

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Bedeutung von allelen Varianten des Hexose-Transporters Hxt3p
und der Hexokinasen Hxk1p und Hxk2p für Aufnahme und
Verwertung von Glucose und Fructose durch Weinhefen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Magdalena Anna Żuchowska

geb. am 28.03.1986 in Gdynia (Polen)

Mainz, 2015

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2012 bis April 2015 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2015

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

Żuchowska, M., Jaenicke, E., König, H., Claus, H. (2015). **Allelic variants of hexose transporter Hxt3p and hexokinases Hxk1p/Hxk2p in strains of *Saccharomyces cerevisiae* and interspecies hybrids.** *Yeast*, doi:10.1002/yea.3087

Christ, E., Kowalczyk, M., Żuchowska, M., Claus, H., Löwenstein, R., Szopinska-Morawska, A., Renaut, J., König, H. (2015). **An exemplary model study for overcoming stuck fermentation during spontaneous fermentation with the aid of a *Saccharomyces* triple hybrid.** *The Journal of Agricultural Science* 7, doi:10.5539/jas.v7n8p18

Żuchowska, M., Claus, H., König, H. (2015). **Allelic variants of hexose transporter Hxt3p modulate the fermentation profile of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains.** Posterpräsentation. VAAM-Jahrestagung, Marburg

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gärstörungen und ihre Ursachen	2
1.2	Zucker-Metabolismus	6
1.3	Transport-Proteine	8
1.4	Hexokinasen	11
1.5	Ziele der Arbeit	12
2	Material & Methoden	14
2.1	Hefestämme	14
2.2	Chemikalien	16
2.3	Biochemikalien, Enzyme, Kits	16
2.4	Zusammensetzung der Kulturmedien	17
2.5	Puffer und Lösungen	20
2.6	Geräte, Hilfsmittel	23
2.7	DNA- Isolierung	25
2.8	Sequenzierung des Transporters <i>HXT3</i> und der Hexokinasen <i>HXK1</i> und <i>HXK2</i>	25
2.9	Zucker-Bestimmung im Kulturmedium	27
2.10	Messung der Aufnahmerate von ¹⁴ C-markierten Zuckern durch Hefen	27
2.10.1	Gefriertrocknung und Bestimmung der Zellmasse	29
2.11	Ermittlung der Ethanoltoleranz von Hefen	29
2.12	Zellaufschluss für enzymatische Bestimmungen	30
2.13	Protein-Bestimmung	30
2.14	Quantitative Messung der Hexokinase-Aktivität	30
3	Ergebnisse	33
3.1	Einfluss des Ethanol auf das Hefe-Wachstum	33
3.1.1	Wachstum im Flüssigmedium	33
3.1.2	Wachstum auf Festmedium	37
3.2	Hxt3p-Aminosäuresequenzen der untersuchten Hefestämme	39
3.3	Struktur-Modell des Hxt3p-Transporters	43
3.4	Wachstum und Zucker-Verwertung der untersuchten Hefestämme	45
3.5	Aufnahme des ¹⁴ C-markierten Zuckers durch die Hefen	55
3.6	Hxk1p- und Hxk2p-Aminosäuresequenzen der untersuchten Hefestämme	59
3.6.1	Hexokinase 1	59
3.6.2	Hexokinase 2	62
3.7	Hexokinase-Aktivität der Testorganismen	65

4	Diskussion	68
4.1	Variabilität des Hexose-Transporters Hxt3p	69
4.2	Isoformen des Hxt3p-Transporters	70
4.3	Gärleistung der Hefen mit <i>HXT3</i> -Allel-Varianten	71
4.4	Hexosen-Aufnahme durch die Hefen mit <i>HXT3</i> -Allel-Varianten	74
4.5	Die Rolle der Hexokinasen im Zucker-Metabolismus	77
5	Ausblick.....	79
6	Zusammenfassung	80
7	Literaturverzeichnis.....	82
8	Anhang	92
8.1	Nukleotidsequenzen von <i>HXT3</i> , <i>HXK1</i> und <i>HXK2</i>	112
8.2	Aminosäuresequenzen von Hxt3p, Hxk1p und Hxk2p	124

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µmol	mikromolar
Acc. No.	Accession Number
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BW	Blindwert
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
deion.	deionisiert
DNA	Deoxyribose nucleic acid (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynucleoside triphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethyldiaminetetraacetat
for	forward
g	Erdschwerebeschleunigung
GC-Gehalt	Guanin + Cytosin-Gehalt
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hxk	Hexokinase
Hxt	Hexose-Transporter
IMW	Institut für Mikrobiologie und Weinforschung (Mainz, Deutschland)
min	Minute
MW	Mittelwert
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NCYC	National Collection of Yeast Cultures

nmol	nanomolar
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 Nanometer
PCR	Polymerase Chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pmol	picomolar
rev	reverse
s	Sekunde
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
STABW	Standardabweichung
Stammnr.	Stammnummer
Taq-Polymerase	aus <i>Thermus aquaticus</i> isolierte Polymerase
Temp.	Temperatur
TG	Trockengewicht
T _m	Melting Temperature (Schmelztemperatur)
τ	Typstamm
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
YRC	Yeast Resource Center
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

Die Vergärung eines Traubenmostes durch Weinhefen ist ein komplexer Prozess, sowohl biochemisch als auch ökologisch gesehen. Am Anfang der Gärung dominieren im Most Apiculatus-Hefen, wie *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) und Hefen, die Sauerstoff benötigen, wie *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* und *Kluyveromyces*. Diese Nicht-*Saccharomyces* Hefen sind auf Trauben und Kellerutensilien vorhanden und gelangen so in den Most. Da sie eine niedrige Ethanol-Toleranz aufweisen, werden sie im Laufe der Gärung von der Gattung *Saccharomyces* verdrängt (Fleet & Heard, 1993). Des Weiteren sind *Saccharomyces* Arten tolerant gegenüber niedrigen pH-Werten. Sie können im Most sogar bei pH-Wert 2,8 wachsen (Malherbe *et al.*, 2007). Als Folge führen Hefen der Gattung *Saccharomyces* und vor allem die Art *Saccharomyces cerevisiae* die alkoholische Gärung durch (Pretorius, 2000). Weitere weinrelevante *Saccharomyces* Arten sind *S. bayanus* (Sipiczki, 2008) und *S. pastorianus* (Naumov, 1996). In den letzten Jahren wurde öfters beobachtet, dass Interspezies-Hybride spontane Most-Gärungen zu Ende führen (Sipiczki, 2008; Blondin *et al.*, 2009; Blättel *et al.*, 2013; Christ *et al.*, 2015).

Die Trauben und später der Most beinhalten ungefähr gleiche Mengen von Glucose und Fructose. Die Konzentration der beiden Hexosen liegt insgesamt meistens zwischen 160 und 300 g/l (Fleet & Heard, 1993). Unterschiedliche Kultivierung von Weinreben, der Reifegrad der Beeren und das Klima beeinflussen die Glucose- und Fructose-Konzentrationen in den Trauben (Malherbe *et al.*, 2007). Dabei zeigen jüngere Beobachtungen, dass durch den Klimawandel die Zucker-Konzentration in den Trauben steigt (Jones *et al.*, 2005). Während der Gärung werden sowohl Glucose als auch Fructose zu Ethanol und CO₂ sowie zu weiteren Nebenprodukten wie z.B. Glycerol umgewandelt. Da aber die Hefen der Gattung *Saccharomyces* bei der Most-Vergärung in der Regel die Glucose bevorzugen, wird diese schneller als die Fructose verwertet und abgebaut (Fleet, 1998; Berthels *et al.*, 2004).

Beide Hexosen, Glucose und Fructose, haben die gleiche Summenformel, aber eine andere Struktur, die ihnen unterschiedliche physikochemische Eigenschaften verleiht (Fleet & Heard, 1993). Während Fructose eine Ketose ist, die zu 30 % als Furanose in Lösung vorliegt (Flood *et al.*, 1996), ist Glucose eine Aldose, die zu 99,9 % in Form der Pyranose vorkommt (Hyvönen *et al.*, 1977). Da der Hexose-Transport durch die Plasma-Membran in der Pyranose-Form erfolgt (Bisson, 1999), liegt hier eine Ursache, warum Hefen in der Regel Glucose besser verwerten als Fructose und sich das Mengenverhältnis der beiden Zucker im Verlauf der Gärung verschiebt.

Die Rest-Fructose zu vergären ist eine Herausforderung, für die sich in der späten stationären Phase befindenden Hefezellen, die zu diesem Zeitpunkt solchen Stress-Faktoren ausgesetzt sind, wie Mineral- und Stickstoff-Mangel, hohe Ethanol-Konzentrationen und anaerobe Bedingungen (Schütz & Gafner, 1993; Bauer & Pretorius, 2000; Perez *et al.*, 2005). Bleibt die Fructose teilweise unvergoren

im Most liegen, besteht ein Risiko, dass der Wein durch Mikroorganismen verderben wird. Es besteht z.B. die Möglichkeit, dass Milchsäurebakterien den Zucker umsetzen und als Nebenprodukt Essigsäure entsteht (Lonvaud-Funel, 1999). Des Weiteren, ist die Fructose ungefähr doppelt so süß wie die Glucose und damit störend bei der Herstellung von trockenen Weinen (Boulton *et al.*, 1996). Aus diesen Gründen sind Hefen, die relativ hohe Fructose-Affinität besitzen, von industriellem Interesse.

Unter normalen Gärungsbedingungen werden Pentosen wie D-Xylose oder L-Arabinose erst abgebaut, wenn keine Hexosen mehr vorliegen. Solange Glucose vorhanden ist, hemmt diese die Aufnahme von Pentosen durch einzelne Hexose-Transporter. Die gleichzeitige Vergärung von Hexosen und Pentosen ist nur im Fall einer Überexpression solcher Transporter wie Hxt7p und Gal2p möglich (Subtil & Boles, 2012).

1.1 Gärstörungen und ihre Ursachen

Eine Gärstörung liegt vor, wenn sich der Gärverlauf deutlich verlangsamt oder auch nahezu komplett zum Erliegen kommt. Dabei ist im Most noch über 4 g/l Restzucker vorhanden. Gärverzögerungen oder Gärstockungen führen häufig zu signifikanten Qualitätsverlusten. Eine Vermeidung von Gärstörungen bzw. deren schnelle Erkennung und Behebung zählen zu den wichtigsten Arbeiten der Kellerwirtschaft (Dittrich & Großmann, 2005). Laut Gafner & Schütz (1996) zeichnen sich die meisten Gärstockungen durch ein besonders niedriges Glucose:Fructose-Verhältnis (~1:10) aus.

Es gibt physikalische, chemische und mikrobiologische Faktoren und ihre synergistische Wirkungen, die potenziell für Gärungsprobleme verantwortlich sind. Während der alkoholischen Gärung sind die Hefen mehreren Stress-Faktoren ausgesetzt (Bauer & Pretorius, 2000). Diese sind neben der hohen Ethanol-Konzentration (Bisson, 1999), vor allem der Nährstoff-Mangel (Palma *et al.*, 2012) und suboptimale Temperatur (Bisson, 1999).

Ethanol ist der größte Stress-Faktor für die Hefen während der Most-Vergärung (Bisson, 1999). Dies ist auf seine Protein denaturierende Eigenschaften zurückzuführen. Da Ethanol in die Hefezelle frei diffundiert, zerstört es nicht nur Proteine und Phospholipide der Plasmamembran, sondern auch intrazelluläre Enzyme. In Folge dessen ist die Permeabilität der Membran erhöht (Hallsworth, 1998), Transport-Systeme werden inaktiviert (Salmon, 1989) und es kommt zur Hemmung des Zellwachstums (Thomas & Rose, 1979). In diesem Zusammenhang ist es nicht klar, wie die Weinhefen bis zu 12 Vol% Ethanol tolerieren können (Carrasco *et al.*, 2001).

Zinnai *et al.* (2013) konnten zeigen, dass bei höheren Ethanol-Konzentrationen der Abbau von Glucose schneller als der von Fructose erfolgte. Auch Berthels *et al.*, (2004) wiesen nach, dass eine hohe Ethanol-Konzentration stärker den Abbau von Fructose als den von Glucose in allen getesteten *S. cerevisiae*-Stämmen hemmt. Ethanol begünstigt nämlich den Übergang der Fructopyranose in die Fructofuranose (Flood *et al.*, 1996) und beeinträchtigt somit deren Transport in die Zelle. Außerdem

wurde beschrieben, dass Ethanol nicht die Affinität des Transporter-Systems zu Glucose beeinflusst, sondern seine Leistungsfähigkeit (Leáo & Van Uden, 1982). All dies unterstützt die Ansicht, dass eine verringerte Fructose-Verwertung die häufigste Ursache für Gärstörungen oder sogar Gärstockungen ist.

Des Weiteren berichteten Santos *et al.* (2008), dass *S. cerevisiae* Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden, eine höhere Ethanol-Resistenz besaßen als Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase. Allerdings hatten Zellen aus der stationären Phase, die zuvor mit Ethanol adaptiert wurden, ihre Abbaurate von Fructose nicht erhöht. Währenddessen zeigten unter den gleichen Bedingungen (2 h mit 6,0 Vol% Ethanol inkubiert) Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase einen ähnlich hohen Fructose-Abbau wie unbehandelten Zellen der stationären Phase. Die Autoren empfehlen deshalb Winzern, Restarter-Kulturen vor der Zugabe in den stockenden Most, mit Ethanol zu inkubieren.

Unter 29 getesteten *Saccharomyces* und Nicht-*Saccharomyces*-Stämmen, verfügte die Art *S. cerevisiae* über die höchste Ethanol-Resistenz (Arroyo-López *et al.*, 2010). Betrachtete man neben der taxonomischen Zugehörigkeit die Herkunft der untersuchten Stämme, ergab sich kein signifikanter Unterschied in Hinsicht auf die Ethanol-Toleranz innerhalb einer Art. Dies lässt vermuten, dass diese physiologische Eigenschaft nicht als eine Antwort auf durch den Mensch erzeugte fermentative Bedingungen entstanden ist. Die meisten Hefen waren in der Lage, bis zu 60 g/l (~8,0 Vol%) Ethanol ohne Einfluss auf das Wachstum zu tolerieren. Alexandre & Charpentier (1998) haben darüber berichtet, dass bei bis zu 8,5 Vol% Ethanol im Medium die Geschwindigkeit in der Glucose-Aufnahme und Aktivität der glykolytischen Enzyme unbeeinflusst bleiben. Dennoch war die Fermentationsrate um etwa 50 % reduziert.

Essigsäure kann in hohen Konzentrationen im Most vorliegen und synergetisch mit dem Ethanol wirken (Cardoso & Leáo, 1992b). Die zugelassenen Grenzwerte für Essigsäure liegen bei 1,08 g/l in Weiß- und Rosé-Wein bzw. bei 1,2 g/l in Rotwein (Dittrich und Großmann, 2005). In Anwesenheit der Essigsäure nimmt die intrazelluläre ATP-Konzentration ab. Dieser Zustand verlangsamt den ATP-abhängigen H⁺-Symport. Des Weiteren wird durch die Essigsäure die Expression der Transporter-Gene, unter anderem von *HXT1* und *HXT3*, reduziert (Ding *et al.*, 2013).

Als minimale Konzentration von freiem Stickstoff, die für eine vollständige Fermentation eines Mostes mit einer Zucker-Konzentration von 200 g/l nötig ist, werden oft 140 mg/l genannt (Bell & Henschke, 2005). Palma *et al.* (2012) haben in einem synthetischen Most mit limitierter Ammonium-Konzentration von 90 mg/l eine um etwa 80 % im Vergleich zu Anfangswerten reduzierte Glucose-Aufnahmerate (V_{\max} -Wert von $21,9 \pm 1,2 \mu\text{mol/h} \cdot 10^8$ Zellen auf $4,9 \pm 0,8 \mu\text{mol/h} \cdot 10^8$ Zellen) von *S. cerevisiae* beobachtet.

Im Gegensatz zu den üblichen Starterkulturen von *S. cerevisiae*, konnten aus einem spontan gärendem Most isolierte Stämme von *S. bayanus* HL77 und *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus* HL78 in Abwesenheit von Ammonium wachsen, sofern Aminosäuren oder Proteine vorhanden waren. Der Hybrid-Stamm konnte besonders die Fructose bei niedrigeren Aminosäure-Konzentrationen verwerten und war somit zum Überwinden der Gärstockung geeignet (Christ *et al.*, 2015).

Ein Stickstoff-, insbesondere Ammonium-Mangel, wirkt sich negativ auf das Wachstum der Hefen sowie auf die Gärung aus und kann dadurch Gärstockungen verursachen (Malherbe *et al.*, 2007). Wahrscheinlich wird auch die Synthese von Proteinen verhindert, die Zucker durch die Membran in das Zellinnere transportieren (Salmon, 1989). Ähnliche Folgen können durch Mangel des Phosphats ausgelöst werden (Boulton *et al.*, 1996).

Es darf nicht vergessen werden, dass Ethanol im Most einen negativen Einfluss auf die Stickstoff-Aufnahme hat. Cardoso & Leão (1992a) haben bei *S. cerevisiae* im Medium mit über 12,0 Vol% Ethanol eine Inaktivierung des Ammonium-Transportsystems, Inhibition der Protein-Synthese und darauf folgende Inaktivierung des Glucose-Transportsystems beobachtet.

Zugabe von Ammonium-Salzen in einen Most mit Stickstoff-Mangel ruft eine hohe CO₂-Produktion hervor und verkürzt die für eine vollständige Vergärung üblicherweise nötige Zeit. Der Grund dafür ist die Erhöhung der Protein-Synthese und damit auch erhöhte Transport-Aktivität der Hexosen-Carrier (Bely *et al.*, 1994). Untersuchungen von Berthels *et al.* (2004) haben gezeigt, dass Zugabe vom Ammonium in den Most die Verwertung von Fructose mehr stimuliert als den Glucose-Abbau. Nach der Supplementierung sollte die Aktivierung der *HXT*-Expression eine große Rolle dabei spielen, die Zuckeraufnahme erneut zu starten (Palma *et al.*, 2012).

Eine Zugabe von Ammonium-Salzen oder stickstoffreichen Verbindungen beeinflusst nicht nur die Fermentationsrate, sondern auch gleichzeitig die sensorische Eigenschaften des Weines. Die Art, Menge und Zeitpunkt der Ammonium-Ergänzung können für die Länge der Gärung, die Konzentration von flüchtiger Säure und Glycerin, sowie für das Aroma-Profil des Weines entscheidend sein. Darüber hinaus kann eine Überdosierung negative Folgen für die Qualität des Weines haben (Martínez-Moreno *et al.*, 2014).

Bei der Weinherstellung gibt es die Tendenz, den Weiß- und Rosé-Wein bei niedrigen Temperaturen (von 10 °C bis 15 °C) und den Rotwein bei hohen Temperaturen (von 18 °C bis 30 °C) zu vergären. So verliert der Weißwein weniger flüchtige Aromastoffe und der Rotwein gewinnt mehr Anthocyane (Belloch *et al.*, 2008).

Die Temperatur des Mostes hat einen Einfluss sowohl auf Wachstum als auch auf Gärleistung der Hefen. Niedrige Temperaturen können den Anfang der exponentiellen Wachstumsphase verschieben und Gärstörungen verursachen (Bisson, 1999). Cortés *et al.* (2010) haben dagegen Gärstörungen im

spontan gärendem Most bei 28 °C beobachtet, während die spontane Gärung bei 12 °C ohne Probleme verlaufen ist. Ein in den Most zugesetzter kommerzieller Stamm *S. cerevisiae* var. *bayanus* präferiert je nach Temperatur entweder Glucose oder Fructose. Bei 12 °C wurde Fructose und bei 28 °C die Glucose schneller abgebaut. Möglicherweise wird bei niedrigerer Temperatur sein zusätzlicher aktiver Fructose/H⁺ Symport zum Nachteil des erleichterten Diffusion Systems stimuliert und/oder niedrigere Temperaturen begünstigen den Übergang der Fructofuranose in die Fructopyranose.

Auch Untersuchungen von Tronchoni *et al.* (2009) haben gezeigt, dass die Temperatur einen Einfluss auf die Vergärung der Glucose und Fructose hat. Dabei gibt es Unterschiede innerhalb der getesteten *Saccharomyces*-Stämme zwischen der Vergärung bei 12 °C und 28 °C. Zwar wird unter beiden Bedingungen die höhere Affinität der Hefen zu Glucose bestätigt, dennoch zeigten bei der niedrigen Temperatur manche Stämme am Anfang der Gärung einen fructophilen Charakter.

Obwohl bereits einige mathematische Modelle postuliert wurden, lässt sich eine Gärstörung oder Gärstockung nur schwer vorhersagen und der Grund für reduzierte Gärungsaktivität kann nicht geklärt werden, bevor diese auftritt (Bisson, 1999). Laut Gafner & Schütz (1996) kann man eine Gärstockung prognostizieren, wenn das Glucose:Fructose-Verhältnis unter 0,1 liegt. Man kann darüber diskutieren, ob dies als Ursache oder als ein Merkmal einer Gärstockung zu betrachten ist. Der schnellere Glucose-Abbau der Weinhefen führt zwangsläufig zu erhöhten Fructose:Glucose-Verhältnissen.

Robuste Hefestämme scheinen aber in der Lage zu sein die Fructose auch noch unter ungünstigen Milieu-Bedingungen vergären zu können. Ivorra *et al.* (1999) haben eine Korrelation zwischen Stress-Resistenz und der Fähigkeit der Hefen, den Gärungsprozess komplett abzuschließen, bestätigt. Unter anderem Liccioli *et al.* (2011) haben Gärungs-relevante Daten (wie Dauer der Gärung, Kinetik des Fructose-Abbaus) mathematisch analysiert um Eigenschaften, die auf eine Fructophilie der Hefe hinweisen, zu finden. Diese Aufgabe stellt sich weiterhin als kompliziert dar. Walker *et al.* (2014) haben ein „Fermentom“, also alle für eine erfolgreiche und schnelle Vergärung nötige Gene, definiert. Es wurden insgesamt 93 Gene gefunden, deren jeweilige Deletion eine längere Vergärung im Vergleich zum Wildtyp zur Folge hatte. Neun dieser Gene (*SSQ1*, *TPS2*, *DOA4*, *PLC1*, *PTK2*, *NPT1*, *TPS1*, *SIN3*, *ZAP1*) erwiesen sich essential für eine erfolgreiche Most-Vergärung. Diese Gen-Produkte spielen u.a. bei der Resistenz der Hefe gegenüber Ethanol und hyperosmotischen Stress eine Rolle.

Robuste, durchgärende Hefestämme werden als Starterkulturen verwendet, um das Gärstockungsrisiko im Vergleich zu spontaner Gärung oder bei der Sekt-Produktion (sogenannte Sekthefer) zu minimieren. Viele technologische und qualitative Merkmale spielen bei der Selektion von Reinzuchtheferen eine bedeutende Rolle. Hierzu gehören neben Nährstoffansprüchen, der Temperaturtoleranz, der Alkoholbildungsfähigkeit und der Alkoholtoleranz auch die Resistenz gegenüber Pflanzenschutzmitteln und Killertoxinen (Dittrich & Großmann, 2005). Die Sektheferen

zeichnen sich durch Vergärung der Glucose und Fructose unter hohen Ethanol-Konzentrationen und niedrigen Temperaturen aus (Carrascosa *et al.*, 2011).

Da der Unterschied zwischen der Glucose- und Fructose-Fermentationsrate an Transport-Geschwindigkeit durch die Plasmamembran (Guillaume *et al.*, 2007) und/oder an Phosphorylierungs-Rate in der Zelle (Berthels *et al.*, 2008) liegen kann, sind an dieser Stelle die molekularen Grundlagen zu suchen. Die weiteren Schritte im Zucker-Metabolismus sind für diese Hexosen gleich.

1.2 Zucker-Metabolismus

Die Hefe *S. cerevisiae* hat sich an die Anforderungen, die ihr die alkoholische Gärung stellt, bestens angepasst. Sie kann Zucker unter rapid abnehmenden osmotischen Bedingungen nutzen, während die Ethanol-Konzentration steigt. Die molekularen Mechanismen, die der Hefe erlauben, die extrazelluläre Glucose-Konzentration zu erkennen und sich an diese anzupassen, wurden intensiv untersucht. Dabei wurden mehrere Signal-Systeme entdeckt (Rodicio & Heinisch, 2009). Sensoren, die spezifisch für die Fructose wären, wurden nie beschrieben (Berthels *et al.*, 2004).

Die Signalerkennung erfordert zwei Membranproteine Snf3p und Rgt2p, welche die Expression der *HXT* (Hexose-Transporter)-Gene induzieren. Snf3p erkennt niedrige Glucose-Konzentrationen und ist deswegen für die Induktion der Glucose-Transporter bei niedrigen Glucose-Konzentrationen notwendig. Rgt2p dagegen ist in die Expression der *HXT* bei hohen Glucose-Konzentrationen involviert (Özcan *et al.*, 1996). In diesem Signal-System spielt der Repressor Rgt1p eine entscheidende Rolle, in dem er an die Promotor-Regionen der *HXT*-Gene bindet (Flick *et al.*, 2003).

Auch Hexokinase Hxk2p trägt dazu bei, dass Hefezellen die Verfügbarkeit der Glucose aufspüren und darauf reagieren können (Herrero *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2001). Es ist schon lange bekannt, dass die Anwesenheit von Glucose im Medium mehrere Gene, die in Gluconeogenese, Atmung und Abbau alternativen C-Quellen involviert sind, reprimiert („Katabolit-Repression“). Ronne (1995) konnte zeigen, dass Hxk2p für diesen Effekt mitverantwortlich ist. Für die Derepression dieser für den Zucker-Metabolismus wichtigen Gene ist ein Snf1 Kinase-Komplex notwendig. Ist dieser aktiv, werden Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und diese wiederum regulieren die Genexpression (Rahner *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2003; Tachibana *et al.*, 2007).

Durch das Membranprotein Gpr1p hat die Hefe eine andere Möglichkeit, die Änderung in der extrazellulären Glucose-Konzentration wahrzunehmen (Yun *et al.*, 1997). Durch eine Signalkaskade wird die cAMP-Konzentration erhöht, die wiederum die Aktivität von Protein Kinase A steigert (Kraakman *et al.*, 1999). Dieses Enzym reguliert solche Prozesse wie Stressresistenz, Gluconeogenese, Glycolyse, Zellwachstum und Proliferation (Toda *et al.*, 1987; Thevelein & de Winde, 1999; Broach, 2012). Diese Kontrolle des Glucose-Metabolismus erfolgt also posttranslational.

Obwohl einige Gene, die in Signalwege der Glucose-Repression und -Induktion einbezogen sind, identifiziert wurden, ist der komplette Mechanismus noch nicht klar. Insbesondere die Positionen der jeweiligen Faktoren in der Signalkaskade und die Interaktionen zwischen ihnen sind noch nicht vollständig bekannt (Moreno & Herrero, 2002).

Im Gegensatz zu verschiedenen anderen Hefearten führt *S. cerevisiae* auch in Anwesenheit von Sauerstoff die alkoholische Gärung durch. Der sog. Pasteur-Effekt spielt bei ihr also keine Rolle (Lagunas, 1981). Stattdessen wird, bei einer Zucker-Konzentration in Höhe von über 2 g/l, das Substrat auf dem Weg der alkoholischen Gärung abgebaut. Dieses Verhalten wird Crabtree-Effekt genannt (Crabtree, 1928). Ist die Zucker-Konzentration niedrig, kann die Hefe über ihren Pyruvat Dehydrogenase-Komplex, das in der Glykolyse anfallende Pyruvat für die Atmung nutzen (Rodicio & Heinisch, 2009). Davon abgesehen benötigt *S. cerevisiae* Sauerstoff für ihr Wachstum und für die Synthese wichtiger Zellkomponenten wie z. B. Sterole und ungesättigte Fettsäuren (Munoz & Ingledew, 1990).

Glucose und Fructose werden bei der Art *S. cerevisiae* von den gleichen Membranproteinen in die Hefezelle aufgenommen, die Hexose-Transporter genannt werden. Dies geschieht ohne Energiezufuhr auf dem Weg der erleichterten Diffusion (Lagunas, 1993).

Gelangt die Glucose in die Hefezelle (Abbildung 1), beginnt der Glucose-Metabolismus in *S. cerevisiae* mit der Phosphorylierung des Zuckers an der C6-Position unter Verwendung von ATP. Diesen ersten irreversiblen Schritt des intrazellulären Glucose-Metabolismus katalysieren die Hexokinasen (Moreno & Herrero, 2002; Kuser *et al.*, 2008). Die Reaktion verläuft nach dem *induced fit* Mechanismus (Kuser *et al.*, 2008).

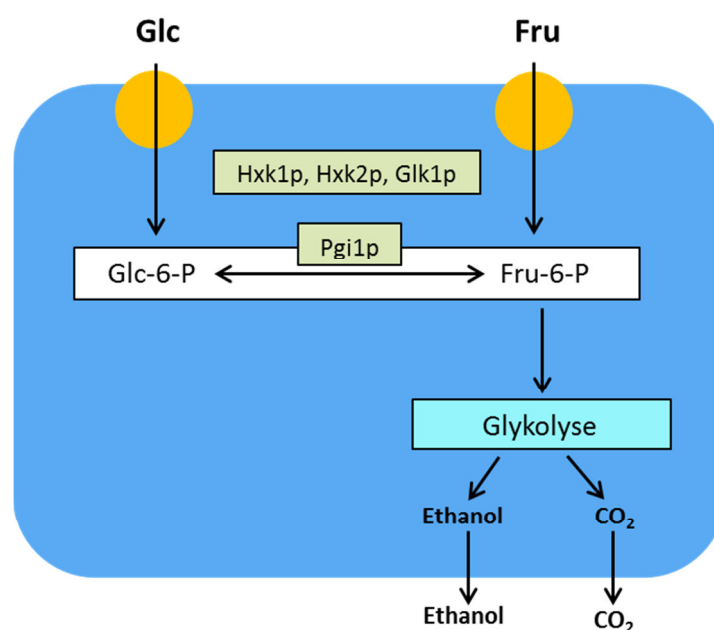


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema einer Hefezelle, des Hexose-Transports und der alkoholischen Gärung.

Hexose-Transport ist der wichtigste Faktor, der den glycolytischen Flux und den Zucker-Metabolismus in *S. cerevisiae* und *S. bayanus* kontrolliert (Uden, 1967; Diderich *et al.*, 1999; Elbing *et al.*, 2004). Die Schlüssel-Enzyme der Glykolyse wirken auf die Gärungs-Rate limitierend. Trotzdem löst die Überexprimierung dieser Enzyme (u.a. Hexokinase, Phosphofruktokinase, Alkohol-Dehydrogenase) keine erhöhte Produktion von Ethanol und anderen Metaboliten aus (Schaaff *et al.*, 1989).

Es liegt nahe, dass die unterschiedlich schnelle Verwertung von Glucose und Fructose mit ihrem Transport durch die Plasmamembran (Guillaume *et al.*, 2007) oder mit ihrer Phosphorylierung innerhalb der Hefezelle (Berthels *et al.*, 2008) zusammenhängt. Die für diese Prozesse verantwortlichen Carrier und Kinasen haben unterschiedliche Affinitäten zu den beiden Hexosen (Berthels *et al.*, 2008; Horák, 2013).

Es gibt Arten innerhalb der Gattung *Saccharomyces*, die außer erleichterter Diffusion der beiden Hexosen einen zusätzlichen hochaffinen Fructose/Proton-Symporter aufweisen. Diese sind *S. pastorianus* (Gonçalves *et al.*, 2000) und *S. bayanus* (Rodrigues de Sousa *et al.*, 2004). Das Gen, das für dieses Protein kodiert, heißt *FSY1*. Die Expression des *FSY1*-Gens wird nur durch sehr niedrige Glucose- oder Fructose-Konzentration ausgelöst und durch hohe Konzentrationen dieser Hexosen verhindert (Rodrigues de Sousa *et al.*, 2004). Überraschenderweise wurde in der kommerziellen Weinhefe *S. cerevisiae*-Stamm EC1118 ebenfalls ein solcher Fructose/Proton-Symporter gefunden (Galeote *et al.*, 2010). Frühere Untersuchungen konnten solchen aktiven Fructose-Transport bei mehreren *S. cerevisiae*-Stämmen nicht bestätigen (Rodrigues de Sousa *et al.*, 1995).

Es gibt auch Wein-relevante Hefe-Gattungen, die fructophil sind, wie z.B. *Zygosaccharomyces bailii* (Sousa-Dias *et al.*, 1996) oder *Candida stellata* (Ciani *et al.*, 2000). In *Kluyveromyces lactis* Frt1p (Diezemann & Boles, 2003), *Z. bailli* Ffz1p (Pina *et al.*, 2004) und *Zygosaccharomyces rouxii* ZrFfz1p und ZrFfz2p (Leandro *et al.*, 2011) wurden Fructose-spezifische Transporter charakterisiert.

