

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Biochemische Charakterisierung des Exopolysaccharids von
Pediococcus parvulus B399, sowie dessen Hydrolyse durch eine
neue β -1,3-Glucanase aus *Delftia* sp. MV01**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Melanie Larisika
geb. am 20.11.1981 in Mainz

Mainz, 2010

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von Mai 2007 bis Juni 2010 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität durchgeführt.

Jahr der mündlichen Prüfung: 2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Exopolysaccharide – (mikrobielle) Biopolymere	1
1.2. Exopolysaccharide von Milchsäurebakterien	3
1.3. Genetik der Exopolysaccharidsynthese	4
1.4. Milchsäurebakterien in der Weinbereitung	7
1.5. Die Gattung <i>Pediococcus</i>	10
1.6. Exopolysaccharidbildung im Wein	11
1.7. Motivation	14
1.8. Ziele der vorliegenden Arbeit	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Geräte und Hilfsmittel	17
2.2. Verbrauchsmaterial	19
2.3. Chemikalien	20
2.4. Biochemikalien, Enzyme und Kits	21
2.5. Oligonukleotide (Primer)	23
2.6. Puffer und Lösungen	23
2.6.1. DNA – Isolierung	23
2.6.2. Agarose – Gelelektrophorese	24
2.6.3. Protein - Blot	24
2.6.4. Isoelektrische Fokussierung	25
2.6.5. SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – PAGE)	25
2.6.6. Aktivitätstests	26
2.6.7. Aktivitätsgele	26
2.6.8. Dünnschichtchromatographie	26
2.6.9. Anionenaustauscher – Chromatographie (Mono Q)	27
2.6.10. Größenausschlußchromatographie I (Sephadex G 75)	27
2.6.11. Größenausschlußchromatographie II	27
2.6.12. HPLC I (gepulste Amperometry)	27
2.6.13. HPLC II	28
2.7. Kulturmedien	28
2.8. Organismen	31
2.9. Screening nach exopolysaccharidbildenden Pediokokken-Stämmen	32
2.10. Kulturbedingungen	34
2.11. Gewinnung des Exopolysaccharids von <i>Pediococcus parvulus</i> B399	35
2.11.1. Aufarbeitung von größeren Mengen Polymer	35
2.12. Charakterisierung des Exopolysaccharids von <i>P. parvulus</i> B399	36
2.12.1. Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes	36
2.12.2. Bestimmung der Monomerzucker	37
2.12.3. Strukturbestimmung mittels Kernspinresonanzspektroskopie	39
2.12.4. IR-Spektroskopie	41
2.12.5. Gelpermeationschromatographie	42
2.12.6. Viskosimetrische Messungen	43
2.12.7. Atomkraftmikroskopie (AFM)	50
2.13. Sequenzierung der 16S rDNA von <i>Pediococcus parvulus</i> B399	54
2.13.1. DNA – Isolierung	54
2.13.2. Amplifizierung der 16S rDNA	55
2.13.3. Aufreinigung der PCR-Produkte	56
2.13.4. Agarose-Gelelektrophorese	56

2.13.5.	Sequenzierung	57
2.13.6.	Nachweis des Glycosyltransferase- Gens (<i>gtf</i> -Gen)	57
2.14.	Screening nach glucanolytischen Mikroorganismen	58
2.14.1.	Nachweis von β -Glucanasen auf festem Nährmedium	59
2.14.2.	Nachweis von β -Glucanasen in Flüssigmedium	59
2.15.	Kultivierung von <i>Delftia</i> sp. MV01	60
2.15.1.	Stammhaltung	60
2.15.2.	Bildung von Exoenzymen im Labormaßstab	60
2.15.3.	Proteinbestimmung	61
2.15.4.	Aufarbeitung der lytischen Kulturüberstände	62
2.15.5.	Bestimmung der Glucanaseaktivität (DNS-Test)	64
2.16.	Reinigung der Glucanase aus <i>Delftia</i> sp. MV01	65
2.17.	Charakterisierung der β -1,3 Glucanase aus <i>Delftia</i> sp.	66
2.17.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
2.17.2.	Nachweis von β -1,3 Glucanasen im Aktivitätsgel	67
2.17.3.	Isoelektrische Fokussierung	68
2.17.4.	Protein-Blotting	69
2.17.5.	N-terminale Sequenzierung	69
2.17.6.	Nachweis von Laminarin-Spaltprodukten	70
2.17.7.	Substratspezifität	70
2.17.8.	Ermittlung des pH-Optimums	70
2.17.9.	Ermittlung des Temperatur-Optimums	71
2.18.	Aktivität des Enzyms unter weinrelevanten Bedingungen	71
2.18.1.	Niedrige Temperaturen	71
2.18.2.	Unterschiedliche Ethanolkonzentrationen	71
2.18.3.	Unterschiedliche Phenolkonzentrationen	72
2.18.4.	Unterschiedliche Kaliumdisulfitkonzentrationen	72
2.19.	Hydrolyse des Exopolysaccharids von <i>Pediococcus parvulus</i> B399 durch die Glucanase	72
2.19.1.	Bestimmung von reduzierenden Gruppen	72
2.19.2.	Bestimmung der Viskositätsabnahme	73
2.19.3.	Bestimmung der Molmassenverteilung im Exopolysaccharid	74
2.19.4.	Bestimmung von strukturellen Änderungen des Polymers	74
2.20.	Phänotypische Charakterisierung von <i>Delftia</i> sp. MV01	75
2.20.1.	Ermittlung der Zellmorphologie von <i>Delftia</i> sp. MV01	75
2.20.2.	Ermittlung der phänotypische Eigenschaften von <i>Delftia</i> sp. MV01	75
2.20.3.	Ermittlung des Temperaturoptimums	76
2.20.4.	Ermittlung des pH-Optimums	76
2.20.5.	Beeinflussung des Wachstums in Anwesenheit von NaCl	76
2.20.6.	Ermittlung des Substratverwertungsspektrums	76
2.20.7.	Verwertung von Polymeren	77
2.21.	Genotypische Charakterisierung von <i>Delftia</i> sp. MV01	78
2.21.1.	Sequenzierung der 16S rDNA von <i>Delftia</i> sp. MV01	78
2.21.2.	Phylogenetische Analyse	79
2.21.3.	DNA-DNA-Hybridisierung	79
2.21.4.	Fettsäureanalyse	80
2.21.5.	Bestimmung des GC-Gehalts	80
3.	Ergebnisse	82
3.1.	Exopolysaccharidbildung bei Pediokokken	82
3.2.	Exopolysaccharidbildung bei <i>Pediococcus parvulus</i> B399	85

3.3.	Exopolysaccharid-Ausbeuten	88
3.4.	Aufbau des Exopolysaccharids von <i>Pediococcus parvulus</i> B399	90
3.4.1.	Monomierzusammensetzung	90
3.4.2.	Struktur des Exopolysaccharids (NMR)	93
3.4.3.	Struktur des Exopolysaccharids (IR)	97
3.4.4.	Größe des Exopolysaccharids	99
3.4.5.	Rheologische Eigenschaften des Exopolysaccharids	101
3.4.6.	Dreidimensionale Struktur des Exopolysaccharids	105
3.5.	16S rDNA Sequenz von <i>Pediococcus parvulus</i> B399	106
3.6.	Glycosyltransferase (<i>gtf</i>)-Gen	106
3.7.	Glucanolytische Mikroorganismen	107
3.7.1.	Nachweis von β -Glucanasen auf festem Nährmedium	107
3.7.2.	Nachweis von β -Glucanasen in Flüssigmedium	108
3.8.	Bildung der β - Glucanase durch <i>Delftia sp.</i> MV01	110
3.9.	Reinigung der β - Glucanase aus <i>Delftia sp.</i> MV01	111
3.10.	Charakterisierung der β -1,3-Glucanase aus <i>Delftia sp.</i> MV01	121
3.10.1.	Masse und Aktivität des Enzyms	121
3.10.2.	Isoelektrischer Punkt	122
3.10.3.	Protein-Blot	123
3.10.4.	N-Terminus	123
3.10.5.	pH-Optimum	124
3.10.6.	Temperatur-Optimum	125
3.10.7.	Spaltung von Laminarin	125
3.10.8.	Substratspezifität	126
3.11.	Glucanaseaktivität unter weinrelevanten Bedingungen	127
3.11.1.	Niedrige Temperaturen	127
3.11.2.	Ethanolzusatz	128
3.11.3.	Phenolzusatz	129
3.11.4.	Kaliumdisulfitzusatz	130
3.12.	Exopolysaccharid (EPS) - Hydrolyse	131
3.12.1.	Freigesetzte reduzierende Enden	131
3.12.2.	Abnahme der Viskosität	133
3.12.3.	Änderung der Molekulargewichtsverteilung	135
3.12.4.	Strukturelle Änderungen	136
3.13.	Phänotypische Eigenschaften von <i>Delftia sp.</i> MV01	138
3.13.1.	Zellmorphologie	138
3.13.2.	Weitere phänotypische Eigenschaften von <i>Delftia sp.</i> MV01	139
3.13.3.	Temperatur-Optimum	139
3.13.4.	pH- Optimum	140
3.13.5.	Substratverwertung	140
3.13.6.	Polymerspaltung	142
3.13.7.	Glucoseverwertung	143
3.14.	Genotypische Eigenschaften von <i>Delftia sp.</i> MV01	144
3.14.1.	16S rDNA von <i>Delftia sp.</i> MV01	144
3.14.2.	Phylogenetische Stellung	144
3.14.3.	Taxonomie	145
3.14.4.	Fettsäuren	145
3.14.5.	GC-Verhältnis	145
4.	Diskussion	146
4.1.	Beeinflussung der Exopolysaccharidbildung	146

4.2.	Vergleich der Exopolysaccharidbildung bei <i>P. parvulus</i> B399 mit anderen Milchsäurebakterien	148
4.3.	Vergleich der Struktur des Exopolysaccharids von <i>Pediococcus parvulus</i> B399 mit denen von anderen <i>Pediococcus</i> -Stämmen	150
4.4.	Industrielle Anwendung	153
4.5.	Glycosyltransferase -(<i>gtf</i>) Gen bei Milchsäurebakterien	154
4.6.	Verbreitung von β -1,3 Glucanasen bei Mikroorganismen	155
4.7.	Substrate zur Bildung von β -Glucanasen	156
4.8.	Vergleich der Glucanase aus <i>Delftia sp.</i> MV01 mit anderen Glucanasen	156
4.9.	<i>Delftia sp.</i> MV01 - eine neue Spezies?	159
5.	Ausblick	162
6.	Zusammenfassung	163
7.	Literatur	165
8.	Anhang	182
8.1.	Ribosomale Gensequenzen (16S rDNA-Sequenzen)	182
8.2.	16S rRNA Sequenzen zur Stammbaumerstellung	184
8.3.	GC-Ergebnisse der Fettsäureanalyse von <i>Delftia sp.</i> MV01	198

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µV	Mikrovolt
A	Ampere
a.u.	arbitrary units
Abb.	Abbildung
AFM	Atomic Force Microscopy
APS	Ammoniumpersulfat
ATR	Attenuated Total Reflection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
cm	Zentimeter
d	days
Da	Dalton
deion.	deionisiert
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNS	Dinitrosalicylsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	Exopolysaccharid
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FT	Fourier Transformation
g	Gramm
g	gravitational constant
GC	Gas Chromatography
GC	Guanin + Cytosin- Gehalt [%]
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	hour
HPAEC	High Performance Anion Exchange Chromatography

Abkürzungen

HPLC	high performance liquid chromatography
Hz	Hertz
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IR	Infrarot
KBE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
KÜ	Kulturüberstand
l	Liter
m	Meter
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
MSB	Milchsäurebakterien
mV	Millivolt
NCBI	National Center of Biotechnology Information
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	Optische Dichte
PAD	Pulsed Amperometric Detection
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rDNA	Ribosomal Desoxyribonucleic Acid
REM	Raster-Elektronen Mikroskop
RI	Refractive Index
rpm	Revolutions per minute
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	Svedberg
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoroacetic Acid
TMS	Tetramethylsilan
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 80	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monooleat
U	Unit(s)
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol-%	Volumenprozent
W	Watt



1. Einleitung

1.1. Exopolysaccharide – (mikrobielle) Biopolymere

Neben verschiedenen Eukaryoten sind auch viele Bakterienarten in der Lage, Exopolysaccharide (EPS) zu synthetisieren (Llaubères et al., 1990). Hierbei handelt es sich um langkettige, extrazelluläre Makromoleküle, die sich aus wiederholenden, ähnlichen oder identischen Untereinheiten (engl. repeating units) zusammensetzen. Sie können zusätzlich nichtpolymere Substituenten niedrigen Molekulargewichtes wie beispielsweise Acetyl-Gruppen enthalten.

Exopolysaccharide sind entweder in Form einer Kapsel mit der Zellwand des Bakteriums assoziiert, oder sie werden als Schleim(e) direkt ins Medium ausgeschieden (Abb.1) (De Vuyst & Degeest, 1999).



Abb. 1 Verschiedene Darstellungsformen der Exopolysaccharidbildung. Lichtmikroskopische Aufnahme einer Negativdarstellung der Exopolysaccharid-Hülle von *P. parvulus* unter Verwendung von Tusche (links). Schleimende Kolonien von *P. parvulus* (Mitte). Viskositäts-erhöhung des Mediums durch EPS-Bildung: Mit der Impföse lässt sich ein Faden aus viskosem Schleim ausziehen (rechts).

Durch die Bildung dieser Biopolymere wird die Zelle unter anderem vor Austrocknung, Phagozytose und toxischen Substanzen wie beispielsweise Metallionen, Schwefeldioxid oder Ethanol geschützt (De Vuyst & Degeest, 1999). Des Weiteren erschweren Exopolysaccharide die Wirkung von Antibiotika und den Angriff von Protozoen (De Vuyst & Degeest, 1999). Zusätzliche Vorteile für die Mikroorganismen bestehen in der Bildung von Biofilmen, die Möglichkeit zur Adhäsion an feste Oberflächen, sowie Schutz vor osmotischem Stress (De Vuyst & Degeest, 1999).

Bei pathogenen Vertretern wie *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus agalactiae* sind neben dem O-Antigen der Lipopolysaccharide auch die kapselbildenden EPS an der Immunantwort beteiligt (De Vuyst & Degeest, 1999).

Es ist weniger wahrscheinlich, dass Exopolysaccharide als Reservestoff fungieren, da die meisten schleimbildenden Bakterien nicht in der Lage sind, diese zu katabolisieren (De Vuyst & Degeest, 1999).

Aufgrund ihrer Beschaffenheit und den damit verbundenen rheologischen Eigenschaften stabile Gele zu formen, eignen sich Exopolysaccharide zum vielfältigen Einsatz beispielsweise in der Lebensmittelherstellung als Dickungsmittel in fermentierten Milchprodukten wie Käse oder Yoghurt, als Geliermittel und als Stabilisator (Velasco et al., 2009).

Des Weiteren wirken einige Biopolymere entzündungshemmend und cholesterinsenkend. Dadurch und durch weitere medizinisch relevante Eigenschaften wie eine antidiabetische, antithrombotische und sogar antitumorale Wirkung findet eine Reihe von Exopolysacchariden auch in der pharmazeutischen Industrie Verwendung (Velasco et al., 2009).

Eine Vielzahl dieser Polymere ist als Lebensmittelzusatzstoff bekannt (Werning et al., 2008): Curdlan ein lineares Homopolymer aus β -1,3-D-Glucoseeinheiten (McIntosh et al., 2005) aus *Agrobacterium sp.* besitzt neben guten Gelierfähigkeiten auch eine Reihe von positiven Wirkungen auf den menschlichen Organismus, darunter die Senkung des Cholesterinspiegels (Shimizu et al., 1999). *Xanthomonas campestris*, ein phytopathogenes Bakterium, produziert in großen Mengen Xanthan, welches gleich bleibende rheologische Eigenschaften in Lebensmitteln zeigt. Gellan aus *Sphingomonas elodea* wird ebenfalls häufig eingesetzt.

Dadurch, dass es sich bei den drei genannten Vertretern um phytopathogene Organismen handelt, wird das Augenmerk verstärkt auf exopolysaccharidproduzierende Mikroorganismen gelegt, die natürlicherweise in fermentierten Lebensmitteln vorkommen (De Vuyst & Degeest, 1999). Zu diesen nicht pathogenen Organismen zählen neben Propionibakterien (Cerning, 1995) und Bifidobakterien (Abbad Andaloussi et al., 1995; Roberts et al., 1995) vor allem Milchsäurebakterien (MSB), (Cerning, 1995; Sutherland, 1986) die bereits aus zahlreichen fermentierten Milchprodukten (Forsén, 1966; Macura & Townsley, 1984; Nakajima et al., 1990), sowie aus fermentiertem Fleisch und Gemüse (van den Berg et al., 1993) isoliert wurden.

1.2. Exopolysaccharide von Milchsäurebakterien

Exopolysaccharide (EPS) von Milchsäurebakterien können in 2 Gruppen unterteilt werden (Tab. 1): Homopolysaccharide, die nur aus einem Monomer aufgebaut sind und Heteropolysaccharide, die neben verschiedenster Monomere zusätzlich auch Glycerol-3-Phosphat und N-Acetylaminozucker sowie Phosphat- und Acetylreste aufweisen können (Doco et al., 1990; Nakajima et al., 1992; Yamamoto et al., 1994; Marshall et al., 1995; Robijn et al., 1995, 1996; Stingle et al., 1996). Die Größe der monomeren Wiederholungseinheit reicht von einem Disaccharid bis zum Heptasaccharid. Die meisten Exopolysaccharide von Milchsäurebakterien haben eine molekulare Masse von ungefähr $4 \cdot 10^4$ - $6 \cdot 10^6$ Dalton (De Vuyst & Degeest, 1999). Sowohl das Medium als auch die gewählten Kulturbedingungen können Einfluss auf die Monomerzusammensetzung und die Art der Verknüpfung der Exopolysaccharide haben (De Vuyst & Degeest, 1999).

Darüber hinaus sollen auch stammspezifische Unterschiede hinsichtlich des strukturellen Aufbaus der Exopolysaccharide erwähnt werden (Marshall et al., 1995).

Tab. 1 Beispiele für Exopolysaccharide bei Milchsäurebakterien.

Gruppe	Untergruppe	Beispielpolymere	Spezies
Homopolysaccharide	Alpha-D-Glucan	Dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides subsp.dextranicum</i>
		Mutan	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus sobrinus</i>
	Beta-D-Glucan	Glucane	<i>Pediococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i>
	Fructane	Levan	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. lactorum</i>
	Andere	Polygalactan	<i>Lactococcus lactis subsp.cremoris</i>
Heteropolysaccharide			<i>Streptococcus pneumoniae</i> Antigene bei anderen <i>Streptococcus</i> -Arten <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>

1.3. Genetik der Exopolysaccharidsynthese

Die Synthese von Homo- bzw. Heteropolysacchariden unterscheidet sich zwar im Detail, allerdings spielen bei dem Aufbau der Polymere Zucker-Nukleotide eine zentrale Rolle. Bei der Synthese von Heteropolysacchariden sind neben spezifischen Enzymen auch solche beteiligt, die im zentralen Metabolismus zu finden sind. Die spezifischen Enzyme werden von Genen codiert, die in so genannten *eps*-Genclustern (~ 10-15kb) zusammengefasst sind. Diese findet man entweder auf Plasmiden oder sie sind wie bei einigen *Oenococcus oeni* Stämmen chromosomal lokalisiert (Kolkman et al., 1998; Kleerebezem et al., 1999; Boels et al., 2001; Mozzi et al., 2006).

In Abbildung 2 wird der Mechanismus der Heteropolysaccharid-Synthese bei Milchsäurebakterien gezeigt. An der Synthese sind Zucker-Nukleotide, wie UDP-Glucose, welche im zentralen Stoffwechsel gebildet werden beteiligt. Die Wiederholungseinheit des Polymers wird an einem Lipidcarrier, der in der Cytoplasmamembran verankert ist, zusammengefügt. Der erste Monomerbaustein wird durch eine Glycosyltransferase (Gtase) an den Lipidcarrier gekoppelt. Weitere Monomere werden dann über spezifische Gtasen angefügt. Jede Gtase nutzt dabei die Energie der UDP-osyl Bindung, um die Übertragung der Osyl-Gruppe auf die wachsende Repeateinheit und dadurch die Bildung einer spezifischen Osidischen-Bindung zu gewährleisten. Nach der Fertigstellung der Wiederholungseinheit erfolgt der Export an die Außenseite der Membran, wo die Polymerisation stattfindet. Dieser Mechanismus gleicht dem, der für gram-negative Bakterien beschrieben ist. Der Lipidcarrier wird über eine Flippase nach außen befördert, während eine Polymerase vom nichtreduzierenden Ende her Wiederholungseinheiten an die wachsende Polymerkette anfügt. Ein Faktor, der die Kettenlänge bestimmt, führt letztendlich dazu, dass das Polymer freigesetzt wird.

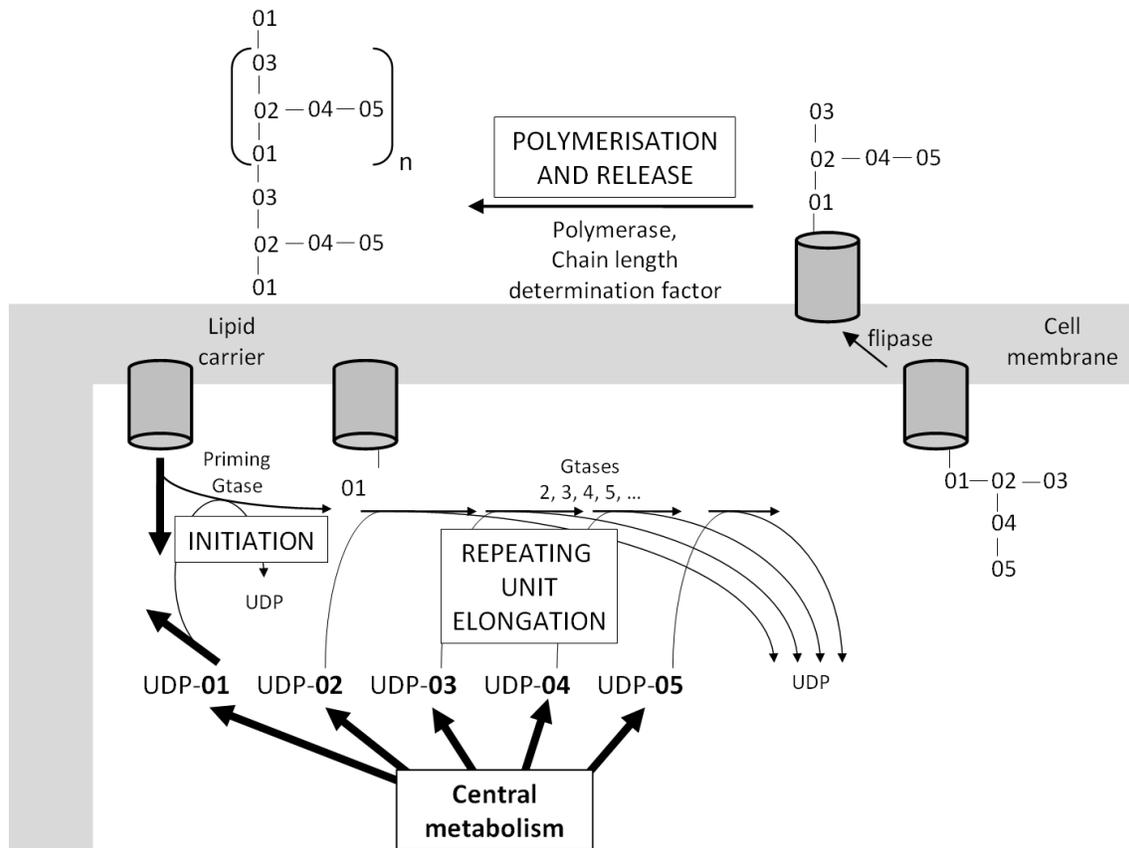


Abb. 2 Schematische Darstellung der Heteropolysaccharidsynthese bei Milchsäurebakterien (MSB). O osyl (glucosyl, rhamnosyl, galactosyl, etc.), Gtase Glycosyltransferase (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel, 2009).

Die Synthese von Homopolymeren wie beispielsweise β -Glucane ist ebenfalls an das Glucosyltransferase Gen (*gtf*) gekoppelt, welches bei *Pediococcus damnosus* (Stamm IOEB 8801) und *Lactobacillus diolivorans* jeweils auf einem 5,5 kb Plasmid (pF 8801) und bei *Pediococcus parvulus* (Stamm 2.6) auf einem 35 kb Plasmid (pPP 2) lokalisiert ist (Werning et al., 2006). Eine Studie zeigte, dass durch eine schrittweise Überführung von schleimbildenden Kolonien in Medien ohne Ethanol der schleimende Phänotyp mit dem Verlust des Plasmids pF 8801 einherging (Lonvaud-Funel et al., 1993). Durch die Sequenzierung der Plasmide konnten die Gene (*dps* und *gtf*) identifiziert werden, die an der β -Glucansynthese beteiligt sind (Abb. 3).

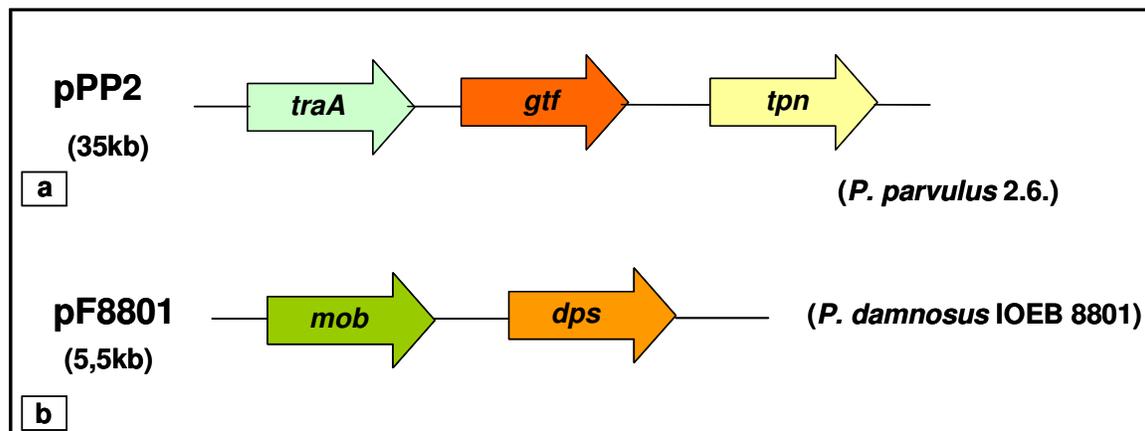


Abb. 3 Lokalisation der Glucan Synthesegene auf den entsprechenden Plasmiden: Plasmid pPP2 von *Pediococcus parvulus* 2.6 (oben) und Plasmid pF8801 von *Pediococcus damnosus* (unten) (Werning et al., 2006). *Dps* codiert für eine putative Glucansynthase. *Gtf* codiert für die Glucosyltransferase. *TraA* und *mob* codieren für Plasmidtransferproteine. *Tpn* codiert für eine putative Transposase.

Das *gtf*- Gen zeigt zu über 98% Identität unter den Spezies *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus parvulus* und *Lactobacillus diolivorans* auf. In allen Fällen codiert es für ein 65 kDa bifunktionelles Transmembranprotein, die Glycosyltransferase, welches zum einen die Synthese der beiden verschiedenen glykosidischen Bindungen im β -Glucan aus UDP-Glucose synthetisiert und zum anderen für die Freisetzung der wachsenden Polymerkette verantwortlich ist (Abb. 4) (Lonvaud-Funel et al., 1993; Fernandez et al., 1995; Llull et al., 2001; Walling et al., 2005; Werning et al., 2006).

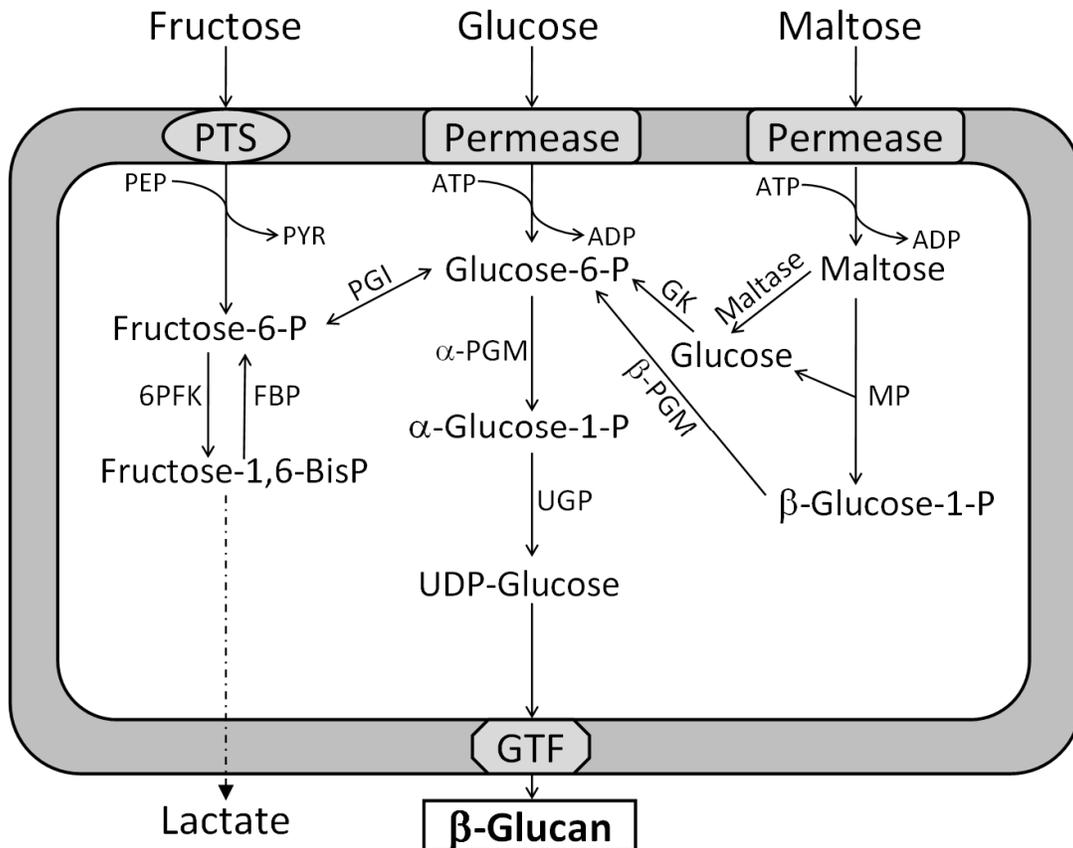


Abb. 4 Vorgeschlagener Metabolismus für Glucose, Maltose und Fructose sowie die Biosynthese des β -Glucan aus *Pediococcus parvulus* 2.6. (GTF) Glycosyltransferase, (FPB) Fructose-1,6-bisphosphatase, (6PFK) 6-Phosphofruktokinase, (PGI) Phosphoglucoseisomerase, (α -PGM) α -Phosphoglucomutase, (β -PGM) β -Phosphoglucomutase, (MP) Maltosephosphorylase, (PTS) Phosphoenolpyruvat-Zucker-Phosphotransferasesystem, (UGP) UDP-Glucosepyrophosphorylase (Velasco et al., 2007).

1.4. Milchsäurebakterien in der Weinbereitung

Die Fermentation von Traubenmost zu Wein ist ein komplexer Prozess, an dem neben verschiedensten Hefen hauptsächlich Milchsäurebakterien (MSB) eine wichtige Rolle spielen. Milchsäurebakterien, die bisher aus Traubenmost und Wein isoliert wurden, lassen sich zwei Familien zuordnen. Die *Lactobacillaceae* umfassen die Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* und die Familie der *Leuconostocaceae*, zu welcher die Gattungen *Leuconostoc*, *Weissella* und *Oenococcus* gehören (Tab. 2).

Tab. 2 Auswahl einiger Milchsäurebakterien in der Weinbereitung.

Gattung	Morphologie	Stoffwechsel	Spezies
		obligat heterofermentativ	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus buchneri</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus fructivorans</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus</i>	Stäbchen	fakultativ heterofermentativ	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Pediococcus</i>	Kokken	obligat homofermentativ	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus parvulus</i> <i>Pediococcus inopinatus</i>
		fakultativ heterofermentativ	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Leuconostoc</i>	Kokken	obligat heterofermentativ	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>subsp. mesenteroides</i>
<i>Weissella</i>	Kokken	obligat heterofermentativ	<i>Weissella paramesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Kokken	obligat heterofermentativ	<i>Oenococcus oeni</i>

Milchsäurebakterien sind gram-positive, nicht sporulierende und Katalase negative Organismen, die sauerstoff- und säuretolerant sind. Morphologisch gesehen, bilden sie sowohl Stäbchen als auch Kokken.

Bezüglich ihres Stoffwechsels können sie in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Homofermentative Spezies produzieren < 85% Milchsäure als einzigstes Gärprodukt, während heterofermentative und fakultativ heterofermentative Arten neben Milchsäure, CO₂ und Ethanol / Acetat bilden.

Intakte, unbeschädigte Weintrauben enthalten < 10³ KBE pro Gramm. Daher ist der anfängliche Titer dieser Mikroorganismen im Traubenmost gering (Lanfou – Lafourcade et al., 1983). Während der Verarbeitung der Trauben beginnt das Wachstum der Milchsäurebakterien (10⁴ – 10⁵ KBE pro ml), wobei unterschiedliche Arten zu verschiedenen Zeiten der Weinherstellung dominant auftreten können. Ursache dafür sind eine Reihe von Faktoren. So

begünstigen pH- Werte > 3,5 beispielsweise das Wachstum der *Pediococcus*- und *Lactobacillus*-Arten, während pH-Werte < 3,5 das Wachstum der Spezies *Oenococcus oeni* fördern (Fleet, 1998; Osborne & Edwards, 2005). Weitere Bedingungen, die das Wachstum von Milchsäurebakterien im Wein beeinflussen, sind neben dem Nährstoffangebot, der Temperatur und der Zugabe von SO₂ der Alkoholgehalt. Generell wird das Wachstum von Milchsäurebakterien bei Ethanolkonzentrationen über acht vol% gehemmt. Aber es gibt auch eine Reihe von Ausnahmen. Die Spezies *Oenococcus oeni* toleriert 14 vol% und eine Reihe von *Lactobacillus* - Arten, darunter *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fructivorans* und *Lactobacillus hilgardii* zeigten auch bei Ethanolkonzentrationen von 20 vol% noch Wachstum. Milchsäurebakterien sind vor allem für die malolaktische Fermentation, dem so genannten biologischen Säureabbau, während der Weinherstellung verantwortlich. Hierbei wird die natürlich vorkommende L- Äpfelsäure zur weniger sauren Milchsäure und CO₂ abgebaut, wodurch der Säuregehalt im Wein reduziert wird. Durch die Abnahme des sauren Geschmacks wird der Wein „milder“. Allerdings kann die Stoffwechselaktivität einiger Milchsäurebakterien zu unerwünschten Verbindungen führen, die eine Reihe von Weinfehlern verursachen. Auf den Lindton wird in Abschnitt 1.6 näher eingegangen.

1.5. Die Gattung *Pediococcus*

Pediokokken sind gram-positive Milchsäurebakterien (MSB), die unter fakultativ aeroben bis mikroaerophilen Bedingungen wachsen (Garvie, 1986). Neben einer negativen Katalase- und Oxidasereaktion sind sie bezüglich ihres Glucose-Stoffwechsels homofermentativ, obwohl einige *Pediococcus*-Arten, darunter *Pediococcus pentosaceus*, auch Pentosen über den Pentosephosphatweg abbauen können und somit fakultativ heterofermentativ sind. Von allen anderen Milchsäurebakterien unterscheiden sie sich morphologisch durch die Bildung von Tetraden (Abb. 5). Die Tetradenbildung entsteht durch unvollständige Trennung der Zellwände. Die einzelnen Zellen besitzen einen Durchmesser von 0,3-1,5 µm (Garvie, 1986).

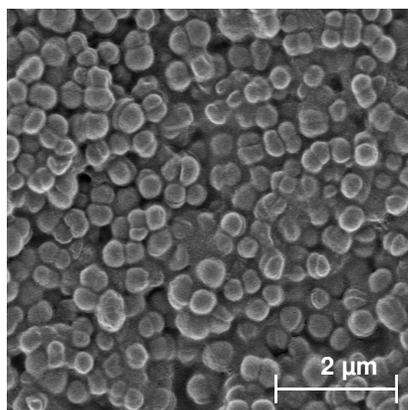


Abb. 5 REM-Aufnahme von *Pediococcus parvulus*.

Die koccidien Zellen sind in Tetraden angeordnet. Der Durchmesser der Zellen beträgt ca. 0,3 µm.

Die Gattung *Pediococcus* wurde 1903 erstmals im Zusammenhang mit verdorbenem Bier erwähnt (Claussen, 1903). Zur Zeit gibt es 11 gültig beschriebene Arten: *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. cellicola*, *P. ethanolidurans*, *P. siamensis*, *P. claussenii*, *P. stilesii*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* und *P. dextrinicus*. Das Auftreten der Arten *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* und *P. parvulus* wurde in den frühen Stadien des Bierbrauprozesses beobachtet (Barney et al., 2001). Seltener wurden die Arten *P. inopinatus* und *P. dextrinicus* im Zusammenhang mit verdorbenem Bier erwähnt (Back, 1978). Durch das Wachstum von Pediokokken während der Fermentierung von Bier werden eine Reihe von Fehltonen verursacht. Dazu gehören Trübungen, sowie Geschmacksveränderungen durch Diacetyl-Bildung (Sakamoto & Konings, 2003). Darüber hinaus kann es auch zur Bildung von Exopolysacchariden kommen (Simpson & Taguchi, 1995).

Aus Weinen mit Fehltonen wurden hauptsächlich Stämme der Arten *P. damnosus* und *P. parvulus* isoliert (Weiller & Radler, 1970; Beneduce et al., 2004; Pfannebecker & Fröhlich, 2008). Die Weine besaßen einen Milchsäureton (Diacetyl und Acetoin) oder eine erhöhte Viskosität durch β -Glucanbildung. Aufgrund der hohen Ethanol-Toleranz (> 12 Vol.%) und der Toleranz gegenüber freiem SO_2 (30-50 mg/l) können einige Pediokokken-Stämme auch während der Lagerung des Weines wachsen. Zwar sind Pediokokken am biologischen Säureabbau beteiligt, allerdings wegen ihrer Fähigkeit zur Bildung von Diacetyl in hohen Konzentrationen unerwünscht (Wibowo et al., 1985). Die Weinqualität wird auch durch die Bildung biogener Amine wie Histamin während des Wachstums einiger Stämme gemindert (Weiller & Radler, 1976; Bover-Cid & Holzapfel, 1999). Zum Schluss soll noch erwähnt werden, dass einige *Pediococcus*-Arten in der Lage sind, Glycerin zu Acrolein abzubauen. Diese Substanz kann mit Anthocyanen reagieren und zur Bildung bitterer Substanzen führen (Davis et al., 1988; Du Toit & Pretorius, 2000).

Stämme der Arten *P. acidilactici*, *P. parvulus* und *P. pentosaceus* werden häufig als Starterkulturen zur Fermentierung von Milch (Back, 1999), Fleisch (Kang & Fung, 1999) und pflanzlichen Produkten wie Silage (Günther & White, 1961), Sauerkraut (Coster & White, 1964) und anderen Gemüsesorten eingesetzt.

1.6. Exopolysaccharidbildung im Wein

Der Lindton, ein Weinfehler, der häufig von Milchsäurebakterien verursacht wird, ist bei säurearmen Weinen und Obstweinen nicht selten (Fugelsang & Edwards, 2007). Er wurde zuerst von Pasteur für Weine beschrieben (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel, 2009), später auch von anderen Autoren für Biere und andere fermentierte Getränke (van Oevelen & Verachtert, 1979; Lonvaud-Funel & Joyeux, 1988; Dueñas et al., 1995; Fernandez et al., 1995).

Das „Zäh- oder Lindwerden“ des Weines (engl. „ropiness“ oder „oiliness“) macht sich durch eine erhöhte Zunahme der Viskosität bemerkbar (Walling et al., 2005). Diese Weine sind schwerer, viskoser als normale Weine und sie fließen ölig und geräuschlos aus den Gefäßen (Ibarburu et al., 2007). Die Ursache des Phänomens liegt in der Bildung von Polysacchariden aus Glucose (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel, 2009). Fructose können nur die weniger säureverträglichen Arten *Leuconostoc mesenteroides subsp. lactorum*, *Leuconostoc infrequens* und *Leuconostoc blayaisense* zu Levan polymerisieren (Dittrich & Grossmann, 2005).

Bereits sehr niedrige Glucose- Konzentrationen von 50-100 mg/l reichen aus, um Exopolysaccharide zu bilden. Dies erklärt auch teilweise die Tatsache, dass das Zähwerden des Weines

nicht nur während der Gärung, sondern auch erst einige Monate nach der Abfüllung auftreten kann (Walling et al., 2005; Fugelsang & Edwards, 2007; Du Toit & Pretorius, 2000).

Mitglieder der Gattungen *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* und sogar *Oenococcus oeni* konnten bereits aus „linden“ Weinen und Apfelweinen isoliert werden (Luthi 1957; van Oevelen & Verachtert 1979; Lonvaud-Funel & Joyeux, 1988; Manca de Nadra & Strasser de Saad, 1995; Dueñas et al., 1995; Fernandez et al., 1995; Werning et al., 2006).

Exopolysaccharidbildende Stämme sind resistenter gegenüber SO_2 , Ethanol und niedrige pH-Werte als Stämme, die kein EPS bildeten (Lonvaud - Funel & Joyeux, 1988; Lonvaud-Funel et al., 1993; Dols-Lafargue et al., 2008). Das Polymer trägt darüber hinaus zur Biofilmbildung und Zelladhäsion an Trauben und Geräten bei. Die Biofilmbildung begünstigt das Überleben der Organismen im Falle extremer Bedingungen (Mah & O`Toole, 2001).

Das Auftreten der Gattung *Pediococcus* kann in säurearmen, trockenen Weinen zur Exopolysaccharidbildung führen (Fugelsang & Edwards, 2007). Bedingungen im Wein, wie pH-Werte über 3,5 begünstigen die Exopolysaccharid- Bildung durch *Pediococcus damnosus* (Walling et al., 2005). Eine Zellzahl von 10^6 bis 5×10^6 Kokken / ml ließ einen Wein leicht bis deutlich zäh werden, ab 5×10^6 Zellen war er schwer fehlerhaft (Dittrich & Großmann, 2005). Ab 10^7 KBE / ml ist ein Wein schließlich deutlich viskos (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Zu den häufigsten Weinverderber gehört allerdings *Pediococcus parvulus* (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel, 2009). Einer Studie bei der 147 Milchsäurebakterien auf die Fähigkeit zur Exopolysaccharidbildung hin überprüft wurden, zeigte, dass alle 32 EPS-positiven Stämme der Art *Pediococcus parvulus* zugeordnet werden konnten (Garai-Ibabe et al., 2010).

Die Spezies *Pediococcus parvulus* 2.6 bildet aus dem verbleibenden Restzucker im Wein ein extrazelluläres, hochmolekulares β -D-Glucan (Tab. 1) mit einer Molekülgröße von 500-2000 kDa (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel, 2009). Das Polymer besteht aus einem sich wiederholenden Trisaccharid mit einer β -1,3-glykosidisch verknüpften Hauptkette, an der an jedem zweiten Glucosemolekül der Hauptkette ein β -1,2-glykosidisch verknüpfter D-Glucopyranosylrest vorkommt (Llaubères et al., 1990; Lonvaud-Funel, 1999; Werning et al., 2006) (Abb. 6).

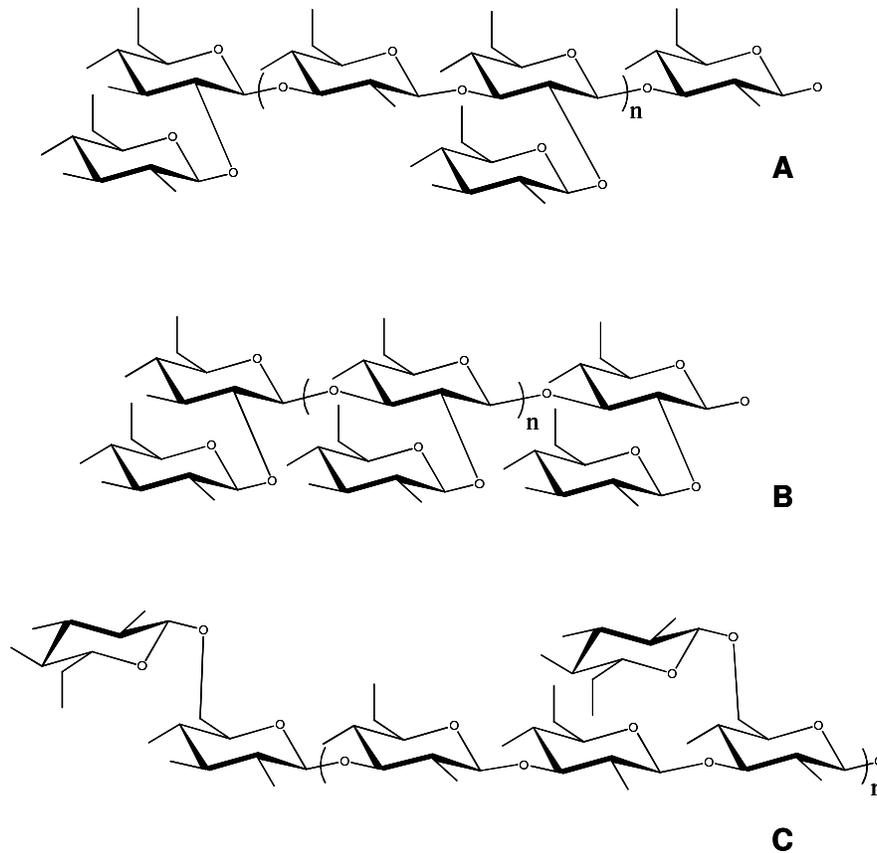


Abb. 6 Schematische Darstellung der chemischen Struktur des *P. damnosus* β -Glucan (A), *S. pneumoniae* β -Glucan (B) und *B. cinerea* β -Glucan (C).

Das Polymer zeigt, bis auf den Verzweigungsgrad, strukturelle Ähnlichkeit mit dem kapsulären Polysaccharid aus *Streptococcus pneumoniae* Typ 37 (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel 2009) (Abb.6). Sowohl *Oenococcus oeni* als auch *Lactobacillus diolivorans* Stämme synthetisieren dieses Glucan (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel 2009).

Neben dem β -Glucan, bildet die Spezies *Oenococcus oeni* (Stamm 14) zwei Heteropolysaccharide bestehend aus Glucose, Galactose und Rhamnose (Ibarburu et al., 2007). Unabhängig vom untersuchten Stamm, bildet *Oenococcus oeni* nur geringe Mengen (50-200 mg/l) an Polymer (Ibarburu et al., 2007). Obwohl einige Pediokokken-Stämme auch aus Fructose, Maltose, Galactose, Xylose oder Arabinose das β -1,3 Glucan synthetisieren konnten, wurde mehr Glucan (140-200 mg/l) gebildet, wenn sie auf Glucose wuchsen (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel, 2009). Viskositätsänderungen im Wein traten schon bei Glucanmengen von 20-30 mg/l auf (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel, 2009).

Die Fähigkeit zur Bildung von Exopolysacchariden ist auch unter Essigsäurebakterien, verschiedenen Hefen und Schimmelpilzen weit verbreitet (Dittrich & Grossmann, 2005).

In diesem Zusammenhang soll *Botrytis cinerea*, ein phythopathogener Pilz, erwähnt werden, der unter anderem durch die Bildung von Polysacchariden während der Weinbereitung große Schäden verursachen kann.

Bei *Botrytis cinerea* konnten 2 Gruppen von Exopolysacchariden identifiziert werden (Dubourdieu, 1982). Die Heteropolysaccharide mit einer molekularen Masse zwischen 10 und 50 kDa bestehen hauptsächlich aus Mannose, Galaktose, Glucose und Rhamnose. Diese alkohollösliche Fraktion ist weitaus weniger bekannt, als das Glucose (Glucan) Homopolymer Cineran.

Cineran ist ein lineares β -1,3-glykosidisch verknüpftes D-Glucosepolymer mit vereinzelt β -1,6 Seitenketten an jedem zweiten oder dritten Glucosemolekül der Kette (Abb. 6) (Dubourdieu et al., 1981). Die molekulare Masse des Glucans beträgt etwa 10^5 - 10^6 Dalton. Einige Stämme von *Botrytis cinerea* bilden nur Cineran als einziges Polymer (Leal et al., 1976; Stahmann et al., 1992). Etwa 60% des extrazellulären Polysaccharids liegt hierbei als Kapsel vor, während die restlichen 40% als Schleim ins Medium abgegeben werden (Pielken et al., 1990). Während der Wachstumsphase produziert der Pilz etwa 300 mg/l Cineran und ungefähr 50 mg/l Heteropolysaccharide (Dubourdieu, 1982). Untersuchungen haben gezeigt, dass das β -1,3-Glucan dem Pilz als extrazellulärer Energiespeicher dient (Stahmann et al., 1992). Darüber hinaus dient es als Schutzfilm gegenüber antifugalen Agenzien (Gil-ad et al., 2001). Diese Eigenschaft begünstigt somit auch dessen Pathogenität gegenüber verschiedenen Wirtspflanzen.

1.7. Motivation

Wie bereits mehrfach erwähnt, sind hauptsächlich die Exopolysaccharide von Milchsäurebakterien, aber auch das Cineran aus *Botrytis cinerea* für eine verminderte Weinqualität verantwortlich.

Weine mit abnormaler Viskosität bergen zwar kein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel, 2009), können allerdings auch nicht verkauft werden und stellen somit für die Winzer ein Problem dar.

Des Weiteren verursachen die Biopolymere Klärungs- und Filtrationsschwierigkeiten. Mit Ethanol werden Molekülaggregate gebildet, die während der Filtration des Weines zu Belegungen der Filtermembranen führen, die dann entweder kostenintensiv regeneriert, bzw. erneuert werden müssen (Wucherpennig et al., 1984; Vernhet et al., 1999). In der Regel reichen schon 2-3 mg/l Glucan aus, um eine Hemmung der Filtration hervorzurufen.

Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurden bereits einige PCR-Methoden entwickelt, um potentielle „schleimende“ Stämme so früh wie möglich während der Weinbereitung zu detektieren (Werning et al., 2006). Durch die Früherkennung der entsprechenden Organismen, soll die Bildung von Exopolysacchariden vermieden werden. Weitere Methoden umfassen ein intensives Schwefeln und mechanisches Durchmischen des Weines. Diese Behandlungen können allerdings nicht gewährleisten, dass die betreffenden Organismen bzw. der Lindton dauerhaft eliminiert werden. Ein Grund hierfür ist die hohe Resistenz von schleimbildenden Organismen gegenüber Schwefeldioxid (Dols-Lafargue et al., 2008). Ein Erhitzen des Weines kurz vor der Abfüllung ist eine weitere, wenn auch weniger gebräuchliche Methode für exopolysaccharidanfällige Weine.

In der Weintechnologie werden allerdings hauptsächlich enzymatische Präparate zur Lyse der Glucane eingesetzt. Diese Rohextrakte wurden bereits aus *Trichoderma sp.* oder *Aspergillus niger* (Watanabe et al., 1992; Coenen et al., 1995; El-Katatny et al., 2001; Bara et al., 2003) isoliert und können käuflich erworben werden (Trenolin, Erbslöh; Panzym Fino G, Begerow; Lallzym, Lallemand). Diese Enzympräparate besitzen allerdings neben β -1,3-Glucanaseaktivität auch verschiedenste Begleitaktivitäten wie Pektinasen oder β -Glucosidasen. Durch diese Begleitaktivitäten wird die spezifische Aktivität gegen β -Glucane herabgesetzt. Darüber hinaus sollte erwähnt werden, dass die Enzyme vornehmlich dazu verwendet werden, um das β -1,3(1,6)-Glucan von *Botrytis cinerea* zu lysieren. Präparate, die spezifisch gegen das Exopolysaccharid von *Pediococcus sp.* wirken sind in diesem Zusammenhang nicht bekannt. Ein Grund hierfür könnte die zusätzliche β -1,2 Verknüpfung im β -1,3-Glucan sein, welche einen enzymatischen Abbau erschwert. Dadurch, dass unter den Milchsäurebakterien häufig *Pediococcus parvulus* als Hauptverderber durch die Bildung von Exopolysacchariden im Wein auftritt, sollen im Rahmen dieser Promotion geeignete Lösungsansätze zur Behebung der Exopolysaccharidproblematik durch Pediokokken erarbeitet werden.

1.8. Ziele der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Forschungsarbeit sollte nach β -Glucanasen gesucht werden, die in der Lage sind, das Exopolysaccharid von *Pediococcus parvulus* effektiv genug zu lysieren, um dadurch dem „Lindwerden“ des Weines entgegenzuwirken.

Hierzu sollte zunächst ein geeigneter *Pediococcus*-Stamm gefunden werden, der das Exopolysaccharid bildete. In einem Screening wurden hierfür verschiedene Pediokokken auf ihre Fähigkeit zur Exopolysaccharidbildung untersucht. In weiteren Versuchen wurde die

β -Glucansynthese des ausgewählten *Pediococcus parvulus*- Stammes unter verschiedenen Kulturbedingungen getestet. Nach der Gewinnung des Exopolysaccharids, musste das Polymer zuerst charakterisiert werden, um feststellen zu können, welche Enzyme für einen späteren Abbau des Zuckers benötigt wurden. Hierbei stand in besonderer Weise der strukturelle Aufbau des Exopolysaccharids im Vordergrund.

Nach der Charakterisierung des Polymers wurde im nächsten Schritt nach potentiellen β -Glucanaseproduzenten gesucht, die das Exopolysaccharid von *Pediococcus parvulus* hydrolysierten.

Nach der Auswahl eines geeigneten Enzymproduzenten, wurden verschiedene Kulturbedingungen hinsichtlich einer optimalen Enzymproduktion getestet. In weiteren Schritten sollte die Glucanase dann biochemisch charakterisiert und zum Schluss gereinigt werden. Abschließend sollte gezeigt werden, wie das Enzym das Exopolysaccharid spaltete.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Hilfsmittel

- Agarose – Elektrophorese – Einheit Bio – Rad, München
 - Gelkammer: Sub Cell Modell 96
 - Spannungsgerät: Power Pac Basic
- Applikatorstreifen für IEF Serva, Heidelberg
- Autoklav Certoclav Certoclav, Taun, Österreich
- Autoklav Fedegari Tecnomara, Zürich, Schweiz
- Autoklav Systec Typ V – 150 Systec, Wettengel
- Blot – Apparatur Pegasus Phase, Mölln
- Concentrator 5301 Eppendorf, Hamburg
- Cross – Flow- System Sarto Jet Sartorius, Göttingen
 - Sartoco[®]n Slice Cassette PESU 0,1 µm
 - Sartoco[®]n Slice Cassette PESU 5 kDa
 - Sartoco[®]n Slice Cassette Hydrosart[®] 100 kDa
- Dialysekapsel Roth, Karlsruhe
- Digitalkamera Coolpix 4500 Nikon, Tokyo, Japan
- Elektrophoresekammer (für PAGE) Sigma, Steinheim
- Exsikkator mit Vakuumölpumpe Trivac D 4B Leybold, Köln
- FPLC – Apparatur Pharmacia
 - Single Path Monitor UV-1 (Control Unit)
 - Single Path Monitor UV-1 (Optical Unit)
 - zwei Pumpen des Typs Pump P -500
 - Gradientenprogrammiergerät GP-250
 - Fraktionssammler Frac-100
 - Schreiber
 - Anionenaustauschersäule Mono Q HR 5/5 GE Healthcare, Freiburg
 - Größenaustauschersäule Superdex[™] G 75 H 10/30 GE Healthcare, Freiburg
- Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT2 Steris, Hürth
- Geldokumentationseinheit Bio Vision CN 3000 Vilber – Lourmat, Eberhardzell
 - incl. Bedienungssoftware: Vision Capt 14.1
- Glasplatten für Polyacrylamidgelle Sigma, Steinheim

- GPC – Anlage
 - Pumpe Gynkotec P580A Dionex, Idstein
 - Probensammler Gynkotec Marathon Dionex, Idstein
 - Detektor Gynkotec RI 71 Dionex, Idstein
 - Säulen: Vorsäule Hema Bio 40 Polymer Standard Service (PSS), Mainz
 - Hema Bio 40, 4×10^4
 - Hema Bio 1000, 7×10^6
 - Suprema 3000
- Heizblock Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg
- HPLC – Apparatur I Shimadzu, Koyoto, Japan
 - 1 Pumpe LC – 6A
 - Automatischer Probengeber SIL – 10ADvP
 - System Controller SCL – 6B
 - Schreiber C - R8A Chromatopac
 - Refraktometer Refractive Index Detector 156 Beckman Coulter, Krefeld
 - Multimeter Hung Chang 6010 (200 μ A)
 - Säule: Aminex[®] HPX – 87H 300mm x 7,8 mm
- HPLC – Apparatur II (gepulste Amperometry)
 - Elektrochemischer Detektor ED 40 Dionex, Idstein
 - Säule: Carbo Pac[™] PA1 4x 50mm Dionex, Idstein
 - Pumpensystem LC – 10 Ai Shimadzu, Koyoto, Japan
 - System Controller SCL – 10 VP Shimadzu, Koyoto, Japan
- IEF – Apparatur Multiphor II LKB, Bromma, Schweden
- Inkubator G 25 New Brunswick Scientific, Nürtingen
- Magnetrührer IKA, Staufen
- Mastercycler gradient Eppendorf, Hamburg
- Microliterzentrifuge Biofuge pico Heraeus, Hanau
- Mikropipetten Eppendorf, Hamburg
- Mikroskop SM Lux Leitz, Wetzlar
- pH – Meter CG 840 Schott, Mainz
- Photometer Specord 50 Analytic Jena, Jena
- Reinstwasseranlage: Milli – RO Plus 30 + Milli-Q plus 185 Millipore, Eschborn

- Software
 - Rheology Advantage TA Instruments, New Castle, USA
Instruments Control AR (version 3.0)
 - PSS WinGPC Scientific V 4.02 Polymer Standard Service (PSS), Mainz
 - Bio – 1D 12.09 Vilber – Lourmat, Eberhardzell
 - Spannungsgerät Consort E122 Consort, Turnout, Belgien
- Ultraschallgerät Branson sonifier, Danbury, USA
- Viskosimeter AR 1000 TA Instruments, New Castle, USA
- Vortex Gerät Vortex- Genie 2 Scientific Industries, USA
- Waagen Sartorius, Göttingen
- Zentrifuge Typ 2 – 16K Sigma, Osterode
- Zentrifuge Typ 5415 – D Eppendorf, Hamburg
- Zentrifuge Avanti[®] J – E Beckman Coulter, Krefeld
- Zentrifuge J2 – MC Beckman Coulter, Krefeld

2.2. Verbrauchsmaterial

- Anionenaustauscher – Säulchen Vivapure Q Mini H Sartorius, Göttingen
- Deckgläser, 18 x 18 mm Menzel, Braunschweig
- Dialyseschläuche, Porengröße: 14 kDa Roth, Karlsruhe
- Elektroden – Dochte für IEF Serva, Heidelberg
- Eppendorfgefäße: 1,5 / 2 ml Eppendorf, Hamburg
- Falcon – Gefäße: 15 ml und 50 ml Fisher, Schwerte
- HPTLC- Platten (Kieselgel Si 60) Merck, Darmstadt
- IEF – Gel, Servalyt Precotes 3-10, 125 x 125 mm Serva, Heidelberg
- Küvetten, 1,5 ml, halbmikro Roth, Karlsruhe
- Membranfilter, 25 mm Syringe, 0,45 µm und 0,2 µm Fisher, Schwerte
- Membranfilter, 25 mm, 5µm Roth, Karlsruhe
- Microcon, YM 10 Millipore, Eschborn
- Objektträger Menzel, Braunschweig
- Pipettenspitzen Starlab, Ahrenburg
- Plastik – Petrischalen Fisher – Schwerte
- PVDF – Membran, 0,45 µm Millipore, Eschborn
- Vivaspin 20: 5 kDa Sartorius, Göttingen

2.3. Chemikalien

• Aceton	Roth, Karlsruhe
• Acrylamid / Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
• Agar	Hartge, Hamburg
• Agarose peqGold Standard-Agarose	Roth, Karlsruhe
• Aminocaprinsäure	Sigma, Steinheim
• Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
• Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
• Borsäure	Roth, Karlsruhe
• Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
• Catechin	Roth, Karlsruhe
• Coomassie Brilliantblau R-250	Roth, Karlsruhe
• Deuteriumoxid	Merck, Darmstadt
• Diammoniumhydrogencitrat	Merck, Darmstadt
• Dikaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
• Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
• 3,5 – Dinitrosalicylsäure	Sigma, Steinheim
• Dinatriumsulfit	Merck, Darmstadt
• Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
• Essigsäure	Roth, Karlsruhe
• Ethanol reinst.	Roth, Karlsruhe
• Ethanol vergällt	Mundo OHG, Mainz - Kostheim
• Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
• Fleischextrakt	Merck, Darmstadt
• Ferulasäure	Roth, Karlsruhe
• Gallussäure	Roth, Karlsruhe
• Glucose	Roth, Karlsruhe
• Glycin	Roth, Karlsruhe
• Hefeextrakt (Typ 900)	Hartge, Hamburg
• Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
• Kaliumnatriumtetrat – Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
• Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe

• Mangansulfat	Roth, Karlsruhe
• Methanol	Roth, Karlsruhe
• 4-Methoxybenzaldehyd (Anisaldehyd)	Merck, Darmstadt
• Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
• Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
• Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
• Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
• Natriumhydroxid (50%)	Merck, Darmstadt
• Natriumnitrat	Roth, Karlsruhe
• Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	Roth, Karlsruhe
• Pepton aus Fleisch	Roth, Karlsruhe
• Phenol	Roth, Karlsruhe
• Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
• Salzsäure	Roth, Karlsruhe
• Schwefelsäure	Sigma, Steinheim
• Stickstoff	Westfalen,Münster
• Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
• Trifluoressigsäure	Sigma, Steinheim
• Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
• Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
• Triton X [®] - 100	Roth, Karlsruhe
• Tryptische Soja-Nährbouillon (Difco)	Becton, Dickinson & Co., Sparks, USA
• Tween 80	Merck, Darmstadt
• Wasser (deion.): Milli RO Plus	Millipore, Eschborn
• Yeast Nitrogen Base (Difco)	Becton, Dickinson & Co., Sparks, USA

2.4. Biochemikalien, Enzyme und Kits

Biochemikalien

• Anodenflüssigkeit 3 für IEF	Serva, Heidelberg
• Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
• Carboxymethyl- Pachyman	Megazyme, Irland
• Chitin aus Krabben	Sigma, Steinheim

- Chitin azure Sigma, Steinheim
- DNA – Längenstandard Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331
- dNTP – Mix Peqlab, Erlangen
- Dextran – Standards (180–277000 g / mol) PSS, Mainz
- Dextran – Standards (670000 & 1,4 Mio g / mol) Sigma, Steinheim
- Dextran aus *Leuconostoc sp.* Sigma, Steinheim
- Enhancer Solution P (5x) Peqlab, Erlangen
- Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor-white) Sigma, Steinheim
- Hefacell® (Hefezellwandpräparat) Erbslöh, Geisenheim
- Katodenfließigkeit 10 für IEF Serva, Heidelberg
- Laminarin von *Laminaria digitata* Sigma, Steinheim
- Lugolsche Lösung Merck, Darmstadt
- Magnesiumchlorid – Lösung (3,5 mM) Peqlab, Erlangen
- Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae* Sigma, Steinheim
- MassRuler™ (6x) Loading Dye Solution Fermentas, St. Leon-Rot
- Oligonukleotide (100 µM) Operon, Köln
- Pachyman Megazyme, Irland
- PageRuler™ Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Protein Ladder SM0671
- PCR – Puffer (10x) Peqlab, Erlangen
- Protein – Standard: IEF Marker 3–10 Serva, Heidelberg
- Protein – Probenpuffer: Rotiload 1 Roth, Karlsruhe
- Pullulan aus *Aureobasidium pullulans* Sigma, Steinheim
- Pustulan Roth, Karlsruhe
- Taq – Polymerase SAWADY (5U / µl) Peqlab, Erlangen
- Wasser für die Molekularbiologie Roth, Karlsruhe

Enzyme

- Lysozym aus Hühnereiweiß Sigma, Steinheim
- Laminarinase (Endo- β -1,3(4) - glucanase) aus *Trichoderma sp.* Sigma, Steinheim

Kits

- BC – Assay protein quantification kit Uptima, Monteluçon, Frankreich
- DNeasy[®] Blood & Tissue Kit Qiagen, Hilden
- PageSilver[™] Silver Staining Kit Fermentas, St. Leon - Rot
- QIAquick[®] PCR Purification Kit Qiagen, Hilden

2.5. Oligonukleotide (Primer)

Tab. 3 Verwendete Oligonukleotide zur 16S rDNA Sequenzierung und zum Nachweis des *gtf*-Gens bei *P. Parvulus* B399.

