Ausgangsmaterial

Der Extrakt von Zitronenmesokarp wurde ebenfalls mit semipräparativer HPLC an einer C₁₈-Säule aufgetrennt und anschließend in Microtiterplatten auf Wachstumsfaktoren untersucht, da hier die Wachstumsstimulierung aufgrund des äußerst geringen Mangangehaltes nur doch organische Stoffe verursacht wird (siehe Kapitel 4.3.6). Die durch Auftrennung mit 1%iger Essigsäure erhaltenen HPLC-Fractionen analog dem Mangoschalen-Extrakt ergaben im folgenden Wachstumstest keinerlei Förderung außer in den Fraktionen 4-6. (Abb. 34). Dieses Ergebnis glich also dem der Tomate (Kapitel 4.4.3).

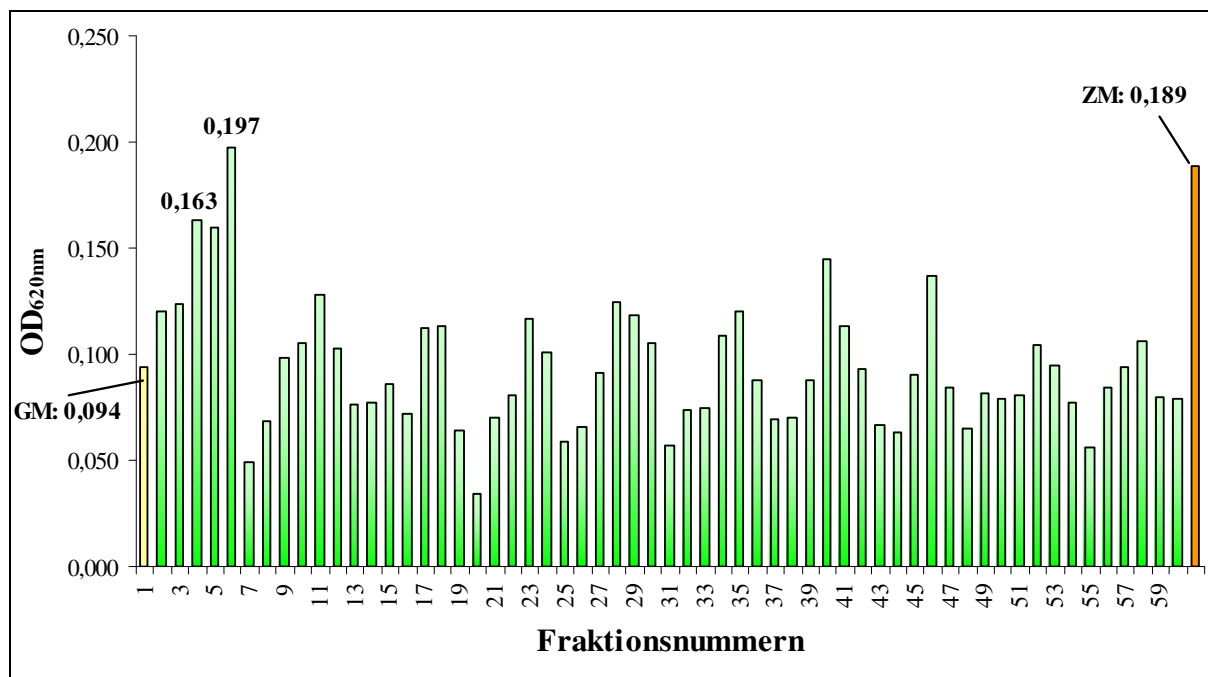


Abb. 34: Wachstumstest in Microtiterplatten mit *Oenococcus oeni* Stamm B2. Die 60 erhaltenen Fraktionen aus Zitronenmesokarp-Extrakt (ZMI) nach Auftrennung an einer semipräparativen C₁₈-HPLC-Säule mit einem Gradientenprogramm aus 1%iger Essigsäure in Reinstwasser und Methanol wurden als Medienzusatz verwendet. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 620 nm.

Die HPLC wurde jedoch mit dem sensitiveren Ammoniumacetat als Fließmittel wiederholt werden, weil Ammoniumacetat bei der Analyse von Zitronenmesokarp-Extrakt im Gegensatz zu den anderen Säften eine ebenfalls gute Auftrennung der Inhaltsstoffe ermöglichte (siehe Anhang 9). Es ergab sich nun eine erhöhte Zelldichte bei Zusatz der Fraktionen 12 und 18 zum Grundmedium (Abb. 35). Es handelt sich also um eine hydrolyseempfindliche Verbindung, die durch die Anwendung von 1%iger Essigsäure zersetzt wird. In Fraktion 4 zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Extinktion bei 620 nm, die allerdings auch bei der

unbeimpften Kontrolle auftrat. Dies ist auf den Gehalt an Monosacchariden zurückzuführen, die mit den Aminosäuren im Grundmedium während des Autoklavierens eine nicht-enzymatische Bräunungsreaktion (Maillard-Reaktion) eingehen. Es lag hier also eine chemische Reaktion mit Bildung farbiger Verbindungen vor. Die Zelldichte war nicht erhöht, nach Subtraktion der Extinktion der Kontrolle zeigte sich keine signifikante Wachstumsstimulierung (Abb. 35).

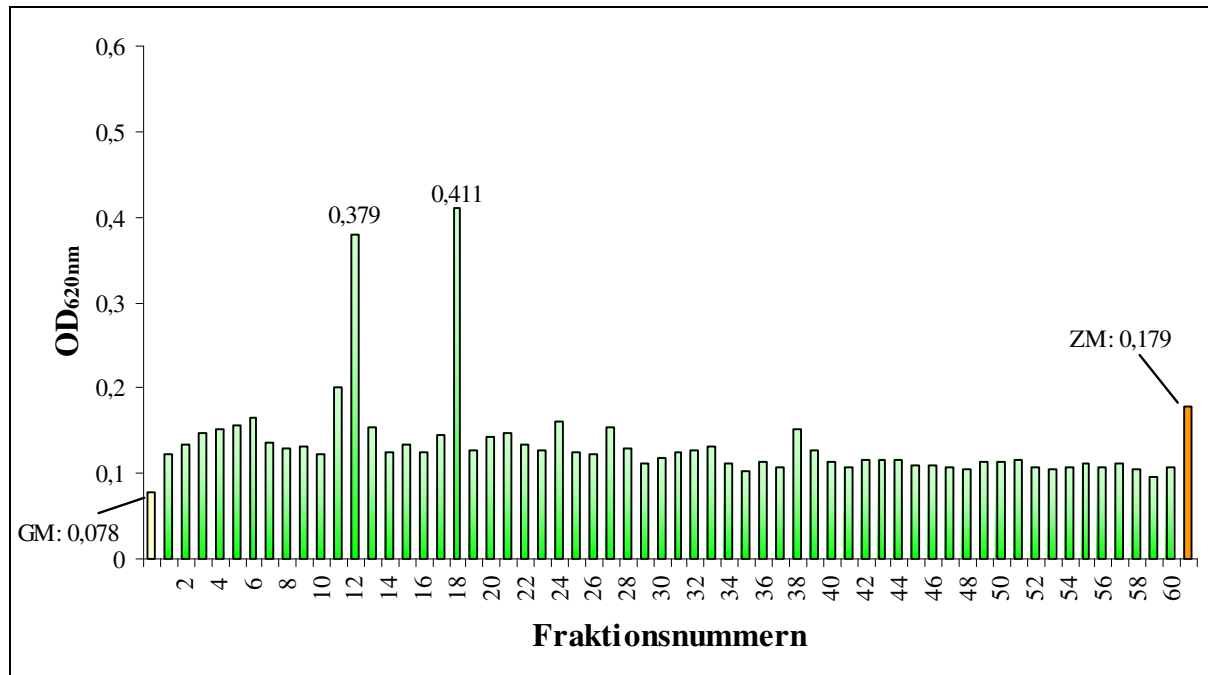


Abb. 35: Wachstumstest in Microtiterplatten mit *Oenococcus oeni* Stamm B2. Die 60 erhaltenen Fraktionen aus Zitronenmesokarp-Extrakt (ZMI) nach Auftrennung an einer semipräparativen C₁₈-HPLC-Säule mit einem Gradientenprogramm aus 0,5%igem wässrigen Ammoniumacetat und Methanol wurden als Medienzusatz verwendet. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 620 nm.

Die mit den Fraktionen 12 und 18 erzielte Zelldichte (0,379 bzw. 0,411) lag deutlich über der der nicht aufgetrennten Probe (0,179), was auch auf das Vorliegen von hemmenden Verbindungen letzterer hindeutet. Es lag nahe, dass es sich bei den Verbindungen in Fraktion 12 und 18 wie bei dem Mangoschalen-Extrakt um Oligosaccharide handelt, die bei der Auftrennung mit 1%iger Essigsäure in Reinstwasser hydrolysiert wurden und als Monosaccharide in Fraktion 4 bis 6 die erhöhte Zelldichte verursachten (Abb. 34).

a) Identifizierung von Wachstumsfaktoren aus Zitronenmesokarp-Extrakt mittels MS und NMR

Zur näheren Charakterisierung und Identifizierung der Wachstumsfaktoren wurde analog der Vorgehensweise beim Mangoschalen-Extrakt (siehe Kapitel 4.4.4a) in semipräparativen HPLC-Läufen jeweils die Fraktion 12 und 18 aufgefangen und nach Aufkonzentrierung bis zur Trockene eine Massenspektrometrie (MS) durchgeführt. Bei Fraktion 12 war leider keine Molmasse ersichtlich, da immer noch mehrere Substanzen enthalten waren. Bei Fraktion 18 ergab sich eindeutig eine Molmasse von 358, da im negativen Modus (gemessen bei pH 2) $M-H^+$ (357) und $2M-H^+$ (715) sowie in der positiven Spur (gemessen bei pH 7) das $M+NH_4^+$ (376) und $M+Na^+$ (381) zur Geltung kamen (Abb. 36). Die Substanz verhielt sich auch klar pH-sensitiv, d.h. dass sie bei saurem pH hydrophiler wird. Dies bestätigt die Beobachtung bei der semipräparativen HPLC-Analyse mit 1%iger Essigsäure in Reinstwasser.

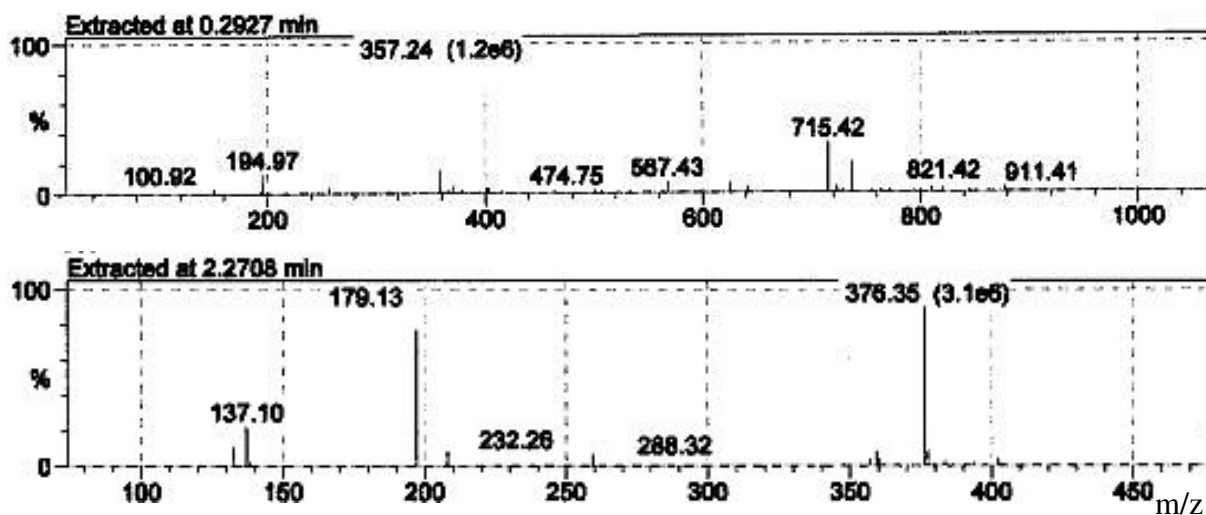


Abb. 36: Massenspektrometrie der gereinigten Substanz von Fraktion 18 (Abb. 35) des Zitronenmesokarp-Extraktes. (a) Negativ-Modus, (b) Positiv-Modus.

Aufgrund der vorhandenen Reinheit von Fraktion 18 des Zitronenmesokarps konnte ein 1H -NMR-Spektrum (Abb. 37) aufgenommen werden. Es zeigten sich keine Signale im aromatischen Bereich, die auftretenden Signale waren jedoch wiederum typisch für C-OH-Gruppen. Es war offensichtlich, dass der Wachstumsfaktor zur selben Substanzklasse (Oligosaccharide) wie der aus Mangoschalen-Extrakt gehörte. Die vorhandene Substanzmenge reichte jedoch nicht aus, um die zur genauen Identifizierung notwendigen NMR-Spektren wie ^{13}C , HMBC, HSQC, COSY und TOCSY aufzunehmen.

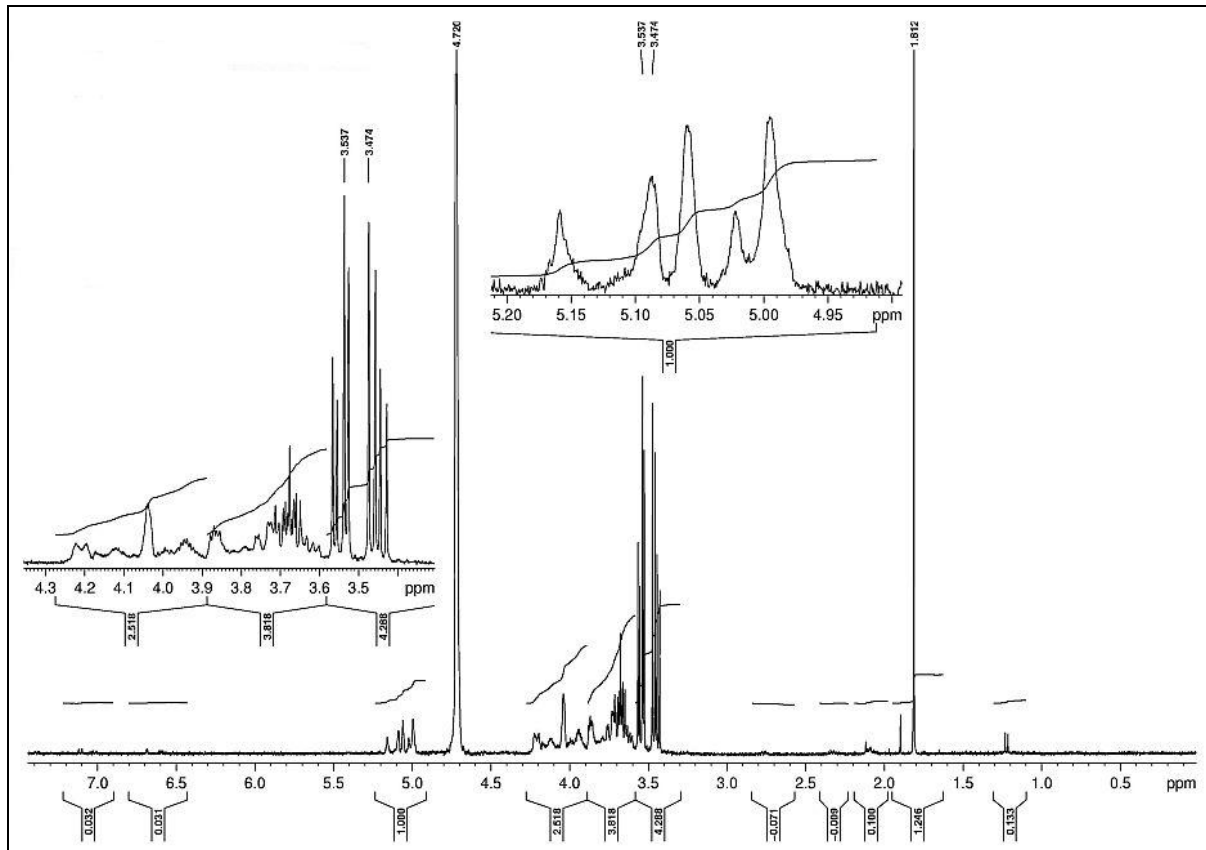


Abb. 37: $^1\text{H-NMR}$ -Analyse der gereinigten Substanz von Fraktion 18 (Abb. 31) des Zitronenmesokarp-Extraktes.

b) Identifizierung von Einzelzuckern aus Zitronenmesokarp-Extrakt nach Hydrolyse mittels DC und HPLC-RI

Um die Einzelzucker des Wachstumsfaktors zu ermitteln wurde eine Hydrolyse der Fraktion 18 von Zitronenmesokarp-Extrakt in 2 M TFA (90 min bei 100 °C) ausgeführt. Mit dem Hydrolysat wurde eine Dünnschichtchromatographie auf Kieselgurplatten mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühreagenz analog Kapitel 4.4.4 b) durchgeführt. Es wurde nur ein breiter, nicht ganz aufgelöster Spot detektiert, für den aufgrund des R_f -Wertes und der Färbung nur Mannose und Arabinose in Frage kommen (Tab. 24).

Probe	Laufstrecke [cm]	R _F -Wert	Farbe
Ribose	10,6	0,73	Blaugrün
Fructose	7,6	0,52	Violett
Glucose	5,3	0,36	Blaugrün
Arabinose	7,8	0,53	Gelbgrün
Mannose	7,5	0,51	Grün
Galactose	4,5	0,31	Grün
Rhamnose	12,4	0,85	Blaugrün
Xylose	10,7	0,73	Grün
Sorbose	7,3	0,50	Violett
Hydrolysat von Fraktion 18 des Zitronenmesokarp-Extraktes	7,9	0,54	Gelbgrün - Grün

Tab. 24: Zuckeranalysen des Hydrolysates von Fraktion 18 des Zitronenmesokarp-Extraktes mittels Dünnschichtchromatographie und Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühreagenz.

Um zu klären ob nur Arabinose bzw. nur Mannose oder eine Mischung dieser beiden Zucker im Wachstumsfaktor enthalten sind, wurde das Hydrolysat mittels einer HPLC-Methode für die Analyse von Monosacchariden und organischen Säuren an einer Aminex-Säule mit Brechungsindex-Detektor analysiert (Pfeiffer und Radler 1985). Die in Kapitel 4.4.4 b) verwendete Rezex Pb²⁺-Säule wurde nicht verwendet, da sich hier Arabinose und Mannose in der Elutionszeit nur um 0,6 min unterscheiden und dieser Unterschied bei der benutzten Aminex-Säule größer war (siehe Anhang 10). Es konnten hierbei zwei Signale bei R_t = 9,80 min und bei R_t = 10,81 min detektiert werden (Abb. 38).