Pentosen wie Xylose und Arabinose werden in *S. cerevisiae* ebenfalls durch Hexose-Transporter aufgenommen. Die Transporter Hxt1p, Hxt2p, Hxt4p, Hxt5p, Hxt7p und Gal2p sind relevant für die D-Xylose-Aufnahme (Hamacher *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Sedlak & Ho, 2004, Saloheimo *et al.*, 2007). Es gibt auch Transporter für Disaccharide in *S. cerevisiae*: z.B. Maltose wird über H⁺/Symport in die Hefezelle aufgenommen (Lagunas, 1993).

1.3 Transport-Proteine

S. cerevisiae hat die größte Hexose-Transporter Familie unter den Organismen, deren Genom vollständig sequenziert wurde. Bis heute wurden 20 Gene, deren Produkte im Hexose-Transport involviert sind, identifiziert (Wieczorke *et al.*, 1999). Dazu gehören die Gene *HXT1 - 17*, *GAL2* und Gene, die für Glucose-Sensoren kodieren, *SNF3* und *RGT2* (Kruckeberg, 1996). Alle genannten Carrier-Proteine sind tatsächlich in der Lage die Hexosen zu transportieren, außer Hxt12p, welches

von einem Pseudogen kodiert wird (Wieczorke *et al.*, 1999). Betrachtet man die DNA-Sequenzen der *HXT*-Gene, entsteht der Eindruck, dass sie durch Duplikation oder Chromosomen-Rekombination entstanden sind. Für diese These spricht auch die Tatsache, dass diese Gene mehrere kleinere Cluster auf dem gleichen Chromosom bilden (Bargues *et al.*, 1996).

Laut Kruckeberg (1996) sind diese Proteine hoch konserviert. Die Aminosäure-Sequenzen sind untereinander von 99,7 % (Hxt6p und Hxt7p) bis 25,0 % (Snf3p und Hxt16p oder Hxt17p) identisch. Dabei haben Hxt1p - 17p und Gal2p eine ähnliche Größe während Snf3p und Rgt2p einen längeren C-Terminus besitzen. Diese Tatsache hängt wahrscheinlich mit ihrer Funktion als Glucose-Sensoren zusammen (Özcan *et al.*, 1998). Von zwölf transmembranen Domänen sind die Domänen 3, 5, 7, 8 und 11 in den Prozess der Substrat-Bindung und Substrat-Aufnahme involviert (Kruckeberg, 1996).

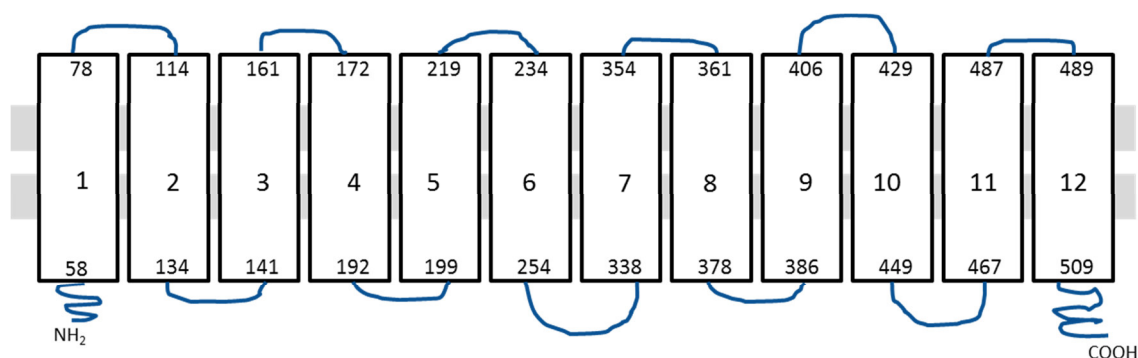


Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der Sekundärstruktur von Hexose-Transporter Hxt3p (modifiziert nach Guillaume *et al.*, 2007).

Reifenberger *et al.* (1995) und Wieczorke *et al.* (1999) haben Hefe-Mutanten hergestellt, die jeweils nur ein Gen oder keines der physiologisch relevanten *HXT*-Gene besitzen, um ihre Rolle im Zucker-Metabolismus zu klären. Die für den Glucose-Transport relevante Gene sind *HXT1* - 4 und *HXT6* - 7. Diese können auch Fructose und Mannose transportieren, allerdings mit niedrigerer Affinität (Wieczorke *et al.*, 1999). Die Expression der Gene *HXT8* - 17 wird dagegen sehr niedrig gehalten (Özcan & Johnston, 1999). Eine Mutante, welcher die Gene *HXT1* - 7 fehlen, war nicht fähig, auf Glucose oder Fructose zu wachsen (Reifenberger *et al.*, 1997). Die Carrier Hxt5p und Hxt8p - 17p konnten die Aufnahmerate der Hexosen nur durch Überexpression erhöhen (Wieczorke *et al.*, 1999). Interaktionen zwischen verschiedenen Hxt-Proteinen wurden postuliert (Reifenberger *et al.*, 1997), aber noch nicht experimentell nachgewiesen. Die einzelnen Hexose-Transporter unterscheiden sich in ihrer Affinität zu Hexosen voneinander.

Tabelle 1: Eigenschaften der wichtigsten Hexose-Transporter von *S. cerevisiae* (modifiziert nach Rodicio & Heinisch, 2009).

Hexose-Transporter	Glucose- Affinität ¹	Glucose- Regulation ²	Expression während der Fermentation ³
Hxt1	Niedrig ($K_m = 50 - 100 \text{ mM}$)	Induziert durch hohe Konzentration	Anfang der Fermentation
Hxt2	Mittel ($K_m \approx 10 \text{ mM}$)	Induziert durch niedrige Konzentration, reprimiert durch hohe Konzentration	Lag- Phase
Hxt3	Niedrig ($K_m = 50 - 100 \text{ mM}$)	Induziert durch hohe/niedrige Konzentration	Während der ganzen Fermentation
Hxt4	Mittel ($K_m \approx 10 \text{ mM}$)	Induziert durch niedrige Konzentration, reprimiert durch hohe Konzentration	Induziert während der Wachstumsphase
Hxt5	mittel hoch	Nicht reguliert durch Glc; Reguliert durch Wachstumsrate	Nicht induziert
Hxt6	Hoch ($K_m = 1 - 2 \text{ mM}$)	Induziert durch niedrige Konzentration, reprimiert durch hohe Konzentration	Induziert in der stationären Phase
Hxt7	Hoch ($K_m = 1 - 2 \text{ mM}$)	Induziert durch niedrige Konzentration, reprimiert durch hohe Konzentration	Induziert in der stationären Phase

¹ Reifenberger *et al.* (1997); Maier *et al.* (2002); Verwaal *et al.* (2002); ² Boles & Hollenberg (1997); Özcan & Johnston (1999); ³ Luyten *et al.* (2002); Perez *et al.* (2005)

Man unterscheidet bei *S. cerevisiae* zwischen Transport-Systemen mit hoher und niedriger Substrat-Affinität (Tabelle 1). Bei hochaffinen Carriern liegen die K_m -Werte bei $1,5 \pm 0,25 \text{ mM}$ für Glucose und bei $6 \pm 2 \text{ mM}$ für Fructose. Die niedrigaffinen Transporter haben K_m -Werte in Höhe von $20 \pm 8 \text{ mM}$ für Glucose und $40 \pm 15 \text{ mM}$ für Fructose. Obwohl die Transport-Systeme eine höhere Affinität zu Glucose als zu Fructose aufweisen (Bisson & Fraenkel, 1983) ist die Transportgeschwindigkeit (V_{\max} -Werte) von Fructose allgemein höher als von Glucose (Bisson, 1999).

In erster Linie beeinflusst die Konzentration der Glucose die Expression einzelner *HXT*-Gene. Die Expression solcher mit hoher und mittlerer Affinität (*HXT6*, *HXT7*, *HXT2* und *HXT4*) wird durch niedrige Glucose-Konzentration induziert und durch hohe Glucose-Konzentration reprimiert. Während die Expression des niedrigaffinen *HXT1* durch hohe Glucose-Konzentration induziert wird, wird Expression von Gen *HXT3* kaum durch die Glucose-Konzentrationen reguliert (Özcan & Johnston, 1995). Darüber hinaus wird am Anfang der Gärung (batch-Verfahren, Most-ähnliches Medium), wenn noch eine hohe Zucker-Konzentration vorliegt, das niedrigaffine *HXT1* exprimiert. Dieses spielt in der stationären Phase der Gärung keine Rolle mehr. *HXT3* (Abbildung 2) ist das einzige Transporter-Gen, das über die ganze Gärung exprimiert wird. Die maximale Expression findet bis Ende der exponentiellen Wachstumsphase statt und nimmt langsam während der stationären Phase ab. Zum Anfang der stationären Phase werden ähnlich hoch die zwei hochaffinen *HXT6* und *HXT7* exprimiert und dieser Zustand bleibt in dieser Phase bestehen. *HXT2* wird nur vorübergehend während der lag

Phase exprimiert, was seine bedeutende Rolle bei Initiierung des Wachstums vermuten lässt (Luyten *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2005).

Außer der Zucker-Konzentration beeinflussen noch andere Faktoren die Expression der *HXT*-Gene. Diese sind osmotischer Stress (Hirayama *et al.*, 1995) und physiologischer Zustand der Hefezellen z.B. während des Wachstums bei limitierten Nährstoff-Konzentrationen (Wendell & Bisson, 1994; Diderich *et al.*, 1999). Weiterhin wird die Transport-Leistung der Hexose-Carrier durch die posttranslationale Kontrolle reguliert. Bei Bedarf werden die Proteine in den Vakuolen degradiert (Krampe *et al.*, 1998).

Guillaume *et al.* (2007) haben den kommerziellen *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp[®] untersucht, der sich durch eine relativ hohe Abbaurrate der Fructose charakterisiert. Laut ihrer Untersuchungen sollte diese Fähigkeit auf der Expression eines mutierten *HXT3*-Allels beruhen. Die 38 Mutationen innerhalb der DNA-Sequenz entsprechen zehn AS-Substitutionen im Vergleich zum Standard Stamm S288c. Nachdem dieses *HXT3*-Allel in einem *hxt* Stamm überexprimiert wurde, kam es zwar zu einer besseren Verwertung beider Hexosen, jedoch wurden keine Unterschiede im Glucose- und Fructose-Transport im Vergleich zu Stämmen mit dem Standard-Allel von S288c gefunden. Ein verbessertes Fructose:Glucose-Verhältnis während der Gärung war dem mutierten *HXT3*-Allel aus Stamm Fermichamp[®] trotzdem zuzuschreiben. Um zu klären, ob veränderte Eigenschaften des Proteins oder seine erhöhte Expression für die verbesserte Gärungsrate verantwortlich waren, müssen weitere Untersuchungen unternommen werden.

1.4 Hexokinasen

In Hefen der Gattung *Saccharomyces* sind für die Hexosen-Phosphorylierung Hexokinase 1 (Hxk1p), Hexokinase 2 (Hxk2p) und Glucokinase 1 (Glk1p) verantwortlich. Während Glucose durch alle drei Enzyme phosphoryliert wird, kann die Fructose nur durch die ersten zwei aktiviert werden (Barnett, 1997). Während die Glucokinase an die Zellmembran gebunden zu sein scheint, sind beide Hexokinasen in Cytoplasma bzw. im Zellkern lokalisiert (Clifton *et al.*, 1993).

Die Aminosäuresequenzen von Hxk1p und Hxk2p sind zu 76 % gleich. Während die Sequenz von Hxk1p aus 485 AS besteht, ist die Hxk2p Sequenz 486 AS lang. Die beiden Isoenzyme unterscheiden sich voneinander durch ihre Aktivität gegenüber den Hexosen und können als Monomere und Dimere vorliegen. Die Dissoziierung der Dimere kann durch Glucose-Bindung, erhöhte pH-Werte und ionische Kräfte ausgelöst werden (Kuser *et al.*, 2008).

Hxk1p hat eine höhere Affinität zu Glucose ($K_m = 0,12 \text{ mM}$) als zu Fructose ($K_m = 1,5 \text{ mM}$). Ebenso zeigt Hxk2p eine höhere Glucose-Affinität ($K_m = 0,25 \text{ mM}$) im Vergleich zu Fructose ($K_m = 1,5 \text{ mM}$). Bezüglich Umsatzgeschwindigkeit erreicht Hxk1p mit Fructose dreifach höhere V_{\max} -Werte als mit Glucose. Hxk2p dagegen zeigt mit Glucose etwas höhere V_{\max} -Werte als mit Fructose (Barnard, 1975; Entian & Mecke, 1982). Außer Glucose und Fructose wird von diesen Enzymen auch noch Mannose

phosphoryliert (Rodicio & Heinisch, 2009), weiterhin Glucose-Analoga, die in Pyranose- oder Furanose-Form vorliegen wie z.B. Desoxy- und Desoxyfluoro-Analoga von D-Glucose (Chenault *et al.*, 1997).

Die cytoplasmatische Hxk2p ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse, während nukleare Hxk2p in der Expressionskontrolle mehrerer Gene, einschließlich ihrer eigenen, involviert ist. Der Mechanismus dieser Autokontrolle ist noch nicht völlig geklärt. Die im Nukleus und im Cytoplasma vorliegenden Hxk2p sind anders aufgebaut. Eine Aminosäuresequenz innerhalb der Hxk2p zwischen Lysin-6 und Methionin-15 determiniert die Lokalisierung des Proteins im Nukleus. Eliminiert man diese Sequenz, werden die Lokalisierung der Hxk2p im Nukleus und die Repression von *HXK1* und *GFLK1* aufgehoben (Moreno & Herrero, 2002).

Solange Glucose und Fructose im Medium vorhanden sind, wird das Gen *HXK2* exprimiert. Ist der Zucker aufgebraucht, wird *HXK2* reprimiert und die Gene *HXK1* und *GLK1* werden schnell dereprimiert (Moreno *et al.*, 2005; Varela *et al.*, 2005). Hxk2p muss im Nukleus vorliegen, damit die durch Glucose induzierte Expression des *HXK2*-Gens und die Repression der *HXK1*- und *GLK1*-Gene stattfinden kann (Rodríguez *et al.*, 2001). Des Weiteren haben Rodríguez *et al.* (2001) gezeigt, dass Hxk1p ein negativer Faktor in der Expression der Gene *GLK1* und *HXK2* ist.

Bezüglich der transkriptionalen Kontrolle des *HXK2*-Gens, wurde ein DNA-Protein-Komplex beschrieben, an dem zwei Nukleotid-Sequenzen beteiligt sind. Diese liegen in der kodierenden Region dieses Gens. Während die Regulation der *GLK1*-Expression über drei regulatorische Sequenzen innerhalb des Promotors stattfindet, sind an diesem Prozess bei *HXK1* zwei solcher Sequenzen beteiligt (Moreno & Herrero, 2002).

Berthels *et al.* (2008) konnten zeigen, dass der Unterschied in Glucose- und Fructose-Abbau bei verschiedenen *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen mit den kinetischen Eigenschaften ihrer Hexokinasen zusammenhängt. Eine bessere Fructose-Verwertung korrelierte mit einer höheren Phosphorylierungsrate für diese Hexose ($V_{\max} = 570 - 1200 \text{ nmol/min} \cdot \text{mg Protein}$) im Vergleich zu Glucose ($V_{\max} = 310 - 1100 \text{ nmol/min} \cdot \text{mg Protein}$) und mit niedrigen K_m -Werten der Hexokinasen für beide Zucker ($K_{m\text{Glc}} = 0,07 - 0,18 \text{ mM}$; $K_{m\text{Fru}} = 0,62 - 1,30 \text{ mM}$).

Petit *et al.* (2000) demonstrierten mit *hvk2* Mutanten, dass diese Hexokinase auch den Glucose-Transport reguliert. Hxk2p reprimiert in der exponentiellen Wachstumsphase die hochaffinen Transporter Gene *HXT2* und *HXT7* und erhöht die Expression der niedrigaffinen *HXT1* und *HXT3*.

1.5 Ziele der Arbeit

Es gibt bedeutende Unterschiede in der Vergärung von Glucose und Fructose zwischen Weinhefen der Gattung *Saccharomyces* (Berthels *et al.*, 2004; Tronchoni *et al.*, 2009). Diese Unterschiede können auf Eigenschaften der Hexose-Transporter (Guillaume *et al.*, 2007) und/oder der Hexokinasen (Berthels *et*

al., 2008) zurückgeführt werden. Mit Eigenschaften sind hier die Expressionsrate und/oder die molekulare Struktur dieser Proteine gemeint.

Intensive Untersuchungen zum Transport und Umsatzrate von Zuckern in Hefen wurden in letzten Jahrzehnten durchgeführt, allerdings mit Laborstämmen wie z.B. *S. cerevisiae* S288c und ihren Mutanten. Diese Stämme sind nicht in der Lage, in niedrigen pH-Bereichen und unter hohem osmotischem Druck zu wachsen. Solche Bedingungen bietet gerade Traubenmost an (Borneman *et al.*, 2011).

Mittlerweile ist gut belegt, dass sich *S. cerevisiae*-Stämme im Laufe der Domestizierung und Anpassung an verschiedene Habitate genetisch verändert haben. Deswegen war es vorgesehen in dieser Arbeit eine repräsentative Auswahl von Labor-, kommerziellen und in der Natur vorkommenden *Saccharomyces*-Stämmen und ihren Interspezies-Hybriden auf die Verbreitung allerer Varianten der Hexokinase-Gene *HXK1* und *HXK2* untersucht werden. Von den Hexose-Transportern sollte Hxt3p im Mittelpunkt stehen, da neuere Studien seine essentielle Rolle bei der Vergärung von Glucose und Fructose belegen.

Es sollte geklärt werden, ob allele Varianten existieren, wenn ja, ob Hefestämme mit diesen Varianten sich in Hinsicht der Zucker-Verwertung tatsächlich voneinander unterscheiden und ob ihr Verhalten unter Stress-Bedingungen davon beeinflusst wird. Als Stress-Faktoren für das Hefe-Wachstum wurden im Rahmen dieser Arbeit hohe Ethanol-Konzentrationen, reduzierter Ammonium-Gehalt und ungünstige Glucose:Fructose-Verhältnisse getestet.

Zur Klärung der Zusammenhänge zwischen Alleltypus und Zucker-Abbau, wurden Transport-Messungen mit radioaktiv markierten Substraten durchgeführt. Ferner sollte anhand von Strukturmodellen ein möglicher Zusammenhang zwischen Aminosäure-Austauschen und Funktionalität der untersuchten Proteine hergestellt werden.

Die Identifizierung und Charakterisierung eventueller Gen-Varianten wäre somit wichtig bei der Suche nach robusten Hefestämmen mit hoher Gärungsleistung in der Weinherstellung. Die geplanten Untersuchungen sollten somit auch einen wichtigen Beitrag leisten, um Ursachen von Gärstockungen besser zu verstehen und schließlich beheben zu können.

2 Material & Methoden

2.1 Hefestämme

Alle Stämme, mit denen im Rahmen dieser Arbeit gearbeitet wurde, sind im Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg Universität Mainz hinterlegt (Tabelle 2). Der Großteil sind Isolate aus deutschen Traubenmosten, aber auch aus anderen Ländern Europas. Den kleineren Anteil bilden Hefestämme, die zur Vergärung von anderen alkoholischen Getränken wie Bier und Cidre angesetzt werden. Unter ihnen findet man sowohl Typstämme als auch kommerzielle Hefen, die als Starterkulturen verwendet werden.

Tabelle 2: Stämme, die im Laufe dieser Arbeit verwendet wurden.

Spezies/Stammnr.	Eigenschaften/Herkunft
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
29 (ATCC 48427)	Weinhefe; Bayrische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Würzburg
33 (ATCC 48428)	Weinhefe; Bayrische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Würzburg
72 (CBS 429)	Weinhefe; DLR Mosel
73	Weinhefe; Institute du Vin, Athen, Griechenland
101 (ATCC 48430)	Weinhefe; Michelsbach
596	Weinhefe; Trockenhefe Präparat Hefix® 2000, Erbslöh
642 (Lalvin DV10®)	Kommerzielle Wein- und Sektheife (Champagnerhefe); Frankreich
657 (SIHA 4®)	Kommerzielle Sektheife; Henkell
661 (DSM 70449 ^T / CBS 1171)	Bierhefe; Niederlande
54.41	Weinhefe; Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel
16.1	Weinhefe; Weingut Wittmann, Pfalz
712	Weinhefe; Weingut Wittmann, Pfalz
Fermichamp® (INRA 67J)	Kommerzielle Weinhefe; Frankreich
Fermivin® (INRA 7013)	Kommerzielle Weinhefe; Frankreich
156	Untergärige Bierhefe; VLAB, Berlin
3211-1	Weinhefe; Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel
S288c	Standard Laborstamm; isoliert aus Feige
<i>Saccharomyces bayanus</i>	
HL77	Weinhefe; Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	
NCYC 3518	Isolat aus europäischer Brauerei
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	
NCYC 529	Lager-Brauerei-Hefe; Europa
DSM 6580 ^T	Bierhefe; Europa
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i>	
CBS 8614	Isoliert aus Cidre; Frankreich
3211-2	Weinhefe; Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> x <i>S. bayanus</i>	
HL78	Weinhefe; Weingut Heymann-Löwenstein, Mosel

In Abhängigkeit vom durchgeführten Experiment wurden verschiedene Kulturmedien verwendet, deren Zusammensetzung in 2.4 aufgelistet ist.

2.2 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid, Serva, Heidelberg

Agar, Marcor, New Jersey, USA

peqGOLD Universal Agarose, Peqlab, Erlangen

Bromphenolblau, Sigma-Aldrich, Steinheim

Ethidiumbromid, Roth, Karlsruhe

Fleischextrakt, Merck, Darmstadt

Fructose, Roth, Karlsruhe

Glucose, Roth, Karlsruhe

Hefeextrakt, Marcor, New Jersey, USA

Pepton aus Fleisch, Marcor, New Jersey, USA

Alle anderen Chemikalien wurden in höchst erhaltlicher Qualität bezogen (Sigma-Aldrich, Steinheim; Roth, Karlsruhe).

2.3 Biochemikalien, Enzyme, Kits

BSA Standard for Protein Assay, Interchim, Frankreich

DNeasy[®] Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden

dNTP-Mix: 10 mM, Peqlab, Erlangen

D-[U-¹⁴C] Fructose [300 mCi/mmol (11,11 GBq/mmol)], American Radiolabeled Chemicals, Inc, St. Louis, USA

GeneJET[™] PCR Purification Kit, Fermentas, St.Leon-Rot

GeneRuler[™]: DNA Ladder Mix 0,5 µg/µl, Fermentas, St.Leon-Rot

D-[U-¹⁴C] Glucose [255 mCi/mmol (9,44 GBq/mmol)], Hartmann Analytic, Braunschweig

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*, Roche, Mannheim

Lyticase aus *Arthrobacter luteus*, Sigma-Aldrich, Steinheim

MgCl₂: 25 mM, Peqlab, Erlangen

Phosphoglucose-Isomerase, Sigma-Aldrich, Steinheim

QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden

10x Reactionbuffer S, Peqlab, Erlangen

Roti[®]-Quant, Roth, Karlsruhe

Szintillationslösung Rotiszint[®] Eco Plus, Roth, Karlsruhe

Taq-DNA-Polymerase: 5 U/μl, Peqlab, Erlangen

UV-Test zur Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose in Lebensmitteln, r-biopharm, Darmstadt

2.4 Zusammensetzung der Kulturmedien

GYP-Medium (glucose - yeasts extract - peptone)

40,0 g Glucose

5,0 g Pepton aus Fleisch

5,0 g Hefeextrakt

ad 1000 ml deion. H₂O

Das Medium wurde 15 min bei 121 °C autoklaviert.

YEP-Medium

20,0 g Glucose

20,0 g Pepton aus Fleisch

10,0 g Hefeextrakt

ad 1000 ml deion. H₂O

Das Medium wurde 15 min bei 121 °C autoklaviert.

Um feste Medien herzustellen, wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugegeben.

Sabouraud-Medium

30,0 g Sabouraud 2 % Glucose-Bouillon

ad 1000 ml deion. H₂O

pH = 3,5

Das Medium wurde 15 min bei 121 °C autoklaviert.

B-Medium (modifiziert nach Heerde & Radler, 1978)

100,00 g Fructose

100,00 g Glucose

20,00 g D-/L-Malat

1,50 g (NH₄)₂SO₄

1,00 g MgSO₄ x 7 H₂O

0,50 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat

0,04 g myo-Inosit

100,0 ml Aminosäuren-Stammlösung

10,0 ml Vitamine-Stammlösung

10,0 ml Spurenelemente-Stammlösung

ad 1000 ml deion. H₂O

pH = 3,5

Das Medium wurde 20 min bei 100 °C im Dampftopf erhitzt.

Stressmedium mit minimaler Ammonium-Konzentration

36,00 g	Fructose
4,00 g	Glucose
20,00 g	D-/L-Malat
0,15 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
1,00 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1,00 g	Kaliumdihydrogenphosphat
0,50 g	tri-Natriumcitrat-Dihydrat
0,04 g	myo-Inosit
90,0 ml	≥ 99,8 % (v/v)-Ethanol
10,0 ml	Aminosäuren-Stammlösung
10,0 ml	Vitamine-Stammlösung
10,0 ml	Spurenelemente-Stammlösung
ad 1000 ml	deion. H ₂ O

pH = 3,5

Das Medium wurde 20 min bei 100 °C im Dampftopf erhitzt. Das Ethanol wurde nach dem Durchdampfen zum Medium zugegeben.

2.5 Puffer und Lösungen

Aminosäuren-Stammlösung

0,75 g	L-Alanin
3,50 g	L-Arginin
0,20 g	L-Histidin
0,40 g	L-Methionin
0,50 g	L-Serin
2,00 g	L-Threonin
0,40 g	L-Tryptophan
0,50 g	L-Asparaginsäure
3,00 g	L-Glutaminsäure
ad 1000 ml	deion. H ₂ O

Vitamine-Stammlösung

8 mg	4-Aminobenzoessäure
40 mg	Nicotinsäure
40 mg	Calcium-D-Pantothenat
40 mg	Pyridoxolhydrochlorid
20 mg	Thiaminhydrochlorid
40 ml	Biotin [2 mg/100 ml deion. H ₂ O, darin 5 ml Salzlsg. (1,5 g KH ₂ PO ₄ + 1,5 g K ₂ HPO ₄ /10 ml deion. H ₂ O)]
40 ml	Folsäure (2 mg/100 ml deion. H ₂ O)
20 ml	Riboflavin (20 mg/20 ml deion. H ₂ O)
ad 400 ml	deion. H ₂ O

Spurenelemente-Stammlösung

300 mg	Kaliumhydrogentartrat
30 mg	H ₃ BO ₃
30 mg	FeCl ₃ x 6 H ₂ O
30 mg	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
30 mg	MnSO ₄ x H ₂ O
30 mg	AlCl ₃
15 mg	KJ
15 mg	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
15 mg	NaMoO ₄ x 2 H ₂ O
15 mg	CoCl ₂ x 6 H ₂ O
15 mg	LiSO ₄ x H ₂ O
ad 150 ml	deion. H ₂ O

Ladepuffer (siehe 2.8)

3,2 ml	1 M Tris-HCl pH 8,0
3,5 ml	100 % (v/v)-Glycerin
2,5 ml	deion. H ₂ O
Spatelspitze	Bromphenolblau

Kochsalz-Lösung

9,0 g	NaCl
ad 1000 ml	deion. H ₂ O

Die Lösung wurde 15 min bei 121 °C autoklaviert.

10x TBE-Puffer

107,81 g Tris
55,03 g Borsäure
7,44 g Na-EDTA
ad 1000 ml deion. H₂O
pH = 8,0 - 8,3

1x TBE-Puffer (siehe 2.8)

10x TBE-Puffer wurde 10x verdünnt.

PCR-H₂O

Filtriertes MilliQ-H₂O wurde zwei Mal 15 min bei 121 °C autoklaviert und mit UV-Licht ~180 min behandelt.

Sorbitol-Puffer (siehe 2.7)

9,110 g Sorbitol
37,220 g Na-EDTA
0,055 g β-Mercaptoethanol
ad 50 ml deion. H₂O

0,1 M Phosphat-Puffer (siehe 2.10)

12,25 g KH₂PO₄
1,58 g Na₂HPO₄
ad 1000 ml deion. H₂O
pH = 5,9

Puffer A (siehe 2.12)

9,10 g Sorbitol
0,23 g Dithiothreitol
ad 50 ml Puffer C

Alle Bestandteile des Puffers wurden im Ultraschallbad gelöst.

Puffer B (siehe 2.12)

9,100 g Sorbitol
0,008 g Dithiothreitol
1,850 g Na-EDTA
ad 50 ml Puffer C

Bei der Durchführung vom Zellaufschluss wurden 20 µl Lyticase (10000 U/ml) pro 1,0 ml Puffer B (Endkonz. 200 U/ml) zugegeben.

Puffer C (siehe 2.12)

2,98 g HEPES
ad 250 ml dH₂O

pH-Wert wurde mit KOH auf 7,5 eingestellt.

2.6 Geräte, Hilfsmittel

Autoclav, Systec VE40, Systec GmbH, Wettengel

Einmalfilter Chromafil, 0,2 µm, regenerierte Cellulose, Macherey-Nagel, Düren

Einmalfilter Syringe steril, 0,2 µm, Polyethersulfon Membran, VWR International, Darmstadt

Eppendorf-Gefäße, Eppendorf, Hamburg

Eppendorf-Zentrifuge, Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg

Falcon-Gefäße, VWR International, Darmstadt

Falcon-Zentrifuge 2-1 6K, Sigma, Osterode

Filterpapiere, Macherey-Nagel, Düren

Glasmikrofaser-Filter GF/C™ Whatman™, GE Healthcare, UK

Glasplatten für Polyacrylamid-Gele, Sigma-Aldrich, Steinheim

Gefriertrocknung Lyovac GT2, Steris, Braunsfeld

Geldokumentationseinheit, Vilber Lourmat, Eberhardzell

Gelkammer Model 96, Bio-Rad, München

Gelkammer Mini-PROTEAN® Tetra System, Bio-Rad, München

Heizblock Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg

Küvetten halbmikro, Brand, Wertheim

Magnetrührer mit Heizplatte, IKA®-Werke, Staufen

Mikroskop, LABORLUX 11, Leitz, Wetzlar

Mini-Vials, 6 ml, Sarstedt, Nümbrecht

Objektträger, Menzel, Braunschweig

PCR-Tubes 0,2 ml, Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, USA

PCR-Tubes 0,5 ml, Roth, Karlsruhe

Petrischalen, Greiner Bio-One, Frickenhausen

Petrischalen viereckig mit Netzmuster, Simport, Kanada

pH-Meter CG 840, Schott, New York, USA

Photometer UV-160A, Shimadzu, Kyoto, Japan

Photometer UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japan

Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss, Roth, Karlsruhe

Reinstwasseranlage: Milli-RO Plus 30 und Milli-Q Plus 185, Millipore, Eschborn

Schüttler, New Brunswick Scientific, USA

Spritzen 1 ml steril, Terumo Europe, Leuven, Belgien

Spritzen 10 ml steril, B. Braun, Melsungen

Szintillationszähler, 1414 Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer Wallac, Absteinach

Thermocycler, Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg

Ultraschallgerät Sonorex, Bandelin, Berlin

UV-Tisch, Biometra, Göttingen

Vortexer, Vortexer-Genie2, Scientific Industries, Inc., New York, USA

Waagen, Sartorius, Göttingen

Thoma-Zählkammer, Brand, Bad Bevensen

Zellkulturschalen 150 mm, VWR International, Darmstadt

Zentrifuge 2-16 K, Sigma, Osterode

Zentrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg

Vakuum-Filtrationsgerät FH 225V Ten-Place Filter Manifold, Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, USA

2.7 DNA- Isolierung

Innerhalb der Arbeit wurde DNA von mehreren *Saccharomyces*-Stämmen isoliert. Diese Isolierung erfolgte mithilfe des DNeasy[®] Blood & Tissue Kits der Firma Qiagen. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers: „Purification of total DNA from yeast“.

Die DNA-Isolierung erfolgte über eine Silikagel-Membran. Während der Zentrifugation wurde die DNA selektiv an die Membran gebunden. Protein-, Polysaccharid- und Salzanteile wurden in zwei darauffolgenden Waschschrritten mit ethanolhaltigen Puffer von der Säule entfernt. Anschließend wurde die DNA von der Säule eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.8 Sequenzierung des Transporters *HXT3* und der Hexokinasen *HXK1* und *HXK2*

Es wurden neue spezifische Primer-Paare entwickelt, um Gene, die für Hxt3p, Hxk1p und Hxk2p kodieren, zu amplifizieren und zu sequenzieren. Hierzu wurden in der NCBI-Datenbank hinterlegte bekannte Sequenzen verwendet. Primerdesign erfolgte mit PrimerQuestSM (<http://eu.idtdna.com/scitools/applications/primerquest/>). Die Primer-Paare wurden auf Hairpins-, Self-Dimere- und Homo-Dimere-Bildung mit Hilfe von Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) geprüft und konnten so ausgeschlossen werden. Die Primer-Herstellung erfolgte bei der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim).