Primer ^a	Sequenz (5'→3')	bp	GC (%)	T _m (°C) ^b
Primer zur 16S rDNA Sequenzierung				
Pur Eubak3 (R)	AGA AAG GAG GTG ATC C	16	50	54,1
Pur Eubak5 (F)	AGA GTT TGA TCM TGG CT	17	44	53,5
Primer zum Nachweis des <i>gtf</i> - Genes (Werning et al., 2006)				
GTFF (F)	CGG TAA TGA AGC GTT TCC TG	20	50	60,4
GTFR (R)	GCT AGT ACG GTA GAC TTG	18	50	57,6

^aPrimerbezeichnung: F \triangleq Forward; R \triangleq Reverse

^bMittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers

2.6. Puffer und Lösungen

2.6.1. DNA – Isolierung

- **Lyse – Puffer**
 - TRIS, pH 8,0 20 mM
 - EDTA 2 mM
 - Triton X[®] - 100 1,2%
 - deion. Wasser ad 50 ml
 - Lysozym (kurz vor Gebrauch hinzugeben) 20 mg /ml

2.6.2. Agarose – Gelelektrophorese

- **Agarosegel (1,5%)**
 - Agarose 2,25 g
 - 1 x TBE- Puffer (pH 8,3) 150 ml
- **DNA- Färbelösung**
 - Ethidiumbromid (10mg / ml) 200 µl
 - 1 x TBE – Puffer 1000 ml
- **TBE – Elektrophoresepuffer (10 x, pH 8,3)**
 - TRIS 890 mM
 - Borsäure 890 mM
 - EDTA 20 mM
 - deion. Wasser ad 1000 ml

2.6.3. Protein - Blot

- **Anodenpuffer (pH 10,4)**
 - TRIS 0,3 M
 - Methanol 10% (w/v)
- **Kathodenpuffer (pH 9,4)**
 - TRIS 25 mM
 - Aminocapronsäure 40 mM
 - Methanol 10% (w/v)
- **Färbelösung**
 - Coomassie Brilliantblau R-250 0,1% (w/v)
 - Methanol 50% (w/v)
 - Essigsäure 7% (w/v)

- **Entfärbelösung I**
 - Methanol 50% (w/v)
 - Essigsäure 7% (w/v)

- **Entfärbelösung II**
 - Methanol 90% (w/v)
 - Essigsäure 10% (w/v)

2.6.4. Isoelektrische Fokussierung

- **Fixierlösung**
 - Trichloressigsäure 20% (w/v)

- **Serva Violet Stammlösung 14**
 - Serva Violett 17 Pulver 0,2% (w/v)

- **Stammlösung 2**
 - Phosphorsäure 20% (w/v)

- **Entfärbelösung**
 - Phosphorsäure 3% (w/v)

2.6.5. SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – PAGE)

- **Trenngelpuffer**
 - TRIS 121,0 g/l

der pH – Wert wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt

- **Sammelgelpuffer**
 - TRIS 121,0 g/l

der pH – Wert wurde mit HCl auf 6,8 eingestellt

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

- **Proteinfärbelösung**
 - Ethanol 500 ml/l
 - Eisessig 100 ml/l
 - Coomassie Blue R250 500 mg/l
- **Entfärbelösung**
 - Eisessig 70 ml/l
 - Ethanol 100 ml/l

2.6.6. Aktivitätstests

- **3,5- Dinitrosalicylsäure (DNS) – Reagenz**
 - 3,5- Dinitrosalicylsäure 10,0 g/l
 - NaOH (fest) 20,0 g/l
 - Phenol 2,0 g/l
 - Na₂SO₃ 0,5 g/l
 - K, Na –Tartrat 400 g/l

2.6.7. Aktivitätsgele

- **Phosphatpuffer (10 mM; pH 5,9)**
K₂HPO₄ 1,74 g/l
Na₂HPO₄ 1,42 g/l
- **Renaturierungspuffer**
 - Isopropanol 250 ml/l
 - Phosphatpuffer (10 mM; pH 5,9) 750 ml/l

2.6.8. Dünnschichtchromatographie

- **Laufmittel**
 - Butanol 50 ml
 - Ethanol 30 ml
 - dH₂O 20 ml

Sprühreagenz (Anisaldehyd-H₂SO₄)

- 96% Ethanol 45 ml
- 4-Methoxybenzaldehyd 2,5 ml
- Schwefelsäure 2,5 ml
- einige Tropfen Essigsäure

2.6.9. Anionenaustauscher – Chromatographie (Mono Q)

- Eluent A : TRIS / HCl (20 mM; pH 7,5)
- Eluent B : TRIS / HCl (20 mM; pH 7,5) + 1M NaCl

Vor Gebrauch wurde der Puffer über einen 0,2 µm Filter filtriert. Anschließend erfolgte eine Entgasung im Exsikkator unter Vakkum für 30 min.

2.6.10. Größenausschlußchromatographie I (Sephadex G 75)

- TRIS / HCl (20mM; pH 8) + 0,2 M NaCl

Vor Gebrauch wurde der Puffer über einen 0,2 µm Filter filtriert. Anschließend erfolgte eine Entgasung im Exsikkator unter Vakkum für 30 min.

2.6.11. Größenausschlußchromatographie II

- 0,1 M NaNO₃
- 0,05 M NaHCO₃

2.6.12. HPLC I (gepulste Amperometry)

- Eluent A : 16 mM NaOH
- Eluent B : 300 mM NaOH

Vor Gebrauch wurde das ddH₂O über einen 0,2 µm Filter filtriert. Anschließend erfolgte eine Entgasung im Exsikkator unter Vakkum für 30 min. Die entsprechenden Mengen an NaOH wurden unter leichtem Rühren hinzugefügt.

2.6.13. HPLC II

- 0,013 N H₂SO₄

Vor Gebrauch wurde das ddH₂O über einen 0,2 µm Filter filtriert. Anschließend erfolgte eine Entgasung im Exsikkator unter Vakuum für 30 min. Die entsprechende Menge an H₂SO₄ wurde unter leichtem Rühren hinzugefügt.

2.7. Kulturmedien

Medium zur Anzucht von *Pediococcus parvulus*:

MRS-Medium (Medium 11, DSMZ)

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

Der pH-Wert wurde auf 5,3 eingestellt. Im Falle von Plattentests wurde dem Medium zusätzlich 15,0 g/l Agar zur Verfestigung zugesetzt.

Medium zur Schleimbildung von *Pediococcus parvulus*:**Medium M**

Glucose	20,0 g/l
Tween 80	1,0 g/l
K ₂ HPO ₄	2,0 g/l
Natriumacetat	5,0 g/l
(NH ₄) ₂ Citrat	2,0 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g/l
MnSO ₄ x H ₂ O	0,05 g/l
Yeast Nitrogen Base (sterilfiltriert)	5,0 g/l

Der pH-Wert wurde auf 4,5 eingestellt.

Medium zur Anzucht von *Delftia sp.* MV01:**LB- Medium (Medium 381, DSMZ)**

Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	10,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	10,0 g/l

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Zur Stammhaltung wurde *Delftia sp.* MV01 auf Schrägagarröhrchen kultiviert. Hierfür wurde dem Medium 15,0 g/l Agar zugesetzt.

TSB-Medium

Tryptische Soja-Nährbouillon (Fertigmedium)	30 g/l
---	--------

Basal-Medium A (nach Han et al., 2005)

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g/l
KH ₂ PO ₄	3,0 g/l
K ₂ HPO ₄	7,0 g/l
MgSO ₄ x H ₂ O	0,1 g/l
C-Quelle	5,0 g/l

Medium zur Bildung von Exoenzymen:

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

NaNO ₃	1,0 g/l
K ₂ HPO ₄	1,0 g/l
KCl	0,5 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/l
Hefeextrakt	0,5 g/l
Kohlenstoffquelle ¹	1,0 g/l

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Für Plattentests wurde dem Medium 15,0 g/l Agar zur Verfestigung zugesetzt.

Medium zur Anzucht von Hefen:

GYP-Medium

Hefeextrakt	10,0 g/l
Pepton	20,0 g/l
Glucose	20,0 g/l

¹ Laminarin oder alternativ Hefazell® (Hefezellwandpräparat), lebende Hefezellen von H74 gefriergetrocknetes Exopolysaccharid von *P. parvulus* B399

2.8. Organismen

Tab. 4 Pediokokken-Stämme getestet auf Exopolysaccharidbildung.

Pediokokken-Stämme	
Stamm ^a	Spezies
B 397	<i>P. parvulus</i>
B 399	<i>P. parvulus</i>
B 443	<i>P. parvulus</i>
B 445	<i>P. parvulus</i>
B 455	<i>P. damnosus</i>
B 457	<i>P. parvulus</i>
B 484	<i>P. parvulus</i>
B 491	<i>P. parvulus</i>
B 492	<i>P. parvulus</i>
B 493	<i>P. parvulus</i>

^a Alle Stämme sind in der institutseigenen Sammlung hinterlegt.

Tab. 5 Verwendete Mikroorganismen, getestet auf ihre β -1,3-Glucanaseaktivität.

Stammbezeichnung	Organismus	sequenzierte Bp der 16S rDNA	Quelle
Rt 6a	<i>Bacillus licheniformis</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Reticulitermes santonensis</i>
Rt 6b	<i>Bacillus licheniformis</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Reticulitermes santonensis</i>
RT 11a	<i>Bacillus cereus</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Reticulitermes santonensis</i>
RT 11b	<i>Bacillus cereus</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Reticulitermes santonensis</i>
WX	<i>Paenibacillus macerans</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Mastotermes darwiwniensis</i>
Cz 101	nächster Verwandter <i>Cellulomonas</i> sp.	463	isoliert aus <i>Nasutitermes nigriceps</i>
DSM 43879	<i>Cellulomonas cellulans</i>	nicht hinterlegt	DSM 43879
KMX 7	<i>Bacillus circulans</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Mastotermes darwiwniensis</i>
KMC12	<i>Bacillus coagulans</i>	465	isoliert aus <i>Mastotermes darwiwniensis</i>

Fortsetzung Tabelle 5

KMaC2	<i>Cellulomonas sp.</i>	463	isoliert aus <i>Mastotermes darwiwniensis</i>
KHC 3	<i>Bacillus circulans</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Heterotermes indicola</i>
KScC4	<i>Bacillus subtilis</i>	461	isoliert aus <i>Schedorhinotermes intermedius</i>
KD1	<i>Bacillus sphaericus</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Reticulitermes santonensis</i>
Kbf 2	<i>Bacillus licheniformis</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Reticulitermes santonensis</i>
KD 8	<i>Bacillus subtilis</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Reticulitermes santonensis</i>
Anreicherungskultur CZ 181a	<i>Paenibacillus sp.</i>	326	isoliert aus <i>Zootermopsis angusticollis</i>
CZ 177d	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Zootermopsis angusticollis</i>
CZ 375a	<i>Paenibacillus sp.</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Zootermopsis angusticollis</i>
CZ 375b	<i>Paenibacillus sp.</i>	nicht hinterlegt	isoliert aus <i>Zootermopsis angusticollis</i>

2.9. Screening nach exopolysaccharidbildenden Pediokokken-Stämmen

Um einen *Pediococcus*-Stamm zu finden, der zur Exopolysaccharid-Synthese fähig war, wurde zunächst ein einfacher „Zahnstochertest“ durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Stämme auf MRS – Agar ausgestrichen und für 6 Tage bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurde mit einem sterilen Zahnstocher in einzelne Kolonien eingestochen. Exopolysaccharid – produzierende Stämme bildeten hierbei einen Faden aus viskosem Schleim aus (Abb. 7A). Weiterhin zeigten polymerbildende Stämme deutliche Unterschiede in der Kolonieform (Abb. 7B). Die ausgewerteten Platten wurden dann bei 10 °C gelagert und nach einer Woche erneut beurteilt.

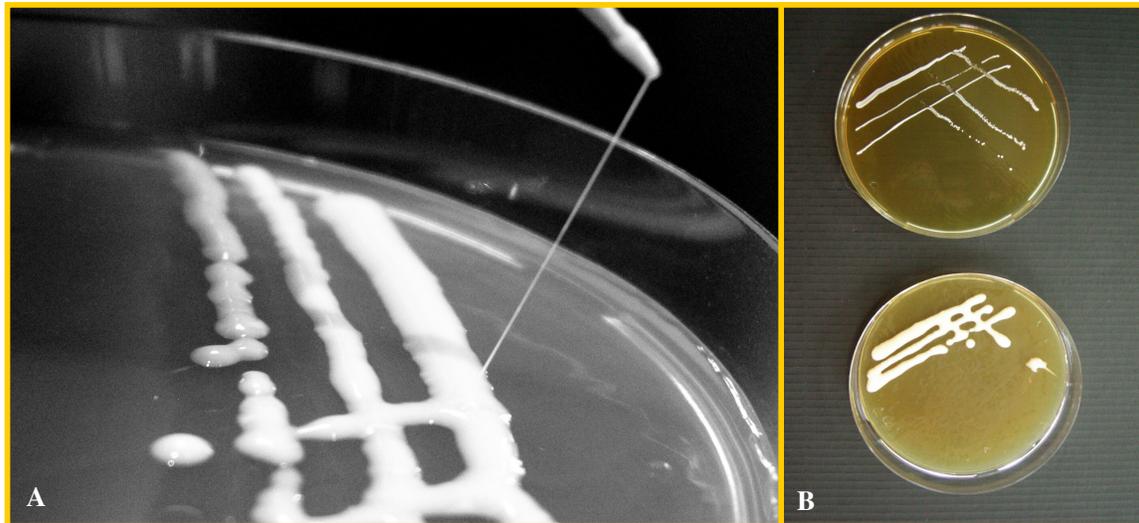


Abb. 7 Fädenziehende Kolonien von *Pediococcus parvulus* B399 beim „Zahnstochertest“ (7A). Vergleich der Koloniegröße und Morphologie des exopolysaccharidbildenden *Pediococcus*-Stammes B399 (7B, unten) mit dem Stamm B484, der kein EPS bildet (7B, oben).

In einem weiteren Versuch wurde die Exopolysaccharidbildung in Flüssigkultur untersucht. Hierfür wurden die Stämme in 10 ml MRS-Medium bei 20 °C für 6 Tage kultiviert. Exopolysaccharidbildung äußerte sich in einer zunehmenden Viskositätssteigerung des Mediums. Viskositätsänderungen ließen sich am Rheometer (2.12.6) verfolgen. Da komplexe Medienbestandteile (Trypton, Fleisch- und Hefeextrakt) des MRS-Mediums eine spätere Exopolysaccharidquantifizierung störten (Dueñas et al., 2003), wurden die Stämme, die sich im ersten Test als mögliche Exopolysaccharidproduzenten in MRS-Medium erwiesen hatten, danach zusätzlich in 10 ml Medium M bei 20 °C für 6 Tage kultiviert. Über Viskosimetrie wurde die Exopolysaccharidbildung qualitativ bewertet. Des Weiteren wurde auch die Menge an gebildetem Polymer nach 6 tägigem Wachstum bei 20 °C bestimmt. Hierfür wurde 1 ml der Zellkultur bei 16000 x g für 15 min abzentrifugiert. Das Exopolysaccharid wurde anschließend mit dem dreifachen Volumen an vergälltem Ethanol aus dem Überstand bei 4 °C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 3800 x g, wurde das Präzipitat bei 65 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, in 1 ml ddH₂O aufgenommen und anschließend über Nacht in Dialysekapseln gegen ddH₂O dialysiert (Membranausschlußgröße: 14000 kDa). Durch die Dialyse werden niedermolekulare Salze und eventuell vorhandene Glucose des Mediums entfernt. Die Polymermenge wurde mittels Phenol – Schwefelsäuretest (DuBois et al., 1956) wie unter 2.12.1 Punkt beschrieben bestimmt.

2.10. Kulturbedingungen

In der Literatur werden zur Exopolysaccharidbildung durch *Pediococcus sp.* zahlreiche synthetische Medien vorgeschlagen, da komplexe Medien oft Fleisch- und Hefeextrakt enthalten, die die Exopolysaccharidquantifizierung stören und darüber hinaus den Reinheitsgrad des Polymers herabsetzen (Dueñas et al., 2003; Marieta et al., 2009; Velasco et al., 2009).

Für die Polymerbildung durch *Pediococcus parvulus* Stamm B399 wurden zunächst aus der Literatur empfohlene synthetische Medien getestet (Llaubères et al., 1990; Dueñas – Chasco et al., 1997; Ibarburu et al., 2007). Des Weiteren wurde der Stamm B399 in Medium M kultiviert. Hierzu wurde *Pediococcus parvulus* B399 als Vorkultur in MRS-Medium für 3 Tage bei 20 °C kultiviert. Die Zellen wurden bei 16000 x g für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Zellpellet mit 0,9% NaCl – Lösung gewaschen. Mit dieser Zellsuspension wurden anschließend die Versuchsansätze in modifiziertem MRS-Medium beimpft. Dabei wurde die anfängliche OD₆₀₀ auf 0,2 eingestellt.

Die Exopolysaccharidsynthese wurde bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen (15 °C, 18 °C, 20 °C und 25 °C) über einen Zeitraum von 3 Wochen verfolgt. Hierzu wurden 200 ml Kulturen angesetzt. Neben dem Wachstum (OD₆₀₀), wurde auch die gebildete Menge an EPS in Abhängigkeit des Glucoseverbrauchs im Medium bestimmt (2.12.1).

Die Verwertung von Glucose wurde über HPLC bestimmt (2.6.13). Hierfür wurden 500 µl (gegebenenfalls Verdünnungen) zellfreier polymerhaltiger Kulturüberstand in Probengläschen pipettiert und über einen Autosammler an einer Aminex[®]- Säule (HPX – 87H 300 mm x 7,8 mm) mit 0,013 N H₂SO₄ bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt.

Um zu testen, ob die Zugabe von Ethanol Einfluß auf die gebildete Polymermenge hatte, wurde *Pediococcus parvulus* B399 jeweils in 100 ml Medium M für 8 Tage bei 20 °C kultiviert. Dem Medium wurden zusätzlich verschiedene Ethanolkonzentrationen (5, 10, 12, 15 und 18% (v/v)) zugesetzt. Zum Vergleich diente ein Ansatz ohne Ethanol. Nach der Inkubation wurde das EPS wie unter 2.11 beschrieben gewonnen und die Menge über den Phenol-Schwefelsäuretest (2.12.1) bestimmt.

Um das Exopolysaccharid in größeren Mengen zu gewinnen, wurden neben einem 2 l Ansatz auch Steilbrustflaschen mit einem Kulturvolumen von 2 x 10 l verwendet. Nach 8 Tagen Wachstum bei 20 °C in Medium M mit 5% (v/v) Ethanol wurde das Polymer wie unter 2.11 und 2.11.1 beschrieben gewonnen und die Menge an gefriergetrocknetem EPS über Wiegen bestimmt. Des Weiteren wurde auch ein 40 l Fermenteransatz unter denselben Bedingungen

durchgeführt. Das Exopolysaccharid wurde auch hier wie unter 2.11 und 2.11.1 beschrieben gewonnen. Die Polymerausbeute wurde im Anschluß ebenfalls über Wiegen ermittelt. Die verschiedenen Polymerchargen wurden für die nachfolgenden Versuche wie folgt gekennzeichnet: Charge 1 (gewonnen aus 40 l Kultur); Charge 2 (gewonnen aus 10 l Kultur), Charge 3 (gewonnen aus 10 l Kultur); Charge 4 (gewonnen aus 2 l Kultur). Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden weitere Versuche mit der Polymercharge 4 durchgeführt.

2.11. Gewinnung des Exopolysaccharids von *Pediococcus parvulus* B399

Zur Gewinnung des Exopolysaccharids wurden zunächst die Zellen durch Zentrifugation (30 min; 17700 x g; 4 °C) entfernt. Aus dem zellfreien Kulturüberstand wurde dann das Polymer mit dem dreifachen Volumen an vergälltem Ethanol über Nacht bei 4 °C gefällt. Anschließend wurde das gefällte Polymer abzentrifugiert (20 min; 3800 x g 4 °C), in ddH₂O gelöst und erneut mit vergälltem Ethanol gefällt. Dieser Vorgang wurde noch dreimal wiederholt. Zum Schluß wurde das Exopolysaccharid in einem geringen Volumen ddH₂O gelöst und über 4-5 Tage gegen dH₂O dialysiert (Membranausschlußgrenze: 14000 Da). Das Dialysewasser wurde hierbei zwei bis dreimal pro Tag gewechselt. Die Dialyse diente vor allem dazu, niedermolekulare Bestandteile des Mediums wie Salze und restliche Glucose vollständig zu entfernen. Um das Polymer später in einer einwiegbaren Form zu erhalten, wurde es nach der Dialyse gefriergetrocknet.

2.11.1. Aufarbeitung von größeren Mengen Polymer

Die Fällung von Exopolysaccharidmengen in Kulturvolumina ≥ 5 l mit dem dreifachen Volumen an vergälltem Ethanol konnte erst nach einer Konzentrierung des polymerhaltigen Überstandes mittels Cross-Flow-Filtration erfolgen (2.15.4). Die Konzentrierung der Lösung erfolgte an einem Ultrafiltrationssystem der Firma Satorius. Hierzu wurde der zellfreie Überstand (17700 x g; 50 min; 4 °C) über eine Microsart Kassette (Hydrosart[®]) mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDa filtriert.

Vor dem eigentlichen Filtrationsprozess wurde die Membran mit 2 x 5 l dH₂O gespült und danach mit dem polymerhaltigen Überstand für 15 min bei einem Pumpenzug von 0,2% (1bar Eingangsdruck; 0,5 bar Permeatdruck) benetzt. Die Konzentrierung erfolgte dann bei einem Pumpenzug von 5% (1,3 bar Eingangsdruck; 0,5 bar Permeatdruck) bei einem Durchfluß von

75 ml/min für ca. 2 h. Mit diesen Parametern konnten 10 l Anfangsvolumen auf 200 ml konzentriert und wie unter 2.11 beschrieben weiter aufgearbeitet werden.

2.12. Charakterisierung des Exopolysaccharids von *P. parvulus* B399

2.12.1. Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes

Zur Bestimmung des Neutralzuckeranteils im gefriergetrockneten Exopolysaccharid, wurde der Phenol-Schwefelsäuretest nach DuBois et al. (1956) durchgeführt. Mono-, Oligo- und Polysaccharide reagieren mit Phenol und konzentrierter Schwefelsäure zu einer farbigen Substanz mit einem Absorptionsmaximum zwischen 480 nm und 490 nm.

Mittels saurer Hydrolyse werden hierbei zunächst die glykosidischen Bindungen der Oligo- und / oder Polysaccharide gespalten. Durch die Wasserabspaltung entstehen Furfuralderivate, die wiederum mit zwei Phenolmolekülen zu einem orange-rotem Triarylmethanderivat kondensieren. Je nachdem, welcher Zucker an der Reaktion beteiligt ist, verschiebt sich das Absorptionmaximum leicht. Für Hexosen liegt es bei 490 nm (Abb. 8).

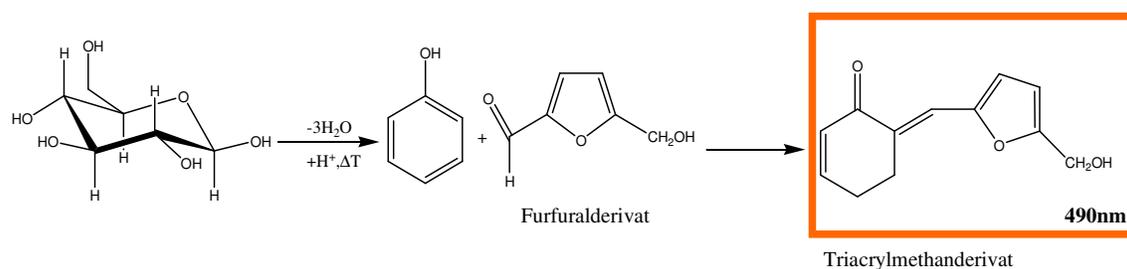


Abb. 8 Chemie des Phenol-Schwefelsäuretest nach DuBois et al. (1956).

Um den Kohlenhydratanteil der EPS- Präparation zu bestimmen, wurde 1 mg Exopolysaccharid in ddH₂O gelöst. 500 µl der Polymerlösung (gegebenenfalls Verdünnungen) wurden zu 500 µl 5%-iger Phenollösung pipettiert und durchmischt. Anschließend wurden 2,5 ml konz. H₂SO₄ hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei RT stehen gelassen und anschließend die OD bei 490 nm bestimmt. Alle Messungen erfolgten als dreifach Bestimmungen. Zur Auswertung diente eine Standardkurve mit bekannten Glucosekonzentrationen (0–200 µg/ml). Der Kohlenhydratanteil im Endprodukt konnte somit nach folgender Beziehung ermittelt werden:

Einwaage gefriergetrocknetes Exopolysaccharid \triangleq Menge an Neutralzuckern

2.12.2. Bestimmung der Monomerzucker

Zur Bestimmung der Monomerzusammensetzung wurde das Exopolysaccharid sauer hydrolysiert (vgl. Hydrolysebedingungen im selben Abschnitt) und die entsprechenden Monomerzucker zunächst qualitativ mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Ein quantitativer Nachweis erfolgte zusätzlich über Anionenaustauschchromatographie mit gekoppelter gepulster amperometrischen Detektion (HPAEC–PAD, **H**igh **P**erformance **A**nion **E**xchange **C**hromatography with **P**ulsed **A**mperometric **D**etection):

Bei der HPAEC werden die Zucker durch ihre schwach sauren Eigenschaften bei hohen pH-Werten selektiv an einer Anionenaustauschersäule getrennt (Johnson & La Course, 1990). Die aufgetrennten Monosaccharide können im Anschluß über gepulste Amperometrie sehr spezifisch und empfindlich nachgewiesen werden (Abb. 9). Hierbei wird die Änderung des Stromes in einer Messzelle gemessen, durch welche die Monosaccharide nach Durchlaufen der Trennsäule fließen (Schiller, 2002). Der Strom entsteht durch Oxidation der im Eluat enthaltenen Monosaccharide an der Oberfläche einer Goldelektrode und wird bei konstantem Messpotential (50 mV) detektiert (Schiller, 2002). Anschließend wird mit Hilfe eines relativ hohen Oxidationspotentials von 750 mV die Elektrodenoberfläche komplett von Oxidationsprodukten befreit. Hierbei wird die Oberfläche der Goldelektrode komplett oxidiert (Schiller, 2002). Das nachfolgende Anlegen eines reduktiven Potentials (-150 mV) führt zur Reduktion der Goldoberfläche. Mit Hilfe dieser wellenförmigen Potentialänderungen wird einer elektrochemischen Verschmutzung der Elektrode vorgebeugt (Schiller, 2002).

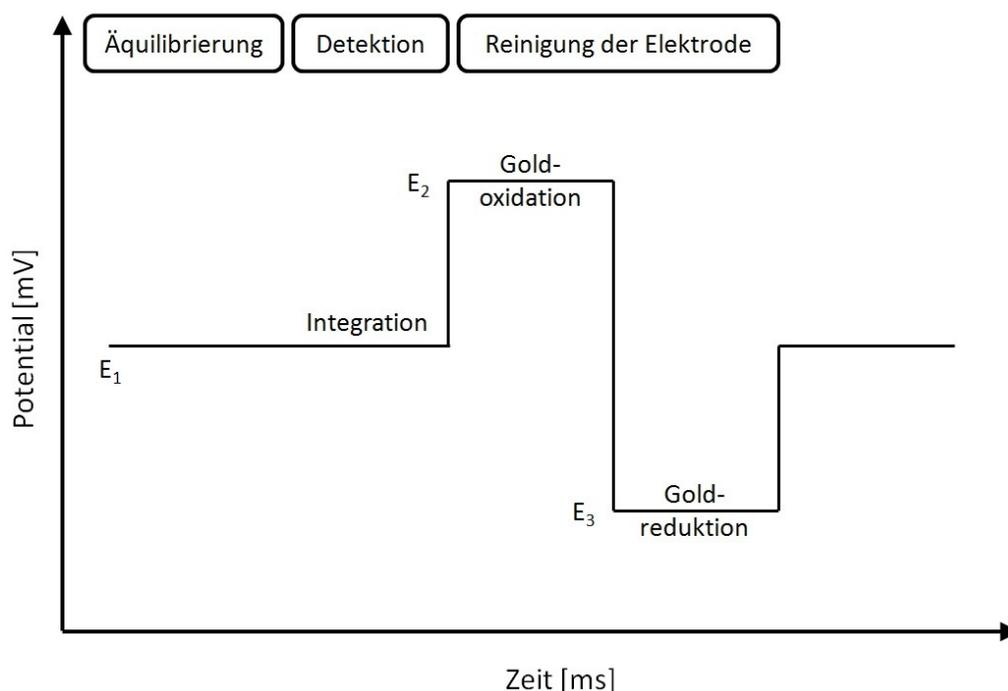


Abb. 9 Schematische Darstellung der wellenförmigen Potentialänderungen bei der Oxidation von Zuckern an einer Goldelektrode (gepulste amperometrische Detektion) (Schiller, 2002).

Es wurden verschiedene Hydrolysebedingungen getestet:

- Säuren: 2 M HCl; 2 M TFA; 4 M TFA
- Hydrolysezeiten: 1–4 h und 6 h
- Temperatur: 100 °C

Im Falle des quantitativen Nachweises wurden 2 mg Exopolysaccharid mit 200 μ l der jeweiligen Säure bei 100 °C hydrolysiert. Den Testansätzen wurden jeweils 5 μ l pro Zeitintervall entnommen und diese direkt auf eine zuvor aktivierte Kieselgelplatte (15 min; 100 °C) aufgetragen. Als Standard wurde Glucose (1 mg/ml) mitgeführt. Als Laufmittel wurde Butanol: Ethanol: dH₂O im Mischungsverhältnis 5:3:2 verwendet. Die Detektion der Monomierzucker erfolgte nach Besprühen mit Anisaldehyd–H₂SO₄ (2.6.8) durch Oxidation bei 105 °C.

Für die Monomerbestimmung mit anschließender Quantifizierung wurden jeweils in Doppelansätzen 1 mg Exopolysaccharid mit 100 μ l der entsprechenden Säure bei 100 °C unterschiedlich lang hydrolysiert. Die Säuren wurden nach der Hydrolyse aus dem Ansatz mittels Stickstoff entfernt und die Hydrolyseprodukte zunächst in 100 μ l NaOH (16 mM) gelöst und zur Messung 1:100 verdünnt. Die Trennung der Monosaccharide erfolgte über HPLC an

einer Anionenaustauschersäule (CarboPac PA1 4 x 250 mm) bei einer Flußrate von 1 ml / min und einem Probeninjektionsvolumen von 5 µl. Die Elution der Monosaccharide erfolgte über einen binären NaOH–Gradienten (Tab. 6). Hierbei wurden die Anteile der Eluenten A (16 mM NaOH) und B (300 mM NaOH) im vorgeschriebenen Zeitintervall verändert (Tab. 6). Der Nachweis der Monomierzucker erfolgte über gepulste – amperometrische Detektion (PAD) an einer Goldelektrode. Zur Kalibrierung wurde eine Glucoselösung mit bekannter Konzentration (0,99 g/l) als externer Standard (zur Messung 1:100 verdünnt) verwendet.

Tab. 6 Binäres Gradientenprogramm zur Bestimmung von Monosacchariden

Zeit [min]	Anteil Eluent A [%] ¹	Anteil Eluent B [%] ²
0.00	90	10
15.00	90	10
17.00	0	100
27.00	0	100
28.00	90	10
38.00	90	10

¹16 mM NaOH

²300 mM NaOH

2.12.3. Strukturbestimmung mittels Kernspinresonanzspektroskopie

Definition

Mithilfe der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie von engl., **n**uclear **m**agnetic **r**esonance) können magnetisch aktive Kerne in einem äußeren Magnetfeld beobachtet werden. Durch die Betrachtung der elektronischen Umgebung einzelner Atome, sowie deren Wechselwirkung mit Nachbaratomen, können Informationen bezüglich des strukturellen Aufbaus von Molekülen gewonnen werden. Dabei können nur Isotope mit ungerader Nukleonen- oder Ordnungszahl im NMR untersucht werden.

In Abbildung 10 wird der Aufbau eines NMR-Gerätes schematisch gezeigt.

Näher Informationen bezüglich dieser spektroskopischen Methode, können der Literatur entnommen werden (vgl. Hesse et al., 2005).

Der strukturelle Aufbau des Exopolysaccharids von *Pediococcus parvulus* B399 wurde mittels NMR-Spektroskopie in Kooperation mit Dr. Christoph Nowak vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz bestimmt.

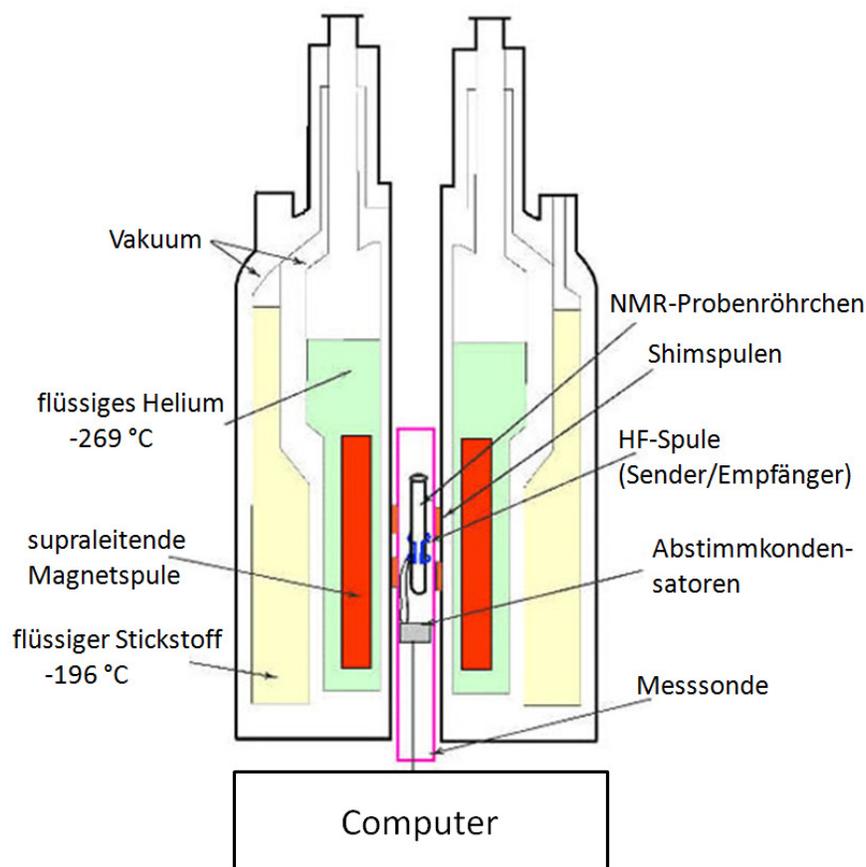


Abb. 10 Schematischer Aufbau eines NMR-Gerätes

(modifiziert nach <http://lucas.lakeheadu.ca/luil/nuclear-magnetic-resonance-nmr-facility/>).

Probenmessung

Zur Bestimmung des strukturellen Aufbaus des EPS aus *P. parvulus* B399 wurde sowohl ein ^1H - als auch ein ^{13}C - NMR Spektrum aufgenommen. Für die Messung des ^1H -Spektrums wurde das EPS in einer Konzentration von 3 mg/ml D_2O gelöst. Als interner Standard diente Tetramethylsilan (TMS). Das Spektrum wurde an einem 200 MHz Gerät (Bruker Avance) bei 20 °C für 10 min aufgenommen. Zur Bestimmung von ^{13}C wurde das EPS in einer Konzentration von 10 mg/ml D_2O gelöst. Als interner Standard wurde ebenfalls Tetramethylsilan (TMS) verwendet. Das ^{13}C -Spektrum wurde für 24 h bei 70 °C an einem 700 MHz Gerät (Bruker 700 Ultra Shield) aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software Mest Re-C 6.1.0 (Mest-Re Lab Research).

2.12.4. IR-Spektroskopie

Die IR-Spektroskopie dient genauso wie die NMR-Spektroskopie zur Aufklärung von komplexen Strukturen wie beispielweise die von Polysacchariden. Detaillierte Informationen über diese spektroskopische Methode finden sich in der Literatur (vgl. Gregoriou & Braiman, 2006; Aroca, 2007).

Die Untersuchung des Exopolysaccharids von *Pediococcus parvulus* B399 mittels ATR-FTIR Messung erfolgte in Kooperation mit Dr. Christoph Nowak vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz.

Probenmessung

In der vorliegenden Arbeit sollte diese spektroskopische Methode dazu dienen, die β -Glucan Struktur des Exopolysaccharids von *P. parvulus* B399 zu ermitteln und darüber hinaus auch zeigen, ob die Präparation und die Reinigung des Polymers aus dem Kulturüberstand erfolgreich war. Proteinverunreinigungen auch in geringsten Mengen würden z.B. als Amid-Banden im Spektrum detektiert werden.

Für die ATR-FTIR-Messungen wurden 1 mg Exopolysaccharid in 1 ml H₂O gelöst. Als Vergleichssubstanz diente Laminarin von *Laminaria digitata* in gleicher Konzentration.

Alle Messungen erfolgten auf einem trapezförmigen Silicium-ATR-Kristall mit einer zweilagigen Goldoberfläche (Abb. 11), die eine 128-fache Signalverstärkung gegenüber dem Kristall ohne Goldoberfläche als Vorteil hat. Eine genaue Beschreibung der Präparation dieser Goldoberfläche und weitere Details dazu sind in der Literatur zu finden (Nowak et al., 2009).

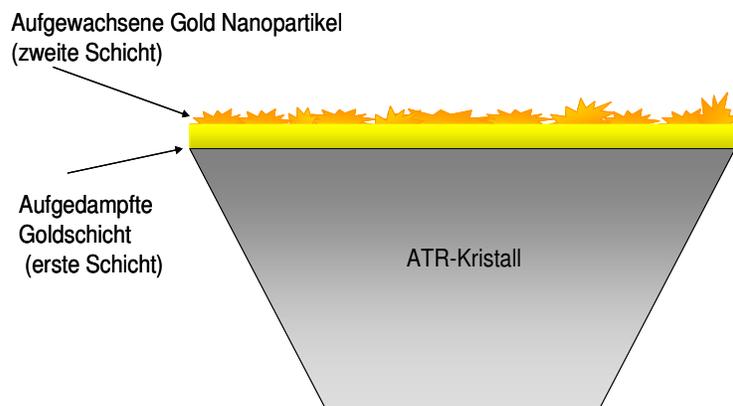


Abb. 11 Silicium-ATR-Kristall mit zweilagiger Goldoberfläche.

Die Analyse erfolgte von 800-4000 cm^{-1} Wellenzahlen an einem Vertex 70 Gerät (Bruker Optik, Karlsruhe) am MPI für Polymerforschung Mainz. Die Auswertung erfolgte über die Software Opus 6.0 (Bruker Optik, Karlsruhe).

2.12.5. Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC, engl. SEC: size exclusion chromatography) ist eine Relativmethode zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von Polymeren. Bei dieser Art von Flüssigchromatographie wird die verdünnte Polymerlösung unter hohem Druck (50–100 bar) durch Trennsäulen gepresst, die mit einem porösen, hochvernetzten Gel (Polymer oder Silikat) gefüllt sind. Im Gegensatz zur High Performance Liquid Chromatography (HPLC) erfolgt die Trennung hierbei rein aufgrund der Größe, genauer dem hydrodynamischen Volumen der Moleküle (Eckelt, 2004). Je nach hydrodynamischem Radius (und damit auch Molekulargewicht) steht den einzelnen Polymerelementen unterschiedlich viel Volumen innerhalb der Trennsäule zu Verfügung, je nachdem ob sie in die Poren des Trägermaterials eindringen können oder nicht (Eckelt, 2004). Diejenigen Moleküle, die den größten hydrodynamischen Radius besitzen, werden als erste aus der Säule eluiert. Um die Molekulargewichtsverteilung ermitteln zu können, werden Detektoren verwendet, welche die Abhängigkeit der Polymerkonzentration im Eluat registrieren können (z.B. UV-, RI, Viskositäts- oder Lichtstreuendetektoren) (Eckelt, 2004). Da die Auftrennung nicht nach dem Molekulargewicht erfolgt, sondern nach dem hydrodynamischen Radius, muß eine Kalibrationskurve mittels engverteilten Polymerstandards (meist Dextran) erstellt werden (Eckelt, 2004).

Probenmessung

Zur Bestimmung der Größe des Exopolysaccharids von *P. parvulus* B399 wurden 2,5 mg EPS unter kontinuierlichem Rühren von mindestens 3 h im Eluenten der GPC (0.1 M NaNO_3 / 0.05 M NaHCO_3) gelöst und über ein 5 μm Filter filtriert, bevor 50 μl der EPS-Lösung zur GPC-Messung injiziert wurden. Die Trennung erfolgte über 3 in Serie geschaltete Säulen (Hema Bio 40; Hema Bio 1000 und Suprema 3000; alle PSS, Mainz) bei einer Flussrate von 1 ml / min. Nach der Elution (0.1 M NaNO_3 / 0.05 M NaHCO_3) der Probe, konnte mittels RI-Detektor (Gynkotek RI 71, Dionex) die Molekulargewichtsverteilung ermittelt werden. Zur Kalibrierung dienten neben Glucose 13 Dextranstandards (180–277.000 g / mol) der Firma PSS, Mainz.

Außerdem wurden 2 hochmolekulare Dextranstandards (670.000 g/mol und 1.4000.000 g/mol) (Sigma, Steinheim) verwendet.

2.12.6. Viskosimetrische Messungen

Rheologie

Der Begriff Rheologie (griechisch. = rheos – der Fluß, das Fließen, das Strömen) umfasst neben dem Fließverhalten von Flüssigkeiten auch die Deformation von Festkörpern.

Das Rheologische Verhalten einer Substanz hängt von verschiedenen Bedingungen ab:

- Art der Belastung
- Höhe der Belastung
- Dauer der Belastung
- Temperatur

Einige weitere wichtige Parameter sind die Konzentration der Polymerlösung, der Umgebungsdruck, der pH-Wert und die magnetische oder die elektrische Feldstärke (Mezger, 2000).

Begriffsdefinitionen

Einige grundlegende rheologische Parameter werden mit Hilfe des Zwei – Platten- Modells definiert (Abb. 12). Die obere Platte mit der (Scher-) Fläche A wird durch die (Scher-) Kraft F um den Betrag s ausgelenkt. Die untere Platte ist unbeweglich ($s=0$). Zwischen den beiden Platten mit dem Abstand h wird die Messprobe geschert (Mezger, 2000). Dabei wird vorausgesetzt, dass sie sowohl an beiden Platten Wandhaftung hat und im gesamten Messspalt homogen verformt wird (Mezger, 2000).

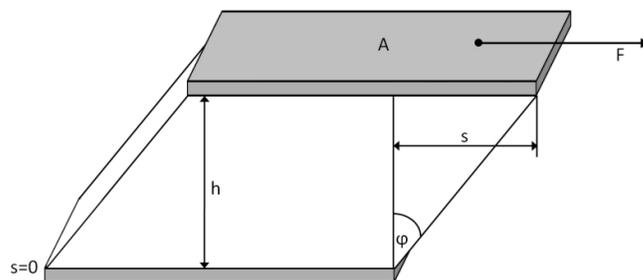


Abb. 12 Verformung der Messprobe im Scherspalt des Zwei-Platten-Modells (Mezger, 2000).

Schubspannung

Die Schubspannung (engl. shear stress) setzt sich aus der (Scher-) Kraft F [N] und der (Scher-) Fläche A [m²] zusammen:

$$\tau = F / A \quad (1)$$

τ hat die Einheit [Pa] es folgt

$$1\text{Pa} = 1\text{N} / \text{m}^2 = 1 \text{ kg/ m *s}^2 \quad (2)$$

Scherrate

Die Scherrate (engl. shear rate) ist wie folgt definiert:

$$\dot{\gamma} = v / h \quad (3)$$

v ist die Geschwindigkeit [m/s]

h ist der Plattenabstand [m]

$\dot{\gamma}$ hat die Einheit [1/s] = [s⁻¹]

Deformation

Die Deformation (shear strain) ist wie folgt definiert:

$$\gamma = s / h \quad (4)$$

s ist die Auslenkung [m]

h ist der Plattenabstand [m]

Es gilt: $s / h = \tan \varphi$, mit dem Auslenkwinkel φ [°]

γ hat die Einheit [1]; Die Deformation ist dimensionslos.

Viskosität

Zwischenmolekulare Reibungskräfte in einer Flüssigkeit bestimmen den Fließwiderstand und damit die Viskosität. Die Scherviskosität (engl. shear viscosity) ist definiert als Verhältnis aus Schubspannung und Scherrate:

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \quad (5)$$

η hat die Einheit [Pas] („Pascal – Sekunde“); es gilt

$$1\text{Pas} = 1\text{N} \cdot \text{s} / \text{m}^2 \quad (6)$$

Viskositätskurven

In Abbildung 13 werden die Viskositätskurven für idealviskose, scherverdünnende und scherverdickende Proben gezeigt.

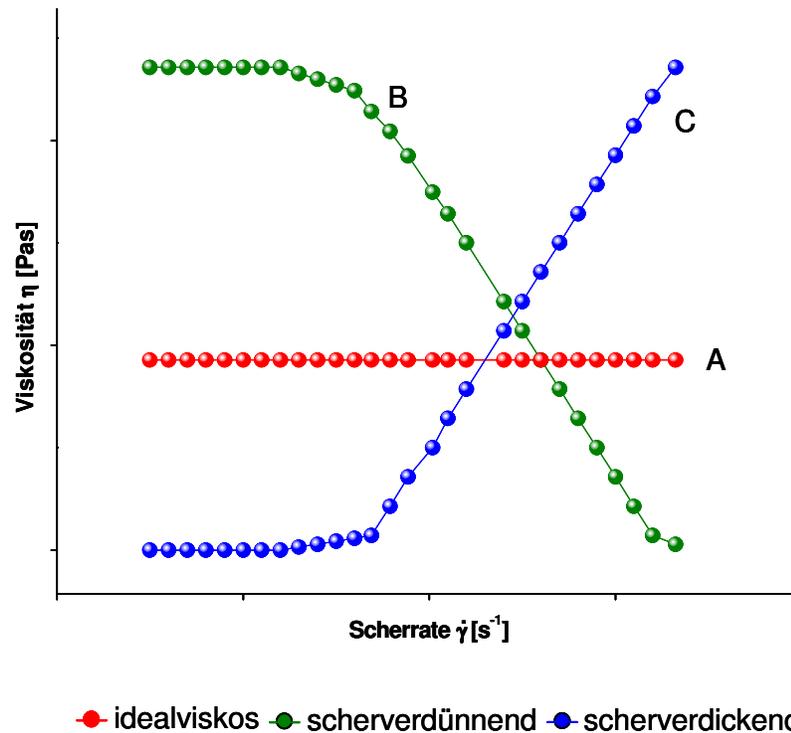


Abb. 13 Viskositätskurven für idealviskose- (A), scherverdünnende (B) und scherverdickende (C) Proben.

Beim idealviskosen Fließverhalten ist die Viskosität unabhängig von der Scherrate. Man findet dieses Verhalten bei homogenen niedermolekularen Flüssigkeiten, z.B. bei Schmierölen. Bei solchen Proben ist für die Beschreibung des Fließverhaltens ausreichend, pro Temperatur einen Viskositätswert anzugeben. Idealviskose Proben misst man in der Regel mit einem Kapillar- oder Kugelrollviskosimeter. Deren Messgenauigkeit liegt im Promille-Bereich und ist den Rotationsrheometern überlegen.

Bei den meisten (nicht-homogenen) Flüssigkeiten, bei Lösungen von Makromolekülen sowie bei fast allen pastösen und cremartigen Produkten nimmt die Viskosität mit zunehmender Scherrate ab. Man nennt dieses Fließverhalten scherverdünnend. Fast alle Produkte des Alltags (z.B. Farben, Cremes, Baustoffe, Soßen, Duschgel, Klebstoffe oder Zahnpasta) zeigen

scherverdünnendes Fließverhalten. Scherverdickendes Fließverhalten zeigt sich hauptsächlich bei hoch gefüllten Dispersionen bei hohen Scherraten.

Kegel – Platte – Messsystem

Die Geometrie besteht aus dem Messkörper mit kegelförmiger Oberfläche und der feststehenden ebenen Platte (Abb. 14). Das zu analysierende Fluid wird in den Zwischenraum von Kegel und Platte gefüllt. Die geometrischen Maße des Kegels sind festgelegt durch Kegelradius R und Kegelwinkel α . Bei der Messung wird die Kegelspitze so nah an die Platte gebracht, dass die Spitze theoretisch die Platte berührt. In der Messpraxis wird jedoch die Kegelspitze um ca. 30-50 μm abgefräst, und genau diese Kegelspitzenabnahme wird als Abstand zwischen Kegel und Platte eingestellt. Es sitzt also nur die virtuelle Kegelspitze auf der Platte auf, was die Reibung zwischen Kegel und Platte verhindert. Der Kegel rotiert mit einer Winkelgeschwindigkeit ω . Ein Vorteil von Kegel-Platte-Geometrien ist die konstante Scherrate im gesamten Messspalt: Bewegt man sich von der Rotationsachse zum Kegelrand, so nimmt zwar die Umfangsgeschwindigkeit mit dem Radius linear zu, aber ebenso auch die Spaltweite. Beide Effekte kompensieren sich und führen nach Gleichung (3) zu konstanter Scherrate. Über das Moment, das der Platte vom rotierenden Kegel aufgeprägt wird, kann die Scherspannung τ berechnet und so die Viskosität aus Gleichung (5) bestimmt werden.

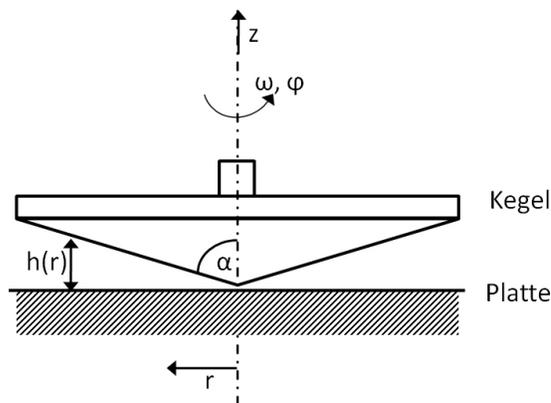


Abb. 14 Prinzipskizze eines Kegel-Platte-Rheometers (Mezger, 2000).

Viskosität der β -Glucanlösungen verschiedener Pediokokken

Durch die Bildung von Exopolysacchariden wird häufig die Viskosität des Mediums erhöht. Diese Viskositätsunterschiede lassen sich am Rheometer verfolgen. Verwendet wurde für alle rheologische Messungen ein Rheometer AR1000 der Fa. TA Instruments, New Castle, USA. Für die Messung wurden 1 ml Zellkultur bei 16000 x g für 20 min abzentrifugiert und der Überstand anschließend mittels Kegel-Platte-Rheometer (Messgeometrie: Kegeldurchmesser 60 mm, 1° Kegelwinkel, Peltier-Temperierung) bei konstanter Scherrate 100 (s⁻¹) über 10 Messpunkte (10 Sekunden pro Messpunkt) bei 25 °C gemessen.

Rheologische Eigenschaften des EPS aus *P. parvulus* B399

Um die rheologischen Eigenschaften des Exopolysaccharids aus *P. parvulus* B399 zu bestimmen, wurden Polymerlösungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt:

- 0,35%, 0,5%, 1%, 2%, 3% [w/v]

Das Fließverhalten der unterschiedlichen Exopolysaccharidlösungen wurde mit Hilfe von Fließkurven (Viskosität in Abhängigkeit der Scherrate) bei 10 °C und 20 °C am Rheometer (Meßgeometrie: Kegel – Platte; Kegeldurchmesser 60 mm; 1° Kegelwinkel) bestimmt. Mit der Fließkurve wird die gegenseitige Abhängigkeit von τ und $\dot{\gamma}$ deutlich. Aus der Fließkurve lässt sich die Viskositätskurve ableiten (Gleichung (6)).

Um linear- viskoelastische (schwach gelbildende) Eigenschaften des β -Glucans zu zeigen, wurden Oszillationsmessungen (mechanisch-dynamische Messungen) durchgeführt. Hierbei wird entweder die Deformation oder die Schubspannung sinusförmig vorgegeben:

$$\gamma = \gamma_0 * \sin \omega t \quad \text{bzw.} \quad \tau = \tau_0 * \sin \omega t \quad (7)$$

Folgende Begriffe sind für diese Messtechnik von Bedeutung:

Phasenverschiebung δ

Bei sinusförmiger Vorgabe von z.B. der Scherdeformation ist zwar auch die Schubspannung als primäres Messergebnis sinusförmig. Jedoch sind beide Größen im Allgemeinen zueinander phasenverschoben. Die Phasenverschiebung δ beträgt zwischen 0° bei idealelastischen Proben und 90° bei idealviskosen Proben.

Speichermodul G' (engl. storage modulus)

Der Speichermodul G' [Pa] spiegelt das elastische Verhalten der Messprobe wider. Er gilt als Maß für die in der Probe gespeicherte Deformationsenergie während des Scherprozesses. Diese Energie steht nach der Entlastung für eine Rückdeformation zur Verfügung, so dass idealelastische Substanzen ein reversibles Deformationsverhalten zeigen (Mezger, 2000).

$$G' = (\tau_0 / \gamma_0) * \cos \delta \quad (8)$$

Verlustmodul G'' (engl. loss modulus)

Der Verlustmodul G'' [Pa] repräsentiert das viskose Verhalten einer Messprobe. Er gilt als Maß für die während des Scherprozesses verlorengegangene Deformationsenergie. Diese Energie wird entweder in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben und / oder zur Änderung der Probenstruktur verbraucht, so dass viskose Substanzen nach einem Be / -Entlastungszyklus ein irreversibles Deformationsverhalten zeigen (Mezger, 2000).

$$G'' = (\tau_0 / \gamma_0) * \sin \delta \quad (9)$$

Komplexe Viskosität (complex viscosity)

Die komplexe Viskosität η^* [Pas] setzt sich aus der sinusförmigen $\tau(t)$ – Funktion [Pa] und der sinusförmigen $\dot{\gamma}(t)$ – Funktion [1/s] zusammen:

$$\eta^* = \tau(t) / \dot{\gamma}(t) \quad (10)$$

Linear-viskoelastischer Bereich (LVE-Bereich)

Im LVE-Bereich verlaufen die beiden Funktionen, $G'(\gamma)$ und $G''(\gamma)$, bei kleinen Amplituden von Schubspannung bzw. Scherrate, jeweils auf einen konstanten Plateauwert. Linear-viskoelastisches Verhalten liegt vor, wenn das Hooke`sche- und das Newton`sche Gesetz gelten, d.h., wenn die Schubspannung proportional zur Deformation bzw. zur Scherrate ist:

Durch die Messung im LVE-Bereich lassen sich Aussagen über den Strukturcharakter der Messprobe gewinnen:

1. Gel-Charakter, wenn $G' > G''$

Das elastische dominiert über das viskose Verhalten. Die Struktur der Probe weist einen gelartigen Zustand auf, sie ist formstabil (Mezger, 2000).

2. Flüssigkeitscharakter, wenn $G'' > G'$

Das viskose dominiert über das elastische Verhalten. Die Struktur der Probe zeigt im LVE-Bereich den Charakter einer Flüssigkeit. Sie bleiben nicht formstabil, sondern verlaufen (Mezger, 2000).

Cox-Merz-Regel

Die Scherviskositätsfunktion $\eta(\dot{\gamma})$ des Rotationsversuchs und die Funktion der komplexen Viskosität $|\eta^*(\omega)|$ des Oszillationsversuchs zeigen bei Darstellung im selben Diagramm nahezu denselben Kurvenverlauf. Das ist der Fall, wenn die Probe in sich homogen ist.

Messprozeduren

Alle Oszillationstests in Abhängigkeit von der Frequenz (Frequenzsweep) wurden mit den höherkonzentrierten Polymerlösungen (0,5-3%) zunächst unter Vorgabe einer Deformation von 10% durchgeführt.. Bei kleinen Frequenzen unterhalb 1 rad/s wurde zudem bei einigen Proben unter Vorgabe der Schubspannung im Bereich von 0,05 Pa bis 0,2 Pa gearbeitet. (Die Schubspannungsvorgabe ist gegenüber der Deformationsvorgabe für das verwendete Rheometer AR1000 der Fa. TA Instruments besser einzuregeln.) Um den linear-viskoelastischen Bereich und damit eine geeignete Oszillationsamplitude festzulegen, wurde im Vorfeld eine Oszillationsmessung bei konstanter Frequenz 10 rad/s und veränderlicher Amplitude (Amplitudensweep) mit einer 1,5% igen Polymerlösung durchgeführt.

2.12.7. Atomkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie oder auch Atomkraftmikroskopie (engl., Atomic Force Microscopy) ist eine Weiterentwicklung der Rastertunnelmikroskopie (Wiesendanger, 1996, 1998). Bei der Rastertunnelmikroskopie wird der extrem abstandsempfindliche Tunnelstrom zwischen einer feinen Spitze und der Probenoberfläche, die elektrisch leitfähig sein muss, gemessen.

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird hingegen die Kraft gemessen, die zwischen einer scharfen Spitze und der zu untersuchenden Probenoberfläche herrscht. Die Spitze ist am Ende einer kleinen Blattfeder, dem Cantilever befestigt. Meist besteht der Cantilever aus Silizium oder Siliziumnitrid, der Krümmungsradius der Spitze liegt in der Größenordnung von einigen Nanometern.

Wird die Spitze des Cantilevers in die Nähe der zu untersuchenden Probenoberfläche gebracht, so erfährt sie durch zwischen Spitze und Oberfläche wirkende Kräfte eine Auslenkung, die durch eine optische Methode detektiert werden kann. Hierbei wird ein fein fokussierter Laserstrahl auf der Rückseite des Cantilevers reflektiert und gelangt über einen oder mehrere Ablenspiegel in einen Photodetektor, welcher in vier Segmente unterteilt ist. Mit Hilfe dieser vier Segmente kann sowohl die vertikale als auch horizontale Verbiegung des Cantilevers gemessen werden.

Das Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops ist in Abbildung 15 gezeigt.

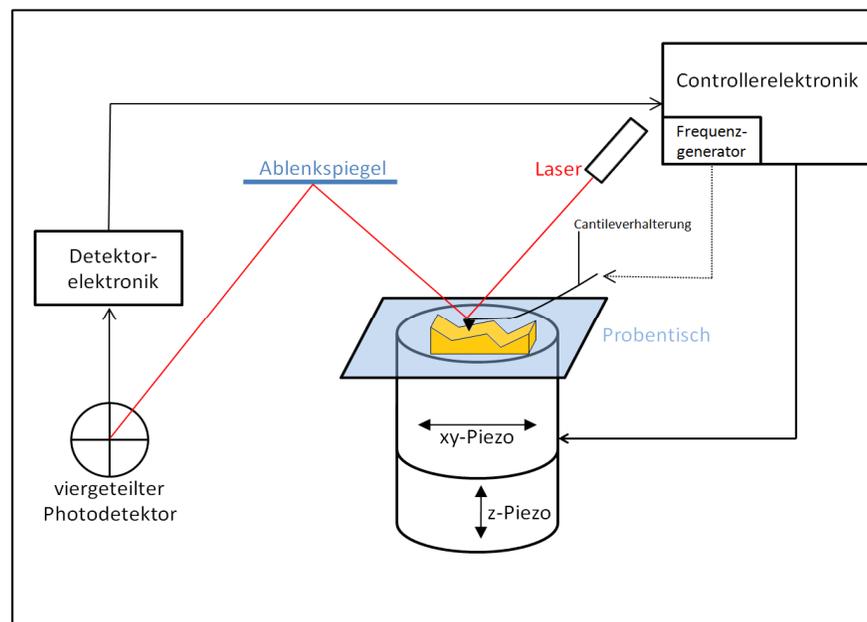


Abb. 15 Funktionsprinzip eines Atomkraftmikroskops (Magonov & Whangbo, 1998).

Um zu vermeiden, dass der Cantilever während dem Abtasten der Oberfläche mit selbiger kollidiert, befindet sich die Probe auf einem Piezoelektrischen Scanner, der die Probe in z-Richtung bewegt, um eine konstante Kraft beizubehalten. Gleichzeitig bewegt der Scanner die Probe während des Abtastvorgangs in x- und y-Richtung.

Es gibt mehrere Betriebsmodi der Rasterkraftmikroskopie, die im Folgenden klassifiziert werden:

Beim **Kontakt-Modus**, engl. **contact Mode**, steht die Messspitze in direktem mechanischem Kontakt mit der Probenoberfläche. Da sich die Orbitale der Atome in der Spitze und an der Oberfläche nicht überlappen können (Pauli-Prinzip), entstehen starke abstoßende Kräfte, die gemessen werden. Es wird hier unterschieden zwischen dem constant Height Mode (engl. für konstante Höhe) und dem constant Force Mode (engl. für konstante Kraft). Im constant Height Mode verbiegt sich die Abtastnadel beim Abrastern der Probe entsprechend der Struktur der Oberfläche. Es handelt sich hierbei um die älteste Messmethode der Rasterkraftmikroskopie, da an die Regelungstechnik nur sehr geringe Anforderungen gestellt sind. Im constant Force Mode wird der Aufhängungspunkt der Blattfeder mit Hilfe eines Piezostellelements so gesteuert, dass die Auslenkung des Cantilevers und damit die Kraft zwischen Spitze und Probe möglichst gleich bleibt.