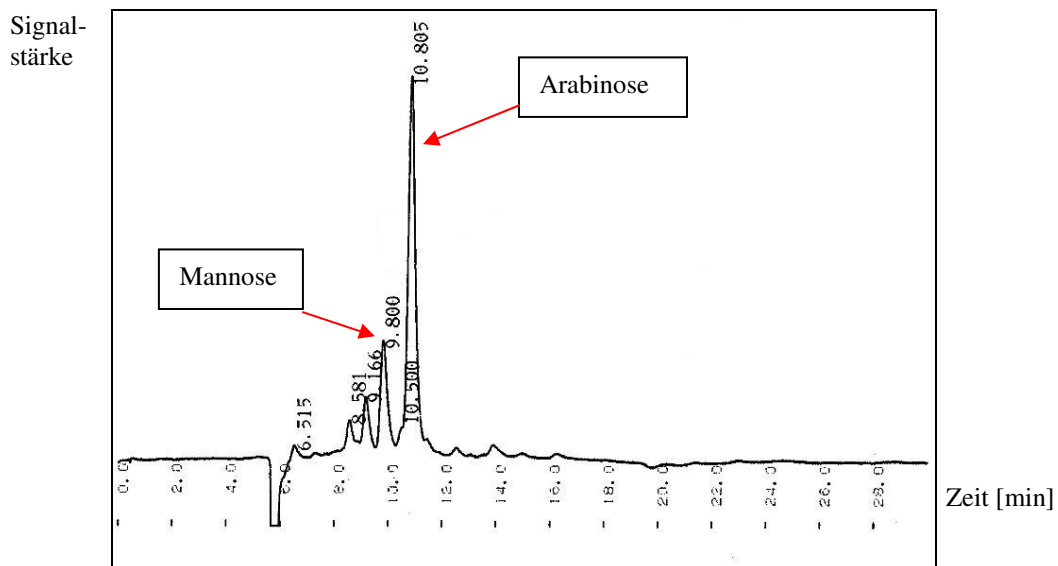


Abb. 38: HPLC-Chromatogramm des Hydrolysates der Fraktion 18 von Zitronenmesokarp-Extrakt nach Auftrennung an einer Aminex HPX 87H-Säule.

Durch Vergleich der Retentionszeiten mit den Standardsubstanzen waren diese Peaks Mannose und Arabinose zuzuordnen. Es kamen also beide Zucker in der gesuchten Verbindung vor. Anschließende Wachstumstests mit verschiedenen Mannosekonzentrationen verursachten bei *Oenococcus oeni* Stamm B2 jedoch keinerlei erhöhte Zelldichten, sodass auch hier nur die Arabinose für diesen Effekt verantwortlich ist.

4.4.6 Wachstumsversuche mit Cystein

Als weiterer wachstumsfördernder Stoff in dem benutzten Nährmedium erwies sich Cystein (siehe auch *Leuconostoc oenos*-Medium der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig). Verschiedene Konzentrationen von Cystein als Zusatz zum Nährmedium zeigte ein Optimum bei 1,5 g/l für den Stamm B2. Besonders auffällig ist die verkürzte lag-Phase, die an den OD's nach 5 Tagen Kultivierungsdauer sichtbar wird (Tab. 25). Im Tomatensaft konnte nach Derivatisierung mit ACQ (6-Aminochinoloyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamat) anhand einer HPLC-Analyse mit Fluoreszenzdetektor 3,6 mg/l Cystein ermittelt werden (siehe Anhang 11), was weit unterhalb einer wirksamen Konzentration für den Stamm B2 lag.

Medienzusätze	OD _{546nm}	
	nach 5 Tagen	nach 10 Tagen
Wasser	0,27	0,49
Cystein (0,1 g/l)	0,32	0,52
Cystein (0,3 g/l)	0,42	0,57
Cystein (0,5 g/l)	0,35	0,57
Cystein (0,75 g/l)	0,38	0,54
Cystein (1 g/l)	0,20	0,53
Cystein (1,5 g/l)	0,49	0,64
Cystein (2 g/l)	0,41	0,67
Cystein (4 g/l)	0,34	0,69
Tomatensaft	1,20	1,44

Tab. 25: Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2 bei unterschiedlichen Konzentrationen von Cystein.

4.4.7 Wachstumsversuche mit den identifizierten Substanzen

In einem weiteren Wachstums-Assay mit dem Stamm B2 wurden die in den Verdünnungsreihen ermittelten optimalen Konzentrationen für Arabinose, Cystein und Mangan („ACM-Mix“) zu synthetischem Basalmedium ohne und mit komplexen Zusätzen (Pepton aus Fleisch, Trypton aus Casein und Hefeextrakt) addiert (Tab. 26).

Zusätze zum Grundmedium ohne komplexen Bestandteile	OD _{546nm}	
	a)	b)
H ₂ O (Kontrolle)	0,01	0,01
ACM Mix	0,01	0,02
Tomatensaft	0,05	1,33
Pepton aus Fleisch (5 g/l) + Trypton (20 g/l)	0,06	0,32
Pepton aus Fleisch (5 g/l) + Trypton (20 g/l) + ACM Mix	0,93	1,21
Pepton aus Fleisch (5 g/l) + Trypton (20 g/l) + Tomatensaft	0,04	1,41
Hefeextrakt (5 g/l) + Pepton aus Fleisch (5 g/l) + Trypton (20 g/l)	0,08	0,57
Hefeextrakt (5 g/l) + Pepton aus Fleisch (5 g/l) + Trypton (20 g/l) + ACM Mix	1,08	1,30
Hefeextrakt (5 g/l) + Pepton aus Fleisch (5 g/l) + Trypton (20 g/l) + Tomatensaft	0,12	1,48

Tab. 26: Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2 in Gegenwart des „ACM Mix“. ACM Mix: 1,5 g/l Arabinose, 1,5 g/l Cystein, 34 mM MnSO₄ x H₂O. Die OD wurde nach (a) 3 Tagen und (b) 10 Tagen Inkubation bei 25 °C gemessen.

Es zeigte sich ein additiver Effekt. Die eingesetzten Substanzen wirkten sehr stark wachstumsfördernd, auch wenn noch eine geringe OD-Differenz bei 546 nm von 0,18 zum Tomatensaft in der stationären Phase bestand. Allerdings erzielte die Bakterienkultur mit dem „ACM-Mix“ schon nach 3 Tagen eine OD_{546nm} von 1,08 während der Tomatensaft lediglich 0,12 erreichte. Wie Tab. 25 zeigte war bei den Kulturen mit „ACM-Mix“ ein Zusatz von Hefe-Extrakt zum Basalmedium für ein gutes Wachstum nicht nötig. Es wurde bereits nach 3 Tagen eine Zelldichte von 0,93 erreicht, bei Zusatz von Tomatensaft nur 0,04. Es war also eine deutlich schnellere Anzucht möglich, weshalb für die Kultur von Oenokokken mit ähnlichen Eigenschaften folgendes Medium („ACM-Medium“) zu empfehlen ist:

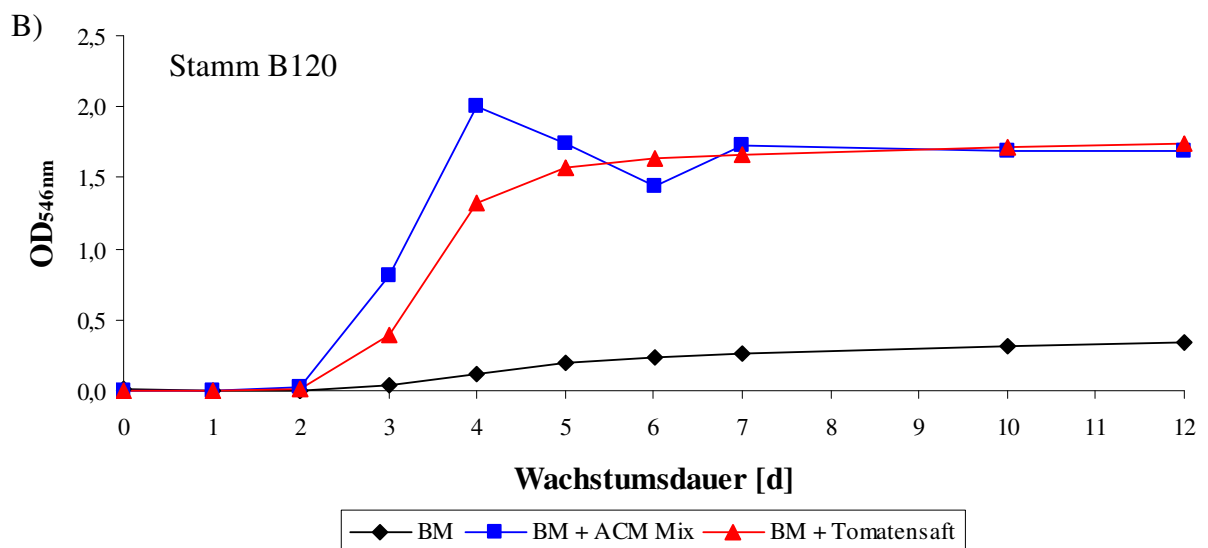
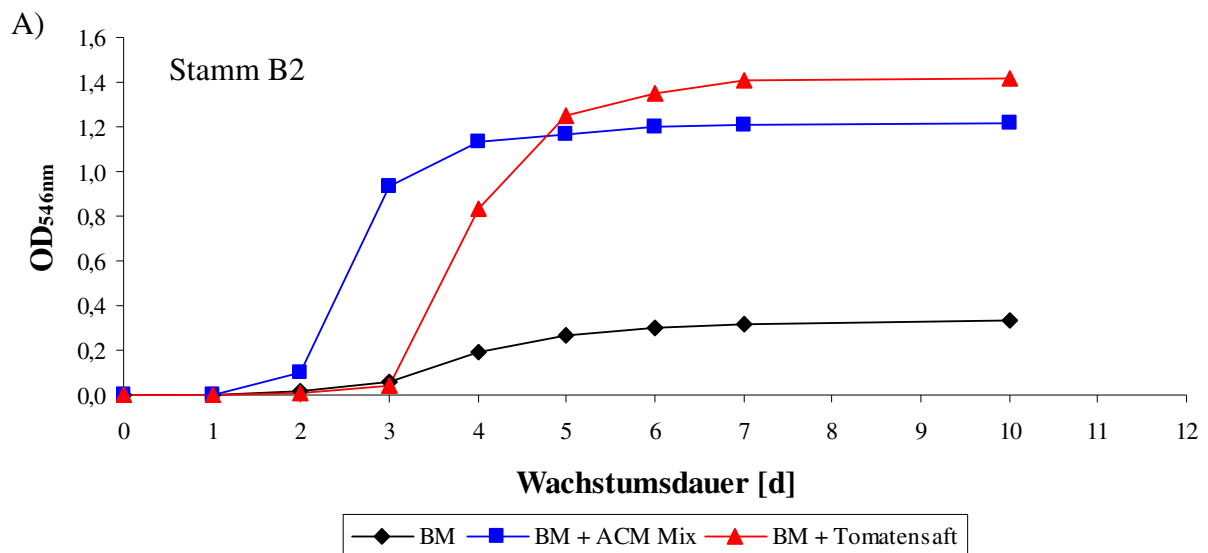
20 g/l Trypton, 5 g/l Pepton aus Fleisch, 5 g/l Glucose, 5 g/l Fructose, 1,5 g/l Arabinose, 3 g/l Citronensäure, 1 g/l Tween 80, 1,9 g/l Mangansulfat, 0,5 g/l Magnesiumsulfat x 7 H₂O, 1,5 g/l Cystein, 10% Aminosäurenlösung und 1% Vitaminlösung.

Ohne Pepton aus Fleisch und Trypton war jedoch kein Anwachsen von *Oenococcus oeni* Stamm B2 zu erreichen, außer mit Tomatensaft als Zusatz. Dies bewies, dass weitere

unbekannte wachstumsfördernde Substanzen in der Tomate und auch in Pepton und Trypton vorhanden sind, die eventuell den Polyphenolen zugeordnet sind (siehe Kapitel 4.4.2).

4.4.8 Wachstumskurven von 4 Stämmen mit den identifizierten fördernden Substanzen (ACM Mix)

Neben dem Stamm B2 gab es noch einige weitere Stämme, bei denen Tomatensaft nicht allein durch die optimale Mangankonzentration von 34,3 mM ersetzt werden konnte (siehe Kapitel 4.2.5: Tab. 13). Aus diesem Grund wurden von den Stämmen B2, B120, B211 und B249 Wachstumskurven in synthetischem Basalmedium ohne Hefeextrakt in Anwesenheit von ACM Mix aufgenommen (Abb. 39).



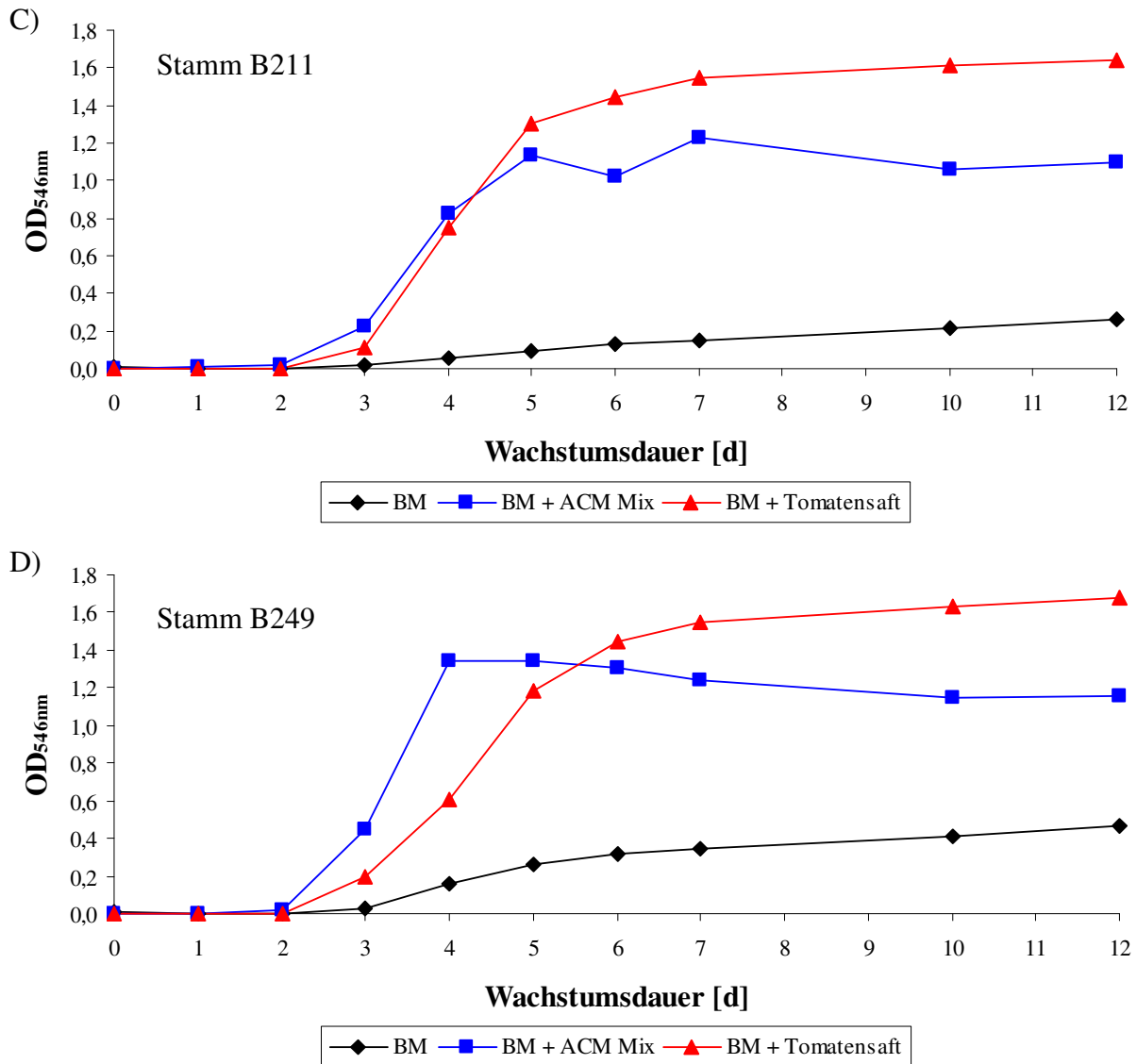


Abb. 39: Wachstumskurven von *Oenococcus oeni* Stamm B2 (A), B120 (B), B211 (C) und B249 (D) in Basalmedium ohne Hefeextrakt mit dem ACM Mix. BM = Basalmedium.

Bei Stamm B120 hingegen kann Tomatensaft durch Zugabe des ACM Mixes komplett ersetzt werden. Ein verfrühtes Absterben wie beim alleinigen Zusatz von 34 mM Mangan (Kapitel 4.2.5) tritt nicht mehr ein. Mit Ausnahme des Stammes B211 war bei allen Stämmen eine deutlich schnellere Anzucht möglich, die End-Extinktion lag jedoch noch um 0,20 (B2) – 0,35 (B249) tiefer als bei Zugabe von Tomatensaft. Es sind für einzelne Stämme also immer noch weitere Substanzen mit schwach wachstumsfördernder Wirkung in Tomatensaft enthalten.

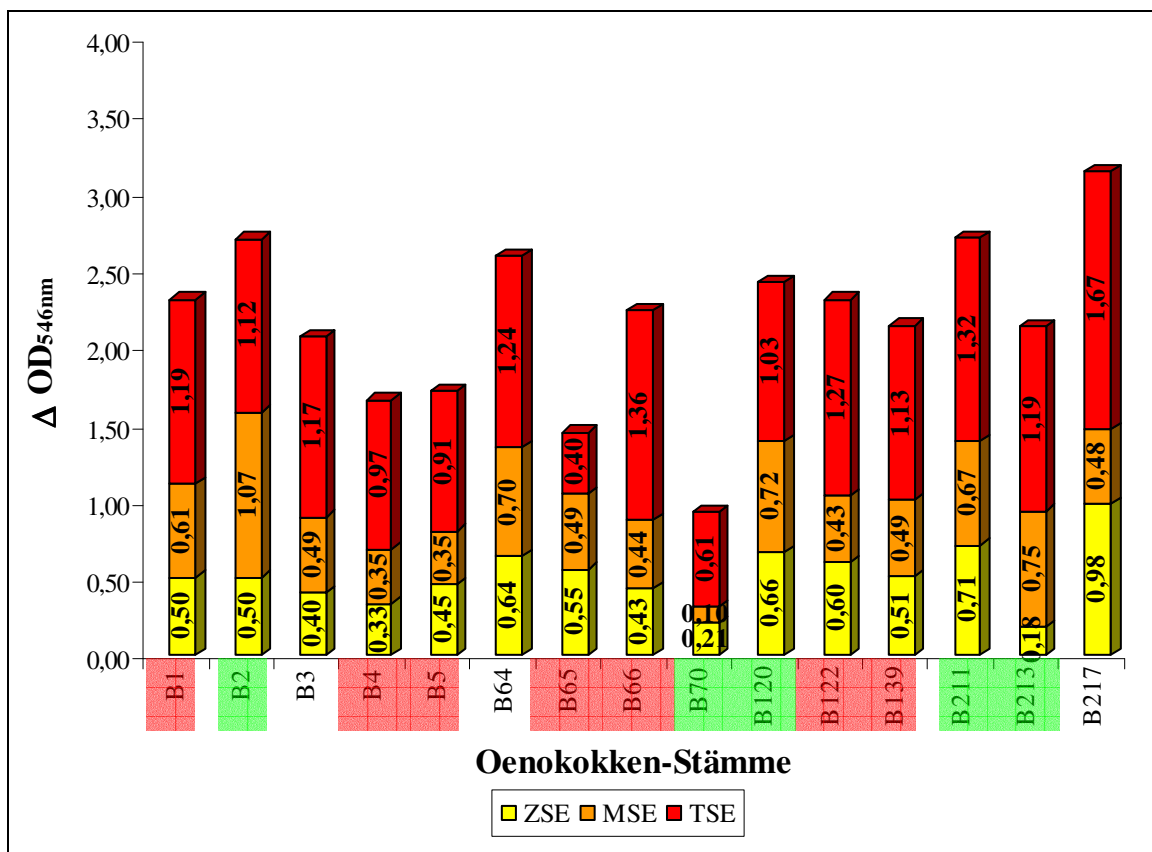
5. Diskussion

5.1 Wachstums-Screening von Säften und Blattextrakten als Additive mit verschiedenen *Oenococcus oeni*-Stämmen

Das Wachstum der 30 getesteten Oenokokken-Stämmen mit den verschiedenen Saft- und Blattextraktzusätzen war sehr heterogen. Das bedeutet, dass stammabhängig unterschiedliche Substanzen wachstumsfördernd wirkten bzw. eine Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen benötigt wurde. Die bislang verwendeten komplexen Medien wie MRS-Medium, *Leuconostoc oenos*-Medium und Irrmann-Medium (De Man et al. 1960, Irrmann 1978), die Tomatensaft als Zusatz verwenden, sind zwar zur Stammhaltung und Kultivierung aller Oenokokken geeignet, erzielten aber nicht die maximale Zellmasse bei den einzelnen Stämmen wie es zum Einsatz als Starterkultur gewünscht wäre. Das Medium muß daher für jeden Stamm separat optimiert werden, wobei Tomatensaft nicht für jeden Stamm das beste Additiv ist. Mangosaft könnte beispielsweise, wie Kapitel 4.2.2 zeigte, ebenso gut eingesetzt werden. Dennoch wurden bislang solche Medien aus Kostengründen nicht verwendet, obwohl Oenokokken sogar als Kontamination in Mangosaft-Dosen nachgewiesen wurden (Ethiraj und Suresh 1985), was nochmals die guten Wachstumsvoraussetzungen für *Oenococcus oeni* in diesem Milieu bestätigt. Garvie und Mabbitt fanden 1967 keine Wachstumsfaktoren für *Leuconostoc oenos* NCDO 1674 in Pflanzensäften aus Äpfeln, Aprikosen, schwarzer Johannisbeere, Kohlblättern, Karotten, Kirschen, Curry, Heidelbeeren, Trauben, Zitronen, Kartoffeln, Rhabarber und Nachtschattenbeeren. Nur bei Zusatz von Melonensaft zeigte sich circa die Hälfte der Wachstumsförderung von Tomatensaft (Garvie und Mabbitt 1967). Diese Beobachtung erscheint angesichts der breiten Wachstumsförderung von Pflanzensäften bei 30 Oenokokken-Stämmen (Kapitel 4.1) zweifelhaft. Die verursachten Extinktionssteigerungen von mindestens 0,5 gegenüber der Kontrolle bei den Stämmen B2 und B248, die bei sieben der elf getesteten Säfte und Blattextrakten auftrat, lassen eher auf eine weite Verbreitung der wachstumsfördernden Substanzen in Pflanzen schließen als auf ein spezielles Vorkommen in der Tomate, was auch die in Kapitel 4.3 und 4.4 identifizierten Stoffe bestätigten. So fanden Metcalf et al. 1946 neben Tomatensaft auch in grünen Bohnen, roten Beten, Zwiebeln, Kohl, Spinat und Orangen wachstumsfördernde Substanzen für das verwandte Milchsäurebakterium *Lactobacillus fermentum* (L36).