Ein PCR-Ansatz, der gleich für alle drei amplifizierten Gene war, setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen.

PCR-Ansatz

5 μ l 10x Reaktionspuffer S
 5 μ l 5x Enhancer
 1 μ l 10 mM dNTP-Mix
 2 μ l 25 mM MgCl₂
 1 μ l 10 pmol/ μ l Primer F
 1 μ l 10 pmol/ μ l Primer R
 1 μ l 1 U/ μ l Taq-DNA-Polymerase
 1 μ l DNA
 ad 50 μ l PCR-H₂O

Tabelle 3: PCR-Programm zur Amplifikation der Gene *HXT3*, *HXK1* und *HXK2*.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	95	5
Denaturierung	94	1
Primer-Bindung	55	1
DNA-Synthese	72	2
Finale Elongation	72	10

} 35 Zyklen

Das oben genannte Programm (Tabelle 3) lieferte mit wenigen Ausnahmen die gewünschten spezifischen Produkte. Wurden keine Amplifikate erhalten, wurde die Annealing-Temperatur auf 53 °C oder 51 °C erniedrigt.

Die PCR-Produkte (5 µl) wurden mit einem Ladepuffer (1 µl) auf ein 1 %-Agarosegel in 1x TBE-Puffer zusammen mit einem DNA-Marker aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 100 V. Anschließend wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt, wobei unter UV-Licht fluoreszierende DNA-Banden sichtbar wurden.

Im Fall von unspezifischen Produkten wurden die gewünschten Amplifikate aus dem Agarose-Gel mit Hilfe von QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen laut Hersteller-Angaben extrahiert. Diese PCR-Produkte wurden dann mit Hilfe von GeneJET™ PCR Purification Kit der Firma Fermentas nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

Die DNA-Amplifikate wurden von der Firma LGC (Berlin) sequenziert. Die sequenzierten DNA-Fragmente wurden dann zu kompletten Sequenzen der untersuchten Gene zusammengesetzt. Die Nukleotid-Sequenzen konnten dann mit Hilfe von ExPASy Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) in die Aminosäuresequenzen übersetzt werden. Cluster-Analyse der Hxt3p-Varianten erfolgte durch Alignment der Primärsequenzen mit Hilfe von Programm ClustalX 2.1 (<http://www.clustal.org/clustal2/>). Der Stammbaum wurde im Programm TreeView 1.6.6. (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) erstellt.

2.9 Zucker-Bestimmung im Kulturmedium

Um den Abbau von Zucker ausgewählter *Saccharomyces*-Stämme in Kulturmedien zu ermitteln, wurde ein enzymatischer Test zur Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose der Firma r-biopharm verwendet.

Die Medien wurden auf einen Titer in Höhe von 10000 Zellen/ml eingestellt, der mittels der Zählkammer (Thoma) ermittelt wurde. Solange entweder D-Glucose oder D-Fructose im Medium vorhanden war, wurde der jeweiligen Kultur in regelmäßigen Abständen 1 ml entnommen. Somit konnte der Umsatz von oben genannten Zuckern ermittelt werden. Gleichzeitig wurde das Wachstum der Hefen (OD_{600}) verfolgt. Die Kultur-Ansätze erfolgten in mindestens zwei Parallelen und die Messungen wurden mindestens zweifach durchgeführt.

2.10 Messung der Aufnahme rate von ^{14}C -markierten Zuckern durch Hefen

Durch Messung der Radioaktivität, konnte die initiale Menge von in Hefezellen aufgenommenen ^{14}C -markierten Zuckern ermittelt werden. Die verwendete Glucose-/Fructose-Konzentrationen reichten von 0,1 bis 10,0 mM.

Die verwendete D-[U- ^{14}C]-Glucose (0,392 mM, 566400 dpm/nmol) stammte von Hartmann Analytic (Braunschweig). Durch geeignete Verdünnung mit kalter Glucose (1 M) wurde [U- ^{14}C]-Glucose in einer Konzentration von 100 mM und einer spezifischen Aktivität von ca. 2000 dpm/nmol erhalten. Diese Lösung wurde mit deion. H_2O weiter verdünnt.

Die D-[U-¹⁴C]-Fructose (0,334 mM, 666000 dpm/nmol) stammte von American Radiolabeled Chemicals, Inc (St. Louis, USA). Durch geeignete Verdünnung mit kalter Fructose (1 M) wurde [U-¹⁴C]-Fructose in einer Konzentration von 100 mM und einer spezifischen Aktivität von ca. 2000 dpm/nmol erhalten. Diese Lösung wurde mit deion. H₂O weiter verdünnt.

Da diese errechnete Aktivität bei der Herstellung einer Zucker-Lösung, die aus ¹²C- und ¹⁴C-markierten Hexosen bestand, variieren konnte, wurde die Radioaktivität [dpm], die 1 nmol Zucker entsprach, bei jeder Messung geprüft.

Die Experimente wurden für jeden Stamm vierfach durchgeführt, jeweils zwei Mal aus zwei parallelen Kulturen. Die Methode wurde modifiziert nach Walsh *et al.* (1994). Die in diesem Versuch verwendeten Hefen wurden im B-Medium mit jeweils 100 g/l Glucose und Fructose bei 15 °C kultiviert. Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden geerntet und 5 min bei 9300 x g zentrifugiert. Für diesen Versuch wurden die Zellen vorbereitet, in dem sie dreifach mit 0,1 M Phosphat-Puffer pH 5,9 (siehe 2.5) gewaschen und anschließend in diesem resuspendiert wurden. Für jede Messung wurde eine OD₆₀₀ zwischen 2,0 und 3,5 eingestellt. Der ¹⁴C-markierte Zucker (12,5 µl) und die Hefezellen (50 µl) wurden 3 min bei 28 °C separat inkubiert, dann gemischt und 5 s inkubiert. Die Reaktion (Aufnahme) wurde gestoppt durch Zugabe der mit Zucker vermischten Hefezellen (62,5 µl) zu einem eiskalten 0,1 M Phosphat-Puffer pH 5,9 (3 ml). Die Zellen wurden mit Hilfe eines Vakuum-Filtrationsgeräts auf einem Glasfaser-Filter gesammelt und dreifach mit je 1 ml Puffer gewaschen. Diese Prozedur wurde so schnell wie möglich durchgeführt. Filter wurden in Mini-Vials überführt, mit Szintillationslösung (4 ml) bedeckt und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

Bei jeder Messung wurden zwei Blindwerte mitgeführt: ¹⁴C-markierter Zucker und Hefezellen wurden nach einander mit dem Puffer versetzt. Somit wurde die Verfälschung der Ergebnisse, die durch unspezifische Anheftung von Hexosen an den Hefezellen und Filtern entstehen könnten, vermieden. Nach Abzug des jeweiligen Blindwertes (BW) konnte die Aufnahme-Aktivität in nmol/mg Trockengewicht (TG) wie folgend berechnet werden:

$$[^{14}\text{C}]\text{-Zuckeraufnahme [nmol/mg TG]} = \frac{(\text{Radioaktivität der Probe} - \text{BW}) [\text{dpm}]}{\text{spezifische Aktivität} \left[\frac{\text{dpm}}{\text{nmol}} \right] \times \text{TG [mg]}}$$

BW = Blindwert; TG = Gewicht gefriergetrockneter Zellen

Um das Zuckeraufnahme-Verhalten der Zellen in Gegenwart von Alkohol zu testen, wurde in die Zucker-Lösung 4,0 Vol% Ethanol (Endkonzentration) gegeben. Eine andere Variante, in der die Antwort auf Ethanol-Stress getestet werden sollte, bestand in der Zugabe von 4,0 bis 10,0 Vol% Ethanol (Endkonzentration) zur Hefekultur 24 h vor der Messung der Zuckeraufnahme. Unter Trockengewicht wird in dieser Arbeit das Gewicht gefriergetrockneter Zellen verstanden (s.u.).

2.10.1 Gefriertrocknung und Bestimmung der Zellmasse

Die Hefezellen wurden in B-Medium (jeweils 100 g/l Glucose und Fructose) bei 30 °C kultiviert. Die Kulturen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase 10 min bei 5204 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden zweifach mit 10 ml 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und nochmals wie oben zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen und über 72 h in Lyovac GT2 (Steris, Braunsfeld) gefriergetrocknet.

Um das jeweilige Gewicht von Zellen, die in eine Zuckeraufnahme-Messung eingesetzt wurden zu ermitteln, wurde für jeden Stamm eine Kalibrierungsgerade erstellt (siehe Anhang, Abbildung 24 - Abbildung 28).

Hierzu wurden die gefriergetrockneten Zellen eingewogen, in die 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen (2 mg/ml), eine Verdünnungsreihe hergestellt und die OD₆₀₀ gemessen. Diese Bestimmung wurde für jeden Stamm dreifach durchgeführt. Die Kalibrierungsgeraden sind dem Anhang zu entnehmen. Aus der optischen Dichte konnte so jeweils das Gewicht gefriergetrockneter Zellen bestimmt werden.

2.11 Ermittlung der Ethanoltoleranz von Hefen

Diese Methode wurde modifiziert nach Kwołek-Mirek & Zdraż-Tęcza (2014) durchgeführt. Reinkulturen ausgewählter Hefestämme wurden ins YEP-Medium (pH 6,8) angeimpft und bei 15 °C und 20 °C inkubiert. Die Zellernte erfolgte nach 120 und 144 h. Die Hefezellen wurden mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und die OD₆₀₀ wurde auf 1,0 eingestellt. So hergestellte Zellsuspensionen wurden mit Ethanol versetzt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammensetzung der Zellsuspensionen, die auf Festmedien als Spots aufgetragen wurden.

End-Konzentration des Ethanols [% v/v]	Zugabe von			Zellsuspension OD ₆₀₀ = 1,0 [μl]
	≥99,8 % (v/v) Ethanol [μl]	MilliQ-H ₂ O [μl]	0,9 % NaCl [μl]	
Kontrolle 1	0	0	900	100
Kontrolle 2	0	900	0	100
5	50	850	0	100
10	100	800	0	100
15	150	750	0	100
20	200	700	0	100
25	250	650	0	100

Die Zellsuspensionen wurden entsprechend im MilliQ-H₂O und in 0,9 % NaCl-Lösung bis zu 10⁻⁴ verdünnt und weiterhin bei 20 °C oder 15 °C inkubiert. Je 5 μl aus den Suspensionen wurden am Tag

0, 1 und 7 auf YEP-Platten entweder mit Glucose oder Fructose als C-Quelle in Form von Spots aufgetragen. Die Inkubation erfolgte weiterhin bei den zwei Temperaturen. Das Wachstum auf den Festmedien wurde dokumentiert.

2.12 Zellaufschluss für enzymatische Bestimmungen

Die verwendete Zellaufschluss-Methode wurde modifiziert nach Lomolino *et al.* (2001) und Mateo & Di Stefano (1997).

Hefezellen wurden in B-Medium kultiviert (zwei Kulturen á 7 ml), in 15 ml Falcon-Gefäße überführt und 5 min bei 2655 x g zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde zwei Mal mit 1 ml Puffer C gewaschen, zwei Mal 5 min bei 2655 x g zentrifugiert und in Eppendorfgefäße überführt. Nach diesen Waschschritten wurden die Hefezellen gewogen und mit jeweils 1 ml Puffer A 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 2300 x g zentrifugiert. Jeweils 0,25 g des Zellpellets (Nassgewicht) wurden mit 1 ml Puffer B und 20 µl Lyticase (10000 U/ml) für 2,5 h bei 37 °C auf dem Thermomixer (950 rpm) inkubiert. Somit gewonnene Spheroblasten wurden 5 min bei 2300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Puffer C aufgenommen. Die Suspension wurde 5 min im Thermomixer bei 1100 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Spheroblasten für 5-8 min in das Ultraschallbad gestellt und danach 1 min bei 15700 x g zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

2.13 Protein-Bestimmung

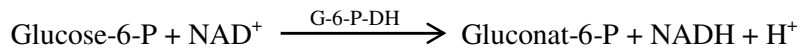
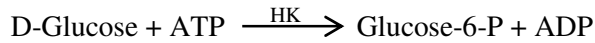
Die photometrische Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976) mit der Färbelösung Roti[®]-Quant der Firma Roth (Karlsruhe).

Es wurden Verdünnungen von BSA in Konzentrationen von 0,1 - 2,0 mg/ml im Probenpuffer hergestellt. Hiervon und vom Probenpuffer wurden jeweils 50 µl in Test-Gefäße pipettiert. Zu jedem Standard und zum Probenpuffer wurden 2,5 ml 1x-Färbelösung zugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren wurden die Proben gemischt. Nach 5 bis 30 min wurde die E_{595} der Standards gegen den Nullwert (Probenpuffer) gemessen. Die ermittelten Extinktions-Werte wurden gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen.

Von den Proben (Zellaufschlüsse) wurden die E_{595} ermittelt und anhand der Kalibrierungsgeraden die Proteinkonzentrationen bestimmt.

2.14 Quantitative Messung der Hexokinase-Aktivität

Die Hexokinase-Aktivität-Assay erfolgte modifiziert nach Worthington Enzyme Manual und Berthels *et al.* (2008). Die Messung basiert auf dem Prinzip, dass NAD^+ während der gekoppelten Reaktion von G-6-P-Dehydrogenase zu NADH reduziert wird. Somit erfolgt eine Steigerung der Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm.



Die verwendete G-6-P-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* (300 U/ml, Endkonz 1 U/ml) stammte von der Firma Roche (Mannheim). Alle für den Assay benötigten Lösungen wurden im 50 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,0) hergestellt. Die Aktivität-Messung wurde entweder mit Glucose oder Fructose als Substrat durchgeführt.

Zusammensetzung eines Ansatzes für ca. 8 Messungen:

6,84 ml	50 mM Tris/HCl pH 8,0
1,5 ml	0,67 M Glucose (oder Fructose)
0,3 ml	16,5 mM ATP
0,3 ml	6,8 mM NAD ⁺
30 µl	300 U/ml G-6-P-Dehydrogenase
90 µl	1 M MgCl ₂ x 7 H ₂ O

In Fall der Hexokinase-Aktivität-Messung mit Fructose als Substrat, wurden in den Master-Mix zusätzlich 5 µl Phosphoglucose-Isomerase (4000 U/ml; Endkonz 2,2 U/ml) zugegeben.

Für die Aktivität-Messung, die in Quarzküvetten erfolgte, wurden 50 µl vom Zellextrakt und 950 µl vom Master-Mix angesetzt. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur bei einer Wellenlänge von 340 nm für 1 min. Es wurde nur der lineare Bereich der Kinetik berücksichtigt.

Da der molare Extinktionskoeffizient von NAD(P)H bei der Wellenlänge von 340 nm 6220 L/mol x cm beträgt und der zellfreie Extrakt 1:20 im Ansatz verdünnt wurde, wurde die Hexokinase-Aktivität wie folgt berechnet:

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\Delta A_{340} / \text{cm} \times \text{min} \times 20}{6,22 \left[\frac{\text{ml}}{\mu\text{mol} \times \text{cm}} \right]}$$

$$\text{Spezifische Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]} = \frac{\Delta A_{340} / \text{cm} \times \text{min} \times 20}{6,22 \left[\frac{\text{ml}}{\mu\text{mol} \times \text{cm}} \right] \times \text{Gesamt-Protein-Konz.} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]}$$

Dabei ist zu beachten, dass 1 Unit die Menge von Enzym bedeutet, die nötig ist für den Umsatz von 1 μmol Substrat innerhalb 1 min.

K_m - und V_{max} -Werte mit Glucose und Fructose als Substrat wurden für Zucker-Konzentrationen in Höhe von 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 5 und 10 mM bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mit Excel gemäß einer nicht-linearen Regression nach der mathematischen Methode der kleinsten Quadrate (persönliche Mitteilung Dr. J. Fröhlich).

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss des Ethanols auf das Hefe-Wachstum

Um die Empfindlichkeit ausgewählter Hefestämme gegenüber Ethanol zu testen, wurde das Wachstum (OD₅₉₀) im Sabouraud-Medium (pH 3,5) über 14 Tage beobachtet. Getestet wurden: *S. cerevisiae*-Stämme 16.1, 54.41, Fermichamp® und Fermivin®, *S. bayanus*-Stamm HL77 und der Hybrid *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78. Der Zelltitert wurde auf 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Die Versuche wurden bei zwei verschiedenen Temperaturen durchgeführt: 15 °C und 20 °C.

3.1.1 Wachstum im Flüssigmedium

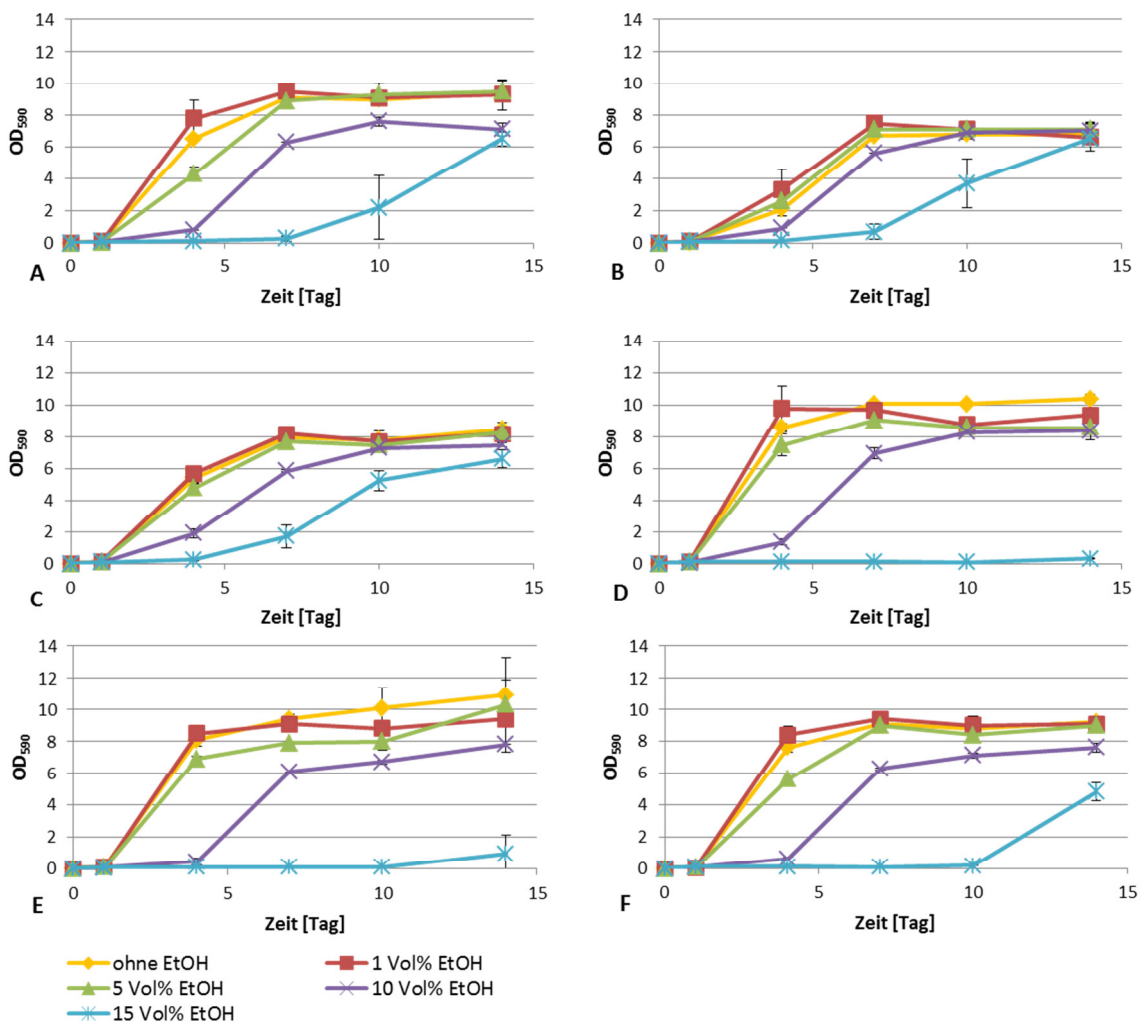


Abbildung 3: Wachstum ausgewählter Hefestämme bei 15 °C im flüssigen Sabouraud-Medium pH 3,5 versetzt mit Ethanol. (A) *S. cerevisiae*-Stamm 16.1, (B) *S. cerevisiae*-Stamm 54.41, (C) *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp®, (D) *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin®, (E) *S. bayanus*-Stamm HL77, (F) *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78 (siehe Anhang, Tabelle 16 - Tabelle 20).

Das Wachstum bei 15 °C im Sabouraud-Medium ohne, mit 1,0 Vol% und mit 5,0 Vol% Ethanol war bei allen Stämmen vergleichbar gut (Abbildung 3). OD₅₉₀-Werte von 9,0 und höher erreichten unter diesen Bedingungen die Stämme 16.1, Fermivin[®], HL77 und HL78. Die Stämme 54.41 und Fermichamp[®] erreichten etwas niedrigere OD₅₉₀-Werte von 6,8 und höher.

Erst bei 10,0 Vol% Ethanol im Medium waren Beeinträchtigungen im Wachstum festzustellen. Dies gilt für alle Stämme außer Stamm 54.41. Die maximal erreichten OD₅₉₀-Werte unter diesen Bedingungen liegen zwischen 7,0 (54.41) und 8,4 (Fermivin[®]). Das Wachstum begann unter diesen Bedingungen erst am Tag 4.

Das Verhalten der Hefestämme im Sabouraud-Medium mit 15,0 Vol% Ethanol ist ein Maß für die Empfindlichkeit gegenüber Ethanol. Während das Wachstum der Stämme 54.41 und Fermichamp[®] bereits an Tag 7 begann, war dies beim Stamm 16.1 erst ab Tag 10 erkennbar. Die maximalen OD₅₉₀-Werte lagen hier im Bereich 6,5-6,6. Einen OD₅₉₀-Wert von 4,8 erreichte der Stamm HL78, dessen Wachstum erst ab Tag 14 erkennbar war. Ein minimales Wachstum zum gleichen Zeitpunkt war dagegen bei den Stämmen Fermivin[®] und HL77 festzuhalten.

Insgesamt war es auffällig, dass die Hefestämme, die bei Ethanol-Konzentrationen zwischen 0 und 5,0 Vol% ein relativ schwaches Wachstum aufwiesen, bei der höchsten Ethanol-Konzentration die höchsten OD₅₉₀-Werte (54.41 und Fermichamp[®]) erreichten. Die Stämme 16.1, Fermivin[®], HL77 und HL78, die unter dem Einfluss von niedriger Ethanol-Konzentration die höchste OD₅₉₀-Werte zeigten, erreichten niedrigere OD₅₉₀-Werte im Medium mit 15,0 Vol% Ethanol und benötigten längere Zeit, um in die exponentielle Wachstumsphase zu kommen.

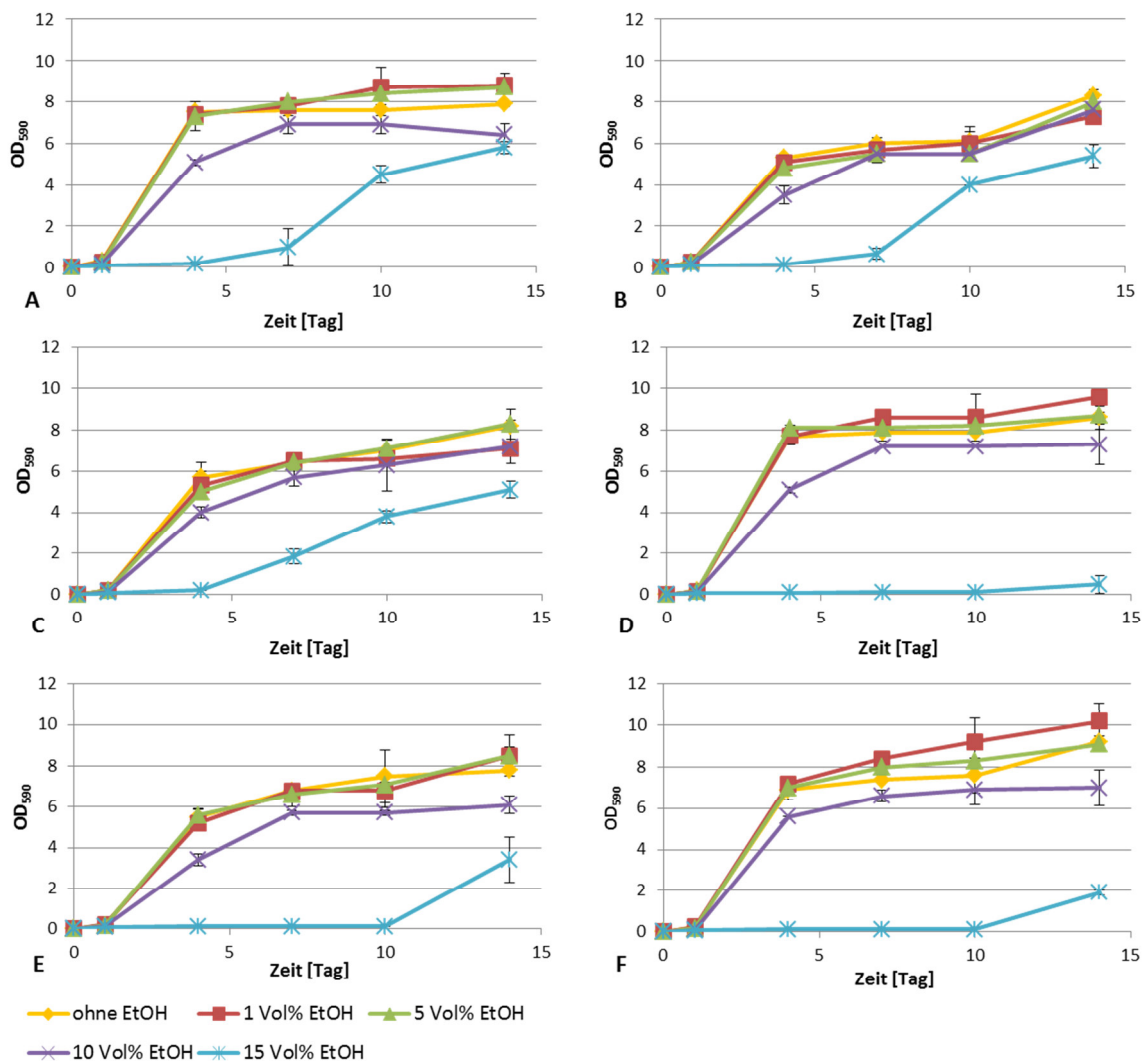


Abbildung 4: Wachstum ausgewählter Hefestämme bei 20 °C im flüssigen Sabouraud-Medium pH 3,5 versetzt mit Ethanol. (A) *S. cerevisiae*-Stamm 16.1, (B) *S. cerevisiae*-Stamm 54.41, (C) *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp®, (D) *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin®, (E) *S. bayanus*-Stamm HL77, (F) *S. cerevisiae* x *S. bayanus*-Stamm HL78 (siehe Anhang, Tabelle 16 - Tabelle 20).

Das Wachstum bei 20 °C war, wie zuvor bei 15 °C, im Sabouraud-Medium mit Ethanol-Konzentrationen in Höhe von 0 bis 5,0 Vol% bei allen untersuchten Stämmen vergleichbar gut (Abbildung 4). Bei dieser Temperatur wurde die maximale OD₅₉₀ vom Stamm Fermivin® (9,6) und Stamm HL78 (10,2) erreicht. Die maximale OD₅₉₀-Werte der Hefestämme 16.1, 54.41, Fermichamp® und HL77 lagen nicht unter 7,1.

Das Wachstum im Medium mit 10,0 Vol% Ethanol war bei den Stämmen 54.41 und Fermichamp® kaum beeinträchtigt. Für Stämme 16.1, Fermivin®, HL77 und HL78 gilt: der maximal erreichte OD₅₉₀-Wert im Medium mit 10,0 Vol% Ethanol unterschied sich um höchstens 3,2 vom maximal erreichten OD₅₉₀-Wert in Medien mit 0 bis 5,0 Vol% Ethanol.

Unterschiedliche Empfindlichkeit dieser Stämme gegenüber Ethanol stellte sich vor allem in Medien mit 15,0 Vol% Ethanol heraus. Während Fermivin®, HL77 und HL78 einen Anstieg des OD₅₉₀-wertes

erst am Tag 14 zeigten, wuchsen unter den gleichen Bedingungen die Stämme 16.1, 54.41 und Fermichamp® schon ab Tag 7. Diese erreichten am Tag 14 einen OD₅₉₀-Wert von 5,1-6,4.

Um das Verhalten der jeweiligen Stämme gegenüber dem Ethanol in Abhängigkeit von der Temperatur besser vergleichen zu können, wurden die maximalen OD₅₉₀-Werte in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Maximale erreichte OD₅₉₀-Werte (Mittelwerte) der untersuchten Hefe-Kulturen. Das Wachstum erfolgte bei 15°C und 20 °C im flüssigen Sabouraud-Medium pH 3,5 mit Ethanol. In Klammer sind die Tage angegeben, an denen die Werte gemessen wurden.

Ethanol- Konz. [% v/v]	0	1	5	10	15
Stamm	15 °C				
16.1	9,4 (T14)	9,5 (T7)	9,5 (T14)	7,6 (T10)	6,5 (T14)
54.41	6,8 (T10)	7,5 (T7)	7,1 (T7)	7,0 (T14)	6,5 (T14)
Fermichamp®	8,5 (T14)	8,2 (T7)	8,3 (T14)	7,5 (T14)	6,6 (T14)
Fermivin®	10,4 (T14)	9,8 (T4)	9,1 (T7)	8,4 (T14)	0,3 (T14)
HL77	10,9 (T14)	9,4 (T14)	10,3 (T14)	7,8 (T14)	1,0 (T14)
HL78	9,2 (T14)	9,4 (T7)	9,0 (T7)	7,6 (T14)	4,8 (T14)
	20 °C				
16.1	7,9 (T14)	8,8 (T14)	8,7 (T14)	6,9 (T7)	5,8 (T14)
54.41	8,3 (T14)	7,3 (T14)	8,0 (T14)	7,6 (T14)	5,4 (T14)
Fermichamp®	8,2 (T14)	7,1 (T14)	8,3 (T14)	7,2 (T14)	5,1 (T14)
Fermivin®	8,6 (T14)	9,6 (T14)	8,7 (T14)	7,3 (T14)	0,5 (T14)
HL77	7,8 (T14)	8,5 (T14)	8,5 (T14)	6,1 (T14)	3,4 (T14)
HL78	9,2 (T14)	10,2 (T14)	9,1 (T14)	7,0 (T14)	1,9 (T14)

Im Medium ohne Ethanol zeigte *S. cerevisiae*-Stamm 16.1 am Tag 14 den höchsterreichten OD₅₉₀-Wert von 9,4 bei 15 °C. Dieser Stamm hat den höchsten OD₅₉₀-Wert von 9,5 in Sabouraud-Medien am Tag 7 mit 1,0 Vol% und am Tag 14 mit 5,0 Vol% Ethanol bei 15 °C erreicht. Bei beiden untersuchten Temperaturen hatten 15,0 Vol% Ethanol das Wachstum des Stammes 16.1 beeinträchtigt. Dieser benötigte längere Zeit um in die exponentielle Wachstumsphase zu kommen.

Den höchsten OD₅₉₀-Wert von 8,3 im Medium ohne Ethanol erreichte *S. cerevisiae*-Stamm 54.41 bei 20 °C am Tag 14. In einem Medium mit Ethanol zeigte dieser Stamm den maximalen OD₅₉₀-Wert von 8,0 zum gleichen Zeitpunkt (5,0 Vol% Ethanol, 20 °C). Höhere Ethanol-Konzentrationen hatten einen negativen Einfluss auf das Wachstum. Bei 15,0 Vol% Ethanol erreichte am Tag 14 der Stamm 54.41 OD₅₉₀-Werte von 6,5 und 5,4 bei entsprechend 15 °C und 20 °C. Trotz relativ hoher OD₅₉₀-Werte

brauchte der Stamm 54.41 eine längere Zeit bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase. Die Kulturen mit 1,0 - 10,0 Vol% Ethanol-Konzentration schienen unbeeinflusst zu bleiben.

Niedrige Ethanol-Konzentrationen hatten kaum einen Einfluss auf das Wachstum von *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp®. Der negative Einfluss vom Ethanol war bei einer Konzentration in Höhe von 15,0 Vol% feststellbar.

Im Fall von *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin® wurde der höchste OD₅₉₀-Wert in Medium ohne Ethanol am Tag 14 bei 15 °C erreicht (10,4). Bei beiden untersuchten Temperaturen wurde eine Beeinträchtigung im Wachstum in Anwesenheit von Ethanol beobachtet. Die Konzentration in Höhe von 15,0 Vol% erlaubte nur noch ein verspätetes, schwaches Wachstum von Stamm Fermivin®.