Der **Nicht-Kontakt-Modus (NC-AFM)**, engl. **non contact (nc) Mode, dynamic Mode** gehört zur Familie der dynamischen Anregungsmodi, wobei der Federbalken durch eine externe periodische Kraft zu Schwingungen angeregt wird. Dabei wird das Prinzip der Selbsterregung ausgenutzt: das Schwingungssignal des Federbalkens wird direkt mit einer Phasenverschiebung von 90° wieder an das Anregungselement rückgekoppelt, d. h. ein geschlossener Schwingkreis entsteht. Damit schwingt der Balken grundsätzlich immer in seiner Resonanzfrequenz. Wenn jetzt zwischen der Spitze des Federbalkens und der zu untersuchenden Probenoberfläche Kräfte auftreten, so ändert sich die Resonanzfrequenz des Schwingkreises. Diese Frequenzverschiebung ist ein Maß für die Kraftwechselwirkung und wird als Regelsignal beim Abtasten der Oberfläche genutzt.

Der **intermittierende Modus** (engl. **intermittent contact Mode, tapping Mode**) gehört auch zur Familie der dynamischen Anregungsmodi. Im Gegensatz zum Nicht-Kontakt-Modus wird in diesem Fall die Anregung extern bei einer festen Frequenz nahe der Resonanzfrequenz des Federbalkens vorgenommen. Wechselwirkungskräfte zwischen der Spitze des Federbalkens und der Probenoberfläche verändern die Resonanzfrequenz des Systems, wodurch sich die Schwingungsamplitude und die Phase zwischen Anregung und Schwingung ändern. Meistens wird die Schwingungsamplitude als Regelsignal beim Abrastern der Probe genutzt, d.h. ein Regelkreis versucht die Amplitude konstant zu halten, indem der Abstand und somit die Kraftwechselwirkung zwischen Balkenspitze und Probe angepasst wird. Dieser Modus wird üblicherweise bei Messungen unter Umgebungsbedingungen oder auch in Flüssigkeiten genutzt und hat dadurch weite Verbreitung gefunden.

Probenmessung

Mithilfe der AFM-Messung kann die Bildung von supramolekularen Strukturen des β -1,3 Glucans von *P. parvulus* Stamm B399 gezeigt werden. Hierfür wurde eine Exopolysaccharidlösung (100 mg/l) über Dispersion in ddH₂O hergestellt. Das Biopolymer quoll über Nacht bei Raumtemperatur ohne dass die Lösung mechanisch gerührt wurde. Anschließend wurden die AFM-Proben mittels Tropfenverteilungsmethode hergestellt: 0,5 μ l Probe wurden auf einen fettfreien Siliciumslide gegeben und staubfrei eintrocknen lassen. Die AFM-Messung wurde im tapping mode bei Raumtemperatur bei einer Frequenz von 0,2 bis 1 Hz mittels Rasterkraftmikroskop (Veeco 3100) mit einem Silicium- Nitrid Cantilever durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Nanoskop 5.31. und Nanoskop v.071.

2.13. Sequenzierung der 16S rDNA von *Pediococcus parvulus* B399

Um die Artzugehörigkeit des EPS-bildenden *Pediococcus* Stammes zu bestimmen, wurde die 16S rDNA des Stammes B399 sequenziert.

2.13.1. DNA – Isolierung

Zur Isolierung der genomischen DNA aus *Pediococcus parvulus* B399 wurde das DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die DNA- Isolierung erfolgte nach dem Protokoll für gram-positive Bakterien wie im Handbuch des Herstellers beschrieben. Als Ausgangsmaterial wurde eine 1-2 ml Flüssigkultur (ca. 10^8 - 10^9 Zellen) eingesetzt. Die Zellen wurden für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zur Zellwand-Lyse anschließend in 180 μ l Lysepuffer (enthält Lysozym) resuspendiert und bei 37 °C für mindestens eine h inkubiert. Die Aufreinigung genomischer DNA erfolgte über eine Silica-Gel-Membran aus dem Kit ohne Phenol-Chloroform Extraktion. Durch Zentrifugation wurde die DNA selektiv an die Membran der DNeasy[®]-Säule gebunden. Proteine und zweiwertige Kationen wurden in zwei darauffolgenden Waschschrinen mit ethanolhaltigen Puffern von der Säule entfernt. Anschließend wurde die DNA mit 100 μ l DNase freiem PCR-Wasser wieder von der Säule eluiert und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.13.2. Amplifizierung der 16S rDNA

Die Untersuchung von ribosomale Gensequenzen wird häufig zur Gattungs- und Art-Identifizierung von Prokaryoten verwendet. Vor allem die Sequenzierung der small subunit (SSU) ribosomalen Sequenz (16S rDNA bei Prokaryoten) spielt auch bei der Identifizierung unbekannter Organismen eine große Rolle. Als Zielregionen für die Bindung der Oligonukleotide (Primer) dienen die hochkonservierten Bereiche am 5'- und 3'-Ende der ribosomalen Gene. Durch ihre Amplifizierung, Sequenzierung und Vergleich mit hinterlegten Sequenzen aus Datenbanken kann die Gattungs- und Artzugehörigkeit ermittelt werden.

Um die Artzugehörigkeit von *P. parvulus* B399 zu bestätigen, wurde das 16S rRNA Gen mit den konservierten Primern PurEubak 5 und PurEubak 3 (Tab. 7) amplifiziert. Die Zusammensetzung des 50 µl PCR-Ansatzes ist in Tab. 7 zusammengefasst.

Tab. 7 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifizierung der 16S rDNA.

Komponente (Stammlösung)	Volumen (µl)	bezogen auf 50 µl ^a
Forward-Primer (PurEubak5) (10 µM)	1	0,2 µM
Reverse-Primer (PurEubak3) (10 µM)	1	0,2 µM
dNTP-Mix (je 10 mM)	1	800 µM
MgCl ₂ (25 mM)	2	1 mM ^b
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM MgCl ₂)	5	1 x
Enhancer Solution P (5x)	5	0,5 x
DNase freies PCR-Wasser	31	-
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl)	2	2 U
Template-DNA (20 ng/µl)	2	40 ng
Gesamtvolumen	50	

^a die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen im 50 µl Ansatz

^b Die Gesamtkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz betrug 3 mM

Die Amplifizierung der 16S rDNA aus *Pediococcus parvulus* B399 erfolgte in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) unter den in Tabelle 8 angegebenen Reaktionsbedingungen.

Tab. 8 Darstellung der verwendeten PCR-Parameter.

Nummer	Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	56	1
4	Elongation	72	1,5
5	35 Zyklen beginnend bei Nummer 2		
6	Finale Elongation	72	10

Die PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt (2.13.3), gelektrophoretisch aufgetrennt (2.13.4), mit dem Primer PurEubak5 sequenziert und mit hinterlegten Sequenzen aus der NCBI-Datenbank verglichen. (2.13.5).

2.13.3. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIA quick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde in 30 µl Elutionspuffer (10 mM TRIS, pH 8,5) aufgenommen.

2.13.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Amplifikate erfolgte in einem 1,5%-igen Agarosegel. Für ein Agarosegel (25 x 10 cm) wurden 2,25 g Agarose in 150 ml 1 x TBE-Puffer gelöst und unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer aufgeköcht. Nach dem Abkühlen (ca. 50 °C) wurde die Lösung in die entsprechende Gelkassette gegossen und an einem Ende ein Kamm eingesetzt. Nach dem Aushärten des Geles wurde der Kamm entfernt, das Gel in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und 5 µl der PCR-Probe mit 3µl Ladepuffer (6x) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Um die Länge der Fragmente nach der Trennung bestimmen zu können, wurden 5 µl eines DNA- Längenstandards mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für 60 min. Um die DNA nach dem Elektrophoreselauf

sichtbar zu machen, wurde das Gel in eine Ethidiumbromid-Lösung (2 mg/l) für 20 min gelegt. Zur Entfernung von ungebundenem Ethidiumbromid wurde das Gel im Anschluß kurz gewässert und schließlich unter UV-Licht betrachtet und gegebenenfalls photographisch dokumentiert (Bio Vison CN 3000, Vilber-Lourmat, Eberhardzell).

2.13.5. Sequenzierung

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977) und wurde von der Firma Eurofins-MWG (Martinsried) durchgeführt. Die DNA-Sequenzen wurden mit den verfügbaren, hinterlegten Sequenzen aus der NCBI Datenbank verglichen (BLAST-Suche).

2.13.6. Nachweis des Glycosyltransferase- Gens (*gtf*-Gen)

β -1,3-D-Glucan bildende Milchsäurebakterien besitzen ein *gtf*- Gen, welches für eine Glycosyltransferase (GTF) codiert. Mithilfe der Primer GTFF und GTFR (Tab. 9) konnte das *gtf*-Gen bereits bei verschiedenen Stämmen der Arten *P. parvulus*, *P. damnosus*, *O. oeni*, *L. diolivorans*, *L. suebicus* und *L. collinoides* nachgewiesen werden. Die beiden Primer bedingen die Amplifizierung eines Bereiches innerhalb des *gtf*-Gens, so dass für *P. parvulus* ein PCR-Amplifikat von 417 bp zu erwarten ist (Werning et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde für den Stamm *P. parvulus* B399 das *gtf*-Gen nach einer modifizierten PCR-Methode nach Werning et al. (2006) nachgewiesen.

In Tabelle 9 ist die Zusammensetzung des 50 µl PCR-Ansatzes zusammengefasst.

Tab. 9 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zum Nachweis des *gtf*- Gens von *P. parvulus* B399.

Komponente (Stammlösung)	Volumen (µl)	bezogen auf 50µl ^a
Forward-Primer (GTFF) (100 pM)	2	4 pM
Reverse-Primer (GTFR) (100 pM)	2	4 pM
dNTP-Mix (je 10 mM)	4	3,2 mM
MgCl ₂ (3,5 mM)	1	70 µM ^b
PCR-Puffer (10x) (enthält 20mM MgCl ₂)	5	1x
DNase freies PCR-Wasser	33	-
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl)	2	2 U
Template-DNA (20 ng/µl)	1	20 ng
Gesamtvolumen	50	

^a die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen im 50 µl Ansatz

^b Die Gesamtkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz betrug 2,07 mM.

Das PCR-Produkt wurde im Anschluß aufgereinigt und gelelektrophoretisch analysiert (2.13.3 und 2.13.4)

2.14. Screening nach glucanolytischen Mikroorganismen

Eine Reihe von Mikroorganismen ist in der Lage, Exoenzyme darunter Proteasen, Cellulasen oder Glucanasen u.v.m. zu bilden, wenn ihnen die entsprechenden Polymere als Kohlenstoff-Quelle in einem Minimalmedium zur Verfügung stehen.

Am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Universität Mainz wurden bereits cellulase- und hemicellulaseproduzierende Organismen aus dem Termitendarm von *Zootermopsis angusticollis* isoliert und identifiziert (Schäfer et al., 1996; Wenzel et al., 2002). Einige dieser Organismen wurden in dieser Arbeit auf ihre glucanolytische Aktivität, auch im Hinblick auf eine mögliche Spaltung des EPS aus *P. parvulus* B399 getestet (Tab. 5). Da das Exopolysaccharid von *P. parvulus* B399 für Screening-Versuche nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung stand, wurden neben dem EPS (Charge 1-3) auch Vergleichssubstrate wie das β-1,3-Glucan Laminarin aus *Laminaria digitata* und das lineare β-1,3-Glucan Pachyman aus dem Basidiomyceten *Poria cocos* bzw. das farbstoffmarkierte Azurine-Pachyman verwendet.

2.14.1. Nachweis von β -Glucanasen auf festem Nährmedium

Um zu überprüfen, ob sich unter den Testorganismen mögliche Glucanase-Produzenten befanden, wurden zunächst Agarplatten (15 g/l) hergestellt, die die entsprechenden β -1,3-Glucane (2.14) in einer Konzentration von 1 g/l im CYM-Medium (2.7) enthielten. Die Lyseplatten wurden im Anschluß strichförmig mit den zu testenden Organismen beimpft, die zuvor 3 Tage lang in LB-Medium kultiviert wurden.

Nach zwei bis dreitägiger Inkubation bei 30 °C wurden die Platten auf das Vorhandensein eines Lysehofes (Indiz für Polymerabbau) um die gewachsenen Bakterienkolonien kontrolliert. Dadurch, dass lytische Abbauzonen ohne Färbung häufig nicht eindeutig zu erkennen sind, wurde eine Färbung mit Calcofluor-White (0,001%) durchgeführt (2.14.2).

Bei einer Spaltung des farbstoffmarkierten Substrates Azurine-Pachyman gehen kürzere farbstofftragende Oligosaccharide in Lösung.

2.14.2. Nachweis von β -Glucanasen in Flüssigmedium

Um nachzuweisen, dass die glucanolytische Aktivität der getesteten Mikroorganismen auf der Sekretion eines oder mehrerer lytischer Exoenzyme beruhte, wurden die Testorganismen in 20 ml CYM-Medium (2.7) kultiviert, das als Kohlenstoffquelle β -1,3 verknüpfte Glucane (EPS (Charge1-3), Hefacell[®]) enthielten. Nach fünftägiger Kultivierung wurden die Zellen über Zentrifugation (13.000 rpm, 15 min) entfernt, der Kulturüberstand über einen 0,2 μ m Filter filtriert und auf glucanolytische Aktivität in einem Lochplattentest überprüft. Hierzu wurden steril Löcher in Lyseplatten (enthielten 0,001% Calcofluor-White) (2.14.1) gestanzt und diese mit jeweils 40 μ l Kulturüberstand befüllt. Die Bildung von Lysehöfen um die Löcher wurde nach 24-48 h unter UV-Licht überprüft. Als Kontrollen dienten hitzeinaktivierte Kulturüberstände und eine handelsübliche Laminarinase (Endo- β -1,3(4)-glucanase) aus *Trichoderma sp.* (0,6 U/ml).

2.15. Kultivierung von *Delftia* sp. MV01

Delftia sp. MV01 wurde aus einer Anreicherungskultur (CZ181a) aus dem Darm der Termiten *Zootermopsis angusticollis* gewonnen und durch mehrmaliges Ausstreichen auf LB-Agar (2.7) reinkultiviert.

2.15.1. Stammhaltung

Delftia sp. MV01 wurde in LB-Medium über Nacht bei 30 °C und 150 rpm auf einem Schüttler kultiviert. Alle 4 Wochen wurde der Stamm in LB-Medium überimpft. Bei einer längeren Lagerung des Stammes wurden LB-Schrägagarröhrchen, sowie LB-Agarplatten beimpft und über Nacht bei 30 °C kultiviert und danach bei 10 °C gelagert.

2.15.2. Bildung von Exoenzymen im Labormaßstab

Es wurden verschiedene Kulturbedingungen zur Bildung von β -Glucanasen durch *Delftia* sp. MV01 ausgetestet (Tab. 10). Hierbei wurden verschiedene Substrate und Kulturvolumina getestet. Eine Variation bezüglich der eingesetzten Substratmenge, resultierend in einer gesteigerten Glucanaseaktivität durch *Delftia* sp. MV01 konnte aufgrund der begrenzten Polymermengen nicht durchgeführt werden. Für die Herstellung des CYM-Mediums mit lebenden Hefezellen von *Zygosaccharomyces bailii* (Stamm H74) als Substrat, wurde H74 über Nacht in GYP-Medium bei 30 °C aerob kultiviert. Die Zellen wurden danach abzentrifugiert (17700 x g; 15 min, 4 °C) und mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Das CYM-Medium wurde dann mit den Zellen beimpft (OD 0,8). Alle Medien wurden mit einer 0,5%-igen Übernachtskultur von *Delftia* sp. MV01 beimpft und für sieben Tage bei 150 rpm und 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Um den Zeitpunkt der höchsten Enzymproduktion zu ermitteln, wurden den Kulturen täglich jeweils 20 ml entnommen. Nach Entfernung der Zellen (16000 x g, 15 min, 4 °C) wurde der zellfreie Kulturüberstand über einen 0,2 μ m Filter filtriert und anschließend die Glucanase-Aktivität mittels DNS-Test bestimmt (2.15.5). Bei dem Test wurden die Kulturüberstände 1:20 aufkonzentriert (Vivaspin 20, Sartorius) eingesetzt.

Tab. 10 Durchgeführte Anzuchtsbedingungen von *Delftia sp.* MV01.

Medium	Substrat (1g/l)	Kulturgefäß (Volumen)	Kulturvolumen
CYM, modifiziert	EPS von <i>P.parvulus</i> B399 ¹	Erlenmeyerkolben (500 ml)	200 ml
CYM, modifiziert	Hefacell [®] , Erbslöh	Erlenmeyerkolben (500 ml)	200 ml
CYM, modifiziert	Hefacell [®] , Erbslöh	Kolben mit Schikanen (2000 ml)	800 ml
CYM, modifiziert	lebende Hefezellen H74 ²	Erlenmeyerkolben (500 ml)	200 ml
CYM, modifiziert	lebende Hefezellen H74 ²	Kolben mit Schikanen (2000 ml)	800 ml

¹EPS Charge 1²*Zygosaccharomyces bailii*

Für die Gewinnung größerer Mengen an Exoenzym, wurde *Delftia sp.* MV01 in 21 x 200 ml Kulturen mit Hefacell[®] als Substrat für 3 Tage bei 30 °C aerob kultiviert. Ausgehend von diesem Kulturüberstand wurden neben der Reinigung der Glucanase auch alle weiteren Tests durchgeführt.

2.15.3. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Kulturüberständen, zellfreien Extrakten und in den Fraktionen während der Proteinreinigung erfolgte mittels BC-Assay Protein Quantification Kit der Firma Uptima, Frankreich, nach Angaben des Herstellers.

Bei dieser kolorimetrischen Methode reduzieren die Aminosäureseitenketten von Cystein, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindungen der Proteine selbst Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen, die daraufhin spezifisch von dem Chelatbildner Bicinchoninsäure (BCA) gebunden werden. Der darausresultierende purpurfarbene Komplex kann photometrisch bei 562 nm gemessen werden. Die Proteinkonzentration berechnet sich anhand der Kalibrierungsgeraden mit bekannten BSA-Konzentrationen (0-2 mg/ml).

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.15.4. Aufarbeitung der lytischen Kulturüberstände

Lyophilisation

Die Lyophilisation, auch als Gefriertrocknung oder Sublimationstrocknung bezeichnet, ist ein Verfahren zur schonenden Trocknung und gleichzeitigen Konzentrierung von Proteinlösungen. Dabei wird durch Sublimation das Lösungsmittel aus der gefrorenen Probe beseitigt und diese so getrocknet (Rehm, 2002).

Die Lyophilisation wurde bei einem Kulturvolumen von 800 ml durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 50 ml des zellfreien Kulturüberstandes von *Delftia sp.* MV01 in einem Rundkolben (250 ml Volumen) eingefroren und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde je nach Konzentrierungsgrad in 2,5 ml oder 1,0 ml H₂O_{dest.} aufgenommen und in Dialysekapseln oder Dialyseschläuche (Membranausschlussgrenze: 14000 Da) gegen H₂O_{dest.} über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die aufkonzentrierte Enzymprobe wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Ultrafiltration und Diafiltration

Bei der Ultrafiltration werden asymmetrische Membranen mit verschiedenen Ausschlussgrenzen aus Cellulose, Celluloseester oder Polyethersulfon benutzt, um Proteine mit unterschiedlicher Größe zu trennen und die im Konzentrat enthaltenen Proteine anzureichern. Werden Membranen mit geringer Porengröße verwendet, steht weniger die Trennung als die Anreicherung von Proteinen im Vordergrund. Über das Prinzip der Diafiltration können Proteinlösungen durch das Nachspülen mit Wasser zusätzlich entsalzt werden.

Zur Konzentrierung und Entsatzung von Enzymproben mit einem Volumen von ≤ 15 ml wurden Filter der Firma Satorius mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa (Bezeichnung Vivaspin 20) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anweisungen des Herstellers.

Zur Konzentrierung und Entsatzung von Enzymproben mit kleinen Volumina von ≤ 1 ml wurden Filter der Firma Millipore mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (Bezeichnung Microcon YM10) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

Cross – Flow – Filtration

Die Cross-Flow-Filtration (auch Tangentialflow- oder Querstromfiltration) wird häufig eingesetzt, um größere Mengen an Proteinlösungen (meist ≥ 5 l) zu konzentrieren. Zusätzlich besteht nach der Konzentrierung auch die Möglichkeit der Diafiltration.

Das Prinzip dieser Filtrationsmethode besteht in der Erzeugung einer Querströmung, die mit Geschwindigkeiten von 2,5-3 m/s parallel zu einer Membran fließt, um auf der Membranoberfläche abgelagerte Stoffe zu entfernen. Die Proteinlösung wird hierbei wie bei anderen Ultrafiltrationstechniken mit Hilfe polymerer oder anorganischer Membranen (meist Polyethersulfon (PESU), Hydrosart[®] u.a) mit unterschiedlichen Porengrößen filtriert.

In der vorliegenden Arbeit diente die Cross-Flow-Filtration dazu, den Kulturüberstand von *Delftia sp.* MV01 mit einem Gesamtvolumen von 4,2 l (21 x 200 ml Kultur) etwa 56-fach aufzukonzentrieren. Hierzu wurde der bereits zellfreie Kulturüberstand (17700 x g, 60 min, 4 °C) über eine Microsart Kassette (Porengröße 0,1 µm; Membranmaterial PESU) filtriert, um eventuelle Zellreste vollständig zu entfernen. Hierfür wurde die Kassette zunächst mit 2 x 5 l H₂O_{dest} gespült (Pumpenzug ~ 20%; Eingangsdruck ca. 2 bar; Retentatdruck 0,5 bar). Darauf folgte eine Spülung mit 5 l einer 0,9%-igen NaCl-Lösung (Pumpenzug ~ 20%; Eingangsdruck ca. 2 bar; Retentatdruck 0,5 bar). Nach den Spülschritten erfolgte ein 15 minütiges Benetzen der PESU-Membran bei geschlossenem Permeatventil mit dem Kulturüberstand von *Delftia sp.* (Pumpenzug 5%; Eingangsdruck 0,55 bar; Permeatdruck 0,5 bar). Die eigentliche Filtration erfolgte dann bei gedrosseltem Permeatfluß für ~ 1,5 h (Pumpenzug 9,5%; Eingangsdruck 0,91 bar; Permeatdruck 0,2 bar).

Die Konzentrierung der Enzymlösung erfolgte im Anschluß über eine PESU- Ultrasart Kassette mit einer Porengröße von 5 kDa. Nach den beiden bereits beschriebenen Spülschritten, wurde die Membran mit der zu konzentrierenden Proteinlösung bei geschlossenem Permeatventil für 15 min gleichmäßig benetzt (Pumpenzug 7%; Eingangsdruck 0,81 bar; Permeatdruck 0,4 bar). Die Filtration erfolgte innerhalb von ca. 4 h bei einem Durchlauf von knapp 18 ml Proteinlösung / min bei den eingestellten Parametern (Pumpenzug 14%; Eingangsdruck 1,7 bar; Retentatdruck 0,1 bar gedrosselt, Permeatdruck 0,3 bar gedrosselt).

Nach der Filtration wurden die Kassetten mit 1N NaOH bei 50 °C gereinigt und in 20% Ethanol bis zur erneuten Verwendung aufbewahrt.

Die 50-fach aufkonzentrierte Enzymlösung wurde je nach Verwendungszweck dialysiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.15.5. Bestimmung der Glucanaseaktivität (DNS-Test)

Zur Bestimmung der Glucanaseaktivität in Kulturüberständen, Extrakten und während den Reinigungsschritten wurde der Dinitrosalicylsäure-Test (DNS-Test, Miller, 1959) in modifizierter Form durchgeführt. Der Test dient zum Nachweis reduzierender Zucker und damit zur indirekten Bestimmung von Glucan-spaltenden Enzymen. Durch enzymatische Hydrolyse des Glucans werden dessen reduzierende Halbacetale gebildet, die sich qualitativ und quantitativ mittels 3,5-Dinitrosalicylsäure nachweisen lassen. 3,5-Dinitrosalicylsäure wird dabei zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert, was zu einem Farbumschlag von gelb nach rot führt. Die Konzentration an gebildeter 3-Amino-5-nitrosalicylsäure kann photometrisch bei 575 nm mit Hilfe einer Glucosestandardreihe bestimmt werden und entspricht der Konzentration an neugebildeten reduzierenden Endgruppen.

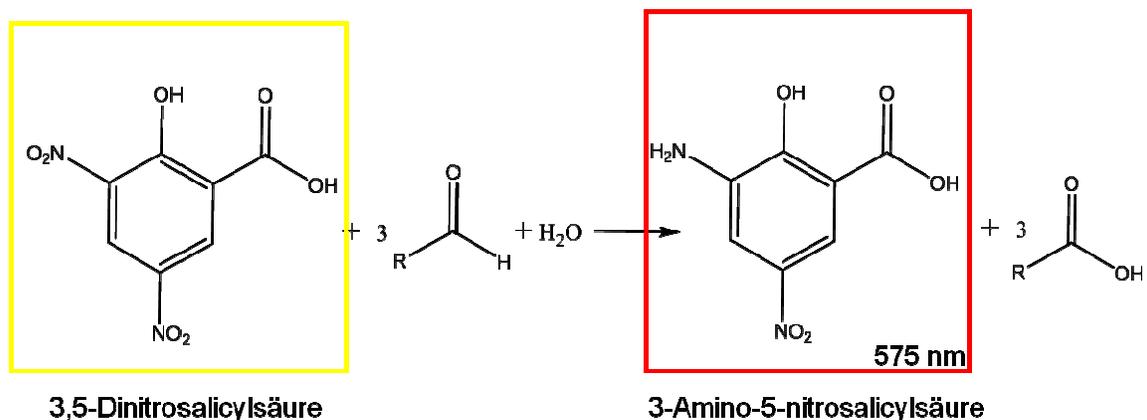


Abb. 16 Chemie des DNS-Tests (Miller, 1959).

Standardbedingungen

450 μl Laminarinlösung (0,25% in 50 mM Na^+ -Acetatpuffer pH 6,0) wurden mit 125 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und 125 μl Enzymlösung für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 μl Glucoselösung (1 mg/ml) und 750 μl DNS-Reagenz (2.6.6) hinzugefügt und die Proben im heißen Wasserbad für 15 min gekocht. Danach wurden die Reaktionsansätze auf RT abgekühlt und bei 575 nm gemessen. Zur Auswertung diente eine Standardkurve mit bekannten Glucosekonzentrationen (0-1000 $\mu\text{g/ml}$).

Alle Messungen wurden in Doppelansätzen durchgeführt. Als Kontrollen dienten hitzeinaktivierte Enzymlösungen (15 min gekocht).

Definition der Enzymaktivität

Für die Bestimmung der Glucanaseaktivität wurde folgende Unitsdefinition festgelegt:

Ein Unit entspricht der Enzymmenge, die die Freisetzung von 1 μmol reduzierender Enden in Form von Glucose pro Minute unter den gegebenen Standardbedingungen katalysiert.

2.16. Reinigung der Glucanase aus *Delftia sp.* MV01**Anionenaustauscherchromatographie**

Bei der Ionenaustauscherchromatographie werden Proteine aufgrund ihrer Ladung getrennt. Wählt man den pH-Wert so, dass ein Teil der Proteine protoniert, ein anderer Teil deprotoniert vorliegt, kann eine Trennung dieser beiden Gruppen erfolgen. Die Säulenmatrix des Anionenaustauschers trägt positiv geladene Gruppen, an die die negativ geladenen Proteine binden können. Proteine mit einem höheren isoelektrischen Punkt sind bei dem eingestellten pH-Wert nicht negativ geladen, können dadurch nicht an die Säule binden und sind im Durchfluß zu finden. Die Proteine, die an die Säule binden, werden schließlich mit NaCl in erhöhter Konzentration eluiert. Cl⁻-Ionen werden gegen die negativ geladenen Proteine ausgetauscht; diese eluieren (Rehm, 2006).

Um ein geeignetes Puffersystem zu etablieren, wurden zunächst Anionenaustauscher-Säulchen (Vivapure Q Mini H) der Firma Sartorius (2.2) verwendet. Das positiv geladene Gegenion der Säulenmatrix war quarternäres Aminomethyl.

Die Anreicherung der β -1,3-Glucanase erfolgte an einem FPLC-System der Firma Pharmacia. Hierfür wurde zunächst die aufkonzentrierte Proteinprobe (39,75 mg Gesamtprotein) gegen den Eluenten A (20 mM TRIS/HCl pH 7,5) dialysiert, um eine maximale Bindung der Probe an den Austauscher zu erzielen. Anschließend wurden 2 ml Probe (Proteinmenge: 1,06 mg/ml) auf die Anionenaustauschersäule (MONO Q (HR 5/5; 0,5 x 50 mm); General Healthcare) gegeben, die zuvor mit 20 mM TRIS/HCl pH 7,5 äquilibriert wurde. Die Proteine wurden im Anschluß mittels einen linearen NaCl-Gradienten (Eluent B) bei einer Flußrate von 1ml /min von der Säule eluiert. Das Eluat wurde mittels UV-Detektor bei 280 nm gemessen und anschließend in 1 ml Volumen fraktioniert (insgesamt 36 Fraktionen). Die Fraktionen wurden wie unter 2.14.2 beschrieben auf Glucanaseaktivität untersucht. Dieselben aktiven Fraktionen pro FPLC-Lauf wurden vereinigt und mittels Ultrafilter (Vivaspin 20, Sartorius) für den nachfolgenden Reinigungsschritt auf 0,9 ml aufkonzentriert. Insgesamt wurden 24 Läufe an der Mono Q-Säule

durchgeführt. Das Proteinbandenmuster der aktiven Fraktionen wurde darüberhinaus im SDS- und Aktivitätsgel (2.17.1 + 2.17.2) analysiert.

Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde ebenfalls an der FPLC-Apparatur der Firma Pharmacia durchgeführt. Hierzu wurden 200 µl konzentrierte Proteinlösung (0,8-2,02 mg/ml je nach Mono Q Fraktion) auf eine Sephadex G 75 (HR 10/30; 10 x 300 mm) –Säule der Firma General Healthcare gegeben, die zuvor mit 20 mM TRIS/HCl pH 7,5 mit 200 mM NaCl (2.6.10) äquilibriert wurde. Die Elution der Proteine erfolgte im Anschluß mit demselben Puffer bei einer Flußrate von 0,5 ml / min. Das Eluat wurde mittels UV-Detektor bei 280 nm gemessen und anschließend in 1 ml Volumen fraktioniert (insgesamt 20 Fraktionen). Die Fraktionen wurden im Lochplattentest (2.14.2) auf Glucanaseaktivität untersucht. Des Weiteren wurde das Proteinbandenmuster nach der Reinigung im SDS-Gel (2.17.1) analysiert.

2.17. Charakterisierung der β -1,3 Glucanase aus *Delftia sp.*

2.17.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In denaturierenden Polyacrylamidgelen lassen sich Proteine aufgrund ihrer Größe in einem elektrischen Feld auftrennen, denn mittels SDS (engl., sodium dodecyl sulfate), ein anionisches Detergenz, werden die Eigenladungen der Proteinen so effektiv überdeckt, dass diese ein konstantes Ladungs- und Massenverhältnis erhalten, wodurch eine Auftrennung nach Proteingröße möglich wird. Wegen der hohen Auflösung, die mit der diskontinuierlichen Elektrophorese erreicht werden kann, wird standardmäßig für Proteintrennungen ein von Laemmli et. al. (1970) eingeführtes SDS-haltiges, diskontinuierliches TRIS-HCl/TRIS-Glycin-Puffersystem eingesetzt. Bei der Elektrophorese im SDS-Gel erhält man über bestimmte Bereiche eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der Proteine. Mit Hilfe von Standards lassen sich die Molekulargewichte der Proteine ermitteln.

Herstellung eines 12,5%-igen SDS-Gels

1,05 ml H₂O_{dest.} wurden mit 1,51 ml Trenngelpuffer und 1,25 ml Acrylamid vermischt und entgast. Anschließend wurden 40 µl 10%ige SDS-Lösung, 3,3 µl TEMED und 32 µl einer 10%-igen Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) hinzugefügt. Die Lösung wurde in die entsprechenden Gelkassetten gegossen und mit H₂O_{dest.} überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Wasser entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel (bestehend aus 1,23 ml H₂O_{dest.}, 0,2 ml Sammelgelpuffer, 0,2 ml Acrylamid, 17 µl 10%-ige SDS-Lösung, 2 µl TEMED und 17 µl 10%-ige APS-Lösung) überschichtet und ein Kamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel bei 4 °C bis zur Verwendung feucht gelagert.

Elektrophorese

Nach dem Einsetzen des SDS-Gels in die entsprechende, mit Kammerpuffer gefüllte Gelkammer, wurde der Probenkamm entfernt, die Geltaschen mit den Proteinproben (22,5 µl Probe mit 7,5 µl Probenpuffer Rotiload1 versetzt und bei 99 °C für 5 min erhitzt) befüllt. Als Größenstandard wurden 3-5 µl PageRuler™ (Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Danach wurden die Gele für etwa 20 min in Proteinfärbelösung gelegt und anschließend für weitere 20 min in Entfärbelösung entfärbt. Für eine Lagerung wurde das Gel in eine 10%-ige Essigsäurelösung überführt.

Im Falle einer Detektion von sehr geringen Proteinmengen im SDS-Gel, wurde anstelle der herkömmlichen Coomassie-Färbung eine Silberfärbung mittels des PageSilver™ Silver Staining Kit (Fermentas) durchgeführt. Hierbei wurde nach Angaben des Herstellers (staining protocol for miximum sensitivity) vorgegangen.

2.17.2. Nachweis von β-1,3 Glucanasen im Aktivitätsgel

Exoenzyme, darunter auch β-1,3-Glucanasen lassen sich im Proteingemisch mittels Zymogramm-Technik bezüglich ihrer molekularen Masse nachweisen. Die Methode beruht darauf, dass zunächst die Enzyme entsprechend ihrer Größe im SDS-Gel aufgetrennt werden und in einem nächsten Schritt das SDS aus dem Gel durch Isopropanol- oder Triton X-100 Behandlung entfernt wird, so dass die entsprechenden Enzyme wieder renaturiert und somit aktiviert werden. Wird dieses renaturierte Gel nun auf ein Agarosegelbett gelegt, das ein β-1,3 Substrat wie Laminarin enthält, wird Glucanaseaktivität in Form lytischer Abbauzonen im Gel dort sichtbar, wo die molekularen Massen der Enzyme einzuordnen sind.

Für den Nachweis von β -1,3-Glucanasen im Aktivitätsgel, wurde zunächst das Proteingemisch des Kulturüberstandes im SDS-Gel aufgetrennt (2.17.1). Dann wurde das SDS-Gel für 30 min in Renaturierungspuffer gewaschen. Darauf folgten zwei weitere Waschschrirte für jeweils 15 min in 10 mM Phosphatpuffer pH 5,9. Das renaturierte Gel wurde nun auf ein 0,3%-iges Laminaringelbett (50 mM Na⁺-Acetatpuffer pH 6,0, 2% Agarose, 0,001% Calcofluor-White) gelegt und bei 30 °C inkubiert. Hydrolyse des Substrates und somit Glucanaseaktivität wird in Form lytischer Abbauzonen unter UV-Betrachtung sichtbar.

2.17.3. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) (Endpunktmethode) ist ein elektrophoretisches Verfahren, bei dem Proteine im elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten wandern, bis sie an den pH-Wert gelangen, an dem ihre Nettoladung Null ist und damit auch ihre Wanderungsgeschwindigkeit. Dies ist ihr isoelektrischer Punkt. Unter der Nettoladung eines Proteins versteht man die Summe aller negativen und positiven Ladungen an den Aminosäureseiten- und -gruppen. Dabei spielt auch die dreidimensionale Konfiguration des Proteins eine Rolle. Weiterhin beeinflussen auch Phosphorylierung, Glykosylierung und Oxidationszustand den Ladungszustand der Proteine.

Durchführung der IEF

Nach der Kühlung der Elektrophoreseeinheit auf 5 °C, wurde das IEF-Gel aufgelegt. Die Elektrodendochte wurden mit Kathoden- bzw. Anodenflüssigkeit durchtränkt und auf die jeweiligen Seiten des IEF-Gels angeordnet. Der Applikationsstreifen zur Auftrag der Proben wurde mittig platziert. Danach wurde eine Spannung von 2000 V (5 mA, 1 W) aufgebaut. Im Anschluß wurden jeweils 8 μ l der entsalzten Enzymprobe pro Tasche aufgetragen. Als Proteinstandard diente ein IEF-Marker 3-10 der Firma Serva.

Die isoelektrische Fokussierung wurde für etwa 3 h durchgeführt. Dann wurde das Gel für 1 h in 200 ml Fixierlösung gelegt und danach für 1 min in 200 ml Entfärbelösung. 100 ml der Stammlösung 1 wurden mit 100 ml der Stammlösung 2 vermischt und das Gel mit dieser Lösung überschichtet. Nach 20 minütiger Färbung, wurde für etwa 10 min mit Entfärbelösung entfärbt. Gegebenfalls wurde so lange entfärbt, bis der Hintergrund des Geles keine Färbung mehr aufwies. Das Gel wurde zum Schluß in H₂O_{dest} gewaschen und bei RT getrocknet.

2.17.4. Protein-Blotting

Durch das Protein-Blotting werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran (oft PVDF-Membran) übertragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Semi-Dry-Blot-Verfahren von Kyhse-Anderson (1984) verwendet.

Hierbei wurde zunächst die Proteinprobe mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.17.1). Die PVDF-Membran wurde für 1 h in Methanol, danach für 1 h im Kathodenpuffer eingeweicht. Auf die Edelstahlplatte der Blot-Apparatur wurden zwei in Kathodenpuffer eingeweichte Filterpapiere gelegt. Auf diese Filterpapiere wurde das SDS-Gel gelegt, gefolgt von der PVDF-Membran und zwei weiteren Filterpapieren (getränkt mit Anodenpuffer). Der Transfer erfolgte für 2 h bei 4 °C. Die eingesetzte Stromstärke wurde anhand der Fläche der PVDF-Membran berechnet (Fläche der PVDF-Membran x 0,8 = Stromstärke [A]). Nach der Übertragung der Proteine wurde die Membran in Wasser gewaschen und für 1 h in Methanol inkubiert. Zur Sichtbarmachung des Proteins, wurde der Blot für 2 min in der Färbelösung (2.6.3) inkubiert. Anschließend wurde der Blot für 10 min in der Entfärbelösung I (2.6.3) entfärbt. Zum Schluß wurde mit der Färbelösung II (2.6.3) für weitere 10 min entfärbt, wodurch der Hintergrund des Blots weitestgehend farbfrei wurde.

Die immobilisierte Proteinbande auf der getrockneten PVDF-Membran konnte nun mit dem Skalpell ausgeschnitten und für eine N-terminale Sequenzierung verwendet werden.

2.17.5. N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung erfolgte mittels Edman-Abbau (Edman & Berg, 1967). Hierbei reagiert zunächst Phenylisothiocyanat mit der ungeladenen endständigen Aminogruppe des Peptids zu einem Phenylthiocarbamoylderivat. Als Nächstes wird unter schwach sauren Bedingungen ein zyklisches Derivat dieser endständigen Aminosäure abgespalten. Zurück bleibt ein um eine Aminosäure verkürztes Peptid. Die zyklische Verbindung eine Phenylthiohydantoin-Aminosäure läßt sich chromatographisch identifizieren. Das verkürzte Peptid kann dann einem erneuten Edman-Abbau unterzogen werden. Dieser Zyklus kann zehn bis 20 mal wiederholt werden, wodurch schrittweise eine Identifizierung des N-Terminus des Peptids herbeigeführt wird.

Die Sequenzierung wurde als Auftragsarbeit von der Firma Toplab (Martinsried) durchgeführt.

2.17.6. Nachweis von Laminarin-Spaltprodukten

Für den Test wurde 1 mg Laminarin in 50 mM Na⁺-Acetatpuffer pH 6,0 gelöst und mit dem Enzym (3 U/mg) über 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Spaltprodukte wurden dann mittels Dünnschichtchromatographie nach der Methode von Gacto et al. (2000) nachgewiesen.

2.17.7. Substratspezifität

Zur Bestimmung der Substratspezifität der Glucanase wurden 0,25% Carboxymethyl-Pachyman (Megazyme, Irland), Carboxymethyl-Cellulose (Sigma, Steinheim), Dextran von *Leuconostoc sp.* (Sigma, Steinheim), Pustulan (Roth), Xylan aus Haferspelzen (Sigma, Steinheim) und Laminarin aus *Laminaria digitata* (Sigma, Steinheim) in 50 mM Na⁺-Acetatpuffer pH 6,0 mit dem Enzym (3 U/mg) bei 30 °C für 15 min inkubiert. Des Weiteren wurden 0,125% EPS (50 mM Na⁺- Acetatpuffer pH 6,0) mit der gleichen Enzymmenge für 15 min bei 30 °C inkubiert. Als Kontrollen dienten jeweils hitzeinaktivierte Enzymlösungen. Alle Tests wurden als Doppelbestimmungen angesetzt. Der Nachweis von reduzierenden Gruppen erfolgte wie unter 2.15.5 beschrieben. Die Aktivität des Enzyms gegen Laminarin wurde auf 100% festgesetzt.

2.17.8. Ermittlung des pH-Optimums

Tab. 11 Verwendete Puffer zur Ermittlung des pH-Optimums.

Puffersystem ^a	Eingestellter pH-Wert
Na ⁺ -Citratpuffer	3,0
Na ⁺ -Citratpuffer	3,5
Na ⁺ -Citratpuffer	4,0
Na ⁺ -Acetatpuffer	4,5
Na ⁺ -Acetatpuffer	5,0
Na ⁺ -Acetatpuffer	6,0
TRIS - HCl	7,0
TRIS - HCl	8,0

^a Alle Puffer hatten eine Konzentration von 50 mM.

Zur Ermittlung des pH-Optimums, wurde das β -1,3-Glucan Laminarin in den verschiedenen Puffersystemen (Tab. 11) in einer Konzentration von jeweils 0,25% angesetzt. Der Test wurde wie unter 2.15.5 beschrieben mit teilgereinigter Glucanase [3 U/mg] durchgeführt. Der pH-Wert, für den die höchste Aktivität gemessen wurde, wurde dann als neue 100% relative Aktivität festgelegt.

2.17.9. Ermittlung des Temperatur-Optimums

Zur Ermittlung des Temperatur-Optimums der Glucanase aus *Delftia sp.*, wurde eine 0,25% Laminarinlösung (50 mM Na⁺-Citratpuffer pH 4,0) hergestellt und wie unter den Standardbedingungen (2.15.5) beschrieben nicht nur bei 37 °C, sondern auch bei folgenden Temperaturen mit der Enzymlösung [3 U / mg] inkubiert: 10 °C, 12 °C, 15 °C, 18 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C und 80 °C. Der DNS-Test wurde anschließend wie unter 2.15.5 durchgeführt. Die Temperatur, für die die höchste Aktivität gemessen wurde, wurde in diesem Test als 100% relative Aktivität festgelegt.

2.18. Aktivität des Enzyms unter weinrelevanten Bedingungen

2.18.1. Niedrige Temperaturen

Um zu überprüfen, ob das Enzym bei weinrelevanten Temperaturen (10-25 °C) über einen längeren Zeitraum aktiv und stabil blieb, wurden 0,25% Laminarinlösung (50 mM Na⁺-Citratpuffer pH 4,0) mit dem teilgereinigten Enzym [3 U/mg] für zwei Stunden bei 10-25 °C inkubiert. Der DNS-Test wurde anschließend wie unter 2.15.5 beschrieben durchgeführt. Als 100% relative Aktivität wurde die Temperatur gesetzt, bei der in diesem Test die höchste Enzymaktivität gemessen werden konnte.

2.18.2. Unterschiedliche Ethanolkonzentrationen

Zur Ermittlung der Ethanol-Toleranz der Glucanase im angereinigten Kulturüberstand wurden folgende Ethanolkonzentrationen (v/v) ausgehend von 96%-igem Ethanol hergestellt:

5%, 10%, 15%, 17,5% und 30%.

0,25% Laminarin wurde in den angegebenen Ethanolkonzentrationen gelöst und mit dem Enzym [3 U/mg] für eine Stunde bei 20 °C inkubiert. Der DNS-Test wurde anschließend wie

unter 2.15.5 beschrieben durchgeführt. Der Ansatz ohne Ethanolzusatz (Kontrolle) wurde als 100% relative Aktivität festgelegt.

2.18.3. Unterschiedliche Phenolkonzentrationen

Um zu überprüfen, ob Phenole einen Einfluß auf die Enzymaktivität hatten, wurde ein Gemisch aus drei Phenolen (Ferulasäure, Gallussäure und Catechin) mit folgenden Konzentrationen (mg/l) angesetzt: 5, 10, 40.

0,25% Laminarin wurde in den angegebenen Phenolkonzentrationen gelöst und mit dem Enzym [3 U/mg] für eine h bei 20 °C inkubiert. Der DNS-Test wurde anschließend wie unter 2.15.5 beschrieben durchgeführt. Der Ansatz ohne Phenolzusatz (Kontrolle) wurde als 100% relative Aktivität festgelegt.

2.18.4. Unterschiedliche Kaliumdisulfitkonzentrationen

Der Einfluß von Sulfit auf die Enzymaktivität wurde mit unterschiedlichen Kaliumdisulfitkonzentrationen (10, 50 und 100 mg/l) überprüft. Hierbei wurde 0,25% Laminarin in den angegebenen Kaliumdisulfitlösungen resuspendiert und mit dem Enzym für eine h bei 20 °C inkubiert. Der DNS-Test wurde anschließend wie unter 2.15.5 beschrieben durchgeführt. Der Ansatz ohne Kaliumdisulfitzusatz (Kontrolle) wurde als 100% relative Aktivität festgelegt.

2.19. Hydrolyse des Exopolysaccharids von *Pediococcus parvulus* B399 durch die Glucanase

2.19.1. Bestimmung von reduzierenden Gruppen

Die Freisetzung von reduzierenden Gruppen bei der Spaltung des EPS durch die β -1,3-Glucanase aus *Delftia* sp. MV01 wurde bei 50 °C über einen Zeitraum von sechs Stunden verfolgt. Dazu wurde eine 0,125% EPS-Lösung (50 mM Na⁺-Citratpuffer pH 4,0) hergestellt. 450 μ l der Substratlösung wurden mit 125 μ l Enzymlösung (3 U/mg) und 125 μ l H₂O_{dest} bei 50 °C für 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 und 360 Minuten inkubiert. Die restlichen Testschritte erfolgten wie unter 2.15.5 beschrieben. Als Kontrolle diente hitzeinaktivierte Enzymlösung.

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Auswertung diente eine Glucosestandardreihe (0-1000 µg/ml).

2.19.2. Bestimmung der Viskositätsabnahme

Mithilfe von viskosimetrischen Messungen kann Polysaccharidase-Aktivität sehr sensitiv bestimmt werden, denn eine enzymatische Spaltung des Polymers in der Mitte der Hauptkette des β -1,3,(1,2)-Glucans von *P. parvulus* würde zu einer signifikanten Viskositätserniedrigung des Polymers führen. Für die Polymerabbauversuche wurden 300 µl β -Glucanlösung (8 mg/ml) mit 100 µl der angereinigten β -Glucanase aus *Delftia sp.* (3 U/mg) bei 20 °C und 50 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert und die Viskositätsabnahme mittels Viskosimeter (Meßgeometrie: Kegel-Platte, Kegeldurchmesser 40 mm, 1° Kegelwinkel) bei konstanter Scherrate 100 (s⁻¹) und 25 °C verfolgt. Als Kontrolle diente hitzeinaktivierte Enzymlösung. Um mikrobielles Wachstum während der Inkubation zu vermeiden, wurde den Reaktionsansätzen Natriumazid (0,001%) zugefügt.

In einem weiteren Viskositätsversuch wurde das β -Glucan (8 mg/ml) statt in 50 mM Na⁺-Citratpuffer pH 4,0 in Wein (Weißburgunder, 2007, pH 3,77) gelöst. 300 µl dieser β -Glucanlösung wurden mit 100 µl der angereinigten β -Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 (3 U/mg) bei 20 °C über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Um mikrobielles Wachstum während der Inkubation zu vermeiden, wurde den Reaktionsansätzen Natriumazid (0,001%) zugefügt. Veränderte Viskositäten wurden wie bereits beschrieben gemessen. Als Kontrolle diente hier ebenfalls hitzeinaktivierte Enzymlösung.

2.19.3. Bestimmung der Molmassenverteilung im Exopolysaccharid

Anhand von GPC – Messungen lassen sich veränderte Molmassenverteilungen innerhalb des EPS von *P. parvulus* bedingt durch die Aktivität der Glucanase bestimmen. Durch die Hydrolyse des Polymers verändert sich sowohl das zahlenmittlere, als auch das gewichtsmittlere Molekulargewicht des Polymers. Sind diese beiden Parameter bekannt, erhält man nach Gleichung (11) die Polydispersität D . Je größer diese ist, desto uneinheitlicher ist das Polymer. Besitzen dagegen alle Moleküle die gleiche Kettenlänge, so hat das Polymer die Polydispersität 1 und wird als monodispers bezeichnet (Eckelt, 2004).

$$D = \frac{M_w}{M_n} \quad (11)$$

Für den Versuch wurden jeweils 10 mg Exopolysaccharid in 10 mM Na⁺-Citratpuffer pH 4,0 gelöst und mit der angereinigten Glucanase (3 U/mg) über einen Zeitraum von 48 Stunden bei 50 °C inkubiert. Nach 6, 18, 24 und 48 h wurde die Reaktion jeweils auf Eis gestoppt und veränderte Molmassenverteilungen des Polymers wie unter 2.12.5 beschrieben mittels GPC analysiert. Als Kontrolle diente eine unbehandelte EPS-Lösung.

2.19.4. Bestimmung von strukturellen Änderungen des Polymers

Mithilfe von IR-Messungen kann die Hydrolyse des Polymers durch die Glucanase aus *Delftia sp.* insofern gezeigt werden, dass eine Spaltung des Polymers zu einer Abnahme von charakteristischen Absorptionsbanden beispielsweise für β -1,3-Glucane führt. Um die Hydrolyse des Polymers im zeitlichen Verlauf darzustellen, wurden 0,25% EPS-Lösung (10 mM Na⁺-Citratpuffer pH 4,0) mit der Glucanase [3 U/mg] bei 50 °C über einen Zeitraum von 48 h inkubiert. Nach 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 und 48 h wurden 500 μ l dem Testansatz entnommen und wie unter 2.12.4 (Probenmessung) beschrieben an einem Vortex 70 Gerät (Bruker Optik, Karlsruhe) am MPI für Polymerforschung Mainz gemessen. Die Auswertung erfolgte über die Software Opus 6.0 (Bruker Optik, Karlsruhe). Als Referenz diente ein Testansatz, der ohne Inkubation sofort gemessen wurde. Für die spätere Auswertung wurde dieser Referenzansatz aus allen Spektren herausgerechnet.

2.20. Phänotypische Charakterisierung von *Delftia sp.* MV01

Um *Delftia sp.* MV01 als mögliche neue Art mit dem Typstamm *Delftia saccharophila* MV01^T beschreiben zu können, wurden neben genotypischen Methoden, auch eine Reihe phänotypischer Eigenschaften von *Delftia sp.* MV01, darunter auch die Verwertung verschiedenster Substrate bestimmt und mit den Eigenschaften der zwei bereits beschriebenen *Delftia* Arten (*Delftia lacustris* und *Delftia tsuruhatensis*) verglichen.

2.20.1. Ermittlung der Zellmorphologie von *Delftia sp.* MV01

Zur Bestimmung der Zellgröße und Morphologie wurden Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) hergestellt. Hierzu wurden 5 µl einer dichtbewachsenen Flüssigkultur auf ein Deckgläschen pipettiert und staubfrei eintrocknen lassen. Die Präparate wurden anschließend für 12–24 h in 2,5% Glutaraldehyd (100 mM Phosphatpuffer) fixiert. Danach wurden die Präparate mit einer Saccharoselösung für 1 h gereinigt und dann für 1 h in 1% gepuffertem Osmium nachfixiert. Im Anschluß erfolgte eine schrittweise Dehydrierung der Proben in einer aufsteigenden Acetonreihe (30-100%). Zum Schluß wurden die Proben über die Methode der kritischen Punkt Trocknung (31 °C, 73 bar) getrocknet und unter dem Philips XL30 ESEM Elektronenmikroskop (Institut für klinische und funktionelle Anatomie, Universität Mainz) betrachtet.

2.20.2. Ermittlung der phänotypische Eigenschaften von *Delftia sp.* MV01

Zu der phänotypischen Charakterisierung gehörten eine Reihe von mikrobiologischen Tests zur Identifizierung von Mikroorganismen. Folgende Tests wurden mit *Delftia sp.* MV01 nach den Angaben von Collins und Lyne (1984) durchgeführt:

- Gram- Färbung
- Oxidase-Test
- Katalase-Test
- Nitrat-Reduktion
- Citratverwertung
- O / F – Test (Glucose)

2.20.3. Ermittlung des Temperaturoptimums

Zu Bestimmung der optimalen Wachstumstemperatur, wurde der Stamm MV01 bei 10 °C, 20 °C, 26 °C, 30 °C und 43 °C in TSB-Medium (2.7) über 90 h unter aeroben Bedingungen kultiviert und die OD bei 600 nm gemessen.

2.20.4. Ermittlung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes, wurde der Stamm MV01 in TSB-Medium (2.7) mit den pH-Werten 4-9 über knapp 80 h aerob bei 30 °C kultiviert und das Wachstum bei 600 nm gemessen.

2.20.5. Beeinflussung des Wachstums in Anwesenheit von NaCl

Das Wachstum von Stamm MV01 in Anwesenheit von verschiedenen NaCl-Konzentrationen (0%, 1%, 3%, 6%, 10%) wurde bei 30 °C unter aeroben Bedingungen in TSB-Medium (2.7) über 80 h bei einer OD von 600 nm verfolgt.

2.20.6. Ermittlung des Substratverwertungsspektrums

Die Verwertung verschiedenster Substrate, darunter Mono- und Disaccharide, Polymere, Aminosäuren, sowie verschiedene organische Säuren (Tab. 12) durch den Stamm MV01 wurde in 10 ml Basalmedium A (2.7) mit jeweils 5 g/l der zu testenden Substanz (Tab. 12) unter aeroben Bedingungen überprüft. Zum Vergleich wurden die Typstämme der bereits beschriebenen *Delftia* Arten *Delftia lacustris* DSM 21246^T und *Delftia tsuruhatensis* DSM 17581^T bei dem Versuch mitgeführt. Alle Tests wurden als Doppelbestimmungen angesetzt.

Tab. 12 Verwendete Substrate zur Überprüfung des Verwertungsspektrums von Stamm MV01.

Mono-/Disaccharide	Zuckeralkohole	Polymere ¹	Organische Säuren	Aminosäuren
D-(-)-Arabinose	Glycerol	Casein	Fumarat	L-Aspartat
D-Fructose	D-Mannitol	Chitin	K ⁺ /Na ⁺ -Tatrat	D-Glutamat
D-Galactose		Dextran	Malat	L-Prolin
D-Glucose		Glykogen	Maleat	L-Serin
D-Lactose		Laminarin	Malonat	L-Tryptophan
D-Mannose		Mannan	Na ⁺ -Acetat	L-Valin
Maltose		Pullulan		
Saccharose		Pustulan		
D-Xylose		Stärke		
		Xylan		

¹ Casein, Chitin, Laminarin und Stärke wurden auch auf festem Nährmedium getestet.

2.20.7. Verwertung von Polymeren

Die Spaltung von Casein, Azure-Chitin, Laminarin und Stärke wurde auf festem Nährmedium beurteilt. Zum Vergleich wurden die Typstämme der bereits beschriebenen *Delftia* Arten *Delftia lacustris* DSM 21246^T und *Delftia tsuruhatensis* DSM 17581^T mitgeführt. Für den Test wurden 1 g/l der Substrate jeweils in CYM-Medium (2.7) gelöst, welches 15 g/l Agar zur Verfestigung enthält. Im Falle der Laminarinspaltung, wurde dem Medium noch 0,001% Calcofluor-White zugefügt. Nach dem Erstarren der Platten, wurden die Bakterien strichförmig aufgetragen und bei 30 °C für 2 Tage inkubiert.

Caseinspaltung

Zum Nachweis der Caseinspaltung wurde die Platte mit 20% Trichloressigsäure überschichtet. Im Falle des Caseinabbaus wurde ein Hof um die ausgestrichenen Bakterien sichtbar.

Chitinabbau

Bei einer Spaltung von Azure-Chitin, gehen farbstofftragende N-Acetylglucosaminoligomere in Lösung. Der Hof um die Bakterienkolonien wird demnach blau.

Laminarinabbau

Laminarinspaltung wurde in Form eines dunklen Hofes unter UV-Licht sichtbar.

Stärkespaltung

Die bewachsenen Platten wurden mit Lugolscher-Lösung überschichtet. Im Falle einer positiven Reaktion erscheint ein gelber Hof um die Bakterien.

2.20.8 Verwertung von Glucose

Die Verwertung von Glucose durch den Stamm MV01 wurde mittels HPLC (2.10) über einen Zeitraum von 60 h verfolgt. Bei diesem Versuch wurde auch das Wachstum von Stamm MV01 bei 600 nm im selben Zeitraum bestimmt. Alle Tests wurden als Doppelbestimmungen angesetzt. Des Weiteren wurden auch *Delftia lacustris* DSM 21246^T und *Delftia tsuruhatensis* DSM 17581^T bei diesem Versuch mitgeführt.

2.21. Genotypische Charakterisierung von *Delftia sp.* MV01

2.21.1. Sequenzierung der 16S rDNA von *Delftia sp.* MV01

Für die Sequenzierung der 16S rDNA wurde zunächst die DNA wie unter 2.13.1 beschrieben isoliert. Anschließend wurde die 16S rDNA mit den universellen Primern PurEubak3 und PurEubak5 amplifiziert und das PCR-Amplifikat aufgereinigt (2.13.2 + 2.13.3). Um möglichst die gesamte 16S rRNA Gensequenz (1500 bp) zu erhalten, wurde mit den genannten Primern in beide Richtungen sequenziert. Die Sequenzierung wurde als Auftragsarbeit von der Firma Eurofins-MWG (Martinsried) durchgeführt (2.13.5).

2.21.2. Phylogenetische Analyse

Zur Berechnung eines phylogenetischen 16S rDNA-Stammbaumes wurde ein 16S rDNA-Sequenzalignment des Stammes MV01 mit verwandten Typstämmen unter Verwendung der Software CLUSTAL X 2.0 (Larkin et al., 2007) durchgeführt. Die Software basiert auf dem Jukes-Cantor-Algorithmus zur Konstruktion eines phylogenetischen Stammbaumes nach dem Neighbor-Joining –Modell (Saitou & Nei, 1987). Zur statistischen Absicherung wurden Bootstrap-Analysen durchgeführt (Felsenstein, 1985). Bootstrap-Werte geben an, wie oft die Verzweigungen aus den Datensätzen stabil berechnet werden konnten.

Als outgroup wurde *Neisseria gonorrhoeae* angegeben.

2.21.3. DNA-DNA-Hybridisierung

Mit der DNA-DNA Hybridisierung kann getestet werden, ob zwei Organismen verschiedenen Arten angehören, obwohl die Sequenzierung ihrer 16S rRNA und möglicherweise auch der Phänotyp keine signifikanten Unterschiede zwischen ihnen gezeigt haben.

Falls zwei Organismen viele ähnliche oder identische Nukleotidsequenzen in ihrer DNA besitzen, dann weisen sie auch sehr ähnliche Gene auf. Solche DNA-Moleküle würden proportional zur Ähnlichkeit in ihren Sequenzen miteinander hybridisieren. Die genomische Hybridisierung misst dabei den Grad der Sequenzähnlichkeit.

Das Grundprinzip basiert auf den Renaturierungskinetiken für denaturierte DNA, wie sie von Marmur & Doty (1962) sowie Wetmur & Davidson (1968) beschrieben wurden. Für die DNA-DNA Hybridisierung werden die DNA-Proben zunächst fragmentiert. Anschließend werden Mischungen der DNA-Lösungen von je zwei zu untersuchenden Stämmen im gleichen Verhältnis hergestellt. Durch Kochen der gemischten, als auch der unvermischten DNA-Lösungen wird die DNA thermisch denaturiert. Der Grad der Renaturierung und somit der Grad der Reassoziationskinetik läßt sich am Spektralphotometer bei 260 nm aufzeichnen. Dabei ist der Grad der Reassoziationskinetik der gemessenen Absorptionsabnahme direkt proportional. Vergleicht man nun die Reassoziationskinetiken zweier unterschiedlicher DNA-Lösungen mit der ihrer Mischung, läßt sich die Basensequenzähnlichkeit anhand des Ausmaßes der Heteroduplexbildung bestimmen und somit auch indirekt der Verwandtschaftsgrad der Genome. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA aus *Delftia sp.* MV01 jeweils mit den Typstämmen der 3 beschriebenen *Delftia* Arten *Delftia acidovorans* DSM 39^T, *Delftia tsuruhatensis* DSM 17581^T und *Delftia lacustris* DSM 21246^T hybridisiert.

Hierzu wurde aus jeweils 2,5 g Zellmasse die DNA nach Cashion et al. (1977) gereinigt und die DNA-DNA Hybridisierung nach der Methode von De Ley et al. (1970) unter Berücksichtigung einiger Modifikationen (Huss et al., 1983) als Doppelbestimmung von der DSMZ (Braunschweig) als Auftragsarbeit durchgeführt.

2.21.4. Fettsäureanalyse

Um Bakterien zu identifizieren, kann die Lipidanalyse von Bedeutung sein, insbesondere durch die Charakterisierung der Fettsäuretypen, die in den Lipiden der Cytoplasmamembran oder der äußeren Membran (gram-negative Bakterien) vorkommen. Für die Analyse kultiviert man den Organismus unter Standardbedingungen und extrahiert die Gesamtlipide. Die Fettsäuren werden dann zu den entsprechenden Methylestern umgewandelt, die man über Gaschromatographie mit angeschlossenem Massenspektrometer (GC-MS) identifizieren kann. Das Fettsäureprofil wird dann mit denen von Referenzbakterien in einer Datenbank abgeglichen.

Die Fettsäureanalyse von Stamm MV01 wurde von der DSMZ (Braunschweig) als Auftragsarbeit durchgeführt.

2.21.5. Bestimmung des GC-Gehalts

Ein Teil der konventionellen bakteriellen Taxonomie ist die Bestimmung des Gehalts an Guanin plus Cytosin eines Organismus.

Zur Bestimmung des GC-Gehalts der DNA wurde diese nach der Methode von Cashion et al. (1977) gereinigt. Anschließend wurde die DNA mit P1 Nuklease verdaut und die Nukleotide mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die entstandenen Deoxyribonukleoside wurden nach der Methode von Mesbah et al. (1989) mittels HPLC analysiert. Der GC-Gehalt wurde im Anschluß nach den Vorgaben von Mesbah et al., (1989) kalkuliert.