Ein weiteres interessantes Ergebnis ergab sich durch das Schälen der Früchte und dem darauffolgenden Vergleich der verursachten Oenokokken-Zelldichte bei Zusatz von

Fruchtfleischsaft und Schalenextrakt zum Grundmedium, worüber bislang noch keine Untersuchungen vorlagen. Es zeigte sich durch Chromatogrammvergleich mittels HPLC-UV/DAD, dass so leicht schalenspezifische Inhaltsstoffe vom Fruchtfleischsaft abtrennbar waren und die Schalenextrakte gegenüber dem Fruchtfleischsaft stammabhängig mitunter sehr unterschiedliche Auswirkungen auf das Oenokokken-Wachstum hatten. So verursachte beispielsweise Mangoschalen-Extrakt beim Stamm B5 eine geringere Erhöhung der Extinktion ($\Delta OD_{546nm} = 0,31$) als der Zusatz von Mangosaft ($\Delta OD_{546nm} = 0,80$), während bei Stamm B248 keine signifikanten Unterschiede zu erkennen waren. Der Zusatz von Zitronenschalen-Extrakt wirkte hingegen bei allen 30 Stämmen wachstumsfördernd, während Zitronensaft bei 10 Stämmen keine Auswirkung hatte und bei weiteren 10 Stämmen gar eine Wachstumshemmung zu beobachten war. Dieses Resultat bewies die Wichtigkeit der Auftrennung einer Frucht in die Fruchtbereiche mit den jeweiligen unterschiedlichen Inhaltsstoffen bei der Suche nach Wachstumsfaktoren für Oenokokken und das Potential, das noch in Schalenextrakten und weiteren Früchten neben der Tomate enthalten ist.



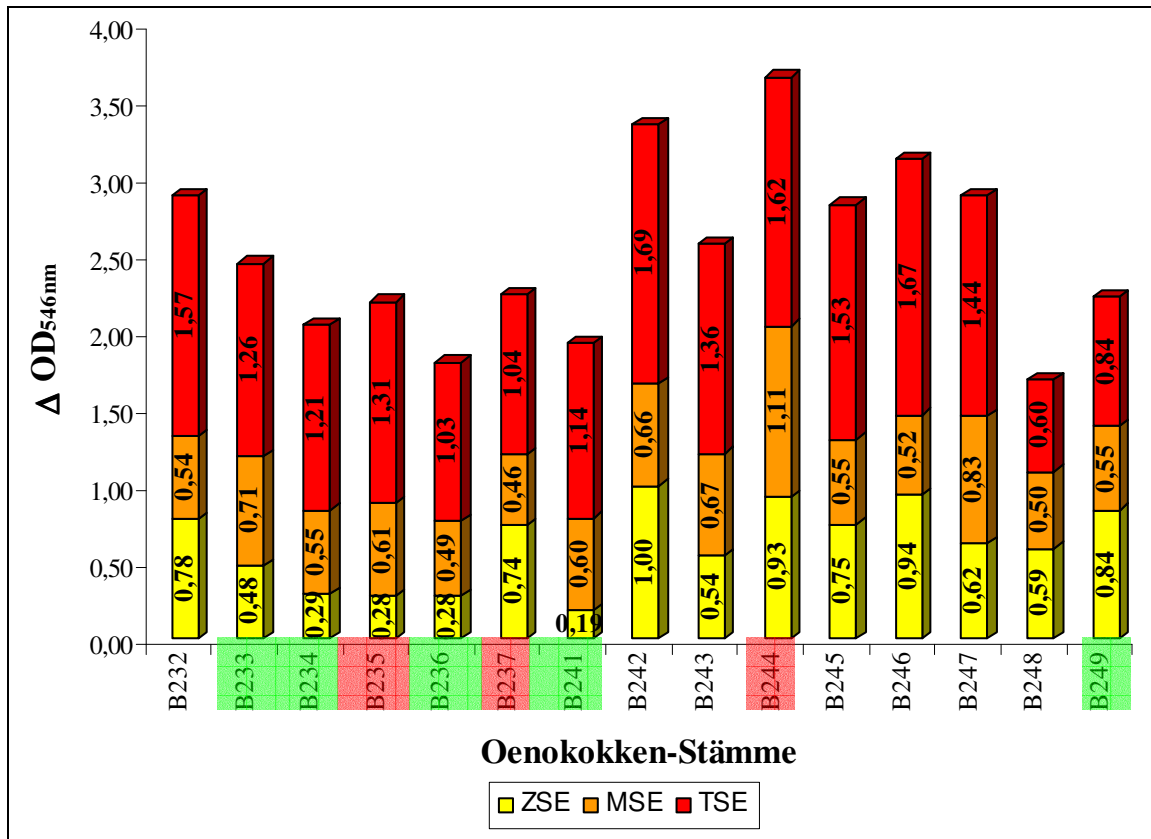


Abb. 36: Wachstumsförderung von 30 verschiedenen *Oenococcus oeni*- Stämmen mit Zitronenschalen-Extrakt (ZSE), Mangoschalen-Extrakt (MSE) und Tomatenschalen-Extrakt (TSE) als Medienzusatz. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 546 nm. Auf grün hinterlegte Stämme wirkte der Zusatz von Zitronensaft fördernd, auf rot hinterlegte hemmend und auf weiß hinterlegte neutral.

Eine Gruppierung bezüglich Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Additive ließ sich aufgrund der Diversität der Oenokokken-Stämme nur schwer erstellen. Aus der bisher publizierten Literatur war diese große Unterschiedlichkeit der Oenokokken im Nährstoffbedarf nicht erkennbar, da alle Untersuchungen nur an einem oder sehr wenigen Stämmen durchgeführt wurden. So bewirkten beispielsweise der Zusatz der wässrigen Schalenextrakte insbesondere bei den Stämmen B217, B242, B244 und B246 eine große Erhöhung der Zelldichte, was auf einen erhöhten Bedarf an Polyphenolen bei diesen Oenokokken hindeuten könnte (Abb. 40). Bei den Stämmen B4, B5, B65, B70, B236 und B248 zeigte sich dagegen insgesamt wenig Wachstumsförderung auf diese Zusätze, wobei B70 schon im Grundmedium sehr gut wächst und keine weiteren Substanzen benötigt. Das Verhalten der Stämme bezüglich des Zusatzes von Zitronensaft (in Abb. 40 farblich hinterlegt) unterstrich die Diversität. Über die hemmende Wirkung von Zitronensaft für *Oenococcus oeni* und auch *Lactobacillus plantarum* berichtet auch Conte et al. (2007). Als Ursache für diese Hemmung wird eine Änderung der Membranpermeabilität bei *Oenococcus oeni* vermutet, die zu einem Verlust von essentiellen Substanzen für den Metabolismus führt. Eine ähnliche Änderung der Membraneigenschaften

verursachten bei Mikroorganismen ätherische Öle wie beispielsweise Eugenol und Thymol (Lambert und Hammond 1973). Allerdings wurde die Untersuchung von Conte et al. (2007) nur an dem Oenokokken-Typstamm B139 der DSMZ (DSM 20252; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) durchgeführt. Diese Beobachtung konnte für diesen Stamm hier bestätigt werden (Tab. 5). Unbekannt war jedoch, dass Zitronensaft nur auf einige Oenokokken-Stämme hemmend wirkt, auf andere aber keinerlei Wirkung oder gar eine Wachstumsförderung zeigt. Das bedeutet, dass manche Oenokokken-Stämme ihre Membranpermeabilität nicht ändern, da sie dies durch Produktion von Stressproteinen und Membranlipiden unterbinden können (Guzzo et al. 2000, Chu-Ky et al. 2005). Der durch den hohen ermittelten Citronensäure-Gehalt von 40 g/l (Lit.: 45 g/l, Souci et al. 1986) im Zitronensaft verursachte Säurestreß konnte dafür der auslösende Faktor sein. Oenokokken, die nicht in der Lage sind Stressproteine zu produzieren, sterben ab, während die anderen Oenokokken sich schützen können. Die vermehrt vorliegende Citronensäure kann dann mitunter von einigen Stämmen als externer Elektronenakzeptor für die NAD(P)H-Reoxidation oder zur Malolaktatfermentation genutzt werden, wodurch sich das Wachstum erhöht (Zaunmüller et al. 2006). Ausserdem ist bekannt, dass Citronensäure bei Nährstoffmangel als Vorläufer für die Biosynthese der Aminosäuren der Aspartat-Familie (Asparagin, Asparaginsäure und Isoleucin) dienen kann (Saguir und Manca de Nadra 2002).

Die beim Zusatz von hohen Konzentrationen Weinblatt-Extrakt erzielte Hemmung wirkte nicht auf dieselben Stämme wie der Zitronensaft (Tab. 27). Insbesondere beim Stamm B70 zeigte Weinblatt-Extrakt eine starke Hemmung, der Zitronensaft förderte hier hingegen das Wachstum. Diese bakterizide Wirkung von Weinblatt-Extrakt beruht wahrscheinlich auf dem hohen Gehalt an Gerbstoffen in Blatt-Extrakten, die in der medizinischen Therapie unter anderem zur Entzündungshemmung ausgenutzt wird (Alam et al. 1995, Kosar et al. 2007).

Wirkung	Oenokokken-Stämme
Zitronensaft fördert, Weinblatt-Extrakt ist neutral	B2, B211
Zitronensaft fördert, Weinblatt-Extrakt hemmt	B70, B236
Zitronensaft und Weinblatt-Extrakt sind neutral	B248
Zitronensaft hemmt, Weinblatt-Extrakt ist neutral	B5

Tab. 27: Wirkung von Zitronensaft und Weinblatt-Extrakt (c = 3,52 g/ml) auf verschiedene Oenokokken-Stämme.

5.2 Der anorganische Wachstumsfaktor Mangan

Wie die Ergebnisse aus Kapitel 4.3 zeigten, bewirkte Mangan als einziger anorganischer Inhaltsstoff der getesteten Säfte eine Wachstumssteigerung bei Oenokokken. Das Angebot an Mangan in den üblichen Kulturmedien für Oenokokken wie beispielsweise MRS-Medium entspricht mit ca. 1 mM Mangangehalt jedoch nicht den hier ermittelten Maxima von 67 μM und insbesondere 34 mM. Das Ausmaß der dadurch bedingten, geringeren Zelldichte ist auch hier stammabhängig unterschiedlich: Bei den Stämmen B2, 245 und B248 ist die Zelldichte mit 34 mM Manganzusatz deutlich höher als bei 1 mM Manganzusatz, besonders in der exponentiellen Phase (Tab. 28). Bei Stamm 213 ist dagegen kein Unterschied festzustellen. Bei 13 von 20 untersuchten Oenokokken-Stämmen ließ sich allein durch Zusatz von 34 mM Mangan zum Grundmedium dieselbe Zelldichte wie bei Zusatz von Tomatensaft erzielen. Ähnliche Ergebnisse sind von Untersuchungen von Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc* und *Pediococcus* bekannt. Hier genügte allerdings bereits der Zusatz von 0,5 mM Mangan bei 63 von 71 getesteten Stämmen um dieselbe Bakteriendichte zu erzielen. Die Ausnahmen waren 4 Stämme von *Lactobacillus pastorianus*, 2 Stämme von *Lactobacillus helveticus* und 2 Stämme von *Streptococcus* sp. (Stamer et al. 1964). Auch Gewürze beinhalten Mangan als stimulierende Komponente für das Wachstum von Starterkulturen bei der Wurstherstellung wie *Lactobacillus plantarum* und *Pediococcus acidilactici*. Bei *Lactobacillus plantarum* wurde hierbei aber eine Wachstumsverzögerung in der lag-Phase bei Mangankonzentrationen ab 1 mM festgestellt und bei *Pediococcus acidilactici* trat in der stationären Phase ein cytotoxischer Effekt auf, da Mangan auch die Säureproduktion stimulierte (Zaika und Kissinger 1984). Eine solche Säureempfindlichkeit könnte auch der Grund für das verfrühte Absterben nach anfänglicher Stimulierung einiger Oenokokken-Stämme beim Zusatz von 34 mM Mangan sein (siehe Tab. 13: Gruppe c).

c(Mn) im Medium	OD _{546nm}							
	Stamm B2		Stamm B213		Stamm B245		Stamm B248	
	exp. ¹⁾	stat. ³⁾	exp. ¹⁾	stat. ²⁾	exp. ³⁾	stat. ⁴⁾	exp. ¹⁾	stat. ⁵⁾
0 μM	0,06	0,31	0,07	0,51	0,18	0,37	0,19	0,49
1,1 mM	0,43	0,64	1,06	1,39	0,48	0,72	0,66	0,94
34,3 mM	0,71	0,83	0,85	1,44	0,89	0,89	1,11	1,16

Tab. 28: Wachstum der *Oenococcus oeni*-Stämme B2, B213, B245 und B248 mit 1,1 mM und 34,3 mM Manganchlorid. Inkubationszeiten: ¹⁾ 3 Tage, ²⁾ 6 Tage, ³⁾ 10 Tage, ⁴⁾ 13 Tage, ⁵⁾ 5 Tage.

Im mikromolaren Bereich bei 67 μM könnten wie bei anderen Milchsäurebakterien unterschiedliche Enzyme für die Wachstumssteigerung verantwortlich sein, die diesen Mineralstoff als Co-Faktor benötigen (De Angelis und Gobbetti 1999, Kim und Rajagopal 2000). Es ist bekannt, dass Mangan beispielsweise von *Lactobacillus plantarum* und *Leuconostoc mesenteroides* in Spuren zum Wachstum benötigt wird und nicht durch andere Kationen ersetzt werden kann (Raccach 1985, Imbert und Blondeau 1998, Lu et al. 2002). Folgende aus Milchsäurebakterien bekannte Enzyme sind beispielsweise bei ihrer Funktion auf Mangan angewiesen:

1. Lactatdehydrogenase (LDH)

Das Enzym LDH reduziert in Milchsäurebakterien Pyruvat zu Lactat, wobei NADH oxidiert wird. Das entstehende NAD^+ wird für die Glykolyse bzw. bei den Oenokokken für den Pentosephosphatweg benötigt. Die Aktivierung dieses Enzyms erfolgt bei manchen Lactobacillen wie z.B. *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus plantarum* durch Mangan. Die maximale Aktivierungsrate liegt bei *Lactobacillus casei* in vitro bei 1 mM Mangan. Auch Oenokokken besitzen eine hohe LDH-Aktivität (Wagner et al. 2005). Durch Elektrophoreseversuche konnte bereits gezeigt werden, dass stammabhängig unterschiedliche LDH-Enzyme vorliegen (Sato et al. 2001). Die maximalen Aktivierungsraten durch Mangan wären zu untersuchen, da hierzu noch keine Ergebnisse vorliegen.

2. Malolaktat-Enzym

Das Malolaktat-Enzym decarboxyliert L-Malat in L-Lactat und CO_2 und ist damit für die Malolaktat-Fermentation verantwortlich. Für diese Reaktion wird NAD^+ und Mangan zwingend benötigt, NAD^+ wird allerdings hierbei nicht reduziert. Dieses Enzym ist in 53 von 59 getesteten Milchsäurebakterien enthalten, unter anderem bei den Oenokokken (Caspritz und Radler 1983, Archibald 1986).

3. RNA-Polymerase

Aus dem Milchsäurebakterium *Lactobacillus curvatus* ist eine Mangan- und DNA-abhängige RNA-Polymerase isoliert worden, bei der eine optimale Aktivität bei Zusatz von 2 bis 4 mM Mangan auftritt (Archibald 1986). Eventuell ist die RNA-Polymerase bei Oenokokken ebenfalls von Mangan, möglicherweise in anderen Konzentrationen, abhängig.

4. Xylose-Isomerase

Dieses Enzym katalysiert die Isomerisierung von D-Xylose in D-Xylulose. Es wird durch die Zugabe von Mangan verstärkt induziert und kann für Milchsäurebakterien eine Rolle spielen, da dadurch die am häufigsten in Pflanzen vorkommende Pentose Xylose abgebaut werden

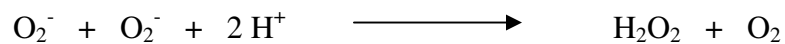
kann. Über das Vorkommen von Xylose-Isomerase in Oenokokken liegen bislang noch keine Informationen vor.

5. NADH-Oxidase

NADH-Oxidase ist ein O₂-reduzierendes und H₂O₂-produzierendes Enzym, das unbedingt FAD benötigt und durch Mangan (0,5 mM) stimuliert wird. Hierbei wird NAD⁺ regeneriert, das beispielsweise zur Oxidation von Glucose-6-phosphat im Pentosephosphatweg benötigt wird. NADH-Oxidase ist in vielen Milchsäurebakterien wie z.B. *Lactobacillus plantarum* enthalten und auch in *Oenococcus oeni* PSU-1 nachgewiesen worden (Mills et al. 2005). Eine weitere Funktion ist insbesondere bei mikroaerophilen Bakterien wie den Oenokokken die Bekämpfung von oxidativem Streß.