S. bayanus-Stamm HL77 erreichte am Tag 14 den höchsten OD₅₉₀-Wert bei 15 °C im Medium ohne Ethanol (10,9). Ab einer Konzentration in Höhe von 10,0 Vol% wurde der negative Einfluss von Ethanol auf das Wachstum von Stamm HL77 unter den getesteten Bedingungen deutlich.

S. bayanus x *S. kudriavzevii* x *S. cerevisiae*-Stamm HL78 wuchs im Medium ohne Ethanol bei 15 °C und 20 °C gleich gut. Überraschenderweise hatte 1,0 Vol% Ethanol einen positiven Effekt auf das Wachstum bei beiden Temperaturen. Bei 15,0 Vol% Ethanol brauchte der Hybrid-Stamm HL78 eine längere Zeit, um in die exponentielle Wachstumsphase zu kommen.

3.1.2 Wachstum auf Festmedium

Der Einfluss von Ethanol auf das Wachstum der Teststämme, wurde auch auf festen Agar-Platten (pH 6,8) getestet. Hierzu wurden Zellsuspensionen, versetzt mit Ethanol, auf YEP-Platten entweder mit Glucose oder Fructose als C-Quelle aufgetragen. Diese Zellsuspensionen wurden davor über sieben Tage mit 5,0 bis 25,0 Vol% Ethanol bei 15 °C und 20 °C inkubiert. Ein Beispiel, in welcher Form die Spots aufgetragen wurden, ist in der Abbildung 5 zu sehen.

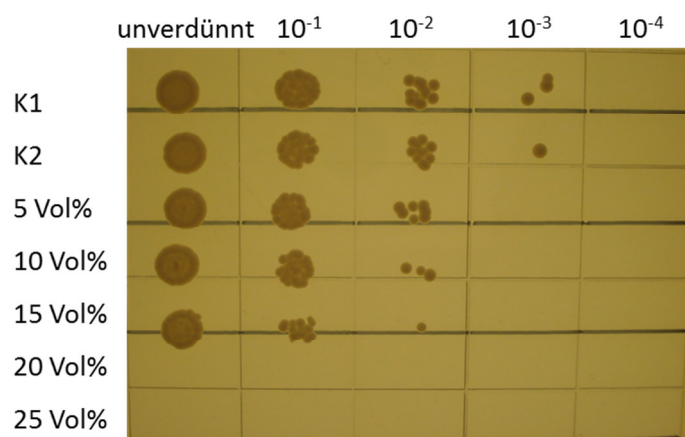


Abbildung 5: Kolonien des Hybrids *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78 auf YEP-Platten pH 6,8 mit Glucose als C-Quelle. Mit Ethanol versetzte Zellsuspensionen (5 - 25 Vol%) und zwei Kontrollen wurden bei 20 °C inkubiert und am Tag 1 auf YEP-Platten aufgetragen. Die Suspensionen wurden bis 10⁻⁴ verdünnt (siehe 2.11).

Die Tabelle 6 wurde nach Sichtung der YEP-Platten erstellt.

Tabelle 6: Zusammenstellung des Hefe-Wachstums auf YEP-Platten pH 6,8 mit Glucose oder Fructose als C-Quelle. Angegeben ist die höchste Ethanol-Konzentration [Vol%], bei der die Hefezellen überlebt haben und deren Wachstum auf Festmedium beobachtet wurde. Die Methode wurde im Punkt 2.11 beschrieben.

Gattung, Stamm		<i>S. cerevisiae</i> Fermichamp®	<i>S. cerevisiae</i> Fermivin®	<i>S. bayanus</i> HL77	<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> x <i>S. bayanus</i> HL78
		15 °C			
0	Glc	15	20	25	20
	Fru	25	25	25	25
1	Glc	10	15	20	15
	Fru	20	15	20	15
7	Glc	10	15	15	15
	Fru	15	15	15	15
		20 °C			
0	Glc	20	25	25	20
	Fru	20	20	20	20
1	Glc	15	15	15	15
	Fru	15	15	15	15
7	Glc	15	15	5	10
	Fru	15	15	10	10

Das Wachstum der Stämme schien bei 15 °C weniger vom Ethanol negativ beeinflusst zu sein als bei 20 °C. Nach sieben Tagen Inkubation überlebten bei 15 °C fast alle getesteten Stämme bei bis zu 15,0 Vol% Ethanol.

Allgemein gilt, dass je länger die Ethanol-Inkubation dauert, desto mehr ist das Wachstum aller Stämme bei hohen Ethanol-Konzentrationen beeinträchtigt. Die Antwort auf den Ethanol-Stress spiegelt sich in der Überlebensfähigkeit wieder und variiert unter den Stämmen. Die größte Beeinträchtigung in Wachstum war bei *S. bayanus*-Stamm HL77 bei 20 °C zu beobachten. Während nach direkter Ethanol-Zugabe die Zellen in Anwesenheit von bis zu 25,0 Vol% Ethanol überlebten, wurde am Tag 7 deren Wachstum nur noch nach Inkubation mit 5,0 Vol% Ethanol bestätigt.

Den Zellsuspensionen wurde in Festmedien entweder Glucose oder Fructose angeboten. Damit sollte mögliche Präferenz zu einer der Hexosen überprüft werden. Auffällig war das Verhalten vom Stamm Fermichamp® als er mit Ethanol bei 15 °C inkubiert wurde. Während direkt nach der Ethanol-Zugabe sein Wachstum bei bis zu 15,0 und 25,0 Vol% Ethanol mit entsprechend Glucose und Fructose als C-

Quelle erfolgte, hat er nach sieben Tagen bei bis zu 10,0 und 15,0 Vol% Ethanol überlebt. Auch zu diesem Zeitpunkt erfolgte das Wachstum nach Inkubation mit höherer Ethanol-Konzentration auf Fructose. Unter diesen Bedingungen kam also sein fructophiler Charakter zum Vorschein.

3.2 Hxt3p-Aminosäuresequenzen der untersuchten Hefestämme

Auf Grund der zentralen Bedeutung des Hexose-Transporters Hxt3p für die Most-Vergärung wurde dessen Aminosäuresequenz auf ihre Variabilität bei verschiedenen *Saccharomyces* Arten und ihren Hybriden überprüft. Die Primer zur PCR-Amplifikation des *HXT3*-Gens wurden anhand der in der Datenbank hinterlegten Sequenz für den *S. cerevisiae*-Standardlaborstamm S288c entwickelt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zur Amplifizierung und Sequenzierung des *HXT3*-Gens verwendete Primer-Paare.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge [bp]	GC-Gehalt [%]	T _m [°C]
HXT3FOR	CAGGCGCTGTTTTATCTTCAGCA	23	48	55.3
HXT3REV	TCAGCACTACGGTTTAGCGTGAA	23	48	55.3
HXT3FOR2*	TGGGTGTTGGTGGTATTGCCGT	22	55	56.7
HXT3REV2*	CCTGTTCCGGCTCTCGCCGATG	21	67	60.2
HXT3FOR6	GGGTTGCATATAAATACAGGCGCT	24	46	55.7
HXT3REV6	CATTATTGACTAGCACATCGAATCT	25	36	52.8

*im Fall von unspezifischen PCR-Produkten, wurden die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert

Die Nukleotidsequenz von *HXT3*, welche aus 1704 Basenpaaren besteht, konnte aus zwei bis drei sequenzierten PCR-Produkten zusammengesetzt werden. Die Primer-Paare HXT3FOR/HXT3REV und HXT3FOR6/HXT3REV6 konnten optional verwendet werden. Darauf folgte die Sequenzierung des PCR-Produktes nach dem Einsatz des Primer-Paares HXT3FOR2/HXT3REV2. Eine Übersicht über die Bindestellen dieser Primer ist in der Abbildung 6 dargestellt.

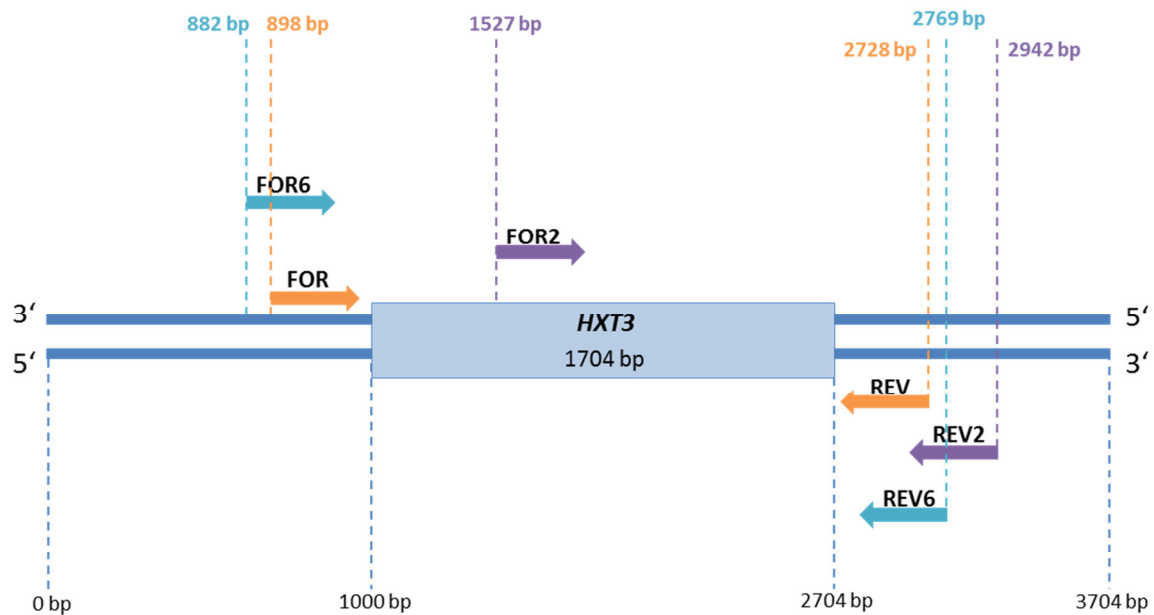


Abbildung 6: Übersicht über die Bindestellen der Primer-Paare, die zur Amplifizierung und Sequenzierung des *HXT3*-Gens entwickelt wurden. Neben der schematisch dargestellten 1704 bp langen *HXT3*-Nukleotidsequenz wurden flankierende Regionen in Länge von jeweils 1000 bp dargestellt.

Auf diese Weise gelang es, die *HXT3*-Sequenzen von *S. cerevisiae* und Hybriden der insgesamt 17 in der Kulturensammlung des IMW hinterlegten Stämme (eigene Isolate und kommerzielle Stämme) zu ermitteln (8.1). Die Gensequenzen wurden mit Hilfe von ExPASy Translate tool in die entsprechenden Proteinsequenzen übersetzt. Diese und zusätzlich 34 aus der NCBI- und YRC-Datenbank entnommene Aminosäuresequenzen (siehe Anhang, Tabelle 21) wurden mittels Programm ClustalX 2.1 verglichen. Die Aminosäureaustausche im Vergleich zum *S. cerevisiae* Laborstamm S288c wurde in der Tabelle 8 rot und grün hinterlegt.

Tabelle 8: Variable Regionen innerhalb der Proteinsequenz des Hexose-Transporters Hxt3p in untersuchten *Saccharomyces*-Arten und ihren Hybriden. Grün hinterlegt sind konservative, rot hinterlegt sind signifikante Aminosäure-Substitutionen im Vergleich zur Hxt3p -Aminosäuresequenz des Laborstammes S288c. Blau markiert sind selbst sequenzierte Sequenzen. iL: Inside-Loop (Loop innerhalb der Zelle); oL: Outside-Loop (Loop außerhalb der Zellmembran), TM: Transmembran, X: unbekannte Aminosäure. *zusätzliche Substitutionen: D550E, A551E, L552M, M553T, Q557K, F559L, K562R, G565S; K566T; **zusätzliche Substitutionen: S354K, F368L, C372A, R408K, I464V, Q542R, N546D, K567N.

Spezies/Stamm	Aminosäure-Position/ Transmembranregion																																					
	iL N-Terminus	oL TM 1-2			TM 2	TM 3	TM 5	iL TM 6-7		TM 7	TM 8	iL TM 8-9	TM 9	oL TM 9-10		TM 10	iL TM 10-11	TM 11																				
<i>S. cerevisiae</i> S288c, Fermivint [®] , AMRI796 [®] , 29 (ATCC 48427), 33/ATCC 48428), 101 (ATCC 48430), BC, 87, DBVGL106	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
UCD939	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
16.1	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
712	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
642 (Lalvin DV10 [®])	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
Lalvin EC1118 [®]	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
Fermichamp [®] (INFA 67), 72 (CBS 429), 73, 54, 41, 596, 657 (SIHA 4 [®])	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
DSM 70449 [®] (CBS 1171)	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
Foster [®] , Foster [®] **	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
UCD2031, 3211-1	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
<i>S. kudriavzevii</i> IF1802**	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
<i>S. kudriavzevii</i> VIN7 [®]	D	A	L	L	L	K	S	Y	S	I	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i>	E	T	F	V	H	T	P	A	V	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471	
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> x <i>S. bayanus</i> HL78	E	T	F	V	H	T	P	A	V	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471	
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i> 3211-2	E	T	F	V	H	T	P	A	V	A	M	T	I	L	A	S	V	V	F	K	M	T	N	349	371	390	398	389	392	414	415	416	417	428	449	459	471	

Die Cluster-Analyse basierend auf Hxt3p-Aminosäuresequenzen erfolgte mit insgesamt 51 Stämmen unterschiedlicher Herkunft. Die Mehrheit der untersuchten Stämme waren Isolate aus solchen alkoholischen Getränken wie Wein, Bier, Sake und Palmwein. Weiterhin wurden die Laborstämme, klinische Isolate, Bäckerhefen, Pflanzen- und Boden-Isolate der Analyse unterzogen. Der Stammbaum wurde im Programm TreeView 1.6.6. (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) erstellt.

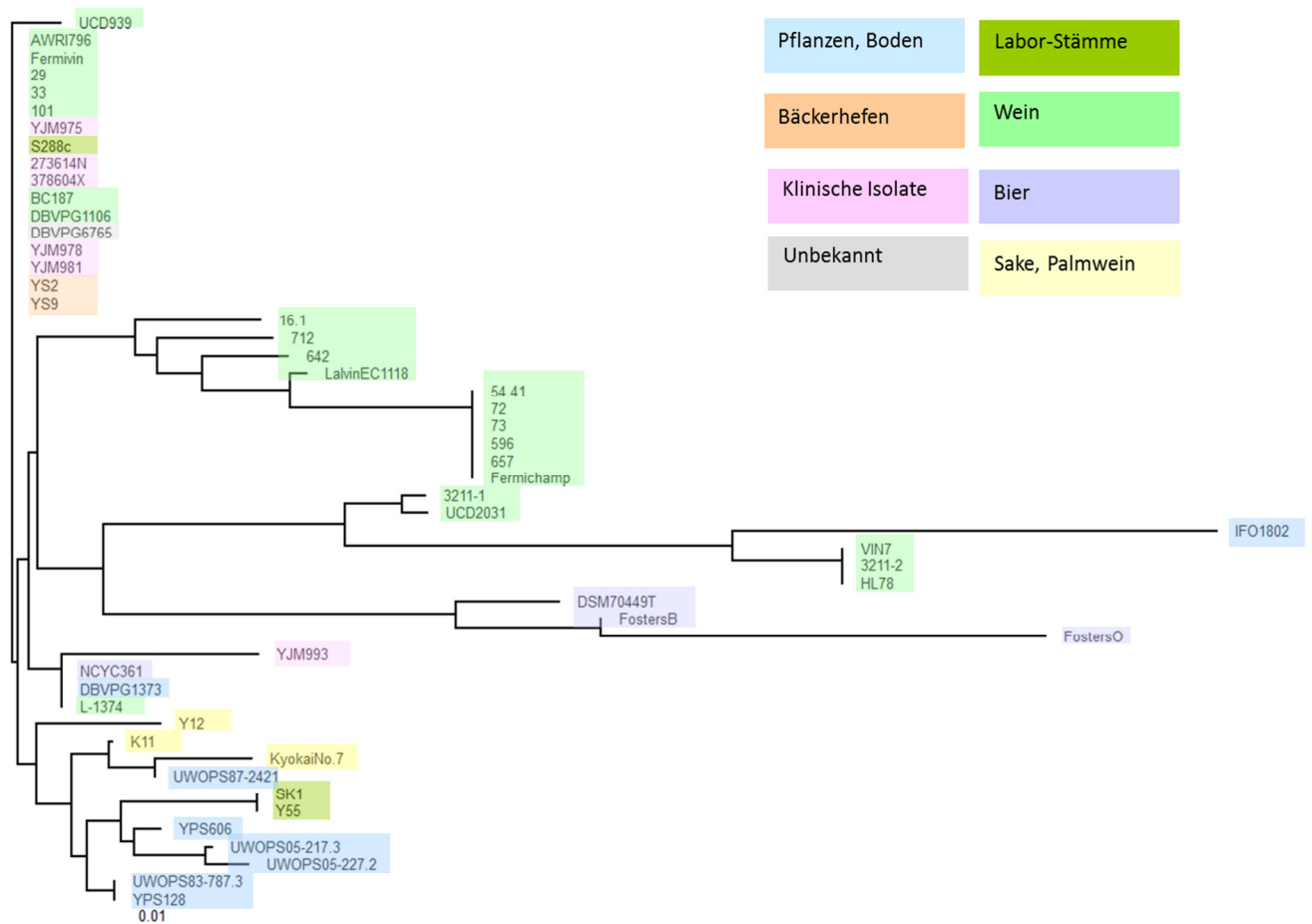


Abbildung 7: Cluster-Analyse der Gattung *Saccharomyces* und Hybrid-Stämmen basierend auf Hxt3p-Sequenzen (Tabelle 21, Anhang). Als statistische Methode wurde Neighbor-Joining verwendet. Der Maßstab entspricht einer Distanz von 1 %. Die Herkunft der Stämme ist farbig unterlegt.

Die Mehrzahl der 51 untersuchten Hefestämme zeigten Variationen von Carrier Hxt3p im Vergleich zum Referenzstamm S288c (Tabelle 8; Abbildung 7). Die deutlichsten Unterschiede traten in domestizierten Wein- und Bierhefen auf. Stämme aus natürlichen Habitaten (Pflanzen, Boden) und klinische Isolate zeigten keine oder nur geringe Abweichungen.

Es lassen sich fünf Muster alleler Varianten unterscheiden (Tabelle 8):

- 15 *S. cerevisiae*-Stämme (inkl. sieben Weinhefen) zeigten das gleiche Allel wie der Referenzstamm S288c.
- Fünf *S. cerevisiae*-Stämme enthielten das Fermichamp® Allel (zehn Substitutionen). Die Stämme 642 und Lalvin EC1118® zeigten ein ähnliches Muster.
- *S. cerevisiae* 3211-1 war bezüglich Hxt3p nahezu identisch mit UCD2031 (acht Substitutionen gegenüber S288c).
- Die Bierhefen (DSM 70449^T, FostersB®, FostersO®) unterschieden sich signifikant vom Referenz-Allel (11 - 20 Substitutionen).
- Zwei Hybrid-Stämme zeigten die gleiche Sequenz wie *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* VIN7® (14 Substitutionen).

S. kudriavzevii Stamm IFO1802 zeigten ein nahezu gleiches Substitutions-Muster wie die Hybride (Tabelle 8), aber noch weitere acht Substitutionen am C-Terminus. Somit stammt das Gen *HXT3* der Hybrid-Stämme wahrscheinlich von dieser *Saccharomyces* Spezies. Die restlichen Sequenzen, repräsentiert vor allem von Labor- und Umweltisolaten, zeigten nur zwei bis fünf Substitutionen.

3.3 Struktur-Modell des Hxt3p-Transporters

Bis jetzt war keine Kristall-Struktur des Hexose-Transporters Hxt3p der Hefen verfügbar. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den *HXT3*-Allel-Varianten und dem Zucker-Transport durch dieses Protein zu untersuchen, wurde ein Hxt3p-Struktur-Modell auf Basis des Proton/Xylose-Symporters Xyle aus *Escherichia coli* erstellt. Während des Xylose-Transports, wird Xyle einer deutlichen Konformationsänderung mit einer räumlichen Umordnung von Teilen des Proteins ausgesetzt. Die Folgen sind sogenannte „inward-open“- und „outward-open“-Konformationen, deren Strukturen vor kurzem mit Hilfe von Kristallographie aufgelöst wurden (Sun *et al.*, 2012; Quistgaard *et al.*, 2013; Wisedchaisri *et al.*, 2014). Die N-terminalen Helices werden in Richtung der C-terminalen Helices und zurück verschoben. Diese Bewegung wird „rocker-switch“ genannt und erlaubt den Wechsel zwischen „inward-open“- und „outward-open“- Konformation. Des Weiteren wird durch das Rearrangement der cytosolischen Domäne die Auflösung der Helices in der „outward-open“-Konformation und der Wechsel zur mehr flexiblen „inward-open“-Struktur bewirkt (Quistgaard *et al.*, 2013; Wisedchaisri *et al.*, 2014). Die Struktur der cytosolischen Domäne in der „inward-open“-Konformation wurde jedoch noch nicht gelöst.

Dargestellt wurden „outward-open“-Konformationen des modellierten Transporters Hxt3p und die Aminosäure-Substitutionen der drei Hauptgruppen mit unterschiedlichem Aminosäuren-Muster (Abbildung 8): CBS 429 (Fermichamp®-Typ), DSM 70449^T (Bierhefe) und HL78 (Hybrid).

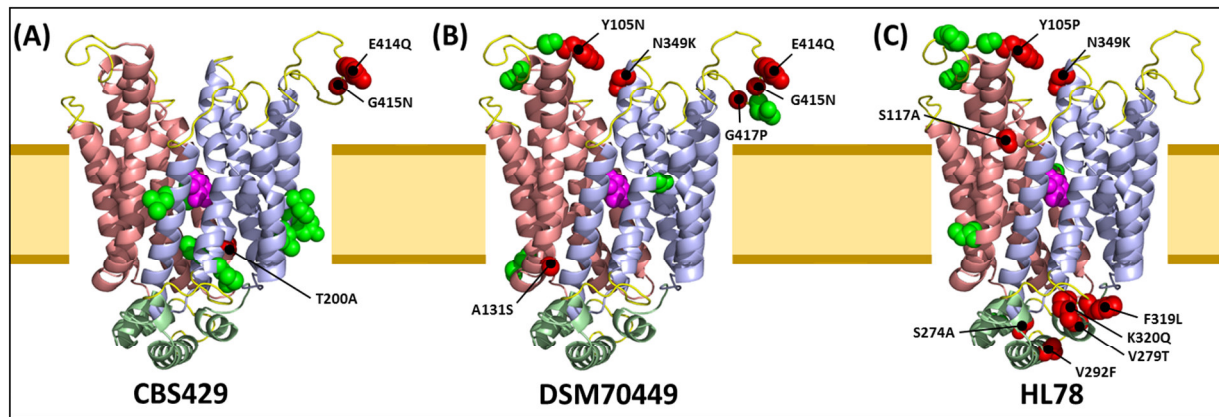


Abbildung 8: Struktur-Modell des Hexose-Transporters Hxt3p basierend auf der Proteinsequenz des *S. cerevisiae* Laborstammes S288c. (A) *S. cerevisiae*-Stamm CBS 429 (B) *S. cerevisiae*-Stamm DSM 70449^T (C) *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78. Hell rot markiert ist die N-terminale Domäne des Proteins; hell blau markiert ist die C-terminale Domäne des Proteins; hell grün markiert ist die cytosolische Domäne; rot markiert sind signifikante Aminosäure-Substitutionen; grün markiert sind konservative Aminosäure-Substitutionen; pink markiert ist eine Hexose in der Substrat-Bindetasche des Proteins. Das Modell wurde von Prof. Dr. E. Jaenicke erstellt mit Hilfe von Modeller 9.14 (<https://salilab.org/modeller/9.14/release.html>). Als Basis diente die zu 30 % homologe Struktur von XylE (PDB Code: 4GBY)- einem Proton/Xylose-Symporter aus *E. coli* (Eswar *et al.*, 2006; Marti-Renom *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2012).

Alle drei Isoformen haben mehrere Aminosäure-Substitutionen im Vergleich zu Hxt3p-Aminosäuresequenz des Standardstammes S288c, allerdings haben vermutlich nicht alle einen bedeutenden Einfluss auf Struktur und Funktion des Proteins. In Folge dessen wurden nur Substitutionen betrachtet, die zwischen Aminosäuren aus zwei unterschiedlichen funktionellen Gruppen stattgefunden haben. Diese sind folgend definiert: NQ, DE, ST, KRH, FYW und ALIVM.

Aus der Abbildung 8 wird sichtbar, dass die Aminosäure-Substitutionen, die eine mögliche Veränderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Proteins mit sich bringen, sich auf drei Bereiche des Hxt3p konzentrieren. Diese so genannten Hotspots sind: die Region zwischen den N- und C-terminalen Domänen, die cytosolische Domäne und der Outside-Loop zwischen Transmembranregion 9 und Transmembranregion 10.

Hotspot 1: Die Hxt3p-Isoformen der Stämme DSM 70449^T und HL78 zeigen in dieser Region fast gleiche Aminosäure-Substitutionen. Während in der Hxt3p-Isoform des Stammes DSM 70449^T Tyrosin gegen ein deutlich kleineres Asparagin ausgetauscht wurde (Y105N), wurde an der gleichen Stelle in der Isoform des Stammes HL78 ein Tyrosin durch das kleinere Prolin ersetzt (Y105P). Weiterhin wurde das Asparagin in Transmembran 7 der C-terminalen Domäne in beiden Isoformen durch Lysin (N349K) ausgetauscht und damit eine neue Oberflächenladung eingeführt. Innerhalb dieses Hotspots liegen noch weitere Aminosäure-Substitutionen vor: T200A in Transmembranregion 5 (Stamm CBS 429), A131S in Transmembranregion 2 (DSM 70449^T) und S117A in Transmembranregion 2 (HL78).

Hotspot 2: Innerhalb der cytosolischen Domäne der Hxt3p-Isoform vom Hybrid-Stamm HL78 befinden sich fünf signifikante Substitutionen: S274A, V279T, V292F, F319L und K320Q.

Hotspot 3: Weitere Aminosäure-Substitutionen befinden sich in dem Outside-Loop zwischen Transmembranregion 9 und 10 der Hxt3p-Isoformen der Stämme CBS 429 und DSM 70449^T. In beiden Hefestämmen liegen benachbarte Aminosäure-Austausche vor: E414Q und G415N. Des Weiteren befindet sich in der Hxt3p-Isoform des Stammes 70449^T eine G417P Aminosäure-Substitution. Leider ist die Struktur dieses Proteinbereiches auf Grund von fehlenden strukturellen Homologen nicht bekannt. Die in der Abbildung 8 gezeichnete Struktur ist spekulativ.

3.4 Wachstum und Zucker-Verwertung der untersuchten Hefestämme

In dieser Versuchsreihe wurde die Fähigkeit der Hefen, Zucker abzubauen, in Medien mit variabler Zusammensetzung genauer untersucht.

Hierfür wurde das Most-ähnliche B-Medium mit jeweils 100 g/l Glucose und Fructose als Basis-Medium verwendet. In den nachfolgenden Versuchen bezeichnet ein sogenanntes Stress-Medium ein modifiziertes B-Medium, dessen Fructose:Glucose-Verhältnis verändert wurde. Laut Gafner & Schütz (1996) kann man eine Gärstockung prognostizieren, wenn Glucose:Fructose-Verhältnis unter 0,1 liegt. Optional trägt das Medium mit sich weitere Stress-Faktoren für das Hefe-Wachstum: minimale Ammonium-Konzentration (1/10 der Standard-Menge in B-Medium) und das Vorliegen von Ethanol in unterschiedlicher Konzentrationen. Der Nährstoff-Mangel (Palma *et al.*, 2012) und hohe Ethanol-Konzentrationen (Bisson, 1999) sind nämlich die größten Stress-Faktoren während der Most-Vergärung. Diese Medium-Varianten wurden in der Tabelle 9 zusammengefasst.

Das Hauptaugenmerk galt besonders der Frage, ob sich Stämme mit unterschiedlichem Hexose-Transporter Hxt3p in dieser Hinsicht unterscheiden. Entsprechend wurden Vertreter der Typen Femivin[®], Fermichamp[®] und Hybrid-Stämme untersucht. Die kommerziellen *S. cerevisiae*-Stämme Femivin[®] und Fermichamp[®] werden als Starterkulturen oder zum Restarten von stockenden Mosten verwendet. Der *S. cerevisiae*-Stamm 33 ist eine Weinhefe, genauso wie *S. cerevisiae*-Stamm 54.41 und Hybrid-Stamm HL78, die aus spontan gärendem Most isoliert wurden.

Tabelle 9: Zusammenstellung der bedeutenden Stress-Parameter der verwendeten Medien.

Medium- Bezeichnung	Fructose- Konz. [g/l]	Glucose- Konz. [g/l]	Fructose:Glucose	Ethanol- Konz. [Vol%]	(NH ₄) ₂ SO ₄ - Konz. [g/l]	AS- Stammlsg.- Konz. [Vol%]
B-Medium	100	100	1:1	-	1,5	10
Stress-Medium 1	36	4	9:1	-	0,15	1
Stress-Medium 2	38	2	19:1	-	0,15	1
Stress-Medium 3	36	4	9:1	5	0,15	1
Stress-Medium 4	36	4	9:1	9	0,15	1
Stress-Medium 5	36	4	9:1	12	1,5	10
Stress-Medium 6	36	4	9:1	12	0,15	1

Für die Vorkulturen wurde B-Medium mit jeweils 50 g/l Glucose und Fructose verwendet und bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei 20 °C inkubiert. Die ausgewählten Hefestämme wurden in einer Thoma-Zählkammer ausgezählt und der Titer auf 10⁴ Zellen/ml Medium eingestellt. Das Wachstum erfolgte bei 15 °C und der Zeitraum, in dem der Zucker vollständig abgebaut wurde, war vom verwendeten Medium abhängig.

Zu definierten Zeitpunkten wurden die OD₆₀₀ und die verbleibende Konzentration von Glucose und Fructose im Medium gemessen (siehe Anhang, Tabelle 22 - Tabelle 28). Die Zucker-Bestimmung erfolgte enzymatisch unter Verwendung eines Testkits der Firma r-biopharm (Darmstadt). Da innerhalb jeder Messreihe eine unbeimpfte Kontrolle mitgeführt wurde, war festzustellen, dass die gemessene Konzentration von der tatsächlichen Einwaage um ca. 4,0 % abweichen konnte.

Die Glucose-Verwertung wurde auf Grund ihrer niedrigen Konzentration in den Stress-Medien 1 - 6 hier nicht betrachtet. Diese Werte sind dem Anhang zu entnehmen.

B-Medium

Das Wachstum im B-Medium wurde über den Zeitraum von 22 Tagen beobachtet. Bis dahin war der Gesamtzucker mit einer Konzentration in Höhe von 200 g/l von allen getesteten Stämmen abgebaut. Der Verlauf des Zuckerabbaus und das dazu gehörende Wachstum (OD₆₀₀) sind in der Abbildung 9 zu sehen.