Die Bestimmung des GC-Gehalts von Stamm MV01 wurde als Auftragsarbeit von der DSMZ (Braunschweig) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Exopolysaccharidbildung bei Pediokokken

Die Fähigkeit zur EPS-Bildung wurde an insgesamt 12 Pediokokken-Stämmen anhand fädenziehender Kolonien auf MRS-Agar nach 6 tägigem Wachstum bei 20 °C und nach zusätzlicher einwöchiger Lagerung der Agarplatten bei 10 °C bewertet (Tab. 13). Die getesteten Stämme unterschieden sich deutlich in der Fähigkeit zur EPS-Bildung auf MRS-Agar. Die Stämme B491, B492 und B399 zeigten dabei einen deutlichen fädenziehenden Phänotyp, wohingegen die Stämme B493 und B 498 unter den getesteten Bedingungen kein Polymer bildeten. Exopolysaccharid-bildende Stämme unterschieden sich weiterhin in ihrer Koloniegröße von denen, die kein Polymer synthetisierten (Tab. 13). Eine Lagerung der MRS-Platten bei 10 °C zeigte bei einigen Stämmen Veränderungen des Phänotyps (Tab. 13). Des Weiteren wurde die Viskositätserrhöhung des Mediums, als Indiz für die Bildung von EPS qualitativ betrachtet (Tab. 13). Ein Großteil der Pediokokken-Stämme, der auf festem Medium zur EPS-Bildung fähig war, zeigte allerdings keine Polymerbildung in Flüssigkultur (Tab. 13).

Tab. 13 EPS-Bildung bei verschiedenen Pediokokken-Stämmen auf MRS-Agar und in Flüssigkultur.

Stamm	EPS-Bildung bei 20 °C ^a	EPS-Bildung nach Lagerung bei 10 °C ^a	EPS-Bildung in Flüssigkultur ^b
B445	+	++	+
B455	+	+	+/-
B491	+++	+++	-
B492	+++	+++	-
B457	+	+	-
B484	++	+++	-
B443	+	+++	+
B399	+++	+++	+
B497	+	+	-
B493	-	-	-
B397	++	+++	+
B498	-	-	-

^a - keine EPS-Bildung; + Fadenhöhe < 5 mm, Koloniegröße Ø 2 mm; ++ Fadenhöhe ~ 24 mm, Koloniegröße Ø ~ 4 mm; +++ Fadenhöhe 200 mm, Koloniegröße Ø > 14 mm

^b + Viskositätsänderung; +/- leichte Viskositätsänderung; - keine Viskositätsänderung

Neben einer qualitativen Bewertung wurden Viskositätsänderungen am Rheometer gemessen. In Abbildung 17 sind die gemessenen Viskositäten der 12 getesteten Stämme im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Der Stamm B399 zeigte die höchste Viskosität mit $2,5 \cdot 10^{-3}$ Pas, wohingegen die Stämme B445 und B397 ebenfalls deutliche Viskositätsänderungen von $1,5 \cdot 10^{-3}$ Pas im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Die meisten Teststämme unterschieden sich allerdings in ihrer Viskosität kaum von der Kontrolle. Hier lag die Viskosität bei ca. $1,0 \cdot 10^{-3}$ Pas (Abb. 17).

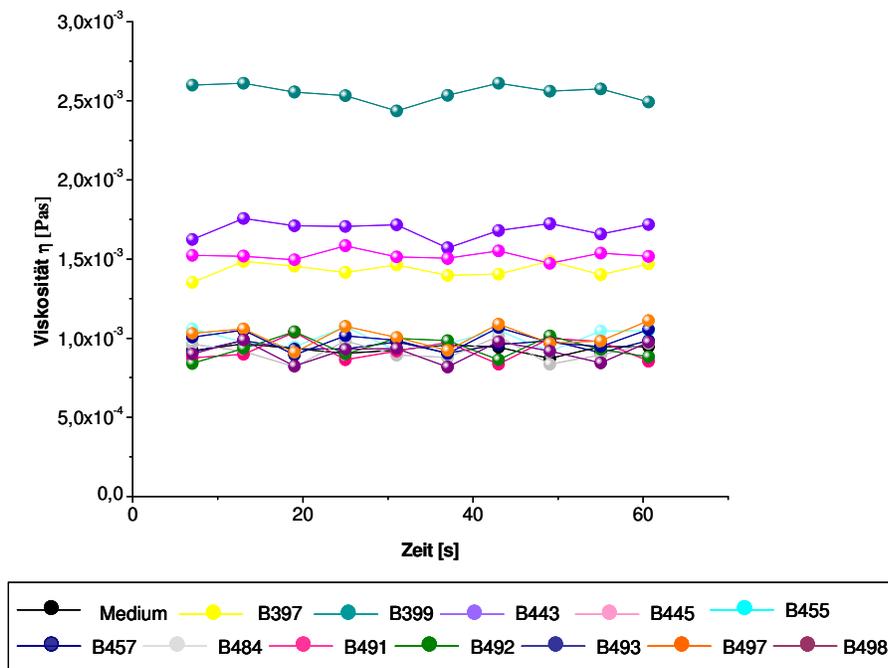


Abb. 17 Viskositätsänderungen im MRS-Medium beim Wachstum verschiedener Pediokokken-Stämme nach 6 Tagen bei 20 °C. Die Messungen wurden an einem Kegel-Platte-Rheometer (60 mm Durchmesser; 1° Kegelwinkel) bei konstanter Scher rate 100 1/s und 25 °C durchgeführt. Für jede Probe wurden 10 Punkte gemessen, davon jeder Punkt für 10 sec. Auf der x-Achse ist die Messzeit der Probe in Sekunden dargestellt. Auf der y-Achse wurde die gemessene Viskosität η [Pas] aufgetragen.

Dadurch, dass die Stämme B443, B445, B397 und B399 nicht nur auf Platte, sondern auch in Flüssigkultur in der Lage waren, EPS zu synthetisieren (Abb. 17) wurden diese Stämme weiter in Medium M kultiviert (2.7).

In Abbildung 18 sind die Viskositätsänderungen dargestellt. Als Kontrolle diente hierbei unbeimpftes Medium M.

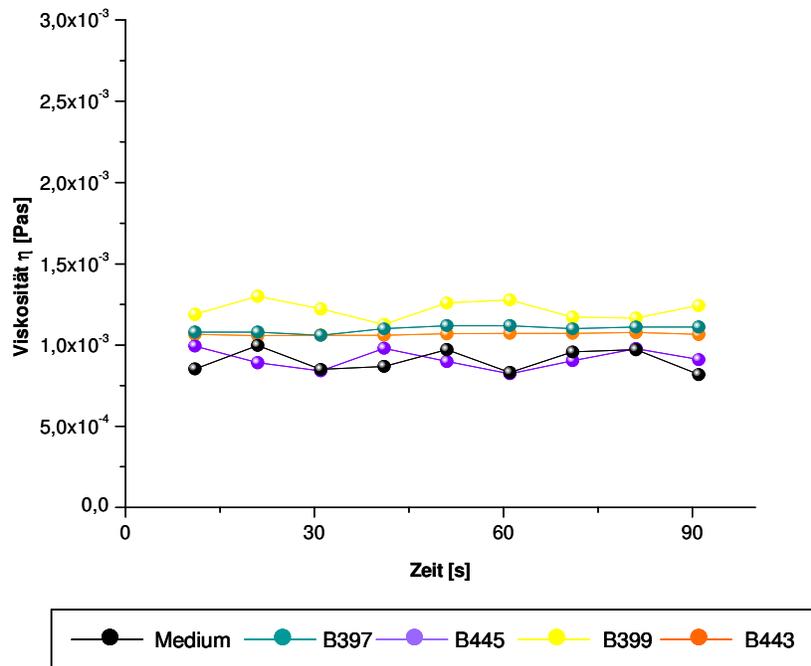


Abb. 18 Viskositätsänderungen des Mediums M bedingt durch das Wachstum und die Bildung von EPS durch die Stämme B443, B445, B399 und B397 im Vergleich zu unbeimpftem Medium M. Die Messungen wurden an einem Kegel-Platte-Rheometer (60 mm Durchmesser; 1° Kegelwinkel) bei konstanter Scher rate 100 1/s und 25°C durchgeführt. Für jede Probe wurden 10 Punkte gemessen, davon jeder Punkt für 10 sec. Auf der x-Achse ist die Messzeit der Probe in Sekunden dargestellt. Auf der y-Achse wurde die gemessene Viskosität η [Pas] aufgetragen.

Anhand von Abbildung 18 wird ersichtlich, dass bei Wachstum der Stämme in Medium M die Viskosität der Proben im Vergleich zur unbeimpften Kontrolle nur leicht anstieg. Der *Pediococcus* Stamm B399 erhöhte die Viskosität des Mediums um knapp 25%. Bei den anderen Proben konnten kaum Viskositätsänderungen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Im komplexen Medium wurden deutlich höhere Viskositäten (Abb. 17) erreicht.

Neben dem qualitativen Nachweis der EPS-Bildung durch rheologische Untersuchungen, wurde auch die Menge an gebildetem EPS nach 6 tägigem Wachstum bei 20 °C in 10 ml Medium M bestimmt (Abb. 19).

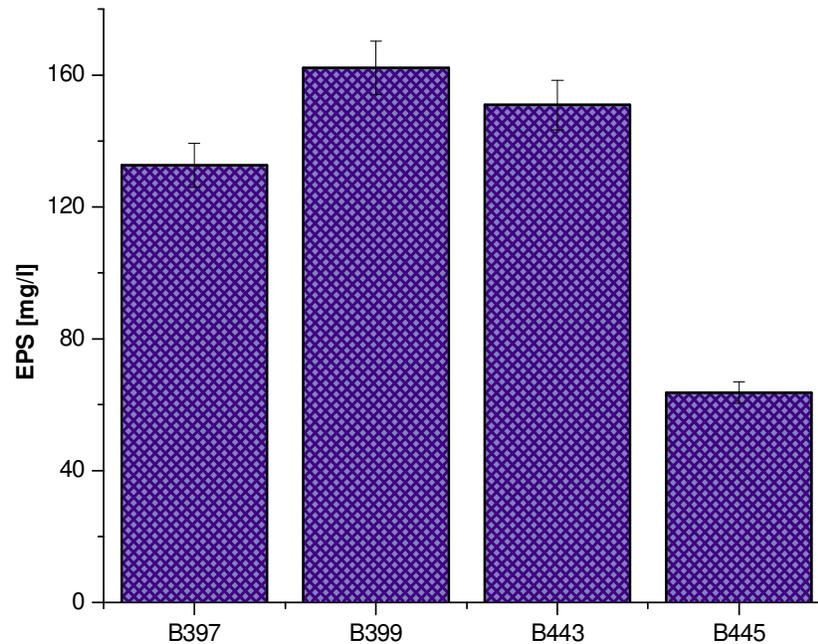


Abb. 19 Gebildete EPS-Menge der Pediokokken-Stämme B397, B399, B443 und B445 nach 6 Tagen Wachstum Medium M bei 20 °C.

Der Stamm B399 bildete unter den gewählten Bedingungen mit 162 mg/l am meisten EPS. Der Stamm B445 bildete knapp 40% weniger EPS als Stamm B399. Die anderen 2 Pediokokken-Stämme bildeten nach 6 Tagen Wachstum bei 20 °C mehr als 100 mg/l Polymer (Abb. 19).

3.2. Exopolysaccharidbildung bei *Pediococcus parvulus* B399

Um optimale Bedingungen hinsichtlich einer erhohnten Produktion des EPS durch *Pediococcus parvulus* B399 zu erreichen, wurden eine Reihe von synthetischer Medien (2.10) getestet. Es zeigte sich aber, dass der Stamm in diesen Medien entweder nicht wachsen konnte, oder kein EPS synthetisierte. Deshalb wurde versucht, durch Variation der Kultivierungstemperatur die EPS-Bildung durch den Stamm B399 in Medium M zu steigern.

In Abbildung 20 wird die gebildete EPS-Menge bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen in Abhängigkeit des Wachstums und dem Glucoseverbrauch im Medium dargestellt.

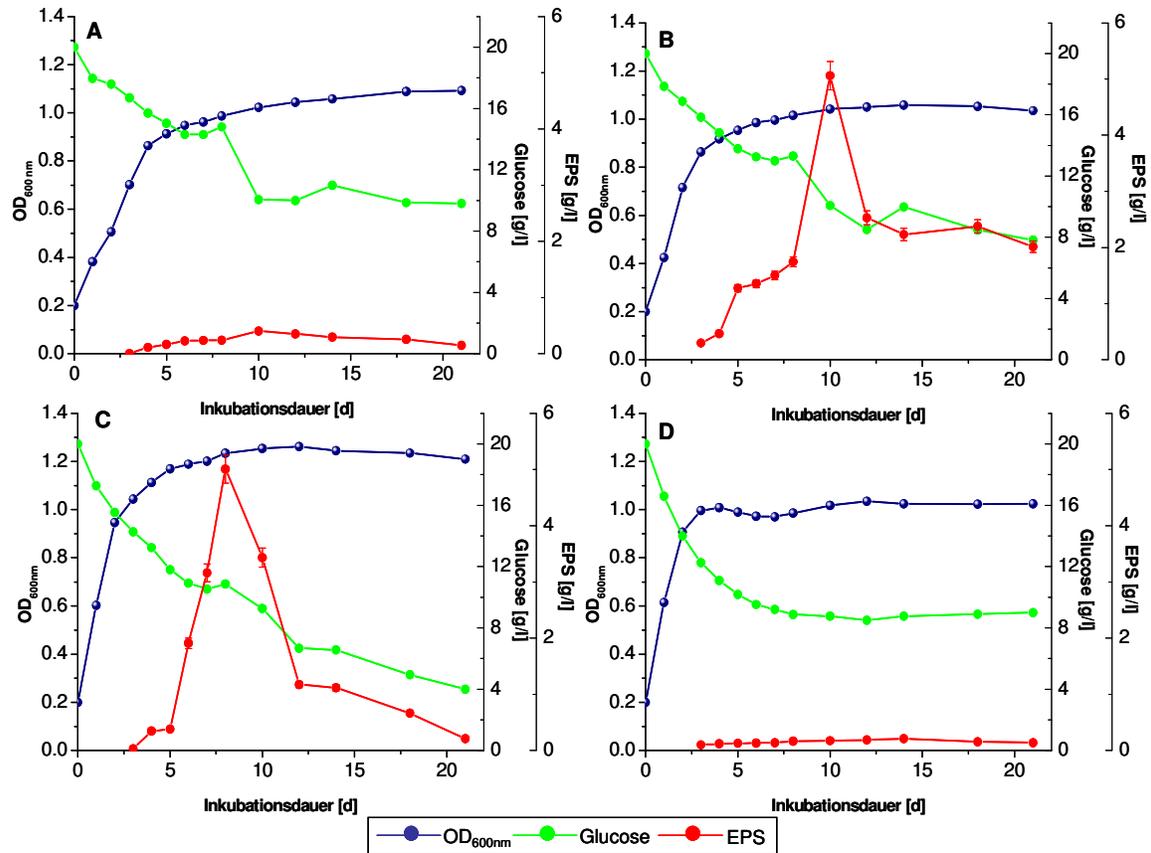


Abb. 20 Gebildete EPS-Menge während des Wachstums von *P. parvulus* B399 und Glucoseverbrauch im Medium bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen in 200 ml Medium M. **A** 15 °C, **B** 18 °C, **C** 20 °C und **D** 25 °C.

Abbildung 20 zeigt, dass das Exopolysaccharid von *P. parvulus* B399 bei allen getesteten Kultivierungstemperaturen schon während der exponentiellen Wachstumsphase gebildet wurde. Bei einer Temperatur von 15 °C und 25 °C wurden im Vergleich deutlich geringere Mengen an EPS synthetisiert. Die größte Ausbeute von knapp 5 g/l wurde nach 8 Tagen bei einer Kultivierungstemperatur von 20 °C erreicht. Diese Polymermenge konnte bei einer Kultivierungstemperatur von 18 °C erst nach 10 Tagen erreicht werden. Ein Vergleich der verbleibenden Restglucose im Medium mit der gebildeten EPS-Menge zeigt, dass zu Beginn der Kultivierung deutlich mehr Glucose, möglicherweise zur Bildung des EPS verbraucht wurde als am Ende der Kultivierung. Bei 15 °C und 25 °C wurden ca. 50% der

Anfangsglucosekonzentration verbraucht, wohingegen bei 20 °C ca. 80% der Glucose verbraucht wurden.

Abbildung 21 zeigt, dass eine Zugabe von 5% (v/v) Ethanol zu einer leichten Steigerung (ca. 14%) der Exopolysaccharidmenge führte. Bei einer Zugabe von 10% (v/v) Ethanol konnten allerdings nur noch 80 mg / l Polymer gebildet werden. Bei Ethanolkonzentrationen > 10% (v/v) konnte kein Wachstum und somit auch eine Exopolysaccharidbildung des Stammes beobachtet werden.

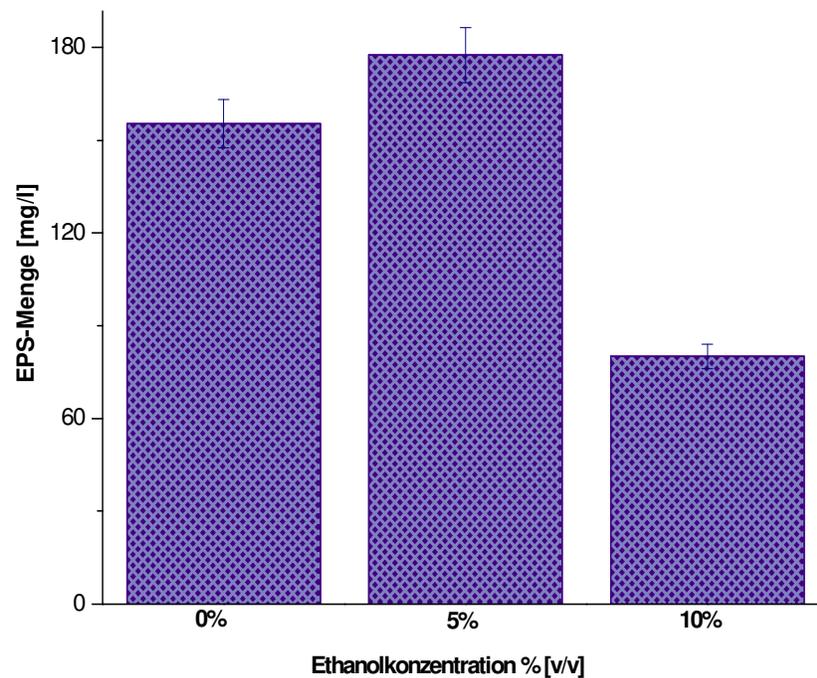


Abb. 21 Gebildete EPS-Menge durch *P. parvulus* B399 in 100 ml Medium M mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen.

3.3. Exopolysaccharid-Ausbeuten

Anhand der ersten Vorversuche konnte gezeigt werden, dass in 200 ml Kulturen nach 8-tägigem Wachstum bei 20 °C ca. 5 g/l gelöstes EPS im zellfreien Kulturüberstand von *P. parvulus* über den Phenol-Schwefelsäuretest (2.12.1) detektiert werden konnten.

In Abbildung 22 sind die tatsächlichen EPS-Ausbeuten, die aus unterschiedlichen Kulturvolumina und durch unterschiedliche Aufarbeitung (2.11 und 2.11.1) gewonnen wurden, im Vergleich dargestellt. Darüberhinaus wurde auch der Neutralzuckeranteil in den gefriergetrockneten EPS-Proben bestimmt.

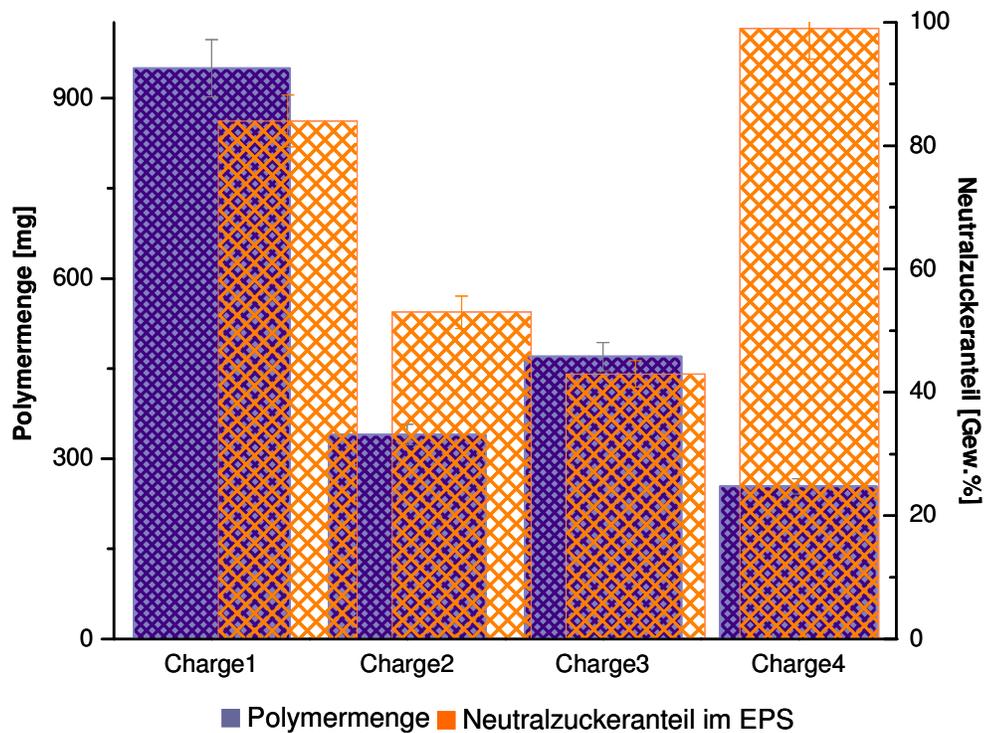


Abb. 22 EPS-Ausbeuten, sowie deren Neutralzuckeranteile aus unterschiedlichen Produktionschargen.

In Abbildung 22 wird gezeigt, dass aus verschiedenen Kulturvolumina unterschiedliche Mengen an EPS gewonnen werden konnten. So wurde aus einem 40 l Fermenteransatz nur etwa 950 mg Polymer gewonnen (Charge 1) mit einem Gesamtneutralzuckeranteil von 84%. Im Vergleich hierzu konnten aus 10 l Kulturen verhältnismäßig mehr EPS isoliert und aufgearbeitet werden (Charge 2 und 3), doch lag der Neutralzuckeranteil deutlich unter 60%. Dies zeigte, dass diese Polymerchargen offensichtlich noch zusätzliche Verunreinigungen beispielsweise durch Proteine enthielten. In Charge 4 konnte aus 2 l Kultur knapp 250 mg EPS gewonnen werden, die einen fast 100%-igen Neutralzuckeranteil enthielt.

3.4. Aufbau des Exopolysaccharids von *Pediococcus parvulus* B399

3.4.1. Monomerzusammensetzung

Die monomeren Zuckereinheiten des Exopolysaccharids von *P. parvulus* B399 wurden nach saurer Hydrolyse (2.12.2) mittels Dünnschichtchromatographie (2.12.2) qualitativ nachgewiesen (Abb.23 + 24).

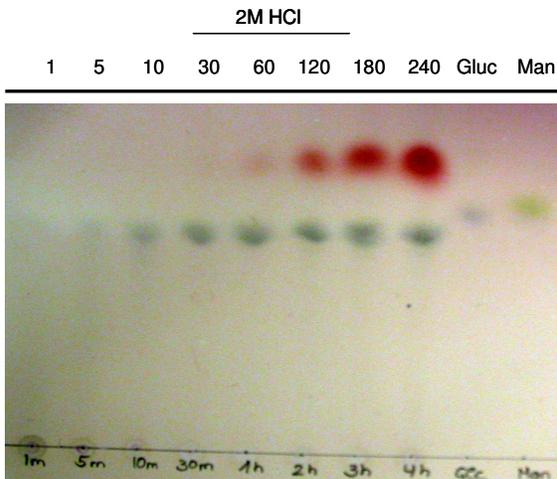


Abb. 23 Auftrennung der Hydrolyseprodukte des EPS nach Behandlung mit 2M HCl bei 100 °C mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel; Laufmittel: Butanol/Ethanol/H₂O (5:3:2)) und nachfolgender Detektion mit Anisaldehyd-H₂SO₄ bei 105 °C. Die Dauer der Hydrolyse betrug insgesamt 240 min. Als Standard dienen Glucose und Mannose (jeweils 1 mg/ml). Das Auftragsvolumen betrug 5 µl.

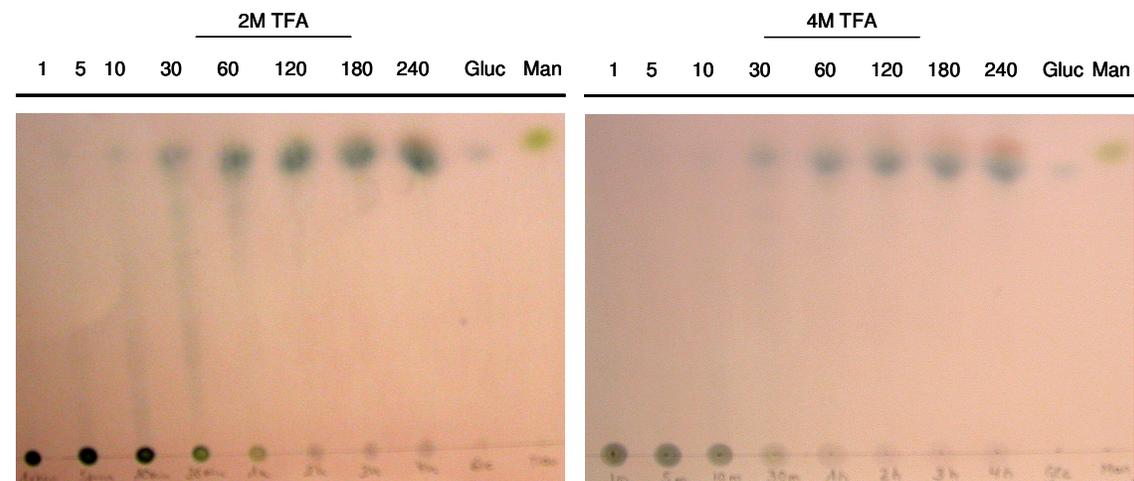


Abb. 24 Auftrennung der Hydrolyseprodukte des EPS mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel; Laufmittel: Butanol/Ethanol/H₂O (5:3:2)) nach Behandlung mit 2 M TFA (links) und 4 M TFA (rechts) bei 100 °C. Die Hydrolyse wurde jeweils nach den angegebenen Zeitintervallen [min] gestoppt und 5 µl auf die Kieselgelplatte aufgetragen. Als Standardmonomere dienten jeweils 5 µl Glucose und Mannose (je 1 mg/ml). Die Detektion der Zucker erfolgte nach Oxidation bei 105 °C und Besprühen mit Anisaldehyd-H₂SO₄.

Anhand von Abb. 23 und 24 konnte gezeigt werden, dass das EPS von *P. parvulus* B399 nur aus Glucose bestand. Der Monomierzucker zeigte einen blau-grünen Spot auf der Dünnschichtplatte nach Detektion mit Anisaldehyd- H_2SO_4 . Bei längeren Hydrolysezeiten traten neben der Glucose auch unspezifische Hydrolyseprodukte auf, die besonders bei der Behandlung mit 2 M HCl als rote Spots sichtbar wurden. Selbige konnten, wenn auch in geringem Maße, in den Hydrolyseprodukten nach 180-240 minütiger Behandlung mit 4 M TFA detektiert werden. Diese Nebenprodukte traten bei der Hydrolyse mit 2 M TFA nicht auf. Bei allen getesteten Säuren wurde das Monomer Glucose nach etwa 30 minütiger Hydrolyse freigesetzt. Davor wurden hauptsächlich größere Oligosaccharide gebildet, die auf der Dünnschichtplatte am Auftragepunkt liegen blieben.

Neben dem qualitativen Nachweis der Monomierzusammensetzung, wurde über HPLC die Menge an gebildeter Glucose, die während der Hydrolyse des EPS entstand, quantitativ bestimmt (Tab. 14).

In Abbildung 25 wird die Auftrennung der Hydrolyseprodukte über Anionenaustauschchromatographie mit gekoppelter gepulster amperometrischen Detektion für eine Probe exemplarisch gezeigt.

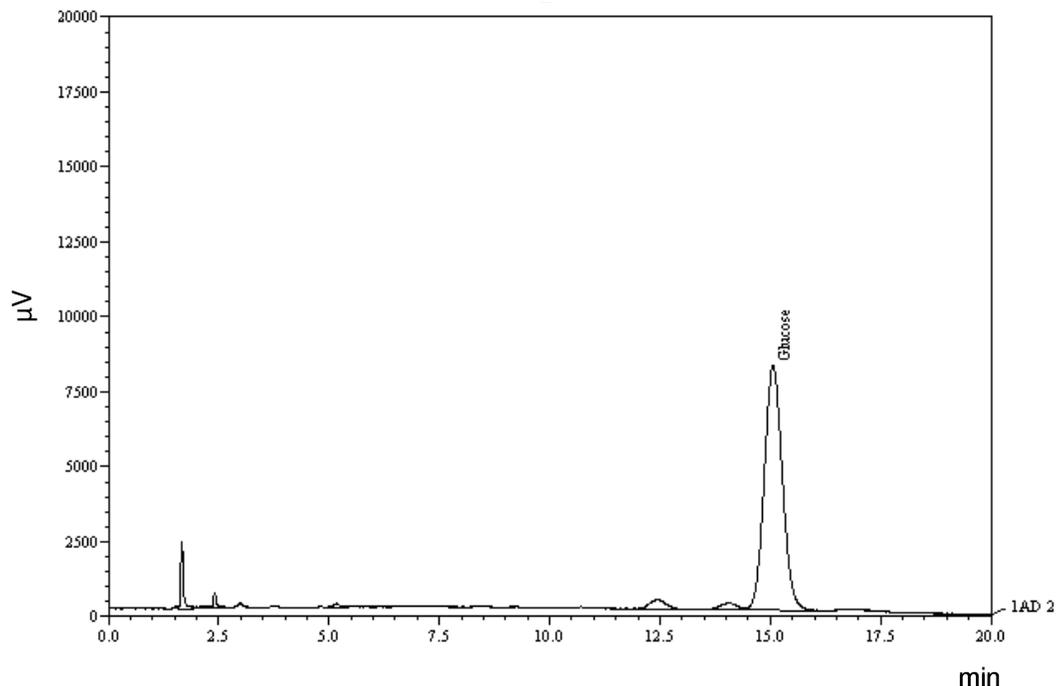


Abb. 25 Auftrennung der EPS-Probe (Probe1) nach saurer Hydrolyse mit 4 M TFA für 3 h bei 100 °C über Anionenaustauschchromatographie mit gekoppelter gepulster amperometrischen Detektion (HPLC-PAD). Auf der x-Achse wird die Retentionszeit [min] angegeben. Auf der y-Achse wird das Detektorsignal in μ Volt angegeben.

In Tab. 14 sind die Glucosemengen, die über HPLC nachgewiesen wurden aufgelistet. Es konnte festgestellt werden, dass die Wahl der Säure einen großen Einfluß auf die Wiederfindungsrate des Hydrolyseproduktes hatte. Wurde das EPS mit 2 M HCl hydrolysiert, konnten nach 4 h nur ca. 13% Glucose detektiert werden. Ein Grund für die geringen Wiederfindungsraten könnte eine unvollständige Entfernung von HCl nach der Hydrolyse sein. Möglicherweise war der Salzgehalt in diesen Proben zu hoch, so dass dadurch die extrem niedrigen Glucosemengen erklärt werden könnten. Mit TFA wurden deutlich höhere Wiederfindungsraten erzielt als mit 2 M HCl. Fast die gesamte Einwaage wurde nach 2 stündiger Hydrolyse mit 2 M TFA wiedergefunden. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass die Konzentration der Säure einen Einfluß auf die Hydrolyse des Polymers hatte. Mit 4 M TFA konnten nach 3 stündiger Hydrolyse maximal nur ca. 75% Glucose detektiert werden.

Tab. 14 Vergleich der Glucosemenge und somit Wiederfindungsrate bei der Hydrolyse des EPS mit verschiedenen Säuren.

	Säure	Hydrolysezeit [h]	Glucose [g/l]	Wiederfindungsrate [%]
Probe 1	2M HCl	1 h	0,97	9,7
Probe 2	2M HCl	1 h	1,05	10,5
Probe 1	2M HCl	2 h	0,31	3,1
Probe 2	2M HCl	2 h	0,34	3,4
Probe 1	2M HCl	3 h	0,29	2,9
Probe 2	2M HCl	3 h	0,28	2,8
Probe 1	2M HCl	4 h	1,29	12,9
Probe 2	2M HCl	4 h	1,12	11,2
Probe 1	2M HCl	6 h	0,19	1,9
Probe 2	2M HCl	6 h	0,22	2,2
Probe 1	2 M TFA	1 h	3,81	38,1
Probe 2	2 M TFA	1 h	3,41	34,1
Probe 1	2 M TFA	2 h	9,82	98,2
Probe 2	2 M TFA	2 h	9,97	99,7
Probe 1	2 M TFA	3 h	2,03	20,3
Probe 2	2 M TFA	3 h	1,91	19,1
Probe 1	2 M TFA	4 h	8,20	82
Probe 2	2 M TFA	4 h	8,62	86,2

Fortsetzung Tabelle 14

Probe 1	2 M TFA	6 h	4,77	47,7
Probe 2	2 M TFA	6 h	4,92	49,2
Probe 1	4 M TFA	1 h	4,92	49,2
Probe 2	4 M TFA	1 h	4,20	42,0
Probe 1	4 M TFA	2 h	2,80	28,0
Probe 2	4 M TFA	2 h	3,56	35,6
Probe 1	4 M TFA	3 h	7,28	72,8
Probe 2	4 M TFA	3 h	7,80	78,0
Probe 1	4 M TFA	4 h	3,10	31,0
Probe 2	4 M TFA	4 h	3,10	31,0
Probe 1	4 M TFA	6 h	4,23	42,3
Probe 2	4 M TFA	6 h	4,60	46,0

3.4.2. Struktur des Exopolysaccharids (NMR)

Mithilfe des ^1H - und ^{13}C - NMR Spektrums wurde die Struktur des Exopolysaccharids von *Pediococcus parvulus* B399 bestimmt. Durch die NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Exopolysaccharid um ein in der Hauptkette β -1,3 verknüpftes Glucan handelt. An jedem zweiten Glucosemolekül der Hauptkette befindet sich ein weiteres β -1,2 verknüpftes Glucosemonomer. In Abbildung 26 ist die Wiederholungseinheit des EPS, das Trisaccharid dargestellt.

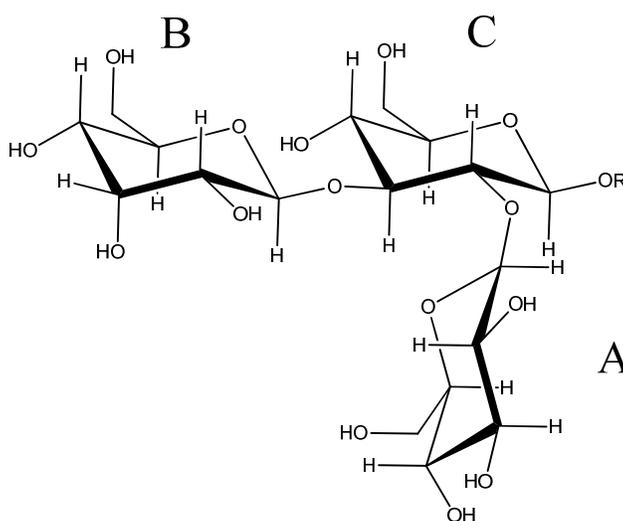


Abb. 26 Struktur des β -D-Glucans. Die Wiederholungseinheit ist ein Trisaccharid, bestehend aus den Einheiten B+C (β -1,3-D-Glucose) und A (β -1,2-D-Glucose).

In Abbildung 27 und 28 ist jeweils das gemessene ^1H - und ^{13}C - NMR Spektrum des Polymers dargestellt.

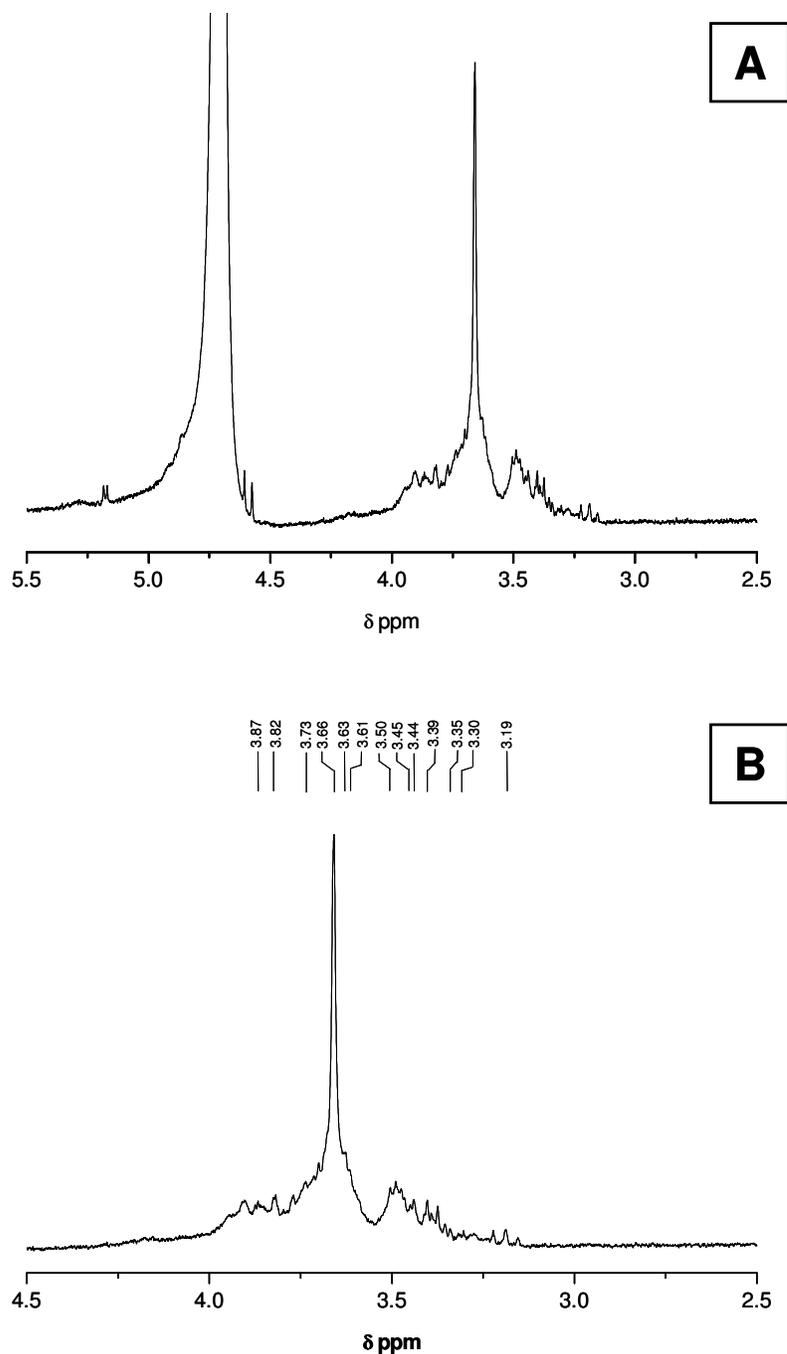


Abb. 27 200 MHz ^1H NMR Spektrum des EPS von *Pediococcus parvulus* B399 in D_2O „Rohspektrum“ inklusive Lösungsmittelpeak (A).

Bearbeitetes Spektrum mit entsprechenden Integralen (B).

Das ^1H Spektrum zeigt alle Resonanzen des Polysaccharids von H-2 bis H-6b (Abb. 27B). Die 3 anomeren Protonen des H-1 konnten durch die Überlagerung mit dem Lösungsmittelpeak von D_2O (δ 4,6–4,8) unter den gewählten Messbedingungen nicht bestimmt werden (Abb. 27A). Im ^{13}C NMR- Spektrum konnten allerdings alle Resonanzen des Zuckers von C-1 bis C-6 zugewiesen werden (Abb. 28), so dass die Struktur, wie in Abbildung 26 gezeigt, bestätigt werden konnte.

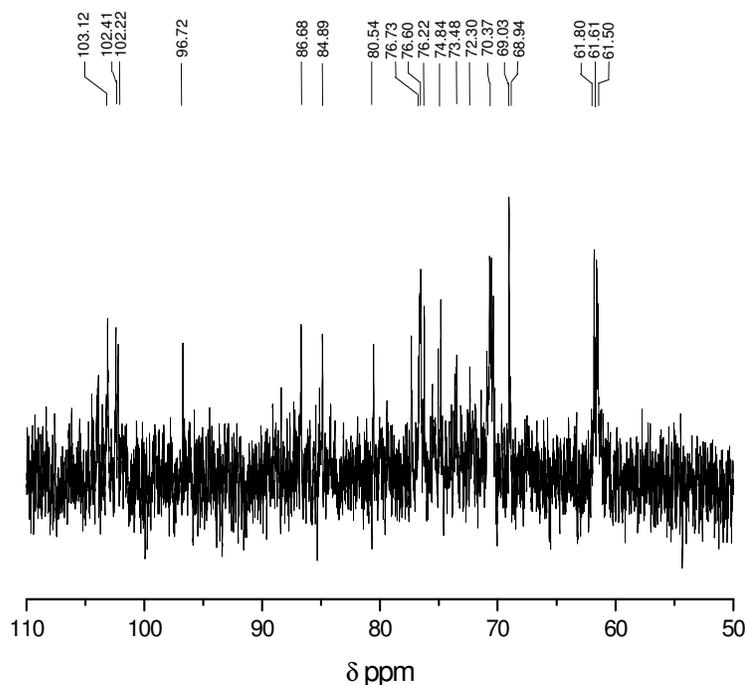


Abb. 28 700 MHz ^{13}C NMR Spektrum des EPS von *Pediococcus parvulus* B399 in D_2O .

Die Hauptsignale des ^{13}C NMR- Spektrums des EPS konnten folgenden Verschiebungen δ [ppm] zugeordnet werden: δ 103,12 für C1, δ 80,54 für C2, δ 86,68 für C3, δ 70,37 für C4, δ 76,6 für C5 und δ 61,8 für C6 (Abb. 28). Diese Resonanzen zeigten große Ähnlichkeit mit den Kohlenstoffen der β - D-Glucopyranose. Die anomeren Kohlenstoff-Signale bei den chemischen Verschiebungen δ 103-102 wiesen auf einen β -glykosidischen Verknüpfungstyp des EPS hin. Alle chemischen Verschiebungen δ [ppm] des ^1H - und ^{13}C NMR Spektrum, sowie die entsprechenden Kopplungskonstanten J [Hz] sind in Tab. 15 + 16 aufgeführt. Zum Vergleich wurden die gemessenen Resonanzen für das EPS aus *Pediococcus damnosus* 2.6 (Dueñas-Chasco et al., 1997) aufgeführt (Tab. 15 + 16; Werte in Klammern).

Tab. 15 ^1H NMR chemische Verschiebungen (δ , ppm) und Kopplungskonstanten (J, Hz) für das EPS aus *Pediococcus parvulus* B399 und *Pediococcus damnosus* 2.6 (Werte in Klammern).

Einheit	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b
A	- (4,82)	3,19 (3,19)	3,39 (3,39)	3,30 (3,31)	3,35 (3,39)	3,87 (3,84)	3,63 (3,64)
B	- (4,74)	3,50 (3,51)	3,66 (3,65)	3,45 (3,45)	3,44 (3,41)	3,82 (3,81)	3,61 (3,63)
C	- (4,74)	3,73 (3,73)	3,87 (3,84)	3,44 (3,44)	3,44 (3,41)	3,82 (3,81)	3,61 (3,63)
	J _{1,2}	J _{2,3}	J _{3,4}	J _{4,5}	J _{5,6b}	J _{6a,b}	
A	-	8,7	9,1	9,2	5,5	-11,6	
B	-	8,5	9,0	9,8	-	-11,7	
C	-	8,2	8,5	10,2	5,3	-11,6	

Tab. 16 ^{13}C NMR chemische Verschiebungen (δ , ppm) für das EPS aus *Pediococcus parvulus* B399 und *Pediococcus damnosus* 2.6 (Werte in Klammern).

Einheit	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
A	103,1 (101,7)	73,5 (73,5)	76,7 (76,1)	70,4 (69,2)	76,6 (75,2)	61,8 (60,3)
B	102,4 (101,3)	72,3 (72,1)	86,7 (85,1)	69,0 (67,6)	74,8 (74,8)	61,6 (60,1)
C	102,2 (100,9)	80,5 (79,4)	84,9 (82,9)	68,9 (67,6)	76,2 (75,0)	61,5 (60,1)

3.4.3. Struktur des Exopolysaccharids (IR)

In Abbildung 29 ist das ATR-FTIR-Spektrum des EPS von *P. parvulus* B399 dargestellt. Zum Vergleich wurde auch ein IR-Spektrum von Laminarin, einem Standard β -1,3-Glucan aufgenommen. Beide IR-Spektren umfassen den Bereich von 4000–800 cm^{-1} , dabei ist der Bereich von 1700–800 cm^{-1} zur besseren Peakzuordnung vergrößert dargestellt.

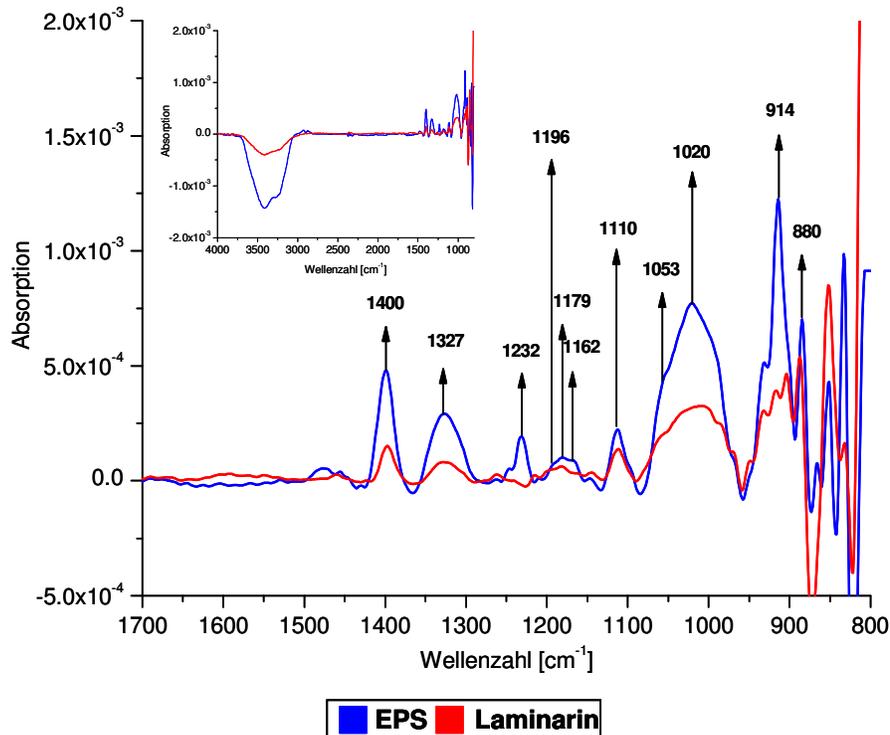


Abb. 29 IR-Spektren von EPS und Laminarin zwischen 4000- 800 cm^{-1} . Im Vordergrund sind die Spektren von 1700- 800 cm^{-1} vergrößert dargestellt.

Das IR-Spektrum des EPS ist charakteristisch für ein β -Glucan, nicht zuletzt weil eine Absorptionsbande bei ca. 880 cm^{-1} auftrat, die auf β -glykosidische Bindungen im Polymer hinwies (Abb. 29). Das IR-Spektrum des EPS ist dem Spektrum von Laminarin sehr ähnlich. Unterschiede konnten unter anderem in der Absorptionsstärke festgestellt werden. Da Laminarin mit 5000-10000 g/mol wesentlich kleiner ist als das Exopolysaccharid von *P. parvulus* B399 mit ca. $5 \cdot 10^6$ g/mol, wurde auch eine geringere Absorption erreicht. Ein weiterer Unterschied besteht in dem Vorkommen einer Absorptionsbande bei ~ 1232 cm^{-1} im EPS. Diese Bande fehlt im Spektrum von Laminarin, so dass vermutet wird, dass diese Bande auf ein β -1,2-Glucan hinweist. Die entscheidende Absorptionsbande bei ca. 880 cm^{-1} konnte

auch im Spektrum von Laminarin festgestellt werden. Bei der Wellenzahl 1110 cm^{-1} trat in beiden Spektren eine Bande auf, die für β -1,3-Glucane steht. Alle weiteren Banden, die im IR-Spektrum auftraten und sich Molekülen oder Gruppen der Zucker zuweisen ließen, sind in Tabelle 17 im Detail aufgeführt. Anhand des IR-Spektrum des EPS konnte auch gezeigt werden, dass das Polymer keine Verunreinigungen in Form von Proteinen enthält, da die typischen Amidbanden der Proteine bei $1670\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ (Amid I) und $1560\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ (Amid II) im EPS-Spektrum fehlten. Weiterhin konnte dadurch auch ausgeschlossen werden, dass das EPS Aminozucker enthielt, da Proteine und Aminozucker bei den gleichen Wellenzahlen im IR Signale zeigen. Anhand des verkleinerten Spektrums konnte darüberhinaus auch gezeigt werden, dass das EPS keine Uronsäuren (Carboxylgruppen) oder veresterte organische Säuren enthielt. Wäre das der Fall, wären Signale bei $1750\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ aufgetreten.

Tab. 17 Hauptabsorptionsbanden und Zuordnungen des ATR-FTIR Spektrums von EPS aus *P. parvulus* B399

Absorptionsbande (cm^{-1})	Hauptzuordnungen
~ 3400	OH-Gruppe in H-Brücken
~ 1400	C-O Schwingungen
~ 1327	O-H Deformationsschwingung
~ 1232	vermutlich β -1,2 Glucan
~ 1196	C-O-C in Kohlenhydraten
~ 1179	C-O; C-OH in Kohlenhydraten mit variabler Verteilung
~ 1162	C-O; C-OH in Kohlenhydraten mit variabler Verteilung
~ 1110	β -1,3 Glucane
~ 1053	C-O-C in Kohlenhydraten
~ 1020	C-H-OH Valenzschwingung
~ 914	asymmetrischer Pyranosering
~ 880	β -glykosidische Bindungsschwingung

3.4.4. Größe des Exopolysaccharids

Die Größe des Polymers von *P. parvulus* B399, wurde mithilfe von 15 Dextranstandards bestimmt. In Abbildung 30A ist das Elugramm der GPC für die Molmassenverteilungen im β -D-Glucan dargestellt. In Abbildung 30B wird das zum Elutionsvolumen gehörende Molekulargewicht in g/mol gezeigt. In Tab.18 werden die Elutionsvolumina der Standards sowie die Molmassenverteilungen im EPS im Detail aufgeführt.

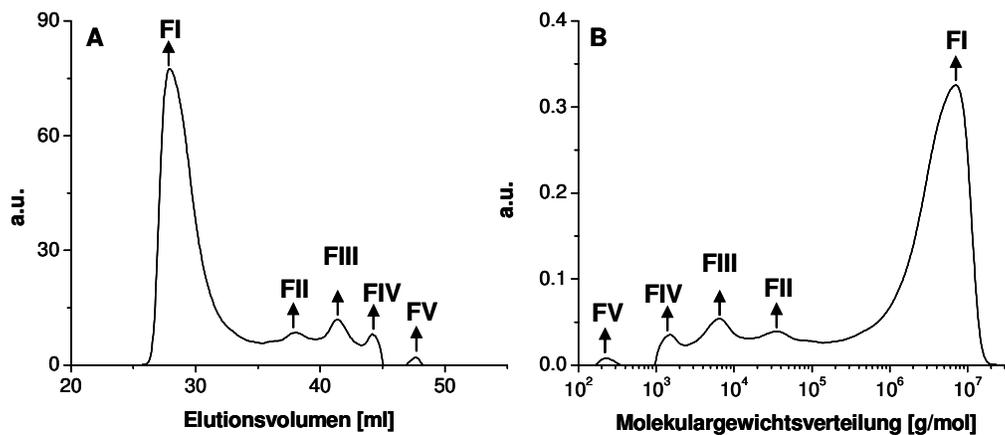


Abb. 30 Molmassenverteilungen im EPS von *P. parvulus* B399. FI kennzeichnet die hochmolekulare Fraktion im EPS. FII-FV kennzeichnen niedermolekulare Fraktionen im EPS. **A** Elugramm des EPS. Auf der x-Achse ist das Elutionsvolumen [ml] angegeben. Auf der y-Achse das Detektorsignal in willkürlichen Einheiten a. u. (engl. arbitrary units a.u.). **B** Molmassenverteilung des EPS resultierend aus dem Elutionsvolumen in A. Auf der x-Achse ist die Molekulargewichtsverteilung [g/mol] angegeben. Auf der y-Achse ist das Detektorsignal in willkürlichen Einheiten a.u. (engl. arbitrary units) aufgetragen.

Das Elugramm der GPC zeigte, dass sich das Polymer aus mehreren Fraktionen zusammensetzte. Neben einer hochmolekularen Fraktion, die bei ca. 27,88 ml eluierte und mehr als 85% des gesamten Polymers ausmachte, konnten weitere niedermolekulare Fraktionen detektiert werden (Abb. 30A). Diese Fraktionen entsprachen in ihrer Größe Oligomeren des β -Glucans (Tab. 18). Gemessen an den Molmassen der Dextrane zeigte der hochmolekulare Peak des EPS ein Molekulargewicht von $5 \cdot 10^6$ g / mol (Abb. 30B). Da die GPC-Säule Moleküle nur bis etwa $5 \cdot 10^6$ g/mol trennen konnte, war eine exakte Größenbestimmung nicht möglich. Anhand des Elutionsvolumens der verwendeten Dextranstandards konnte allerdings gezeigt werden, dass das Polymer deutlich größer als 1,4 Mio g/mol war.

Tab. 18 Elutionsvolumina [ml] bzw. Molekulargewichte [g/mol] der Standards des EPS.

Standard	Molmasse [g / mol]	Elutionsvolumen [ml]
Glucose	180,16	48,16
Dextran	342	47,03
Dextran	502	46,25
Dextran	830	44,82
Dextran	4400	42,26
Dextran	9900	40,85
Dextran	21400	39,06
Dextran	43500	36,96
Dextran	66700	36,28
Dextran	69000	36,14
Dextran	124000	35,41
Dextran	196000	34,66
Dextran	277000	33,79
Dextran	670000	33,20
Dextran	14000000	30,46
EPS	Molmasse [g / mol]	Elutionsvolumen [ml]
hochmolekulare Fraktion F I	$5 \cdot 10^6$	27,88
Niedermolekulare Fraktion F II	~ 347	47,73
Niedermolekulare Fraktion F III	~ 818	44,15
Niedermolekulare Fraktion F IV	~ 10048	41,46
Niedermolekulare Fraktion F V	~ 20836	38,03

3.4.5. Rheologische Eigenschaften des Exopolysaccharids

Die rheologischen Eigenschaften der β -Glucanlösungen wurden zunächst über Fließkurven bestimmt. In Abbildung 31 sind die Fließkurven der unterschiedlich konzentrierten Polymerlösungen bei 10 °C und 20 °C Messtemperatur dargestellt.

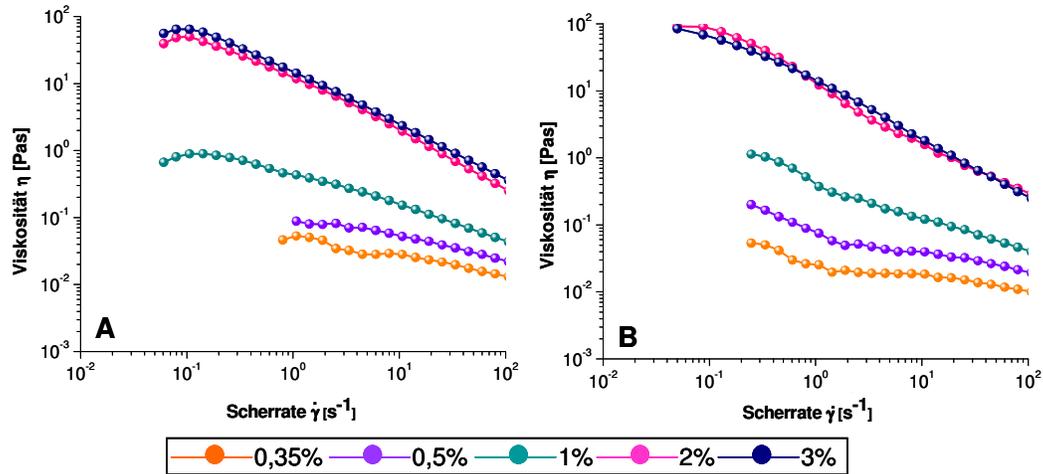


Abb. 31 Viskosität η als Funktion der Scherrate $\dot{\gamma}$ für unterschiedlich konzentrierte β -Glucanlösungen [Gew.-%] bei konstanter Temperatur $T = 10\text{ °C}$ (A) und $T = 20\text{ °C}$ (B).

Anhand von Abb. 31 ist zu erkennen, wie mit steigender Polymerkonzentration auch die Viskosität der Lösung zunahm. Auffallend war jedoch, dass die 2- und 3%-igen Polymerlösungen sich allerdings nur noch gering in ihrer Viskosität unterschieden. Dies zeigt, dass es sich bei dieser Polymerlösung um ein rheologisch komplexes System handelte und deshalb die Viskositätsänderung mit zunehmender Konzentration nicht nur durch die Zunahme von Verhängungen oder andere einfache mechanisch-hydrodynamische Modelle, wie bei synthetischen Polymeren, erklärt werden kann. Weiterhin wurde deutlich, dass bei steigender Scherrate die Viskosität erniedrigt wurde (Scherverdünnung). Ein Vergleich der Fließkurven bei 10 °C und 20 °C zeigte, dass die Messtemperatur in diesem Bereich nur wenig Einfluss auf die Eigenschaften der β -Glucanlösungen hatte. Der scherverdünnende Charakter tritt bei 10 °C und 20 °C in nahezu identischer Weise auf.

Linear-viskoelastisches Verhalten des β -Glucans aus *P. parvulus* B399 wurde über dynamische Oszillationsmessungen bestimmt. Hierfür wurde der linear-viskoelastische Bereich des Polymers anhand eines Amplitudensweeps mit einer 1,5%-igen β -Glucanlösung festgelegt (Abb. 32).

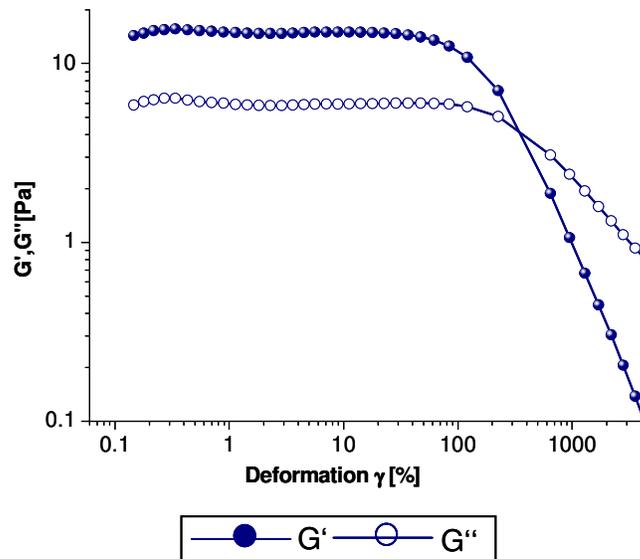


Abb. 32 Amplitudentest einer 1,5% igen Polymerlösung zur Festlegung des linear-viskoelastischen Bereichs. Speicher- (G') (ausgefülltes Symbol) und Verlustmodul (G'') (offenes Symbol) sind als Funktion der Deformation γ aufgetragen.

Anhand von Abbildung 32 ist zu erkennen, dass bis zu einer Scherbelastung von ca. 50% Deformation eine Messung im linear- viskoelastischen Bereich möglich ist.

Für jede Polymerlösung wurde sowohl das Speicher (G')- als auch das Verlustmodul (G'') als eine Funktion der Frequenz ω im Bereich von 0,1-50 rad/s bei 20 °C bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

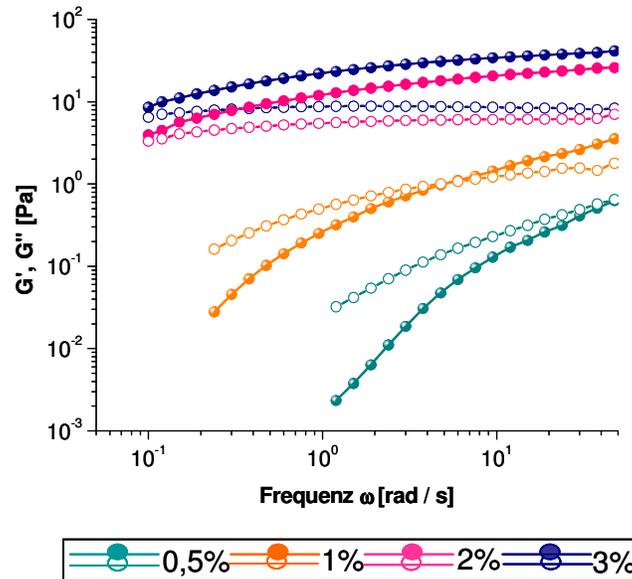


Abb. 33 Speicher (G') (ausgefüllte Symbole) - und Verlustmodul (G'') (offene Symbole) als eine Funktion der Frequenz ω für verschiedene β - Glucankonzentrationen. Alle Werte wurden bei $T = 20$ °C gemessen.

Aus Abbildung 33 wird ersichtlich, dass bei der 0,5%-igen Glucanlösung das viskose Verhalten (G'') über das elastische Verhalten (G') über den gesamten Frequenzbereich dominierte. Diese Messprobe zeigte somit im linear-viskoelastischen Bereich den Charakter einer Flüssigkeit. Bei der 1%-igen Polymerlösung kreuzten sich G' und G'' bei ungefähr 5 rad/s. Das bedeutet, dass sich die Probe bei schnellen Belastungen (hohen Frequenzen) mechanisch eher wie ein festes Gel und bei langsamen Belastungen (niedrigen Frequenzen) eher wie eine Flüssigkeit verhielt. Die 2- und 3%-igen Polymerlösungen zeigten bei allen Frequenzen, dass der viskose Modul (G'') niedriger war als der elastische (G'). Die höherkonzentrierten Glucanlösungen wiesen somit einen gelartigen Zustand auf. Eine Überkreuzung der beiden Kurven konnte für beide Messproben nur bei einer niedrigen Frequenz von ca. 0,1 rad/s beobachtet werden.

Die Oszillationsmessungen der β -Glucanlösungen zeigten also, dass das Zuckerpolymer ab einer Konzentration von $> 1\%$ ein schwaches Gel bildete.

Um nachzuweisen, ob die β -Glucanlösung die sogenannte Cox-Merz-Regel erfüllte und somit in sich homogen war, wurde das Fließverhalten mit den Ergebnissen der Frequenzsweeps

verglichen. Hierzu wurde die komplexe Viskosität (η^*) und die stationäre Viskosität (η) jeweils doppelt-logarithmisch gegen die Oszillationsfrequenz (ω) bzw. die Scherrate $\dot{\gamma}$ aufgetragen (Abb. 34).