6. Manganabhängige Superoxid-Dismutase (SOD)

Dieses Enzym benötigt Mangan als Co-Faktor und dient durch die Dismutation des Superoxid-Radikals O₂⁻ durch die folgende Gesamtreaktion zum Oxidationsschutz:



Oenococcus oeni besitzt keine Superoxid-Dismutase (Mills et al. 2005). Interessanterweise besitzen weitere Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus plantarum* und die *Leuconostoc*-Arten, zu denen auch *Oenococcus oeni* vor seiner Reklassifizierung zählte (Dicks et al. 1995), ebenfalls keine Superoxid-Dismutase, reichern aber im Gegenzug 30 - 35 mM Mangan als nichtenzymatischen Oxidationsschutz an (Efthymiou und Joseph 1972, Archibald und Fridovich 1981a, Jakubovics und Jenkinson 2001). Die Radikalfänger-Aktivität von Zell-Extrakten von *Lactobacillus plantarum* ist hitzebeständig und wird durch Zusatz von 100 µM EDTA inaktiviert. Sie reduziert sich stetig mit sinkendem intrazellulärem Mangangehalt bei Kultivierung in manganarmen Nährmedien. Der Verlust der Radikalfänger-Aktivität beim Dialysieren kann durch Zusatz einer äquivalenten Menge Mangansulfat zum Zell-Extrakt wiederhergestellt werden. Die Anwendung von vier verschiedenen SOD-Assays mit unterschiedlichen O₂⁻-Produzenten und O₂⁻-Detektoren bestätigte diese Radikalfänger-Aktivität (Archibald und Fridovich 1981a). Diese Ergebnisse deuten alle darauf hin, dass die millimolaren Mangankonzentrationen bei *Lactobacillus plantarum* denselben Oxidationsschutz erzeugen wie mikromolare SOD-Enzyme, die in den meisten anderen Organismen vorliegen. Ein Überblick über verschiedene Gattungen von Milchsäurebakterien (Tab. 29) zeigt, dass bei aerotoleranten Arten entweder SOD oder ein hoher intrazellulärer Mangangehalt vorliegt, ansonsten sind die Organismen sehr sauerstoff-empfindlich (Archibald und Fridovich 1981b). Alle *Leuconostoc*- und *Pediococcus*-Arten hatten keine SOD, sondern einen hohen Mangangehalt. Dies könnte auf das Vorkommen auf

Pflanzenmaterial zurückzuführen sein, deren Chloroplasten viel Mangan enthalten. Der genaue Mechanismus der Radikalfänger-Aktivität von hohem intrazellulärem Mangan ist bisher noch unerforscht.

Gattung	O ₂ -Toleranz ^a	SOD	Hoher Mangan-Gehalt ^b	Weder SOD noch hoher Mangan-Gehalt
<i>Lactobacillus</i>	6 von 9 Arten	0 von 9 A.	7 von 9 Arten	2 von 9 Arten
<i>Streptococcus</i>	2 von 3 Arten	3 von 3 A.	0 von 3 Arten	0 von 3 Arten
<i>Aerococcus</i>	1 von 1 Art	1 von 1 A.	0 von 1 Art	0 von 1 Art
<i>Pediococcus</i>	3 von 3 Arten	0 von 3 A.	3 von 3 Arten	0 von 3 Arten
<i>Gemella</i>	1 von 1 Art	1 von 1 A.	0 von 1 Art	0 von 1 Art
<i>Leuconostoc</i>	3 von 3 Arten	0 von 3 A.	3 von 3 Arten	0 von 3 Arten

Tab. 29: Einteilung anhand von hohem intrazellulärem Mangan-Gehalt, SOD und Aerotoleranz bei Milchsäurebakterien. Modifiziert nach Archibald 1986.

^a = definiert als aerobe Agarplatten mit > 20% Wachstumsverlust nach 24 Stunden im Vergleich zu parallelen anaeroben Agarplatten.

^b = definiert als 2,0 mM intrazellulärer Mangan-Gehalt in komplexen Medien mit 330 oder 710 µm Mangan.

Da bei einigen Oenokokkenstämmen Mangan in einer Konzentration von 34 mM zur Erreichung einer optimalen Zelldichte im Kulturmedium angeboten werden muß, können sie möglicherweise Mangan nicht wie einige Milchsäurebakterien in den Zellen in dieser Konzentration anreichern und verwenden dieses analog zum Oxidationsschutz. Diese Vermutung erhärtet sich dadurch, dass der Transporter von *Lactobacillus plantarum* als P-Typ ATPase (MntA) mit einer bisher einzigartigen hohen Spezifität für Mangan identifiziert wurde (Hao et al. 1999). Das Transportsystem ist strukturell ausreichend konserviert um die Lokalisation der kodierenden Gene in sequenzierten bakteriellen Genomen zu ermöglichen. Die typischen Proteinsequenzen finden sich hierbei auch im Genom von *Oenococcus oeni* (Abb. 41).

Bei *Lactobacillus plantarum* wurde beobachtet, dass 80% des intrazellulären Mangans nicht dialysierbar waren, also in einer makromolekularen Speicherform vorliegen müssen. Die in diesem Bakterium vorliegenden Polyphosphat-Granula bieten sich aufgrund ihrer polyanionischen Natur als Speichermolekül für Mangan an. Dies bestätigte sich bei Versuchen, bei denen bei limitiertem Phosphatgehalt im Medium nur 5 - 7 mM anstelle von 30 - 35 mM Mangan angereichert wurden und bei limitiertem Mangangehalt auch keine Polyphosphat-Granula vorlagen (Archibald und Duong 1984). Eine ähnliche Speicherfunktion für unvermindertes Wachstum bei auftretendem Manganmangel wäre auch bei Oenokokken denkbar, da sie das Enzym Polyphosphatkinase besitzen, das die Bildung von Polyphosphat aus ATP katalysiert. Ausserdem wurde beobachtet, dass Mangan neben Kupfer und Zink die

<u>Ionenkanal-Domäne</u>		
MntA <i>L. plantarum</i>	I DAKALVVGD L ISL QV G SVIPA D IRVL TNP IYTDE SSI TG ESVA	151
<i>O. oeni</i> PSU-1	L PA TELV TG DIVLME A G D IVPAD L RRLIEAN S L K I EEA A L TG ES V P	174
Cu-ATPase <i>E. faecalis</i>	I A I DEVMID D IL VI RP G EQVPT D GRII AGTSALDESML TG ESVP	183
Mg-ATPase <i>S. typhimurium</i>	LP I DQLVPG D II KL AA G DMPAD L RRIIQARDLFVAQASL TG ESLP	222
<u>Phosphorylierungs-Domäne</u>		
MntA <i>L. plantarum</i>	ANL NLLL V D K T G T I T TNQPQV	304
<i>O. oeni</i> PSU-1	A K V D T L V F D K T G T L T E G N T A V	324
Cu-ATPase <i>E. faecalis</i>	AHLNS I IL D K T G T I T QGRPEV	437
Mg-ATPase <i>S. typhimurium</i>	GAMDIL CT D K T G T L T QDKIVL	389
<u>ATP-Bindungs-Domäne</u>		
MntA <i>L. plantarum</i>	AEVV P EN K LAI V KAM HRAGYVVGMT G D G V ND A P A L K QSEV	528
<i>O. oeni</i> PSU-1	A R V A P E H K V R I V N A W K K R G K V V A M T G D G V ND A P A L K T A D I	633
Cu-ATPase <i>E. faecalis</i>	AEVL P EE K ANYVEKLQKAGK K VGM V G D G I N D A P A L R L A D V	634
Mg-ATPase <i>S. typhimurium</i>	ARL T PM H K ER I VTL L KRE GHV V G F M G D G I N D A P A L R A A D I	658

Abb. 41: Konservative Sequenzen in MntA und anderen bakteriellen P-Typ ATPasen im Vergleich mit *Oenococcus oeni* PSU-1. Die drei vermutlichen funktionellen Domänen der P-Typ ATPase wurden verglichen. Identische Aminosäuren sind in allen Sequenzen rot markiert, die Sequenz von *Oenococcus oeni* PSU-1 blau. Modifiziert nach Altschul et al. (1997) und Hao et al. (1999).

L. plantarum = *Lactobacillus plantarum*, *E. faecalis* = *Enterococcus faecalis*, *S. typhimurium* = *Salmonella typhimurium*.

spontane ATP-Hydrolyse sowohl unter basischen als auch sauren Bedingungen beschleunigt, während Magnesium diese Reaktion beispielsweise verzögert (Bruice und Benkovic 1966). ATP wird leicht destabilisiert, während ADP stabilisiert wird, was auf die Interaktion von Mangan mit dem Adeninring zurückzuführen sein könnte, die mit Magnesium nicht eintritt. Möglicherweise übernimmt hierbei der hohe intrazelluläre Mangangehalt von 30 - 35 mM (Magnesiumgehalt: 5 - 6 mM) bei *Lactobacillus plantarum* und auch bei den Oenokokken eine Funktion.

Die Mangangehalte bei verschiedenen Rebsorten sind in den Blättern (0,67 mM bis 2,41 mM) am höchsten, in den Beerenhäuten und Kernen am niedrigsten. In Traubenmosten findet man Werte zwischen 4,7 µM bis 41,8 µM. Auf den Mangangehalt von Traubenmost und Wein hat der Boden und der Jahrgang einen deutlichen Einfluß. In nassen Jahren wird mehr Mangan in die Beeren eingelagert als in trockenen Jahren (Würdig und Woller 1989). Aus unseren Versuchen ist abzuleiten, dass der Mangangehalt im Most einen wichtigen Einfluß auf das Wachstum der Oenokokken im Wein und damit auf den biologischen Säureabbau sowie die

Aktivität von Oenokokken-Starterkulturen hat und in Kulturmedien bei einigen Oenokokken den Tomatensaft als Wachstumsstimulans vollständig ersetzen kann.

5.3 Die organischen Wachstumsfaktoren

5.3.1 Arabinose

Mittels semipräparativer HPLC-Auftrennung konnte aus dem Mangoschalen-Extrakt eine einzelne wachstumsfördernde Fraktion isoliert werden, in der ein Trisaccharid enthalten war (Kapitel 4.4.4). Es zeigte sich, dass aus diesem Trisaccharid, das in Fraktion 13 des Mangoschalen-Extraktes enthalten war, nur Arabinose wachstumsfördernd auf *Oenococcus oeni* Stamm B2 wirkte (Kapitel 4.4.4c). Polysaccharide sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet und spielen beim komplexen Aufbau der Zellwand höherer Pflanzen in Form von Cellulose und den sehr heterogen zusammengesetzten Hemicellulosen eine Rolle. Am Aufbau der Polysaccharide sind im Wesentlichen neun Monosaccharide beteiligt: D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose, L-Arabinose, D-Xylose, L-Rhamnose, L-Fucose, D-Galacturonsäure und D-Glucuronsäure (Tucker und Mitchell 1993).

Arabinosehaltige Saccharide stellen zum Beispiel Arabane und Arabinogalactane dar. Arabane kommen meist als Seitenketten von Pektinen vor und bestehen aus einer linearen α -(1 \rightarrow 5)-L-Arabinofuranose-Hauptkette. Über α -(1 \rightarrow 2)- und/oder α -(1 \rightarrow 3)-glycosidische Bindungen sind kurze L-Arabinofuranose-Seitenketten gebunden (Darvill et al. 1980). Schöppllein (1989) konnte aus Zuckerrüben ein Araban isolieren, das zu 61% aus Arabinose bestand. Villetaz und Amado (1981) isolierten aus Traubensaft ein nahezu reines α -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 5)-Arabane. Arabane sind aber auch typische Bestandteile von Beerenobstkolloiden. So handelt es sich bei löslichen Kolloiden aus Himbeersaft hauptsächlich um Arabinogalactane vom Typ II (= β -(1 \rightarrow 3)-D-Galactopyranosyl-Hauptkette mit verschiedenen Seitenketten aus α -(1 \rightarrow 6)-verknüpfter D-Galactose und α -(1 \rightarrow 3)-verknüpfter Arabinose unterschiedlicher Länge). Patz (1994) isolierte aus Himbeersaftkolloiden eine Polysaccharidfraktion, die neben geringen Anteilen an Rhamnose, Xylose und Glucose zu 50,5% aus Arabinose und 20,4% Galactose bestand. Hierbei sind die (1 \rightarrow 3) und (1 \rightarrow 5)-verknüpften Arabinosemoleküle über verzweigte Galactoseeinheiten an die Rhamnogalacturonanhauptkette gebunden. Das Polymer wird von einer Art „Arabinose-Pelz“ umschlossen, der die Galacturonsäurereste gegenüber pektinspaltenden Enzymen abschirmt.

Auch aus Wein und aus Solanaceengewächsen wie der Tomate sind arabinosehaltige Poly- und Oligosaccharide bekannt (Brillouet et al. 1990, York et al. 1996). Durch α -L-Arabinofuranosidase werden während der Reifung aus der Zellwand der Tomate terminale Arabinose- und Glycokonjugatreste freigesetzt (Sozzi et al. 2002).

Das aus der Mangoschale isolierte wachstumsfördernde Trisaccharid entstand wahrscheinlich ebenso während der Reifung der Mango aus solchen arabinosehaltigen Polysacchariden. Es ist bekannt, dass der Texturverlust von Früchten während der Reifung mit dem Abbau von Zellwandpolymeren wie z. B. Pektin und Hemicellulosen einhergeht (Gross und Sams 1984, Muda et al. 1995). Brinson et al. (1988) analysierten den Zuckergehalt in Zellwänden der Mango (Kulturvarietät Ngowe) und stellten einen Verlust von Arabinosyl-, Galactosyl- und Galacturonylresten während der Reifung fest. Später untersuchten Mitcham und McDonald (1992) Zellwandänderungen in Mangos der Kulturvarietäten Keitt und Tommy Atkins. Auch hier zeigte sich in beiden Fällen eine reifungsassoziierte Zunahme in löslichem Pektin und eine Abnahme von Arabinosyl-, Rhamnosyl- und Galactosylresten. Möglicherweise differieren diese Abbau-Produkte bei verschiedenen Kulturvarietäten wie der in dieser Arbeit verwendeten Mangovarietät „Haden“ auch leicht, worüber bisher allerdings sehr wenige Studien vorliegen (Lizada 1991). Prasanna et al. (2003, 2004) ist es gelungen durch Auftrennung der Polysaccharide der Mango mittels Ionenaustauschchromatographie an DEAE/Cellulose einzelne Strukturen zu identifizieren: Es handelte sich um ein α -(1→5)-L-Arabinofuranan, das mit der β -(1→4)-D-Galacturonsäure-Hauptkette durch (1→3)-Bindungen verknüpft war (Galactose:Arabinose = 3:1) sowie um zwei Rhamnogalacturonane. Es ist also durchaus plausibel, dass ein Trisaccharid der detektierten Zusammensetzung Rhamnose, Arabinose und Glucose bei der Reifung in größerer Menge entsteht. Dies wird auch durch die Zuckerzusammensetzung der Zellwandsaccharide der Mango (Tab. 30) und deren Abnahme an Menge und Molekulargewicht bekräftigt (Abb. 42).

Proben	Gesamt-zucker [%]	GalA [%]	Rha [%]	Ara [%]	Xyl [%]	Gal [%]	Glc [%]
unreife Mango	82,7	23,6	3,4	20,9	1,5	28,9	3,6
reife Mango	98,0	24,4	6,3	25,8	1,7	31,7	3,3

Tab. 30: Zuckerzusammensetzung der Zellwandsaccharide der Fraktion 2 von reifen und unreifen Mangos nach Auftrennung an DEAE-Cellulose. Modifiziert nach Yashoda et al. 2005. GalA = Galacturonsäure, Rha = Rhamnose, Ara = Arabinose, Xyl = Xylose, Gal = Galactose, Glc = Glucose.

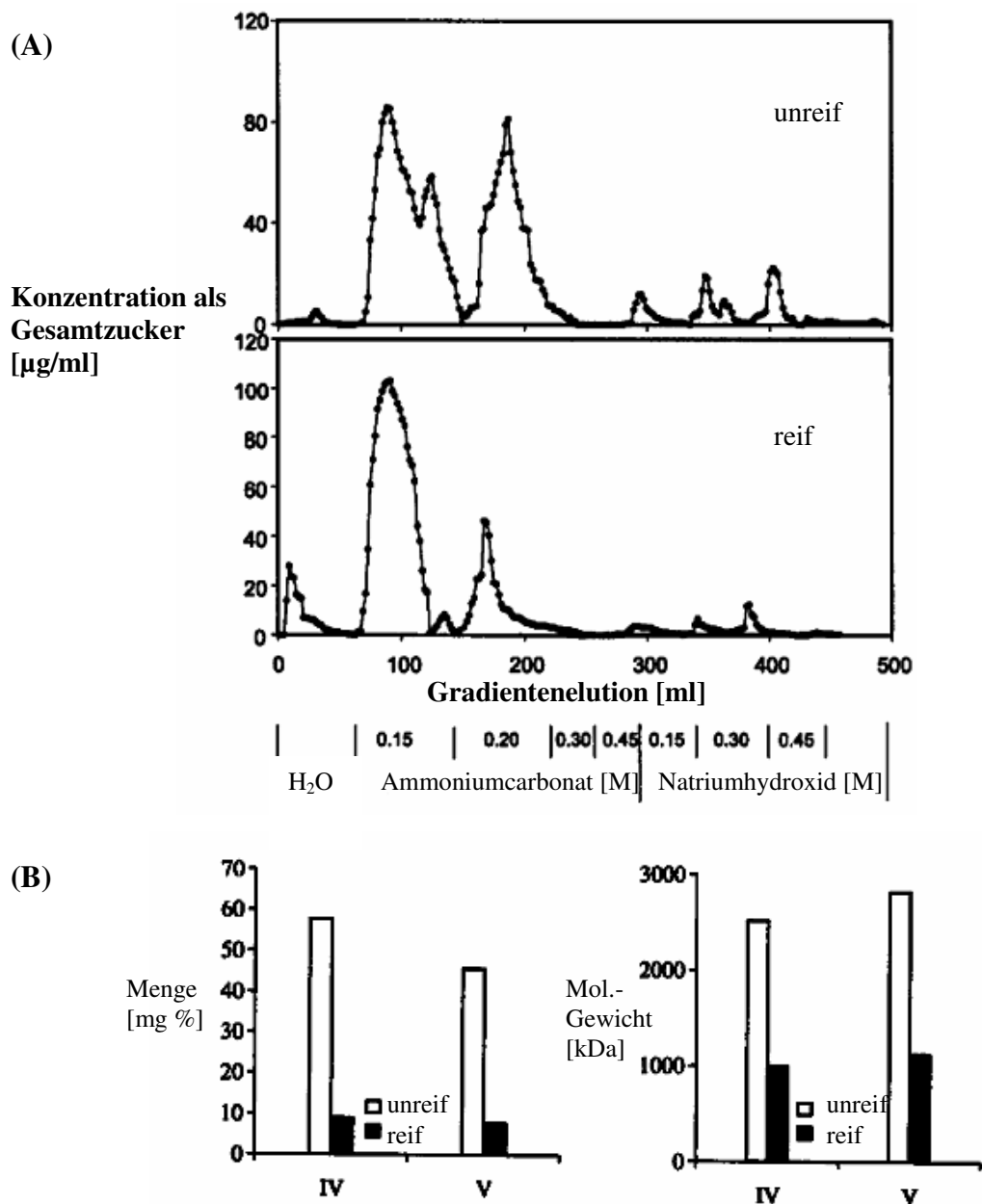


Abb. 42: (A) DEAE/Cellulose-Profil der Zellwandpolysaccharide von reifen und unreifen Mangos. (B) Änderungen der Menge und des Molekulargewichtes der hemicellulolytischen Fraktionen von reifen und unreifen Mangos. Modifiziert nach Yashoda et al. 2005.