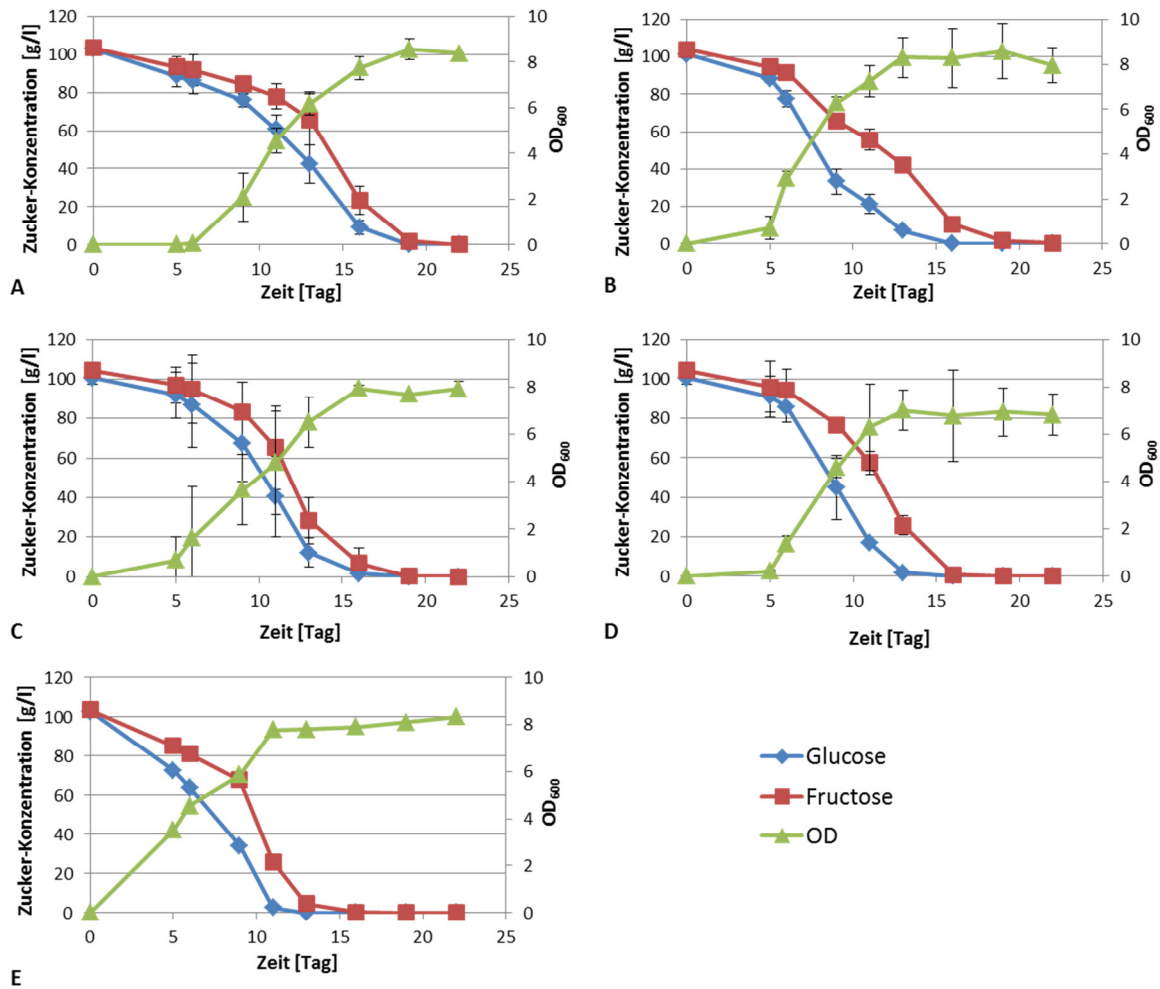


Abbildung 9: Das Wachstum und der Zucker-Abbau im B-Medium mit 1:1 Fructose:Glucose-Verhältnis. Dargestellt sind Kulturen von (A) *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp®, (B) *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin®, (C) *S. cerevisiae*-Stamm 54.41, (D) *S. cerevisiae*-Stamm 33 und (E) *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78.

Der Verlauf des Wachstums der getesteten Stämme war recht ähnlich. Es wurde ein OD₆₀₀-Wert bis zu 8,6 erreicht. Es war festzustellen, dass die Verwertung von Glucose und Fructose gleichzeitig erfolgte, allerdings mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Auffällig war, dass die *S. cerevisiae*-Stämme Fermivin® und 33 und der Hybrid-Stamm HL78 die Glucose schneller abbauten im Vergleich zu *S. cerevisiae*-Stämmen Fermichamp® und 54.41. Deutlich wurde diese Beobachtung besonders in der exponentiellen Wachstumsphase an Tagen 9 und 11. Die Hefestämme Fermichamp® und 54.41 schienen allerdings die Fructose ähnlich schnell wie die Glucose abzubauen. Hier überlagerten sich die Fehlerbalken (Standardabweichungen), die für die Verwertung der beiden Hexosen gemessen wurden. Auch der Hybrid-Stamm zeigte ein ähnliches Verhalten.

Um diese Tatsache deutlich darzustellen, wurden in der Tabelle 10 die Fructose:Glucose-Verhältnisse während des gesamten Zuckerabbaus zusammengefasst.

Tabelle 10: Das beobachtete Fructose:Glucose-Verhältnis während des Wachstums im B-Medium an Tagen 0 bis 19. Dargestellt sind die Werte für *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp[®], Fermivin[®], 54.41 und 33 und Hybrid-Stamm HL78. Das Fructose:Glucose-Verhältnis des verwendeten Mediums betrug am Anfang (Tag 0) 1:1.

Tag	Stamm				
	Fermichamp [®]	Fermivin [®]	54.41	33	HL78
0	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1
5	1,1 : 1	1,1 : 1	1,1 : 1	1,1 : 1	1,2 : 1
6	1,1 : 1	1,2 : 1	1,1 : 1	1,1 : 1	1,3 : 1
9	1,1 : 1	2 : 1	1,2 : 1	1,7 : 1	2,0 : 1
11	1,3 : 1	2,6 : 1	1,6 : 1	3,4 : 1	10 : 1
13	1,5 : 1	6 : 1	2,3 : 1	14,3 : 1	-
16	2,5 : 1	45,5 : 1	4,9 : 1	94 : 1	-
19	21,2 : 1	92 : 1	7 : 1	-	-

(-) Glucose war vollständig abgebaut

Bereits am Tag 9 wurde ersichtlich, dass das Fructose:Glucose-Verhältnis in Kulturen der *S. cerevisiae*-Stämme Fermivin[®] und 33 höher war als in denen der *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp[®] und 54.41. Während zu diesem Zeitpunkt im Kulturmedium des Stammes Fermivin[®] die doppelte Menge von Fructose im Vergleich zu Glucose vorlag, waren in den Kulturen der Stämme Fermichamp[®] und 54.41 die Konzentrationen der beiden Hexosen ausgeglichen.

Das Fructose:Glucose-Verhältnis stieg im Verlauf des Wachstums, blieb aber in den Kulturmedien der Stämme Fermichamp[®] und 54.41 niedriger als in den zwei weiteren Reinkulturen. Dies galt auch für Tag 19, an dem nur noch niedrige Zucker-Konzentrationen vorlagen.

Einen besonderen Fall stellte der Hybrid-Stamm HL 78 dar- in seinem Kulturmedium war die Glucose bereits am Tag 13 restlos abgebaut.

Stress-Medium 1

Der Abbau von Fructose und das Wachstums (OD₆₀₀) der ausgewählten Reinkulturen in diesem Stress-Medium wurden im Zeitraum von 19 Tagen betrachtet und ist in der Abbildung 10 zu sehen.

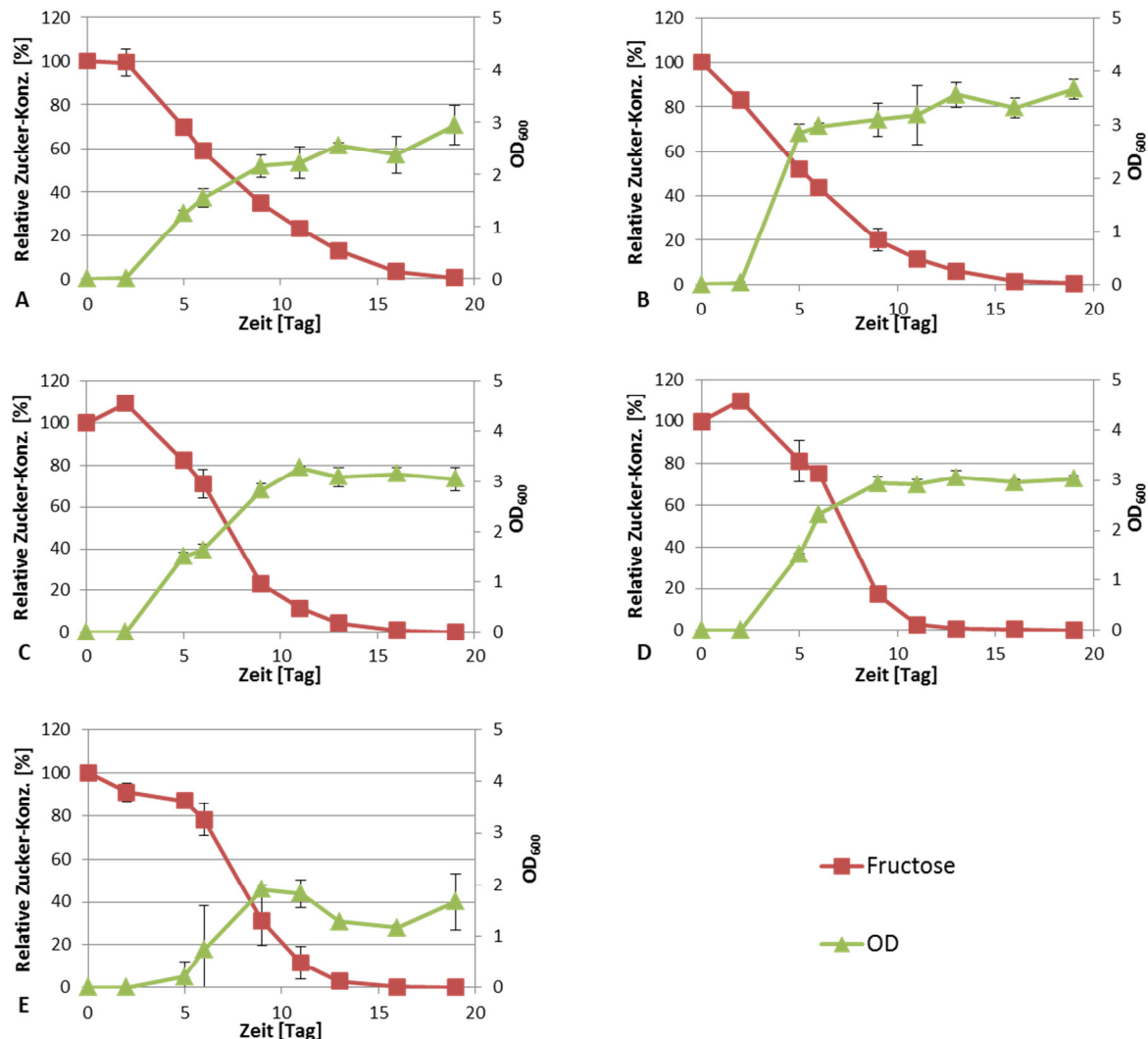


Abbildung 10: Das Wachstum und der Zucker-Abbau im Stress-Medium 1 mit 9:1 Fructose:Glucose-Verhältnis und minimaler Ammonium-Konzentration. Dargestellt sind Kulturen von (A) *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp[®], (B) *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin[®], (C) *S. cerevisiae*-Stamm 54.41, (D) *S. cerevisiae*-Stamm 33 und (E) *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78.

Unter diesen Stress-Bedingungen war festzustellen, dass *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin[®] mit einem OD₆₀₀-Wert bis zu 3,7 das beste Wachstum zeigte. Ein OD₆₀₀-Wert zwischen 3,0 und 3,3 erreichten *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp[®], 54.41 und 33. Verzögert vermehrte sich der Hybrid-Stamm HL78 mit einem maximalen OD₆₀₀-Wert in Höhe von 1,9.

Der relativ gut wachsende *S. cerevisiae*-Stamm 33 baute die Fructose am schnellsten ab. Bereits am Tag 13 war im Medium < 1 % der Anfangs-Konzentration enthalten. Das relativ gute Wachstum der *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp[®], Fermivin[®] und 54.41 spiegelte sich in der Fructose-Verwertung

wider: am Tag 19 war die Fructose fast vollständig abgebaut. Trotz des verzögerten und relativ niedrigen Wachstums wurde die Fructose fast restlos vom Hybrid-Stamm HL78 am Tag 16 verwertet.

Stress-Medium 2

Der Abbau von Fructose während des Wachstums (OD_{600}) der untersuchten Stämme in diesem Kulturmedium wurde über 19 Tage beobachtet. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 11 zu sehen.

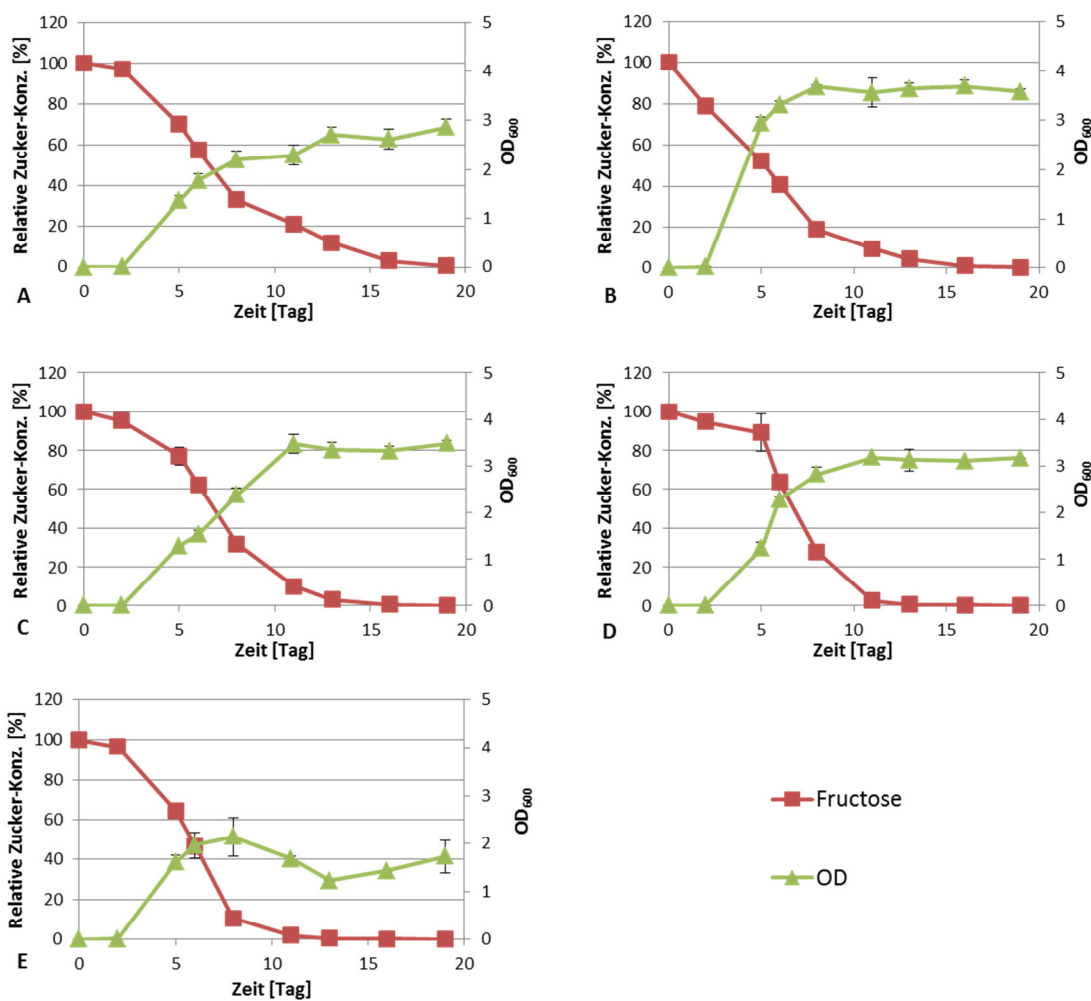


Abbildung 11: Das Wachstum und der Zucker-Abbau im Stress-Medium 2 mit 19:1 Fructose:Glucose-Verhältnis und minimaler Ammonium-Konzentration. Dargestellt sind Kulturen von (A) *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp®, (B) *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin®, (C) *S. cerevisiae*-Stamm 54.41, (D) *S. cerevisiae*-Stamm 33 und (E) *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78.

Das Verhalten der getesteten Hefestämme im Stress-Medium mit einem 19:1 Fructose:Glucose-Verhältnis unterschied sich nur wenig im Vergleich zu dem Medium mit 9:1 Fructose:Glucose-Verhältnis. Die *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp®, Fermivin®, 54.41 und 33 erreichten OD_{600} -Werte zwischen 2,9 und 3,7. Ein relativ niedriges Wachstum zeigte der Stamm HL78 (OD_{600} : 2,1).

Unabhängig von der Wachstumsleistung bauten bereits am Tag 13 der *S. cerevisiae*-Stamm 33 und Hybrid-Stamm HL78 die Fructose fast vollständig ab. Dieser Zustand wurde im Kulturmedium des *S.*

cerevisiae-Stammes 54.41 am Tag 16 erreicht. Trotz ihres hohen Wachstums benötigten die *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp® und Fermivin® 19 Tage um Fructose bis auf < 1 % der Anfangskonzentration abzubauen.

Stress-Medium 3

Hier wurde der Abbau von Fructose durch die Hefestämme im Stress-Medium mit 5,0 Vol% Ethanol über 22 Tage beobachtet. Die Abbildung 12 stellt diese Ergebnisse dar.

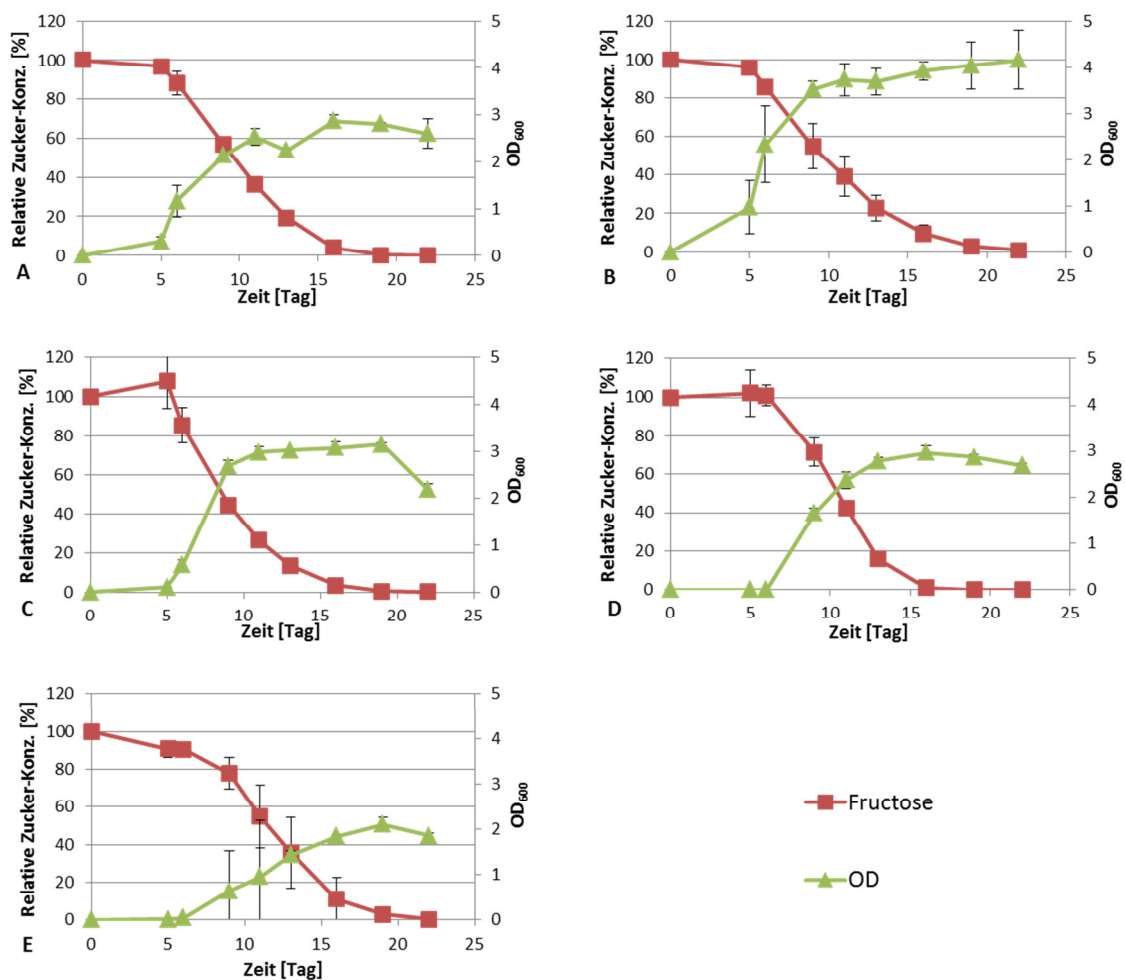


Abbildung 12: Das Wachstum und der Zucker-Abbau im Stress-Medium 3 mit 9:1 Fructose:Glucose-Verhältnis, minimaler Ammonium-Konzentration und 5,0 Vol% Ethanol. Dargestellt sind Kulturen von: (A) *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp®, (B) *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin®, (C) *S. cerevisiae*-Stamm 54.41, (D) *S. cerevisiae*-Stamm 33 und (E) *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78.

Unter diesen Stress-Bedingungen erreichte das höchste Wachstum mit einem OD₆₀₀-Wert von 4,2 der *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin®. Etwas verzögert im Wachstum, aber mit einem OD₆₀₀-Wert von bis zu 3,2 folgten die *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp®, 54.41 und 33. Ein verzögertes und niedrigeres Wachstum zeigte der *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78.

Der *S. cerevisiae*-Stamm 54.41 verwertete die Fructose am schnellsten: am Tag 11 war die Fructose bis auf 26,1 % und am Tag 13 bis auf 13,4 % der anfänglichen Konzentration abgebaut. Während dessen bauten die restlichen Stämme die Fructose am Tag 11 höchstens bis auf 36,1 % (Fermichamp®) und am Tag 13 bis auf 15,9 % (Stamm 33) der Anfangs-Konzentration ab. *S. cerevisiae*-Stämme 54.41, Fermichamp® und 33 verwerteten die Fructose mit solcher Geschwindigkeit, dass am Tag 19 nur noch < 1 % der anfänglichen Fructose-Konzentration im Medium vorlag. Dieses Ergebnis erreichten die Stämme Fermivin® und HL78 am Tag 22.

Bei den *S. cerevisiae*-Stämmen Fermichamp®, 54.41 und 33 war eine Verzögerung im Wachstum und der Zuckerverwertung festzustellen. Trotzdem wurde von diesen Hefestämmen die Fructose bereits am Tag 19 bis auf < 1 % der Anfangs-Konzentration abgebaut.

Trotz des schnellsten Wachstums war die Verwertung der Fructose durch *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin® im Vergleich zu den restlichen Stämmen langsam. Auch *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78, dessen Wachstum am meisten verzögert war, erreichte < 1 % der anfänglichen Fructose-Konzentration am Tag 22.

Stress-Medium 4

Der Abbau von Fructose und das Wachstum (OD₆₀₀) der untersuchten Reinkulturen im Wachstum und Metabolismus hemmenden Stress-Medium 4 mit 9,0 Vol% Ethanol wurden im Zeitraum von 35 Tagen betrachtet und in der Abbildung 13 dargestellt.

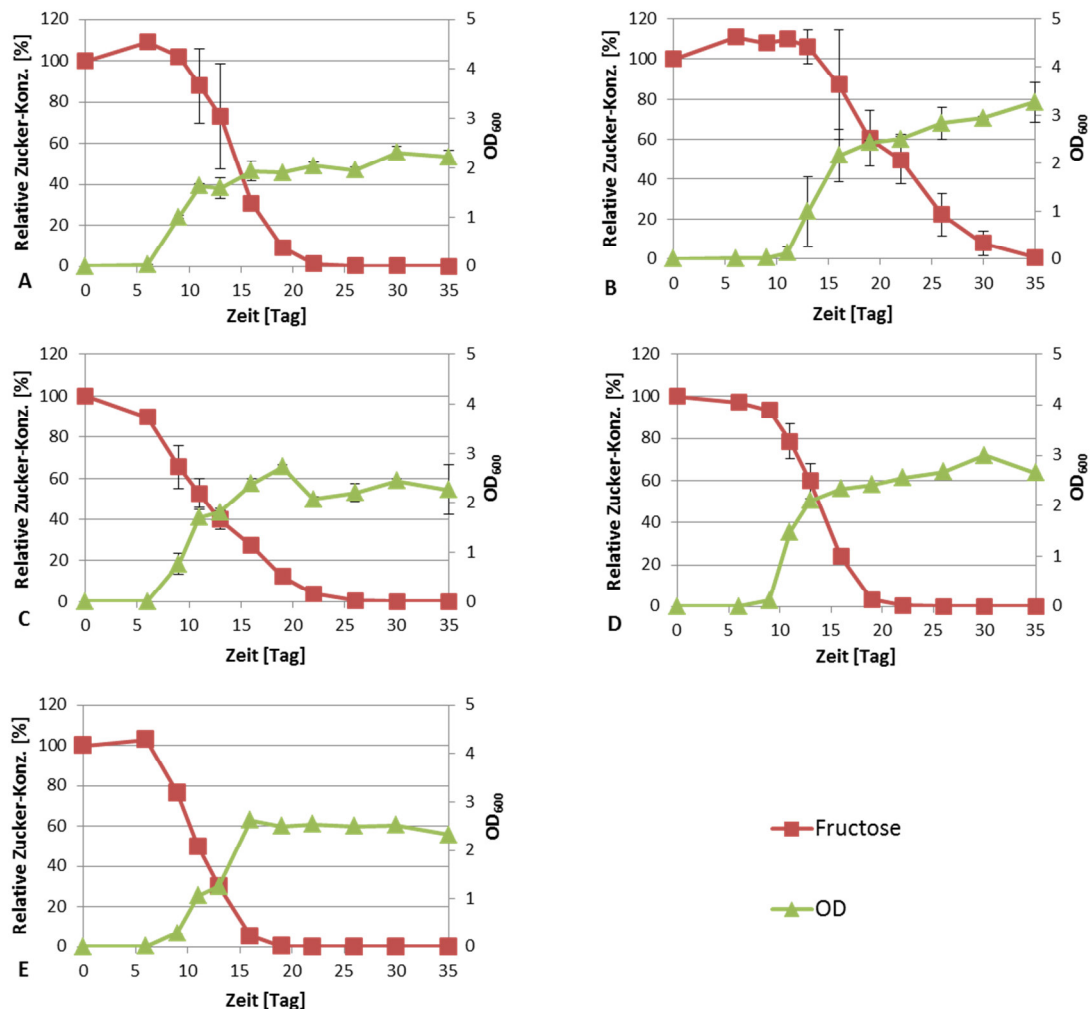


Abbildung 13: Das Wachstum und der Zucker-Abbau im Stress-Medium 4 mit 9:1 Fructose:Glucose-Verhältnis, minimaler Ammonium-Konzentration und 9,0 Vol% Ethanol. Dargestellt sind Kulturen von (A) *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp[®], (B) *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin[®], (C) *S. cerevisiae*-Stamm 54.41, (D) *S. cerevisiae*-Stamm 33 und (E) *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78.

Die Stress-Bedingungen mit erhöhter Ethanol-Konzentration hatten einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum der getesteten Hefestämme. Obwohl der maximale erreichte OD₆₀₀-Wert zwischen ungefähr 2,3 und 3,4 lag, war das Wachstum teilweise verzögert. Das schnellste Wachstum unter diesen Bedingungen zeigten *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp[®] und 54.41. Diese erreichten bereits am Tag 9 einen OD₆₀₀-Wert zwischen 0,8 und 1,0. Auch der *S. cerevisiae*-Stamm 33 erreichte am Tag 11 ähnliche OD₆₀₀-Werte (zwischen 1,5 und 1,7). Etwas verzögert im Wachstum im Vergleich zu bereits erwähnten Hefestämmen war *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin[®].

Während in der Reinkultur von *S. cerevisiae*-Stamm 33 bereits am Tag 22 die Fructose bis auf < 1 % ihrer Anfangs-Konzentration abgebaut wurde, bauten die *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp® und 54.41 diese Hexose bis Tag 26 fast vollständig ab. Dem im Wachstum verzögerten *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin® gelang dies am Tag 35.

Stress-Medium 5 und 6

In den Stress-Medien 5 und 6 mit 12,0 Vol% Ethanol ist jeweils nur ein von allen getesteten Stämme gewachsen. Der Abbau von Fructose im Stress-Medium 5 mit vollständiger Ammonium-Konzentration wurde im Zeitraum von 41 Tagen und im Stress-Medium 6 mit minimaler Ammonium-Konzentration von 60 Tagen betrachtet. Der Verlauf des Zuckerabbaus und das dazugehörige Wachstum sind in der Abbildung 14 zu sehen.

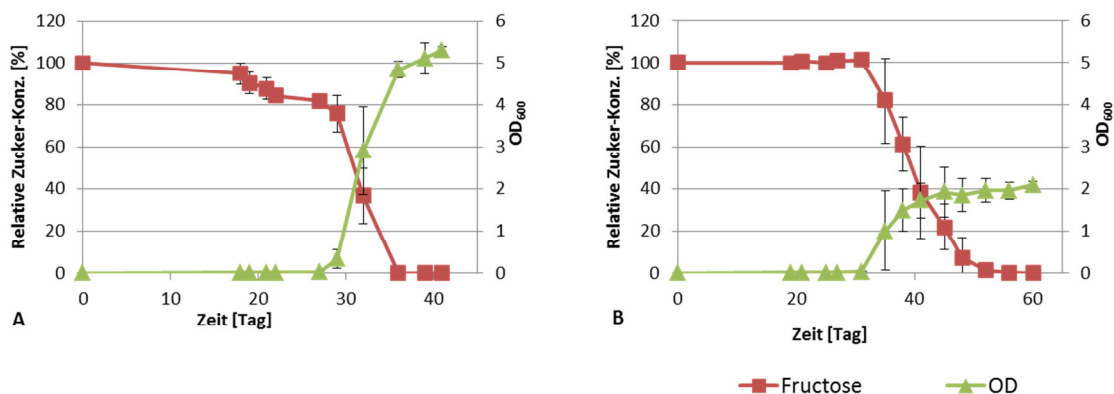


Abbildung 14: Das Wachstum und der Zucker-Abbau im Stress-Medium mit 9:1 Fructose:Glucose-Verhältnis und 12,0 Vol% Ethanol. Dargestellt sind die Kultur von (A) *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78 im Stress-Medium 5 mit vollständiger Ammonium-Konzentration und die Kultur von (B) *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp® im Stress-Medium 6 minimaler Ammonium-Konzentration.

Es war festzustellen, dass im Stress-Medium mit vollständigem Ammonium-Gehalt und 12,0 Vol% Ethanol nur das Wachstum vom Hybrid *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78 erfolgte. Im gleichen Stress-Medium, aber mit minimaler Ammonium-Konzentration wuchs wiederum nur *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp®.

In beiden Medien erfolgte das Wachstum erst nach 30 Tagen. Der erreichte OD₆₀₀-Wert von 5,3 vom Stamm HL78 war deutlich höher als der OD₆₀₀-Wert von 2,1 vom Stamm Fermichamp® im Medium mit minimalem Ammonium-Gehalt. Im Medium mit vollständigem Ammonium-Gehalt wurde die Fructose komplett abgebaut innerhalb kürzerer Zeit als im Medium mit minimaler Ammonium-Konzentration.

3.5 Aufnahme des ^{14}C -markierten Zuckers durch die Hefen

In dieser Versuchsreihe wurde die Aufnahme der Hexosen bei ausgewählten Hefestämmen geprüft. Der besondere Fokus galt der Frage, ob sich Stämme mit unterschiedlichem Hexose-Transporter Hxt3p und damit verbundenem unterschiedlichen Gärverhalten in dieser Hinsicht unterscheiden. Somit wurden Vertreter der Typen Femivin[®], Fermichamp[®] und Hybrid-Stämme untersucht.

Die Aufnahme von Glucose und Fructose in die Hefezellen wurde nach 5 s gemessen. Dabei wurde innerhalb einer Messung nur einer der beiden Zucker angeboten. Die Konzentrationen reichten von 0,1 bis 10,0 mM. In den Diagrammen sind Mittelwerte aus vier durchgeführten Messungen (Anhang, Tabelle 29 bis Tabelle 31) zu sehen. Als Fehlerbalken wurde die jeweilige Standardabweichung eingetragen.

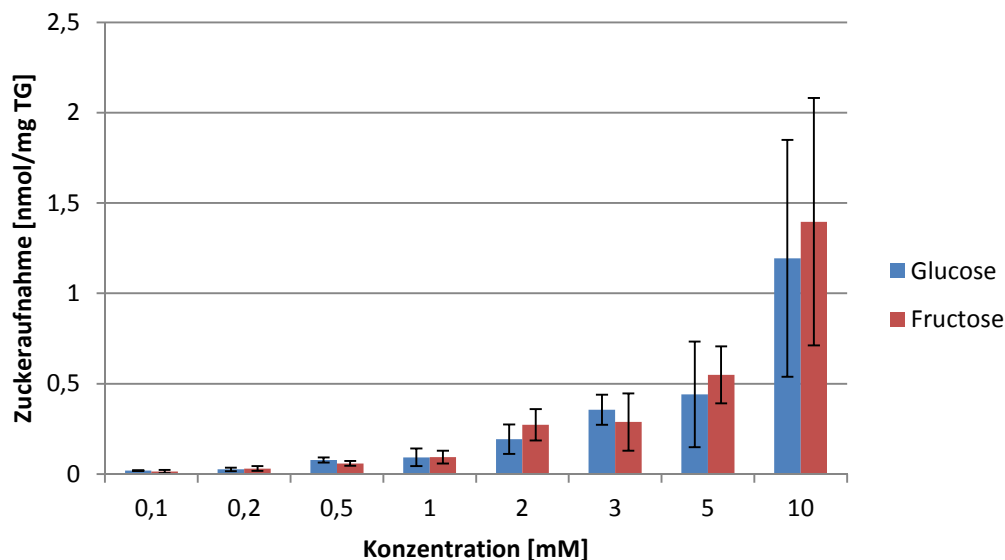


Abbildung 15: Aufnahme von Glucose und Fructose durch Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes Fermichamp[®]. Die Zucker lagen in 0,1 – 10,0 mM Konzentrationen vor. Als Trockengewicht wurde hier das Gewicht gefriergetrockneter Zellen bezeichnet.