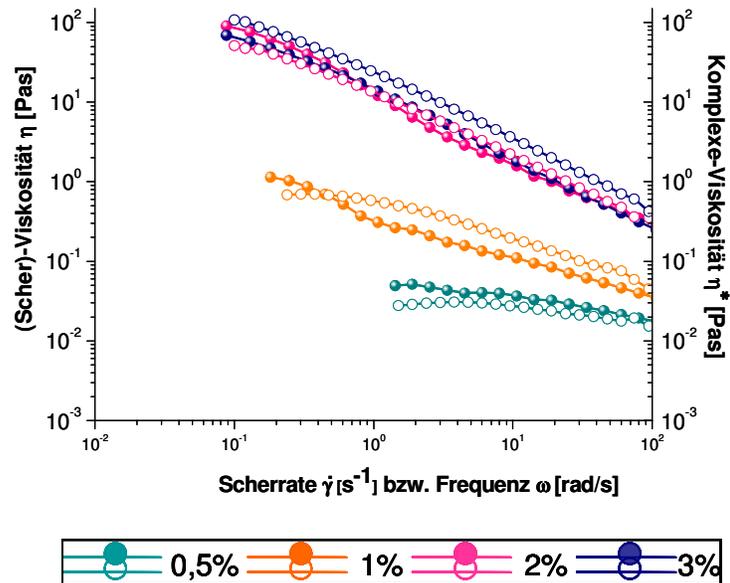


Abb. 34 Doppelt-logarithmischer Plot der komplexen Viskosität (η^*) (ausgefüllte Symbole) und stationären Viskosität (η) (offene Symbole) gegen jeweils die Oszillationsfrequenz (ω) bzw. die Scherrate ($\dot{\gamma}$).

Aus Abbildung 34 wird deutlich, dass das Fließverhalten der Glucanlösungen bei beiden Messungen sehr stark korrelierte. Durch diese hohe Übereinstimmung lässt sich feststellen, dass die Cox-Merz-Regel erfüllt wurde. Zur Ermittlung des Fließverhaltens dieses Systems können also auch Oszillationsmessungen eingesetzt werden. Die Gültigkeit der Cox-Merz-Regel deutet darauf hin, dass die β -Glucanlösungen homogen waren und nur aus einer Phase bestanden.

3.4.6. Dreidimensionale Struktur des Exopolysaccharids

Mithilfe der AFM konnte die supramolekulare Struktur des (1→3)(1→2)- β -D-Glucans aus *P. parvulus* B399 untersucht werden. Anhand von Abb. 35 wird deutlich, dass das Polymer bei einer Konzentration von 100 mg/l ein dreidimensionales Netzwerk bildete. Eine Aufsicht der Polymerstruktur ist zur Veranschaulichung in Abb. 36 gezeigt. Durch entsprechende Line scans (Abb. 35) konnte auch gezeigt werden, dass die Maschen des Polymers einen Durchmesser von ca. 100 nm besaßen. Die Höhe betrug knapp 10 nm. Zusätzlich zu den rheologischen Messungen wurde deutlich, dass das β -D-Glucan unter den gewählten Bedingungen bei RT ein Gel bildete.

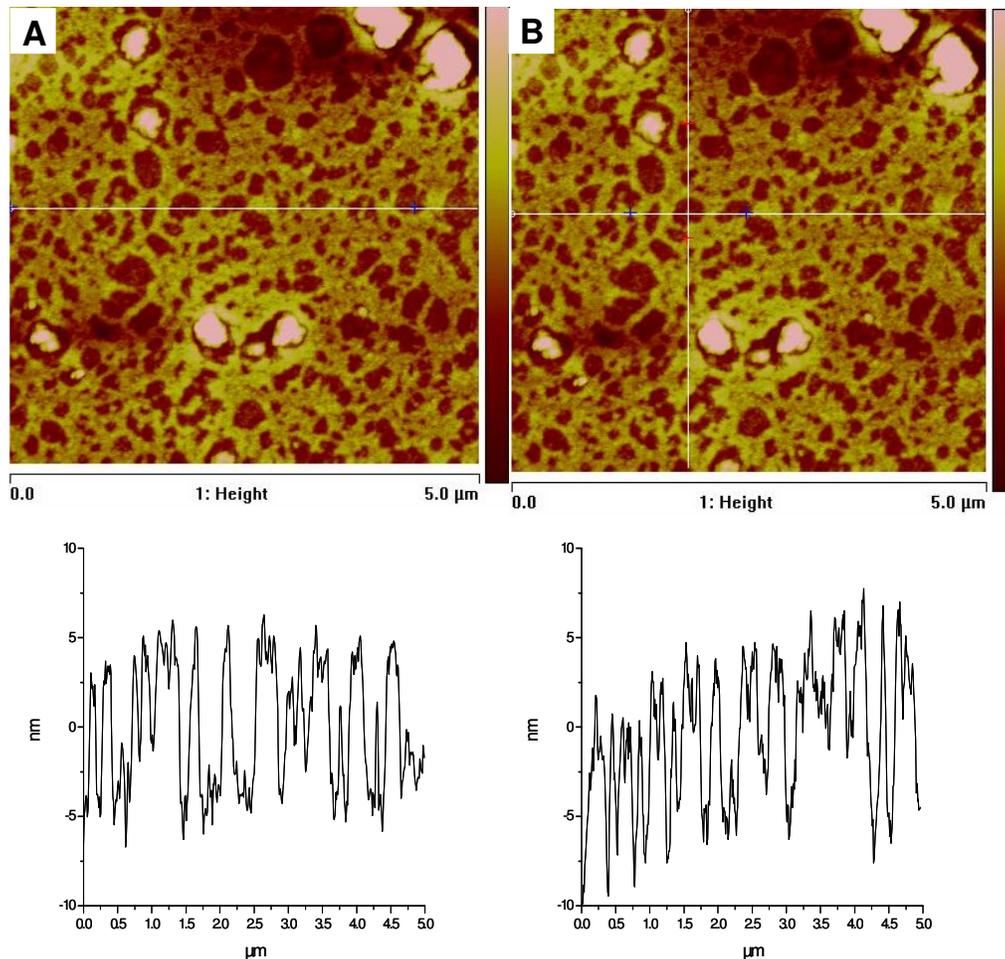


Abb. 35 TM-AFM Aufnahmen des (1→3)(1→2)- β -D-Glucans aus *P. parvulus* B399 (100 mg/l). Der Größenausschnitt beträgt 5,0 μ m x 5,0 μ m. **A** Line scan entlang der x-Achse; Höhenprofil des Querschnitts (unten). **B** Line scan entlang der Y-Achse; das entsprechende Höhenprofil ist darunter angegeben.

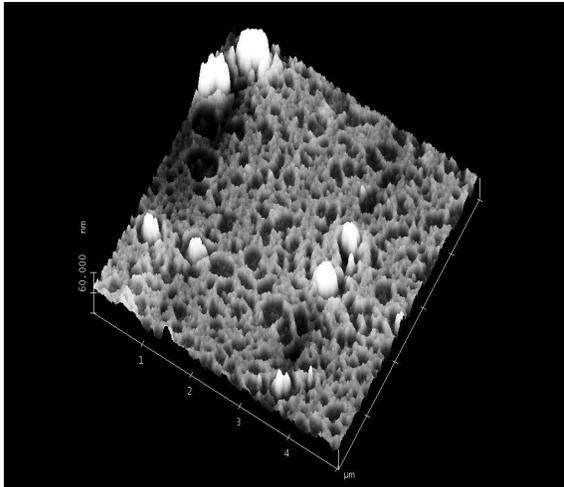


Abb. 36 TM-AFM Aufnahme des (1→3)(1→2)-β-D-Glucans aus *P. parvulus* B399 (100 mg/l) als räumliche Darstellung. Der Größenausschnitt beträgt 5,0 µm x 5,0 µm.

3.5. 16S rDNA Sequenz von *Pediococcus parvulus* B399

Der Stamm B399 konnte der Art *Pediococcus parvulus* zugeordnet werden. Es wurden 972 bp sequenziert, die im Anhang 8.1 zu finden sind.

3.6. Glycosyltransferase (*gtf*)-Gen

Das *gtf*-Gen ließ sich für den Stamm B399 nach der modifizierten Methode nach Werning et al. (2006) nachweisen. In Abbildung 37 wurde das 417 bp PCR-Amplifikat im Agarosegel nachgewiesen.

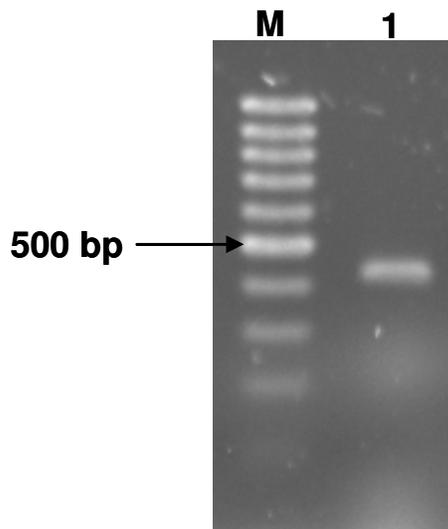


Abb. 37 Nachweis des *gtf*-Gens bei *Pediococcus parvulus* B399. M Marker (GeneRuler™ DNA Ladder Mix); 1 PCR-Amplifikat von 417 bp.

3.7. Glucanolytische Mikroorganismen

3.7.1. Nachweis von β -Glucanasen auf festem Nährmedium

Beim Wachstum der Testorganismen auf den Substraten Laminarin und Azurine-Pachyman, zeigten einige von ihnen β -Glucanaseaktivität, welche sich als Lysehof um die Bakterienkolonien bzw. durch die Freisetzung kürzerer farbstoffgekoppelter Oligomere bei Azurine-Pachyman äußerte. In Abbildung 38 wird die Spaltung von Laminarin und Azurine-Pachyman exemplarisch gezeigt. Die Ergebnisse des Plattentests sind in Tab. 19 zusammengefasst.

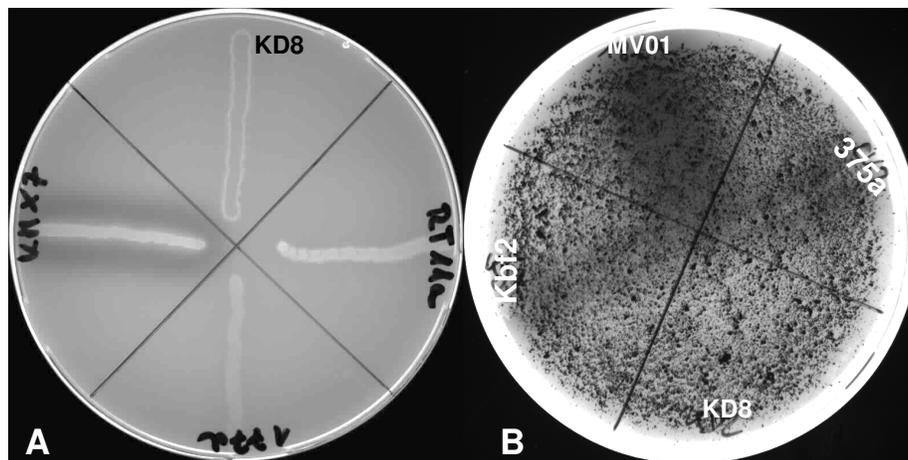


Abb. 38 Nachweis der β -Glucanaseaktivität mittels Calcofluor-White beim Wachstum der Teststämme KMX7, KD8, RT11a und CZ177d auf Laminarin (A). Beim Wachstum der Stämme Kbf2, MV01, CZ375a und KD8 auf Azurine-Pachyman (B) erfolgt der Nachweis der Glucanaseaktivität durch Freisetzung von azurinegekoppelten Oligomeren.

Anhand von Abb. 38A wird gezeigt, dass der Stamm KMX7 bei Wachstum auf Laminarin, offensichtlich Exoenzyme in Form von Glucanasen bildete, wohingegen die Stämme KD8, RT11a und CZ177d keine Glucanasen bildeten. Bei Wachstum auf Azurine-Pachyman zeigte der Stamm MV01 durch die Freisetzung von farbstoffgekoppelten Oligomeren eine deutliche Spaltung des Polymers, wohingegen die Stämme CZ375a und Kbf2 das Polymer nicht vollständig hydrolysierten. Der Stamm KD8 konnte Azurine-Pachyman nicht spalten (Abb. 38B).

Tab. 19 Glucanaseaktivität aller Teststämme (Tab. 5) auf festen Nährböden und in Flüssigmedium

Stamm	β -Glucanase im Plattentest	β -Glucanase in Flüssigmedium
Rt 6a	-	-
Rt 6b	-	-
RT 11a	-	-
RT 11b	-	-
WX	-	-
CZ 375a	+	+
CZ 375b	+	+
CZ101	+	+
DSM 43879	-	-
KMX 7	+	+
KMC12	+	+
KMaC2		
KHC 3	+	+
KScC4	-	-
KD1	-	-
KD8	-	-
Kbf 2	+	+
CZ 181a	-	-
CZ 177d	-	-
MV01	++	++

- keine Glucanaseaktivität, + Glucanaseaktivität, ++ starke Glucanaseaktivität

3.7.2. Nachweis von β -Glucanasen in Flüssigmedium

Beim Wachstum einiger Stämme (Tab. 19) in CYM-Medium mit EPS oder Hefacell[®] als Substrat konnten β -Glucanasen als Exoenzyme gebildet werden, die im Plattentest nachgewiesen werden konnten. In Abbildung 39 wird die Spaltung der kommerziellen Substrate Laminarin, Pachyman und Azurine-Pachyman durch die im Kulturüberstand enthaltenen β -Glucanasen exemplarisch für einige Organismen gezeigt. Die Bildung von β -Glucanasen in Flüssigkultur aller getesteter Organismen wird in Tabelle 19 zusammengefasst.

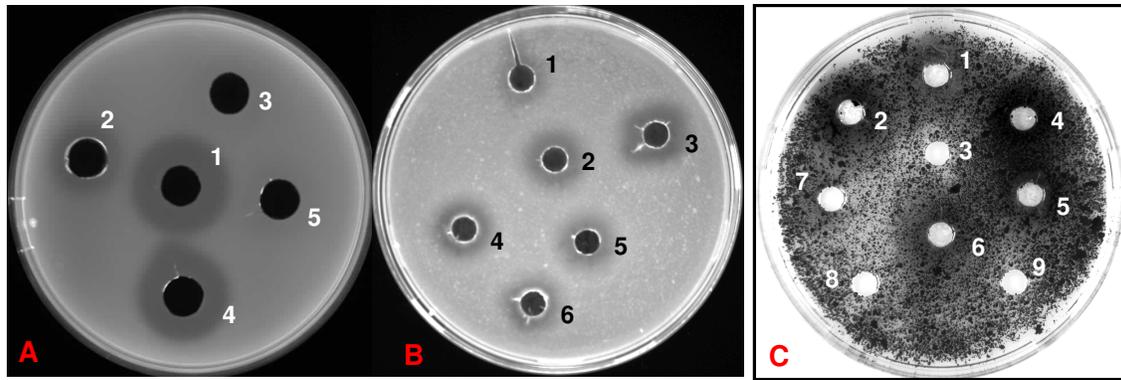


Abb. 39 Nachweis der Glucanaseaktivität in den Kulturüberständen mittels Lochplattentests. **A:** Lyseplatte mit Laminarin; 1: KÜ (EPS) von MV01 1:20 aufkonz.; 2: KÜ (EPS) von MV01; 3: hitzeinaktivierter KÜ (EPS) von MV01; 4: Laminarinase aus *Trichoderma sp.* [0,6 U/ml]; 5: hitzeinaktivierte Laminarinase aus *Trichoderma sp.* [0,6 U/ml]. **B:** Lyseplatte mit Pachyman; 1: KÜ (Hefacell[®]) von KHC3 1:20 aufkonz.; 2: KÜ (Hefacell[®]) von Kbf2 1:20 aufkonz.; 3: KÜ (Hefacell[®]) von MV01; 4: KÜ (EPS) von CZ375a 1:20 aufkonz.; 5: KÜ (EPS) von MV01 1:20 aufkonz.; 6: KÜ (EPS) von CZ101 1:20 aufkonz. **C** Lyseplatte mit Azurine Pachyman; 1: KÜ (EPS) von CZ 375b; 2: KÜ (EPS) von MV01; 3: hitzeinaktivierter KÜ (EPS) von MV01 4: Laminarinase aus *Trichoderma sp.* [0,6 U/ml]; 5: KÜ (Hefacell[®]) von KMX 7; 6: KÜ (Hefacell[®]) von KMC12; 7: KÜ (Hefacell[®]) von RT6a; 8: KÜ (Hefacell[®]) von RT6b; 9: KÜ (Hefacell[®]) von RT11a.

Aus Abbildung 39 wird deutlich, dass einige Stämme sowohl mit Hefacell[®], als auch mit dem EPS als Substrat ein oder mehrere β -Glucanasen bildeten. Die im KÜ enthaltene(n) Glucanase(n) konnte(n) alle β -1,3-Substrate hydrolysieren (Abb. 39). Dadurch, dass *Delftia sp.* MV01 im Plattentest den größten Lysehof zeigte und auch in Flüssigkultur mit EPS oder Hefacell[®] als Substrat ein oder mehrere Glucanasen bildete, wurde in weiteren Versuchen mit diesem Stamm gearbeitet.

3.8. Bildung der β - Glucanase durch *Delftia sp.* MV01

Kultivierungsbedingungen

In Abbildung 40 sind die Kulturbedingungen für MV01 hinsichtlich einer optimalen Enzymproduktion gezeigt. Es konnte festgestellt werden, dass der Stamm bei Wachstum mit dem Zellwandpräparat Hefacell[®] und dem EPS von *P. parvulus* B399 eine höhere Glucanaseaktivität zeigte, als bei einer Anzucht mit lebenden Hefezellen. Des Weiteren wurde deutlich, dass bei Anzucht mit Hefacell[®] auch das Kulturvolumen Einfluß auf die Enzymproduktion hatte. Ein Kulturvolumen von 200 ml führte zu deutlich höheren Glucanaseaktivitäten als eine Kultivierung in einem Volumen von 800 ml. Die größte Glucanaseaktivität konnte bei der Anzucht mit Hefacell[®] (200 ml Kulturvolumen) nach 3 Tagen beobachtet werden, wohingegen bei der Anzucht mit EPS nach 5 tägiger Inkubation die höchste Glucanaseaktivität von ~ 7 U/ml erreicht wurde.

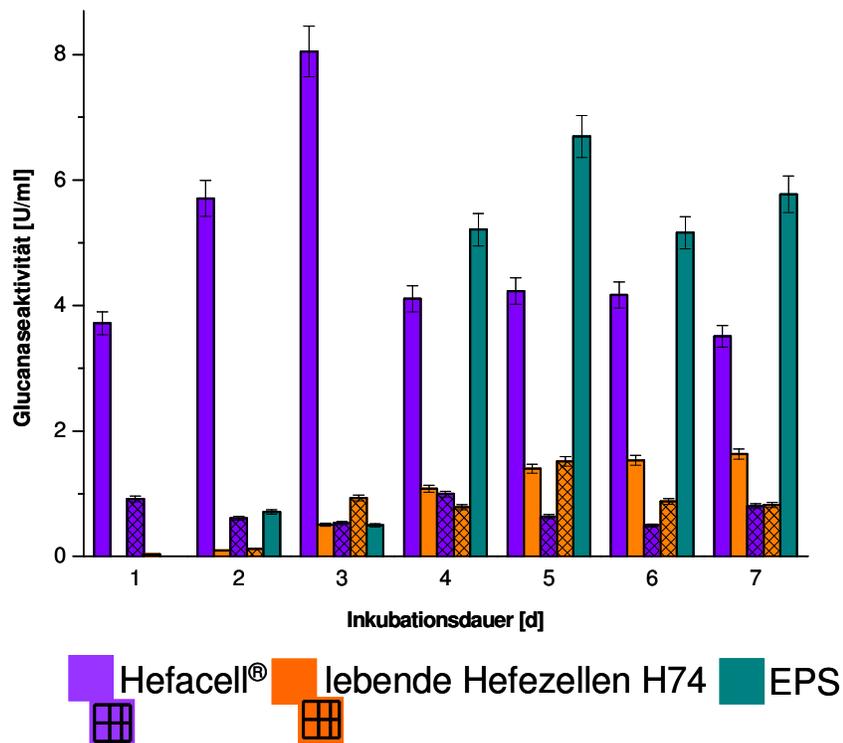


Abb. 40 Enzymproduktion von MV01 bei Wachstum mit Hefacell[®] (lila Balken), lebende Hefezellen (orangefarbene Balken) und EPS (türkisfarbene Balken) in 200 ml Kulturen für 7 Tage bei 30 °C. Die gemusterten Balken geben die Glucanaseaktivität [U/ml] von Stamm MV01 bei Wachstum mit Hefacell[®] (lila Balken), lebende Hefezellen (orangefarbene Balken) in 800 ml Kulturen an.

3.9. Reinigung der β - Glucanase aus *Delftia sp.* MV01

Anionenaustauscherchromatographie

In Abbildung 41 ist das Chromatogramm des ersten Reinigungsschritts der Glucanase über Anionenaustauscherchromatographie (Mono Q) zu sehen. Exemplarisch wird der 7. Lauf von insgesamt 24 Läufen gezeigt. Das Chromatogramm macht deutlich, dass sich neben der Glucanase(n) noch eine große Menge an Fremdprotein in der Probe befand. Aktive Fraktionen konnten mittels Lochplattentest (Abb. 41) zugeordnet werden. Es zeigte sich, dass im Durchfluß (Fraktion 3-5) Glucanaseaktivität zu finden war. Des Weiteren eluierten aktive Fraktionen (F12 und F13) bei ca. 0,3 M NaCl von der Säule. In den übrigen Fraktionen konnte keine Glucanaseaktivität festgestellt werden. Dadurch, dass bei ca. 0,15 M NaCl glucanasehaltige Fraktionen eluierten (Durchfluss), die demnach nicht an die Anionenaustauschersäule gebunden haben, lag die Vermutung nahe, dass sich in der Probe möglicherweise zwei verschiedene Glucanasen befanden. Die Fraktionen mit Glucanaseaktivität wurden sowohl im SDS-, als auch im Aktivitätsgel analysiert (Abb. 42).

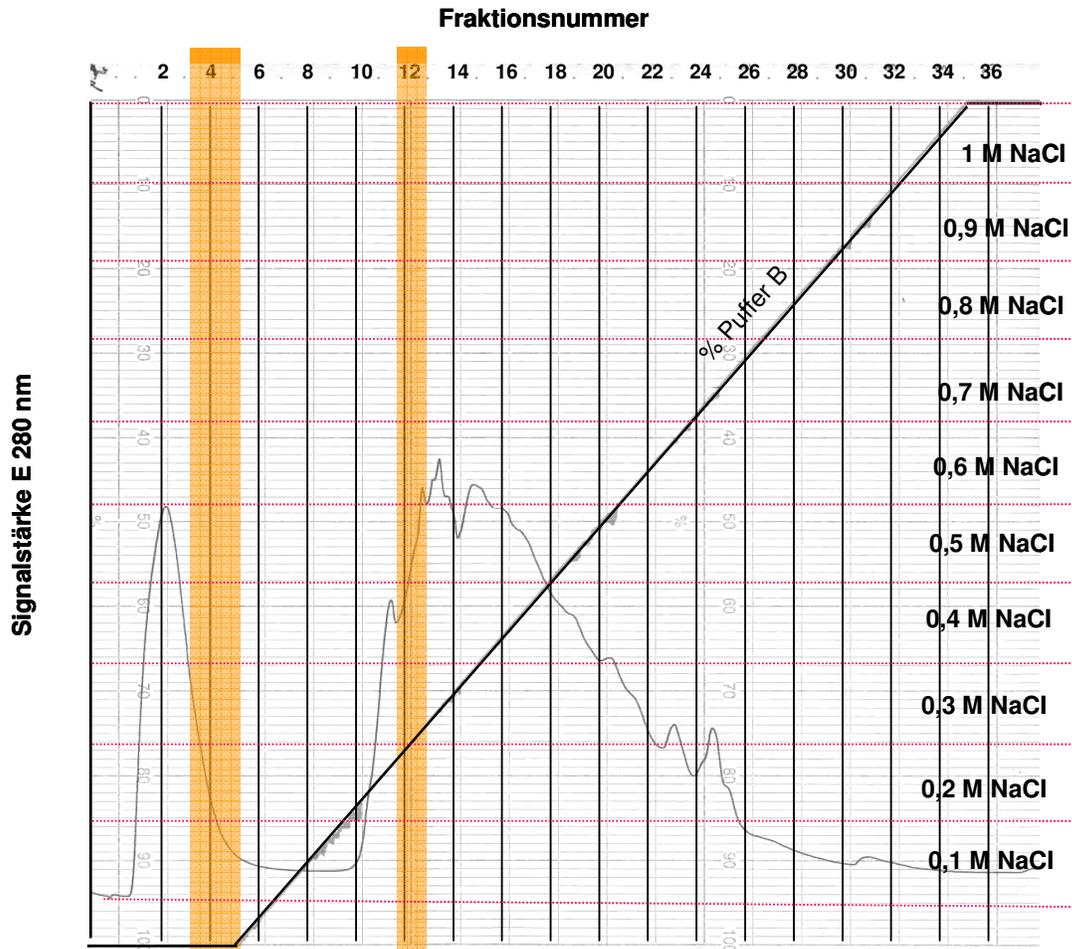


Abb. 41 FPLC-Chromatogramm der eluierten Fraktionen des aufbereiteten Kulturüberstandes von *Delftia sp.* MV01. Die Trennung der Proteine erfolgte an einer Anionenaustauschersäule Mono Q HR 5/5, 0,5 x 50 mm mittels eines linearen NaCl-Gradienten (20 mM Tris/ HCl, pH 7,5 + 1 M NaCl) bei einer Flußrate von 1 ml/min. Auf der x-Achse sind die Fraktionen (F1-F36) aufgetragen. Auf der y-Achse (links) ist das Detektorsignal (280 nm) aufgetragen. Auf einer weiteren y-Achse (rechts) wird der lineare NaCl-Gradient gezeigt. Fraktionen mit Glucanaseaktivität sind orange gekennzeichnet.

In Abbildung 43 wurden die aktiven Fraktionen nach Anionenaustauscherchromatographie mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das SDS-Gel zeigte, dass die FPLC-Fraktionen noch eine Menge an Fremdproteinen enthielten. Da aufgrund der Ergebnisse in Abbildung 52 vermutet wurde, dass sich in der Proteinprobe möglicherweise zwei Glucanasen befanden, wurde ein Aktivitätsgel der aktiven Fraktionen (Abb. 41 + 42) angefertigt. Mittels des Aktivitätsgels konnte allerdings der Verdacht ausgeschlossen werden, dass sich im Kulturüberstand von *Delftia sp.* MV01 mehr als eine Glucanase befand (Abb. 43). Zwischen 34 und 26 kDa konnte unter UV-Betrachtung im Aktivitätsgel eine lytische Abbauzone festgestellt werden, die bei den FPLC-Fraktionen 3-5 (Abb. 41 + 42) sehr deutlich auftrat. Fraktion 12 und 13 (Abb. 41 + 42) zeigten hingegen eine schwächere Glucanaseaktivität im Aktivitätsgel.

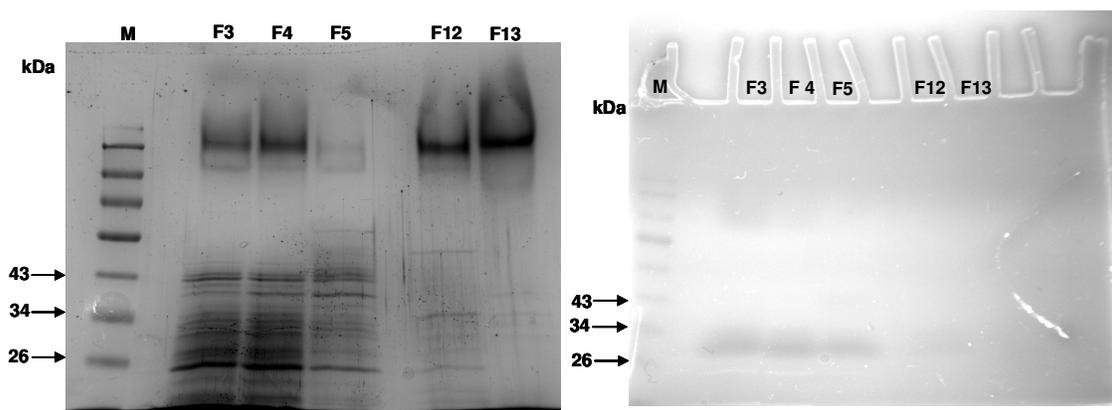


Abb. 43 SDS-PAGE (links) und Aktivitätsgel (rechts) der aktiven FPLC-Fraktionen. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 20 µg. Die Bezeichnung der Probe bezieht sich auf die Fraktionsnummer des FPLC-Laufes (Abb. 41). M: Protein-Standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder).

Gelfiltration

Die aktiven Fraktionen der Anionenaustauscherchromatographie (Abb. 41 + 42) wurden über Gelfiltration weiter gereinigt. Abbildung 44, 46 und 48 zeigen die FPLC-Chromatogramme der Gelfiltration für die ursprünglichen Fraktionen 3, 4, 5, 12 und 13 der Anionenaustauscherchromatographie (Abb. 41 + 42). Die FPLC-Chromatogramme der Gelfiltrationen aller Proben wiesen neben der Glucanase auch Fremdprotein auf (Abb. 44, 46 und 48). Nach der Auftrennung der ursprünglichen Fraktion 3 (Mono Q) wiesen danach noch 4 Fraktionen (F13-16) im Lochplattentest Glucanaseaktivität auf (Abb. 45), wohingegen bei den ursprünglichen Fraktionen 4 und 5 (Mono Q) nur noch in 2 Fraktionen Glucanaseaktivität zu

finden war (Abb. 45 und 47). Die ursprünglichen Fraktionen 12 und 13 (Mono Q) zeigten hingegen nur noch in einer Fraktion (F14) nach Gelfiltration Aktivität gegen Laminarin. Exemplarisch wird der Lochplattentest der ursprünglichen Fraktion 13 (Mono Q) gezeigt (Abb. 49).

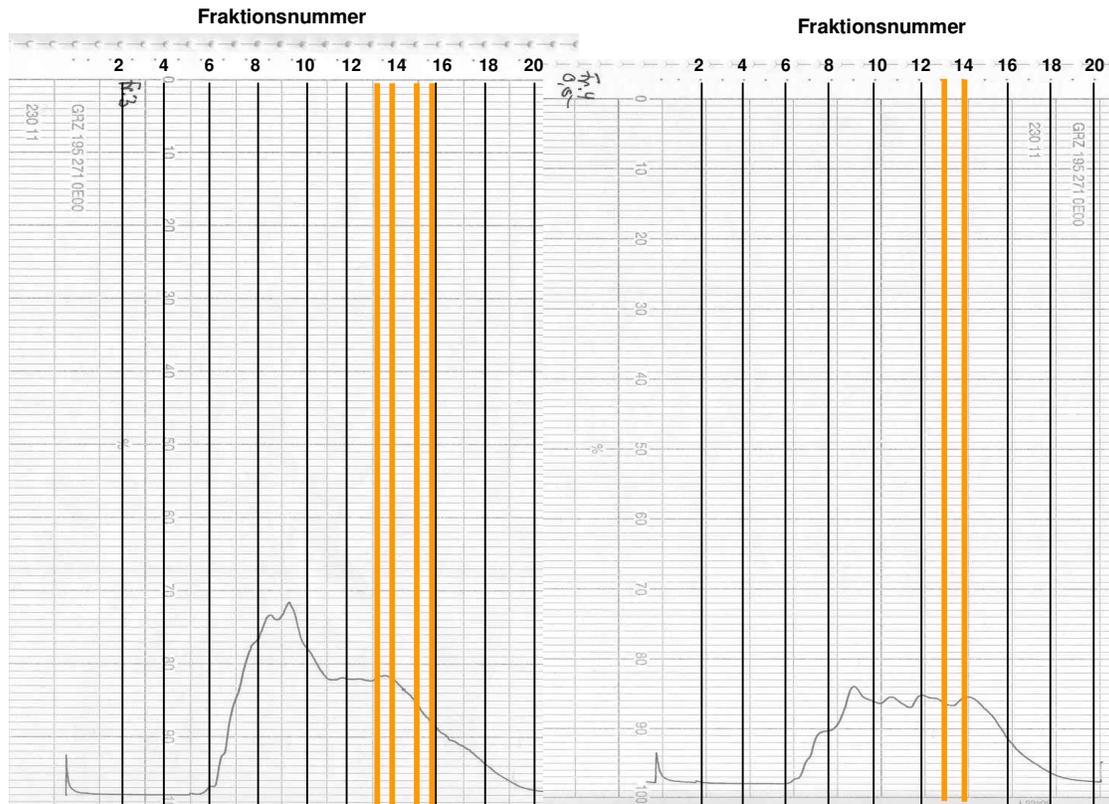


Abb. 44 FPLC-Chromatogramm der nach Gelfiltration (Sephadex G 75 HR 10/30) eluierten Proteine der ursprünglichen Fraktionen F3 (links) und F4 (rechts) der Anionenaustauscherchromatographie (Abb. 41). Die Elution erfolgte mittels 20 mM Tris/HCl pH 7,5 + 200 mM NaCl bei einer Flußrate von 0,5 ml/min. Das Auftragungsvolumen betrug 200 µl. Auf der x-Achse sind jeweils die Fraktionen (F1-F20) aufgetragen. Die orangefarbenen Balken heben die aktiven Fraktionen hervor. Die Intensität der Detektion betrug jeweils 0,5.

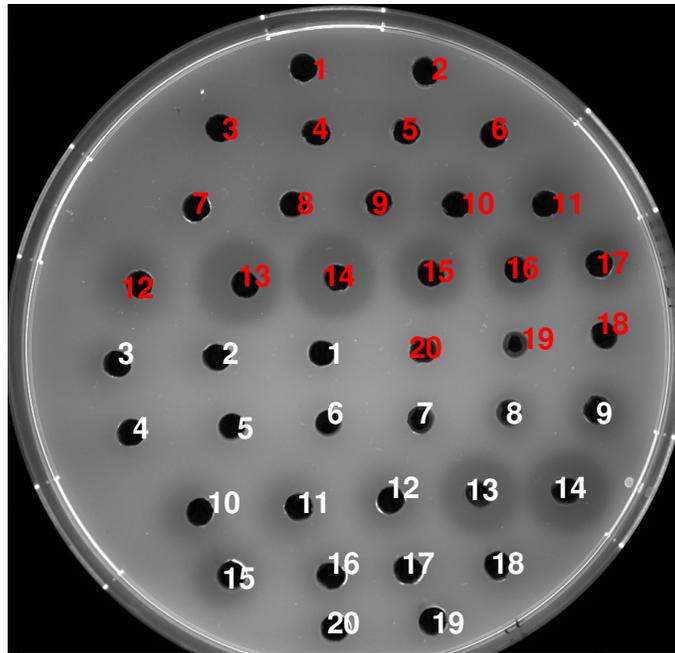


Abb. 45 Bestimmung der Glucanaseaktivität in den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration (Abb. 55) der ursprünglichen Proben 3 und 4 (Abb. 41 + 42) mittels Lochplattentests (Laminarin + 0,001% Calcofluor-White). Aufgetragen wurden jeweils die Fraktionen 1-20 der ursprünglichen Probe 3 (rot) und 4 (weiß). Fraktionen mit Glucanaseaktivität zeigten einen dunklen Lysehof unter UV-Betrachtung.

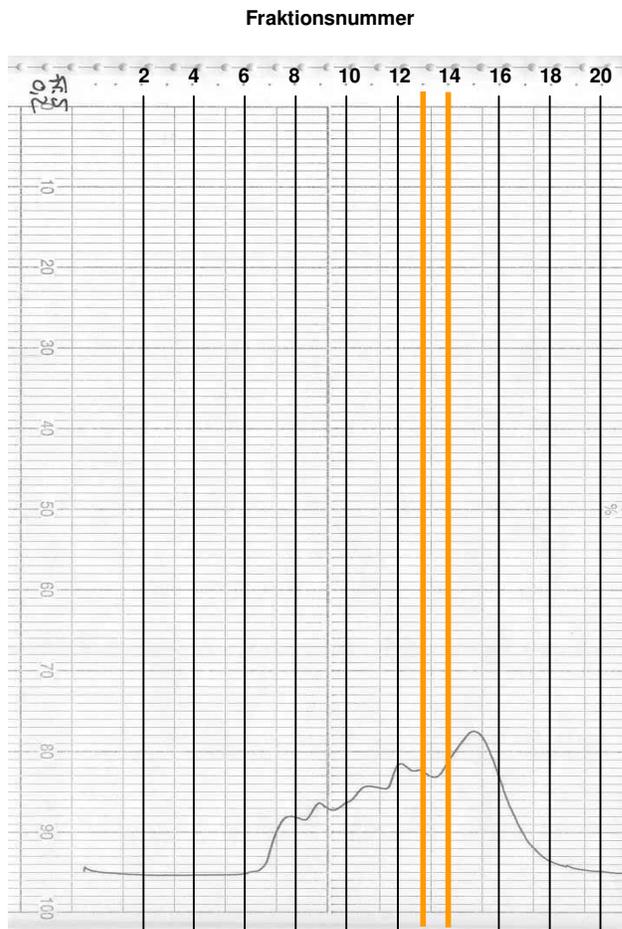


Abb. 46 FPLC-Chromatogramm der nach Gelfiltration (Sephadex G 75 HR 10/30) eluierten Proteine der ursprünglichen Fraktion F5 nach Anionenaustauscherchromatographie (Abb. 41). Die Elution erfolgte mittels 20 mM Tris/HCl pH 7,5 + 200 mM NaCl bei einer Flußrate von 0,5 ml/min. Das Auftragungsvolumen betrug 200 μ l. Auf der x-Achse sind jeweils die Fraktionen (F1-F20) aufgetragen. Die orangefarbenen Balken heben die aktiven Fraktionen hervor. Die Intensität der Detektion betrug 0,2.

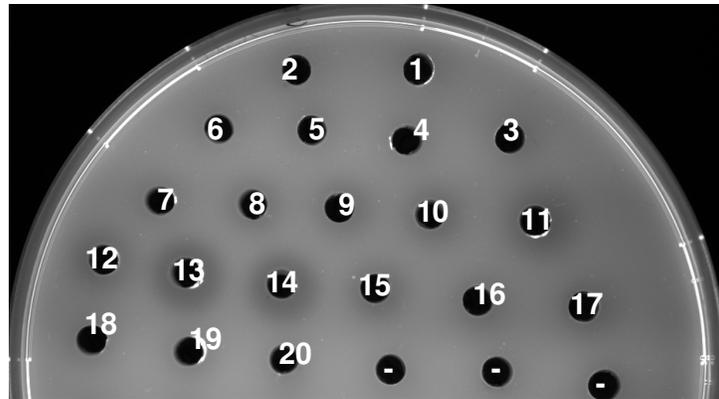


Abb. 47 Bestimmung der Glucanaseaktivität nach der Gelfiltration in den einzelnen Fraktionen (Abb. 44) der ursprünglichen Probe 5 (Abb. 52 + 53) mittels Lochplattentests (Laminarin + 0,001% Calcofluor-White). Aufgetragen wurden jeweils die Fraktionen 1-20 der Gelfiltration. Fraktionen mit Glucanaseaktivität zeigten einen dunklen Lysehof unter UV-Betrachtung.

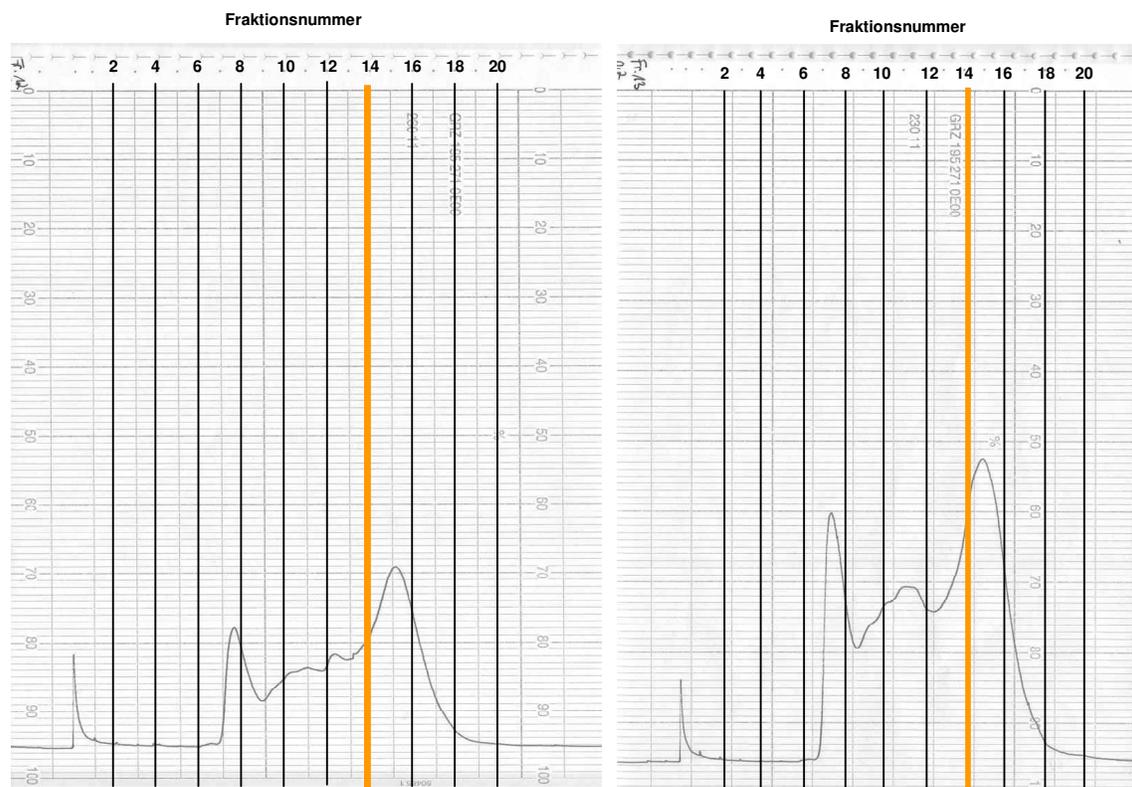


Abb. 48 FPLC-Chromatogramm der nach Gelfiltration (Sephadex G 75 HR 10/30) eluierten Proteine der ursprünglichen Fraktionen F12 (links) und F13 (rechts) der Anionenaustauscherchromatographie (Abb. 41). Die Elution erfolgte mittels 20 mM Tris/HCl pH 7,5 + 200 mM NaCl bei einer Flußrate von 0,5 ml/min. Das Auftragungsvolumen betrug 200 µl. Auf der x-Achse sind jeweils die Fraktionen (F1-F20) aufgetragen. Die orangefarbenen Balken heben die aktiven Fraktionen hervor. Die Intensität der Detektion betrug jeweils 0,2.

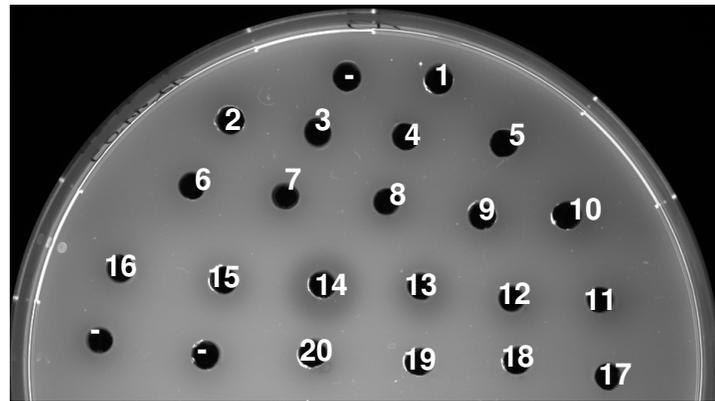


Abb. 49 Bestimmung der Glucanaseaktivität nach der Gelfiltration in den einzelnen Fraktionen (Abb. 48) der ursprünglichen Probe 13 (Abb. 41 + 42) mittels Lochplattentests (Laminarin + 0,001% Calcofluor-White). Aufgetragen wurden jeweils die Fraktionen 1-20 der Gelfiltration. Fraktionen mit Glucanaseaktivität zeigten einen dunklen Lysehof unter UV-Betrachtung.

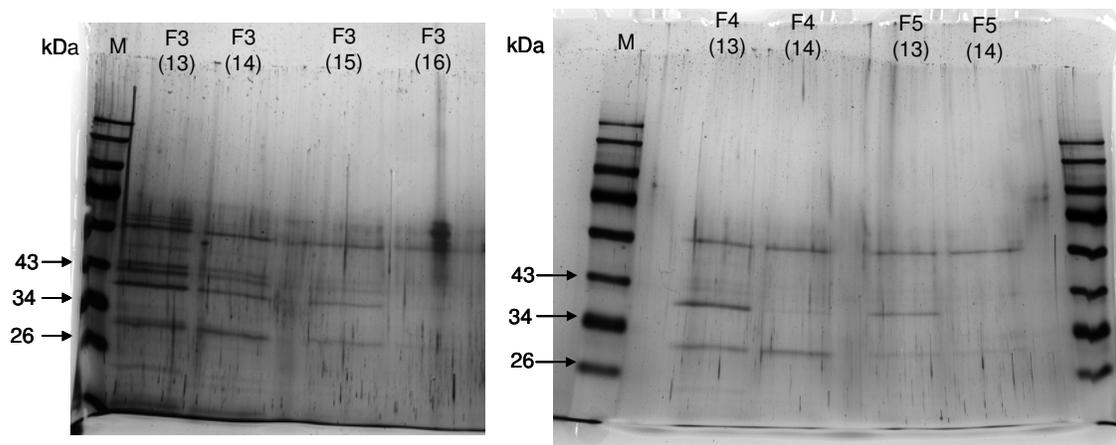


Abb. 50 Auftrennung der aktiven Fraktionen (Abb. 45 + 47) der Gelfiltration (Werte in Klammern) der ursprünglichen Mono-Q Fraktionen F3 (links) und F4 und F5 (rechts) mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung der SDS-Gele. M: Protein-Standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 2 µg.

Die Auftrennung der aktiven Fraktionen aus der Gelfiltration zeigte, dass sich in den Proben der ursprünglichen F3 (Mono-Q) Fraktion noch eine Reihe an Fremdproteinen befand, wohingegen das SDS-Gel der Fraktionen F4 und F5 (beide Mono-Q) nach der Gelfiltration nur noch 2-3 Proteinbanden aufwies (Abb. 50). Die Fraktionen F12 und F13 (Mono-Q) zeigten nach der Gelfiltration nur noch eine Proteinbande im silbergefärbten SDS-Gel von ~ 29 kDa (Abb. 51). Die Glucanase konnte somit nach Gelfiltration vollständig gereinigt werden.

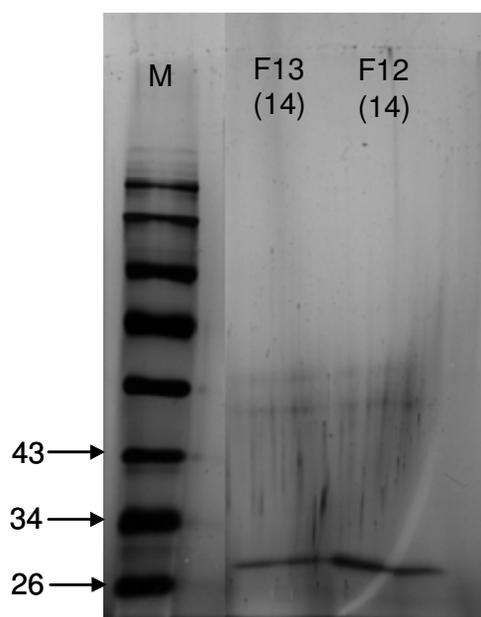


Abb. 51 Auftrennung der aktiven Fraktionen (Abb. 49) der Gelfiltration (Werte in Klammern) der ursprünglichen Mono-Q Fraktionen F12 und F13 über SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung. M: Protein-Standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 2 µg.

In Tabelle 20 sind die einzelnen Reinigungsschritte der Glucanase zusammengefasst. Aus einem anfänglichen Gesamtvolumen von 2690 ml konnten nach Gelfiltration 34 µg reine Glucanase gewonnen werden. Diese hatte eine spezifische Aktivität von 10 U/mg gegen Laminarin.

Tab. 20 Zusammenfassung der Reinigungsschritte für die 29 kDa β-1,3-Glucanase aus *Delftia sp.* MV01¹.

Schritt	Gesamt- volumen [ml]	Gesamt- protein [mg]	Aktivität [U m ⁻¹]	Gesamt- aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Anreicherung	Ausbeute [%]
Kulturüberstand	2690	282,45	0,035	94,15	0,345	1	100
Ultrafiltration	48	39,75	1,695	81,36	3,1949	9,26	86,42
MonoQ- Chromatographie (Abb. 41 + 43)	24	4,32	0,55	13,2	3,0426	8,81	14,02
Gelfiltration (Abb. 48 + 51)	1	0,034	0,34	0,34	10	28,96	0,36

¹ Das Reinigungsprotokoll wurde für die Fraktion F13 (Abb. 41) angefertigt.

3.10. Charakterisierung der β -1,3-Glucanase aus *Delftia sp.* MV01

3.10.1. Masse und Aktivität des Enzyms

Die Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 konnte, wie bereits in Abbildung 51 gezeigt, nach Anionenaustauscherchromatographie (Abb. 41) und Gelfiltration (Abb. 48) gereinigt werden. Während der Reinigung der Glucanase wurden nur Silbergele angefertigt (Abb. 50 + 51). Ein Nachweis der gereinigten Glucanase im Aktivitätsgel erfolgte in Abbildung 52B. Nach etwa 3 stündiger Inkubation konnte Glucanaseaktivität in Form einer lytischen Abbauzone unter UV-Betrachtung nachgewiesen werden.

Um die Aktivität zuordnen zu können, wurde die gereinigte Glucanase (Abb. 51 (F13)) nochmals im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 52A). Mithilfe des Proteingrößenstandards konnte dem Enzym eine Masse von 29 kDa zugeordnet werden (Abb. 52A).

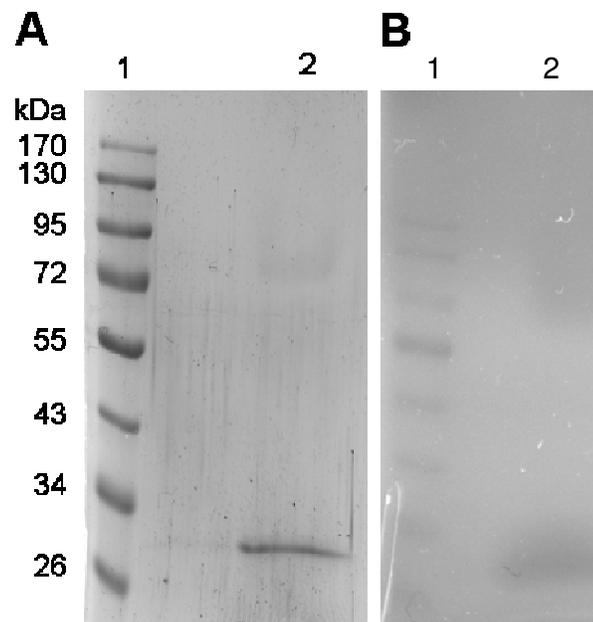


Abb. 52 SDS-PAGE der gereinigten β -1,3-Glucanase aus *Delftia sp.* MV01. **A)** nach Proteinfärbung, 1: Protein-Standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) 2: gereinigtes Enzym, **B)** Zymogramm der Glucanaseaktivität. 1: Protein-Standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) 2: lytische Zone im Aktivitätsgel mit Calcofluor-White (0,001%) zeigt unter UV-Betrachtung Glucanaseaktivität an.

3.10.2. Isoelektrischer Punkt

Die gereinigte Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 (Abb. 52) hatte einen isoelektrischen Punkt von ~ 4,3 (Abb. 53). Da bereits ausgeschlossen werden konnte (Abb. 51), dass in der Proteinprobe neben der Glucanase noch weitere Proteine enthalten sein könnten, wurden mögliche Artefaktbanden, die bei der Färbung des IEF-Gels entstanden waren, nicht weiter berücksichtigt.

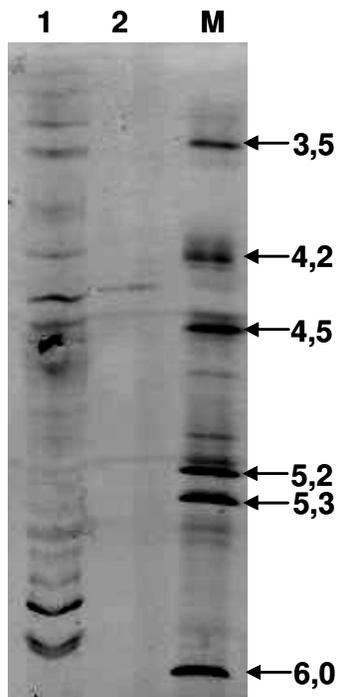


Abb. 53 IEF der gereinigten Glucanase aus *Delftia sp.* MV01. 1: Kulturüberstand, 2: gereinigte Glucanase, M: Protein-Standard (IEF-Marker 3-10).

3.10.3. Protein-Blot

Der Protein-Blot der Glucanase ist in Abbildung 54 dargestellt. Die Probe der FPLC Fraktion 5 nach Anionenaustauscherchromatographie (Abb. 41, 42 und 43), bzw. Fraktion 14 nach der Gelfiltration (Abb. 46 + 50) zeigte neben der Glucanase (29 kDa) noch zwei weitere niedermolekulare Banden, die allerdings nicht weiter berücksichtigt wurden.

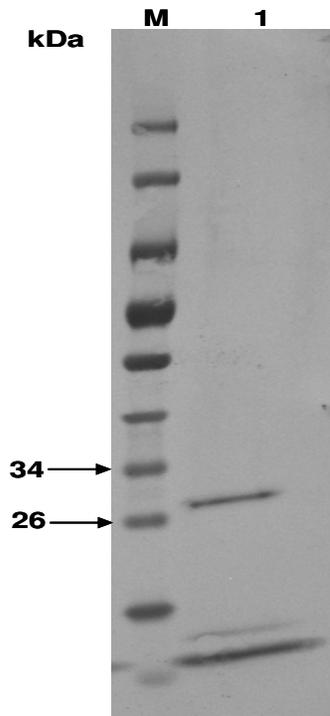


Abb. 54

Protein-Blot der Glucanase. M: Protein-Standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), 1: Fraktion 14 der Gelfiltration.

3.10.4. N-Terminus

Die ersten 15 Aminosäuren des N-Terminus des Proteins aus *Delftia sp.* MV01 sind in Tabelle 21 dargestellt. Die Aminosäuresequenz zeigte hohe Ähnlichkeit mit β -1,3-Glucanasen, die zu der Glycosyl-Hydrolase Superfamilie 16 gehören. Ein Alignment des sequenzierten N-Terminus der Glucanase zeigte eine 100% ige Übereinstimmung mit einer β -1,3-Glucanase aus *Cellulosimicrobium cellulans* (Accession no. AAC38290). Weiterhin konnten auch Ähnlichkeiten mit den Glucanasen aus *Nocardiosis dassonvillei subsp. Dassonvillei* (Accession no YP_003679525) (86%) und *Arthrobacter aurescens* (Accession no YP_946579) (73%) gefunden werden.

Tab. 21 Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz verschiedener β -1,3-Glucanasen der Glycosyl-Hydrolase Superfamilie 16.

Mikroorganismus	Aminosäuresequenz ^a
<i>Delftia sp.</i> MV01	<u>APGD</u> LLWSDEF <u>DGAA</u>
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> (Accession no. AAC38290)	<u>APGD</u> LLWSDEF <u>DGAA</u>
<i>Nocardiosis dassonvillei subsp. Dassonvillei</i> (Accession no YP_003679525)	<u>APGD</u> VVWSDEF <u>DGAA</u>
<i>Arthrobacter aurescens</i> (Accession no YP_946579)	<u>APGK</u> LVWSDEF <u>NGPA</u>

^aAminosäuren, die identisch mit denen der β -1,3-Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 sind, wurden unterstrichen.

3.10.5. pH-Optimum

Das pH-Optimum der Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 lag bei 4 (Abb. 55).

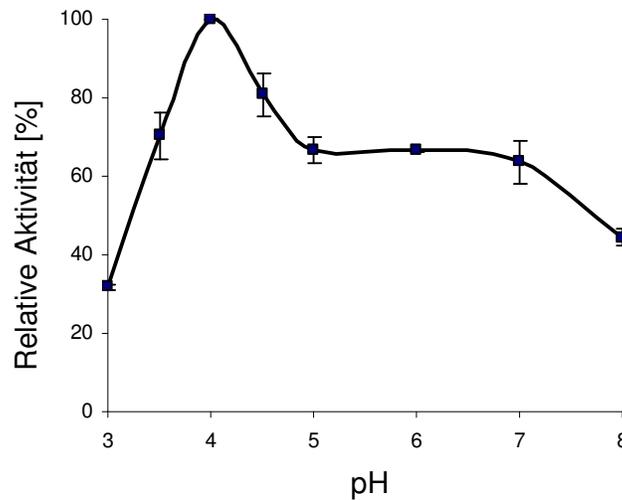


Abb. 55 Beeinflussung der Enzymaktivität durch unterschiedliche pH-Werte.

3.10.6. Temperatur-Optimum

Die Glucanase hatte ein Temperatur-Optimum von 50 °C (Abb. 56).

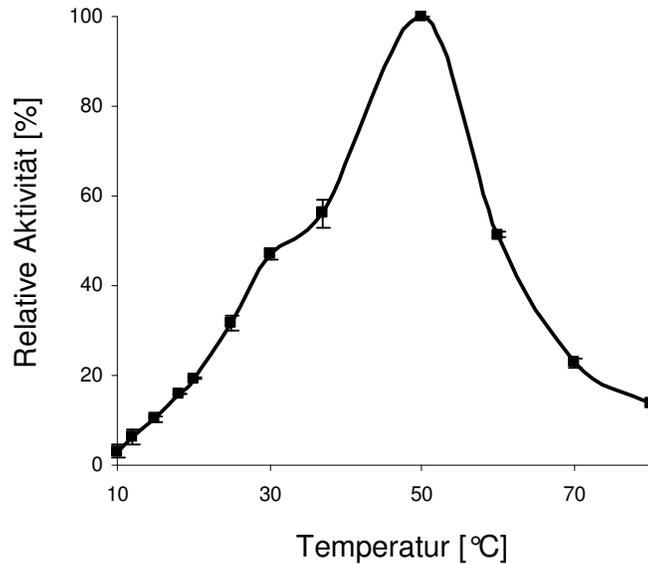


Abb. 56 Beeinflussung der Enzymaktivität durch unterschiedliche Temperaturen.

3.10.7. Spaltung von Laminarin

Wie in Abbildung 57 zu sehen, wurde Laminarin von der Glucanase (3 U/mg) willkürlich und vermutlich endoglycanolytisch gespalten. Neben Glucose traten auch Laminarioligosaccharide als Hydrolyseprodukte auf. Durch die Betrachtung der Hydrolyseprodukte, konnte vermutet werden, dass es sich bei dem Enzym um eine Endoglucanase handelte.

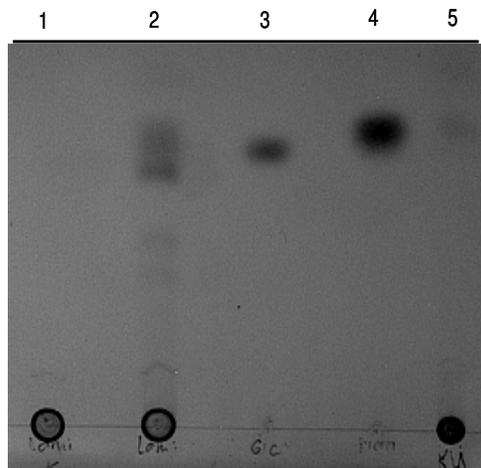


Abb. 57 Auftrennung der Hydrolyseprodukte von Laminarin nach Behandlung mit angereinigter Glucanase (3 U/mg) mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck; Laufmittel: Butanol/Ethanol/H₂O (5:3:2)) und nachfolgender Detektion mit Anisaldehyd-H₂SO₄ bei 105 °C.

1: Laminarin (Kontrolle), 2: Laminarin + Glucanase (3 U/mg), 3: Glucose (5 µg), 4: Mannose (5 µg), 5: Glucanase (3 U/mg). Das Auftragsvolumen der Proben betrug jeweils 5 µl.

3.10.8. Substratspezifität

Die Ergebnisse aus Tabelle 23 konnten zeigen, dass es sich bei der Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 um eine β -1,3-Glucanase handelte, die keine weiteren Aktivitäten aufwies. Nur β -1,3 verknüpfte Substrate konnten von dem Enzym hydrolysiert werden. Die β -1,3-Glucanaseaktivität variierte allerdings je nach Aufbau des β -1,3-Glucans. So zeigte das Enzym gegen das ausschließlich β -1,3 verknüpfte Carboxymethyl-Pachyman (CM-Pachyman) eine 135%-ige Aktivität, wohingegen die Aktivität gegen Laminarin bei 100% lag. Laminarin besitzt neben der β -1,3 verknüpften Hauptkette, auch β -1,6 verknüpfte Seitenketten, die möglicherweise die Aktivität des Enzyms daher etwas mindern. Des Weiteren hatte die Glucanase im Vergleich zu Laminarin eine 23%-ige Aktivität gegen das EPS von *P. parvulus* B399. Möglicherweise wurde durch das zusätzliche Auftreten der β -1,2 Reste im Polymer die Aktivität stärker gemindert, als bei β -1,6 Resten, die im Laminarin auftreten. Aus Tabelle 23 wird sehr deutlich, dass keine β -1,4- oder β -1,6 verknüpften Polymere, wie Xylan, Carboxymethyl-Cellulose (CM-Cellulose) oder Pustulan von der Glucanase gespalten wurden. Darüber hinaus besaß das Enzym auch keine Aktivität gegen α -1,6 verknüpftes Dextran.

Tab. 23 Substratspezifität der β -1,3 Glucanase aus *Delftia sp.* MV01.

Substrate ^a	Hauptverknüpfungstyp (Monomer)	β -1,3-Glucanaseaktivität (%) ^b
Laminarin	β -1,3; β -1,6 (Glc)	100
CM-Pachyman	β -1,3 (Glc)	135
Xylan	β -1,4 (Xyl)	0
Pustulan	β -1,6 (Glc)	0
CM-Cellulose	β -1,4 (Glc)	0
Dextran	α -1,6 (Glc)	0
EPS (<i>P. parvulus</i>)	β -1,3; β -1,2 (Glc)	23

^a Alle Substrate wurden bis auf das EPS (0,75 mg/ml) in einer Endkonzentration von 1,5 mg/ml verwendet.

^b Eine Aktivität von 100% entspricht der Aktivität gegen Laminarin.