Eventuell ist also das Vorkommen von Oenokokken auf der Oberfläche von beispielsweise Früchten auf deren Arabinosegehalt in den Zellwänden und –säften zurückzuführen. Durch Verletzungen der Früchte bei der mechanischen Ernte oder beim Transport tritt Zellsaft aus und bildet ein ideales Substrat für die Vermehrung von Bakterien. So findet man in Weinen 0,5 - 1,3 g/l freie Arabinose (Würdig und Woller 1989). Rotweine enthalten hierbei höhere Anteile an Pentosen als Weißweine, dasselbe gilt für Pressweine. Diese Tatsache rührt daher, dass die festen Traubenbestandteile wie schalen und Stielgerüst höhere Pentosegehalte

aufweisen als der Most. Gehalte über 2 g/l deuten auch auf den Zusatz von Obstwein hin. Bei vom Schimmelpilz *Botrytis cinerea* befallenen Trauben konnten in daraus gepressten Mosten sogar häufig erhöhte Arabinosegehalte bis ca. 6 g/l nachgewiesen werden (Dittrich et al. 1976). Die im Laufe der Reifung entstehenden Oligosaccharide können möglicherweise gegenüber der freien Arabinose durch entsprechende Oligosaccharidtransporter sogar noch verbessert aufgenommen werden kann, während die in Polysacchariden wie z. B. Arabinogalactanen enthaltene Arabinose aufgrund der fehlenden benötigten Enzyme nicht verwertet werden kann. Entsprechende Untersuchungen bei Milchsäurebakterien ergaben bereits, dass die Aufnahmesysteme für Oligosaccharide und Glykoside die Aufnahmesysteme für freie Zucker im zahlenmäßigen Vorkommen bei weitem übertreffen (Makarova et al. 2006). Bei *Lactobacillus acidophilus* werden z. B. die hauptsächlich in Fruchtgemüse vorkommenden Fructooligosaccharide, die spezifisch das Wachstum probiotischer Bakterien fördern, mittels ABC-Transporter (eine Klasse von Membranproteinen, die als gemeinsames Strukturelement eine ATP-bindende Kasette [*ATP binding cassette*, ABC] besitzen und spezifische Substrate aktiv über eine Zellmembran transportieren) aufgenommen und nachfolgend hydrolysiert. Die einzelnen Zucker stehen dann für den Stoffwechsel zur Verfügung (Barrangou et al. 2006). Die freigesetzte Arabinose aus dem Trisaccharid des Mangoschalen-Extraktes könnte dann analog von *Oenococcus oeni* neben Glucose und Fructose in den Pentosephosphatweg eingebracht und verwertet werden. Die Arabinose würde dabei zuerst durch Arabinose-Isomerase zu Ribulose umgesetzt, die wiederum durch Ribulokinase in Ribulose-5-Phosphat umgewandelt wird. Aus dieser entstünde letztendlich durch Ribulose-5-phosphat-4-epimerase Xylulose-5-Phosphat, das in den Pentosephosphatweg eingeht. Alle diese Enzyme sind bei *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 vorhanden (DOE Joint Genom Institute, US Department of Energy, Office of Science: <http://img.jgi.doe.gov>). Eine weitere Verwertungsmöglichkeit wäre die Reduktion von Arabinose zu Arabitol unter Reoxidation von NADH. Dazu müsste das Enzym Arabinose-Reduktase vorhanden sein. Dieses wurde bislang noch nicht bei *Oenococcus oeni* identifiziert, bei *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 werden jedoch durch Genomvergleiche sechs Aldo/Keto-Reduktasen vorhergesagt, die diese Funktion wahrnehmen könnten. Die dabei bewerkstelligte Bildung von NAD⁺, das für die Oxidation von Glucose-6-phosphat benötigt wird, könnte die Limitierung des Ethanolweges umgehen und somit eine Alternative zum Erythritweg darstellen, bei dem unter anderem die unerwünschte Essigsäure als Produkt entsteht.

5.3.2 Cystein

Die positive Wirkung von schwefelhaltigen Aminosäuren wie Cystein (Garvie 1984) und Glutathion auf das Wachstum von *Oenococcus oeni* ist bereits bekannt, allerdings in erheblich geringeren Konzentrationen von 20 mg/l (Rauhut et al. 2004). Auch hier scheint es Unterschiede zwischen den verwendeten *Oenococcus oeni*-Stämmen zu geben. Zu einer hohen Konzentration von 1,5 g/l Cystein, die bei Stamm B2 für die größte Zelldichte sorgte, liegen bislang keine Untersuchungen vor, da das Cystein direkt zum Most zugegeben wurde und durch den Stoffwechsel schwefelig riechende Verbindungen entstehen könnten, die den Wein sensorisch negativ beeinflussen. Der Zusatz einer solchen Menge Cystein in einer Vorkultur zum Anzüchten einer möglichst großen Zellmasse an Oenokokken sollte jedoch problemlos sein. Zum Isolieren von *Leuconostoc spp.* aus Gemüsen, von denen sich 40 % als *Leuconostoc oenos* erwiesen, wurde bereits ein Medium mit einem Zusatz von 0,5 g/l Cystein verwendet (Benkerroum et al. 1993).

Die Thiolgruppe des Cysteins könnte bei aeroben Oenokokken-Kulturen durch Kombination mit Sauerstoff die sauerstoffbedingte Hemmung der Enzyme Alkoholdehydrogenase und Acetaldehyddehydrogenase des Ethanolweges vermeiden. Dadurch wäre eine erhöhte Glucoseverwertung analog anaeroben Bedingungen wie sie von Maicas et al. (2002) in Konzentrationen bis sogar 30 mM Cystein festgestellt wurde und somit ein verbessertes Bakterienwachstum möglich. Daneben könnte Cystein mit Pantothersäure zur Synthese von Coenzym A verwendet werden, das zur Funktion von Acetaldehyddehydrogenase gebraucht wird. Eine weitere positive Beeinflussung des Oenokokken-Wachstums stellt eventuell die Metabolisierung von Cystein über Pyruvat zu Acetat dar, wie sie bereits für andere Milchsäurebakterien beschrieben ist (Bruinenberg et al. 1997), durch Reoxidation zwei zusätzliche Moleküle NAD^+ sowie ein zusätzliches Molekül ATP gewonnen werden.

5.3.3 Polyphenole

Bestimmte polyphenolische Substanzen aus beispielsweise Tomatenhaut-Extrakt sowie rotem und weißem Traubensaft hatten ebenfalls einen wachstumsfördernden Einfluß auf *Oenococcus oeni*, wie insbesondere nach Behandlung dieser Säfte mit PVPP deutlich wurde (Abb. 17; Theobald et al. 2005). Das Fehlen dieser Stoffe in Eluat 1 der Kationentauscher-SPE vom aufkonzentrierten Fruchtfleischsaft der Tomate (Kapitel 3.6.2 und 4.3.1) könnte den noch vorhandenen Extinktionsunterschied zur verwendeten Probe erklären (Abb. 13). Bisher

waren phenolische Substanzen aus Trauben wie beispielsweise Hydroxyzimtsäuren (Reguant et al. 2000, Salih et al. 2000) oder Tannine (Vivas et al. 2000) eher als Hemmstoffe für das Wachstum von *Oenococcus oeni* bekannt. Lediglich für Malvidin-3,5-diglucosid liegen Hinweise auf eine mögliche Wachstumsförderung vor (Rozes et al. 2003), die sich aber unter den in dieser Arbeit verwendeten Oenokokkenstämmen und Kultivierungsbedingungen nicht bestätigten. Der wachstumsfördernde Effekt von Gallussäure unter anaeroben Bedingungen (Vivas et al. 1997) konnte unter Luftzufuhr nicht bestätigt werden (Reguant et al. 2000, Campos et al. 2003). Eventuell sind die phenolischen Substanzen in Fruchtsäften und Schalenextrakten weniger oxidationsempfindlich und dadurch auch bei aeroben Kulturen wirksam. Polyphenolische Substanzen könnten zum Beispiel als komplexbildende Agentien für Mineralstoffe wie das wachstumsfördernde Mangan wirken und somit deren Aufnahme in *Oenococcus oeni* erleichtern.

Bislang konnte nur EGCG aus grünem Tee als wachstumsbeeinflussendes Polyphenol identifiziert und somit genaueren Untersuchungen unterzogen werden. EGCG zeigte in Abhängigkeit von der Konzentration einen hemmenden (>600 mg/l EGCG) als auch einen stimulierenden Effekt (400 – 500 mg/l EGCG) auf das Wachstum des *Oenococcus oeni* Stammes B2. Diese Konzentrationen korrelierten auch mit der verwendeten Catechinmischung. Dennoch konnte bei der Catechinmischung kein hemmender Effekt bei Konzentrationen von 621 - 724 mg/l EGCG festgestellt werden, sodass auch ein Einfluss der Minorkomponenten Epicatechingallat (ECG) und Gallocatechingallat (GCG) in Erwägung gezogen werden kann. Da die Konzentration der einzelnen Catechine in Trauben unterhalb 30 mg/kg liegt (Herrmann 2001) sollte ihr Einfluss auf das Oenokokkenwachstum während der Weinherstellung gering sein. Ein möglicher synergistischer Effekt der verschiedenen Catechine wäre noch zu untersuchen.

Die Wirkung von EGCG auf das Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2 beruhte jedoch nicht auf der Funktion als möglicher Mangantransporter. Auch die Funktion als Antioxidans kommt nicht als alleiniger Mechanismus für die Wachstumssteigerung in Frage, da die gemessene ΔOD_{546nm} zu gering war. Ebenso war in einem ABTS⁺-Assay (Pellegrini et al. 1997) keinerlei Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität der getesteten Substanzen und der erzielten Wachstumssteigerung erkennbar (Daten nicht gezeigt). So wies z. B. das starke Antioxidans OPC (oligomere Proanthocyanidine) keinen Effekt auf *Oenococcus oeni* Stamm B2 auf. In oxidativem wässrigen Milieu bildet ABTS⁺ ein stabiles, grün gefärbtes Radikalkation, das bei 734 nm photometrisch gemessen werden kann. Je mehr Antioxidantien

in der Probelösung enthalten sind, umso geringer fällt die Extinktion aus. Eine weitere Möglichkeit für die gezeigte Wirkung auf das Wachstum von *Oenococcus oeni* Stamm B2 stellt die bekannte Wechselwirkung von EGCG mit einigen Enzymen (Rodriguez-Caso et al. 2003, Zhang und Rock 2004) dar, die bei Oenokokken noch untersucht werden muss. Aufgrund des schmalen Konzentrationsbereiches und der Instabilität unter aeroben Bedingungen kann EGCG jedoch nicht als Wachstumsstimulans für *Oenococcus oeni* in säurereichen Weinen empfohlen werden. Möglicherweise kann die Verwendung von Schwefeldioxid zur Verhinderung einer spontanen Malolaktatfermentation in säurearmen Weinen aber durch Kombination mit EGCG reduziert werden. Hierbei hätte EGCG gegenüber anderen hemmenden phenolischen Substanzen den Vorteil, dass es im Geschmack wenig bitter und adstringierend ist und auch viele positive Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit hat (Dahlem und Freiburg 2000, Zhen et al. 2002, Zittlau, 2005).

6. Ausblick

Für zukünftige weitere Arbeiten an diesem Thema wäre insbesondere die Aufklärung der biologischen Funktionen der gefundenen Wachstumsfaktoren Mangan, Arabinose und Cystein von Interesse, zu denen hier in der Diskussion einige Anregungen und Möglichkeiten gegeben wurden. Auch die Aufklärung der Doppelfunktion von EGCG sowohl als Hemmstoff als auch Wachstumsfaktor stellt eine weiterführende Forschungsmöglichkeit dar.

Das aus dem Zitronenmesokarp-Extrakt erfolgreich isolierte arabinosehaltige wachstumsfördernde Disaccharid kann nach der beschriebenen Methode in größerer Menge isoliert werden, um nachfolgend die genaue Identifizierung mittels speziellen NMR-Techniken analog dem bereits identifizierten Trisaccharides aus Mangoschalen-Extrakt zu ermöglichen.

Unter Zusatz der optimalen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren Mangan, Arabinose und Cystein kann versucht werden, die im vorgeschlagenen Medium für Oenokokken mit hohen Nährstoffansprüchen noch enthaltenen komplexen Bestandteile Trypton aus Casein und Pepton aus Fleisch mittels beispielsweise Casaminsäuren zu ersetzen, sodass man ein rein synthetisches Medium erhalten könnte.

Auch die Identifizierung der zum Wachstum des Stammes B2 benötigten Polyphenole aus Tomatensaft stellt eine Fortführungsmöglichkeit dieser Arbeit dar. Allerdings ist die durch die Polyphenole bewirkte OD-Erhöhung von 0,2 in der stationären Phase recht niedrig und fast alle getesteten Oenokokken-Stämmen benötigen die Polyphenole neben den bereits identifizierten Wachstumsfaktoren nicht mehr. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die erzielten OD-Unterschiede bei Verteilung auf mehrere Polyphenole kaum noch signifikant von der Fehlergrenze bei Messung der Extinktion in Reagenzgläsern und Microtiterplatten unterscheiden würden. Denkbar ist auch, dass die Polyphenole nach analytischer Isolierung als Einzelsubstanz gar keine Wirkung auf das Oenokokken-Wachstum zeigen. Dies wäre zum Beispiel der Fall wenn sie als Chelat-Komplexbildner zur verbesserten Aufnahme von Mineralstoffen wie Mangan dienen. Dann müssten die erhaltenen HPLC-Fractionen teilweise wiedervereint werden, was die aufgrund der Vielfalt an ähnlichen Strukturen ohnehin schwierige Polyphenol-Analytik weiter verkompliziert.

7. Veröffentlichungen

Aus der vorliegenden Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor.

Publikationen:

1. Theobald, S., Pfeiffer, P. und König, H.: Wachstumsfördernde Substanzen aus Fruchtsäften und Blattextrakten für das weinrelevante Bakterium *Oenococcus oeni*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 101: 286-293 (2005).
2. Theobald, S., Pfeiffer, P. und König, H.: Manganese-dependent growth of oenococci. Journal of Wine Research 16: 171-178 (2005).
3. Theobald, S., Pfeiffer, P. und König, H.: Hoher Manganbedarf von Oenokokken. Einfluß auf den biologischen Säureabbau? Deutsches Weinbau Jahrbuch 2006: 190-197.
4. Theobald, S., König, H., Paululat, T., Gerlitz, M. und Pfeiffer, P.: Neue Hinweise für synergistische Wachstumsfaktoren zur erfolgreichen Kultivierung des weinrelevanten Bakteriums *Oenococcus oeni*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 103: 411-416 (2007).
5. Theobald, S., Pfeiffer, P. und König, H.: Nährstoffansprüche von Wein-relevanten malolaktischen Milchsäurebakterien. Gibt es den „Tomatensaft-Faktor“? Deutsches Weinbau Jahrbuch 2007: 169-176.
6. Theobald, S., Pfeiffer, P., Zuber, U. und König, H.: Influence of epigallocatechin gallate and phenolic compounds from green tea on the growth of *Oenococcus oeni*. Journal of Applied Microbiology 104: 566-572 (2007).

Posterpräsentationen und Vorträge:

1. Theobald, S., Pfeiffer, P. und König, H.: Identifizierung von Wachstumsfaktoren für Oenokokken aus Tomatensaft. GDCh-Jahrestagung Chemie, München 2003.
2. Theobald, S., Pfeiffer, P., Fröhlich, J., Hirschhäuser, S. und König, H.: *Oenococcus oeni*: Biologischer Säureabbau im Wein. 6. Fachsymposium der DGHM-Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie, Suhl 2004.
3. Theobald, S., Pfeiffer, P. und König, H.: Wachstumsfördernde Substanzen aus Fruchtsäften und Blattextrakten für das weinrelevante Bakterium *Oenococcus oeni*. 2. Gemeinsamer Kongress der DGHM und VAAM, Göttingen 2005.
4. Theobald, S., Pfeiffer, P. und König, H.: Wachstumsstimulierung bei Oenokokken. 8. Fachsymposium der DGHM-Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie, Suhl 2006.

8. Literaturverzeichnis

- Alam, M. S., Chopra, N. und Pillai, K. K.:** Anti-inflammatory activity of *Vitis elongata*. J. Ethnopharmacol. 48, 59-60 (1995).
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J.:** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997).
- Amachi, T., Imamoto, S. und Yoshizumi, S.:** A growth factor for malo-lactic fermentation bacteria. Part II: Structure and synthesis of a novel pantothenic acid derivative isolated from tomato juice. Agric. Biol. Chem. 35, 1222-1230 (1971).
- Amachi, T. und Yoshizumi, H.:** Studies on the bacteria isolated from wine. Part V: Isolation and properties of the growth factor from tomato juice for a bacterium inducing malo-lactic fermentation. Agric. Biol. Chem. 33, 139-146 (1969).
- Archibald, F.:** Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 13, 63-109 (1986).
- Archibald, F. und Duong, M. N.:** Manganese acquisition by *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. 158, 1-8 (1984).
- Archibald, F. und Fridovich, I.:** Manganese and defences against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. 145, 442 (1981a).
- Archibald, F. und Fridovich, I.:** Manganese, superoxide dismutase and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. J. Bacteriol. 146, 928 (1981b).
- Barrangou, R., Azcarate-Peril, M. A., Duong, T., Connors, S. B., Kelly, R. M. und Klaenhammer, T. R.:** Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microassays. Proc. Nat. Acad. Sci. 103, 3816-3821 (2006).

- Bauer, O.:** Einflüsse von Starterkulturen verschiedener Milchsäurebakterien auf die Qualität von Rotweinen unter Praxisbedingungen. Diplomarbeit an der Fachhochschule Wiesbaden (1992).
- Belitz, H. D. und Grosch, W.:** Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4.Aufl., Springer-Verlag, Berlin (1992).
- Benkerroum, N., Misbah, M., Sandine, W. E. und Elaraki, A. T.:** Development and use of a selective medium for isolation of *Leuconostoc spp.* from vegetables and dairy products. Appl. Environ. Microbiol. 59, 607-609 (1993).
- Bergner, K. G. und Lemperle, E.:** Weinkompodium. 2.Aufl., Hirzel Verlag, Stuttgart (1998).
- Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H. und Berset, C.:** Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. J. Agric. Food Chem. 46, 2123-2129 (1998).
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F. und Kunkee, R. E.:** Principles and Practices of Winemaking, Chapman & Hall, New York (1996).
- Bousbouras, G. E. und Kunkee, R. E.:** Effect of pH on malo-lactic fermentation in wine. Am. J. Enol. Vitic. 22: 121-126 (1971).
- Brillouet, J. M., Bosso, C. und Moutounet, M.:** Isolation, purification, and characterization of an arbinogalactan from a red wine. Am. J. Enol. Vitic. 41, 29-36 (1990).
- Brinson, K., Dey, P., John, M. und Pridham, J.:** Postharvest changes in *Mangifera indica* L. mesocarp cell walls and cytoplasmic polysaccharides. Phytochemistry 27, 719-723 (1988).
- Bruice, T. C. und Benkovic, S.:** Bioorganic Mechanisms Vol. 2, W. A. Benjamin, New York (1966).
- Bruinenberg, P. G., de Roo, G. und Limsowtin, K. Y.:** Purification and characterization of cystathione γ -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11: possible role in

- flavour compound formation during cheese maturation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 561-566 (1997).
- Campos, F. M., Couto, J. A. und Hogg, T. A.:** Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *J. Appl. Microbiol.* 94, 167-174 (2003).
- Caspritz, G. und Radler, F.:** Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties, and distribution among bacteria. *J. Biol. Chem.* 258, 4907-4910 (1983).
- Chu-Ky, S., Tourdot-Marechal, R., Marechal, P. A. und Guzzo, J.:** Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochim. Biophys. Acta* 1717: 118-124 (2005).
- Conte, A., Sinigaglia, M. und Del Nobile, M. A.:** Use of lemon extract to inhibit the growth of malolactic bacteria. *J. Food Prot.* 70: 114-118 (2007).
- Costantini, A., Cersosimo, M., Del Prete, V. und Garcia-Moruno, E.:** Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *J. Food Prot.* 69: 391-396 (2006).
- Coton, E., Rollan, G. C., Bertrand, A. und Lonvaud-Funel, A.:** Histamine-producing lactic acid bacteria in wines; early detection frequency and distribution. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 199-204 (1998).
- Coucheney, F., Gal, L., Beney, L., Lherminier, J., Gervais, P. und Guzzo, J.:** A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochim. Biophys. Acta* 1720: 92-98 (2005).
- Dahlem, P. und Freiburg, G.:** Das große Buch vom Tee. Moewig Verlag, Rastatt (2000).
- Darvill, A., McNeil, M., Albersheim, P. und Delmer, D. P.:** The primary cell wall of flowering plants. *The biochemistry of plants Vol. 1*, 91-162, The Plant Cell Academic Press, New York (1980).