Es war festzustellen, dass *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp[®] mit steigender Zucker-Konzentration erwartungsgemäß eine steigende Aufnahme der angebotenen Hexosen aufwies (Abbildung 15). Zusätzlich festzuhalten ist, dass unabhängig von der Zucker-Konzentration eine ausgeglichene Aufnahme von Glucose und Fructose erfolgte.

Weitere Messungen wurden in Suspension mit 5,0 mM Glucose- oder Fructose-Konzentration durchgeführt (Abbildung 16). Es wurde der Einfluss von zwei Ethanol-Konzentrationen auf das Zuckeraufnahme-Verhalten untersucht. Die 4,0 Vol% Ethanol-Konzentration wurde entweder direkt in die Zuckersuspension während der Messung gegeben oder in die untersuchte Hefezellkultur 24 h vor der Messung. Eine 10,0 Vol% Ethanol-Konzentration wurde der Hefekultur 24 h vor der Messung zugesetzt.

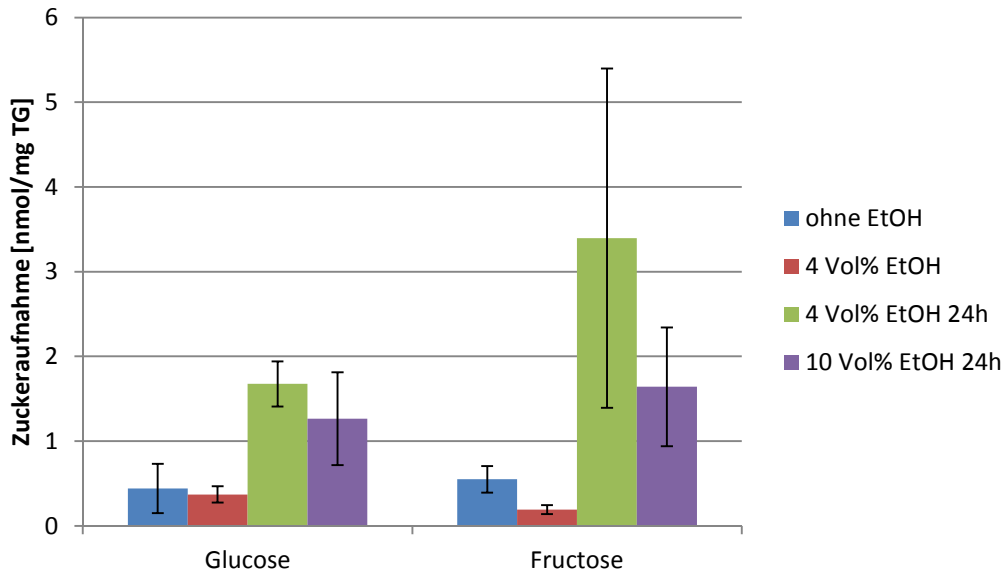


Abbildung 16: Aufnahme von 5,0 mM Glucose oder Fructose durch Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes Fermichamp® in Anwesenheit von Ethanol. Als Trockengewicht wurde hier das Gewicht gefriergetrockneter Zellen bezeichnet.

Bei direkter Zugabe von 4,0 Vol% Ethanol in den Messansatz, blieb die Aufnahme von Glucose unbeeinflusst und die Fructose-Aufnahme war etwas eingeschränkt (Abbildung 16). Die Aufnahme von Glucose und Fructose stieg dagegen signifikant an, nachdem 4,0 Vol% Ethanol der Zellkultur 24 h vor der Messung zugesetzt worden sind. Dabei war der Fructose-Transport etwa doppelt so hoch wie der Glucose-Transport. Auch 10,0 Vol% Ethanol hatten einen positiven Einfluss auf die Zuckeraufnahme. Allerdings waren diese Werte niedriger im Vergleich zur denen nach 24 stündiger Inkubation mit 4,0 Vol% Ethanol. Auch in diesem Fall war die Fructose-Aufnahme höher als Glucose-Aufnahme.

Die gleichen Experimente wurden mit *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin® durchgeführt.

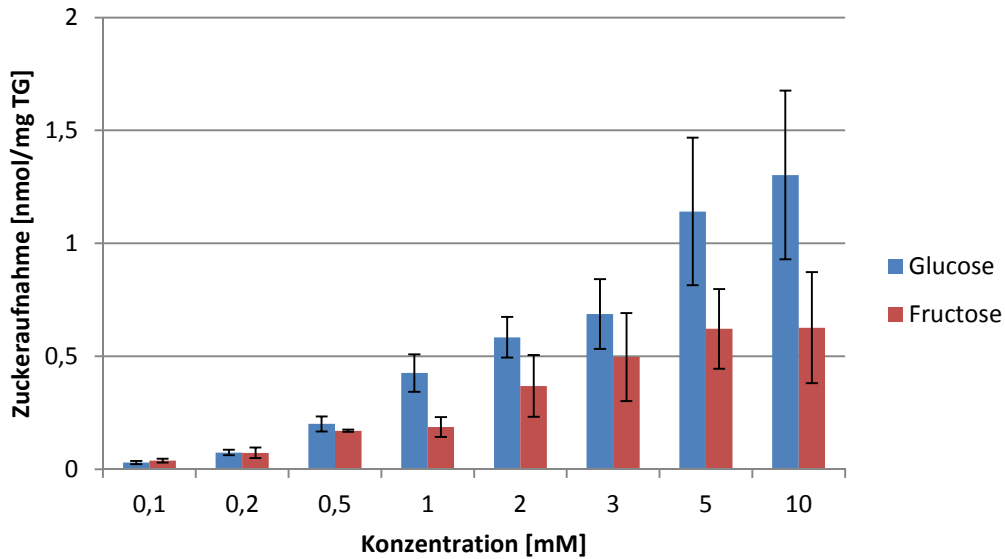


Abbildung 17: Aufnahme von Glucose und Fructose durch Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes Fermivin®. Die Zucker lagen in 0,1 – 10,0 mM Konzentrationen vor. Als Trockengewicht wurde hier das Gewicht gefriergetrockneter Zellen bezeichnet.

Auch für diesen Stamm gilt, dass mit steigender Konzentration von angebotenenem Zucker seine Aufnahme in die Hefezellen stieg (Abbildung 17). Auffällig war die höhere Aufnahme von Glucose im Vergleich zu Fructose und zwar unabhängig von der Zucker-Konzentration.

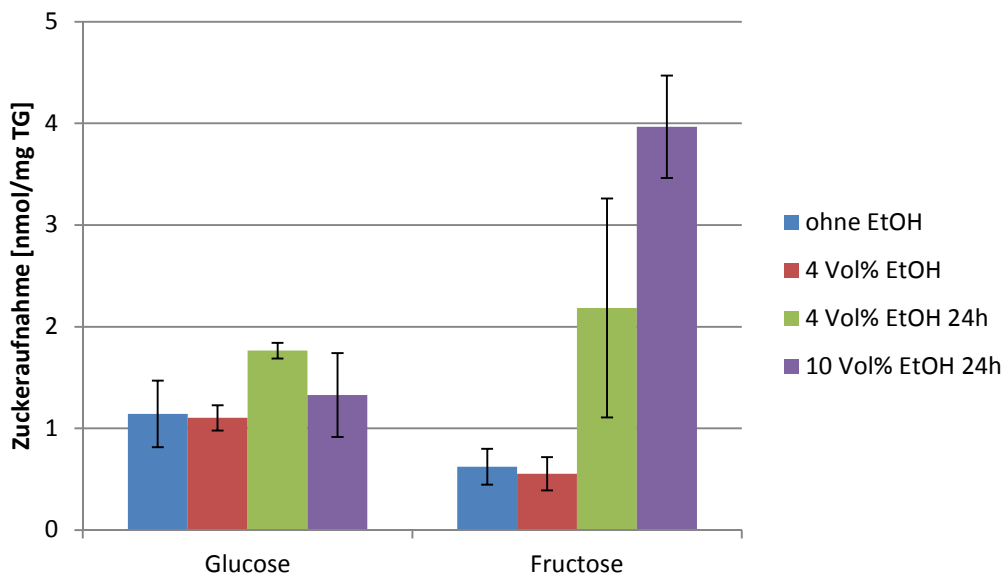


Abbildung 18: Aufnahme von 5,0 mM Glucose oder Fructose durch Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes Fermivin® in Anwesenheit von Ethanol. Als Trockengewicht wurde hier das Gewicht gefriergetrockneter Zellen bezeichnet.

Nach 5 s wurde die Zuckeraufnahme von direkt zugegebenem Ethanol (4,0 Vol%) kaum beeinflusst und die Aufnahme von Glucose war höher als die von Fructose (Abbildung 18). Die Situation änderte sich, wenn die gleiche Ethanol-Konzentration der Hefekultur schon 24 h vor der Messung zugesetzt wurde. Insgesamt stieg der Zucker-Transport und die Aufnahme von Glucose und Fructose war etwa gleich. Auf gleiche Weise zugesetztes 10,0 Vol% Ethanol beeinflusste vor allem den Fructose-Transport positiv, der doppelt so hoch ausfiel wie bei Anwesenheit von 4,0 Vol% Ethanol.

Drei weitere Stämme mit unterschiedlichem *HXT3*-Allel wurden auf ihr Glucose- und Fructose-Aufnahmeverhalten untersucht: *S. cerevisiae*-Stamm 54.41, *S. cerevisiae*-Stamm 33 und *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78. Die Bestimmungen erfolgten bei 5,0 mM Konzentrationen von Glucose oder Fructose. Zusätzlich wurde den Hefekulturen 24 h vor der Messung 4,0 Vol% Ethanol zugesetzt.

In Abbildung 19 ist die Aufnahme von Glucose und Fructose von allen untersuchten Hefestämmen vergleichend dargestellt.

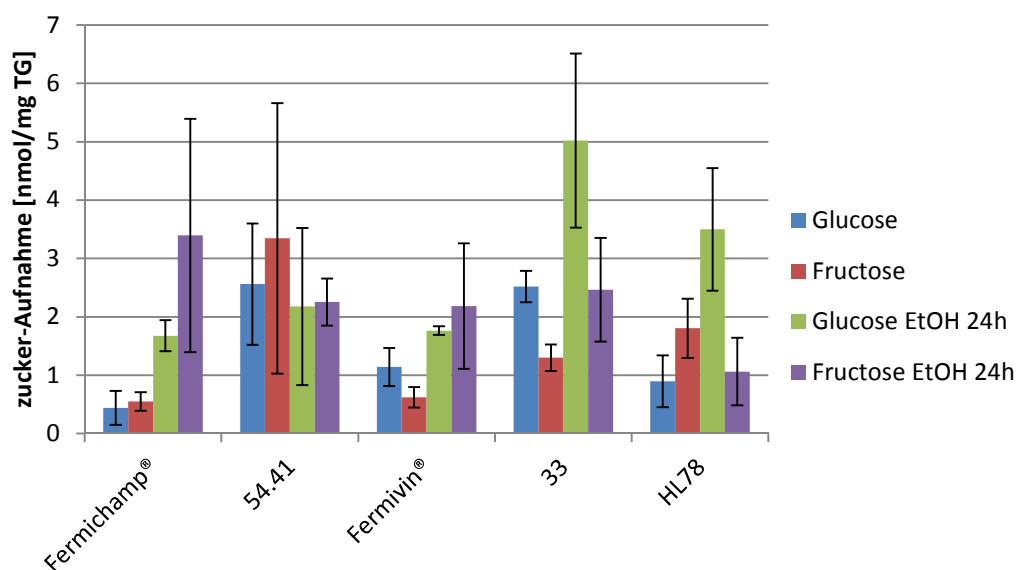


Abbildung 19: Aufnahme von Glucose oder Fructose durch Zellen der *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp®, 54.41, Fermivin®, 33 und von *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78. Die Messung erfolgte nach 5 s. Als Trockengewicht wurde hier das Gewicht gefriergetrockneter Zellen bezeichnet.

Aus der Abbildung 19 wird sichtbar, dass die Aufnahme von Hexosen, besonders von Fructose, durch *S. cerevisiae*-Stamm 54.41 im Vergleich zu anderen Teststämmen relativ hoch war. Eine ausgeglichene Aufnahme beider Zuckern war beim Stamm Fermichamp® festzustellen. *S. cerevisiae*-Stamm 33, sowie *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin®, zeigten eine höhere Glucose- als Fructose-Aufnahme. Die 24-stündige Inkubation mit 4,0 Vol% Ethanol hatte entweder keinen (Stamm 54.41) oder einen positiven Einfluss (Stämme Fermichamp®, Fermivin®, 33 und HL78) auf die Aufnahme von Glucose im Vergleich zu Zellen ohne dieser Vorbehandlung. Der Stamm 33 erreichte nach 5 s die maximale Glucose-Aufnahme in Höhe von 5,02 nmol/mg gefriergetrockneter Zellen. Das Ethanol

beeinflusste die Fructose-Aufnahme der *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp[®], Fermivin[®] und 33 positiv. Hier wurde der maximale Wert von Fermichamp[®] mit 3,39 nmol/mg gefriergetrockneter Zellen erreicht. Beeinträchtigungen in der Fructose-Aufnahme waren bei den Stämmen 54.41 und HL78 erkennbar.

Die Ergebnisse der Zuckeraufnahme-Messungen haben gezeigt, dass der unterschiedliche Hexosen-Abbau des jeweiligen Stammes offensichtlich mit Allel-Varianten des Hxt3p verbunden ist und auch mit der Aufnahme von Glucose und Fructose korreliert. Weiterhin wurde untersucht, ob auch alle Varianten der Hexokinasen einen Einfluss auf das Gärverhalten der getesteten Hefestämme haben.

3.6 Hxk1p- und Hxk2p-Aminosäuresequenzen der untersuchten Hefestämme

Die Hxk1p und Hxk2p sind in der Gattung *Saccharomyces* für die Phosphorylierung sowohl der Glucose als auch der Fructose verantwortlich, während die Glucokinase spezifisch für die Glucose ist (Barnett, 1997). Diese Reaktionen sorgen dafür, dass die beiden Zucker nach dem Transport in die Zelle nicht gleich wieder aus der Hefezelle diffundieren. Glucose und Fructose werden in dieser aktivierten Form in die Glykolyse eingespeist.

Während die cytoplasmatische Hxk2p ein Schlüsselenzym der Glykolyse darstellt, ist die nukleare Hxk2p in der Expressionskontrolle mehrerer Gene des Glucose-Metabolismus involviert (Moreno & Herrero, 2002).

Somit spielen die Hexokinasen eine bedeutende Rolle während der Gärung und wurden deshalb auf Variabilität innerhalb der Aminosäuresequenz geprüft.

3.6.1 Hexokinase 1

Die für die Amplifizierung und Sequenzierung des *HXK1*-Gens verwendeten Primer-Paare sind in der Tabelle 11 aufgelistet. Als Grundlage diente die bekannte Sequenz des *HXK1*-Gens vom Laborstamm S288c.

Tabelle 11: Zur Amplifizierung und Sequenzierung des *HXK1*-Gens entwickelte Primer-Paare.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge [bp]	GC-Gehalt [%]	T _m [°C]
HXK1FOR	GCAATCGGTTTCACTTCTTGGA	24	50	57.4
HXK1REV	TCGTCTGCTAATTGCCCTCAAC	24	50	57.4
HXK1FOR2	TGCCTATTGAAATTGTAGCATTGA	24	33	50.6
HXK1REV2	CCCGGAGAACAAAGTAAGTGGA	22	50	54.8

Wie aus Abbildung 20 ersichtlich, wurde die gesamte 1458 Basenpaare lange *HXK1*-Sequenz aus zwei Teilsequenzen zusammengesetzt, die mit Hilfe der beiden Primer-Paare HXK1FOR/HXK1REV und HXK1FOR2/HXK1REV2 erhalten wurden.

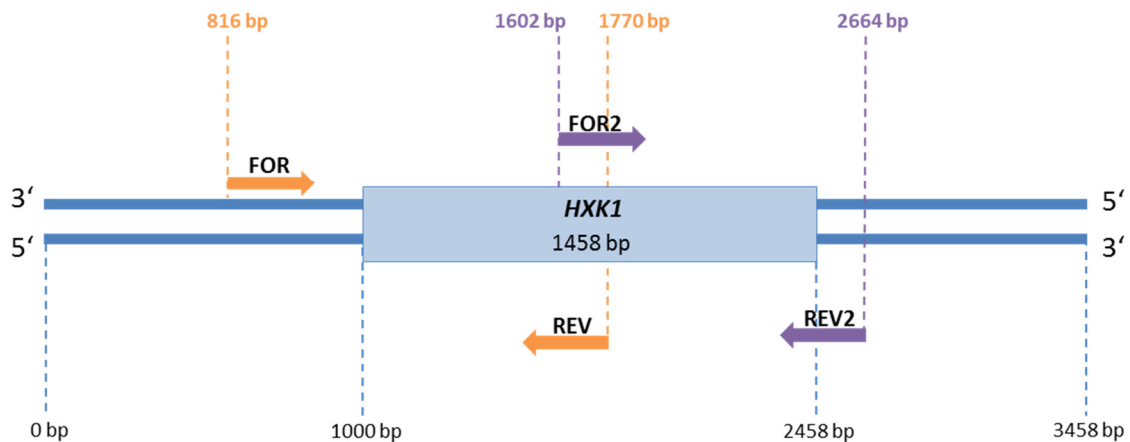


Abbildung 20: Übersicht über die Bindestellen der Primer-Paare, die zur Amplifizierung und Sequenzierung des *HXK1*-Gens entwickelt wurden. Neben der schematisch dargestellten 1704 bp langen *HXK1*-Nukleotidsequenz wurden flankierende Regionen in Länge von jeweils 1000 bp abgebildet.

Es konnte die *HXK1*-Sequenz von 20 Stämmen verschiedener Arten der Gattung *Saccharomyces*, ermittelt und auf ihre Variabilität geprüft werden (8.1). Darunter waren sowohl kommerzielle Hefestämme als auch in der Stammsammlung des IMW hinterlegte Organismen. Diese und zusätzliche aus der NCBI- und YRC-Datenbank entnommene Sequenzen (insgesamt 61) sind in der Tabelle 12 zusammengefasst. Eine Zusammenstellung über die Stamm-Herkunft befindet sich im Anhang (Tabelle 21).

Tabelle 12: Variable Regionen innerhalb der Hexokinase Hxk1p in untersuchten *Saccharomyces*-Arten und ihren Hybriden. Grün hinterlegt sind konservative, rot hinterlegt sind signifikante Aminosäure-Substitutionen im Vergleich zur Aminosäuresequenz von Hxk1p des Laborstammes S288c. Blau markiert sind selbst sequenzierte Sequenzen.

Spezies/Stamm	insgesamt: 485 AS										Aminosäure-Position											
	11	25	36	39	100	118	193	198	200	215	217	252	261	287	288	327	334	359	408	412	431	447
<i>S. cerevisiae</i> S288c, BC187	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	I	G	N	V	A	M	S	E	G	G	A	K
JAY291, 29 (ATCC 48427), 378604X, DBVPG1106	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	A	K
AMR1796 ⁺ , 73, 5441, DSM 70449 ⁺ (CBS 1171)	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	A	N
AS2,381	A	D	V	X	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	X	E	G	G	A	N
Lalvin QA23 ⁺	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	X	N
3211-1	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	D	G	G	A	N
16.1, 642 (Lalvin DV10 ⁺), 712	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	X	N
QFPT32, 101 (ATCC 48430)	G	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	A	K
Fermivine ⁺ , 33 (ATCC 48428), 72 (CBS 429), 657 (SIHA 4 ⁺), AS2,521, Y52, YIM975, YIM981, DBVPG6765, L-1374, NCYC361, DBVPG1373, YIM978, Y55	G	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	A	N
Fermichamp ⁺ (INRA 671), 596	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	N	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	A	N
Lalvin EC1118 ⁺	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	G	N
SH17-1, Y59, YPS606, YPS128, Y12, UWOP505-217.3, UWOP505-227.2	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	T	E	G	G	A	N
SK1	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	I	T	E	G	G	A	N
RM11-1a	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	V	N
FostersB ⁺	A	D	V	E	S	M	Q	K	K	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	A	N
SHM4	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	D	N	V	A	M	T	E	G	G	A	N
BVC1	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	T	E	G	G	A	N
P8-1	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	T	E	G	A	A	N
YIM789, 273614N	A	D	V	D	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	T	E	G	G	A	N
AS2	A	D	A	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	D	M	T	E	G	G	A	N
JF1, UWOP587-2421, UWOP583-787.3	A	N	V	E	S	I	Q	R	E	T	V	G	D	I	A	M	T	E	G	G	A	N
HNG26	A	N	V	E	S	I	Q	R	E	T	V	G	D	I	A	M	T	E	S	G	A	N
<i>S. kudriavzevii</i> NCYC 3518	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	V	N
<i>S. pastorianus</i> NCYC 529	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	A	N
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i> 3211-2	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	D	G	G	A	N
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i> CBS 8614	A	D	V	E	S	M	R	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	E	G	G	V	N
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> VIN7 ⁺	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	D	G	G	V	N
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> x <i>S. bayanus</i> HL78	A	D	V	E	S	M	Q	K	E	T	V	G	N	V	A	M	S	D	G	G	A	N

Innerhalb der Hxk1p-Aminosäuresequenz fast aller untersuchten Wein- und Bier-relevanten Hefestämme konnten im Vergleich zum *S. cerevisiae*-Standardstamm S288c nur zwei konservierte ausgetauschte Aminosäuren festgestellt werden: I217V und K447N. Diese Hxk1p-Variationen scheinen ohne Bezug auf die Nützlichkeit dieser Stämme für Wein-, Sekt- oder Bier-Produktion zu sein. Eine höhere Variabilität in Allel-Varianten des *HXK1* weisen die Umwelt-Isolate aus China auf (Wang *et al.*, 2012).

Bei der Darstellung des Proteins Hxk1p wurde das Programm DS Visualizer Client (<http://accelrys.com/products/discovery-studio/visualization-download.php>) verwendet. Mit seiner Hilfe war es möglich, die signifikanten Aminosäure-Substitutionen zu markieren (Abbildung 21).

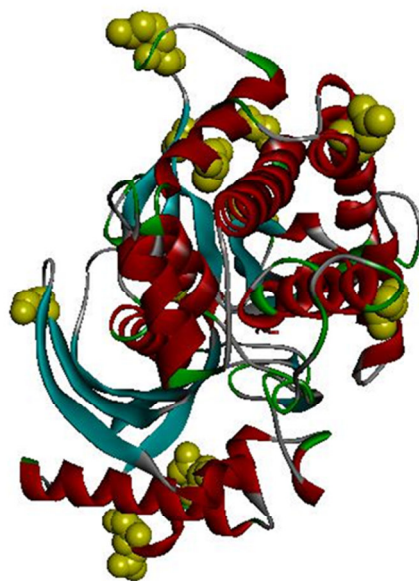


Abbildung 21: Ein Struktur-Modell des Proteins Hxk1p (PDB Code: 3B8A) mit möglichen signifikanten Aminosäure-Substitutionen (gelb markiert) im Vergleich zu Hxk1p des Standardstammes S288c (Tabelle 12). In der Darstellung sind nicht alle Aminosäure-Austausche sichtbar. Zusätzlich wurde eine der Substitutionen (A11G) nicht aufgetragen, da das Ende des N-Terminus nicht im Struktur-Modell vorhanden ist. Rot markiert sind die α -Helices, blau markiert sind die β -Faltblätter und grün die Loops.

Die Abbildung 21 zeigt, dass die signifikanten Aminosäure-Substitutionen innerhalb von Loops und auf der Oberfläche des Proteins liegen. Die Hxk1p kann sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegen (Kuser *et al.*, 2008). Damit haben diese Austausch wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Struktur, solange das Protein als Monomer vorliegt. Liegt die Hexokinase 1 als Dimer in der Lösung vor, könnten diese Substitutionen die Struktur und damit auch die Funktion beeinflussen.

3.6.2 Hexokinase 2

In der Tabelle 13 sind die Eigenschaften der Primer-Paare, die zur Amplifizierung und Sequenzierung des *HXK2*-Gens dienen, zusammen gefasst. Als Grundlage diente die bekannte *HXK2*-Nukleotidsequenz vom *S. cerevisiae* Laborstamm S288c.

Tabelle 13: Zur Amplifizierung und Sequenzierung des *HXK2*-Gens entwickelte Primer-Paare.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge [bp]	GC-Gehalt [%]	T _m [°C]
HXK2FOR	CACCTTCGCCACTGTCTTATCTACA	25	48	57.7
HXK2REV	GGGCACCTTCTTGTGTCAAACCT	25	44	56.0
HXK2FOR2*	AGTTGGGCGGTGACCGTACCT	21	62	58.3
HXK2REV2*	AGAGAGGGTTAAAATTGGCGTGCAA	25	44	56.0

*im Fall von unspezifischen PCR-Produkten, wurden die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert

Aus der Abbildung 22 wird ersichtlich, wie die *HXK2*-Sequenz mit Hilfe der Primer-Paare HXK2FOR/HXK2REV und HXK2FOR2/HXK2REV2 amplifiziert und ermittelt wurde.

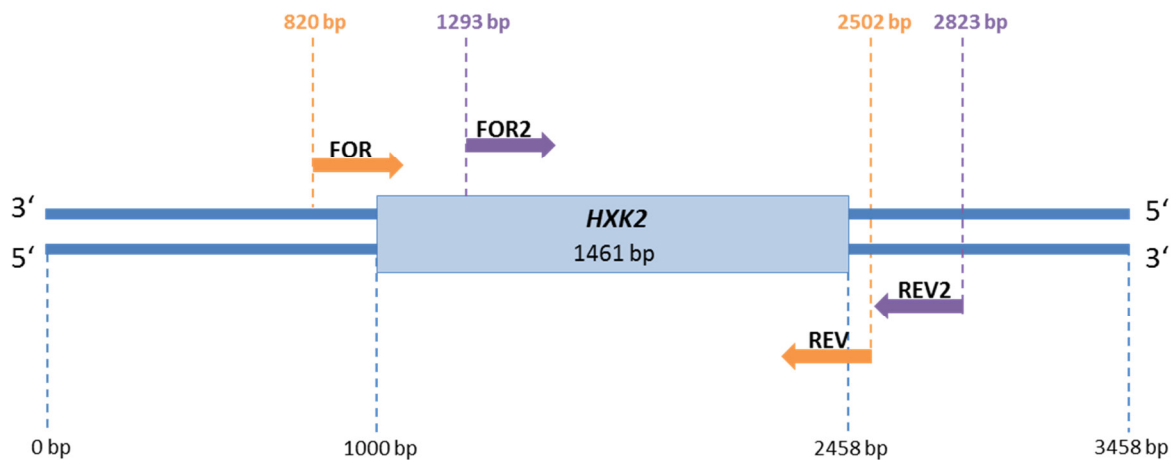


Abbildung 22: Übersicht über die Bindestellen der Primer-Paare, die zur Amplifizierung und Sequenzierung des *HXK2*-Gens entwickelt wurden. Neben der schematisch dargestellten 1704 bp langen *HXK2*-Nukleotidsequenz wurden flankierende Regionen in Länge von jeweils 1000 bp abgebildet.

Auf diesem Weg konnte die DNA- Sequenz der Hexokinase 2 von 13 Stämmen ermittelt werden (8.1). 28 weitere aus den NCBI- und YRC-Datenbanken wurden zum Vergleich herangezogen (Tabelle 21, im Anhang). Die Aminosäuresequenzen sind in der Tabelle 14 zusammen gefasst.

Tabelle 14: Variable Regionen innerhalb der Hexokinase Hxk2p in untersuchten *Saccharomyces*-Arten und ihren Hybriden. Grün hinterlegt sind konservative, rot hinterlegt sind signifikante Aminosäure-Substitutionen im Vergleich zur Aminosäuresequenz von Hxk2p des Laborstammes S288c. Blau markiert sind selbst sequenzierte Sequenzen. * unvollständige Sequenz

Spezies/Stamm	Aminosäure-Position																			
	38	40	50	113	137	140	150	170	180	200	246	260	287	349	367	370	385	390	436	472
<i>S. cerevisiae</i>	insgesamt: 486 AS																			
S288c, 72 (CBS 429), 73, 657 (SIHA4 [®])	T	T	S	R	A	D	P	I	I	N	D	P	I	R	N	G	S	A	K	Q
156	T	T	S	R	A	D	P	I	I	N	D	P	I	R	S	G	S	A	K	Q
Latvin EC1118 [®] , 54,41, 596, 642 (Latvin DV10 [®]), Fermichamp [®] (INRA 67J)	T	T	S	R	A	D	P	I	V	N	D	P	I	R	N	G	S	A	K	Q
VL3 [®]	T	T	S	R	A	D	P	I	I	N	D	P	I	R	N	C	S	A	K	Q
3211-1, 16.1, 712	T	T	S	R	A	D	P	I	X	N	D	P	I	R	N	G	S	A	K	Q
<i>S. pastorianus</i> DSM 6580	T	T	S	R	A	D	P	I	I	N	D	P	I	R	N	G	S	A	K	Q
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i> VIN13 [®]	T	T	S	R	A	D	P	I	X	N	D	P	I	R	N	G	S	A	K	Q
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i> x <i>S. kudriavzevii</i> HL78	T	T	S	R	A	D	P	I	V	N	D	P	I	R	N	G	S	A	K	Q
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> VIN7 [®]	S	S	T	K	T	N	T	V	I	D	E	S	V	K	N	G	C	T	R	G
<i>S. kudriavzevii</i> IFO 1802*	S	S	T	K	T	N	P	V	I	D	E	S	V	K	N	G	C	T	-	-

Die Variabilität innerhalb der untersuchten Aminosäuresequenzen ist niedrig, allerdings gibt es eine von der Herkunft unabhängige konservierte Aminosäure-Substitution, die im Vergleich zum Laborstamm S288c häufiger vorkommt: I180V. Auffällige Ausnahme ist allele Variante von Hxk2p des Hybrid-Stammes VIN7[®], die offenbar Sequenzabschnitte des *S. kudriavzevii* Stammes IFO 1802 enthält.

Mit Hilfe vom Programm DS Visualizer Client (<http://accelrys.com/products/discovery-studio/visualization-download.php>) konnten in der Hxk2p-Sequenz ausgetauschte Aminosäuren im Struktur-Modell lokalisiert werden (Abbildung 23).

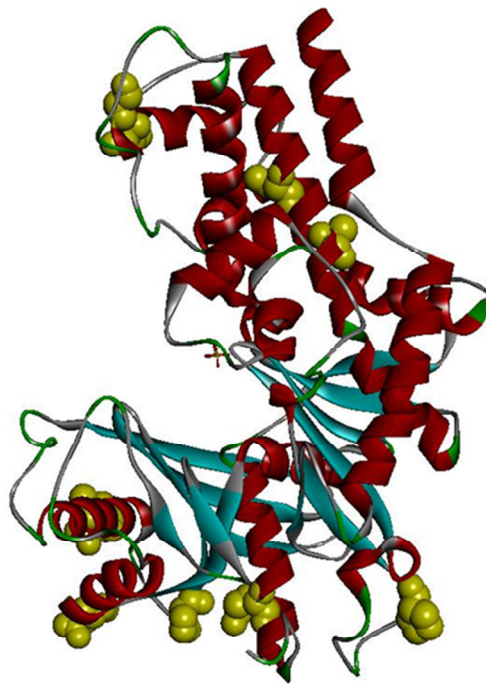


Abbildung 23: Ein Struktur-Modell des Proteins Hxk2p (PDB-Kode: 1IG8) mit allen detektierten signifikanten Aminosäure-Substitutionen (gelb markiert) im Vergleich zu Hxk2p des Standardstammes S288c (Tabelle 14). Rot markiert sind die α -Helices, blau markiert sind die β -Faltblätter und grün die Loops.

Aus der Abbildung 23 wird ersichtlich, dass die signifikanten Aminosäure-Substitutionen innerhalb von Loops und auf der Oberfläche des Proteins liegen. Wie im Fall von der Hxk1p, kann auch die Hxk2p als Monomer und Dimer vorkommen (Kuser *et al.*, 2008). In Form eines Monomers haben diese Austausche wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Struktur. Liegt die Hexokinase 2 aber als Dimer in der Lösung vor, können diese Aminosäure-Austausche einen Einfluss auf die Struktur und auf die Funktion haben.

3.7 Hexokinase-Aktivität der Testorganismen

Für die Bestimmung der Hexokinase-Aktivität ausgewählter Hefestämme wurden diese bei 20 °C im B-Medium mit jeweils 50 g/l Glucose und Fructose kultiviert. Der Zellaufschluss erfolgte nachdem die Kulturen eine OD_{600} in Höhe von mindestens 1,0 erreicht hatten.