3.11. Glucanaseaktivität unter weinrelevanten Bedingungen

3.11.1. Niedrige Temperaturen

Da die Glucanase bei einem möglichen Einsatz in der Weinbereitung auch bei Temperaturen unterhalb von 30 °C aktiv bleiben sollte, allerdings bereits gezeigt wurde, dass die Aktivität der Glucanase bei Temperaturen unter 30 °C stark herabgesetzt wird (Abb. 56), wurde versucht durch Verlängerung der Inkubationszeit von 15 min (Abb. 56) auf 2 h (Abb. 58) eine zufriedenstellende Aktivität des Enzyms bei niedrigen Temperaturen (10-25 °C) zu erreichen.

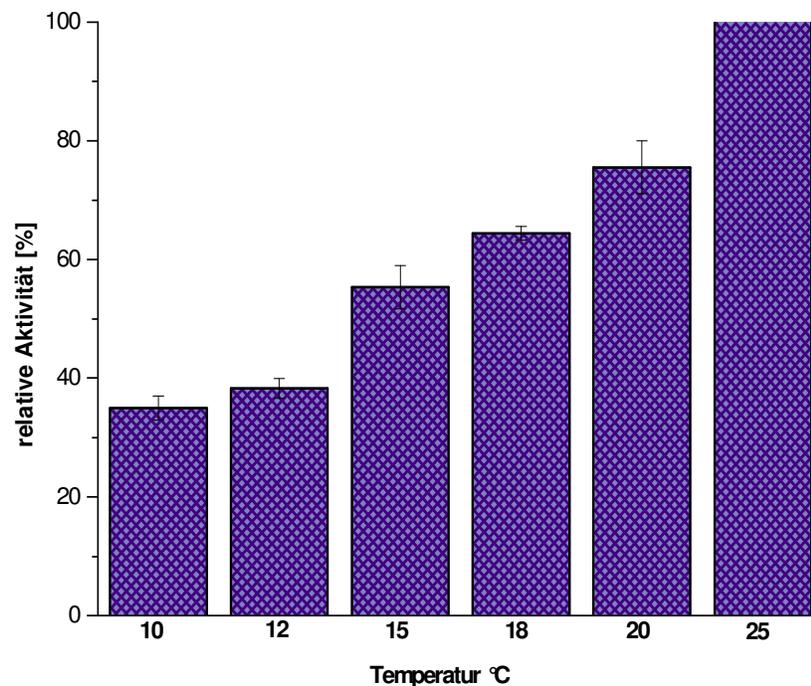


Abb. 58 Relative Aktivität der Glucanase bei weinrelevanten Temperaturen.

Es konnte festgestellt werden, dass die Glucanase offensichtlich bei allen weinrelevanten Temperaturen aktiv blieb (Abb. 58). Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit wurde deutlich, dass das Enzym bei Temperaturen unter 30 °C langsamer arbeitete. Beispielsweise zeigte das Enzym bei einer Temperatur von 10 °C noch 40% Aktivität (Abb. 58), obwohl bei 15 minütiger Inkubation der Eindruck erweckt wurde, dass die Glucanase bei dieser Temperatur kaum bis gar nicht mehr aktiv war (Abb. 56). Bei 18 °C wurden durch Verlängerung der Inkubationsdauer sogar fast 70% Enzymaktivität wiedergefunden (Abb. 58).

Im Vergleich hierzu zeigte das Enzym nach 15 min Inkubation nur knapp 20% Aktivität bei 18 °C. Trotz eines Temperaturoptimums von 50 °C (Abb. 56) konnte mit diesem Versuch verdeutlicht werden, dass das Enzym durchaus in der Weinbereitung Anwendung finden kann, da die Aktivität bei niedrigen Temperaturen erhalten bleibt.

3.11.2. Ethanolzusatz

Da das Enzym während der Weinbereitung auch höheren Ethanolkonzentrationen standhalten sollte, wurde die Glucanaseaktivität in Anwesenheit verschiedener Ethanolkonzentrationen getestet (Abb. 59).

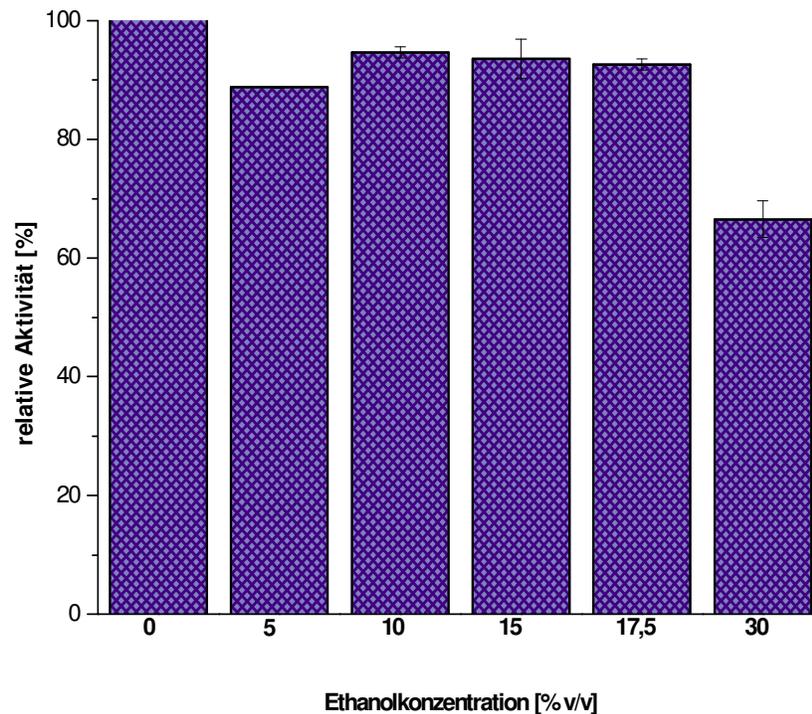


Abb. 59 Einfluß verschiedener Ethanolkonzentrationen auf die Glucanaseaktivität

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass Ethanolkonzentrationen bis 17,5% (v/v) die Enzymaktivität kaum beeinflussen (Abb. 59). Vergleicht man den Kontrollansatz ohne Ethanol (100% relative Aktivität) mit den Ansätzen bis 17,5% (v/v), so konnte lediglich ein Aktivitätsverlust von bis zu 10% für die Probe mit einem Zusatz von 5 vol% Ethanol festgestellt werden. Da allerdings bei höheren Ethanolzugaben (10-17,5% v/v) die Aktivität

wieder stieg, ist eher von einem Meßfehler auszugehen. Verminderte Glucanaseaktivität (ca. 70%) zeigte sich erst bei einer Konzentration von 30% (v/v) Ethanol. Da diese Ethanolkonzentration im Wein allerdings weniger eine Rolle spielt, konnte mit diesen Ergebnissen belegt werden, dass die Aktivität des Enzyms auch bei erhöhten Ethanolkonzentrationen nahe 100% liegt (Abb. 59).

3.11.3. Phenolzusatz

Weine enthalten eine Vielzahl an phenolischen Verbindungen, die auf die Weintrauben zurückzuführen sind (Kennedy et al., 2006). Der Gesamtphenolgehalt in Rotweinen liegt im Bereich von 10 $\mu\text{mol/l}$ und ist somit 10 mal höher als in Weißweinen (Eder & Wendelin, 2002). Aus diesem Grund wurde anhand eines Phenolgemischs (2.18.3) getestet, inwieweit die getesteten Phenolkonzentrationen die Aktivität des Enzyms beeinflussen.

Die Ergebnisse in Abbildung 60 verdeutlichen, dass das getestete Phenolgemisch in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatte.

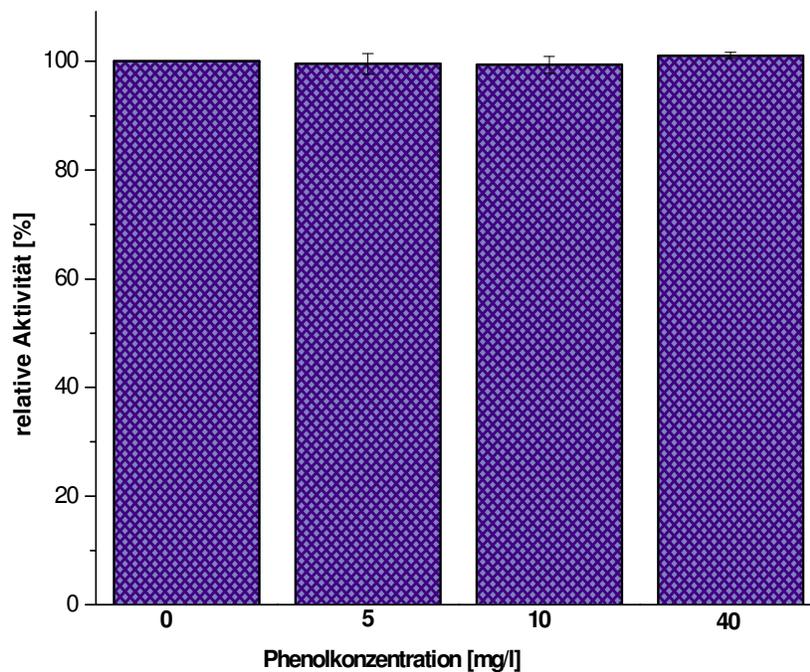


Abb. 60 Einfluß verschiedener Phenolkonzentrationen auf die Glucanaseaktivität.

3.11.4. Kaliumdisulfitzusatz

Dadurch, dass der Wein unter anderem nach der Gärung zur Unterdrückung von mikrobiellen Wachstum geschwefelt wird, sollte das Enzym auch eine gewisse Resistenz gegenüber einer Sulfitzugabe zeigen.

In Abbildung 61 wird der Einfluß verschiedener Sulfitkonzentrationen auf die Enzymaktivität dargestellt. Zwar wurde durch Zugabe von Sulfit (10 und 50 mg/l) ein Aktivitätsverlust von 20% herbeigeführt, allerdings wurde auch bei einer Sulfitkonzentration von 100 mg/l wieder ein Anstieg der Enzymaktivität auf ca. 90% beobachtet. Die Proben mit geringer Sulfitzugabe wurden möglicherweise fehlerhaft vorbereitet oder gemessen, denn ein Anstieg der Aktivität bei 100 mg/l Sulfit ist nicht zu erklären. Demnach kann zusammengefasst gesagt werden, dass Sulfit die Glucanaseaktivität nur leicht beeinflusst (Abb. 61).

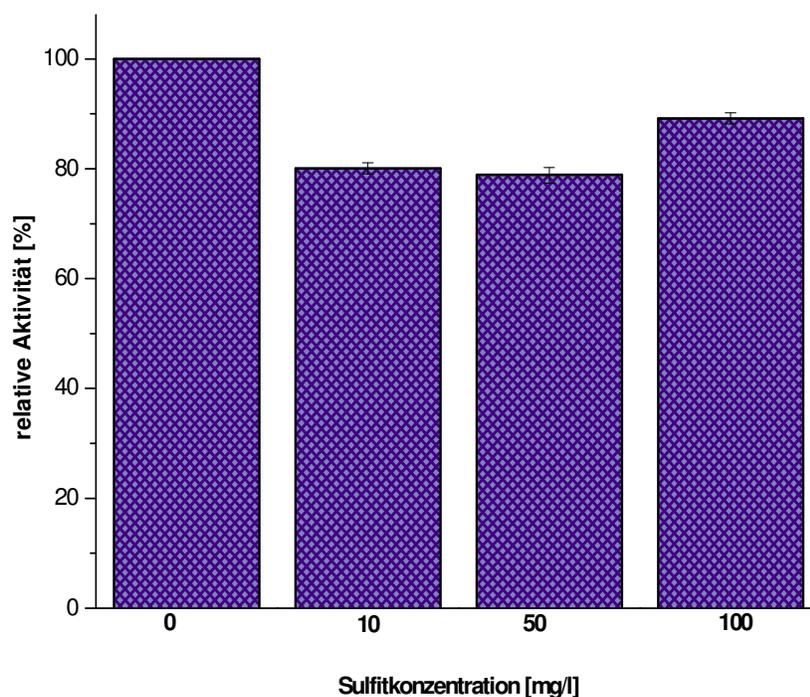


Abb. 61 Einfluß verschiedener Sulfitkonzentrationen auf die Glucanaseaktivität.

3.12. Exopolysaccharid (EPS) - Hydrolyse

3.12.1. Freigesetzte reduzierende Enden

Die Spaltung des EPS durch die Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 konnte durch die Freisetzung an reduzierenden Enden (DNS-Test) gezeigt werden (Abb. 62).

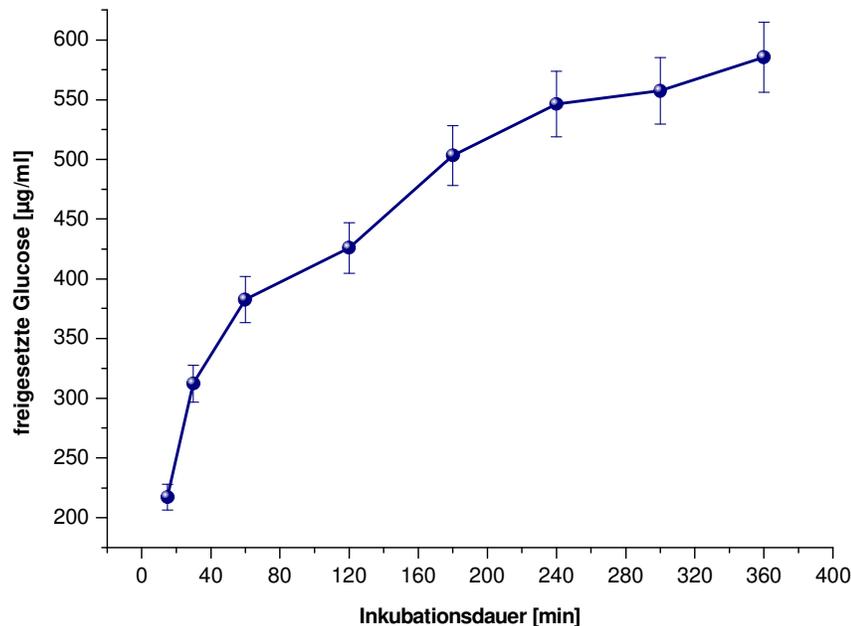


Abb. 62 Spaltung des β - 1,3-Glucans von *P. parvulus* B399 durch die Glucanase aus *Delftia sp.* MV01. Dargestellt sind die freigesetzten reduzierenden Gruppen im Polymer (detektiert als Glucose), die im DNS-Test über einen Zeitraum von 360 min bei der Hydrolyse des EPS entstehen.

Der Kurvenverlauf in Abbildung 62 verdeutlicht, dass das EPS durch die β -Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 gespalten wurde. Während der Inkubationsdauer von 360 min nahm die Konzentration der freigesetzten Reduktionsäquivalente (Glucose), die mittels DNS-Test (Miller, 1959) bestimmt wurden, kontinuierlich zu. Bereits nach 15 min konnten 217 $\mu\text{g/ml}$ Glucose detektiert werden. Am Ende der Inkubation wurden fast 600 $\mu\text{g/ml}$ Reduktionsäquivalente in Form von Glucose freigesetzt.

In Abbildung 63 wird die Hydrolyse des Polymers in Prozent angegeben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Glucanase unter Optimabedingungen (50 °C; pH 4,0) das EPS nach 360 minütiger Inkubation zu fast 47% hydrolysierte.

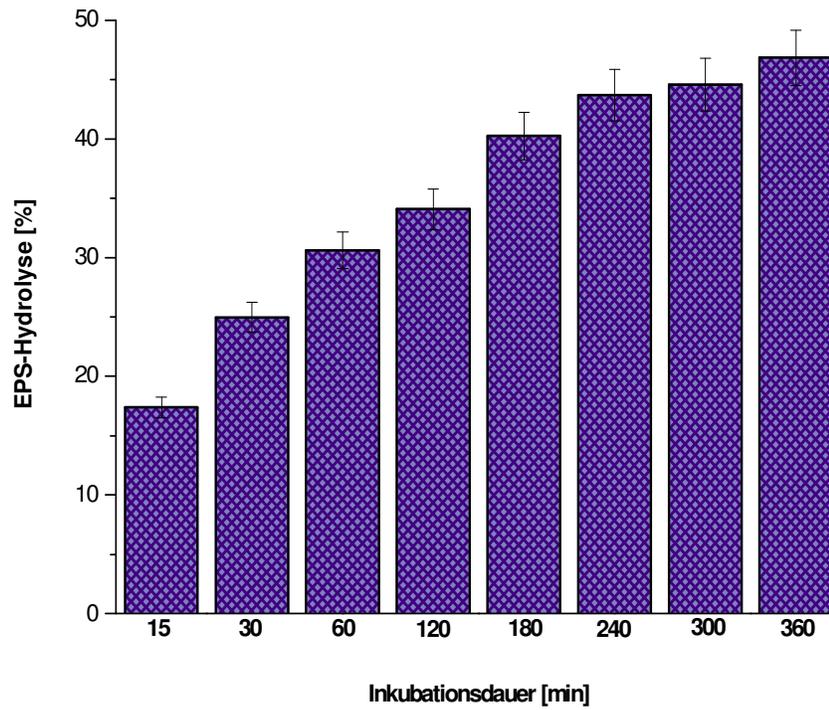


Abb. 63 Zeitlicher Verlauf der EPS-Spaltung durch die Glucanase im DNS-Test. Auf der x-Achse ist die Inkubationsdauer [min] aufgetragen. Auf der y-Achse wird die EPS-Hydrolyse [%] gezeigt. Als 100% wird eine vollständige Spaltung des Glucans zu Glucose festgelegt.

3.12.2. Abnahme der Viskosität

In Abbildung 64 werden die Ergebnisse der Viskositätsabnahme der EPS-Lösung durch die 24-stündige Inkubation mit der Glucanase bei 20 °C und 50 °C dargestellt. Als Kontrolle diente hitzeinaktiviertes Enzym. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl während der Inkubation mit dem Enzym bei 50 °C, als auch bei 20 °C die Viskosität der EPS-Lösung abnahm. Bei 50 °C wurde allerdings die Viskosität um 50% nach 24-stündiger Enzyminkubation gesenkt, wohingegen bei 20 °C in derselben Zeit die Viskosität um nur 30% herabgesetzt wurde. Dies ist allerdings nicht verwunderlich, denn das Enzymoptimum lag bei 50 °C (3.10.6). Trotzdem wurde deutlich, dass die Glucanase auch unter weinrelevanten Temperaturen von 20 °C in der Lage war, das Polymer zu hydrolysieren.

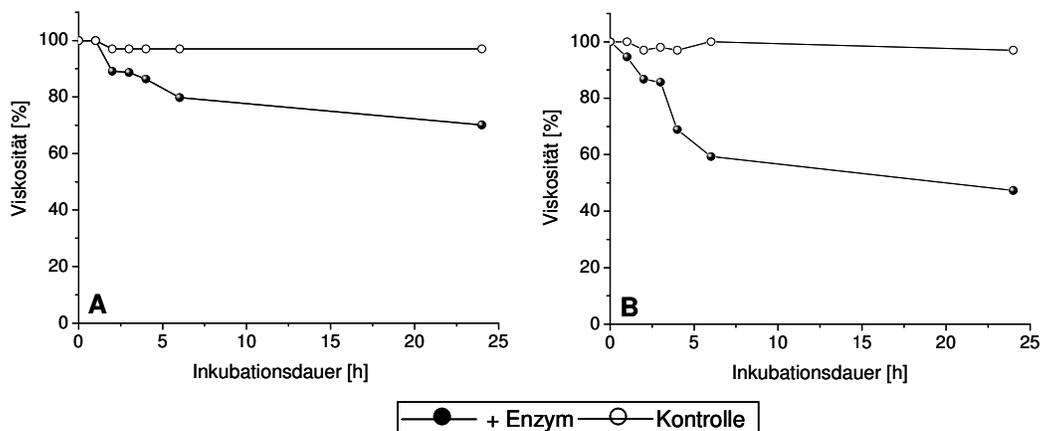


Abb. 64 Verlauf der Viskositätsabnahme während der Inkubation mit der Glucanase bei 20 °C (A) und 50 °C (B). Auf der x-Achse wird die Inkubationsdauer [h] angegeben. Auf der y-Achse ist die Viskositätsabnahme der EPS-Lösung bei Enzymzusatz (geschlossenes Symbol) und bei Zusatz mit hitzeinaktiviertem Enzym (offenes Symbol) dargestellt.

In einem weiteren Versuch wurde die Viskositätssenkung bei 20 °C direkt im Wein verfolgt. Hierzu wurde das β -Glucan statt in 50 mM Na⁺-Citratpuffer (pH 4,0) (Abb. 64) direkt in Wein (Weißburgunder, 2007, pH 3,77) gelöst. Aus Abbildung 75 ist zu erkennen, dass das Enzym auch im Wein aktiv war und nach 24-stündiger Inkubation eine Viskositätssenkung von 27% bewirkte.

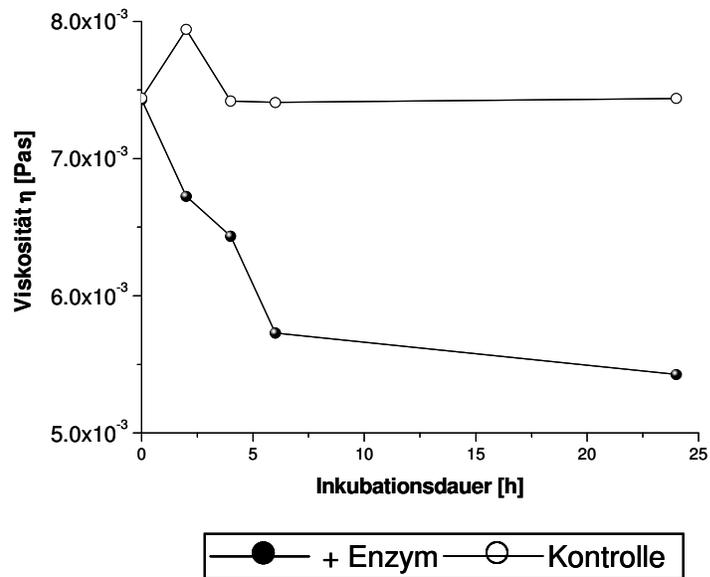


Abb. 65 Verlauf der Viskositätsabnahme während der Inkubation mit der Glucanase bei 20 °C im Wein. Auf der x-Achse wird die Inkubationsdauer [h] angegeben. Auf der y-Achse ist die Viskosität η [Pas] der EPS-Lösung mit Enzymzusatz (geschlossenes Symbol) und mit hitzeinaktiviertem Enzymzusatz (offenes Symbol) dargestellt.

3.12.3. Änderung der Molekulargewichtsverteilung

Veränderungen der Molmassenverteilungen im EPS durch die Aktivität der Glucanase konnten anhand von GPC-Messungen gezeigt werden (Abb. 66). In Abbildung 66A wird das Elugramm des EPS ohne Enzymbehandlung mit den Elugrammen bei einer Enzymbehandlung bis zu 48 h verglichen. In Abbildung 66B sind die entsprechenden Molmassenverteilungen (ausgewertet an Dextranstandards) des EPS aufgeführt.

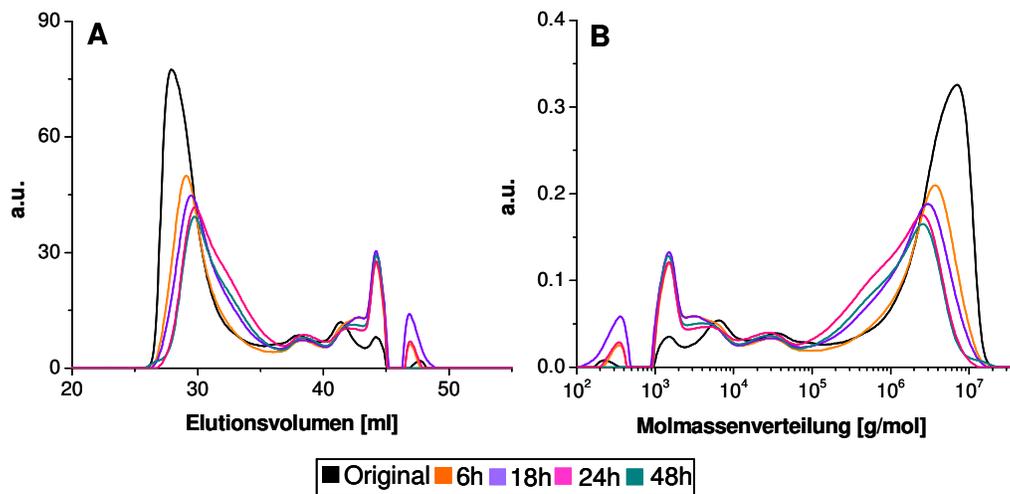


Abb. 66 Verfolgung der hydrolytischen Spaltung des Polymers mittels GPC-Auftrennung. Vergleich des Elugramms der Originalprobe (ohne Enzymbehandlung) mit den Elugrammen des EPS nach 6, 18, 24 und 48 stündiger Enzymbehandlung (A). Molmassenverteilungen im EPS in der Originalprobe und nach Enzymbehandlung (B), resultierend aus den Elutionsvolumina in A.

Auf der x-Achse werden jeweils das Elutionsvolumen [ml] und die Molmassenverteilungen [g/mol] angegeben. Auf der y-Achse wird jeweils das Detektorsignal in willkürlichen Einheiten a.u.(engl. arbitrary units) aufgetragen.

Aus Abbildung 66 wird ersichtlich, dass sich die Molmassen im EPS durch Glucanasebehandlung veränderten. Bereits in den ersten 6 h der Hydrolyse kam es zu deutlichen Änderungen im zahlen- und gewichtsmittleren Molekulargewicht der hochmolekularen Fraktion (Originalprobe) (Tab. 22). Darüberhinaus stieg die Polydispersität des hochmolekularen Peaks von 2,5 auf 3,4 nach 18 stündiger Enzymbehandlung an. Daraus konnte gefolgert werden, dass das Polymer in seiner Kettenlänge uneinheitlicher wurde. Wird das zahlen- bzw. gewichtsmittlere Molekulargewicht im EPS ohne Enzymbehandlung und nach 48 stündiger Behandlung mit Glucanase verglichen, so konnte jeweils eine 30- bzw. 39,1%-ige Abnahme festgestellt werden.

Tab. 22 Änderungen des zahlenmittleren (M_n) und gewichtsmittleren (M_w) Molekulargewichts [g/mol] und die berechnete Polydispersität (D) für den hochmolekularen Peak während des Glucanabbaus.

Probe	zahlenmittleres MG (M_n)	gewichtsmittleres MG (M_w)	Polydispersität (D)
EPS (Originalprobe)	$1,82 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^6$	2,5
6h Abbau	$1,1 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	3,1
18h Abbau	$7,5 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^6$	3,4
24h Abbau	$6,3 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^6$	3,3
48h Abbau	$5,5 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^6$	3,3

3.12.4. Strukturelle Änderungen

In Abbildung 67 sind die gemessenen Gesamtabsorptionsspektren ($800-4000 \text{ cm}^{-1}$) für den zeitlichen Verlauf der Hydrolyse des Exopolysaccharids durch die Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 dargestellt. Die Spektren zeigten deutliche Änderungen in den Absorptionen bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. Genauere Details bezüglich eines enzymatischen Abbaus des Exopolysaccharids, können den vergrößerten Teilspektren ($800-1500 \text{ cm}^{-1}$) in Abbildung 68 entnommen werden. An diesen Spektren wird deutlich, dass sich während des Abbaus des EPS ein Teil der Absorptionsbanden veränderten. Bei einigen Banden nahm die Absorption während der Hydrolyse zu, bei anderen konnte eine Abnahme der Absorption festgestellt werden. Alle hervorgehobenen Absorptionsbanden, die sich während des Polymerabbaus veränderten und als Bestandteile dem EPS zugeordnet werden konnten, sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Anhand der Abnahme der Absorptionsbanden 1374 und 1102, die auf β -1,3-Glucane hinweisen, (Tab. 23) wurde sehr deutlich, dass das Enzym offensichtlich die β -1,3 verknüpfte Hauptkette des EPS spalten konnte. In Anbetracht des zeitlichen Verlaufs der Hydrolyse konnte für die Absorptionsbande bei 1102 gezeigt werden, dass unter den gewählten Bedingungen die enzymatische Spaltung des Polymers innerhalb der ersten 24 h stattfand. Hierbei konnte eine starke Abnahme der Absorption zwischen 8 und 24 h festgestellt werden. Des Weiteren konnte eine Spaltung der β -glykosidischen Bindung im Polymer auch daran gezeigt werden, dass die Absorptionsbande bei 879 cm^{-1} deutlich abnahm (Tab. 23). Die Spektren zeigten darüber hinaus auch, dass höchstwahrscheinlich nur das β -1,3-Glucan gespalten wurde, da die β -1,2 Seitenkette, die bei einer Wellenzahl von 1230 cm^{-1} vermutet wurde, keine nennenswerten Absorptionsänderungen aufwies.

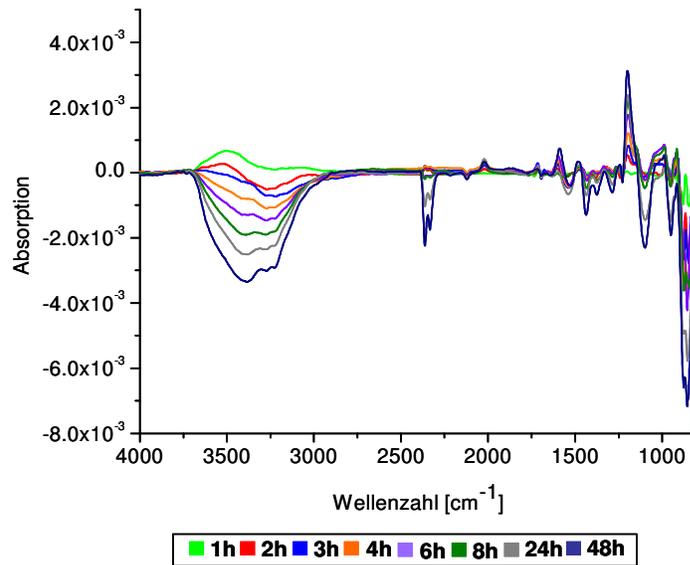


Abb. 67 Gesamtabsorptions-Spektren ($800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) nach der Hydrolyse des Exopolysaccharids mit der Glucanase aus *Delftia sp.* MV01. Proben wurden nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten dem Reaktionsansatz entnommen und vermessen. Die Inkubationsdauer [h] des Enzyms kann der Farblegende entnommen werden. Auf der x-Achse sind die Wellenzahlen [cm^{-1}] aufgetragen. Auf der y-Achse befinden sich die gemessenen Absorptionen.

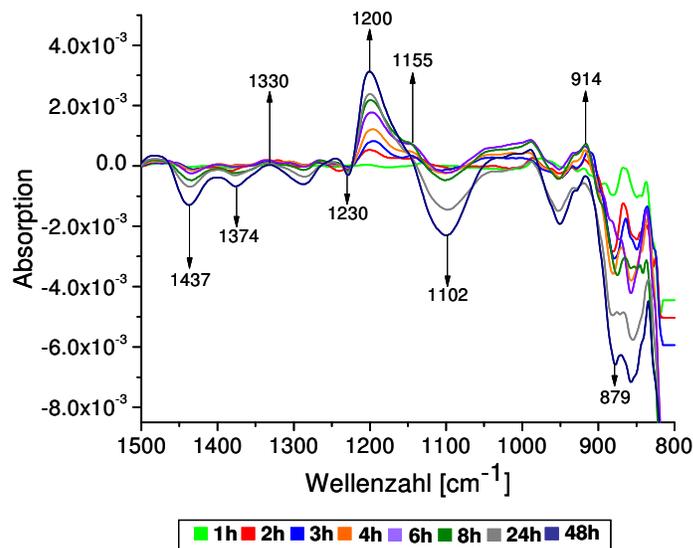


Abb. 68 Vergrößerte Absorptions-Spektren von $800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ nach der Hydrolyse des Exopolysaccharids mit der Glucanase aus *Delftia sp.* MV01. Proben wurden nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten dem Reaktionsansatz entnommen und vermessen. Die Inkubationsdauer [h] des Enzyms kann der Farblegende entnommen werden. Auf der x-Achse sind die Wellenzahlen [cm^{-1}] aufgetragen. Auf der y-Achse befinden sich die gemessenen Absorptionen.

Tab. 23 Veränderte Absorptionsbanden der ATR-FTIR Spektren nach der Hydrolyse des EPS aus *P. parvulus* B399 durch die Glucanase.

Absorptionsbande (cm ⁻¹)	Hauptzuordnungen
~ 1437	CH ₂ -Deformationsschwingung
~ 1374	β-1,3 Glucane
~ 1330	OH-Deformationsschwingung
~ 1230	Vermutlich β-1,2 Glucane
~ 1200	C-O-C in Kohlenhydraten
~ 1155	C-O; C-OH in Kohlenhydraten mit variabler Verteilung
~ 1102	β-1,3 Glucane
~ 914	asymmetrischer Pyranosering
~ 879	β-glykosidische Bindungsschwingung

3.13. Phänotypische Eigenschaften von *Delftia sp.* MV01

3.13.1. Zellmorphologie

Die REM-Aufnahme von *Delftia sp.* MV01 zeigte, dass der Organismus Stäbchen bildete, die zum Teil auch in leicht gekrümmter Form vorlagen. Die Zellen traten entweder einzeln, in Paaren oder unregelmäßig auch in längeren Ketten auf. Die Stäbchen hatten eine ungefähre Größe von $2,35 \pm 0,9 \mu\text{m}$ Länge und einen Durchmesser von $0,73 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (Abb. 69).

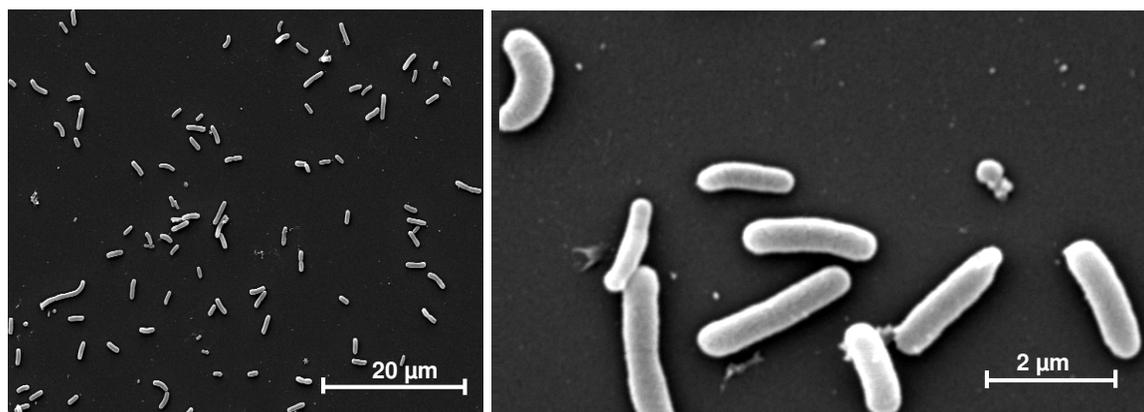


Abb. 69 REM-Aufnahme von *Delftia sp.* MV01. Übersichtsdarstellung der Zellmorphologie (links) und Detailansicht (rechts).

3.13.2. Weitere phänotypische Eigenschaften von *Delftia sp.* MV01

Der gram-negative Organismus war im Lichtmikroskop beweglich, allerdings konnte im REM keine Begeißelung nachgewiesen werden. Der neue *Delftia*-Stamm reagierte darüber hinaus positiv auf den Oxidase-, Katalase- und Urease-Test. Das Isolat zeigte kein anaerobes Wachstum bzw. keine fermentative Antwort im O/F-Test, wenn Glucose als Substrat verwendet wurde. Neben der Citratverwertung konnte auch die Reduktion von Nitrat zu Nitrit beobachtet werden.

3.13.3. Temperatur-Optimum

Delftia sp. MV01 wuchs zwischen 20 °C und 30 °C, wohingegen bei 10 °C und 43 °C kein Wachstum mehr zu beobachten war (Abb. 70). Das Temperaturoptimum von *Delftia sp.* MV01 wurde bei 30 °C vermutet, allerdings wurde auf eine Berechnung der Generationszeit verzichtet.

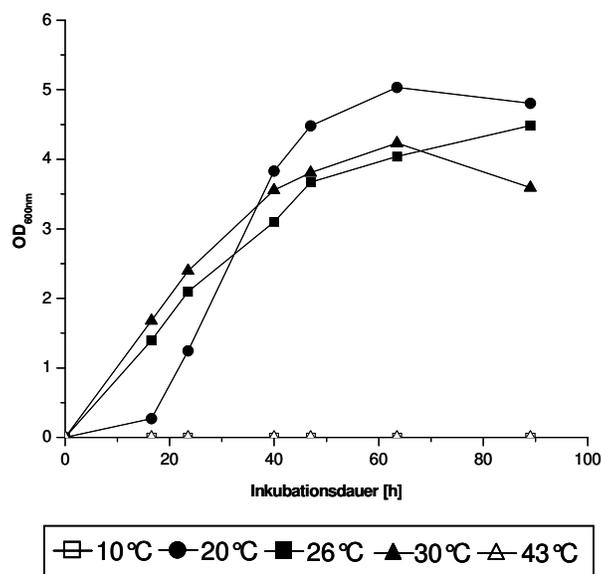


Abb. 70 Wachstum von *Delftia sp.* MV01 bei verschiedenen Temperaturen in TSB-Medium. Der Vollständigkeit wurden auch die Messpunkte bei 10 und 43 °C (offene Symbole nahe der x-Achse) aufgetragen.

3.13.4. pH- Optimum

In Abbildung 71 wird das Wachstum von *Delftia sp.* MV01 in TSB-Medium mit unterschiedlichen pH-Werten dargestellt. Der Stamm MV01 konnte zwischen pH 5,0-8,0 wachsen. Bei einem pH-Wert von 4,0 fand kein Wachstum mehr statt. Es wird vermutet, dass das pH-Optimum des Stammes MV01 bei 8,0 lag. Allerdings wurde auf eine Berechnung der Generationszeit verzichtet.

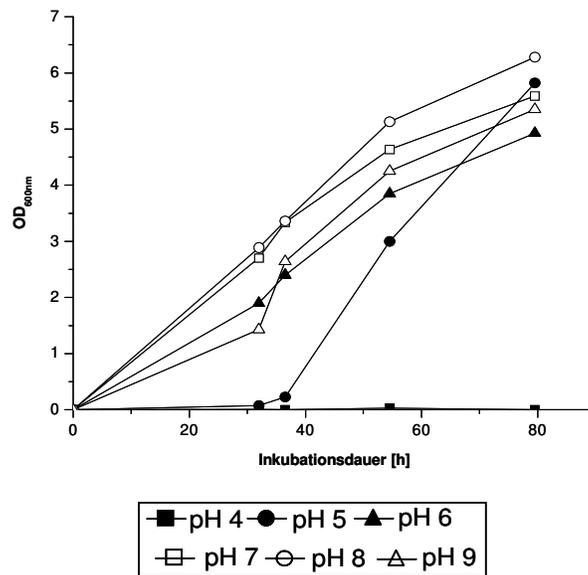


Abb. 71 Wachstum von *Delftia sp.* MV01 bei verschiedenen pH-Werten in TSB-Medium.

3.13.5. Substratverwertung

Delftia sp. MV01 unterschied sich deutlich von den anderen beiden *Delftia*- Arten in der Verwertung einer Vielzahl an Mono- und Disacchariden (Tab. 24). Weiterhin konnte *Delftia sp.* MV01 Malonat nicht verwerten, mit welchem die anderen Arten wachsen konnten. Zum Schluß soll als weiterer Unterschied die Polymerverwertung angeführt werden. Eine Reihe von Polymeren, darunter Stärke, Laminarin, Xylan, Mannan und Chitin konnten nur von *Delftia sp.* MV01 verwertet werden.

Tab. 24 Substratverwertung von *Delftia sp.* MV01 im Vergleich zu *Delftia tsuruhatensis* und *Delftia lacustris*.

Substrate	<i>Delftia sp.</i> MV01 ^a	<i>Delftia tsuruhatensis</i> ^a	<i>Delftia lacustris</i> ^a
Mono-/Disaccharide			
D-(-)-Arabinose	+	+	+
D-Fructose	+	+	+
D-Galactose	+	-	-
D-Glucose	+	-	-
D-Lactose	+	-	-
D-Mannose	+	+	+
Maltose	+	-	-
Saccharose	+	-	-
D-Xylose	+	-	-
Zuckeralkohole			
Glycerol	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+
Organische Säuren			
Fumarat	+	+	+
K/Na-Tatrat	-	-	-
Malat	+	+	+
Maleat	+	+	+
Malonat	-	+	+
Na-Acetat	+	+	+
Aminosäuren			
L-Aspartat	+	+	+
D-Glutamat	+	+	+
L-Prolin	+	+	+
L-Serin	-	-	-
L-Tryptophan	+	+	+
L-Valin	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 24

Polymere			
Casein	+	+	+
Chitin	+	-	-
Dextran	+	+	+
Glykogen	+	+	+
Laminarin	+	-	-
Mannan	+	-	-
Pullulan	+	+	+
Pustulan	+	+	+
Stärke	+	-	-
Xylan	+	-	-

^a + Wachstum, - kein Wachstum

3.13.6. Polymerspaltung

Delftia sp. MV01 hydrolysierte die Polymere Casein, Chitin, Laminarin und Stärke im Plattentest. Die anderen beiden *Delftia*-Arten konnten nur Casein, allerdings schwächer als *Delftia sp.* MV01, spalten (Abb. 72).

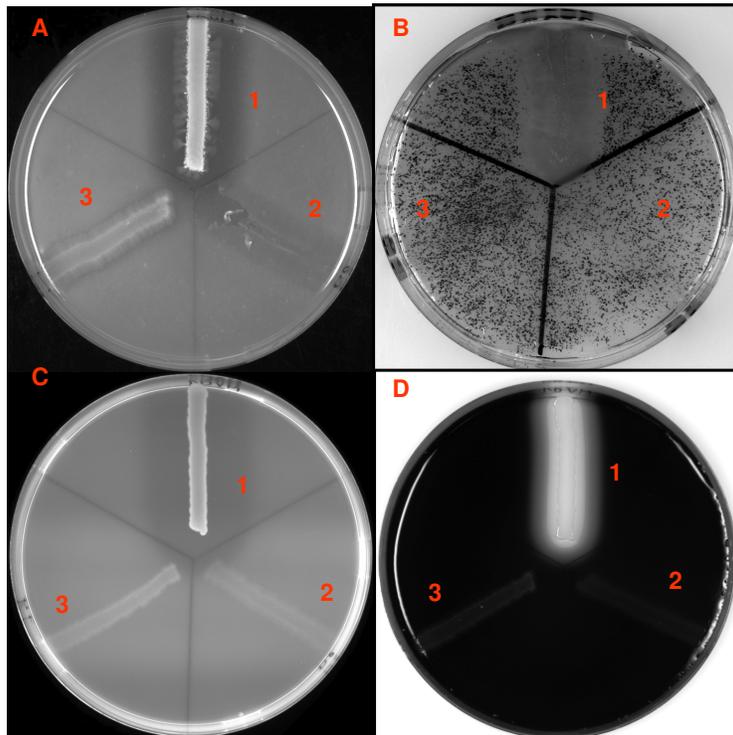


Abb. 72 Hydrolyse der Polymere Casein (A), Azure-Chitin (B), Laminarin (C) und Stärke (D) durch die 3 *Delftia*-Arten.

1: *Delftia sp.* MV01; 2: *Delftia lacustris*; 3: *Delftia tsuruhatensis*.

3.13.7. Glucoseverwertung

In Abbildung 73 wird das Wachstum der 3 *Delftia*-Arten mit Glucose als Kohlenstoffquelle bei 30 °C quantitativ verglichen. Es zeigte sich, dass nur *Delftia sp.* MV01 mit Glucose wachsen konnte, wohingegen die anderen beiden *Delftia*-Arten kein Wachstum und somit auch keinen nennenswerten Glucoseverbrauch aufwiesen. Bei *Delftia sp.* MV01 konnten von der anfänglichen Glucosekonzentration von 5 g/l nach 23 h bereits nur noch knapp 1,2 g/l mittels HPLC detektiert werden. Nach 40 h konnte keine Restglucose im Medium mehr gefunden werden.

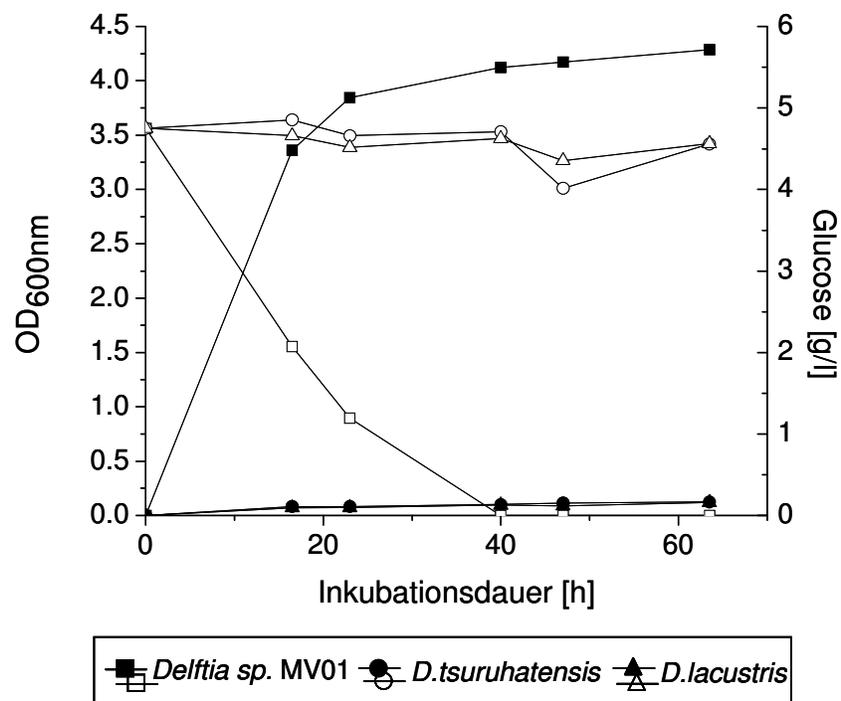


Abb. 73 Wachstum der 3 *Delftia*-Stämme mit Glucose als Substrat bei 30 °C. Auf der x-Achse ist die Inkubationszeit [h] angegeben. Die linke y-Achse gibt das Wachstum (geschlossene Symbole) der Stämme [OD_{600nm}] an. Die rechte y-Achse gibt den Glucoseverbrauch (offene Symbole) [g/l] an.

3.14. Genotypische Eigenschaften von *Delftia* sp. MV01

3.14.1. 16S rDNA von *Delftia* sp. MV01

Dadurch, dass in beide Richtungen sequenziert wurde, konnte fast die gesamte 16S rRNA Gensequenz von *Delftia* sp. MV01 (1440 bp) erhalten werden. Die komplette Sequenz befindet sich im Anhang 8.1.

3.14.2. Phylogenetische Stellung

Die phylogenetische Analyse der 16S rRNA Gensequenzen (Abb.74) zeigte ganz deutlich, dass der Stamm MV01 zur Gattung *Delftia* gehörte und *Delftia tsuruhatensis* T7^T mit einer Sequenzhomologie von 99% der nächste Verwandte ist. Weiterhin konnten alle *Delftia* - Sequenzen in zwei phylogenetische Cluster unterteilt werden, was durch einen Bootstrap-Wert von 55% unterstützt wurde. Demnach bildete *Delftia acidovorans* den einen Cluster und *Delftia tsuruhatensis*, *Delftia lacustris* und Stamm MV01 den anderen. Die 16S rRNA Gensequenzen aller Stämme sowie das Sequenzalignment sind in Anhang 8.2 aufgeführt.

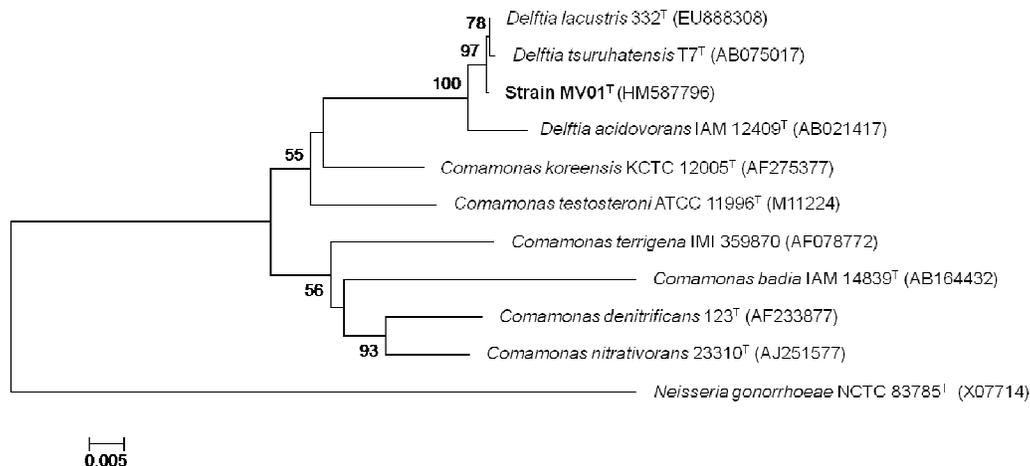


Abb. 74 Der phylogenetische Baum, basierend auf den 16S rRNA Gensequenzen, zeigt die Verwandtschaft des Stammes MV01 zu den anderen Mitgliedern der Gattungen *Delftia* und *Comamonas*. *Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375^T wurde als Outgroup verwendet. Der Baum wurde mithilfe der Neighbour-joining Methode konstruiert. Für jeden Abzweigungspunkt werden Bootstrap Werte über 50 gezeigt.

3.14.3. Taxonomie

Die Ergebnisse der DNA-DNA-Hybridisierung sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tab. 25% DNA-DNA Homologie.

	<i>Delftia sp. MV01</i>
<i>Delftia tsuruhatensis</i> ^a	98.5 (98.8)
<i>Delftia lacustris</i> ^a	86.1 (89.6)
<i>Delftia acidovorans</i> ^a	67.0 (73.5)

^a Werte in Klammern geben das Ergebnis der Wiederholungsmessung an.

3.14.4. Fettsäuren

Die charakteristischen Fettsäuren der Gattung *Delftia* C_{8:0} 3-OH und C_{10:0} 3-OH konnten jeweils zu 0,17% bzw. 2,12% bei Stamm MV01 gefunden werden. Die Hauptfettsäuren von *Delftia sp. MV01* waren C_{16:1 ω7c/ iso} - C_{15:0} 2-OH (39,78%), C_{16:0} (34,81%) und C_{18:1 ω7c} (17,66%). C_{17:0} cyclo konnte nur in geringen Mengen (2,27%) nachgewiesen werden.

Das GC-Chromatogramm, sowie die Zuordnung weiterer Fettsäuren sind im Anhang 8.3 aufgeführt.

3.14.5. GC-Verhältnis

Der GC-Gehalt der DNA von *Delftia sp. MV01* betrug 67,1 mol%.

4. Diskussion

4.1. Beeinflussung der Exopolysaccharidbildung

Die Bildung von Exopolysacchariden ist bei Pediokokken stammabhängig. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Pediokokken auf festem Nährboden den „schleimenden“ Phänotyp aufwiesen, allerdings in Flüssigmedium keine Viskositätssteigerung auftrat, welche ein erstes Indiz für Exopolysaccharidbildung darstellt. Weiterhin wurde bei dem Screening auch deutlich, dass möglicherweise niedrige Temperaturen Einfluss auf die Exopolysaccharidbildung haben. Bei vier von den 12 getesteten Stämmen trat der „schleimender“ Phänotyp erst auf, nachdem die Agarplatten bei 10 °C gelagert wurden. Bereits mehrere Studien haben gezeigt, dass mesophile Milchsäurebakterien (MSB) mehr Exopolysaccharide (EPS) synthetisieren, wenn sie bei Temperaturen wachsen, die unterhalb ihrer optimalen Wachstumstemperatur lagen (Cerning et al., 1992; van den Berg et al., 1995; Gamar et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings der Temperatureinfluss nur auf festem Nährboden festgestellt werden. Die Pediokokken-Stämme, die in Flüssigmedium nach 6 tägigem Wachstum bei 20 °C keine Polymerbildung zeigten, bildeten auch nach einwöchiger Lagerung bei 10 °C kein EPS. In weiteren Studien könnte allerdings überprüft werden, ob Pediokokken, die auf Agarplatten durch eine Lagerung bei niedrigen Temperaturen (10 °C) eine gesteigerte Exopolysaccharidproduktion aufwiesen, später beim Überführen in Flüssigmedium möglicherweise den „schleimenden“ Phänotyp beibehalten. Darüber hinaus könnte festgestellt werden, inwieweit Temperaturen unter 10°C die Exopolysaccharidbildung bei Pediokokken beeinflussen. Es ist denkbar, dass beispielsweise niedrige Temperaturen (< 10 °C) als Stressfaktor gelten, was als Schutzfunktion eine erhöhte Bildung an EPS mit sich bringen würde. Neben der Temperatur beeinflusst auch das Nährmedium die EPS-Bildung. Vergleicht man die Viskositäten (Indiz für EPS-Bildung) der Pediokokken-Stämme in Vollmedium (MRS-Medium) mit denen in Minimalmedium (Medium M), so wurde besonders für Stamm B399 deutlich, dass höchstwahrscheinlich mehr EPS in Vollmedium, als in Minimalmedien gebildet wird. Generell kann gesagt werden, dass eine Viskositätssteigerung als Indiz für die Bildung von Polysacchariden gilt, aber die Viskosität des Mediums wird auch von metabolischen Stoffen wie Lactat und Proteinen beeinflusst (Cerning, 1990). Da Vollmedien komplexe Bestandteile, wie Fleisch-, Hefeextrakt und Peptone enthalten, die nicht nur die Viskosität des Mediums beeinflussen, sondern auch die EPS-Quantifizierung und den Reinheitsgrad der Polymere stören, werden häufig synthetische Medien zur Polymerbildung verwendet (Dueñas et al.,

2003). Vergleicht man die Mengen an gebildeten EPS der einzelnen Pediokokken-Stämme untereinander, so gab es einige, wenn auch geringfügige Unterschiede. Bei Milchsäurebakterien hängt die Menge an gebildeten EPS zum einem von der Zusammensetzung des Mediums, aber auch von den Kulturbedingungen wie Temperatur, pH und Inkubationsdauer ab (De Vuyst & Degeest, 1999). Bei einem Wachstum der Bakterien unter nicht optimalen Kulturbedingungen bildeten Milchsäurebakterien zwischen 0,045-0,350 g/l Exopolysaccharid (De Vuyst & Degeest, 1999). Unter optimalen Bedingungen konnten abhängig vom jeweiligen Stamm zwischen 0,15-0,6 g/l synthetisiert werden (Cerning, 1990; Cerning, 1995). Ein Vergleich der EPS-Mengen von Pediokokken-Stämmen aus der Literatur mit denen aus der vorliegenden Arbeit zeigte, dass Pediokokken in synthetischen Medien zwischen 100-243 mg/l EPS synthetisieren. *P. parvulus* B399 bildete nach 6 tägigem Wachstum in Medium M ca. 160 mg/l EPS, wohingegen *P. parvulus* 2.6 nach 7 Tagen Wachstum in einem anderen synthetischen Medium ca. 140 mg/l EPS bildete (Velasco et al., 2007). *P. damnosus* 2.6. bildete in SMD-Medium nach 19 Tagen ca. 120 mg/l EPS (Dueñas et al., 2003). In MST-Medium bildeten *P. parvulus*- Stämme zwischen 2- 243 mg/l Polymer (Garai-Ibabe et al., 2010). Diese aktuelle Studie zeigte, dass die EPS-Bildung in verschiedenen Medien sehr stammabhängig ist. *P. parvulus* B399 zeigte in bereits beschriebenen Medien (Llaubères et al., 1990; Dueñas-Chasco et al., 1997; Ibarburu et al., 2007) entweder kein Wachstum oder keine EPS-Bildung. Allerdings konnte in dem selbst zusammengestellten Medium M die Exopolysaccharidsynthese von vier *P. parvulus*-Stämmen gezeigt werden. In dem Medium M bildeten die Pediokokken-Stämme vergleichbare Mengen an EPS, wie sie aus der Literatur für Pediokokken bereits beschrieben wurden. Der Vorteil dieses selbst zusammengestellten Mediums liegt allerdings darin, dass keine separat und zeitaufwendig herzustellenden Zusätze wie z.B. Vitamin,- und Spurenelementlösungen dem Medium zugefügt werden müssen. Andere bereits beschriebenen β -Glucansynthese-Medien kommen ohne diese Zusätze nicht aus (Velasco et al., 2007; Garai-Ibabe et al., 2010). Möglicherweise könnte das „Grundmedium M“ durch einige Modifikationen noch verbessert werden, um die Exopolysaccharidbildung der getesteten Stämme noch zu steigern.

4.2. Vergleich der Exopolysaccharidbildung bei *P. parvulus* B399 mit anderen Milchsäurebakterien

Die Exopolysaccharidbildung bei *P. parvulus* B399 war in dem getesteten Medium M auf einen bestimmten Temperaturbereich beschränkt. Bei einer Temperatur von 15 °C bzw. 25 °C wurden deutlich geringere Mengen an EPS gebildet als bei 18 °C bzw. 20 °C. Bei der Gattung *Lactococcus* und *Lactobacillus* konnte bereits gezeigt werden, dass 50-60% mehr EPS gebildet wurde, wenn die Stämme statt bei 30 °C bei 25 °C wuchsen (Cerning et al., 1992). Dueñas et al. (2003) stellten ebenfalls fest, dass die Temperatur Einfluß auf die EPS-Bildung von *P. damnosus* 2.6 hatte. Hier wurde deutlich, dass bei einer Temperatur von 12 °C die EPS-Synthese des Stammes vermindert wurde und erst nach 29 Tagen etwa 43 mg/l nachgewiesen werden konnten. Eine Betrachtung der EPS-Bildung von *P. damnosus* 2.6 bei 25 °C zeigte, dass nach etwa 19 Tagen ca. 120 mg/l Polymer gebildet wurden, dabei wurde nach 120 h eine OD_{600 nm} von 1,8 erreicht. Weiterhin wurde festgestellt, dass EPS überwiegend während der exponentiellen Wachstumsphase gebildet wurde und sich in der stationären Phase fortsetzte. Ähnliche Beobachtungen wurden für andere EPS-bildende Stämme gemacht (Kojic et al., 1992; Pham et al., 2000; Torino et al., 2000). Bei unseren Versuchen (18 °C und 20 °C) konnte festgestellt werden, dass die EPS-Bildung während der exponentielle Phase stetig zunahm, allerdings konträr zur Literatur in der frühen stationären Phase ihr Maximum erreichte. Anders als der Stamm *P. damnosus* 2.6 konnte *P. parvulus* B399 bei 25 °C kaum EPS bilden. Weiterhin konnte bei einigen Milchsäurebakterien beobachtet werden, dass die EPS-Synthese im engen Zusammenhang mit dem Zellwachstum stand (Grobben et al., 1995; Gamar et al., 1997; Degeest et al., 2001). Dies konnte für *P. parvulus* B399 und *P. parvulus* 2.6 (Velasco et al., 2006) nicht bestätigt werden. Darüber hinaus nahm die Menge an EPS bei verlängerter Kultivierung ab. Dieses Phänomen konnte auch bei anderen Stämmen beobachtet werden (Cerning et al., 1992; De Vuyst et al., 1998; Pham et al., 2000). Es war auffällig, dass der Stamm B399 in 200 ml Kulturen bis zu 5 g/l Polymer bildete. Diese Menge wurde allerdings mittels eines photometrischen Tests (DuBois et al., 1956) zur Quantifizierung von Kohlenhydraten bestimmt. Es könnte durchaus möglich gewesen sein, dass trotz Dialyse noch restliche Glucose aus dem Medium mitquantifiziert wurde, was die hohen Neutralzuckerwerte erklären würde. Diese Vermutung wurde darüber hinaus auch dadurch bestärkt, dass deutlich geringere Mengen an EPS nach kompletter Fällung und Aufarbeitung des Polymers gefunden werden konnten. Aus einem 40 l Ansatz konnten nach Aufarbeitung nur knapp 1 g EPS gewonnen werden. Aus 2 l Kulturen konnte im Vergleich hierzu ca. 250 mg EPS quantifiziert

werden. Möglicherweise kam es bei der Aufarbeitung großer Volumina zu signifikanten Polymerverlusten oder die Bildung von EPS wurde in Kulturvolumina > 2 l deutlich herabgesetzt. Aus der Literatur wurden zur Produktion von β -Glucanen durch Pediokokken hauptsächlich Kulturvolumina zwischen 200–700 ml verwendet. In einer Veröffentlichung wurde *P. parvulus* 2.6 zwar in einem 10 l Fermenter kultiviert, allerdings wurde nicht erwähnt, wieviel EPS nach der Kultivierung gewonnen werden konnte (Velasco et al., 2009). Es wäre demnach zu überprüfen, ob das Kulturvolumen Einfluß auf die Glucanbildung bei Pediokokken hat.

Velasco et al. (2006) konnten bei *P. parvulus* 2.6 durch Optimierung des Medium die EPS-Menge von 0,12 g/l auf 4,1 g/l steigern. Allerdings wurde die EPS-Menge nach dem Fällen des Polymers über Wiegen bestimmt. Bei einer Fällung des Polymers aus dem Kulturüberstand mit organischen Lösungsmittel werden allerdings neben dem EPS auch weitere Substanzen wie Proteine, DNA-Moleküle usw. mitausgefällt. Das bedeutet, dass vor dem Wiegen des Präzipitats die tatsächliche Menge an reinem EPS bestimmt werden müsste, um sicherzustellen, dass das ausgefällte Endprodukt nur aus EPS besteht. Dies wurde allerdings bei dieser Versuchsreihe nicht berücksichtigt. Deshalb sollte die Optimierung der EPS-Ausbeute von *P. parvulus* 2.6 auf 4,1 g/l kritisch gesehen werden, nicht zuletzt, da unsere Studie gezeigt hat, dass sich EPS-Chargen in ihrem Neutralzucker Gehalt stark unterscheiden können.