- Da Silveira, M. G., Baumgartner, M., Rombouts, F. M. und Abee, T.:** Effect of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2748-2755 (2004).
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H. und Fleet, G. H.:** Practical implications of malolactic fermentation: a review. Am. J. Enol. Vitic. 36: 290-301 (1985).
- De Angelis, M. und Gobbetti, M.:** *Lactobacillus sanfranciscensis* CBI: manganese, oxygen, superoxide dismutase and metabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 358-363 (1999).
- Deibel, R. H. und Seeley, H. W.:** Family II. Streptococcaceae fam. nov. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 3rd edition: 490-517 (1974).
- De Man, J. C., Rogosa, M. und Sharpe, M. R.:** A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23, 130-135 (1960).
- Dicks, L. M. T., Dellaglio, F., und Collins, M. D.:** Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. Int. J. System. Bacteriol. 45, 395-397 (1995).
- Dicks, L. M. T., van Vuuren, H. J. J. und Dellaglio, F.:** Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions and DNA-DNA hybridizations. Int. J. System. Bacteriol. 40, 83-91 (1990).
- Dittrich, H. H.:** Mikrobielle Weinqualitätsminderungen. 2. Aufl. Mikrobiologie des Weines, Ulmer Verlag, Stuttgart: 258-275 (1987).
- Dittrich, H. H. und Großmann, M.:** Mikrobiologie des Weines, 3. Aufl., Ulmer Verlag, Stuttgart (2005).
- Dittrich, H. H., Wedler, A. und Sponholz, W. R.:** Über seltene Zucker in Mosten aus gesunden und *Botrytis*-infizierten Traubenbeeren, wie in daraus gewonnenen Weinen. Wein-Wiss. 31, 25-31 (1976).
- Eder, R. und Glatt, J.:** Weinfehler – Erkennen, Vermeiden, Beheben. Ulmer Verlag, Stuttgart (2000).

- Efthymiou, C. J. und Joseph, S. W.:** Difference between manganese ion requirements of pediococci and enterococci. *J. Bacteriol.* 112, 627 (1972).
- Endo, A. und Okada, S.:** *Oenococcus kitaharae* sp. nov., non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2345-2348 (2006).
- Ethiraj, S. und Suresh, E. R.:** A note on the occurrence of *Leuconostoc oenos* as a spoilage organism in canned mango juice. *J. Appl. Bacteriol.* 59, 239-242 (1985).
- Fraser, P. D., Truesdale, M. R., Bird, C. R., Schuch, W. und Bramley, P. M.:** Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (Evidence for tissue-specific gene expression). *Plant Physiol.* 105, 405-413 (1994).
- Friedman, M.:** Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5751-5780 (2002).
- Fugelsang, K. C.:** Malolactic fermentation. In: *Wine microbiology*, Chapman & Hall Verlag, New York (1997).
- Garvie, E. I.:** The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. *J. Gen. Microbiol.* 48, 439-447 (1967).
- Garvie, E. I.:** Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *Methods Microbiol.* 16, 147-178 (1984).
- Garvie, E. I.:** Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198^{AL} emend. mut. char. Hucker and Pederson 1930, 66^{AL}. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe und J. G. Holt (Eds.), The Williams and Wilkins co., Baltimore (1986).
- Garvie, E. I. und Farrow, J. A. E.:** The differentiation of *Leuconostoc oenos* from non-acidophilic species of *Leuconostoc*, and the identification of five strains from the American Type Culture Collection. *Am. J. Enol. Vitic.* 31, 154-157 (1980).

- Garvie, E. I. und Mabbitt, L. A.:** Stimulation of the growth of *Leuconostoc oenos* by tomato juice. Arch. Microbiol. 55, 398-407 (1967).
- Giannakopoulos, P. I., Markakis, P. und Howell, G. S.:** The influence of malolactic strain on the fermentation on wine quality of three Eastern red wine grape cultivars. Am. J. Enol. Vitic. 35: 1-4 (1984).
- Gorinstein, S., Zachwieja, Z., Folta, M., Barton, H., Piotrowicz, J., Zemser, M., Weisz, M., Trakhtenberg, S. und Martin-Belloso, O.:** Comparative content of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples. J. Agric. Food Chem. 49, 952-957 (2001).
- Groot, M. N. N. und de Bont, J. A. M.:** Involvement of manganese in conversion of phenylalanine to benzaldehyde by lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5590-5593 (1999).
- Gross, K. und Sams, C.:** Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. Phytochemistry 23, 2457-2461 (1984).
- Guerrini, S., Bastianini, A., Granchi, L. und Vincenzini, M.:** Effect of oleic acid on *Oenococcus oeni* strains and malolactic fermentation in wine. Current Microbiol. 44, 5-9 (2001).
- Guzzo, J., Jobin, M. P., Delmas, F., Fortier, L. C., Garmyn, D., Tourdot-Marechal, R., Byong, L. und Divies, C.:** Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as function of environmental changes and growth phase. Int. J. Food Microbiol. 55, 27-31 (2000).
- Hao, Z., Chen, S. und Wilson, D. B.:** Cloning, expression and characterization of cadmium and manganese uptake genes from *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4746-4752 (1999).
- Herrmann, K.:** Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse. Ulmer Verlag, Stuttgart (2001).

- Imamoto, S., Amachi, T. und Yoshizumi, H.:** Syntheses of some derivatives of glycosyl pantothenic acids, analogues of the growth factor for MLF bacteria. *Agr. Biol. Chem.* 37, 545-551 (1973).
- Imbert, M. und Blondeau, R.:** On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr. Microbiol.* 37, 64-66 (1998).
- Irrmann, R.:** Tentative of standardization of biologic controls of lactic-acid bacteria in wine. In: E. Lemperle und J. Frank (Hrsg.): Proceedings of the 5th International Oenological Symposium, S. 299-308, International Association of Modern Winery and Technology Management (1978).
- Jakob, L., Hamatschek, J. und Scholten, G.:** Weinfehler. In: *Der Wein*, 10. Auflage: 170-186 (1997).
- Jakubovics, N. S. und Jenkinson, H. F.:** Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology* 147, 1709-1718 (2001).
- Kim, J. W. und Rajagopal, S. N.:** Isolation and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiol. (Praha)* 45, 29-34 (2000).
- Konings, W. N., Lolkema, J. S., Bolhuis, H., van Veen, H. M., Poolman, B. und Driessen, A. J. M.:** The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 117-128 (1997).
- Kosar, M., Küpeli, E., Malyer, H., Uylaser, V., Türkben, C. und Baser, K. H.:** Effect of brining on biological activity of leaves of *Vitis vinifera L.* (Cv. Sultani cekirdeksiz) from Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4596-4603 (2007).
- Krieger, S.:** Lenkung des biologischen Säureabbaus bei Weisswein und Rotwein. *Schweiz. Z. Obst. Weinbau* 21, 554-556 (2002).
- Kuicken, K. A., Norman, W. H., Lyman, C. M., Hale, F. und Blotter, L.:** The microbiological determination of amino acids. *J. Biol. Chem.* 151: 615-626 (1943).

- Kuskoski, E. M., Vega, J. M., Rios, J. J., Fett, R., Troncoso, A. M. und Asuero, A. G.:** Characterization of anthocyanins from the fruits of baguacu (*Eugenia umbelliflora* Berg). J. Agric. Food Chem. 51: 5450-5454 (2003).
- Labarre, C., Guzzo, J., Cavin, J. F. und Divies, C.:** Cloning and characterization of the genes encoding the malolactic enzyme and the malate permease of *Leuconostoc oenos*. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1274-1282 (1996).
- Lambert, P. A. und Hammond, S. M.:** Potassium fluxes, first indication of membrane damage in microorganisms. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54: 796-799 (1973).
- Landete, J. M., Ferrer, S. und Pardo, I.:** Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? J. Appl. Microbiol. 99: 580-586 (2005).
- Lemperle, E. und Kerner, E.:** Identifizierung und Beurteilung von Trübungen und Ausscheidungen im Wein. Dt. Weinb. 37, 96-108 (1982).
- Leontowicz, M., Gorinstein, S., Leontowicz, H., Krzeminski, R., Lojek, A., Katrich, E., Ciz, M., Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Haruenkit, R. und Trakhtenberg, S.:** Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. J. Agric. Food Chem. 51, 5780-5785 (2003).
- Liu, S. O., Pritchard, G. G., Hardman, M. J. und Pilone, G. J.:** Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway. J. Appl. Bacteriol. 81: 486-492 (1996).
- Lizada, M.:** Postharvest physiology of the mango – a review. Acta Hort. 219, 437-453 (1991).
- Lonvaud-Funel, A.:** Lactic acid bacteria and the quality improvement and depreciation of wine. System. Antonie van Leeuwenhoek 76, 317-331 (1999).

- Lonvaud-Funel, A. und Joyeux, A.:** Antagonism between lactic acid bacteria of wines: inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. Food Microbiol. 10, 411-419 (1993).
- Lothar, A. M.:** Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* for alcoholic and malolactic fermentation in continuous winemaking, Dissertation, University of Georgia, Athen (1999).
- Loubiere, P., Salou, P., Leroy, M. J., Lindley, N. D. und Pareilleux, A.:** Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. J. Bacteriol. 174, 5302-5308 (1992).
- Lu, Z., Fleming, H. P., McFeeters, R. F. und Yoon, S. A.:** Effects of anions and cations on sugar utilization in cucumber juice fermentation. J. Food Sci. 67, 1155-1161 (2002).
- Lüthi, H. und Vetsch, U.:** Mikroskopische Beurteilung von Weinen und Fruchtsäften in der Praxis. 2.Aufl. Heller Chemie- und Verw. Ges., Schwäbisch Hall (1981).
- Maicas, S., Ferrer, S. und Pardo, I.:** NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. Microbiology 148, 325-332 (2002).
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N. und weitere:** Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. 103, 15611-15616 (2006).
- Mangani, S., Guerrini, S., Granchi, L. und Vincenzini, M.:** Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. Curr. Microbiol. 51: 6-10 (2005).
- Matissek, R., Schnepel, F. M., Steiner, G.:** Lebensmittelanalytik, Springer Verlag Berlin (1992).
- Metcalf, D., Hucker, G. J. und Carpenter, D. C.:** A growth factor in certain vegetable juices. J. Bacteriol. 51: 381-384 (1946).
- Mickle, F. L.:** *Lactobacillus lycopersici* n. sp.; the causative organism of the gaseous fermentation of tomato pulp and related products. Abstr. Bacteriol. 8: 403-404 (1924).

- Mickle, F. L. und Breed, R. S.:** A gaseous fermentation of tomato pulp and related products. N. Y. State Agr. Expt. Sta. (Geneva, N. Y.) Bull. 110 (1925).
- Mills, D. A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D. und Makarova, K.:** Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. FEMS Microbiol. Rev. 29, 465-475 (2005).
- Mitcham, E. und McDonald, R.:** Cell wall modification during ripening of 'Keitt' and 'Tommy Atkins' mango fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117, 919-924 (1992).
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., Jorganes, F. und Munoz, R.:** Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. Int. J. Food Microbiol. 84: 117-123 (2003).
- Morse, R., Collins, M. D., Ohanlon, K., Wallbanks, S. und Richardson, P. T.:** Analysis of the beta' subunit of DNA-dependent RNA polymerase does not support the hypothesis inferred from 16S rRNA analysis that *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) is a tachytelic (fast-evolving) bacterium. Int. J. Sys. Bacteriol. 46, 1004-1009 (1996).
- Muda, P., Seymour, G. B., Errington, N. und Tucker, G. A.:** Compositional changes in cell wall polymers during mango fruit ripening. Carbohydrate Polymers 26, 255-260 (1995).
- Pardo, I., Garcia, M. J., Zuniga, M. und Uruburu, F.:** Evaluation of the API 50 CHL system for identification of *Leuconostoc oenos*. Am. J. Enol. Vitic. 39: 347-350 (1988).
- Patz, C.-D.:** Die Analytik von Pflanzenpolysacchariden bei der Strukturaufklärung von löslichen Himbeerkolloiden. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen (1994).
- Peynaud, E. und Domercq, S.:** Étude de quatre cents souches de coques hétérolactiques isolés de vins. Ann. Inst. Pasteur 19: 159-170 (1968).
- Pellegrini, N., Re, R., Yang, M. und Rice-Evans, C.:** Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-Azinobis(3-

- ethylenebenzothiazoline)-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol.* 299: 379-389 (1999).
- Pfeiffer, P. und Radler, F.:** Hochleistungsflüssigchromatographische Bestimmung von organischen Säuren, Zuckern, Glycerin und Alkohol im Wein an einer Kationenaustauschersäule. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 181: 24-27 (1985).
- Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E. J., Ubbink, T., Abee, T., Renault, P. P. und Konings, W. N.:** Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.* 173, 6030-6037 (1991).
- Pramafteki, P. V., Metafa, M., Kallithraka, S. und Lanaridis, P.:** Evolution of malolactic bacteria and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentations in a Greek winery. *Lett. Appl. Microbiol.* 43: 155-160 (2006).
- Prasanna, V., Prabha, T. N. und Tharanathan, R. N.:** Pectic polysaccharides of mango (*Mangifera indica* L): structural studies. *J. Sci. Food Agric.* 84: 1731-1735 (2004).
- Prasanna, V., Yashoda, H. M., Prabha, T. N. und Tharanathan, R. N.:** Pectic polysaccharides during ripening of mango (*Mangifera indica* L). *J. Sci. Food Agric.* 83: 1182-1186 (2003).
- Raccach, M.:** Manganese and lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 48, 895-898 (1985).
- Radler, F.:** Problematik des bakteriellen Säureabbaus. *Weinberg und Keller* 19, 357-370 (1972).
- Rankine, B. C. und Bridson, D. A.:** Bacterial spoilage in dry red wine and its relationship to malo-lactic fermentation. *Austral. Wine Brew. Spirit. Rev.* 90, 44-50 (1971).
- Rauhut, D., Gawron-Scibek, M., Beisert, B., Kondzior, M., Schwarz, R., Kürbel, H., Grossmann, M. and Krieger, S.:** Der Einfluss von S-haltigen Aminosäuren und Glutathion auf das Wachstum von *Oenococcus oeni* und die malolaktische Gärung. Weinqualität und biologischer Säureabbau: Zusammenfassung der Berichte des XVI^{es} Entretiens Scientifiques Lallemand: 21-23 (2004).

- Reguant, C., Bordons, A., Arola, L. und Rozès, N.:** Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. J. Appl. Microbiol. 88, 1065-1071 (2000).
- Richter, H.:** Bedeutung von Pantothenensäure für die Unterdrückung der Bildung von Erythrit und Essigsäure bei der Fermentation von Glucose durch *Oenococcus oeni*. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2000).
- Richter, H.:** Zuckertransport und Regulation des Hexosestoffwechsels bei *Oenococcus oeni*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2004).
- Richter, H., Vlad, D. und Uden, G.:** Significance of pantothenate for glucose fermentation by *Oenococcus oeni* and for suppression of the erythritol and acetate production. Arch. Microbiol. 175, 26-31 (2001).
- Rode, T.:** Stabilität und Penetrationsfähigkeit von pflanzlichen Stoffen in topischen Formulierungen. Dissertation, Universität Kiel (2001).
- Rodriguez-Caso, C., Rodriguez-Agudo, D., Sanchez-Jimenez, F. und Medina, M. A.:** Green tea epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of mammalian histidine decarboxylase. Cell. Mol. Life Sci. 60, 1760-1763 (2003).
- Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. und Torres, C.:** Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. Food Microbiol. 24, 482-491 (2007).
- Roth, B. L.:** Bacterial viability and antibiotic susceptibility with sytox green nucleic acid stain. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2421-2431 (1997).
- Rozes, N., Arola, L. und Bordons, A.:** Effect of phenolic compounds on the co-metabolism of citric acid and sugars by *Oenococcus oeni* from wine. Lett. Appl. Microbiol. 36, 337-341 (2003).
- Saguir, F. M. und Manca de Nadra, M. C.:** Effect of L-malic and citric acids metabolism on the essential amino acid requirements for *Oenococcus oeni* growth. J. Appl. Microbiol. 93, 295-301 (2002).

- Salema, M., Lolkema, J. S., San Romao, M. V. und Loureiro Dias, M. C.:** The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. J. Bacteriol. 178, 3127-3132 (1996).
- Salema, M., Poolman, B., Lolkema, J. S., Loureiro Dias, M. C. und Konings, W. N.:** Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. Eur. J. Biochem. 225, 289-295 (1994).
- Salih, A. G., Le Quere, J. M. und Drilleau, J. F.:** Action des acides hydroxycinnamiques libre set estérifiés sur la croissance des bactéries lactique. Sci. Aliments 20, 537-560 (2000).
- Salou, P., Loubiere, P. und Pareilleux, A.:** Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1459-1466 (1994).
- Sato, H., Yanagida, F., Shinohara, T., Suzuki, M., Suzuki, K.-I. und Yokotsuka, K.:** Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan. FEMS Microbiol. Letters 202, 109-114 (2001).
- Schleifer, K. H. und Ludwig, W.:** Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. System. Appl. Microbiol. 18, 461-467 (1996).
- Schneider, T.:** Essigstich: alter Fehler – neue Ursachen. Das deutsche Weinmagazin 2, 12-15 (2000).
- Schöpplein, E.:** Biochemische und chromatographische Charakterisierung von Fruchtsaft-Polysacchariden unter Verwendung hochgereinigter Glycanasen. Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen (1989).
- Snell, N. und Lewis, J. C.:** Nutritional studies with *Lactobacillus fermenti*. J. Bacteriol. 65: 671-677 (1953).

- Souci, S. W., Fachmann, W. und Kraut, H.:** Die Zusammensetzung der Lebensmittel: Nährwert-Tabellen 1986/1987. 3.Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1986).
- Sozzi, G. O., Frascina, A. A., Navarro, A. A., Cascone, O., Greve, L. C. und Labavitch, J. M.:** α -L-Arabinofuranosidase activity during development and ripening of normal and ACC synthase antisense tomato fruit. HortScience 37, 564-566 (2002).
- Stahl, E.:** Dünnschichtchromatographie – Ein Laboratoriumsbuch, Springer Verlag Berlin: 479 (1962).
- Stamer, J. R., Albury, M. N. und Pederson, C. S.:** Substitution of manganese for tomato juice in the cultivation of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. 12, 165-168 (1964).
- Steidl, R. und Leindl, G.:** Biologischer Säureabbau. Ulmer-Verlag/Agrarverlag, Stuttgart/Leopoldsdorf (2002).
- Stiles, M. E. und Holzapel, W. H.:** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36, 1-29 (1997).
- Teixeira, H., Goncalves, M. G., Rozes, N., Ramos, A. und San Romao, M. V.:** Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: A response to ethanol stress? Microbial Ecology 43, 146-153 (2002).
- Terrade, N. und Mira de Orduna, R.:** Impact of winemaking practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation. J. Appl. Microbiol. 101, 406-411 (2006).
- Theobald, S., Pfeiffer, P. und Koenig, H.:** Wachstumsfördernde Substanzen aus Fruchtsäften und Blattextrakten für das weinrelevante Bakterium *Oenococcus oeni*. Dtsch. Lebensmittel Rundsch. 101, 286-293 (2005).
- Tucker, G. A. und Mitchell, J.:** Cell walls, structure, utilization and manipulation. Plant Biotechnol. 3, 55-103 (1993).