Die Hexokinase-Aktivität der Zellextrakte wurde mit jeweils Glucose und Fructose als Substrat gemessen. Die Konzentration dieser Hexosen reichte von 0,1 bis zu 10,0 mM. Aus den ermittelten Werten (siehe Anhang, Tabelle 32 bis Tabelle 46) wurden V_{\max} - und K_m -Werte bestimmt. Diese sind für alle untersuchten Stämme in der Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: K_m - und V_{\max} -Werte der untersuchten Hefestämme in Bezug auf Hexokinase-Aktivität.

Art/Stamm	K_m [mM]		$K_{m\text{ Glc}} : K_{m\text{ Fru}}$	V_{\max} [U/mg Gesamt-Protein]		$V_{\max\text{ Glc}} : V_{\max\text{ Fru}}$
	Glucose	Fructose		Glucose	Fructose	
<i>S. cerevisiae</i> 16.1	0,73	4,05	0,18	0,86	0,93	0,92
<i>S. cerevisiae</i> 712	0,91	3,95	0,23	0,66	0,66	1,00
<i>S. cerevisiae</i> 156	0,72	3,89	0,19	1,01	1,09	0,92
<i>S. cerevisiae</i> Fermichamp®	0,55	6,52	0,08	0,59	0,78	0,76
<i>S. cerevisiae</i> Fermivin®	0,51	4,58	0,11	0,69	0,55	1,25
<i>S. cerevisiae</i> 54.41	0,98	6,70	0,15	0,99	0,97	1,02
<i>S. cerevisiae</i> 72	1,01	5,17	0,20	0,48	0,58	0,83
<i>S. cerevisiae</i> 73	1,23	7,20	0,17	1,30	1,51	0,86
<i>S. cerevisiae</i> 596	0,45	5,39	0,08	0,55	0,58	0,95
<i>S. cerevisiae</i> 642	0,90	4,61	0,20	1,26	1,50	0,84
<i>S. cerevisiae</i> 657	1,02	5,13	0,20	2,16	2,36	0,92
<i>S. cerevisiae</i> 3211-1	0,69	3,38	0,20	1,37	1,77	0,77
<i>S. bayanus</i> HL77	1,01	5,50	0,18	0,93	0,88	1,06
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i> 3211-2	0,70	5,37	0,13	0,95	1,55	0,61
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> x <i>S. bayanus</i> HL78	0,83	3,69	0,22	1,24	1,38	0,90

Die Hexokinase-Aktivität wurde in Zellextrakten gemessen, die alle Zellproteine enthalten. Bei den Messungen wurde somit zwischen den Aktivitäten von Hexokinase 1 und 2 oder der Glucokinase nicht unterschieden.

Die Zucker-Phosphorylierungsrate (V_{\max}) der Hexokinasen war jeweils in den *S. cerevisiae*-Stämmen 16.1, 712, 156, Fermichamp®, Fermivin®, 54.41, 72, 596 sowie in *S. bayanus*-Stamm HL77 unabhängig vom verwendeten Substrat (Glucose oder Fructose) ähnlich hoch (Tabelle 15).

Etwas höhere V_{\max} -Werte unabhängig vom Substrat im Vergleich erreichten *S. cerevisiae*-Stämme 73, 642, 657 und 3211-1. Das gleiche gilt für die Hybrid-Stämme 3211-2 und HL78.

Trotzdem lagen die $V_{\max \text{ Glc}}:V_{\max \text{ Fru}}$ -Verhältnisse aller getesteten Stämme zwischen 0,61 (*S. cerevisiae* x *S. bayanus*-Stamm 3211-2) und 1,25 (*S. cerevisiae*-Stamm Fermivin®). Dies ließ auf eine relativ ausgeglichene Phosphorylierungsrate beider Hexosen allen untersuchten Stämmen schließen.

Betrachtet man die in der Tabelle 15 zusammengefassten K_m -Werte aller getesteten Hefestämme, ist es auffällig, dass die K_m -Werte mit Fructose als Substrat mehrfach höher waren als diejenigen mit Glucose als Substrat.

Die höchsten K_m -Werte zeigte *S. cerevisiae*-Stamm 73. Während der K_m -Wert mit Glucose als Substrat 1,23 mM betrug, ergab sich mit Fructose als Substrat ein Wert von 7,20 mM. Der niedrigste K_m -Wert mit Glucose als Substrat wurde beim Stamm 596 (0,45 mM) und mit Fructose als Substrat beim Stamm 3211-1 (3,38 mM) ermittelt.

Da alle Stämme einen mehrfach höheren K_m -Wert mit Fructose als mit Glucose als Substrat aufwiesen, lag das $K_{m \text{ Glc}}:K_{m \text{ Fru}}$ -Verhältnis zwischen 0,08 (*S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp® und 596) und 0,23 (*S. cerevisiae*-Stamm 712). Auch diese Werte lagen nicht weit auseinander und bestätigten ähnliche Hexosen-Affinität bei allen untersuchten Stämmen.

4 Diskussion

Das Genom des *S. cerevisiae* Laborstammes S288c wurde 1996 sequenziert und ist 12 Mb groß. Die etwa 6000 Gene sind auf 16 Chromosomen verteilt (Goffeau *et al.*, 1996). Die entsprechenden Sequenzen von Weinhefen wurden später veröffentlicht (Borneman *et al.*, 2008; Novo *et al.*, 2009). Heute liegen einige Gesamtgenom-Sequenzen mehrerer *S. cerevisiae*-Stämme vor (Liti *et al.*, 2009; Schacherer *et al.*, 2009).

Laut Legras *et al.* (2007) sind 88 % aller *S. cerevisiae*-Stämme diploid. Darüber hinaus gilt dieser diploide Zustand für die meisten in der Wein-Herstellung verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme. Diese sind variabel heterozygot (Carreto *et al.*, 2008). Beim kommerziellen Weinstamm EC1118 z.B. beträgt der heterozygotische Anteil weniger als 0,1 % (Blondin *et al.*, 2009).

Die *S. cerevisiae*-Stämme vermehren sich unter optimalen Wachstums-Bedingungen meistens vegetativ durch Sprossung. Kommt es während der sexuellen Vermehrung zur Sporenbildung und Verschmelzung zweier haploiden Sporen verschiedener Paarungstypen, werden diploide Organismen generiert (Blondin *et al.*, 2009). Durch eine Anpassung an stressige Bedingungen im Wein, werden sich homozygote diploide Organismen durchsetzen. Auf diesem Weg kann eine sogenannte Genom-Erneuerung stattfinden (Mortimer *et al.*, 1994).

Die domestizierten Weinhefen unterscheiden sich auf Grund der langfristigen genetischen und physiologischen Anpassung voneinander (Liti *et al.*, 2009; Schacherer *et al.*, 2009; Boynton & Greig, 2014). Genomische Studien haben umfangreiche Differenzen zwischen industriellen und Laborstämmen der Art *S. cerevisiae* demonstriert (Borneman *et al.*, 2008, 2011). Die allele Varianten und damit auch Veränderungen im Phänotyp der Hefen unterstreichen ihre Fähigkeit, sich an die Umwelt-Bedingungen anzupassen (Borneman *et al.*, 2008). Somit geben die Identifizierung und Charakterisierung solcher alleler Varianten die Möglichkeit, Stämme mit hoher Gärleistung zu selektieren (Dunn *et al.*, 2005; Steensels *et al.*, 2014).

In diesem Zusammenhang hat sich diese Arbeit auf allele Varianten von *HXT3* konzentriert, da dieses Gen während der ganzen Gärung exprimiert wird und als niedrigaffiner Carrier eine essentielle Rolle bei der Mostvergärung spielt (Rodicio & Heinisch, 2009). Weiterhin wurden die *Saccharomyces*-Stämme und ihre Interspezies-Hybride auf die Verbreitung alleler Varianten der Hexokinase-Gene *HXK1* und *HXK2*, die für Schlüsselenzyme der Glykolyse kodieren, untersucht. Da die meisten Studien mit Laborstämmen, die nicht in der Lage sind, bei niedrigen pH-Werten und hoher Osmolarität des Traubenmostes zu wachsen und damit keine Bedeutung für die Weinherstellung haben, wurden im Laufe dieser Arbeit mehrere industrielle Stämme und natürliche Isolate betrachtet.

4.1 Variabilität des Hexose-Transporters Hxt3p

DNA-Sequenzierung und Vergleich des *HXT3*-Allels von 51 *Saccharomyces*-Arten und ihren Hybriden ergaben fünf Gruppen mit auffallendem Aminosäuren-Muster (Tabelle 8).

Die größte Gruppe bildeten 15 Hefestämme mit dem *HXT3*-Standard-Alleltyp des *S. cerevisiae*-Stammes S288c. Hierzu gehörten Weinhefen, Bäckerhefen und klinische Isolate verschiedener geographischer Herkunft (Tabelle 21, Anhang).

Die zweite große Gruppe bestand aus sechs Stämmen mit einem Fermichamp[®]-Alleltyp. Hier gab es zehn Aminosäure-Austausche im Vergleich zum Standardstamm. Ein zu dieser Gruppe sehr ähnliches Aminosäuren-Muster zeigten zwei weitere Stämme. Eine kleinere dritte Gruppe bildeten zwei *S. cerevisiae*-Stämme, die acht Substitutionen gegenüber dem Referenz-Stamm S288c aufwiesen. Auch Bierhefen und Hybrid-Stämme, die entsprechend eine vierte und fünfte Gruppe bildeten, zeigten ein charakteristisches Aminosäuren-Muster. Die drei untersuchten Bierhefen verfügten über 11 bis zu 20 Substitutionen. Hybrid-Stämme zeigten 14 Aminosäure-Austausche im Vergleich zum Referenzstamm S288c. *S. kudriavzevii*-Stamm IFO1802 zeigte ein nahezu gleiches Substitutions-Muster wie die Hybride, aber noch weitere acht Substitutionen am C-Terminus. Somit stammt das *HXT3*-Gen der Hybrid-Stämme wahrscheinlich von dieser *Saccharomyces* Spezies. Die restlichen Sequenzen, repräsentiert vor allem von Labor- und Umweltisolaten, zeigten nur zwei bis fünf Substitutionen.

Der *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp[®] wird zum Restarten von gärstockenden Mosten angesetzt. Unter die gleiche Gruppe fielen weitere starkgärende *Saccharomyces*-Stämme wie 72 (Deutschland), 73 (Griechenland) und 54.41 (Deutschland). Das gleiche Aminosäuren-Muster bezüglich Hxt3p zeigten die kommerzielle Sekthefer Stamm 657 und Stamm 596, ein Isolat aus einem Trockenhefe-Präparat. Weitere zwei Stämme zeigten ein sehr ähnliches Aminosäuren-Muster: eine Champagnerhefe aus Frankreich Stamm 642 und der als Starterkultur verwendete kommerzielle Stamm Lalvin EC1118[®].

Überraschenderweise besaßen die Hybrid-Stämme *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus* HL78 und *S. cerevisiae* x *S. bayanus* 3211-2, die aus spontan gärendem Most isoliert wurden, ein *HXT3*-Allel mit einem Muster, das identisch mit dem Allel aus dem kommerziellem *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* Weinstamm VIN7[®] war.

Die im Laufe der Arbeit ermittelten *HXT3*-Sequenzen der kommerziellen Weinhefen (Fermivin[®], Fermichamp[®]) bestätigten die Ergebnisse von Guillaume *et al.* (2007). Die Autoren beschrieben eine spontane Mutation innerhalb des *HXT3*-Gens des industriell genutzten *S. cerevisiae* Weinstammes Fermichamp[®]. Diese Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass die gleichen *HXT3*-Varianten in Weinstämmen aus unterschiedlichen geographischen Regionen vorkommen. Es ist naheliegend, dass solche Mutationen offenbar häufiger auftreten und den betroffenen Stämmen Vorteile verleihen.

Die Variabilität der Hexose-Carrier scheint relativ hoch zu sein. Karpel *et al.* (2008) haben die Gene *HXT1* - 7, die für die wichtigsten Hexose-Transporter kodieren, aus acht *S. cerevisiae*-Stämmen mit Sequenzen des Laborstammes S288c verglichen. Darunter gehörten vier Traubenmost-Isolate und zwei kommerzielle Weinstämme. Nukleotid-Austausche, die zu Unterschieden in Aminosäuresequenzen führten, wurden in allen sieben Hexose-Transportern gefunden. Im Vergleich zum *S. cerevisiae* Laborstamm S288c wurden in den acht untersuchten Stämmen bis zu acht Aminosäure-Austausche je Stamm und Gen festgestellt. Im Gegensatz zu Ergebnissen dieser Arbeit, war das Gen *HXT3* eines der meist konservierten. Nur der Stamm UCD2031, der auch innerhalb dieser Arbeit betrachtet wurde, zeigte ein anderes *HXT3*-Allel mit acht Aminosäure-Substitutionen. Weiterhin unterschied sich der Stamm UCD939 von den anderen in einer Aminosäure-Substitution (T371S) in diesem Gen. Eine niedrige Diversität wurde auch bei Hxt2p und Hxt5p festgestellt. Ein auffallend hoher Polymorphismus wurde bei Hxt1p, Hxt6p und Hxt7p Carriern beobachtet.

Auch die Ergebnisse von Hernández *et al.* (2013), die Mezcal-Isolate der Art *S. cerevisiae* untersucht haben, bestätigten einen hohen Polymorphismus innerhalb Hxt1p. Zusätzlich zu einem in diesen Stämmen sich wiederholenden charakteristischen Aminosäuren-Muster, wurden 14 weitere einmalige Substitutionen gefunden. Auch innerhalb der Hxt3p-Sequenz wiederholte sich ein Substitutions-Muster im Vergleich zum Laborstamm S288c. Hier wurden aber nur zwei zusätzliche Austausche festgestellt.

4.2 Isoformen des Hxt3p-Transporters

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den *HXT3*-Varianten und dem Zucker-Transport durch diesen Carrier zu untersuchen, wurde ein Hxt3p-Struktur-Modell auf Basis des Proton/Xylose-Symporters Xyle aus *E. coli* erstellt. Der Symporter Xyle wurde auf Grund seiner zu 30 % homologen Struktur ausgewählt. Eine Kristall-Struktur des Hefe-Hexose-Transporters Hxt3p war nämlich bis jetzt nicht verfügbar. Es wurden die „outward-open“-Konformationen des Carriers Hxt3p modelliert und die Aminosäure-Substitutionen der drei Hauptgruppen mit unterschiedlichem Aminosäuren-Muster markiert. Diese Gruppen bildeten Stämme mit Fermichamp®-Alleltyp, die Bierhefen und die Hybrid-Stämme.

Alle drei Isoformen haben mehrere Aminosäure-Substitutionen im Vergleich zur Hxt3p-Sequenz des Standardstammes S288c. Die Aminosäure-Austausche konzentrieren sich auf drei besonders stark variable Bereiche des Transporters („Hotspots“).

Hotspot 1 lag in der Region zwischen den N- und C-terminalen Domänen. Hierhin gehörten der Outside-Loop zwischen Transmembranregion 1 und 2 und die Transmembranregionen 2, 5 und 7. Da die Transmembranen 5 und 7 erforderlich für Substrat-Erkennung und/oder Zucker-Transport in dem hochaffinem Hxt2p sind (Kasahara & Kasahara, 2003), könnten diese Aminosäure-Substitutionen

auch einen Einfluss auf Funktionalität des Hxt3p haben. Unerwarteterweise gab es keine Aminosäure-Substitutionen an der Substrat-Bindestelle, die auch in dieser Region vorliegt.

Hotspot 2 befand sich in der cytosolischen Domäne, das heißt in einem Inside-Loop zwischen Transmembranregion 6 und 7. Diese cytosolische Domäne umschließt das Substrat während des Transports in der „outward-open“-Konformation. In diesem Zusammenhang verändern die Aminosäure-Substitutionen die Transport-Leistung des Carriers (Wisedchaisri *et al.*, 2014).

In dem Outside-Loop zwischen Transmembranregion 9 und 10 lag Hotspot 3. Da in Xyle-Protein von *E.coli* der entsprechende Loop kürzer ist, konnte die Loop-Struktur von Hxt3p nicht geklärt werden. Dieser Bereich könnte entweder mit der N-terminalen Domäne, der C-terminalen Domäne oder sogar mit der Zellmembran interagieren. Nichtsdestotrotz scheint dieser lange Loop in Hxt3p für die Funktion des Proteins wichtig zu sein. Es befindet sich im periplasmatischen Bereich der Hefezelle und interagiert sehr wahrscheinlich direkt mit den Hexosen im Medium. Im Gegensatz dazu ist dieser Loop im Xyle-Protein von *E.coli* kurz und ihm wurde keine bedeutende Funktion zugeordnet (Sun *et al.*, 2012).

Alle drei Gruppen (die Fermichamp[®]-Typ Gruppe, Bierhefen und Hybrid-Stämme) besitzen somit signifikante Aminosäure-Substitutionen innerhalb des Transporters Hxt3p, die oben genannte Hotspots bilden. Insofern trägt wahrscheinlich jede Isoform dieses Transporters funktionelle Veränderungen mit sich. Detaillierte Struktur- und Funktions-Experimente sind notwendig, um die Bedeutung der Aminosäure-Substitutionen in Hxt3p aufzudecken. Einige auffallende Zusammenhänge werden nachfolgend diskutiert.

4.3 Gärleistung der Hefen mit *HXT3*-Allel-Varianten

Guillaume *et al.* (2007) haben demonstriert, dass die *HXT3*-Allel-Variante des als Starterkultur verwendbaren Stammes Fermichamp[®], für den verstärkten Fructose-Abbau verantwortlich war. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben ein gleiches Verhalten der Stämme mit dieser Allel-Variante bestätigt. Getestet wurden die *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp[®] und 54.41, die bezüglich Hxt3p-Aminosäuresequenz gleich sind, gegenüber zwei *S. cerevisiae*-Stämmen mit dem Standard-Alleltyp von *HXT3*: Fermivin[®] und 33.

Der Unterschied im Hexose-Metabolismus zwischen Stämmen mit Fermichamp[®]- und Standard-Alleltyp war in der Mitte des Gärverlaufs am deutlichsten sichtbar.

Beide Gruppen, sowohl mit Fermichamp[®]- als auch Fermivin[®]-Alleltyp von *HXT3* vergoren die Glucose schneller als die Fructose. Der Unterschied aber zwischen diesen *HXT3*-Alleltypen beim Zucker-Abbau lag darin, dass der Fermichamp[®]-Typ eine kleinere Differenz in der Abbaugeschwindigkeit der beiden Hexosen zeigte als der Fermivin[®]-Typ. Auch Liccioli *et al.* (2011) haben

zwanzig kommerzielle *S. cerevisiae*-Stämme untersucht und festgestellt, dass Fermichamp® den kleinsten Unterschied zwischen Glucose und Fructose-Abbau zeigte.

Hernández *et al.* (2013) untersuchten die Gärungsleistung von acht *S. cerevisiae*-Isolaten, die am Ende der Gärung in einem traditionellen mexikanischen Mezcal dominierten. Mezcal ist ein fermentierter Agavensaft und reich an Fructose. Fermichamp® diente dabei als eine fructophile Kontroll-Hefe. Als einziger Stamm in dieser Studie hatte Fermichamp® im Medium mit jeweils 100 g/l Glucose und Fructose letztere vollständig abgebaut. Dabei blieben 32 g/l Glucose übrig.

Kürzlich wurde beschrieben, dass der Triple-Hybrid *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78 in der Lage ist, die Fructose effektiver abzubauen als *S. bayanus*-Stamm HL77 (Christ *et al.*, 2015). Sein fructophiler Charakter korrelierte in Transportexperimenten mit verstärkter Aufnahme von Fructose im Vergleich zu Glucose. Insgesamt verhielt sich dieser Stamm ähnlich wie die *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp® und 54.41. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass *S. kudriavzevii* Stamm IFO1802, der ein sehr ähnliches *HXT3*-Allel besitzt wie HL78, eine sehr gute Gärleistung bei niedrigen und mittleren Temperaturen (14 - 22 °C) im Most zeigt (González *et al.*, 2007).

Überraschenderweise haben trotz Anwesenheit mehrerer Stress-Faktoren (Fructose:Glucose-Verhältnis von mindestens 9:1, minimale Ammonium-Konzentration und Zugabe von Ethanol) alle getesteten *Saccharomyces*-Stämme die Fructose in solchen Medien problemlos abgebaut. Offenbar waren die untersuchten Weinhefen gut an diese Bedingungen adaptiert. Erst in Anwesenheit von 12,0 Vol% Ethanol konnten sich nur noch wenige der getesteten Stämme durchsetzen: der *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp® und der Hybrid-Stamm HL78. In beiden Fällen startete das Wachstum allerdings erst nach einer langen lag-Phase von etwa 30 Tagen, die die Zellen offenbar für die Anpassung an die Stress-Bedingungen benötigten.

Hefen unterscheiden sich auch voneinander durch die Ethanol-Konzentration, die sie produzieren und tolerieren können. Obwohl mögliche Gründe dafür intensiv untersucht wurden (wie z.B. die Zusammensetzung der Cytoplasmamembran), ist es immer noch nicht vollständig geklärt, warum ein Hefestamm über eine höhere Ethanol-Resistenz verfügt als der andere. In dieser Arbeit wurde die Empfindlichkeit gegenüber Ethanol sowohl mit wachsenden Kulturen als auch im batch-Verfahren mit Zellsuspensionen bei Temperaturen von 15 °C und 20 °C getestet.

Im flüssigen Sabouraud-Medium bei pH 3,5 fiel das Wachstum der Teststämme bis zu 10,0 Vol% Ethanol noch vergleichbar gut aus (Tabelle 5). Eine Ethanol-Konzentration von 15,0 Vol% hemmte das Wachstum der Stämme unterschiedlich stark. Bei niedriger Temperatur von 15 °C wuchsen die *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp® und 54.41 (gleiches *HXT3*-Allel) hier am schnellsten.

Die Vitalität der Hefezellen, die mit Ethanol versetzt wurden (Tabelle 6), war allgemein bei 15 °C weniger beeinträchtigt als bei 20 °C. Bei 15 °C zeigte *S. bayanus*-Stamm HL77 die höchste Resistenz.

Abhängig von der Temperatur, pH-Werts des Mediums und seiner Zusammensetzung hatten verschiedene Hefestämme Ethanol-Resistenz gezeigt. Unter Most-ähnlichen Stress-Bedingungen (pH-Wert 3,5; 15 °C; Fructose:Glucose-Verhältnis $\geq 9:1$) waren die Stämme Fermichamp® und Hybrid HL78 besonders robust.

Die Zusammensetzung des Mediums ist für das Verhalten der Hefen entscheidend. Santos *et al.* (2008) haben beispielsweise Hefen der Gattung *Saccharomyces* und Nicht-*Saccharomyces* getestet. Dabei haben fructophile *Zygosaccharomyces bailii* und *Torulaspora delbrueckii* extreme Bedingungen bis 18,0 Vol% Ethanol in YPD-Medium überlebt. Trotzdem haben diese Stämme keine Fructose im Most-ähnlichen Stress-Medium abbauen können.

Die Ergebnisse von Arroyo-López *et al.* (2010) zeigten, dass die meisten der 29 *Saccharomyceten* und Nicht-*Saccharomyceten* in der Lage waren, bis zu etwa 8,0 Vol% Ethanol im YNB-Medium ohne Einfluss auf das Wachstum zu tolerieren. Diese Ergebnisse stimmen mit den eigenen Ergebnissen mit Sabouraud-Medium überein. Alexandre & Charpentier (1998) haben dagegen berichtet, dass bis zu 8,5 Vol% Ethanol im Medium die Geschwindigkeit in der Glucose-Aufnahme und Aktivität der glykolytischen Enzyme unbeeinflusst blieben. Dennoch war die Fermentationsrate um etwa 50 % reduziert. Diese Daten können nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen werden, da in den Stress-Medien nur wenig Glucose vorlag (2 bis 4 g/l).

Als Antwort auf den Ethanol-Stress haben Hefen der Art *S. cerevisiae* einige Strategien entwickelt. Sie wirken den hohen Ethanol-Konzentrationen entgegen, indem sie z.B. die Membran-Zusammensetzung ändern. Steigt die Konzentration an ungesättigten Fettsäuren und Ergosterol in der Membran, nimmt ihre Fluidität ab (Ding *et al.*, 2009). Arroyo-López *et al.* (2010) demonstrierten, dass die wichtigste ungesättigte Fettsäure in diesem Zusammenhang die Ölsäure ist. Diese Tatsache haben bereits You *et al.* (2003) bewiesen. Deswegen ist die Zusammensetzung des Mediums so wichtig. Fehlen die Lipide oder ihre Vorstufen, kann das einen negativen Einfluss auf die Ethanol-Resistenz haben. Zur Stress-Antwort der Hefezellen gehört auch die Erhöhung der Aktivität der Membran-gebundenen ATPase. Diese wirkt dem durch Ethanol induzierten Protonen-Influx entgegen (Ding *et al.*, 2009).

Eine weitere Antwort auf Ethanol-Stress ist die Exprimierung von Faktoren, die denaturierte Proteine stabilisieren, reparieren und/oder degradieren. Diese gehören zur HSR (the heat shock response)-Antwort (Estruch, 2000). Als Folge des physiologischen Zustands der Hefezellen wird auch eine GSR (general stress response)-Antwort aktiviert, die die Zellen auch vor anderen Stress-Faktoren schützt. Hierzu gehört u.a. die Trehalose- und Glykogen-Akkumulation (Alexandre *et al.*, 2001).

Die Konzentration des in den Stress-Medien frei vorliegenden Stickstoffs (in Form von Ammonium-Sulfat und einer Reihe von Aminosäuren) betrug etwa 50 mg/l. Diese Konzentration lag laut Literatur unter der minimalen Stickstoff-Konzentration (140 mg/l), die zu vollständigen Vergärung eines Mostes mit einer Zucker-Konzentration von 200 g/l nötig ist (Bell & Henschke, 2005). Laut Untersuchungen von Orlić *et al.* (2010) reichen *S. cerevisiae* 50 mg/l Stickstoff, um die gleiche Zucker-Menge vollständig abzubauen. Allerdings sind die Ansprüche der Weinhefen in Hinsicht auf freies Ammonium Stamm-spezifisch (Manginot *et al.*, 1998). Trotzdem konnten im Laufe dieser Arbeit auf Grund einer Ammonium-Konzentration von etwa 40,0 mg/l in Verbindung mit einem ungünstigen Fructose:Glucose-Verhältnis keine Beeinträchtigungen im Wachstum und Hexose-Vergärung festgestellt werden. In diesen Medien lagen nur 40 g/l Gesamt-Zucker vor (Tabelle 9).

Vermutlich konnten die untersuchten *Saccharomyces*-Stämme auf die im Medium vorliegenden Aminosäuren zurückgreifen. Eine solche Situation wurde von Christ *et al.* (2015) beschrieben. Stämme von *S. bayanus* HL77 und *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus* HL78, die aus einem spontan gärenden Most isoliert wurden, konnten in Abwesenheit von Ammonium wachsen, sofern Aminosäuren oder Proteine vorhanden waren.

Im Laufe dieser Arbeit konnte dieses Verhalten von *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78 in Anwesenheit von 12,0 Vol% Ethanol nicht bestätigt werden. Während in 12,0 Vol% Ethanol-haltigem Medium mit minimaler Ammonium-Konzentration der Stamm Fermichamp® wachsen konnte, hat sich der Hybrid-Stamm HL78 nur im Medium mit 12,0 Vol% Ethanol und vollständiger Ammonium-Konzentration an die Bedingungen angepasst. Allerdings wurden die Untersuchungen von Christ *et al.* (2015) nicht in Ethanol-haltigen Medien durchgeführt.

Wahrscheinlich hatte die hohe Alkohol-Konzentration einen negativen Einfluss auf die Stickstoff-Aufnahme im Stress-Medium. In Folge kommt es zum Erliegen der Proteinsynthese und zum Abbau proteinhaltiger Zellkomponenten, u.a. der Hexose-Transporter (Cardoso & Leão, 1992a).

4.4 Hexosen-Aufnahme durch die Hefen mit *HXT3*-Allel-Varianten

Es ist schon lange bekannt, dass es innerhalb von *S. cerevisiae*-Stämmen unterschiedlich effektive Glucose-Aufnahme-Systeme gibt (Does & Bisson, 1989). Die Zuckeraufnahme-Messungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass während die Stämme mit dem Standard-Alleltyp die Glucose schneller als Fructose aufnahmen, transportierten die Stämme mit dem Fermichamp®-Allel die beiden Hexosen zumindest gleich schnell (Abbildung 15 und Abbildung 17). Dies stimmte mit dem Gärverhalten dieser Stämme überein. Dieser Zusammenhang konnte allerdings von Guillaume *et al.* (2007) nicht bestätigt werden. Die kinetischen Parameter des Zucker-Transports waren beim Fermichamp®- und Femivin®-Typ sehr ähnlich.

Christ *et al.* (2015) haben die Gärleistung der aus spontangärendem Most mit Gärstörungsproblemen isolierten *S. bayanus*-Stamm HL77 und später in diesem Most dominierten Triple-Hybrid-Stamm untersucht. Dieser *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78 hat die Fructose besser als der *S. bayanus*-Stamm HL77 vergoren. Dies korreliert mit den Transportmessungen in der vorliegenden Arbeit, die zeigten, dass Stamm HL78 Fructose schneller aufnimmt als Glucose (Christ *et al.*, 2015).

Im Gegensatz zu den im Laufe dieser Arbeit untersuchten Wildtyp-Stämmen, in denen Gene für alle Carrier der Hxt-Familie vorlagen, haben Guillaume *et al.* (2007) die Zuckeraufnahme-Messungen mit einem Mutanten-Stamm, in dem nur *HXT3* exprimiert wurde, durchgeführt. Obwohl dadurch die Aktivität weiterer Transporter ausgeschlossen werden kann, sollte man auch solche knock-out Experimente kritisch betrachten. Zum Beispiel berichteten Ye *et al.* (2001), dass Hxt7p im *S. cerevisiae* Wildtyp erst zu Ende der Gärung exprimiert wird, wenn niedrige Zucker-Konzentrationen vorhanden sind. In einer Deletions-Mutante mit nur diesem Hexose-Carrier, war dieser ständig exprimiert und seine Expressionsrate erhöhte sich noch bei niedrigen Glucose-Konzentrationen. Die knock-out Mutanten können somit alternative Stoffwechselwege einschlagen, um die Wildtyp Funktionen wieder herzustellen.

Da *HXT3*-Gen bis zum Ende der Gärung exprimiert wird, wenn bereits als stressig zu bezeichnende Ethanol-Konzentrationen vorliegen, stellt sich die Frage, ob der Carrier besondere Eigenschaften besitzt, die der Hefe Ethanol-Resistenz verleiht.

Die Ergebnisse der Zuckeraufnahme-Messungen haben gezeigt, dass Ethanol, in Abhängigkeit von seiner Inkubationszeit mit den Zellen, einen unterschiedlichen Einfluss auf die Aufnahme von Hexosen hatte. Wurde Ethanol (Endkonzentration 4,0 Vol%) direkt in den Messansatz zugegeben, war die Aufnahme von Glucose und Fructose bei Fermichamp® und Fermivin® kaum beeinflusst. Wurden die Zellen 24 h vor der Messung mit gleicher Ethanol-Konzentration inkubiert, stieg die Zuckeraufnahme bei beiden Stämmen signifikant an. Während beim Stamm Fermichamp® die Fructose-Aufnahme etwa doppelt so hoch wie der Glucose-Transport war, war die Aufnahme von beiden Hexosen beim Stamm Fermivin® etwa gleich. Auf gleiche Weise zugesetztes 10,0 Vol% Ethanol hatte ebenfalls noch einen positiven Einfluss auf die Zuckeraufnahme.

In Hinsicht darauf, dass das Ethanol Proteine und andere Zellbestandteile denaturiert, u.a. auch Transport-Systeme (Salmon, 1989; Hallsworth, 1998), ist die erhöhte Zuckeraufnahme nach Ethanol-Inkubation ein überraschendes Ergebnis. Trotzdem scheint es nachvollziehbar zu sein, dass in einer solchen Stress-Situation, wenn z.B. die ungesättigten Fettsäuren synthetisiert werden, die Energie in Form von Zucker gebraucht wird. Der Transport kann nur unter der Voraussetzung funktionieren, dass die Stress-Antwort der Zelle effektiv arbeitet. Die Ergebnisse von Santos *et al.* (2008) unterstützen diese These. Diese Untersuchungen haben nämlich demonstriert, dass eine höhere Aufnahme und

Abbaurates der Hexosen erreicht wird, wenn Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, zuvor mit Ethanol inkubiert wurden. Dieser Effekt war bereits nach 2 h Inkubation mit 6,0 Vol% Ethanol festzustellen. In der Tat konnte im Rahmen dieser Arbeit eine höhere Aufnahmerate der Hexosen im Vergleich zu Zellen ohne vorheriger 24-stündiger Ethanol-Inkubation nachgewiesen werden. Wurde Ethanol direkt in den Messansatz zugegeben, wurde die Zuckeraufnahme kaum beeinflusst. Ob die schnellere Aufnahme des Zuckers in die Zellen auch dessen Abbau begünstigt, wurde hier nicht untersucht. Die Abbaurates wurde nur in Medien getestet, die zusätzliche Stressfaktoren enthielten. Darüber hinaus verliefen das Wachstum und der Zuckerabbau in diesen Medien langsamer als im B-Medium. Die erhöhte Zuckeraufnahme in Anwesenheit vom Ethanol ist laut Santos *et al.* (2008) auf die Resistenz der Hexose-Transporter gegenüber Ethanol zurückzuführen. Die getesteten Carrier Hxt1 - 7p reagierten auf 12,0 Vol% Ethanol (ohne vorheriger Anpassung) abhängig von der Wachstumsphase unterschiedlich empfindlich. Die für die Gärung entscheidenden Transporter Hxt1p und Hxt3p zeigten sich in der exponentiellen Wachstumsphase weniger empfindlich als in der stationären Phase.