Eine Reihe von Autoren erwähnen, dass auch die Glucosekonzentration des Medium Einfluss auf die gebildete EPS-Menge hatte (Dueñas et al., 2003). Eine Glucosekonzentration von 2 g/l führte im Vergleich zu höheren Glucosemengen (10 und 30 g/l) beispielsweise zu einer verminderten EPS-Bildung bei *P. damnosus* 2.6. Höhere Glucosekonzentrationen wirkten sich sowohl bei 12 °C als auch bei 25 °C positiv auf die EPS-Bildung aus. Eine Glucosekonzentration von 30 g/l war besonders bei 12 °C notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar auf eine Variation der Glucosemenge verzichtet, allerdings wäre es denkbar, dass durch eine Erhöhung der Zuckerkonzentration die EPS-Menge von *P. parvulus* B399 möglicherweise gesteigert werden könnte. Bei einigen EPS-produzierenden Bakterien, wie *Xanthomonas sp.*, *Pseudomonas sp.* und *Rhizobium sp.* weiß man, dass eine Stickstofflimitierung zu einer gesteigerten EPS-Bildung führt (Sutherland, 1990). Dies war allerdings bei einigen getesteten Milchsäurebakterien (Kimmel et al., 1998; Degeest & De Vuyst, 1999), darunter auch *P. damnosus* 2.6 (Dueñas et al., 2003) nicht der Fall. In einer Studie von Del Campo et al. (2003) wurde getestet, ob Ethanol und Glycerol einen stimulierenden Effekt auf die EPS-Bildung von *P. parvulus* hatten. Bei *P. parvulus* 2.6 konnte festgestellt werden, dass bei einer Ethanolkonzentration von 4,9% (w/v) etwa 2,8 g/l EPS gebildet wurden, wohingegen

Glycerol kaum einen Effekt auf die EPS-Bildung hatte. In der vorliegenden Arbeit konnte bei einer Ethanolkonzentration von 5% (w/v) eine leichte Steigerung der EPS-Menge festgestellt werden. Ethanolkonzentrationen > 10% (w/v) führten dazu, dass der Stamm kein Wachstum mehr zeigte und dadurch auch keine EPS-Bildung. Der genaue Mechanismus der Stimulation der Polymerbildung durch Ethanol ist unverstanden (Velasco et al., 2006). Es wird allerdings vermutet, dass Ethanol möglicherweise ein Stresssignal darstellt, um ein „ropy Plasmid“ in „schleimenden“ *P. damnosus* Stämmen zu aktivieren (Lonvaud-Funel et al., 1991).

4.3. Vergleich der Struktur des Exopolysaccharids von *Pediococcus parvulus* B399 mit denen von anderen *Pediococcus*-Stämmen

Zur Elementierung der Exopolysaccharide von Pediokokken aus Weinen und anderen Getränken durch den Einsatz spezifischer, hydrolytischer Enzyme, ist es vorher notwendig die genaue Struktur der Polymere zu kennen (Dueñas-Chasco et al., 1997). Zu Beginn dieser Arbeit war bereits der strukturelle Aufbau der Exopolysaccharide von drei *Pediococcus*-Arten, darunter auch *P. parvulus* bekannt. Sowohl *P. damnosus* (Stamm 2.6), als auch *P. parvulus* (Stamm 2.6) bildeten ein β -1,3(1,2)-Glucan, welches bereits von Llaubères et al. (1990) erstmals für *Pediococcus sp.* beschrieben wurde. Dagegen zeigten Manca de Nadra & Strasser de Saad (1995), dass *P. pentosaceus* ein Heteropolysaccharid aus Glucose, Fructose und Galactose bildete, welches darüber hinaus α -1,4- und α -1,6 glykosidische Bindungen aufwies. Bei *Streptococcus thermophilus* wurde gezeigt, dass die Monomerzusammensetzung der EPS stammabhängig sein konnte. So bildete beispielsweise der Stamm *S. thermophilus* Sfi20 ein Polymer, was keine Rhamnose enthielt (Doco et al., 1990; Stingele et al., 1996), während das EPS aus *S. thermophilus* OR 901 aus Galactose und Rhamnose aufgebaut war (Ariga et al., 1992; Bubb et al., 1997). Generell kann sowohl das Medium, als auch die gewählten Kulturbedingungen Einfluß auf Monomerzusammensetzung und Verknüpfung der Exopolysaccharide haben (De Vuyst & Degeest, 1999). Aus diesem Grund und dadurch, dass bis dato die Struktur nur eines *P. parvulus* Stammes (2.6) bekannt war, wurde das Exopolysaccharid aus *P. parvulus* B399 im Detail charakterisiert.

Die Identifizierung der monomeren Bausteine des Polymers, als auch die spektroskopischen Methoden (^1H - und ^{13}C -NMR) zeigten, dass die β -1,3(1,2)-Glucanstruktur auch für *P. parvulus* B399 bestätigt werden konnte. Allerdings konnte bei der Bestimmung der monomeren Einheiten des Glucan gezeigt werden, dass die Wahl und Konzentration der Säure entscheidend ist für eine vollständige Hydrolyse des Polymers und somit für die Quantifizierung des

Monomers Glucose. Während in dieser Arbeit mit 2 M HCl nur sehr geringe Mengen an Glucose im Glucan von *P. parvulus* B399 wiedergefunden werden konnten, verwendeten Velasco et al. (2007) sogar 8 M HCl zur Bestimmung der Monomere im EPS von *P. parvulus* 2.6. Für die Bestimmung der Monomere wurde für das Polymer aus *P. pentosaceus* 4 M HCl verwendet (Manca de Nadra & Strasser de Saad, 1995). In dieser Arbeit wurde mit TFA die höchsten Wiederfindungsraten (Glucose) erzielt. Dabei zeigte sich, dass mit 2 M TFA fast die gesamte Menge an Glucose im Polymer nachgewiesen werden konnte. Mit 4 M TFA wurden dagegen geringere Glucosemengen detektiert. Sowohl Llaubères et al. (1990) und Werning et al. (2008), als auch Garai-Ibabe et al. (2010) verwendeten für die saure Hydrolyse der Exopolysaccharide aus *Pediococcus sp.* entweder 3 oder 4 M TFA. Es wurde in keinem der Arbeiten erwähnt, wie hoch die Wiederfindungsrate an Glucose und somit der Reinheitsgrad der isolierten Glucane war.

In dieser Arbeit wurde erstmals auch ein ATR-FTIR-Spektrum eines Exopolysaccharids von Pediokokken gezeigt. Anhand dieses Spektrum konnte zum einen die β -Glucanstruktur bestätigt werden, zum anderen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das isolierte Glucan aus *P. parvulus* B399 keine weiteren Verunreinigungen in Form von Proteinen u.a enthielt, da man Verunreinigungen beispielsweise im NMR erst ab 5% detektieren kann. Die IR-Spektroskopie konnte auch dazu verwendet werden, um einen enzymatischen Abbau des Glucans nachzuweisen. Bei der Hydrolyse des Polymers durch das Enzym veränderten sich die charakteristischen Absorptionsbanden (β -glykosidische Bindung) (Abb. 68 + Tab. 23) Ein Vorteil dieser Methode ist die sehr geringe Probenkonzentration, anders als beispielsweise für rheologische oder photometrische Tests. In der Arbeit von Cavagna et al. (2010) wurde beispielsweise die ATR-FTIR Methode verwendet, um die Autolyse von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen im Wein zu beobachten. Es konnte genau verfolgt werden, wann Proteine und Mannoproteine abgebaut wurden, oder zu welchem Zeitpunkt der Autolyse Zellwandpolysaccharide anstiegen. Weiterhin konnte bestimmt werden, wann z.B. Mannane hydrolysiert und Glucose freigesetzt wurde. Durch die gewonnenen Kenntnisse, konnten gezielt Hefestämme ausgewählt werden, die sich als Starterkulturen eigneten.

Teil der Charakterisierung des Exopolysaccharids von *P. parvulus* B399 war auch die Bestimmung der Größe. Es konnte gezeigt werden, dass der Stamm bei Kultivierung in Medium M ein Glucan bildete, das sich aus einer hochmolekularen Fraktion ($5 \cdot 10^6$ g/mol) und 4 Fraktionen niedrigeren Molekulargewichts (347-20836 g/mol) zusammensetzte. Die niedermolekularen Fraktionen waren höchstwahrscheinlich Oligo- und Polysaccharide. Da die Größe des EPS an Dextranstandards ausgewertet wurde, Dextrane allerdings einen anderen

strukturellen Aufbau zeigen, konnte nur von einer mutmaßlichen Größe ausgegangen werden. Allerdings kann festgehalten werden, dass *P. parvulus* B399 in Medium M ein Glucan synthetisierte, was aus unterschiedlich langen Glucanketten aufgebaut war. Ein Vergleich der molaren Masse des Glucans aus *P. parvulus* B399 mit anderen Glucanen aus *P. parvulus* Stämmen zeigte, dass sowohl das Medium, als auch der Monomierzucker des Mediums Einfluß auf die Molmassenverteilungen im Polymer hatten. Llaubères et al. (1990) bestimmte das Molekulargewicht des Glucans aus *Pediococcus sp.* nach GPC-Auftrennung mittels Phenol-H₂SO₄-Test (DuBois et al., 1956) auf 800.000 g/mol. In dieser Studie konnte somit eine hochmolekulare Fraktion nachgewiesen werden. Bei *P. parvulus* IOEB 8801 konnte nach Kultivierung in dialysiertem MRS-Medium und Auftrennung des EPS über GPC mit RI-Detektor eine hochmolekulare Fraktion $> 10^6$ Da identifiziert werden, die ca. 55% des Polymers ausmachte und eine kleinere Fraktion (45%) von weniger als 60 kDa. In der Arbeit von Velasco et al. (2009) wurde *P. parvulus* 2.6 sowohl in MST-Medium (enthielt Glucose), als auch in SMD-Medium (enthielt nur Fructose / Maltose) kultiviert. Während der Stamm mit Glucose eine hochmolekulare Fraktion ($> 85\%$) von $9,6 \cdot 10^6$ Da bildete, wies der Stamm mit Fructose und Maltose dagegen eine niedrigere Masse von $2,5 \cdot 10^6$ Da auf. Es konnten auch niedrigere molekulare Fraktionen (< 10 kDa) detektiert werden, die allerdings bei Anzucht mit Fructose oder Maltose deutlich größer waren, als bei Anzucht mit Glucose. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um Oligosaccharide handelte, die allerdings nicht näher bestimmt werden konnten. Dieser Trend, dass verschiedene EPS-Massen bei unterschiedlichen Zuckerquellen gebildet wurden, konnte auch bei den Heteropolysacchariden von *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772 gezeigt werden (Grobben et al., 1996). Eine aktuelle Studie von Garai-Ibabe et al. (2010) verdeutlichte, dass 28 untersuchte *P. parvulus* Stämme 2 verschiedene Polymerfraktionen bildeten. Eine hochmolekulare Fraktion zwischen $1,1 \cdot 10^7$ und $7,1 \cdot 10^6$ Da und eine niedermolekulare Fraktion zwischen $5,3 \cdot 10^4$ und $2,7 \cdot 10^4$ Da. 22 der 28 Stämme synthetisierten dabei nur die hochmolekulare Fraktion. Garai-Ibabe et al. (2010) stellten auch fest, dass die Stämme, die mehr als 100 mg/l EPS produzierten eine hochmolekulare Fraktion von 96-82% bildeten, während bei Stämmen, die zwischen 40-100 mg/l EPS synthetisierten das hochmolekulare EPS nur etwa 60-79% ausmachte. Stämme, die weniger als 25 mg/l Glucan produzierten, bildeten hoch- und niedermolekulares Polymer in etwa gleichen Mengen (42-55%). In anderen Worten ausgedrückt, es gibt einen linearen Zusammenhang zwischen der gebildeten Polymermenge und dem hochmolekularen Glucan bei *P. parvulus*-Stämmen. Diese Vermutung trifft demnach auch für den Stamm B399 aus dieser Arbeit zu.

4.4. Industrielle Anwendung

In der Industrie werden immer häufiger Exopolysaccharide (EPS) als Stabilisatoren, Dickungsmittel, gelierende Agenzien oder Fettersatzmittel eingesetzt. Dafür ist es allerdings notwendig, die Auswirkungen des Fließverhaltens der Polymere zu kennen. Hierfür werden rheologische Messungen an den Polymerlösungen durchgeführt, mit denen das Fließverhalten untersucht wird. Dabei ist von besonderem Interesse, unter welchen Bedingungen sich das rheologische Verhalten einer Polymerlösung ändert. Das scherverdünnende (pseudoplastische) Fließverhalten konnte bereits an anderen Biopolymeren, die industrielle Anwendung finden, darunter Xanthan und Gellan oder andere β -Glucane wie Skleoglucan oder Schizophyllan gezeigt werden (Farina et al., 2001; Fang et al., 2004). Dieses Fließverhalten der Biopolymere hat wie bereits erwähnt viele Anwendungen in der Lebensmittelindustrie. Eine Reduktion der Viskosität bei steigender Scherrate ist beispielsweise bei Durchmischungs- und Pumpvorgängen wichtig. Zusätzlich ist das scherverdünnende Verhalten hilfreich bei der Förderung der sensorischen Qualität (Freisetzung von Geschmacksstoffen) von Produkten (Velasco et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden die rheologischen Eigenschaften des EPS aus *P. parvulus* B399 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Temperaturen von 10 °C und 20 °C keinen Einfluss auf die pseudoplastischen Eigenschaften der β -Glucanlösungen hatten. Die Oszillationsmessungen zur Bestimmung des viskoelastischen Verhaltens der β -Glucanlösungen verdeutlichten, dass die Lösung bei einer Konzentration $\leq 1\%$ einen Flüssigkeitscharakter hatte, während der Zucker ab einer Konzentration von $> 1\%$ ein schwaches Gel bildete. Nach den Berücksichtigungen der Regeln von Guenet (1992) zeigten unsere viskoelastischen Versuche ($G' > G''$) die Bildung eines schwachen Gels bei Polymerkonzentrationen $> 1\%$. Diese Ergebnisse unterschieden sich von denen, die bei der Untersuchung des Exopolysaccharids von *P. parvulus* 2.6 erhalten wurden (Velasco et al., 2009). Das Polymer aus *P. parvulus* 2.6 zeigte bereits ab einer Konzentration von 1% die schwach gelbildenden Eigenschaften. Dies müsste bedeuten, dass das Glucan aus *P. parvulus* 2.6 deutlich größer sein muss, als das Glucan aus *P. parvulus* B399. Eine Größe von $9,6 \cdot 10^6$ Da (*P. parvulus* 2.6) im Vergleich zu $5 \cdot 10^6$ Da (*P. parvulus* B399) ist höchstwahrscheinlich hierfür eine Erklärung. Unter sonst gleichen Bedingungen (Temperatur, Konzentration) verschob sich der Cross-over von G' und G'' mit zunehmendem Molekulargewicht hin zu niedrigeren Frequenzen. Möglicherweise spielten auch die vier niedermolekularen Polymerfraktionen, die im Glucan von *P. parvulus* B399 gefunden wurden eine Rolle. Das Glucan aus *P. parvulus* B399 wies zwar gelbildende Eigenschaften auf, allerdings waren

hierfür höhere Konzentrationen notwendig als bei dem Glucan von *P. parvulus* 2.6. Ein Einsatz des Polymers in der Nahrungsmittelindustrie wäre durchaus denkbar. Die Bildung einer gelartigen Netzwerkstruktur konnte in dieser Arbeit auch erstmals für Pediokokken mittels AFM-Messungen bestätigt werden.

Weiterhin wurde mithilfe der rheologischen Messungen überprüft, ob das Glucan eine gewisse Homogenität zeigte. Die Ergebnisse (Erfüllung der Cox-Merz-Regel) verdeutlichten, dass das EPS in sich homogen war, also dementsprechend nur aus einer Phase bestand. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für das Glucan aus *P. parvulus* 2.6 gemacht. Im Gegensatz hierzu zeigte ein Skleroglucan bei einer Konzentration von 2% eine signifikant höhere komplexe Viskosität. Die Scherviskosität war geringer, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Probe in sich eine gewisse Heterogenität besaß (Grassi et al., 1995).

4.5. Glycosyltransferase -(gtf) Gen bei Milchsäurebakterien

In der vorliegenden Arbeit konnte das *gtf*-Gen für *P. parvulus* B399 nach einer bereits beschreibenden PCR-Methode (Werning et al., 2006) nachgewiesen werden. Das *gtf*-Gen kodiert für eine Glycosyltransferase, die an der Glucan-Synthese beteiligt ist. Bereits Werning et al. (2006) konnten zeigen, dass alle *gtf*-positiven Stämme ein EPS bildeten, während alle Stämmen, denen das Gen fehlte, auch kein EPS synthetisierten. In einer Studie von Garai-Ibabe et al. (2010) konnte das *gtf*-Gen bei allen 32 EPS-positiven *P. parvulus* Stämmen nachgewiesen werden. Dols-Lafargue et al. (2008) konnten allerdings auch zeigen, dass einige *Oenococcus oeni* Stämme das *gtf*-Gen besaßen, allerdings kein EPS synthetisierten. Das legt die Vermutung nahe, dass die EPS-Synthese nicht nur allein von dem Vorhandensein des *gtf*-Gens und demnach von dem Plasmid abhängig ist, sondern auch durch äußere Faktoren wie z.B der Temperatur beeinflusst werden kann. Die Ergebnisse der Arbeit machte deutlich, dass ein Kälteschock dazu führen kann, dass einige Stämme dann erst verstärkt das Biopolymer bildeten. Des Weiteren wurde festgestellt, dass mehrmaliges Überimpfen zum Verlust der Fähigkeit zur Exopolysaccharidbildung führte.

4.6. Verbreitung von β -1,3 Glucanasen bei Mikroorganismen

Extrazelluläre β -1,3 Glucanasen sind innerhalb der Bakterien weit verbreitet. Sie werden unter anderem von verschiedenen Bacilli (Miyanishi et al., 2003), Paenibacilli (Cheng et al., 2009) und vielen Actinomyceten darunter die Gattungen *Streptomyces* (Hong et al., 2002), *Cellulosimicrobium* (Shibasaki et al., 2008) und *Arthrobacter* (Okazaki et al., 2007) gebildet. Weiterhin bilden viele Pilze wie *Trichoderma sp.* und *Aspergillus sp.* Glucanasen (Watanabe et al., 1992; Coenen et al., 1995; Bara et al., 2003). Die Darmflora von einigen Termiten wurde bereits am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung zum großen Teil identifiziert und auch auf ihre Fähigkeit zum Celluloseabbau untersucht. Eine Reihe der Organismen bildete Cellulasen, bei Wachstum auf cellulosehaltigem Medium (Wenzel et al., 2002). Es wurde vermutet, dass Organismen, die cellulolytische Aktivität haben, möglicherweise bei Wachstum mit β -1,3 Substraten auch Glucanasen produzieren können. *Delftia sp.* MV01 konnte als effektiver Glucanaseproduzent isoliert und identifiziert werden. Bis heute ist nach unserem Kenntnisstand keine Glucanase aus der Gattung *Delftia* bekannt. Eine weitere neue Eigenschaft der Gattung *Delftia* ist die Glucoseverwertung, die in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden konnte. Bis jetzt weiß man von der Spezies nur, dass sie Toxine wie Chloranilin (Zhang et al., 2010) oder 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (Hoffmann & Müller, 2006) abbauen kann, obwohl Stämme der Arten *Delftia lacustris* und *Delftia tsuruhatensis* auch Polymere wie Chitin und Peptidoglycan hydrolysieren können.

Während der Arbeit konnte festgestellt werden, dass sich zum Nachweis von β -1,3 Glucanasen in Plattentests nur eine Färbung mit Calcofluor-White eignet. Häufig werden allerdings Agarplatten zum Nachweis von β -1,3 Glucanasen mit Kongorot gefärbt (Matthews et al., 2006). Diese Färbung konnte aus unserer Erfahrung nur für β -1,4 verknüpfte Glucane verwendet werden, da bei einem Abbau dieser Polymere ein eindeutiger Abbauhof zu erkennen war.

4.7. Substrate zur Bildung von β -Glucanasen

Delftia sp. MV01 bildete bei Wachstum mit allen verwendeten β -1,3 verknüpften Polymeren eine Glucanase. Dabei war die Bildung des Exoenzyms neben dem verwendeten Substrat auch von dem Kulturvolumina abhängig. In einer 200 ml Kultur mit Hefacell[®] (Erbslöh) als Substrat wies der Stamm deutlich höhere Glucanaseaktivitäten auf als bei einer Kultivierung in einem 800 ml Maßstab. Zwar führte das Wachstum von *Delftia sp.* MV01 mit dem Glucan aus *P. parvulus* B399 zur Bildung einer Glucanase, die höchstwahrscheinlich die Hydrolyse des Polymers bewirkte, nur konnte aufgrund der geringen Mengen an synthetisiertem EPS durch *P. parvulus* B399 der Stamm nicht in größeren Mengen mit diesem Glucan angezogen werden. Zur Bildung von β -1,3-Glucanasen in größerem Maßstab werden häufig Pachyman (Aono et al., 1992; Aono et al., 1995), Curdlan (Kanzawa et al., 1994) oder Hefezellwände (Fleet & Phaff, 1974) als Substrate verwendet. Diese Substrate sind entweder einfach im Labor in größeren Mengen herzustellen (Hefezellwände), oder sie können relativ kostengünstig erworben werden (Pachyman oder Curdlan).

4.8. Vergleich der Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 mit anderen Glucanasen

Die Reinigung der Glucanase erfolgte konventionell über Anionenaustauscher- und Größenausschlußchromatographie. In der Arbeit konnten die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen über einen einfachen Plattentest ermittelt werden. Viele Autoren verwenden zur Überprüfung der Aktivität der Glucanase während den Reinigungsschritten den zeitaufwendigen DNS-Test (Kanzawa et al., 1994; Aono et al., 1995). Dies bedeutet allerdings, dass während der Reinigung über Chromatographie alle Fraktionen aufwendig getestet werden müssen und deutlich mehr Probenmaterial zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden muss als bei dem von uns angewandten Lochplattentest. Nach der Reinigung konnten 34 μ g reine Glucanase gewonnen werden, deren spezifische Aktivität gegen Laminarin bei 10 U/mg betrug. Zwar lag der Anreicherungsfaktor bei fast 30%, trotzdem konnte nur eine Ausbeute von 0,36% erzielt werden. Diese Fakten verdeutlichen, dass die konventionelle Reinigung zu erheblichen Proteinverlusten führte. Da derzeit keine weitere β -1,3-Glucanase aus *Delftia sp.* beschrieben ist, ist ein Vergleich schwierig. Allerdings zeigte die konventionelle Reinigung zweier β -1,3-Glucanasen aus *Bacillus circulans* IAM1165, dass trotz großer Enzymverluste, spezifische Aktivitäten von 352 U/mg bzw. 522 U/mg gegen Laminarin erreicht werden konnten (Aono et al., 1995). Für die β -1,3-Glucanase aus *Bacillus clausii* NM-1 wurde allerdings eine

spezifische Aktivität von nur 6,2 U/mg gegen Laminarin bestimmt (Miyanishi et al., 2003). Daran lässt sich zeigen, dass die β -1,3-Glucanasen der Gattung *Bacillus* sehr unterschiedlich in ihren spezifischen Aktivitäten sind.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit mittels einer weiterentwickelten Methode gezeigt werden, dass sich die β -1,3-Glucanase aus *Delftia* sp. MV01 nach Denaturierung im SDS-Gel auch wieder renaturieren lässt und somit im Aktivitätsgel (Zymogramm) nachgewiesen werden kann. Côte et al. (1991) zeigten bereits, dass β -1,3-Glucanasen aus *Trichoderma* sp. bzw. *Penicillium* sp. im Aktivitätsgel nachgewiesen werden können. Allerdings waren sie nicht in der Lage bakterielle β -1,3 Glucanasen zu renaturieren. Es wurde auch erwähnt, dass der Farbstoff Calcofluor-White M2R sehr spezifisch für β -1,4 Glucane war. Mit unseren Ergebnissen konnte allerdings bewiesen werden, dass die Färbung mit Calcofluor-White M2R auch für β -1,3-Glucane geeignet ist, wenn nicht sogar die einzigste Nachweismethode zur Detektion von β -1,3 Glucanasen.

Die N-terminale Sequenzierung der ersten 15 Aminosäuren zeigte, dass die Glucanase sehr hohe Ähnlichkeit zu Mitgliedern der Glycosyl-Hydrolase Superfamilie 16 hatte. Hierzu gehörten neben der β -1,3-Glucanase aus *Cellulosimicrobium cellulans* (Ferrer et al., 1996), *Nocardiopsis dassonvillei subsp. dassonvillei* auch *Arthrobacter aurescens* (Mongodin et al., 2006).

Viele β -1,3-Glucanasen weisen ein Temperaturoptimum zwischen 45 - 55 °C auf und dieser Trend konnte auch für unser Enzym bestätigt werden. Bei dem pH-Optimum konnten allerdings Unterschiede zu anderen β -1,3-Glucanasen festgestellt werden. Während das Enzym aus *Delftia* sp. die höchste Aktivität bei pH 4,0 besaß, war die Glucanase aus *Bacillus clausii* NM-1 im pH-Bereich von 4,0-4,5 sehr labil (Miyanishi et al., 2003). Die Glucanase aus *Bacillus circulans* IAM1165 wies einen optimalen pH-Bereich von 6,0-7,5 (Aono et al. 1995) auf. Des Weiteren wurde auch deutlich, dass für eine spätere Anwendung weinrelevante Parameter wie Sulfit, Ethanol oder Phenole keinen oder kaum Einfluß auf die Aktivität des Enzyms hatten. Zwar setzten niedrige Temperaturen, wie sie während der Weinbereitung vorherrschen, die Aktivität des Enzyms herab, allerdings kam es nicht zum völligen Erliegen der Enzymaktivität. Auch für die hydrolytischen Enzyme aus *Streptomyces* sp. B578 konnte gezeigt werden, dass weinrelevante Parameter wie Sulfit, Ethanol oder niedrige Temperaturen keinen Einfluß auf die Aktivität der Enzyme hatten (Blättel et al., 2009).

Es konnte in dieser Arbeit auch erstmals mittels vier verschiedener Methoden nachgewiesen werden, dass das β -1,3-Glucan aus *P. parvulus* B399 durch eine Glucanase gespalten werden konnte. Neben der Senkung der Viskosität, die auch direkt im Wein bei 20 °C gemessen wurde,

kamen auch klassische Methoden wie der DNS-Test oder die GPC-Messung zur Anwendung. Darüber hinaus konnte auch ein enzymatischer Abbau mittels IR-Spektroskopie aufgezeigt werden. Zwar wies die Glucanase im direkten Vergleich zu Laminarin nur eine relative Aktivität von 23% gegen das β -1,3(1,2)-Glucan aus *P. parvulus* auf, allerdings sollte auch beachtet werden, dass das Standardsubstrat Laminarin nur eine Größe von 5-10 kDa hat und somit ein sehr kleines Polymer ist, was in kürzerer Zeit gespalten werden kann. Es ist im Vergleich zum β -1,3(1,2)-Glucan strukturell einfacher aufgebaut, so dass ein enzymatischer Angriff auf die β -1,3 Hauptkette des Polymers leichter erfolgen kann. Die β -1,2 Seitenkette im Glucan von *P. parvulus* erschwert möglicherweise die enzymatische Hydrolyse des Biopolymers. Daher ist meiner Meinung nach nur ein Vergleich mit anderen Biopolymeren, die eine vergleichbare Größe wie das β -1,3(1,2)-Glucan haben sinnvoll. Pleszczyńska et al. (2007) wiesen im Kulturüberstand von *Paenibacillus* sp. MP-1 eine Mutanase nach, die Mutan aus *Streptococcus mutans* nach 2 h Inkubation bei 40 °C zu 17% hydrolysieren konnte. Allerdings wurde das Mutan zuvor mechanisch zerkleinert und vor dem DNS-Test auch mit Dextranase behandelt. Dies bedeutet, dass es sich hierbei nicht mehr um natives Mutan handelte. Das Glucan aus *P. parvulus* wurde dagegen für alle Versuche nativ und unbehandelt eingesetzt. Eine endo- α -1,3-Glucanase aus *Flavobacterium* sp. spaltete das Mutan aus *Streptococcus mutans* zu 11% (Ebisu et al., 1975). Eine andere Mutanase aus *Bacillus circulans* HU-M1 zeigte nach 10 h Inkubation eine Mutanhydrolyse von 38% (Matsuda et al., 1997). All diese Autoren haben festgestellt, dass für große Biopolymere wie Mutan eine Hydrolyse zwischen 11-38% durch Mutanasen erzielt werden kann. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen, die für das β -1,3(1,2)-Glucan erreicht wurden.

In der Weintechnologie werden bereits verschiedene Präparate mit β -Glucanaseaktivität (Trenolin, Erbslöh; Panzym Fino G, Begerow; Lallzym, Lallemand) meist aus *Trichoderma* sp. oder *Aspergillus* sp. eingesetzt, um das β -1,3(1,6)-Glucan von *Botrytis cinerea* zu eliminieren. Präparate, die spezifisch zur Bekämpfung des β -1,3(1,2)-Glucans aus Pediokokken eingesetzt werden, sind nicht bekannt. Meistens werden die Präparate auch dazu verwendet, die Autolyse von Hefen nach der alkoholischen Gärung zu fördern. Ein Nachteil dieser Präparate ist, dass sie neben der β -Glucanaseaktivität eine Reihe von Begleitaktivitäten wie Pectinasen oder β -Glukosidasen aufweisen, was die spezifische Aktivität gegenüber β -Glucanen mindert. Das Enzym aus *Delftia* sp. MV01 ist dagegen sehr spezifisch und könnte eine Alternative zum intensiven Schwefeln des Weines sein. Es konnte bereits auch gezeigt werden, dass schleimbildene Bakterien sehr resistent gegenüber SO₂ sind und somit keine vollständige Eliminierung der Organismen möglich ist (Dols-Lafargue et al., 2008).

Die spezifische Wirkung der Glucanase konnte auch daran gezeigt werden, dass das Enzym nur β -1,3 Substrate, darunter Pachyman, Laminarin und das Exopolysaccharid aus *P. parvulus* B399 hydrolysieren konnte. Aono et al. (1995) konnten aus *Bacillus circulans* IAM1165 zwei β -1,3-Glucanasen reinigen. Diese Enzyme hydrolysierten allerdings β -1,3(1,4)- und β -1,4-Glucane wie Lichenan oder Gerstenglucan effektiver als das Standard Glucan Laminarin. Das Enzym aus *Bacillus circulans* YK9 spaltete neben Laminarin zusätzlich auch Curdlan (Kanzawa et al., 1994).

4.9. *Delftia* sp. MV01 - eine neue Spezies?

Die Gattung *Delftia* gehört zur Familie der Comamonadaceae, die innerhalb der beta-Proteobacteria angesiedelt sind. Wen et al. (1999) benannten *Comomonas acidovorans* in *Delftia acidovorans* um und beschrieben somit die erste Art der neuen Gattung, nachdem sie festgestellt hatten, dass sich *Comomonas acidovorans* phylogenetisch deutlich von den anderen Arten wie *Comomonas terrigena* unterschied. Neben *Delftia acidovorans* wurden bereits zwei weitere Arten, *Delftia tsuruhatensis* (Shigematsu et al., 2003) und *Delftia lacustris* (Jørgensen et al., 2009) beschrieben. *Delftia* war bislang dafür bekannt gewesen, Toxine wie Chloranilin (Zhang et al., 2010) oder 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (Hoffmann & Müller, 2006) abbauen zu können, obwohl Stämme der Arten *Delftia lacustris* und *Delftia tsuruhatensis* auch Polymere wie Chitin und Peptidoglycan hydrolysieren können (Jørgensen et al., 2009). Ein charakteristisches Merkmal der Gattung *Delftia* ist, dass sie keine Glucose verwerten kann (Sly et al., 2005). Weiterhin kann *Delftia* Stärke nicht hydrolysieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand von *Delftia* sp. MV01 erstmals festgestellt werden, dass die Gattung nicht nur Glucose verwerten, sondern auch Stärke hydrolysieren kann. *Delftia* sp. MV01 konnte eine Reihe von Mono- und Disacchariden verwerten, mit denen *Delftia lacustris* und *Delftia tsuruhatensis* nicht wachsen konnten. Möglicherweise hat die Anpassung an das Habitat, den Termitendarm, dazu geführt, dass *Delftia* sp. MV01 in der Lage ist, mit verschiedenen Zuckern und Polysacchariden zu wachsen.

Dadurch, dass sich *Delftia* sp. MV01 aufgrund des Substratverwertungsspektrums sehr stark von den bisher beschriebenen Arten unterscheidet, könnte davon ausgegangen werden, dass *Delftia* sp. MV01 möglicherweise eine neue Art darstellt.

Die 16S rDNA Sequenzierung zeigte, dass *Delftia* sp. MV01 zu 99% Sequenzidentität zu allen drei beschriebenen *Delftia* Arten aufwies. Die Ergebnisse der DNA-DNA Hybridisierung zeigten allerdings, dass *Delftia* sp. MV01 unter Berücksichtigung der Empfehlungen von

Wayne et al. (1987) und Stackebrandt & Goebel (1994) über einen Grenzwert von 70% DNA-DNA Homologie für die Definition von Arten keine neue Art darstellte. Dies bedeutet, dass der Stamm sowohl zur Art *Delftia lacustris*, als auch zu *Delftia tsuruhatensis* gehören könnte. Da mit *Delftia acidovorans* eine DNA-DNA Homologie von 70% bestand und Ähnlichkeitswerte nur in einem Bereich von 10% reproduzierbar sind, sind Werte um 70% als kritisch zu betrachten. Dies bedeutet, dass *Delftia sp.* MV01 ebenfalls zur Art *Delftia acidovorans* gehören könnte. Die Autoren, die *Delftia tsuruhatensis* T7^T beschrieben haben (Shigematsu et al., 2003) erwähnten einen Wert für die DNA-DNA Hybridisierung von 68,6% zwischen dem Stamm T7^T und *Delftia acidovorans* ATCC 15668^T. Dieser Wert war ebenfalls nicht signifikant unter dem Schwellenwert von 70% für Artbeschreibungen (Stackebrandt & Goebel, 1994). Ähnliche Ergebnisse (66%) konnten für die DNA-DNA Verwandtschaft von *Delftia lacustris* Stamm 332^T zu *Delftia tsuruhatensis* DSM 17581^T festgestellt werden (Jørgensen et al., 2009).

Im Falle der Familie der Enterobacteriaceae trifft der Schwellenwert von 70% nicht in jedem Fall zu. Brenner et al. (1973) erwähnten, dass die DNA von *E. coli* und der von vier *Shigella* Spezies einen Verwandtschaftsgrad von über 70% (80-87%) hatten. Deshalb sollten diese Arten aus verschiedenen Gattungen als eine Spezies aufgefasst werden. Allerdings blieb der Unterschied der Bakterien möglicherweise auch aus historischen Gründen oder medizinischer Relevanz bestehen. Anhand dieses Beispiels wird verdeutlicht, dass der Stamm MV01 aufgrund der DNA-DNA Hybridisierungsergebnisse keine neue Art repräsentiert, stattdessen eher als Subspezies von *Delftia acidovorans* zu sehen ist. Dies wäre dann auch für die anderen beiden beschriebenen *Delftia* Arten der Fall. Da allerdings *Delftia sp.* MV01 im Gegensatz zu den anderen *Delftia* Arten über ein breites Zuckerverwertungsspektrum verfügt, wird eine neue *Delftia* Art, *Delftia saccharophila* vorgeschlagen.

Beschreibung von *Delftia saccharophila* sp. nov.

Delftia saccharophila (sac.cha.ro.phi'la. Gr. n. sacchar sugar; Gr. adj. philos loving; M.L. fem. adj saccharophila sugar-loving).

Gram-negativ, beweglich, leicht gekrümmte Stäbchen ($2,35 \pm 0,9 \mu\text{m} \times 0,73 \pm 0,1 \mu\text{m}$). Zellen kommen einzeln, in Paaren, teilweise auch in Ketten vor. Wachstum findet zwischen 20 - 30 °C bei pH 5,0-9,0 statt. Optimales Wachstum wurde bei 30 °C und pH 8,0 vermutet. Der Organismus zeigte eine positive Oxidase-, Katalase- und Ureasereaktion. In Abwesenheit von Nitrat wuchs das Bakterium aerob. Nitratreduktion und Citratverwertung konnten beobachtet werden. Der Stamm MV01 bildete hydrolytische Enzyme: α - and β -Glucanasen, Chitinasen,

Mannanasen, Proteasen. Die folgenden Substrate konnte *Delftia sp.* MV01 als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen: D-Glucose, D-Fructose, D-Arabinose, D-Galactose, D-Mannose, D-Xylose, D-Lactose, Glycerol, D-Mannitol, Maltose, Saccharose, Maleat, Fumarat, Acetat, L-Tryptophan, L-Glutamat, L-Prolin, L-Aspartat, Malat. Andere Substrate konnte der Stamm MV01 nicht verwerten. Malonat, Tatrak, L-Serin, L-Valin.

Bei dem Bakterium wurden nachstehende Fettsäuren nachgewiesen: C_{16:0}, C_{18:1} ω7c, C_{16:1} ω7c/iso - C_{15:0} 2-OH; C_{10:0} 3-OH, C_{12:0}, C_{14:0}, C_{15:0}, C_{18:0}. C_{17:0} and C_{8:0} 3-OH wurden in geringen Mengen gefunden.

Der GC-Gehalt der DNA betrug 67,1 mol%.

Der nächste Verwandte ist *Delftia tsuruhatensis* mit einer DNA-DNA Homologie von 98,8%.

Der Typstamm trägt die Bezeichnung MV01^T und wurde aus dem Darm der Termiten *Zootermopsis angusticollis* (Hagen) isoliert. Eine Hinterlegung des Typstammes MV01^T in der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, sowie in einer belgischen Sammlung (BCCM/LMG Bacteria Collection) in Gent ist noch nicht abgeschlossen.

5. Ausblick

Mit der Isolierung und Charakterisierung einer neuen β -1,3-Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 ist es möglich geworden, das Exopolysaccharid aus *Pediococcus parvulus* zu hydrolysieren und damit den von Pediokokken verursachten Lindton im Wein oder anderen alkoholischen Getränken wie Bier zu minimieren.

Da das Exopolysaccharid aus *Pediococcus parvulus* aus einem synthetischen Medium isoliert wurde, muss zunächst überprüft werden, ob *Pediococcus parvulus* das gleiche β -1,3-Glucan auch im Wein bildet. Danach müsste eine Überprüfung der Aktivität der Glucanase gegen das Polymer erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität des Enzyms unter weinrelevanten Parametern an dem kommerziellen β -1,3-Glucan Laminarin getestet. Diese Aktivitätstests sollten auch für das Exopolysaccharid durchgeführt werden.

Um das Enzym auch in der Praxis einsetzen zu können, müssten einige praxisnahe Versuchsreihen durchgeführt werden. Da das Biopolymer von *Pediococcus parvulus* im Wein unter anderem dazuführen kann, dass während des Filtrationsprozesses die Filtermembranen belegen, wäre es denkbar, den Filtrationsprozess mit und ohne Enzymzugabe zu vergleichen. Auch die Belegung der Filtermembran könnte in einem Vergleichsansatz mit und ohne Enzymzusatz überprüft werden. Hierbei spielt auch die Filtrationsdauer eine Rolle. Des Weiteren müsste noch untersucht werden zu welchem Zeitpunkt linde Weine mit dem Enzym behandelt werden sollten. Hier wäre entweder eine Behandlung vor der Filtration nach einer entsprechenden Inkubationszeit oder möglicherweise während des Filtrationsprozesses direkt auf der Membran denkbar. Bis jetzt wurde die β -1,3-Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 in laborüblichen Volumina (einige Mikro- bis Milliliter) getestet. Es ist notwendig zu klären, in welcher Konzentration die β -1,3-Glucanase eingesetzt werden muss, um auch größere Mengen an Exopolysaccharid zu hydrolysieren. Eine Produktion der β -1,3-Glucanase in einem größeren Maßstab war bislang nicht möglich, könnte allerdings über heterologe Expression, nach Identifizierung des entsprechenden Gens erreicht werden. Da in den Versuchen gezeigt werden konnte, dass das Enzym neben dem β -1,3-Glucan aus *Pediococcus parvulus* auch andere β -1,3 Glucane (Laminarin oder Pachyman) spaltet, wäre es denkbar, dass das Enzym auch eine Aktivität gegenüber dem β -1,3-Glucan aus *Botrytis cinerea* zeigt und somit als Kombinationspräparat eingesetzt werden kann.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die erste β -1,3-Glucanase aus *Delftia* beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym unter anderem gegen das nur schwer zu hydrolysierende Exopolysaccharid aus *Pediococcus parvulus* wirkte.

Im Einzelnen wurde zunächst das Exopolysaccharid aus *Pediococcus parvulus* B399 aus einem eigens zusammengestellten β -Glucan-Synthesemedium (Medium M) isoliert und gereinigt. Anschließend erfolgte eine umfassende Charakterisierung des Biopolymers. Hierzu gehörten neben der sauren Hydrolyse zur Bestimmung der Monomierzusammensetzung des Polymers, auch spektroskopische Methoden, darunter ^1H und ^{13}C -NMR. Mithilfe der NMR-Spektroskopie konnte die Struktur des Exopolysaccharids aus *Pediococcus parvulus* B399 bestimmt werden. Es handelte sich hierbei ebenfalls um ein β -1,3(1,2)-Glucan, wie es bereits für *Pediococcus parvulus* 2.6 beschrieben wurde. Darüber hinaus wurde erstmals ein ATR-FTIR-Spektrum für ein Exopolysaccharid aus Pediokokken gezeigt. Über GPC-Messungen konnte auch die molekulare Größe des β -1,3(1,2)-Glucans aus *Pediococcus parvulus* B399 bestimmt werden. Es wurde nachgewiesen, dass sich das Exopolysaccharid bei Anzucht in Medium M aus einer hochmolekularen Fraktion ($5 \cdot 10^6$ g/mol) und vier niedermolekularen Fraktionen (347; 818; 10048 und 20836 g/mol) zusammensetzte. Neben der strukturellen Charakterisierung, wurde das Exopolysaccharid auch rheologisch untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass es sich durch seine schwach gelbildenden Eigenschaften auch zum Einsatz in der Lebensmittelindustrie als Stabilisator, Fettersatzmittel oder ähnliches eignen würde. Die erwähnte gelbildende Netzwerkstruktur konnte für das Exopolysaccharid aus *Pediococcus parvulus* B399 auch erstmals im AFM bestätigt werden.

Ein weiterer Teil der Arbeit umfasste ein breites Screeningverfahren nach einem geeigneten Organismus, der das Exopolysaccharid aus *Pediococcus parvulus* B399 effektiv hydrolysieren sollte. Aus einer Anreicherungskultur des Termitendarms (Wenzel et al., 2002), konnte *Delftia* sp. MV01 isoliert werden. Dieser Organismus produzierte bei Wachstum in β -glucanhaltigem Medium (Exopolysaccharid aus *Pediococcus parvulus* B399, sowie weitere kommerziell erhältliche β -1,3-Glucane) eine Glucanase, die in folgenden Schritten konventionell gereinigt und charakterisiert wurde. Die in dieser Arbeit erstmals für die Gattung *Delftia* beschriebene Glucanase besaß eine Größe von 29 kDa (ermittelt über SDS-PAGE) und einen isoelektrischen Punkt von 4,3. Das Temperaturoptimum des Enzyms lag bei 50 °C, das

pH-Optimum lag bei 4,0. Das Enzym ließ sich in von uns weiterentwickelten Aktivitätsgelen mittels Calcofluor-White Färbung nachweisen. Durch N-terminale Sequenzierung konnte festgestellt werden, dass die Glucanase aus *Delftia sp.* MV01 große Ähnlichkeit mit β -1,3-Glucanasen der Glycosyl-Hydrolase Superfamilie 16 hatte. Mittels unterschiedlicher Methoden konnte nachgewiesen werden, dass die neue β -1,3-Glucanase das Exopolysaccharids aus *Pediococcus parvulus* B399 hydrolysieren konnte. Neben der Abnahme der Viskosität des Polymers bis zu 50% bei enzymatischer Spaltung, wurde auch deutlich, dass sich die Molmassenverteilungen im Polymer bei der Hydrolyse änderten. Darüber hinaus wurde auch der klassische DNS-Test durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Glucanase das Biopolymer unter Optimabedingungen (50 °C; pH 4,0) nach 6 h zu ca. 47% hydrolysieren konnte. In dieser Arbeit konnte erstmals ein enzymatischer Abbau von Exopolysacchariden aus *Pediococcus sp.* überhaupt gezeigt werden. Da „schleimende“ Pediokokken hauptsächlich in alkoholischen Getränken vorkommen, war es für die Anwendung der Glucanase notwendig, dass das Enzym unter weinrelevanten Parametern aktiv blieb. Es stellte sich raus, dass das Enzym bei pH-Werten unter 4,0 und Temperaturen unter 25 °C (weinrelevante Parameter) noch aktiv war. Weiterhin hatten weder Ethanolkonzentrationen bis 30% (v/v), noch getestete Sulfit- oder Phenolkonzentrationen einen Einfluss auf die Enzymaktivität.

Ein letzter Aspekt der Arbeit betraf die Charakterisierung von *Delftia sp.* MV01. In dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Gattung *Delftia* auch hydrolytische Enzyme, darunter die erstmals beschriebene β -1,3-Glucanase aus *Delftia sp.* MV01, bilden konnte. Da sich *Delftia sp.* MV01 nicht nur in der Bildung hydrolytischer Enzyme, sondern auch in der Verwertung einer Reihe an Mono-/ Disacchariden deutlich von den bisher beschriebenen *Delftia* Arten unterschied, wurde vermutet, dass *Delftia sp.* MV01 möglicherweise eine neue Art darstellt.

Deshalb wurden neben der klassischen phänotypischen Charakterisierung auch genotypische Methoden wie die DNA-DNA-Hybridisierung angewandt.

Nach der genotypischen Charakterisierung konnte der Stamm MV01 zwar der Gattung *Delftia* zugewiesen werden, nach den Ergebnissen der DNA-DNA-Hybridisierung (über 70%) allerdings zu urteilen, dürfte *Delftia sp.* MV01 nicht als neue Art beschrieben werden. Da die phänotypischen Unterschiede allerdings sehr deutlich waren, bleibt zurzeit noch offen, ob *Delftia sp.* MV01 eine neue Art innerhalb der Gattung bildet.

7. Literatur

Abbad Andaloussi, S., Talbaoui, H., Marzack, R., Bonaly, R., 1995. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**, 995-1000.

Aono, R., Sato, M., Yamamoto, M., Horikoshi, K., 1992. Isolation and partial characterization of an 87- kilodalton β -1,3-glucanase from *Bacillus circulans* IAM1165. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 520-524.

Aono, R., Hammura, M., Yamamoto, M., Asano, T., 1995. Isolation of extracellular 28- 42- kilodalton β -1,3-glucanases produced by *Bacillus circulans* IAM1165. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 122-129.

Ariga, H., Urashima, T., Michihata, E., Ito, M., Morizono, N., Kimura, T., Takahashi, S., 1992. Extracellular polysaccharide from encapsulated *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* OR 901 isolated from commercial yogurt. *Journal of Food Science* **57**, 625-628.

Aroca, R., 2006. Surface - Enhanced Vibrational Spectroscopy. Wiley & Sons Ltd, England.

Back, W., 1978. Elevation of *Pediococcus cerevisiae* subsp. *dextrinicus* Coster and White to species status *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White) comb. nov. *International Journal of Systemic Bacteriology* **28**, 523-527.

Back, W., 1999. Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil 2. Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany.

Bara, M. T., Lima, A.L., Ulhoa, C.J., 2003. Purification and characterization of an exo- beta- 1,3- glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters* **219**, 81-85.

Barney, M., Volgyi, A., Navarro, A., Ryder, D., 2001. Riboprinting and 16S rRNA sequencing for identification of brewery *Pediococcus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 553-560.

Beneduce, L., Spano, G., Vernile, A., Tarantino, D., Massa, S., 2004. Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *Journal of Basic Microbiology* **44**, 10-16.

Blättel, V., Wirth, K., Claus, H., Schlott, B., Pfeiffer, P., König, H., 2009. A lytic enzyme cocktail from *Streptomyces* sp. B578 for the control of lactic and acetic acid bacteria in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**, 839-848.

Boels, I. C., van Kranenburg, R., Hugenholtz, J., Kleerebezen, M., de Vos, W. M., 2001. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **11**, 723-732.

Bover-Cid, S., Holzapfel, W. H., 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **53**, 33-41.

Brenner, D. J., Fanning, G. R., Miklos, G. V., Steigerwalt, A. G., 1973. Polynucleotide sequence relatedness among *shigella* species. *International Journal of Systematic and Bacteriology* **23**, 1-7.

Bubb, W. A., Urashima, T., Fujiwara, R., Shinnai, T. Ariga, H., 1997. Structural characterization of the exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* OR901. *Carbohydrate Research* **301**, 41-50.

Cashion, P., Hodler-Franklin, M. A., McCully, J., Franklin, M., 1977. A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Analytical Biochemistry* **81**, 461-466.

Cavagna, M., Dell `Anna, R., Monti, F., Rossi, F., Torriani, S., 2010. Use of atr-ftir microspectroscopy to monitor autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells in a base wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 39-45.

Cerning, J., 1986. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait* **75**, 463-472.

Cerning, J., 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **87**, 113-130.

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeud, J. M., 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime- forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **76**, 692-699.

Cerning, J., 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait* **75**, 463-472.

Cheng, Y. M., Hong, T. Y., Liu, C. C., Meng, M., 2009. Cloning and functional characterization of a complex endo-beta-1,3-glucanase from *Paenibacillus sp.*. Applied Microbiology and Biotechnology **81**, 1051-1061.

Claussen, N. H., 1903. Études sur les bactéries dites sarcines et sur les maladies qu'elles provoquent dans la bière. Compte Rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg **6**, 64-83.

Coenen, T. M., Schoenmakers A. C., Verhagen, H., 1995. Safety evaluation of beta- glucanase derived from *Trichoderma reesei*: summary of toxicological data. Food and Chemical Toxicology **33**, 859-866.

Collins, C. H., Lyne, P. M., 1984. Microbiological Methods. Fifth Edition. Butterworth, London.

Coster, E., White, H. R., 1964. Further studies of the genus *Pediococcus*. Journal of General Microbiology **37**, 15-31.

Côté, F., El Ouakfaoui, S., Asselin, A., 1991. Detection of β -glucanase activity on various β - 1,3 and β -1,4- glucans after native and denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis **12**, 69-74.

Davis C. R., Wibowo, D. J., Fleet, G. H., Lee, T. H., 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. American Journal of Enology and Viticulture **39**, 137-142.

De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A., 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. European Journal of Biochemistry **12**, 133-142.

De Vuyst, L., Vanderveken, F., van de Ven, S., Degeest, B., 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth - associated biosynthesis. Journal of Applied Microbiology **84**, 1059-1068.

De Vuyst, L., Degeest, B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews **23**, 153-177.

Degeest, B., De Vuyst, L., 1999. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. Applied and Environmental Microbiology **65**, 2863-2870.

Degeest, B., Janssens, B., De Vuyst, L., 2001. Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 470-477.

Del Campo, G., Santos, J. I., Berregi, I., Velasco, S., Ibarburu, I., Dueñas, M. T., Irastorza, A., 2003. Ciders produced by two types of presses and fermented in stainless steel and wooden vats. *Journal of the Institute of Brewing* **109**, 342-348.

Dittrich, H. H., Großmann, M., 2005. *Mikrobiologie des Weines*. 3. Auflage. Ulmer, Stuttgart.

Doco, T., Wieruszeski, J.-M., Fournet, B., Carcano, D., Ramos, P. Loones, A., 1990. Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrate Research* **198**, 313-321.

Dols-Lafargue, M., Lee, H. Y., Le Marrec C., Heyraud, A., Chambat, G., Lonvaud- Funel, A., 2008. Characterization of *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genomes of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in wine. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 4079-4090.

Dols-Lafargue, M., Lonvaud-Funel, A., 2009. Polysaccharide production by grapes, must, and wine microorganisms. In: König, H., Uden, G., Fröhlich, J., (Hrsg). *Biology of Microorganismus on Grapes, in Must and Wine*. Springer- Verlag Berlin, Heidelberg. Seite 241-258.

Du Toit, M., Pretorius, I. S, 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal - a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* **21**, 74-96.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.

Dubourdiou, D., Ribereau- Gayon, P., Fournet, B., 1981. Structure of the extracellular β - D- glucan from *Botrytis cinerea*. *Carbohydrate Research* **93**, 294-299.

Dubourdiou, D., 1982. Recherche sur les polysaccharides sécrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. Thèse d'état, Université Bordeaux II, 37.

Dueñas M., Irastorza, A., Fernandez, K., Bilbao A., 1995. Heterofermentative lactobacilli causing ropiness in basque country ciders. *Journal of Food Protection* **58**, 76-80.

-
- Dueñas-Chasco, M. T., Rodriguez - Carvajal, M. A., Tejero, P., Franco - Rodriguez, G., Espartero, J. L., Irastorza - Iribas, A., Gil - Serrano, A. M.,** 1997. Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. Carbohydrate Research **303**, 453-458.
- Dueñas, M., Munduate, A., Perea, A., Irastorza, A.,** 2003. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. International Journal of Food Microbiology **87**, 113-120.
- Ebisu, S., Kato, K., Kotani, S., Misaki, A.,** 1975. Isolation and purification of *Flavobacterium* α -1,3-glucanase-hydrolyzing, insoluble, sticky glucan of *streptococcus mutans*. Journal of Bacteriology **124**, 1489-1501.
- Eder, R., Wendelin, S.,** 2002. Phenolzusammensetzung und antioxidative Kapazität von Trauben und Weinen. ALVA Jahrestagung Klosterneuburg, 293-296.
- Edman, P., Berg, G.,** 1967. A protein sequenator. European Journal of Biochemistry **1**, 80-91.
- El- Katatny, M. H., Gudelj, M., Robra, K. H., Elnaghy, M. A., Gübitz, G. M.,** 2001. Characterization of a chitinase and an endo- beta- 1,3,glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. Applied Microbiology and Biotechnology **56**, 137-143.
- Fang, Y., Takahashi, R., Nishinari, K.,** 2004. Rheological characterization of schizophyllan aqueous solutions after denaturation- renaturation treatment. Biopolymers **74**, 302-315.
- Fariña, J. I., Siñeriz, F., Molina, O. E., Perotti, N. I.,** 2001. Isolation and physicochemical characterization of soluble scleroglucan from *Sclerotium rolfsii*. Rheological properties, molecular weight and conformational characteristics. Carbohydrate Polymers **44**, 41-50.
- Felsenstein, J.,** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. Evolution **39**, 783-791.
- Fernandez, K., Dueñas M., Irastorza, A., Bilbao, A., Del Campo, G.,** 1995. Characterization and DNA plasmid analysis of ropy *Pediococcus* spp. strains isolated from basque country ciders. Journal of Food Protection **59**, 35-40.

Ferrer, P., Halkier, T., Hedegaard, L., Sawa, D., Diers, I., Asenjo, J. A., 1996. Nucleotide sequence of beta-1,3-glucanase isoenzyme IIA gene of *Oerskovia xanthineolytica* LL G109 (*Cellulomonas cellulans*) and initial characterization of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology **178**, 4751-4757.

Fleet, G. H., Phaff, H. J., 1974. Lysis of yeast cell walls: glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. Journal of Bacteriology **119**, 207-219.

Fleet, G. H., 1998. The microbiology of alcoholic beverages. Aus: Wood, B. J. (Editor), Microbiology of Fermented Foods (2. Auflage). Seite 217- 262. Blackie Academic & Professional, New York.

Forsén, R., 1966. Die Langmilch. Finnish Journal of Dairy Science **26**, 1-76.

Fugelsang, K. C., Edwards, C. G., 2007. Wine Microbiology. Practical Applications and Procedures. Springer Verlag, New York.

Gacto, M., Vicente - Soler, J., Cansado, J., Villa, T. G., 2000. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells. Journal of Applied Microbiology **88**, 961-967.

Gamar, L., Blondeau, K., Simonet, J. M., 1997. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* C83. Journal of Applied Microbiology **83**, 281-287.

Garai - Ibabe, G., Areizaga, J., Aznar, R., Elizaquivel, P., Prieto, A., Irastorza, A., Dueñas, M. T., 2010. Screening and selection of 2- branched (1,3)- β - D- Glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization. Journal of Agriculture and Food Chemistry **58**, 6149-6156.

Garvie, E. I., 1986. Genus *Pediococcus*. Aus: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Editoren), Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Band 2. Williams & Wilkins, Baltimore, Seite 1075-1079.

Gil-ad, N. L., Bar-Num, N., Mayer, A. M., 2001. The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea* effects on the distribution of enzyme activities. FEMS Microbiology Letters **199**, 109-113.

Grassi, M., Lapasin, R., Priel, S. A., 1995. A study of rheological behaviour of scleroglucan weak gel systems. *Carbohydrate Polymers* **29**, 169-181.

Gregoriou, V. G., Braiman, M. S., 2006. *Vibrational Spectroscopy of Biological and Polymeric Materials*. Taylor & Francis Group, London.

Grobben, G. J., Sikkema, J., Smith, M.R., de Bont, J. A. M., 1995. Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 103-107.

Grobben, G. J., Smith, M. R., Sikkema, J., de Bont, J. A. M., 1996. Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar nucleotides in *lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Applied Microbiology and Biotechnology* **46**, 279-284.

Guenet, J. M., 1992. *Thermoreversible gelation of polymers and biopolymers*. Academic Press San Diego, CA.

Günther, H. L., White, H. R., 1961. The cultural and physiological characters of the pediococci. *Journal of General Microbiology* **26**, 185-197.

Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X., Yang, H., Wang, Y., Song, W., 2005. Characterization of a novel plant growth- promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 66-76.

Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., 2005. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme-Verlag, Stuttgart.

Hoffmann, D., Müller, R. H., 2006. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) utilization by *Delftia acidovorans* MC1 at alkaline pH and in the presence of dichlorprop is improved by introduction of the *tfdk* gene. *Biodegradation* **17**, 263-273.

Hong, T. Y., Cheng, C. W., Huang, J. W., Meng, M., 2002. Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3-beta-glucan. *Microbiology* **148**, 1151-1159.

Huss, V. A. R., Festl, H., Schleifer, K. H., 1983. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology* **4**, 184-192.

Ibarburu, I., Soria- Diaz, M. E., Rodriguez- Carvajal, M. A., Velasco, S. E., Tejero Mateo, P., Gil-Serrano, A. M., Irastorza, A., Dueñas M., 2007. Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 477- 486.

Johnson, D. C., La Course, W. R., 1990. Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes. *Analytical Chemistry* **62**, 586-596.

Jørgensen, N. O. G., Brandt, K. K., Nybroe, O., Hansen, M., 2009. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan- degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan - degrading bacterium. *Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2195-2199.

Kang, D. H., Fung, D. Y. C., 1999. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 by stimulated *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology* **29**, 206-210.

Kanzawa, Y., Kurasawa, T., Kanegae, Y., Harada, A., Harada, T., 1994. Purification and properties of a new exo- (1→3)- β-D-glucanase from *Bacillus circulans* YK9 capable of hydrolysing resistant curdlan with formation of only laminari- biose. *Microbiology* **140**, 637-642.

Kennedy, J. A., Saucier, C., Glories, Y., 2006. Grape and wine phenolics: history and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture* **21**, 97-129.

Kimmel, S. A., Roberts, R. F., Ziegler, G. H. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 659-664.

Kleerebezem, M., van Kranenburg, R., Tuinier, R., Boels, I. C., Zoon, P., Looijesteijn, E., Hugenholtz, J., De Vos, W. M., 1999. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: From genetic engineering to improved rheological properties? *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 357-365.

Kolkman M. A., Van der Zeijst, B. A., Nuijten, P. J., 1998. Diversity of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **123**, 937-945.

Kojic, M., Vujcic, M., Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J., Topisirovic, L., 1992. Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. Applied and Environmental Microbiology **58**, 4086-4088.

Kyhse-Andersen, J., 1984. Elektroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. Journal of Biochemistry and Biophysical Methods **10**, 203-209.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685.

Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., Ribéreau- Gayon, P., 1983. Occurrence of lactic acid bacteria during different stages of the vinification and conservation of wines. Applied and Environmental Microbiology **46**, 874-880.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., 2007. Clustal W and Clustal _X version 2.0. Bioinformatics **23**, 2947-2948.

Leal, J. A., Ruperez, P., Gomez- Miranda, B., 1976. Ultrastructure of resting and germinating sclerotia of *Botrytis cinerea*. Transactions of the British Mycological Society.

Llaubères, R., Richard, B., Lonvaud, A., Dubourdiou, D., 1990. Structure of an exocellular β - D- glucan from *Pediococcus sp.* a wine lactic bacteria. Carbohydrate Research **203**, 103-107.

Llull, D., García, E., López, R., 2001. Tts, a processive β - glucosyltransferase of *Streptococcus pneumoniae*, directs the synthesis of the branched type 37 capsular polysaccharide in *Pneumococcus* and other gram- positive species. Journal of Biological Chemistry **276**, 21053-21061.

Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., 1988. Une altération bactérienne des vins : la maladie des vins filants. Sciences des aliments **8**, 33-49.

Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., Ledoux, O., 1991. Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non- isotopic DNA probes. Journal of Applied Bacteriology **71**, 501-508.

Lonvaud-Funel, A., Guilloux, O., Joyeux, A., 1993. Isolation of a DNA probe for identification of glucan-producing *Pediococcus damnosus* in wines. *Journal of Applied Bacteriology* **74**, 41-47.

Lonvaud - Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 317-331.

Luthi, H., 1957. Symbiotic problems relating to the bacterial deterioration of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **8**, 176-181.

Macura, D., Townsley, P. M., 1984. Scandinavian ropy milk- identification and characterization of endogenous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion. *Journal of Dairy Science* **67**, 735-744.

Magonov, N. Whangbo, M., 1998. *Surface Analyses with STM and AFM*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Mah T. F., O'Toole G. A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiology* **9**, 34-9.

Manca de Nadra, M. C., Strasser de Saad, A. M., 1995. Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *International Journal of Food Microbiology* **27**, 101-106.

Marieta, C., Ibarburu, I., Dueñas, M., Irastorza, A., 2009. Supramolecular structure and conformation of a (1→3)(1→2)-β- D- Glucan from *Lactobacillus suebicus* CUPV221 as observed by Tapping Mode Atomic Force Microscopy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **57**, 6183-6188.

Marmur, J., Doty, P., 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology* **5**, 109-118.

Marshall, V. M. E., Cowie, E. N. Moreton, R. S., 1995. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. *Journal of Dairy Research* **62**, 621-628.

Matsuda, S., Kawanami, Y., Takeda, H., Ooi, T., Kinoshita, S., 1997. Purification and properties of mutanase from *Bacillus circulans*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **83**, 593-595.

Matthews, A., Grabin, P. R., Jiranek, V., 2006. A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **12**, 235-244.

McIntosh, M., Stone, B., Stanisich, V. A., 2005. Curdlan and other bacterial (1→3)-β- D- glucans. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**, 163-173.

Mesbah, M., Premachandran, U., Whitmann, W., 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **39**, 159-167.

Mezger, T., 2000. *Das Rheologie-Handbuch*. Vincentz Verlag, Hannover.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426-428.

Miyanishi, N., Hamada, N., Kobayashi, C., Imada, C., Watanabe, E., 2003. Purification and characterization of a novel extracellular beta-1,3-glucanase produced by *Bacillus clausii* NM-1 isolated from ezo abalone *Haliotis discus hannai*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95**, 45-51.

Mongodin, E. F., Shapir, N., Daugherty, C., DeBoy, R. T., Emerson, J. B., Shvartzbeyn, A., Radune, D., Vamathevan, J., Riggs, F., Grinberg, V., Khouri, H., Wackett, L. P., Nelson, K. E., Sadowsky, M. J., 2006. Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurensces* TC1. *PLoS Genetics* **2**, e214.

Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hebert, E. M., van der Meulen, R., Moreno, M. R. F., Font de Valdez, G., De Vuyst, L., 2006. Diversity of heteropolysaccharide- producing lactic acid bacteria strains and their biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 4431-4435.