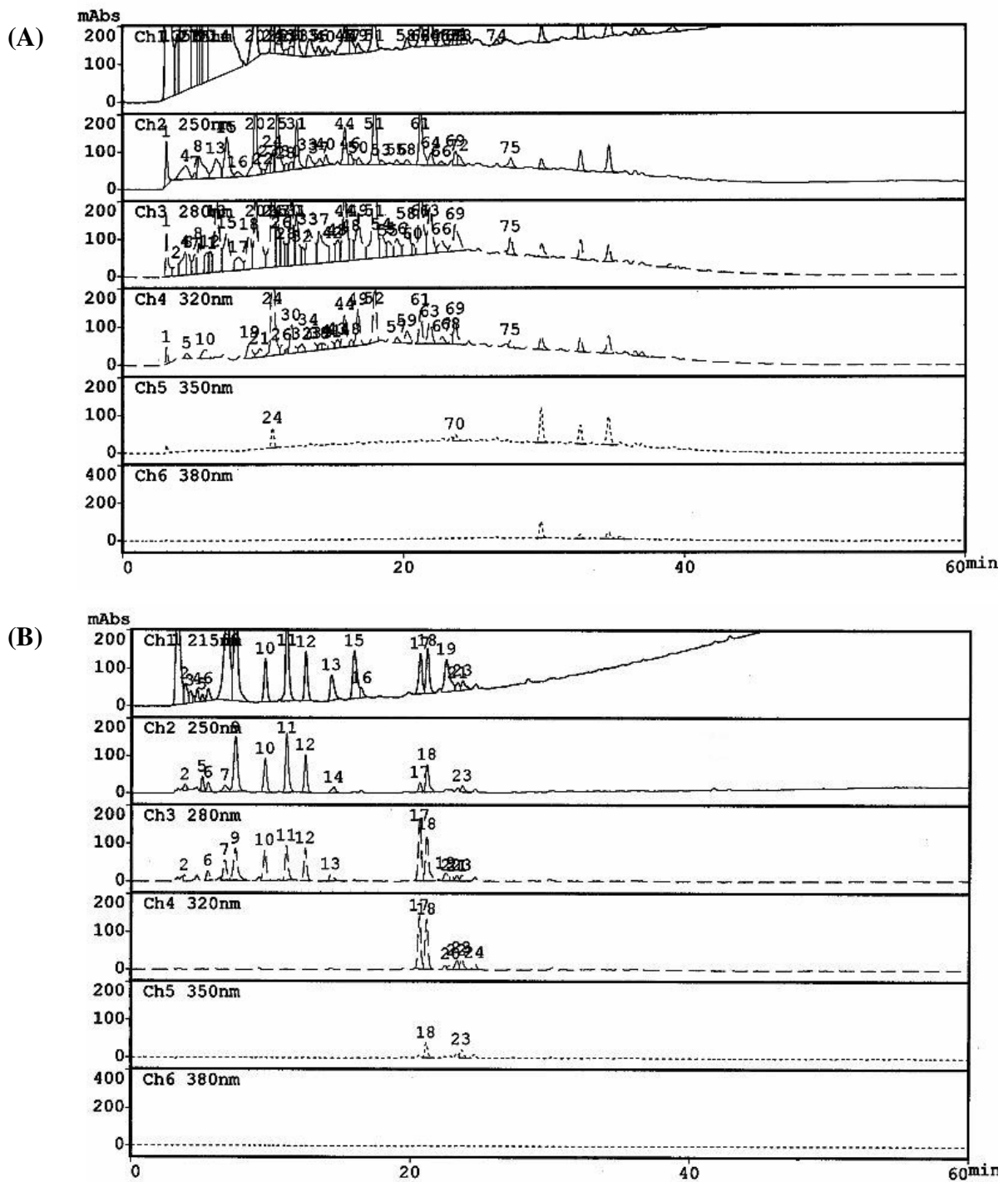
- van Vuuren, H. J. J. und Dicks, L. M. T.:** *Leuconostoc oenos*: a review. Am. J. Enol. Vitic. 44, 99-112 (1993).
- Veiga-Da-Cunha, M., Firme, P., San Romao, M. V. und Santos, H.:** Application of ¹³C nuclear magnetic resonance to elucidate the unexpected biosynthesis of erythritol by *Leuconostoc oenos*. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2271-2279 (1992).
- Veiga-Da-Cunha, M., Santos, H. Und van Schaftingen, E.:** Pathway and regulation of erythritol formation in *Leuconostoc oenos*. J. Bacteriol. 175, 3941-3948 (1993).
- Versari, A., Parpinello, G. P. und Cattaneo, M.:** *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. J. Industr. Microbiol. Technol. 23, 447-455 (1999).
- Vetsch, U. und Lüthi, H.:** Farbstoffverluste während des biologischen Säureabbaus von Rotweinen. Schweiz. Z. Obst. Weinbau 73, 124-126 (1964).
- Villetaz, J. C. und Amado, R.:** Untersuchung der löslichen Neutral-Polysaccharidfraktion von Traubensaft und Wein. Lebensm. Wiss. u. Technol. 14: 176-181 (1981).
- Vivas, N., Augustin, M. und Lonvaud-Funel, A.:** Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*, 8413). J. Sci. Food Agric. 80, 1675-1678 (2000).
- Vivas, N., Lonvaud-Funel, A. und Glories, Y.:** Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. Food Microbiology 14, 291-300 (1997).
- Wagner, N., Tran, Q. H., Richter, H., Selzer, P. M. und Uden, G.:** Pyruvate fermentation by *Oenococcus oeni* and *Leuconostoc mesenteroides* and role of pyruvate dehydrogenase in anaerobic fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4966-4971 (2005).
- Weiller, H. G. und Radler, F.:** Vitamin- und Aminosäurenbedarf von Milchsäurebakterien aus Wein und von Rebenblättern. Mitt. Klosterneuburg 22, 4-18 (1972).
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H. und Lee, T. H.:** Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. Am. J. Enol. Vitic. 36, 302-313 (1985).

- Würdig, G. und Woller, R.:** Chemie des Weines, Ulmer Verlag, Stuttgart (1989).
- Yang, D. und Woese, C. R.:** Phylogenetic structure of the Leuconostocs: An interesting case of a rapidly evolving organism. *System. Appl. Microbiol.* 12, 145-149 (1989).
- Yashoda, H. M., Prabha, T. N. und Tharanathan, R. N.:** Mango ripening – chemical and structural characterization of pectic and hemicellulosic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 340: 1335-1342 (2005).
- York, W. S., Kolli, V. S. K., Orlando, R., Albersheim, P. und Darvill, A. G.:** The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. *Carbohydrate Research* 285, 99-128 (1996).
- Zaika, L. L. und Kissinger, J. C.:** Fermentation enhancement by spices: identification of active component. *J. Food Science* 49, 5-9 (1984).
- Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H. und Unden, G.:** Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 421-429 (2006).
- Zhang, Y. M. und Rock, C. O.:** Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *J. Biol. Chem.* 279, 30994-31001 (2004).
- Zhen, Y. S., Chen, Z. M., Cheng, S. J. und Chen, M.-L.:** Tea – Bioactivity and therapeutic potential, Taylor & Francis press, London und New York (2002).
- Zittlau, J.:** Grüner Tee – Heilpflanze aus dem Fernen Osten, Südwest Verlag, München (2005).

9. Anhang

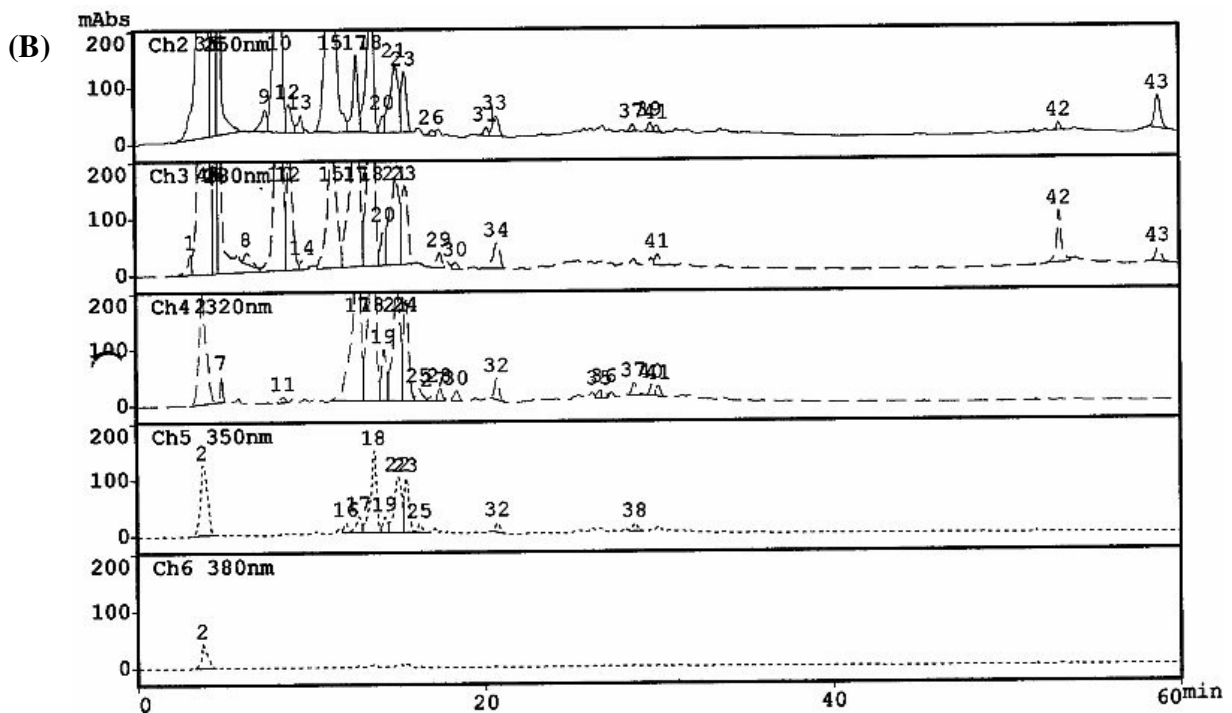
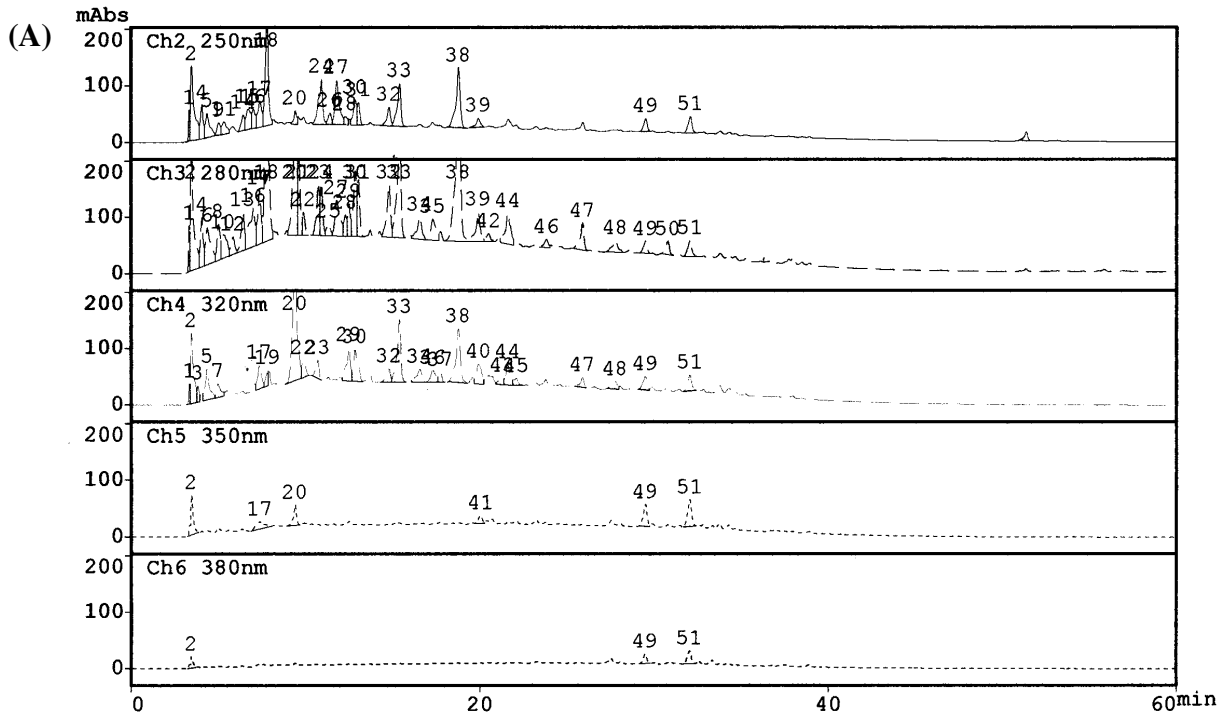
Anhang 1

HPLC/UV-DAD-Chromatogramm der analytischen HPLC (Gradientensystem aus 0,17% Phosphorsäure und Methanol) von Tomatenschalen-Extrakt (A) und fünffach konzentrierter Saft aus geschälten Tomaten (B).



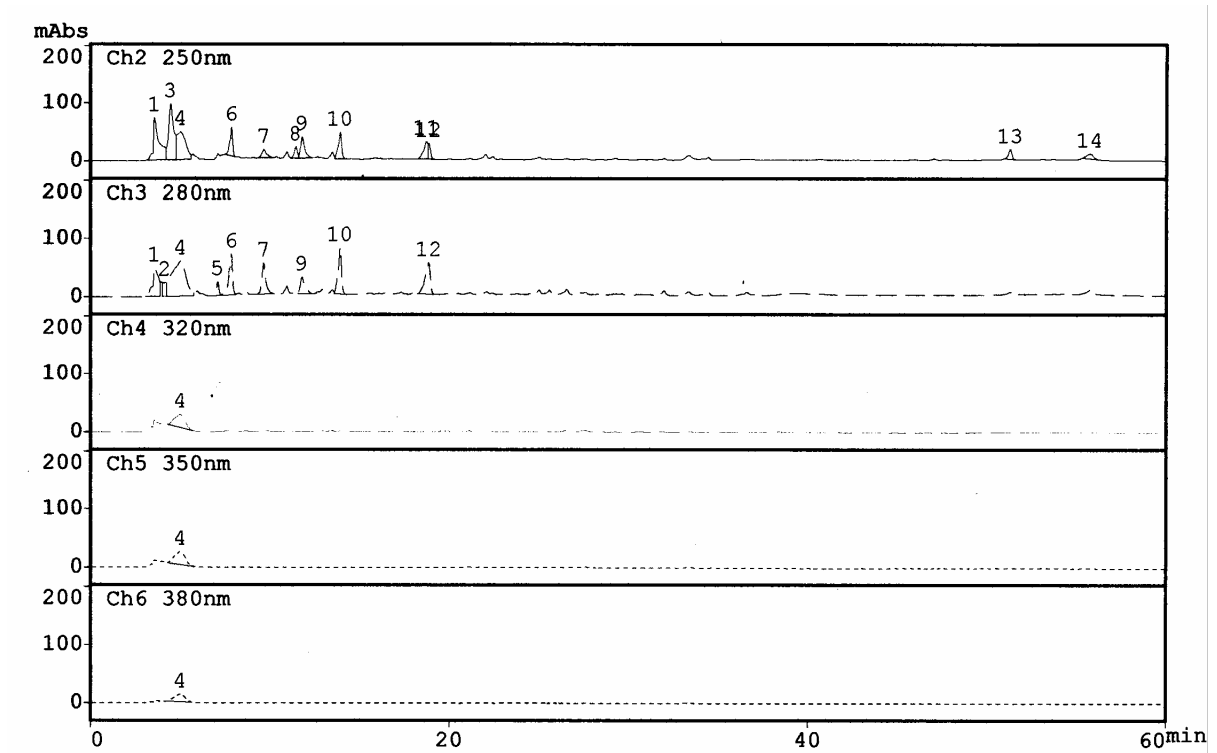
Anhang 2

HPLC/UV-DAD-Chromatogramm der semipräparativen HPLC (Gradientensystem aus 1% Essigsäure und Methanol) von Tomatenschalen-Extrakt (A) und fünffach konzentrierter Saft aus geschälten Tomaten (B).



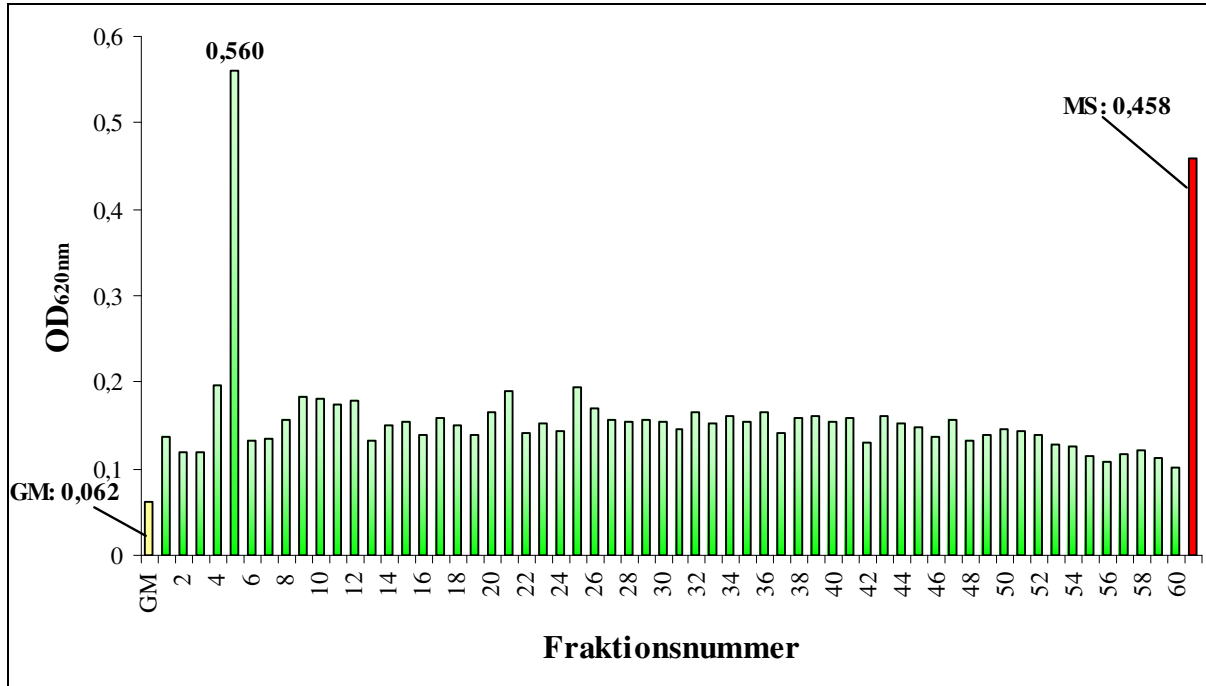
Anhang 3

HPLC/UV-DAD-Chromatogramm der semipräparativen HPLC (Gradientensystem aus 1% Essigsäure und Methanol) von Saft aus geschälten Mangos.



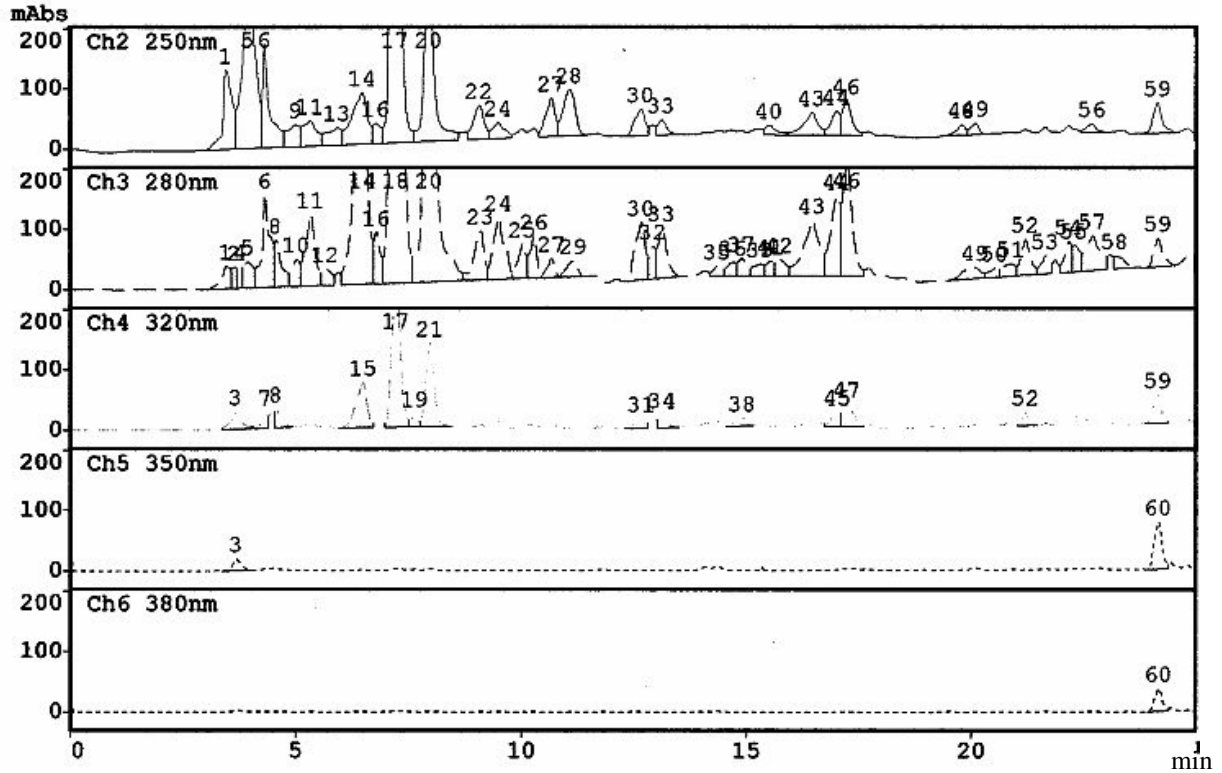
Anhang 4

Wachstumstest in Microtiterplatten mit *Oenococcus oeni* Stamm B2. Die 60 erhaltenen Fraktionen aus dem Saft von geschälten Mangos nach Auftrennung an einer semipräparativen C₁₈-HPLC-Säule (Anhang 3) wurden als Medienzusatz verwendet. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 10 Tagen bei 620 nm.



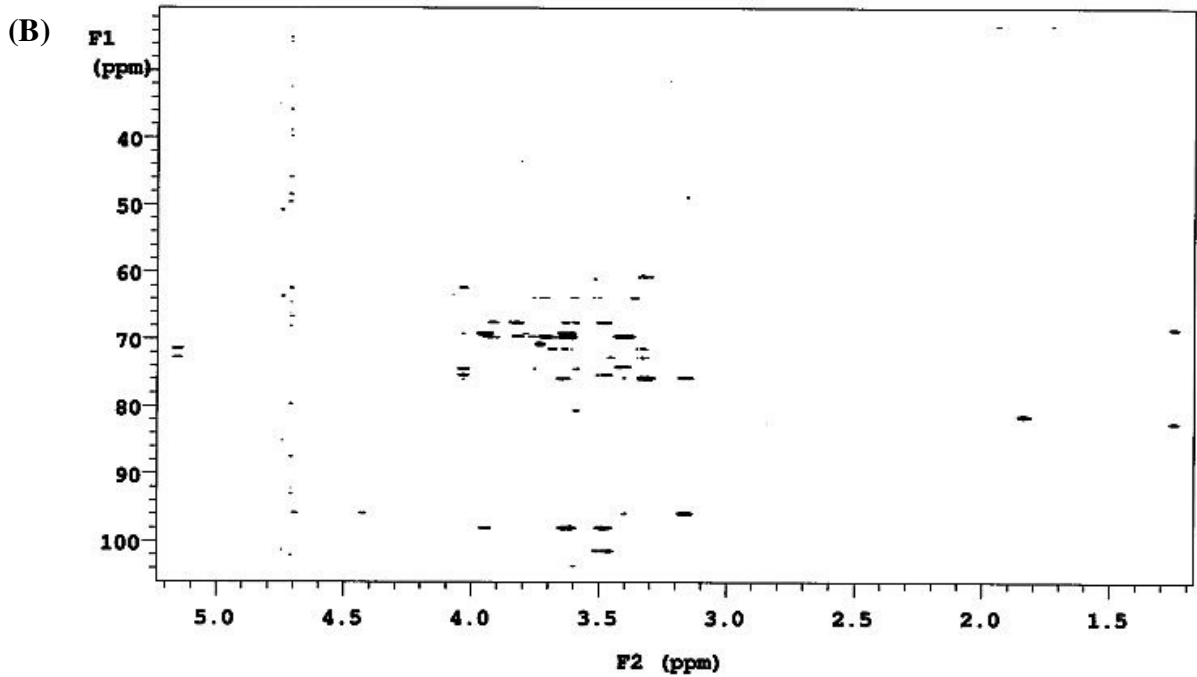
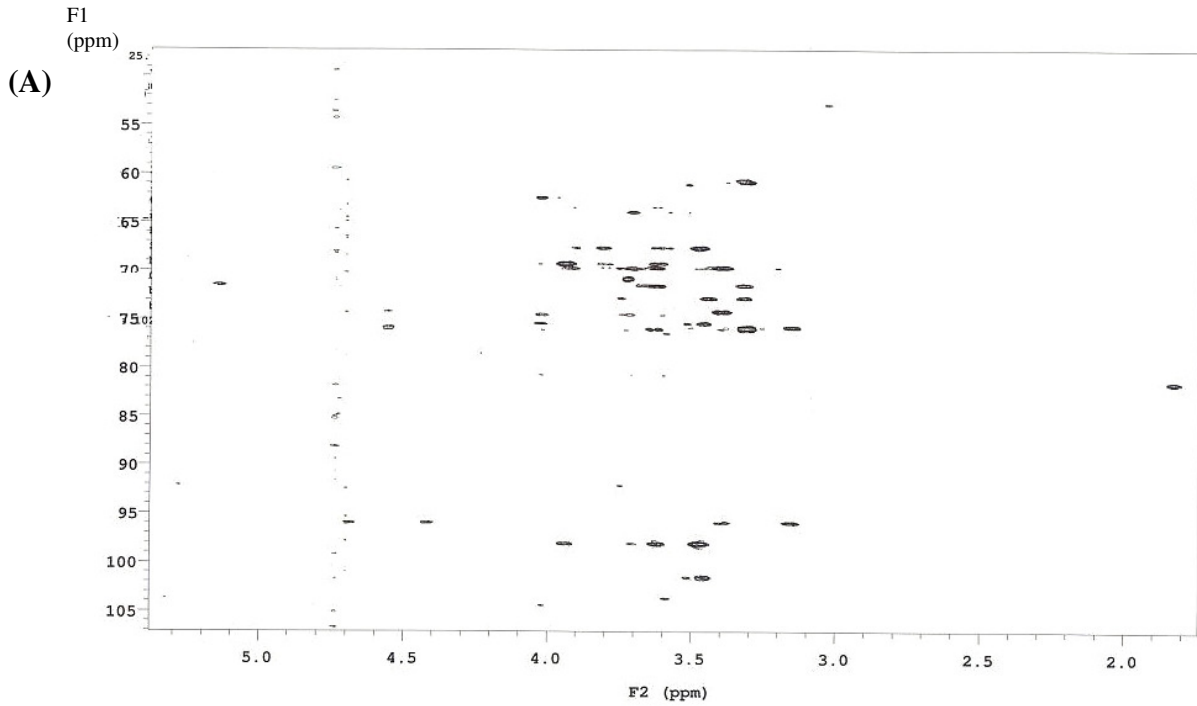
Anhang 5

HPLC/UV-DAD-Chromatogramm der semipräparativen HPLC (Gradientensystem aus 1% Essigsäure und Methanol) von Mangoschalen-Extrakt.



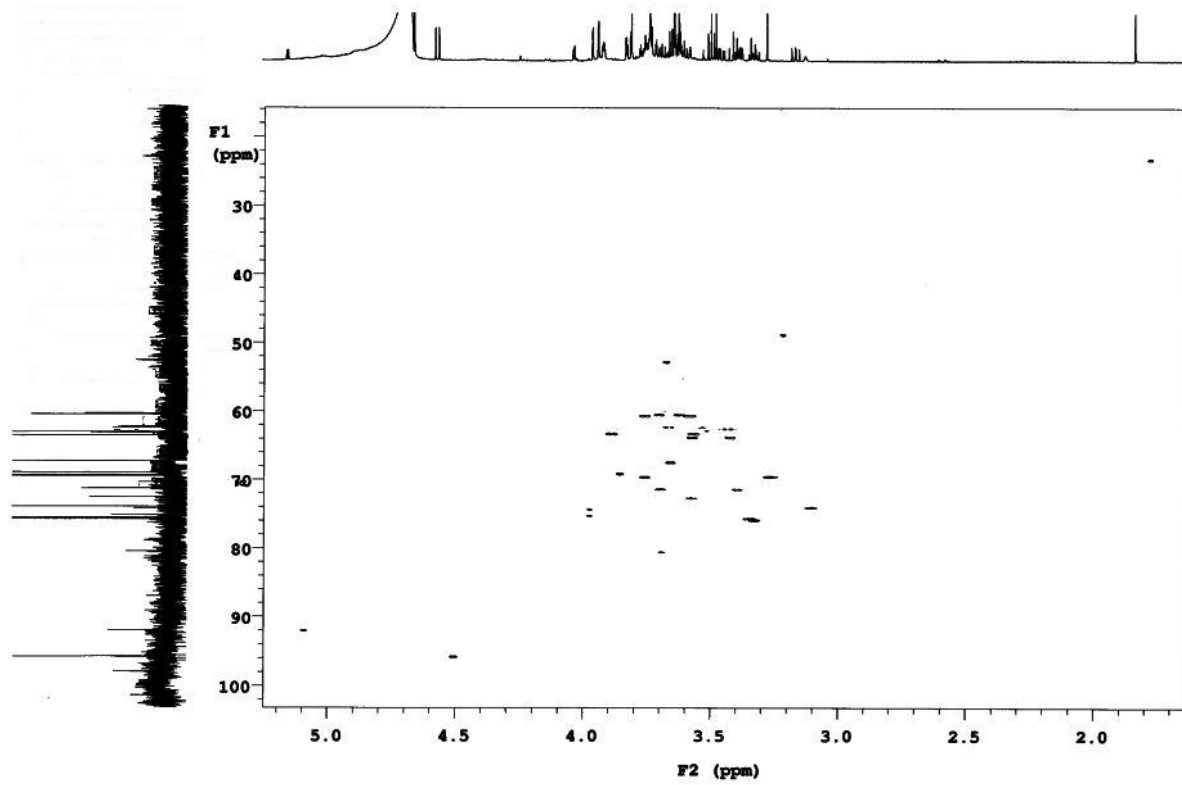
Anhang 6

HMBC-Spektren (Heteronuclear Multiple Band Correlations) der gereinigten Substanz von Fraktion 13 (Abb. 23) des Mangoschalenextrakts bei 4 Hz (A) und bei 8 Hz (B).



Anhang 7

HSQC-Spektrum (Heteronuclear Single Quantum Correlations) der gereinigten Substanz von Fraktion 13 (Abb. 23).



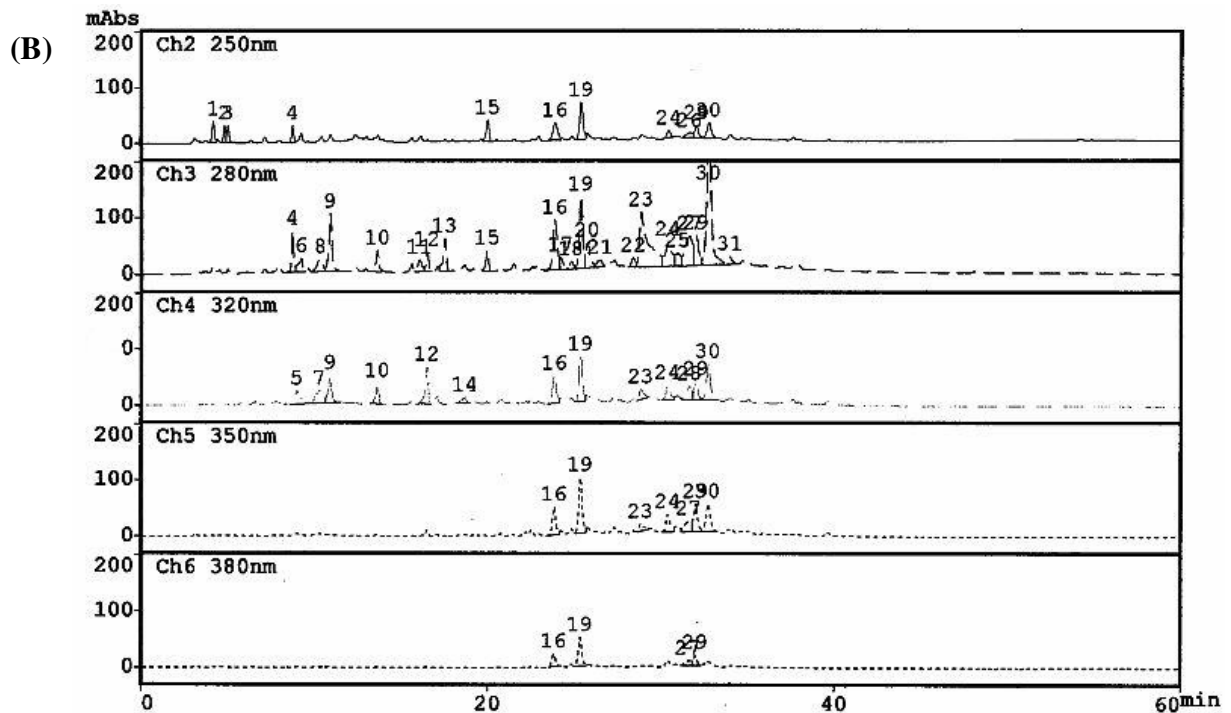
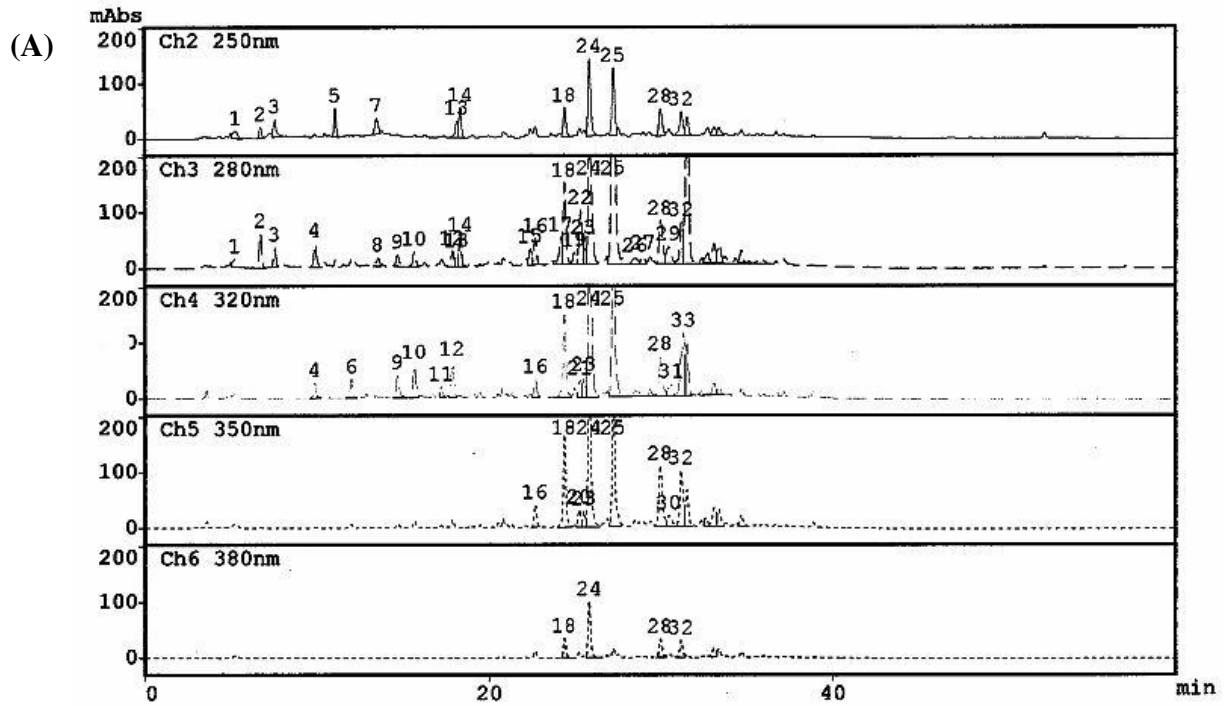
Anhang 8

Retentionszeiten der Zucker-Standardlösungen nach HPLC-Auftrennung an einer Rezex RPM-Pb²⁺-Säule.

Zucker-Standardlösungen (c = 1 g/l)	Retentionszeit [min]
Stachyose	11,03
Saccharose	12,35
Maltose	12,96
Lactose	13,35
Glucose	14,39
Xylose	15,38
Sorbose	16,27
Rhamnose	16,35
Galactose	16,42
Arabinose	17,72
Mannose	18,33
Fructose	18,94
Ribose	34,85

Anhang 9

HPLC/UV-DAD-Chromatogramme der semipräparativen HPLC von Zitronenmesokarp-Extrakt mit einem Gradienten aus 1% Essigsäure und Methanol (A) und einem Gradienten aus 0,5%igem wäßrigem Ammoniumacetat und Methanol (B).



Anhang 10

Retentionszeiten der Zucker-Standardlösungen nach HPLC-Auftrennung an einer Aminex HPX 87H-Säule.

Standardlösungen (c = 1 g/l)	Retentionszeit [min]
Citrat	8,05
Tartrat	8,65
Glucose	9,21
Mannose	9,81
Fructose	10,01
Arabinose	10,85
Succinat	11,95
Lactat	13,16
Acetat	14,20
Glykol	16,89
Ethanol (c = 4 g/l)	22,93

Anhang 11

Bestimmung von Cystein in Tomatensaft anhand HPLC mit Fluoreszenzdetektor nach Derivatisierung mit AQC (6-Aminochinoloyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamat). (A) = Tomatensaft, (B) = Cystein-Standardlösung in Reinstwasser ($c = 0,1 \text{ g/l}$). Die Berechnung erfolgte anhand der Peakhöhe. Wie eine Kontrolle mit Reinstwasser zeigte, stammen die Peaks ab $R_t = 17,25 \text{ min}$ von Zersetzungsprodukten des Derivatisierungsreagenz.