Nakajima, H., Toyoda, S., Toba, T., Itoh, T., Mukai, T., Kitazawa, H., Adachi, S., 1990. A novel phosphopolysaccharide from slime- forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495. *Journal of Dairy Science* **73**, 1472-1477.

Nakajima, H., Hirota, T., Toba, T., Itoh, T., Adachi, S., 1992. Structure of the extracellular polysaccharide from slime- forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydrate Research* **224**, 245-253.

Nowak C., Lüning C., Naumann R. L. C., Knoll W., 2009. A two-layer gold surface with improved surface-enhancement for spectro-electrochemistry using surface-enhanced infrared absorption spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **63**, 1068-1074.

Okazaki, K., Nishimura, N., Matsuoka, F., Hayakawa, S., 2007. Cloning and characterization of the gene encoding endo-1,3-glucanase from *Arthrobacter sp.* NHB-10. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **71**, 1568-1571.

Osborne, J.P., Edwards, C.G., 2005. Bacteria in winemaking. *Advances in Food and Nutrition Research* **50**, 139-177.

Pfannebecker, J., Fröhlich, J., 2008. Use of a species-specific PCR for the identification of pediococci. *International Journal of Food Microbiology* **128**, 288-296.

Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., Cerning, J., 2000. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2302-2310.

Pielken, P., Stahmann, P., Sahn, H., 1990. Increase in glucan formation by *Botrytis cinerea* and analysis of the adherent glucan. *Applied Microbiology and Biotechnology* **33**, 1-6.

Pleszczyńska, M., Marek-Kozaczuk, M., Wiater, A., Szczodrak, J., 2007. *Paenibacillus* strain MP-1: a new source of mutanase. *Biotechnology Letters* **29**, 755-759.

Rehm, H., 2002. *Der Experimentator : Proteinbiochemie/Proteomics*. 4., überarbeitete Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.

Rehm, H., 2006. *Der Experimentator: Biochemie/ Proteomics*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.

Ribéreau - Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B., Lonvaud, A., 2006. *Handbook of Enology. Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinification*. 2. Auflage. John Wiley & Sons, New York.

Roberts, C. M., Fett, W. F., Osman, S. F., Wijey, C., O'Connor, J. V. Hoover, D. G., 1995. Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 463-468.

- Robijn, G. W., van den Berg, D. J. C., Haas, H., Karnerling, J. P., Vliegthart, J. F. G.,** 1995. Determination of the structure of the exopolysaccharides produced by *Lactococcus sake* 0-1. Carbohydrate Research **276**, 117-136.
- Robijn, G. W., Gutiérrez Gallego, R., Van den Berg, D. J. C., Haas, H., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G.,** 1996. Structural characterization of the exopolysaccharides produced by *Lactococcus acidophilus* LMG9433. Carbohydrate Research **288**, 203-218.
- Saitou, N., Nei, M.,** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution **4**, 406-425.
- Sakamoto, K., Konings, W. N.,** 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. International Journal of Food Microbiology **89**, 105-124.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.,** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science **74**, 5463-5467.
- Schäfer, A., Konrad, R., Kuhnigk, T., Kämpfer, P., Hertel, H., König, H.,** 1996. Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. Journal of Applied Bacteriology **80**, 471-478.
- Schiller, M.,** 2002. Analytik und technologische Optik von Filmentabletten mit Extrakten von *Eschscholtzia californica cham.*. Dissertation Universität Tübingen.
- Shibasaki, S., Okada, J., Nakayama, Y., Yoshida, T., Ueda, M.,** 2008. Isolation of bacteria which produce yeast cell wall-lytic enzymes and their characterization. Biocontrol Science **13**, 91-96.
- Shigematsu, T., Yumihara, K., Ueda, Y., Numaguchi, M., Morimura, A., Kida, K.,** 2003. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology **53**, 1479-1483.
- Shimizu, J., Wada, M., Takita, T., Innami, S.,** 1999. Curdlan and gellan gum, bacterial gel-forming polysaccharides, exhibit different effects on lipid metabolism, cecal fermentation and fecal bile acid excretion in rats. Journal of Nutritional Science and Vitaminology **45**, 251-262.
- Simpson, W. J., Taguchi, H.,** 1995. The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. Aus: Wood, B.J.B. und Holzappel, W.H. (Hrsg). The Genera of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic & Professional, London. Seite 125-172.

Sly, L. J., Wen, A., Fegan, M., 2005. Genus IV. *Delftia*. Aus: Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (Editoren), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Band 2. Williams and Wilkins. Baltimore, MD, Seite 706-709.

Stackebrandt, E., Goebel, B. M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic and Bacteriology **44**, 846-849.

Stahmann, K. P., Pielken, P., Schimz, K. L., Sahn, H., 1992. Degradation of extracellular β -(1,3)(1,6)-D-glucan by *Botrytis cinerea*. Applied and Environmental Microbiology **58**, 3347-3354.

Stewart, B. J., Leatherwood, J. M., 1976. Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. Journal of Bacteriology **128**, 609-615.

Stingle, F., Neeser, J. R., Mollet, B., 1996. Identification and characterization of the eps (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. Journal of Bacteriology **178**, 1680-1690.

Sutherland, I. W., 1986. Industrially useful microbial polysaccharides. Microbiology Science **3**, 59.

Sutherland, I. W., 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge University Press, New York, USA. 163.

Torino, M. I., Sesma, F., Font de Valdez, G., 2000. Semidefined media for the exopolysaccharide (EPS) production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 and evaluation of the components interfering with the EPS quantification. Milchwissenschaft **55**, 314-316.

van den Berg, D. J. C., Smits, A., Pot, B., Ledebor, A. M., Kersters, K., Verbrakel, J. M. A., Verrips, C. T., 1993. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. Food Biotechnology **7**, 189-205.

van den Berg, D. J. C., Robijn, G. W. Janssen, A. C. Giuseppin, M. L. F., Vreeker, R., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., Ledebor, A. M., Verrips, C. T., 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. Applied and Environmental Microbiology **61**, 2840-2844.

-
- van Oevelen, D., Verachtert, H.,** 1979. Slime production by brewery strains of *Pediococcus cerevisiae*. Journal of American Society of Brewing Chemists **37**, 34-37.
- Velasco, S., Årsköld, E., Paese, M., Grage, H., Irastorza, A., Rådström, P., van Niel, E. W. J.,** 2006. Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. International Journal of Food Microbiology **111**, 252-258.
- Velasco, S. E., Yebra, M. J., Mondero, V., Ibabure, I., Dueñas, M. T., Irastorza A.,** 2007. Influence of the carbohydrate source on β -glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6. International Journal of Food Microbiology **115**, 325-334.
- Velasco, S., Areizaga, J., Irastorza A., Dueñas, M. T., Santamaria, A., Muñoz, M.,** 2009. Chemical and rheological properties of the β -glucan produced by *Pediococcus parvulus* 2.6. Journal of Agriculture and Food Chemistry **57**, 1827-1834.
- Vernhet, A., Pellerin, P., Belleville, M. P., Planque, J., Moutounet, M.,** 1999. Relative impact of major wine polysaccharides on the performances of an organic microfiltration membrane. American Journal of Enology and Viticulture **50**, 51-56.
- Walling, E., Gindreau, E., Lonvaud- Funel, A.,** 2005. A putative glucan synthase gene dps detected in exopolysaccharide- producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. International Journal of Food Microbiology **98**, 53-62.
- Watanabe, H., Sato, T., Yoshioka, S., Koshijima, T., Kuwahara, M.,** 1992. Purification and properties of *Aspergillus niger* beta-glucosidase. European Journal of Biochemistry **209**, 651-659.
- Watanabe, H., Takase, A., Tokuda, G., Yamada, A., Lo, N.,** 2006. Symbiotic archaezoa of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis* still play a role in cellulase production. Eukaryotic Cell **5**, 1571-1576.
- Wayne, L. G., Brenner, D. L., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., More, W. E. C., Murray, R.,** 1987. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. International Journal of Systematic and Bacteriology **37**, 463-464.
- Weiller, H. G., Radler, F.,** 1970. Milchsäurebakterien aus Wein und von Rebenblättern. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene II **124**, 707-732.
-

Weiller, H. G., Radler, F., 1976. Über den Aminosäurestoffwechsel von Milchsäurebakterien aus Wein. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchungen und Forschung **161**, 259-266.

Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Chakraborty, S., Sly, L. I., 1999. Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen.nov., comb. Nov. International Journal of Systematic and Bacteriology **49**, 567-576.

Wenzel, M., Schönig, I., Berchtold, M., Kämpfer, P., König, H., 2002. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. Journal of Applied Microbiology **92**, 32-40.

Werning, M. L., Ibarburu, I., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Navas, J., López, P., 2006. *Pediococcus parvulus* gtf gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application of specific PCR detection of β -D-Glucan-producing bacteria in foods and beverages. Journal of Food Protection **69**, 161-169.

Werning, M. L., Corrales, M. A., Prieto, A., Fernández de Palencia, P., Navas, J. López, P., 2008. Heterologous expression of a position 2- substituted (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan in *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology **74**, 5259-5262.

Wetmur, J. G., Davidson, N., 1968. Kinetics of renaturation of DNA. Journal of Molecular Biology **31**, 349-370.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H., Lee, T. H., 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine – a review. American Journal of Enology and Viticulture **36**, 302-313.

Wiesendanger, R., 1996. Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy. Cambridge University Press.

Wiesendanger, R., 1998. Scanning Probe Microscopy. Springer Verlag, Berlin.

Wucherpfennig, K., Dietrich, H., Fauth, R., 1984. Über den Einfluß von Polysacchariden auf die Klärung und Filterbarkeit von Weinen unter besonderer Berücksichtigung des *Botrytis glucans*. Deutsche Lebensmittelrundschaue **80**, 38-44.

Yamamoto, Y., Murosaki, S., Yamauchi, R., Kato, K., Sone, Y., 1994. Structural study on an exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* TY 1-2. Carbohydrate Research **261**, 67-78.

Zhang, L. L., He, D., Chen, J. M., Liu, Y., 2010. Biodegradation of 2-chloroaniline, 3-chloroaniline, and 4-chloroaniline by a novel strain *Delftia tsuruhatensis* H1. *Journal of Hazardous Materials* **179**, 875-882.

Verwendete Webadressen:

<http://lucas.lakeheadu.ca/luil/nuclear-magnetic-resonance-nmr-facility/>

8. Anhang

8.1. Ribosomale Gensequenzen (16S rDNA-Sequenzen)

Pediococcus parvulus B399 (972 bp)

GGAAGTCCCGGCGTCTATACATGCAAGTCGAACGCACTTTCGTTGAATGAATTAGAGGTGCTTGCACCG
AAGATGATTTTAGCTATAAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGTGG
GGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAAAGTAAACCGCATGGTTTACTTTTAAAAGA
TGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGGAGATAAAGGCTCACCAA
GGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT
GAAGGCTTTAGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAAGTGTGTGAGAGTAACTGCTCATGCAGTG
ACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
TTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCT
TAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCT
GAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGC
TAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTTCG
AAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGG
GGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGGAGATGTTGGGGTAAAGTTCCGC
ACGAGCGCACCATATATAGTGCCAGCATAGTGGCACTCTAGTGAGACTGCGTGACCACGAGAGGTGGGA
CGACGTCAACACATGCCTTATGACCTGGCTACCACGTGCTACAATGGAACGTACAC

Delftia sp. MV01

> 4_Eubak3 -- 17..956 of sequence (940 bp)

TTGTTACGACTTCACCCCAGTCACGAACCCCGCCGTGGTAAGCGCCCTCCTTGCGGTTAGGCTACCTAC
TTCTGGCGAGACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGAACGTATTCACCGCGA
CATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTGCAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTAC
GACTGGTTTTATGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCCTCTGTACCAGCCATTGTATGACGTG
TGTAGCCCCACCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTTGTCACCGGCA
GTCTCATTAGAGTGCTCAACTGAATGTAGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGCAGGTTCTCTTTCGAGCACGAA
TCCATCTCTGGAAACTTCCCTGCCATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCA
CATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTCAACCTTGGCGCCGTACTCCCCAG
GCGGTCAACTTACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGAAAATAATTCCCAACAACCAGTTGACATCGTTTA
GGGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACAGG
TCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATT
CCATCCCCCTCTACCGTACTCTAGCCATGCAGTCACAAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTC
ACATCTGTCTTACATAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGT

> Eubak5 (940 bp)

CATGCAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAAC
GTGCCAGTCGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAAGCG
GGGGACCTTCGGGCCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAAGCTT
ACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGC
AGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTCCTTCTAATACAGGGGGC
CCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGC
GAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGTGACTGCATGGCTAGAGTACGGTAGAGGGGGATGGAATTCGCGG
TGTAGCAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGTACTG
ACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATG
TCAACTGGTTGTTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAAT
TCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGG

Komplette Sequenz MV01 (1440 bp)

TTGTTACGACTTCACCCCAGTCACGAACCCCGCCGTGGTAAGCGCCCTCCTTGCGGTTAGGCTACCTAC
TTCTGGCGAGACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGA
CATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTAC
GACTGGTTTTATGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTACCAGCCATTGTATGACGTG
TGTAGCCCCACCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCA
GTCTCATTAGAGTGCTCAACTGAATGTAGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGCAGGTTCTCTTTCGAGCACGAA
TCCATCTCTGGAAACTTCCTGCCATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCA
CATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGGCGCCGTAATCCCAG
GCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGAAAACCTAATCCCAACAACCAGTTGACATCGTTTA
GGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACAGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACAGG
TCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTTCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATT
CCATCCCCCTCTACCGTACTCTAGCCATGCAGTCACAAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCCGGGATTTC
ACATCTGTCTTACATAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTAC
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATGGGCCCCCTGT
ATTAGAAGGAGCTTTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCTGCACGCGGC
ATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAAATTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCG
TGCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCTGCTCTCAGACCAGCTACAGATCGTTCGGCTTGGTAAGCTTTTA
TCCCACCAACTACCTAATCTGCCATCGGCCGCTCCAATCGCGCGAGGCCCGAAGGTCCCCCGCTTTCAT
CCTCAGATCGTATGCGGTATTAGCTACTCTTTCGAGTAGTTATCCCCACGACTGGGCACGTTCCGATG
TATTACTACCCGTTTCGCCACTCGTCAGCGTCCGAAGACCTGTTACCGTTTCGACTGCATG

8.2. 16S rRNA Sequenzen zur Stammbaumerstellung

Neisseria gonorrhoeae (1544 bp)

TGAACATAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCCGACG
GCAGCACAGGGAAGCTTGCTTCTCGGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACATATCGGAACGTACCG
GGTAGCGGGGGATAACTGATCGAAAGATCAGCTAATACCGCATACTGCTTTGAGAGGGAAAAGCAGGGGAC
CTTCGGGCCTTGCGCTATCCGAGCGGCCGATATCTGATTAGCTGGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAG
CGCAGATCAGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTCTGAAG
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGGACTTTTGTACAGGGAAGAAAAGGCTGTTGCCAATATCGGCGGCCGATGA
CGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGGGCGCAGACGGTTACTTAAGCAGGATGTGAAATCCCCGGGCTC
AACCCGGGAACTGCGTTCTGAACTGGGTGACTCGAGTGTGTGAGAGGGAGGTGGAATCCACGTGTAGC
AGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCTCCTGGGATAACACTGACGTTT
ATGTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAATT
AGCTGTTGGGCAACTTGATTGCTTGGTAGCGTAGCTAACGCGTGAAATTGACCGCCTGGGGAGTACGGT
CGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTTTTGACATGTGCGGAATCCTCCGGAGACGGAGGAGTGCCCTCGGG
AGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCTTGTCAATTAGTTGCCATCATTCGGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAGCC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGACCAGGGCTTACACGTCATAACAATGG
TCGGTACAGAGGGTAGCCAAGCCGCGAGGCGGAGCCAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCA
CTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGT
TCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGGGATACCAGAAGTAGGTAGGGTAACC
GCAAGGAGTCCGCTTACCACGGTATGCTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGA
ACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT

Comamonas badia (1496 bp)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCCGAACGGCAGCGCG
TCCTTCGGGATGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAAGCATCGGAACGTGCCCGGTAGTGCGGGATA
GCTCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATGAGATCCGAGGATGAAAGCAGGGGACCCGCAAGGCCCTTG
CGCTACTGGAGCGGCCGATGTCAGATTAGTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGCCTGCGATCTGT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCGAACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGG
TTGTAACCTGCTTTTGTACGGAACGAAAAGCCTCTCTTTAATAAATGGGGGTGATGACGGTACCCTAAG
AATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGCTTGTGCAAGACAGTGGTGAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT
GCCATTGTGACTGCAAGGCTGGAGTGCGGCAGAGGGGGATGGAATTCGCGTGTAGCAGTGAATGCGC
AGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCGGGCTGCACTGACGCTCATGCACGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGGA
TTAACTTTCTCAGTAACGAAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAAAA
CCTTACCCACCTTTGACATGTATGGAATCCCGAAGAGATTTGGGAGTGTCTCGCAAGAGAGCCATAACAC
AGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTGCCATCAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTGATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATAACAATGGCTGGTACAAAGGGTTG
CCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTG
CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGCATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACA
CACCGCCGTCACACCATGGGAGCGGGTCTCACCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTA
CCACGGTGGGGTTCTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT

***Delftia tsuruhatensis* (1492 bp)**

TGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACGGG
 TGAGTAATACATCGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATA
 GATCTGAGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCCCTCGCGGATTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAG
 TTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGA
 TCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCT
 CCTTCTAATACAGGGGGCCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTATGTAA
 GACAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGTGACTGCATGGCTAGAGTACGGTAGA
 GGGGATGGAATTCGCGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAA
 TCCCTGGACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAA
 GTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGG
 TGGATGATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCC
 AGAGATGGATTTCGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCT
 GAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCTACATTCAGTTGAGCACTC
 TAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATAGGT
 GGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATA
 AAACCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGG
 ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACACGCGGTACACACCATGGGAGCGGGT
 CTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTACCACGGCAGGGGTACGTGACTGGGGTGA
 AAGTCGTAAACAAGGTAAACGGTAGGCTAGCCAGGAATTCGAA

***Comamonas denitrificans* (1442 bp)**

TGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTTCGGGATGCTGACGAGTGGCGAACG
 GGTGAGTAATACATCGAACGTGCCTAGTAGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTGGCTAATACCGCAT
 GAGATCTATGGATGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGTGCTACTAGAGCGGCTGATGGCAGATTAGGT
 AGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCTACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTG
 GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGGAAACCCT
 GATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAGT
 CTTGGGTTAATACCCTGGGATCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTTGT
 AAGACAGTGGTAAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCATTGTGACTGCAAGGCTGGAGTGC GGCA
 GAGGGGATGGAATTCGCGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGC
 AATCCCTGGGCCCTGCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
 AGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTGGGAATTTATTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCGTG
 AAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC
 GGTGGATGATGTTCTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCACCTTTGACATGTATGGAATCCT
 TTAGAGATGAAGGAGTGCTCGAAAGAGAGCCATAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
 GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTA
 ATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATAGGTGG
 GGCTAGAAAACGTCATACAATGGCCGGTACAAAGGGTAGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCATAAA
 GCCGGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGAT
 CAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGCGGGTCTC
 GCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTACCACGGCGGGGTTTCGTGACTGGGG

***Comamonas nitratorans* (1498 bp)**

ACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCG
AACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCTAGTAGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTGGCTAATACC
GCATGAGATCTATGGATGAAAGCAGGGGACCTTAGGGCCTTGTGCTACTGGAGCGGCCGATGGCAGATT
AGGTAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAA
GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAACGAA
AAGCCTCTCTCTAATACAGGGGGGTGATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTT
TTGTAAGACAGTGGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATGCCATTGTGACTGCAAGGCTGGAGTGC
GGCAGAGGGGGATGGAATTCGCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGA
AGGCAATCCCCTGGGCCTGCACTGACGCTCATACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGGATTTATTTCTTCAGTAACGAAGCTAACG
CGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGTTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAC
AAGCGGTGGATGATGTTCTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGTACGGAA
TCCTTTAGAGATAGAGGAGTGTCTCGAAAGAGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCG
TGCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACGAAAGGGCAC
TCTAATGGGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTATAG
GTGGGGCTAGAAACGTCATACAATGGCCGGTACAAAGGGTTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCA
TAAAGCCGGTTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTTCGGAATCGCTAGTAATCGT
GGATCAGCATGTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCCGTACACCATGGGAGCGGG
TCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTACCACGGCGGGGTTTCGTGACTGGGGTGA
AGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

***Comamonas terrigena* (1519 bp)**

TTTCATAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGC
AGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCAGTTGTGG
GGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATGAGAAGTGGAGTTGAAAGCAGGGGATCGCAAGAC
CTTGCGCAACTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAGGCTTACCAAGCCGACGAT
CTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATTTGGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGCCTT
CGGGTTGTAAACTGCTTTGGTACGGAACGAAAAGCTTCGGGTTAATACCCTGGAGTCATGACGGTACCG
TAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTCTTGTAAAGACAGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCCTTTGTGACTGCAAGGCTGGAGTGCAGGAGGGGGATGGAATTCGCGGTGTAGCAGTGAAT
GCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGGCCTGCACTGACGCTCATGCACGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTG
GGTCTTAACTGACTCAGTAACGAAGCTAACCGTGAAGTTGACCCCTGGGGAGTACGGCCCCAAGGTT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGA
AAAACCTTACCCACCTTTGACATATACGGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGTCTCGAAAGAGAGCCGTA
ACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCA
ACCCTTGCCATTAGTTGATACGAAAGGGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAGG
GTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
ACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTG
TACACACCCCGCTCACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGTAAGGAGGGCG
CTTACCACGGCGGGGTTTCGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGG
A

***Comamonas testosteroni* (1536 bp)**

CGAACTATAGAGTTTGGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCTTTACACATGCAAGTCGAACG
GTAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCTAGTAGTGG
GGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATGAGATCTACGGATGAAAGCAGGGGACCTTCGGGC
CTTGTGCTACTAGAGCGGCTGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGCCTGCGAT
CTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCT
CGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAAACGAAAAGCCTGGGGCTAATATCCCCGGGTGCATGACGGTACCG
TAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGAGCGGTTTGTAAAGACAGTGGTGAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCCATTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCAGGAGGGGGATGGAATTCGCGTGTAGCAGTGAAAT
GCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGGCCTGCACTGACGCTCATGCACGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTG
GGTCTTAACTGACTCAGTAACGAAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTT
GAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGA
AAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGTCTGAAAAGAGAACCTGC
ACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCA
ACCCTTGCCATTAGTTGCTACATTCAGTTGAGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTACATAAATGGCTGGTACA
AAGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCATAAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAA
CTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCGGGGT
CTTGACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGTAAGGAG
GGCGTTACCACGGCGGGTTCTGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGG
CTGGATCACCTCCTTTCT

***Delftia lacustris* (1534 bp)**

GAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGT
CTTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACT
ACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCCTCGCGGA
TTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTG
GTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATTTTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTA
AACTGCTTTTGTACGGAAACGAAAAGCTCCTTCTAATACAGGGGGCCCATGACGGTACCGTAAGAATAA
GCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
CGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGTCATT
TGTGACTGCATGGCTAGAGTACGGTAGAGGGGGATGGAATTCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATA
TGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGTAAGTGCAGCTCATGCACGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGAATTAGT
TTTCTCAGTAACGAAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTA
CCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCCAGAGATGGATTCGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTG
CTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGT
ATTAGTTGCTACATTCAGTTGAGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTACATAAATGGCTGGTACAGAGGGTTGC
CAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCATAAAACCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGC
GTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACAC
ACCGCCCGTACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAAGGAGGGCGCCTTA
CCACGGCGGGGTTCTGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCA
CCTCCTTAAAGCTTGGA

***Comamonas koreensis* (1464 bp)**

CTGGCGGCATGCTTTACACATGCAAGTCAACCGGTAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGAACGG
GTGAGTAACACATCGGAACGTGCCTAGTAGTGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATG
AGATCTAAGGATGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTACTAGAGCGGCTGATGGCAGATTAGGTA
GTTGGTGGGATAAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACNNGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGNCTG
ATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAGAC
NTTTTCTAATAAAGAGGGTCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTATGTA
AGACAAAAGGTGAAATCCCCGGGCTTCAACCTGGGAACGGCCTTTGTGACTGCATAGCTAGAGTACGGT
AGAGGGGGATGGAATTCGCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGG
CAATCCCCTGGACCTGNACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGG
TAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTGTGGGAATTAACCTTCTCAGTAACGAAAGCTAACGCGT
GAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG
CGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGTACGGAAGTG
ACCAGAGATGGACATGTGCTCGAAAGAGAACCCTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGTCTGTT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCT
AATGGGACTGCCGCTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATAGGTG
GGGCTACACACGTCATAAATGGCTGGTACAAAGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAA
AGCCAGTCTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGA
TCAGAATGTCAGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGCGGGTCT
CGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGNAAGGAGGGCGCTTACCACGGCGGGGTTGCTGACTGGGGTGAAGT
CGTAACAAGGTAGCC

***Comamonas acidovorans* (1522 bp)**

AGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCAACCGGTAACAGGT
TTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCAGTTCGTGGGGGATAACTA
CTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCGAT
TGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGG
TCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
ACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAGGCTTCTCCTAATACGAGAGGCCATTGACGGTACCGTAAGAATAAG
CACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
GTAAAGCGTGCAGGCGGTTATGTAAGACAGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATTT
NTAACTGCATGGCTAGAGTACGGTAGAGGGGGATGGAATTCGCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATAT
GCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGTCAACTGGTTGTGGGAATTAGTT
TTCTCAGTAACGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTAC
CCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTCCAGAGATGGATTGCTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGC
TGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTC
TTAGTTGCTACATTTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATAAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCC
AACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAACAGTCTGATGCGGTTTCGAGTCTGCAACTCGACTGCG
TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACA
CCGCCGTCACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTATC
ACGGCGGGGTTTGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGATTCGGAAGGTGCGGCTGGATCACC
TCCT

Sequenzalignment zur Stammbaumerstellung

```

Comamonas_badia          -----AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCT 42
Comamonas_terrigena     --TTTCATAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCT 48
Comamonas_denitrificans -----TGGCGGCATGCCT 13
Comamonas_nitrativorans -----ACGCTGGCGGCATGCCT 17
Comamonas_testosteroni  CGAATATAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCT 50
Comamonas_koreensis     -----CTGGCGGCATGCCT 14
Delftia_lacustris       -----GAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCT 41
Comamonas_acidovorans   -----AGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCT 40
Delftia_tsuruhatensis   -----TGGCGGCATGCCT 13
Neisseria_gonorrhoeae   TGAACATAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCT 50
MV01                     -----TTGTTACGACTTCACCCAGTCACGAACCC 30
                                * * *

```

```

Comamonas_badia          TACACATGCAAGTCTGAACGGCAGCGGTC----CTTCGGGAT--GGCGGC 86
Comamonas_terrigena     TACACATGCAAGTCTGAACGGCAGCACGGA----CTTCGGTCT--GGTGGC 92
Comamonas_denitrificans TACACATGCAAGTCTGAACGGTAAACAGGTC----TTTCGGGAT--GCTGAC 57
Comamonas_nitrativorans TACACATGCAAGTCTGAACGGCAGCACGGA----CTTCGGTCT--GGTGGC 61
Comamonas_testosteroni  TACACATGCAAGTCTGAACGGTAAACAGGT-----CTTCGG-AT--GCTGAC 92
Comamonas_koreensis     TACACATGCAAGTCTGAACGGTAAACAGGT-----CTTCGG-AT--GCTGAC 56
Delftia_lacustris       TACACATGCAAGTCTGAACGGTAAACAGGT-----CTTCGG-AC--GCTGAC 83
Comamonas_acidovorans   TACACATGCAAGTCTGAACGGTAAACAGGT-----CTTCGG-AC--GCTGAC 82
Delftia_tsuruhatensis   TACACATGCAAGTCTGAACGGTAAACAGGT-----CTTCGG-AC--GCTGAC 55
Neisseria_gonorrhoeae   TACACATGCAAGTCTGGACGGCAGCACAGGGAAGCTTGCTTCTCGGGTGGC 100
MV01                     CGCCGTGGTAAGCGCCCTCCTTGCGGTTAG--GCTACTACT--TCTGGC 76
                                * * *** * * *

```

```

Comamonas_badia          GAGTGGCGAACGGGTGA-GTAAAGCATCGGAACGTGCCGGTAGTGCGGG 135
Comamonas_terrigena     GAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGGAACGTGCCAGTTGTGGGGG 141
Comamonas_denitrificans GAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGGAACGTGCCAGTAGTAGTGGGGG 106
Comamonas_nitrativorans GAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGGAACGTGCCAGTAGTAGTGGGGG 110
Comamonas_testosteroni  GAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGGAACGTGCCAGTAGTAGTGGGGG 141
Comamonas_koreensis     GAGTGGCGAACGGGTGA-GTAACACATCGGAACGTGCCAGTAGTAGTGGGGG 105
Delftia_lacustris       GAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGGAACGTGCCAGTCTGTGGGGG 132
Comamonas_acidovorans   GAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGGAACGTGCCAGTCTGTGGGGG 131
Delftia_tsuruhatensis   GAGTGGCGAACGGGTGA-GTAATACATCGGAACGTGCCAGTCTGTGGGGG 104
Neisseria_gonorrhoeae   GAGTGGCGAACGGGTGA-GTAACATATCGGAACGTACCGGGTAGCGGGGG 149
MV01                     GAGACCCGCTCCCATGGTGTGACG-GGCGGTGTGTACAAGACCCGGAAC 125
                                *** ** * ** * * *** ** *

```

```

Comamonas_badia          ATAGCTCGG-CGAAAGCCGGATTAATACCGCATGAGATCCGAGGATGAAA 184
Comamonas_terrigena     ATAACTACT-CGAAAGAGTAGCTAATACCGCATGAGAACTGAGGTTGAAA 190
Comamonas_denitrificans ATAACTACT-CGAAAGAGTGGCTAATACCGCATGAGATCTATGGATGAAA 155
Comamonas_nitrativorans ATAACTACT-CGAAAGAGTGGCTAATACCGCATGAGATCTATGGATGAAA 159
Comamonas_testosteroni  ATAACTACT-CGAAAGAGTAGCTAATACCGCATGAGATCTACGGATGAAA 190
Comamonas_koreensis     ATAACTACT-CGAAAGAGTAGCTAATACCGCATGAGATCTAAGGATGAAA 154
Delftia_lacustris       ATAACTACT-CGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAA 181
Comamonas_acidovorans   ATAACTACT-CGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAA 180
Delftia_tsuruhatensis   ATAACTACT-CGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAA 153
Neisseria_gonorrhoeae   ATAACTGAT-CGAAAGATCAGCTAATACCGCATAACGATCTTGAGAGGGAAA 198
MV01                     GTATCACCGCGACATGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCAC 175
                                ** *** * * *

```

Anhang

Comamonas_badia	GCAGGGGACCCGCAAGGGCCTTGCGC--TACTGGAGCGGCCGATGTCAGA	232
Comamonas_terrigena	GCAGGGGATC-GCAAGA-CCTTGCGC--AACTGGAGCGGCCGATGGCAGA	236
Comamonas_denitrificans	GCAGGGGACC--TTCGGGCCTTGTC--TACTAGAGCGGCTGATGGCAGA	201
Comamonas_nitratorans	GCAGGGGACC--TTAGGGCCTTGTC--TACTGGAGCGGCCGATGGCAGA	205
Comamonas_testosteroni	GCAGGGGACC--TTCGGGCCTTGTC--TACTAGAGCGGCTGATGGCAGA	236
Comamonas_koreensis	GCAGGGGACC--TTCGGGCCTTGCGC--TACTAGAGCGGCTGATGGCAGA	200
Delftia_lacustris	GCGGGGACC--TTCGGGCCTCGCGC--GATTGGAGCGGCCGATGGCAGA	227
Comamonas_acidovorans	GCGGGGACC--TTCGGGCCTCGCGC--GATTGGAGCGGCCGATGGCAGA	226
Delftia_tsuruhatensis	GCGGGGACC--TTCGGGCCTCGCGC--GATTGGAGCGGCCGATGGCAGA	199
Neisseria_gonorrhoeae	GCAGGGGACC--TTCGGGCCTTGCGC--TATCCGAGCGGCCGATATCTGA	244
MV01	GCAGTCGAGT--TGCAGACTGCGATCCGGACTACGACTGGTTTTATGGGA	223
	** * ** * * * * * * * *	
Comamonas_badia	TTAGGTAGT--TGGTGAGGATAAAGGCTACCAAGCCTGCGATC-TGTAGC	279
Comamonas_terrigena	TTAGGTAGT--TGGTGGGATAAAGGCTTACCAAGCCGACGATC-TGTAGC	283
Comamonas_denitrificans	TTAGGTAGT--TGGTGGGATAAAGGCTTACCAAGCCTACGATC-TGTAGC	248
Comamonas_nitratorans	TTAGGTAGT--TGGTGGGATAAAGGCTTACCAAGCCGACGATC-TGTAGC	252
Comamonas_testosteroni	TTAGGTAGT--TGGTGGGATAAAGGCTTACCAAGCCTGCGATC-TGTAGC	283
Comamonas_koreensis	TTAGGTAGT--TGGTGGGATAAAGGCTTACCAAGCCGACGATC-TGTAGC	247
Delftia_lacustris	TTAGGTAGT--TGGTGGGATAAAGGCTTACCAAGCCGACGATC-TGTAGC	274
Comamonas_acidovorans	TTAGGTAGT--TGGTGGGATAAAGGCTTACCAAGCCGACGATC-TGTAGC	273
Delftia_tsuruhatensis	TTAGGTAGT--TGGTGGGATAAAGGCTTACCAAGCCGACGATC-TGTAGC	246
Neisseria_gonorrhoeae	TTAGCTGGT--TGGCGGGATAAAGGCCACCAAGGCACGATC-AGTAGC	291
MV01	TTAGCTCCCCCTCGCGGTTGGCAACCCTCTGTACCAGCCATTGTATGAC	273
	**** * * * * * * * * * * *	
Comamonas_badia	TGGTCTGAGAGGATG-ATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCCGAAC	328
Comamonas_terrigena	TGGTCTGAGAGGACG-ACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGAC	332
Comamonas_denitrificans	TGGTCTGAGAGGACG-ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGAC	297
Comamonas_nitratorans	TGGTCTGAGAGGACG-ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGAC	301
Comamonas_testosteroni	TGGTCTGAGAGGACG-ACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGAC	332
Comamonas_koreensis	TGGTCTGAGAGGACG-ACNNGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGAC	296
Delftia_lacustris	TGGTCTGAGAGGACG-ACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGAC	323
Comamonas_acidovorans	TGGTCTGAGAGGACG-ACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGAC	322
Delftia_tsuruhatensis	TGGTCTGAGAGGACG-ACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGAC	295
Neisseria_gonorrhoeae	GGTCTGAGAGGATG-ATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGAC	340
MV01	GTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACC	323
	** * * * * * * * * * *	
Comamonas_badia	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAAGCCTGA	378
Comamonas_terrigena	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGGACAATGGGCGAAAGCCTGA	382
Comamonas_denitrificans	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGGAAACCCTGA	347
Comamonas_nitratorans	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAAGCCTGA	351
Comamonas_testosteroni	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA	382
Comamonas_koreensis	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGNCTGA	346
Delftia_lacustris	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA	373
Comamonas_acidovorans	TTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA	372
Delftia_tsuruhatensis	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA	345
Neisseria_gonorrhoeae	TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAAGCCTGA	390
MV01	TTCTCCGG--TTTGTACCAGGCAGTCTCAT-TAGAGTGCTCAA-CTGAA	369
	* * * * * * * * * * *	

Comamonas_badia	TCCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTT-CGGGTTGTAAACTGCTT	427
Comamonas_terrigena	TCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTT-CGGGTTGTAAACTGCTT	431
Comamonas_denitrificans	TCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTT-CGGGTTGTAAACTGCTT	396
Comamonas_nitratorans	TCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTT-CGGGTTGTAAACTGCTT	400
Comamonas_testosteroni	TCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTT-CGGGTTGTAAACTGCTT	431
Comamonas_koreensis	TCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTT-CGGGTTGTAAACTGCTT	395
Delftia_lacustris	TCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTT-CGGGTTGTAAACTGCTT	422
Comamonas_acidovorans	TCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTT-CGGGTTGTAAACTGCTT	421
Delftia_tsuruhatensis	TCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTT-CGGGTTGTAAACTGCTT	394
Neisseria_gonorrhoeae	TCCAGCCATGCCGCGTGTCTGAAGAAGGCCTT-CGGGTTGTAAAGGACTT	439
MV01	TGTAGCAACTAATGACAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA	419
	* * * * *	
Comamonas_badia	TTGTACGGAACGAAAAGCCTCTCTTTAATAAATGGGGGTGATGACGGTAC	477
Comamonas_terrigena	TGGTACGGAACGAAAAGCTTCGGGTTAATACCCTGGAGTCATGACGGTAC	481
Comamonas_denitrificans	TTGTACGGAACGAAAAGTCTTGGGTTAATACCCTGGGATCATGACGGTAC	446
Comamonas_nitratorans	TTGTACGGAACGAAAAGCCTCTCTAATACAGGGGGTGTGATGACGGTAC	450
Comamonas_testosteroni	TTGTACGGAACGAAAAGCCTGGGGCTAATATCCCCGGGTCATGACGGTAC	481
Comamonas_koreensis	TTGTACGGAACGAAAAGACNTTTTCTAATAAAGAGGGTCCATGACGGTAC	445
Delftia_lacustris	TTGTACGGAACGAAAAGCTCCTTCTAATACAGGGGGCCCATGACGGTAC	472
Comamonas_acidovorans	TTGTACGGAACGAAAAGGCTTCTCTAATACGAGAGGCCATTGACGGTAC	471
Delftia_tsuruhatensis	TTGTACGGAACGAAAAGCTCCTTCTAATACAGGGGGCCCATGACGGTAC	444
Neisseria_gonorrhoeae	TTGTCAGGGAAGAAAAGGCTGTTGCCAATATCGGCGCCGATGACGGTAC	489
MV01	TCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCA-TGCAGCACCTGTGTGACGGTTC	468
	* * * * *	
Comamonas_badia	-CGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	526
Comamonas_terrigena	-CGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	530
Comamonas_denitrificans	-CGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	495
Comamonas_nitratorans	-CGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	499
Comamonas_testosteroni	-CGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	530
Comamonas_koreensis	-CGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	494
Delftia_lacustris	-CGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	521
Comamonas_acidovorans	-CGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	520
Delftia_tsuruhatensis	-CGTAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	493
Neisseria_gonorrhoeae	-CTGAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	538
MV01	TCTTTCGAGCACGAATCCATCT-CTGGAACCTTCTGCCATGTCAA-AGG	516
	* * * * *	
Comamonas_badia	TAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG--CAGG	574
Comamonas_terrigena	TAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG--CAGG	578
Comamonas_denitrificans	TAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG--CAGG	543
Comamonas_nitratorans	TAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG--CAGG	547
Comamonas_testosteroni	TAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG--CAGG	578
Comamonas_koreensis	TAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG--CAGG	542
Delftia_lacustris	TAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG--CAGG	569
Comamonas_acidovorans	TAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG--CAGG	568
Delftia_tsuruhatensis	TAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG--CAGG	541
Neisseria_gonorrhoeae	TAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGGGCG--CAGA	586
MV01	TGGG---TAAG-GTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAACCATCATCCAC	562
	* * * * *	

Anhang

Comamonas_badia	CGGTCTTGCAAGACAGT-GGTGAAATCCCC-GGGCT-CAACCTGGGAACT	621
Comamonas_terrigena	CGGTCTTGTAAGACAGA-GGTGAAATCCCC-GGGCT-CAACCTGGGAACT	625
Comamonas_denitrificans	CGGTTTTGTAAGACAGT-GGTGAAATCCCC-GGGCT-CAACCTGGGAACT	590
Comamonas_nitratorans	CGGTTTTGTAAGACAGT-GGTGAAATCCCC-GGGCT-CAACCTGGGAACT	594
Comamonas_testosteroni	CGGTTTTGTAAGACAGT-GGTGAAATCCCC-GGGCT-CAACCTGGGAACT	625
Comamonas_koreensis	CGGTTATGTAAGACAAAAGGTGAAATCCCC-GGGCTCAACCTGGGAACG	591
Delftia_lacustris	CGGTTATGTAAGACAGA-TGTGAAATCCCC-GGGCT-CAACCTGGGAACT	616
Comamonas_acidovorans	CGGTTATGTAAGACAGA-GGTGAAATCCCC-GGGCT-CAACCTGGGAACT	615
Delftia_tsuruhatensis	CGGTTATGTAAGACAGA-TGTGAAATCCCC-GGGCT-CAACCTGGGAACT	588
Neisseria_gonorrhoeae	CGGTTACTTAAG-CAGGATGTGAAATCCCC-GGGCT-CAACCCGGGAACT	633
MV01	CGCTTGTCGGGTCCCC--GTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCC	610
	** *	
Comamonas_badia	GCCATT-----GTGACTGCAAGGCTGGAGTGC CGGCAGAGGGGGATG	662
Comamonas_terrigena	GCCTTT-----GTGACTGCAAGGCTGGAGTGC CGGCAGAGGGGGATG	666
Comamonas_denitrificans	GCCATT-----GTGACTGCAAGGCTGGAGTGC CGGCAGAGGGGGATG	631
Comamonas_nitratorans	GCCATT-----GTGACTGCAAGGCTGGAGTGC CGGCAGAGGGGGATG	635
Comamonas_testosteroni	GCCATT-----GTGACTGCAAGGCTTAGAGTGC CGGCAGAGGGGGATG	666
Comamonas_koreensis	GCCTTT-----GTGACTGCATAGCTAGAGTACCGTAGAGGGGGATG	632
Delftia_lacustris	GCATTT-----GTGACTGCATGGCTAGAGTACCGTAGAGGGGGATG	657
Comamonas_acidovorans	GCATTT-----NTAACTGCATGGCTAGAGTACCGTAGAGGGGGATG	656
Delftia_tsuruhatensis	GCATTT-----GTGACTGCATGGCTAGAGTACCGTAGAGGGGGATG	629
Neisseria_gonorrhoeae	GCGTTC-----TGAAGTGGGTGACTCGAGTGTGTCAGAGGGAGGTG	674
MV01	GTACTCCCCAGGCGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGAAAAC	660
	* *	
Comamonas_badia	GAATTCGCGTGTAGCAGTAAAATGCGCAGATATGCGGAGGAACACCGAT	712
Comamonas_terrigena	GAATTCGCGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGAT	716
Comamonas_denitrificans	GAATTCGCGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGAT	681
Comamonas_nitratorans	GAATTCGCGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGAT	685
Comamonas_testosteroni	GAATTCGCGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGAT	716
Comamonas_koreensis	GAATTCGCGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGAT	682
Delftia_lacustris	GAATTCGCGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGAT	707
Comamonas_acidovorans	GAATTCGCGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGAT	706
Delftia_tsuruhatensis	GAATTCGCGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGAT	679
Neisseria_gonorrhoeae	GAATTCACGTTAGCAGTAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT	724
MV01	TAATTCACAACACAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAG-GGT	709
	***** *	
Comamonas_badia	GGCGAAGGCAATCCCCTGGGCTGCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG	762
Comamonas_terrigena	GGCGAAGGCAATCCCCTGGGCTGCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG	766
Comamonas_denitrificans	GGCGAAGGCAATCCCCTGGGCTGCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG	731
Comamonas_nitratorans	GGCGAAGGCAATCCCCTGGGCTGCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG	735
Comamonas_testosteroni	GGCGAAGGCAATCCCCTGGGCTGCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG	766
Comamonas_koreensis	GGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGNACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG	732
Delftia_lacustris	GGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG	757
Comamonas_acidovorans	GGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG	756
Delftia_tsuruhatensis	GGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTG	729
Neisseria_gonorrhoeae	GGCGAAGGCAGCCTCCTGGGATAACACTGACGTTTCATGTCCGAAAGCGTG	774
MV01	ATCTAATCCTGTTTGCTC--CCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACA	757
	* *	

Comamonas_badia	GGG--AGCAAACAGGATTAGATACCC-TGGTAGTCCACGCCCTAAACGAT	809
Comamonas_terrigena	GGG--AGCAAACAGGATTAGATACCC-TGGTAGTCCACGCCCTAAACGAT	813
Comamonas_denitrificans	GGG--AGCAAACAGGATTAGATACCC-TGGTAGTCCACGCCCTAAACGAT	778
Comamonas_nitratorans	GGG--AGCAAACAGGATTAGATACCC-TGGTAGTCCACGCCCTAAACGAT	782
Comamonas_testosteroni	GGG--AGCAAACAGGATTAGATACCC-TGGTAGTCCACGCCCTAAACGAT	813
Comamonas_koreensis	GGG--AGCAAACAGGATTAGATACCC-TGGTAGTCCACGCCCTAAACGAT	779
Delftia_lacustris	GGG--AGCAAACAGGATTAGATACCC-TGGTAGTCCACGCCCTAAACGAT	804
Comamonas_acidovorans	GGG--AGCAAACAGGATTAGATACCC-TGGTAGTCCACGCCCTAAACGAT	803
Delftia_tsuruhatensis	GGG--AGCAAACAGGATTAGATACCC-TGGTAGTCCACGCCCTAAACGAT	776
Neisseria_gonorrhoeae	GGT--AGCAAACAGGATTAGATACCC-TGGTAGTCCACGCCCTAAACGAT	821
MV01	GGTCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCGCATATCTACGCAT	807
	** *	
Comamonas_badia	GTCAACTGGTTGTTGGG-GATTAACTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCCT	858
Comamonas_terrigena	GTCAACTGGTTGTTGGG-TCTTAACGACTCAGTAACGAAGCTAACGCCT	862
Comamonas_denitrificans	GTCAACTGGTTGTTGGG-AATTTATTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCCT	827
Comamonas_nitratorans	GTCAACTGGTTGTTGGG-GATTTATTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCCT	831
Comamonas_testosteroni	GTCAACTGGTTGTTGGG-TCTTAACGACTCAGTAACGAAGCTAACGCCT	862
Comamonas_koreensis	GTCAACTGGTTGTTGGG-AATTAACTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCCT	828
Delftia_lacustris	GTCAACTGGTTGTTGGG-AATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCCT	853
Comamonas_acidovorans	GTCAACTGGTTGTTGGG-AATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCCT	852
Delftia_tsuruhatensis	GTCAACTGGTTGTTGGG-AATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACGCCT	825
Neisseria_gonorrhoeae	GTCAATTAGCTGTTGGGCAACTTGATTGCTTGTTAGCGTAGCTAACGCCT	871
MV01	TTCA-CTGCTACACGGGAATTCATCCCCCTCTACCGTACTCTAGCCAT	856
	*** *	
Comamonas_badia	GAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAAT	908
Comamonas_terrigena	GAAGTTGACCCCTGGGGAGTACGGCCCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT	912
Comamonas_denitrificans	GAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAAT	877
Comamonas_nitratorans	GAAGTTGACCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT	881
Comamonas_testosteroni	GAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT	912
Comamonas_koreensis	GAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT	878
Delftia_lacustris	GAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT	903
Comamonas_acidovorans	GAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT	902
Delftia_tsuruhatensis	GAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT	875
Neisseria_gonorrhoeae	GAAATTGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAAACTCAAAGGAAT	921
MV01	GCAGTCAC-----AAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCC--GGGGATT	895
	* *	
Comamonas_badia	TGACGGG-GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAA	957
Comamonas_terrigena	TGACGGG-GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAA	961
Comamonas_denitrificans	TGACGGG-GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTTCTTTAAATTCGATGCAA	926
Comamonas_nitratorans	TGACGGG-GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTTCTTTAAATTCGATGCAA	930
Comamonas_testosteroni	TGACGGG-GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAA	961
Comamonas_koreensis	TGACGGG-GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAA	927
Delftia_lacustris	TGACGGG-GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAA	952
Comamonas_acidovorans	TGACGGG-GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAA	951
Delftia_tsuruhatensis	TGACGGG-GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGATGCAA	924
Neisseria_gonorrhoeae	TGACGGG-GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAAATTCGATGCAA	970
MV01	TCACATCTGTCTTACATAACCGCTGCGCACGC--TTTACGCCCA-GTAA	942
	* *	

Anhang

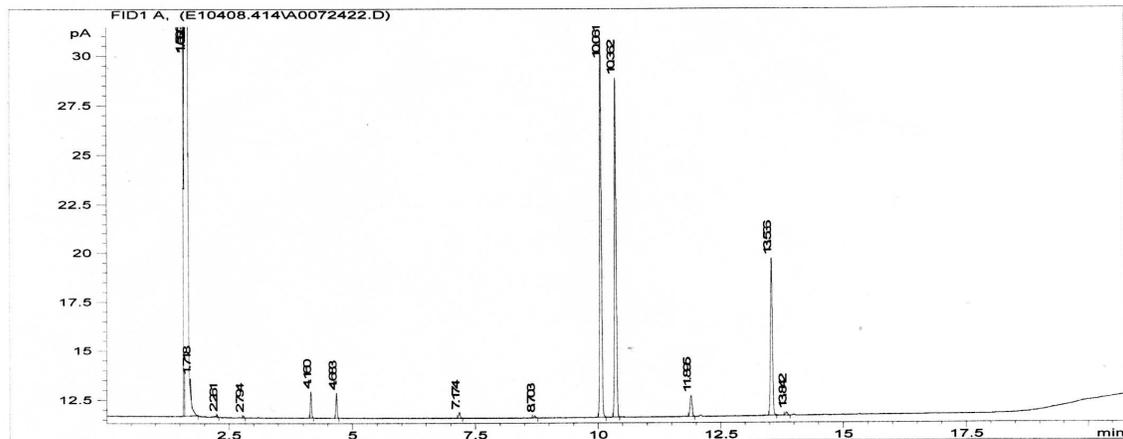
Comamonas_badia	CGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGTATGGAATCCCGAAGAGATTT	1007
Comamonas_terrigena	CGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATATACGGAATCCTTTAGAGATAG	1011
Comamonas_denitrificans	CGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGTATGGAATCCTTTAGAGATGA	976
Comamonas_nitratorans	CGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGTACGGAATCCTTTAGAGATAG	980
Comamonas_testosteroni	CGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAACCTTACCAGAGATGG	1011
Comamonas_koreensis	CGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGTACGGAAGTGACCAGAGATGG	977
Delftia_lacustris	CGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTCCAGAGATGG	1002
Comamonas_acidovorans	CGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTCCAGAGATGG	1001
Delftia_tsuruhatensis	CGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTCCAGAGATGG	974
Neisseria_gonorrhoeae	CGCGAAGAACCTTACCTGGTTTTGACATGTGCGGAATCCTCCGGAGACGG	1020
MV01	TTCCGATTAACGCTCGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG	992
	* * * * *	
Comamonas_badia	---GGGAGTGCTCGCA---AGAGAGCCATAACACAGGTGCTGCAT-GGCT	1050
Comamonas_terrigena	---AGGAGTGCTCGAA---AGAGAGCCGTAACACAGGTGCTGCAT-GGCT	1054
Comamonas_denitrificans	---AGGAGTGCTCGAA---AGAGAGCCATAACACAGGTGCTGCAT-GGCT	1019
Comamonas_nitratorans	---AGGAGTGCTCGAA---AGAGAGCCGTAACACAGGTGCTGCAT-GGCT	1023
Comamonas_testosteroni	---TTGGTGCTCGAA---AGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCAT-GGCT	1054
Comamonas_koreensis	---ACATGTGCTCGAA---AGAGAACCGTAACACAGGTGCTGCAT-GGCT	1020
Delftia_lacustris	---ATTCGTGCTCGAA---AGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCAT-GGCT	1045
Comamonas_acidovorans	---ATTCGTGCTCGAA---AGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCAT-GGCT	1044
Delftia_tsuruhatensis	---ATTCGTGCTCGAA---AGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCAT-GGCT	1017
Neisseria_gonorrhoeae	---AGGAGTGCTCGAA---GGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCAT-GGCT	1061
MV01	TTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATGGGCCCTGTATTAGAA	1042
	**** * ** *	
Comamonas_badia	GTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA	1100
Comamonas_terrigena	GTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA	1104
Comamonas_denitrificans	GTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA	1069
Comamonas_nitratorans	GTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA	1073
Comamonas_testosteroni	GTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA	1104
Comamonas_koreensis	GTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA	1070
Delftia_lacustris	GTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA	1095
Comamonas_acidovorans	GTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA	1094
Delftia_tsuruhatensis	GTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA	1067
Neisseria_gonorrhoeae	GTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA	1111
MV01	GGAGCTTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCG-AAGGCCTTCA	1091
	* * **** ** * * ** * ** *	
Comamonas_badia	ACCCTTGCCATCAGTTGCTA-CG----AAAGGGCACTCTGATGGGACTGC	1145
Comamonas_terrigena	ACCCTTGCCATTAGTTGATA-CG----AAAGGGCACTCTAATGGGACTGC	1149
Comamonas_denitrificans	ACCCTTGCCATTAGTTGCTA-CG----AAAGGGCACTCTAATGGGACTGC	1114
Comamonas_nitratorans	ACCCTTGCCATTAGTTGCTA-CG----AAAGGGCACTCTAATGGGACTGC	1118
Comamonas_testosteroni	ACCCTTGCCATTAGTTGCTA-CATTCAGTTGAGCACTCTAATGGGACTGC	1153
Comamonas_koreensis	ACCCTTGCCATTAGTTGCTA-CG----AAAGGGCACTCTAATGGGACTGC	1115
Delftia_lacustris	ACCCTTGTCATTAGTTGCTA-CATTCAGTTGAGCACTCTAATGAGACTGC	1144
Comamonas_acidovorans	ACCCTTGTCATTAGTTGCTA-CATTTAGTTGGGCACCTAATGAGACTGC	1143
Delftia_tsuruhatensis	ACCCTTGTCATTAGTTGCTA-CATTCAGTTGAGCACTCTAATGAGACTGC	1116
Neisseria_gonorrhoeae	ACCCTTGTCATTAGTTGCCATTCGTTGGGCACCTAATGAGACTGC	1161
MV01	TCCTGCACGCGCATTGCTG-----GATCAGGCTTTCGCC---ATTGT	1132
	** *** ** ** * **	

Comamonas_badia	CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT	1195
Comamonas_terrigena	CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT	1199
Comamonas_denitrificans	CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT	1164
Comamonas_nitratorans	CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT	1168
Comamonas_testosteroni	CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT	1203
Comamonas_koreensis	CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT	1165
Delftia_lacustris	CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT	1194
Comamonas_acidovorans	CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT	1193
Delftia_tsuruhatensis	CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT	1166
Neisseria_gonorrhoeae	CGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT	1211
MV01	CCAAAATTCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGT	1182
	* * * * *	
Comamonas_badia	TATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAAGGGTTGCCA	1245
Comamonas_terrigena	TATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAAGGGTTGCCA	1249
Comamonas_denitrificans	TATAGGTGGGGCTAGAAACGTCATACAATGGCCGGTACAAAAGGGTAGCCA	1214
Comamonas_nitratorans	TATAGGTGGGGCTAGAAACGTCATACAATGGCCGGTACAAAAGGGTAGCCA	1218
Comamonas_testosteroni	TATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAAGGGTTGCCA	1253
Comamonas_koreensis	TATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAAAAGGGTTGCCA	1215
Delftia_lacustris	TATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCA	1244
Comamonas_acidovorans	TATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCA	1243
Delftia_tsuruhatensis	TATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCA	1216
Neisseria_gonorrhoeae	TATGACCAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCCGGTACAGAGGGTAGCCA	1261
MV01	CCCAG-TGTGGCTGGT--CGTCTCTCAGACCAGCTACAGA---TCGTCC	1226
	***** * * * * *	
Comamonas_badia	ACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCACAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATTGCA	1295
Comamonas_terrigena	ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCA	1299
Comamonas_denitrificans	AGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCATAAAGCCGGTTCGTAGTCCGGATCGCA	1264
Comamonas_nitratorans	AGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCATAAAGCCGGTTCGTAGTCCGGATCGCA	1268
Comamonas_testosteroni	ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCA	1303
Comamonas_koreensis	ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCA	1265
Delftia_lacustris	ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCA	1294
Comamonas_acidovorans	ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCA	1293
Delftia_tsuruhatensis	ACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTCGTAGTCCGGATCGCA	1266
Neisseria_gonorrhoeae	AGCCGCGAGGGGGAGCCAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCA	1311
MV01	GCTTG---GTAAGCTTTTATCCCACCAA-CTA--CCTAATCTG--CCATC	1268
	* * * * *	
Comamonas_badia	GGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAA-----TCGCTAGTAATCGTG	1339
Comamonas_terrigena	GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA-----TCGCTAGTAATCGTG	1343
Comamonas_denitrificans	GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA-----TCGCTAGTAATCGTG	1308
Comamonas_nitratorans	GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA-----TCGCTAGTAATCGTG	1312
Comamonas_testosteroni	GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA-----TCGCTAGTAATCGTG	1347
Comamonas_koreensis	GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA-----TCGCTAGTAATCGTG	1309
Delftia_lacustris	GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA-----TCGCTAGTAATCGTG	1338
Comamonas_acidovorans	GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA-----TCGCTAGTAATCGTG	1337
Delftia_tsuruhatensis	GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA-----TCGCTAGTAATCGTG	1310
Neisseria_gonorrhoeae	CTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAA-----TCGCTAGTAATCGCA	1355
MV01	GGCCGC--TCCAATCGCGCAGGCCCGAAGGTCCCCCGCTTTTCATCCTCA	1316
	* * * * *	

Anhang

Comamonas_badia	GATCAGCATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGTC-TTGTACACACCGCCC	1388
Comamonas_terrigena	GATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGTC-TTGTACACACCGCCC	1392
Comamonas_denitrificans	GATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGTC-TTGTACACACCGCCC	1357
Comamonas_nitrativorans	GATCAGCATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGTC-TTGTACACACCGCCC	1361
Comamonas_testosteroni	GATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGTC-TTGTACACACCGCCC	1396
Comamonas_koreensis	GATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGTC-TTGTACACACCGCCC	1358
Delftia_lacustris	GATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTC-TTGTACACACCGCCC	1387
Comamonas_acidovorans	GATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTC-TTGTACACACCGCCC	1386
Delftia_tsuruhatensis	GATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTC-TTGTACACACACGCC	1359
Neisseria_gonorrhoeae	GGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTC-TTGTACACACCGCCC	1404
MV01	GATC-GTATGCGGTATTAGCTACTCTTTTCGAGTAGTTATCCCCACGACT	1365
	* *	
Comamonas_badia	GT-CACACCATGGGAGCGGGTCTCACCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAA	1437
Comamonas_terrigena	GT-CACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGTAA	1441
Comamonas_denitrificans	GT-CACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAA	1406
Comamonas_nitrativorans	GT-CACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAA	1410
Comamonas_testosteroni	GT-CACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGTAA	1445
Comamonas_koreensis	GT-CACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGNAA	1407
Delftia_lacustris	GT-CACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAA	1436
Comamonas_acidovorans	GT-CACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAA	1435
Delftia_tsuruhatensis	GTACACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGCAA	1409
Neisseria_gonorrhoeae	GT-CACACCATGGGAGTGGGGGATAACCAGAAGTAGGTAGGGTAACCGCAA	1453
MV01	GGGCACGTT-CCGATGTATTACTCACCC---GTTCCGCCACTCGTCAGCGT	1411
	* *	
Comamonas_badia	GGAGGGCGC-TTACCACGGT-GGGGTTTCGTGACTGGGGTGAA-GTCGTAA	1484
Comamonas_terrigena	GGAGGGCGC-TTACCACGGC-GGGGTTTCGTGACTGGGGTGAA-GTCGTAA	1488
Comamonas_denitrificans	GGAGGGCGC-TTACCACGGC-GGGGTTTCGTGACTGGGG-----	1442
Comamonas_nitrativorans	GGAGGGCGC-TTACCACGGC-GGGGTTTCGTGACTGGGGTGAA-GTCGTAA	1457
Comamonas_testosteroni	GGAGGGCGC-TTACCACGGC-GGGGTTTCGTGACTGGGGTGAA-GTCGTAA	1492
Comamonas_koreensis	GGAGGGCGC-TTACCACGGC-GGGGTTTCGTGACTGGGGTGAA-GTCGTAA	1454
Delftia_lacustris	GGAGGGCGC-TTACCACGGC-GGGGTTTCGTGACTGGGGTGAA-GTCGTAA	1484
Comamonas_acidovorans	GGAGGGCGC-TTATCACGGC-GGGGTTTGTGACTGGGGTGAA-GTCGTAA	1482
Delftia_tsuruhatensis	GGAGGGCGC-TTACCACGGCAGGGGTACGTGACTGGGGTGAAAGTCGTAA	1458
Neisseria_gonorrhoeae	GGAGTCCGC-TTACCACGGT-ATGCTTCATGACTGGGGTGAA-GTCGTAA	1500
MV01	CCGAAGACC--TGTTACCGTTCGACTGCATG-----	1440
	* *	
Comamonas_badia	-CAAGGTAGCCGT-----	1496
Comamonas_terrigena	-CAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGA-----	1519
Comamonas_denitrificans	-----	
Comamonas_nitrativorans	-CAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT-----	1498
Comamonas_testosteroni	-CAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT-----	1536
Comamonas_koreensis	-CAAGGTAGCC-----	1464
Delftia_lacustris	-CAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTAAGCTTGG	1533
Comamonas_acidovorans	-CAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT-----	1522
Delftia_tsuruhatensis	ACAAGGTA-----AACGGTAGGCTAGCCAGGAATTGAA-----	1492
Neisseria_gonorrhoeae	-CAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT-----	1544
MV01	-----	

Comamonas_badia	-
Comamonas_terrigena	-
Comamonas_denitrificans	-
Comamonas_nitrativorans	-
Comamonas_testosteroni	-
Comamonas_koreensis	-
Delftia_lacustris	A 1534
Comamonas_acidovorans	-
Delftia_tsuruhatensis	-
Neisseria_gonorrhoeae	-
MV01	-

8.3. GC-Ergebnisse der Fettsäureanalyse von *Delftia* sp. MV01

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.590	45098	0.014	----	6.957		----	< min rt	
1.623	3.501E+8	0.026	----	7.023	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.718	1935	0.020	----	7.215		----	< min rt	
2.261	366	0.020	----	8.312		----	< min rt	
2.794	333	0.021	1.191	9.390	8:0 3OH	0.17	ECL deviates -0.002	
4.160	4545	0.026	1.087	11.423	10:0 3OH	2.12	ECL deviates 0.001	
4.683	4481	0.027	1.062	12.000	12:0	2.04	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
7.174	1307	0.034	0.994	14.000	14:0	0.56	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
8.703	597	0.039	0.968	14.999	15:0	0.25	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
10.061	97590	0.040	0.951	15.819	Sum In Feature 3	39.78	ECL deviates -0.003	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.362	85703	0.038	0.947	16.001	16:0	34.81	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
11.895	5665	0.042	0.933	16.889	17:0 CYCLO	2.27	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
13.536	44726	0.044	0.921	17.825	18:1 w7c	17.66	ECL deviates 0.002	
13.842	897	0.038	0.919	17.999	18:0	0.35	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
----	97590	---	----	----	Summed Feature 3	39.78	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

Erklärung

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

Melanie Larisika