Die Transportmessungen ergaben keinen Zusammenhang zwischen Stämmen mit unterschiedlichen *HXT3*-Allelen und ihren Verhalten gegenüber dem Ethanol. Eine 24-stündige Inkubation mit 4,0 Vol% Ethanol im Kulturmedium hatte entweder keinen (Stamm 54.41) oder einen positiven Einfluss (Stämme Fermichamp[®], Fermivin[®], 33 und HL78) auf die Zuckeraufnahme im Vergleich zu Zellen ohne diese Vorbehandlung.

Hernández *et al.* (2013) haben beobachtet, dass Fermichamp[®] in der Lage ist, im Medium mit einem 9:1 Fructose:Glucose-Verhältnis mehr Ethanol ($42,0 \pm 1,1$ g/l) als im Medium mit einem 1:9 Fructose:Glucose-Verhältnis ($39,0 \pm 0,8$ g/l) zu produzieren. Das gleiche galt für den Stamm LCBG-3Y8 (entsprechend $37,2 \pm 4,4$ g/l und $31,5 \pm 0,8$ g/l Ethanol). Allerdings gab es auch hier keinen direkten Zusammenhang zwischen dem Verhalten der Stämme und ihrer *HXT1*- oder *HXT3*-Nukleotidsequenz.

Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die korrekte Expression des *HXT3*-Gens eine wichtige Rolle in der Ethanol-Toleranz der Hefe spielt. Bei Untersuchungen von Karpel *et al.* (2008) reagierte der Stamm UCD932, dem das Gen *HXT3* fehlte, im Gegensatz zu anderen Deletionsmutanten empfindlich, wenn am Anfang der Gärung 5,0 Vol% Ethanol zugesetzt wurde. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass der Carrier Hxt3p eine essentielle Rolle für die Energieproduktion der Hefe spielt. Sein Verlust beeinträchtigt die Alkohol-Toleranz besonders in der frühen exponentiellen Wachstumsphase der Hefe-Gärung.

Es wurden einige molekulare Unterschiede zwischen der kurz- und langfristigen Antwort auf Ethanol-Stress in verschiedenen Studien beobachtet. Die Untersuchungen zur langfristigen Antwort (über einen Zeitraum von 15 Tagen) der Hefen im gärenden Most haben gezeigt, dass im Gegensatz zur Ethanol-

Zugabe ohne vorheriger Anpassung u.a. kein Glycerin akkumuliert wird und nur wenige Gene der HSR-Antwort induziert werden (Zuzuarregui *et al.*, 2006; Marks *et al.*, 2008). Möglicherweise wird auf ähnlichem Weg die Zuckeraufnahme in Stress-Situationen gesteuert. Es gab nämlich einen Unterschied in der Aufnahme der Hexosen abhängig davon, wie lange das Ethanol bereits im Medium vorlag.

4.5 Die Rolle der Hexokinasen im Zucker-Metabolismus

Da die *HXK1*- und *HXK2*-Gene in den untersuchten *Saccharomyces*-Stämmen weitgehend konserviert sind, scheinen die molekularen Varianten für Unterschiede in der Glucose- oder Fructose-Präferenz dieser Stämme nicht verantwortlich zu sein. Auch auf die Anpassung an Umwelt-Stressfaktoren scheinen sie keinen Einfluss zu haben. Es scheint nachvollziehbar, dass diese intrazellulären Proteine, die enzymatische und regulatorische Funktion haben, weniger variabel sind als der Transporter Hxt3p, der dem Außen-Milieu direkt ausgesetzt ist.

Trotzdem, können auch einzelne Aminosäure-Austausche einen dramatischen Einfluss auf die Protein-Struktur und ihre Aktivität haben. Alle möglichen Aminosäure-Austausche in Hxk1p- und Hxk2p-Sequenzen, die innerhalb dieser Arbeit festgestellt wurden, liegen in äußerem Bereich der jeweiligen Protein-Struktur. Diese können eventuell eine Bedeutung haben, wenn die Proteine als Dimere vorliegen (Kuser *et al.*, 2008). Unter solchen Bedingungen wäre eine Veränderung in den Interaktionen zwischen den zwei Untereinheiten möglich. Gegen eine bedeutende Veränderung in der Aktivität dieser Proteine spricht aber die Tatsache, dass die beobachteten Aminosäure-Austausche innerhalb von Loops liegen. Würden diese innerhalb von α -Helices oder β -Faltblätter vorkommen, könnten die ausgetauschte Aminosäuren die Struktur stark verändern.

Weiterhin könnte eine unterschiedliche Expression der Gene *HXK1* und *HXK2* einen Einfluss auf die Gärleistung der *S. cerevisiae*-Stämme haben. Die Ergebnisse der Aktivitäts-Messungen gaben aber keine Hinweise da drauf. Alle untersuchten *Saccharomyces*-Stämme zeigten nämlich eine höhere Affinität zu Glucose als zu Fructose. Die K_m -Werte für Fructose waren für jeden Stamm mehrfach höher als die für Glucose. Auch die von Berthels *et al.* (2008) untersuchten Stämme verfügten über niedrigere K_m -Werte für Glucose im Vergleich zu Fructose. Hierin liegt sicherlich eine Hauptsache warum Fructose generell langsamer verwertet wird als Glucose. Die V_{max} -Werte waren ähnlich hoch für beide Hexosen.

Die Untersuchungen von Berthels *et al.* (2008) haben gezeigt, dass die unterschiedliche Glucose- und Fructose-Verwertung mit den kinetischen Eigenschaften der Hexokinasen korreliert. Weinstämme mit höheren Fructose- und Glucose-Phosphorylierungsraten und niedrigeren K_m -Werten sollten demnach weniger zu Gärstockungen neigen. Die Untersuchungen mit 15 weinrelevanten Stämmen im Laufe dieser Arbeit konnten diese Hypothese nicht unterstützen.

Die Hexokinase-Aktivität ist zweifelsohne ein bedeutender Schritt im Zucker-Metabolismus (Petit *et al.*, 2000; Berthels *et al.*, 2008). Weder die enzymatischen noch die molekularen Daten dieser Arbeit ergaben jedoch keine Hinweise, die auf dieser Ebene Stamm-spezifische Unterschiede in der Glucose/Fructose-Verwertung erklären würden. Laut Guillaume *et al.* (2007) sind Hexokinasen in der Lage, schneller den Zucker zu phosphorylieren als dieser in die Zelle aufgenommen wird.

5 Ausblick

Alle drei Hauptgruppen, die sich in der Variante des *HXT3*-Allels voneinander unterscheiden (die Fermichamp[®]-Typ Gruppe, Bierhefen und Hybrid-Stämme), besitzen signifikante Aminosäure-Substitutionen innerhalb des Transporters Hxt3p. Da wahrscheinlich jede Isoform dieses Transporters funktionelle Veränderungen mit sich trägt, sind weitere Experimente notwendig, um die Bedeutung der Hotspots in Hxt3p aufzuklären. Hierfür sollten physiologische Versuche mit Mutanten durchgeführt werden bei denen einzelne signifikante Aminosäuren ausgetauscht wurden.

Dies wäre auch von industriellem Interesse, da im Laufe dieser Arbeit bestätigt wurde, dass es bedeutende Unterschiede in der Vergärung von Glucose und Fructose zwischen Weinhefen der Gattung *Saccharomyces* gibt, die z.T. mit Struktur-Varianten des Hexose-Transporters Hxt3p korrelieren. Die Zuckeraufnahme-Messungen haben die relativ gute Fructose-Aufnahme dieser Stämme bestätigt. Demzufolge könnten alle Varianten von *HXT3* ein nützliches Kriterium bei der Auswahl gärstarker Hefen für die Weinherstellung sein. Hierfür sollten weitere robuste Hefestämme auf ihre Variante des *HXT3*-Allels geprüft werden.

Nicht nur die Auswirkung der signifikanten Aminosäure-Substitutionen auf die Proteinstruktur und Effizienz des Hexose-Transports, sondern auch der mögliche Zusammenhang mit Ethanol-Resistenz sollten weiter untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten nämlich, dass eine 24-stündige Inkubation mit 4,0 Vol% Ethanol entweder keinen oder einen positiven Einfluss auf die Zuckeraufnahme bei Hefen mit unterschiedlicher Hxt3p-Isoform hatte.

6 Zusammenfassung

In Hinsicht darauf, dass sich *S. cerevisiae*-Stämme im Laufe der Domestizierung und Anpassung an verschiedene Habitate genetisch verändert haben, wurde in dieser Arbeit eine repräsentative Auswahl von Labor-, kommerziellen und in der Natur vorkommenden *Saccharomyces*-Stämmen und ihren Interspezies-Hybriden auf die Verbreitung alleler Varianten der Hexokinase-Gene *HXK1* und *HXK2* getestet. Von den Hexose-Transportern stand Hxt3p im Mittelpunkt, da seine essentielle Rolle bei der Vergärung von Glucose und Fructose bereits belegt wurde.

Im Laufe dieser Arbeit wurde bestätigt, dass es bedeutende Unterschiede in der Vergärung von Glucose und Fructose zwischen Weinhefen der Gattung *Saccharomyces* gibt, die z.T. mit Struktur-Varianten des Hexose-Transporter Hxt3p korrelieren.

Insgesamt 51 Hefestämme wurden auf ihre allele Variante des *HXT3*-Gens untersucht. Dabei haben sich drei Hauptgruppen (die Fermichamp[®]-Typ Gruppe, Bierhefen und Hybrid-Stämme) mit unterschiedlichem *HXT3*-Allel ergeben. Im Zusammenhang mit der Weinherstellung wurden signifikante Nukleotid-Substitutionen innerhalb des *HXT3*-Gens der robusten *S. cerevisiae*-Stämme (wie z.B. Sektheferen, kommerzielle Starterkulturen) und Hybrid-Stämmen festgestellt. Diese Hefen zeichneten sich durch die Fähigkeit aus, den Most trotz stressigen Umwelt-Bedingungen (wie hohe Ethanol-Konzentration, reduzierter Ammonium-Gehalt, ungünstiges Glucose:Fructose-Verhältnis) zu vergären.

Es konnte bestätigt werden, dass die *HXT3*-Allel-Variante des als Starterkultur verwendbaren Stammes Fermichamp[®], für den verstärkten Fructose-Abbau verantwortlich war. Ein gleiches Verhalten der Stämme mit dieser Allel-Variante wurde ebenfalls beobachtet. Getestet wurden die *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp[®] und 54.41, die bezüglich Hxt3p-Aminosäuresequenz gleich sind, gegenüber zwei *S. cerevisiae*-Stämmen mit dem *HXT3*-Standard-Alleltyp Fermivin[®] und 33. Der Unterschied in der Hexose-Verwertung zwischen Stämmen mit Fermichamp[®]- und Standard-Alleltyp war in der Mitte des Gärverlaufs am deutlichsten zu beobachten. Beide Gruppen, sowohl mit *HXT3* Fermichamp[®]- als auch Fermivin[®]-Alleltyp vergoren die Glucose schneller als die Fructose. Der Unterschied aber zwischen diesen *HXT3*-Alleltypen bei der Zucker-Verwertung lag darin, dass der Fermichamp[®]-Typ eine kleinere Differenz in der Abbau-Geschwindigkeit der beiden Hexosen zeigte als der Fermivin[®]-Typ. Die Zuckeraufnahme-Messungen haben die relativ gute Fructose-Aufnahme dieser Stämme bestätigt.

Ebenfalls korrelierte der fructophile Charakter des Triple-Hybrides *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78 in Transportexperimenten mit verstärkter Aufnahme von Fructose im Vergleich zu Glucose. Insgesamt zeigte dieser Stamm ähnliches Verhalten wie die *S. cerevisiae*-Stämme Fermichamp[®] und 54.41.

In dieser Arbeit wurde ein Struktur-Modell des Hexose-Transporters Hxt3p erstellt. Als Basis diente die zu 30 % homologe Struktur des Proton/Xylose-Symporters Xyle aus *Escherichia coli*. Anhand des Hxt3p-Modells konnten Sequenzbereiche mit hoher Variabilität (Hotspots) in drei Hxt3p-Isoformen der Hauptgruppen (die Fermichamp[®]-Typ Gruppe, Bierhefen und Hybrid-Stämme) detektiert werden. Diese signifikanten Aminosäure-Substitutionen, die eine mögliche Veränderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Carriers mit sich bringen, konzentrieren sich auf drei Bereiche. Dazu gehören die Region zwischen den N- und C-terminalen Domänen, die cytosolische Domäne und der Outside-Loop zwischen Transmembranregion 9 und Transmembranregion 10.

Obwohl die Transportmessungen keinen Zusammenhang zwischen Stämmen mit unterschiedlichen *HXT3*-Allelen und ihrer Toleranz gegenüber Ethanol ergaben, wurde ein signifikanter Anstieg in der Zuckeraufnahme nach vorheriger 24-stündiger Inkubation mit 4 Vol% Ethanol bei den Teststämmen beobachtet.

Insgesamt könnten alle Varianten von *HXT3*-Gen ein nützliches Kriterium bei der Suche nach robusten Hefen für die Weinherstellung oder für andere industrielle Anwendungen sein. Die Auswirkung dieser Modifikationen auf die Struktur und Effizienz des Hexose-Transporters, sowie der mögliche Zusammenhang mit Ethanol-Resistenz müssen weiter ausführlich untersucht werden.

Ein Zusammenhang zwischen den niedrig variablen Allel-Varianten der Hexokinase-Gene *HXK1* und *HXK2* und dem Zucker-Metabolismus wurde nicht gefunden. Die Hexokinasen der untersuchten Stämme wiesen allerdings generell eine signifikante geringere Affinität zu Fructose im Vergleich zu Glucose auf. Hier liegt sicherlich eine Hauptursache für den Anstieg des Fructose:Glucose-Verhältnisses im Laufe der Vergärung von Traubenmosten.

7 Literaturverzeichnis

- Alexandre, H., Charpentier, C. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20, 20-27
- Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., Blondin, B. (2001). Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 498, 98-103
- Arroyo-López, F. N., Salvadó, Z., Tronchoni, J., Guillamón, J. M., Barrio, E., Querol, A. (2010). Seseptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. *Yeast* 27, 1005-1015
- Bargues, M., Salom, D., Gomez, A., Paricio, N., Perez-Alonso, M., Perez-Ortin, J. E. (1996). Sequencing analysis of a 4.1 kb subtelomeric region from yeast chromosome IV identifies *HXT15*, a new member of the hexose transporter family. *Yeast* 12, 1005-1011
- Barnett, J. A. (1997). Sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. In: Zimmermann, F. K., Entian, K. D. (eds.). *Yeast Sugar Metabolism*. Technomic Publishing, Switzerland, 35-43
- Bauer, F. F., Pretorius, L. S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine- a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21, 27-51
- Bell, S. J., Henschke, P. A. (2005). Implication of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 242-295
- Belloch, C., Orlić, S., Barrio, E., Querol, A. (2008). Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *International Journal of Food Microbiology* 122, 188-195
- Bely, M., Salmon, J. M., Barre, P. (1994). Assimilable nitrogen addition and hexose transport system activity during enological fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* 100, 279-282
- Barnard, E. A. (1975). Hexokinases from yeast. *Methods in Enzymology* 42, 6-20
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Pretorius, I. S., Thevelein, J. M. (2008). Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 1083-1091
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research* 4, 683-689
- Bisson, L. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 50, 107-119
- Bisson, L. F., Fraenkel, D. G. (1983). Involvement of kinase in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 1730-1734
- Blättel, V., Petri, A., Rabenstein, A., Kuever, J., König, H. (2013). Differentiation of species of the genus *Saccharomyces* using molecular fingerprinting methods. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 4597-4606

- Blondin, B., Dequin, S., Querol, A., Legras, J. L. (2009). Genome of *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. In: König, H., Unden, G., Fröhlich, J. (eds.). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag, Heidelberg, 361-378
- Boles, E., Hollenberg, C. P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 21, 85-111
- Borneman, A. R., Desany, B. A., Riches, D., Affourtit, J. P., Forgan, A. H., Pretorius, I. S., Egholm, M., Chambers, P. J. (2011). Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genetics* 7, e1001287
- Borneman, A. R., Forgan, A. H., Pretorius, I. S., Chambers, P. J. (2008). Comparative genome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Research* 8, 1185-1195
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. (1996). Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In: Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. (eds.). *Principles and Practices of Winemaking*. Chapman & Hall, New York, 153-181
- Boynton, P. J., Greig, D. (2014). The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast* 31, 449-462
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254
- Broach, J. R. (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics* 192, 73-105
- Cardoso, H., Leão, C. (1992a). Sequential inactivation of ammonium and glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *FEMS Microbiology Letters* 94, 155-160
- Cardoso, H., Leão, C. (1992b). Mechanisms underlying the low and high enthalpy death induced by short-chain monocarboxylic acids and ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 388-392
- Carrasco, P., Querol, A., del Olmo, A. (2001). Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology* 175, 450-457
- Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R. (eds.) (2011). *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press, Amsterdam
- Carreto, L., Eiriz, M. F., Gomez, A. C., Pereira, P. M., Schuller, D., Santos, M. A. (2008). Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. *BMC Genomics* 9, 524
- Chenault, H. K., Mandes, R. F., Hornberger, K. R. (1997). Synthetic utility of yeast hexokinase. Substrate specificity, cofactor regeneration, and product isolation. *The Journal of Organic Chemistry* 62, 331-336
- Christ, E., Kowalczyk, M., Żuchowska, M., Claus, H., Löwenstein, R., Szopinska-Morawska, A., Renaut, J., König, H. (2015). An exemplary model study for overcoming stuck fermentation during spontaneous fermentation with the aid of a *Saccharomyces* triple hybrid. *The Journal of Agricultural Science* 7, doi:10.5539/jas.v7n8p18

- Ciani, M., Ferraro, L., Fatichenti, F. (2000). Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 698-703
- Clifton, D., Walsh, R. B., Fraenkel, D. G. (1993). Functional studies of yeast glucokinase. *Journal of Bacteriology* 175, 3289-3294
- Cortés, S., Salgado, J. M., Rivas, B., Torrado, A. M., Domínguez, J. M. (2010). Fermentation kinetics and chemical characterization of *vino tostado*, a traditional sweet wine from Galicia (NW Spain). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 121-131
- Crabtree, H. G. (1928). The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. *The Journal of Biochemistry* 22, 1289-1298
- Diderich, J. A., Schepper, M., van Hoek, P., Luttk, M. A., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., Klaassen, P., Boelens, H. F., de Mattos, M. J., van Dam, K., Kruckeberg, A. L. (1999). Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 15350-15359
- Diezemann, A., Boles, E. (2003). Functional characterization of the Frt1 sugar transporter and of fructose uptake in *Kluyveromyces lactis*. *Current Genetics* 43, 281-288
- Ding, J., Bierma, J., Smith, M. R., Poliner, E., Wolfe, C., Hadduck, A. N., Zara, S., Jirikovic, M., van Zee, K., Penner, M. H., Patton-Vogt, J., Bakalinsky, A. T. (2013). Acetic acid inhibits uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: auxotrophy confounds the use of yeast deletion libraries for strain improvement. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 7405-7416
- Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D., Zhang, K. (2009). Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 253-263
- Dittrich, H. H., Großmann, M. (2005). *Mikrobiologie des Weines*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- Does, A. L., Bisson, L. F. (1989). Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts. *Journal of Bacteriology* 171, 1303-1308
- Dunn, B., Levine, R. P., Sherlock, G. (2005). Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC Genomics* 6, 53
- Elbing, K., Larsson, C., Bill, R. M., Albers, E., Snoep, J. L., Boles, E., Hohmann, S., Gustafsson, L. (2004). Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5323-5330
- Entian, K. D., Mecke, D. (1982). Genetic evidence for a role of hexokinase isozyme PII in carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 257, 870-874
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeasts. *FEMS Microbiol Reviews* 24, 469-486
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., Pieper, U., Sali, A. (2006). Comparative protein structure modeling with MODELLER. In: *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., Suppl. 15, 5.6.1.-5.6.30

- Fleet, G. H. (1998). Microbiology of alcoholic beverages. In: Wood, B. J. (ed.). Microbiology of Fermented Foods (2nd ed.). Blackie Academic & Professional, London, 217-262
- Fleet, G. H., Heard, G. M. (1993). Yeast-growth during fermentation. In: Fleet, G. H. (ed.). Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, 27-54
- Flick, K. M., Spielewoy, N., Kalashnikova, T. I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H. C., Wittenberg, C. (2003). Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from *HXT* gene promoters. *Molecular Biology of the Cell* 14, 3230-3241
- Flood, A. E., Johns, M. R., White, E. T. (1996). Mutarotation of D-fructose in aqueous-ethanolic solutions and its influence on crystallization. *Carbohydrate Research* 288, 45-56
- Gafner, J., Schütz, M. (1996). Impact of glucose-fructose-ratio on stuck fermentations: practical experiences to restart stuck fermentations. *Wein-Wissenschaft* 51, 214-218
- Galeote, V., Novo, M., Salema-Oom, M., Brion, C., Valério, E., Gonçalves, P., Dequin, S. (2010). *FSY1*, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H⁺ symporter. *The Journal of Microbiology* 156, 3754-3761
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546-563
- Gonçalves, P., Rodrigues de Sousa, H., Spencer-Martins, L. (2000). *FSY1*, a novel gene encoding a specific fructose/H⁺ symporter in the type strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of Bacteriology* 182, 5628-5630
- González, S. S., Gallo, L., Climent, M. D., Barrio, E., Querol, A. (2007). Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *International Journal of Food Microbiology* 116, 11-18
- Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J. M., Blondin, B. (2007). Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated *HXT3* allele enhances fructose fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2432-2439
- Hallsworth, J. E. (1998). Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85, 125-137
- Hamacher, T., Becker, J., Gárdonyi, M., Hahn-Hägerdal, B., Boles, E. (2002). Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Journal of the Microbiology* 148, 2783-2788
- Heerde, E., Radler, E. (1978). Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 117, 269-276
- Hernández, A. A. O., Taillandier, P., Pérez, D. R., Zapata, J. A. N., Corona, C.P. L. (2013). The effect of hexose ratios on metabolite production in *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from spontaneous fermentation of mescal. *Antonie van Leeuwenhoek* 103, 833-843
- Herrero, P., Martinez-Campa, C., Moreno, F. (1998). The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the *SUC2* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 434, 71-76

- Hirayama, T., Maeda, T., Saito, H., Shinozaki, K. (1995). Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* 249, 127-138
- Horák, J. (2013). Regulations of sugar transporters: insights from yeast. *Current Genetics* 59, 1-31
- Hyvönen, L., Varo, P., Koivistoinen, P. (1977). Tautomeric equilibria of D-glucose and D-fructose gas-liquid chromatographic measurements. *Journal of Food Science* 42, 654-656
- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J. E., del Olmo, M. L. (1999). An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnology and Bioengineering* 64, 698-708
- Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R., Storchmann, K. (2005). Climate change and global wine quality. *Climatic Change* 73, 319-343
- Karpel, J. E., Place, W. R., Bisson, L. F. (2008). Analysis of the major hexose transporter genes in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture* 59, 265-275
- Kasahara, M., Kasahara, T. (2003). Transmembrane segments 1, 5, 7 and 8 are required for high-affinity glucose transport by *Saccharomyces cerevisiae* Hxt2 transporter. *Biochemical Journal* 372, 247-252
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P. S., Teunissen, A. W. R. H., Donaton, M. C. V., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J. H., Thevelein, J. M. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Molecular Microbiology* 32, 1002-1012
- Krampe, S., Stamm, O., Hollenberg, C. P., Boles, E. (1998). Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Letters* 441, 343-347
- Kruckeberg, A. L. (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 166, 283-292
- Kuser, P., Cupri, F., Bleicher, L., Polikarpov, I. (2008). Crystal structure of yeast hexokinase PI in complex with glucose: a classical „induced fit“ example revised. *Proteins* 72, 731-740
- Kwolek-Mirek, M., Zdrażga-Tęcza, R. (2014). Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research* 14, 1068-1079
- Lagunas, R. (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 10, 229-242
- Lagunas, R. (1981). Is *Saccharomyces cerevisiae* a typical facultative anaerobe? *Trends in Biochemical Sciences* 6, 201-201
- Leandro, M. J., Sychrová, H., Prista, C., Loureiro-Dias, M. C. (2011). The osmotolerant fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* employs two plasma-membrane fructose uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters. *The Journal of Microbiology* 157, 601-608
- Leáo, C., Van Uden, N. (1982). Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 24, 2601-2604

- Lee, W. J., Kim, M. D., Ryu, Y. W., Bisson, L. F., Seo, J. H. (2002). Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 186-191
- Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology* 16, 2091-2102
- Liccioli, T., Chambers, P. J., Jiranek, V. (2011). A novel methodology independent of fermentation rate for assessment of the fructophilic character of wine yeast strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38, 833-843
- Liti, G., Carter, D. M., Moses, A. M., Warringer, J., Parts, L., James, S. A., Davey, R. P., Roberts, I. N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I. J., Bergman, C. M., Bensasson, D., O'Kelly, M. J. T., van Oudenaarden, A., Barton, D. B. H., Bailes, E., Ba, A. N. N., Jones, M., Quail, M. A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E. J. (2009). Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 458, 337-34
- Lomolino, G., Lante, A., Crapisi, A., Spettoli, P., Curioni, A. (2001). Detection of *Saccharomyces cerevisiae* carboxylesterase activity after native and sodium dodecyl sulfate electrophoresis by using fluorescein diacetate as substrate. *Electrophoresis* 22, 1021-1023
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 317-331
- Luyten, K., Riou, C., Blondin, B. (2002). The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. *Yeast* 19, 713-726
- Maier, A., Völker, B., Boles, E., Fuhrmann, G. F. (2002). Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Research* 2, 539-550
- Malherbe, S., Bauer, F. F., Du Toit, M. (2007). Understanding problem fermentations- a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 28, 169-186
- Manginot, C., Roustan, J. L., Sablayrolles, J. M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of stationary phase. *Enzyme and Microbial Technology* 23, 511-517
- Marks, V. D., Ho Sui, S. J., Erasmus, D., van der Merwe, G. K., Brumm, J., Wasserman, W. W., Bryan, J., van Vuuren, H. J. (2008). Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS Yeast Research* 8, 35-52
- Marti-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29, 291-325
- Martínez-Moreno, R., Quirós, M., Morales, P., Gonzalez, R. (2014). New insights into the advantages of ammonium as a winemaking nutrient. *International Journal of Food Microbiology* 177, 128-135
- Mateo, J. J., Di Stefano, R. (1997). Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiology* 14, 583-591

- Moreno, F., Ahuatzí, D., Riera, A., Palomino, C. A., Herrero, P. (2005). Glucose sensing through the Hxk2-dependent signaling pathway. *Biochemical Society Transactions* 33, 265-268
- Moreno, F., Herrero, P. (2002). The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 83-90
- Mortimer, R. K., Romano, P., Suzzi, G., Polsinelli, M. (1994). Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 10, 1543-1552
- Munoz, E., Ingledew, W. M. (1990). Yeast hulls in wine fermentations- a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1, 197-209
- Naumov, G. I. (1996). Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Industrial Microbiology* 17, 295-302
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J. L., Wincker, P., Casaregola, S., Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16333-16338
- Orlić, S., Arroyo-López, F. N., Huić-Babić, K., Lucilla, I., Querol, A., Barrio, E. (2010). A comparative study of the wine fermentation performance of *Saccharomyces paradoxus* under different nitrogen concentrations and glucose/fructose ratios. *Journal of Applied Microbiology* 108, 73-80
- Özcan, S., Johnston, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 554-569
- Özcan, S., Johnston, M. (1995). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology* 15, 1564-1572
- Özcan, S., Dover, J., Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 17, 2566-2573
- Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wolf, S., Johnston, M. (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 12428-12432
- Palma, M., Madeira, S. C., Mendes-Ferreira, A., Sá-Correia, I. (2012). Impact of assimilable nitrogen availability in glucose uptake kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Microbial Cell Factories* 11, 99
- Perez, M., Luyten, K., Michel, R., Riou, C., Blondin, B. (2005). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Research* 5, 351-361
- Petit, T., Diderich, J. A., Kruckeberg, A. L., Gancedo, C., Van Dam, K. (2000). Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 182, 6815-6818
- Pina, C., Gonçalves, P., Prista, C., Loureiro-Dias, M. C. (2004). Ffz1, a new transporter specific for fructose from *Zygosaccharomyces bailii*. *The Journal of Microbiology* 150, 2429-2433

- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729
- Quistgaard, E. M., Löw, C., Moberg, P., Trésaugues, L., Nordlund, P. (2013). Structural basis for substrate transport in the GLUT-homology family of monosaccharide transporters. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 766-769
- Rahner, A., Hiesinger, M., Schuller, H. J. (1999). Deregulation of gluconeogenic structural genes by variants of the transcriptional activator Cat8p of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 34, 146-156
- Reifenberger, E., Boles, E., Ciriacy, M. (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal of Biochemistry* 245, 324-333
- Reifenberger, E., Freidel, K., Ciriacy, M. (1995). Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Molecular Microbiology* 16, 157-167
- Rodicio, R., Heinisch, J. J. (2009). Sugar metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. In: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (eds.). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer Verlag, Heidelberg, 113-134
- Rodrigues de Sousa, H., Spencer-Martins, I., Gonçalves, P. (2004). Differential regulation by glucose and fructose of a gene encoding a specific fructose/H⁺ symporter in *Saccharomyces sensu stricto* yeasts. *Yeast* 21, 519-530
- Rodrigues de Sousa, H., Madeira-Lopes, A., Spencer-Martins, I. (1995). The significance of active fructose transport and maximum temperature for growth in the taxonomy of *Saccharomyces sensu stricto*. *Systematic and Applied Microbiology* 18, 44-51
- Rodríguez, A., de la Cera, T., Herrero, P., Moreno, F. (2001). The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXK1* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal* 355, 625-631
- Ronne, H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends in Genetics* 11, 12-17
- Salmon, J. M. (1989). Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 953-958
- Saloheimo, A., Rauta, J., Stasyk, O. V., Sibirny, A. A., Penttilä, M., Ruohonen, L. (2007). Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 1041-1052
- Santos, J., Sousa, M. J., Cardoso, H., Inácio, J., Silva, S., Spencer-Martins, I., Leão, C. (2008). Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *The Journal of Microbiology* 154, 422-430
- Schaaff, I., Heinisch, J., Zimmermann, F. K. (1989). Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast* 5, 285-290

- Schacherer, J., Shapiro, J. A., Ruderfer, D. M., Kruglyak, L. (2009). Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 458, doi:10.1038/nature07670
- Schütz, M., Gafner, J. (1993). Sluggish alcoholic fermentation in relation to alterations of the glucose-fructose ratio. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 15, 73-78
- Sedlak, M., Ho, N. W. (2004). Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast* 21, 671-684
- Sipiczki, M. (2008). Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Research* 8, 996-1007
- Sousa-Dias, S., Gonçalves, T., Leyva, J. S., Peinado, J. M., Loureiro-Dias, M. C. (1996). Kinetics and regulation of fructose and glucose transport systems are responsible for fructophily in *Zygosaccharomyces bailii*. *The Journal of Microbiology* 142, 1733-1738
- Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M. P., Voordeckers, K., Verstrepen, K. J. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews* 38, 947-995
- Subtil, T., Boles, E. (2012). Competition between pentose and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* 5, 14
- Sun, L., Zeng, X., Yan, C., Sun, X., Gong, X., Rao, Y., Yan, N. (2012). Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature* 490, 361-366
- Tachibana, C., Biddick, R., Law, G L., Young, E. T. (2007). A poised initiation complex is activated by *SNF1*. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 37308-37315
- Thevelein, J. M., de Winde, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 33, 904-918
- Thomas, D. S., Rose, A. H. (1979). Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid-composition. *Archives of Microbiology* 122, 49-55
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Wigler, M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-287
- Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., Querol, A. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 134, 237-243
- Uden, N. V. (1967). Transport-limited fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* and its competitive inhibition. *Archives of Microbiology* 58, 155-168
- Varela, C., Cardenas, J., Melo, F., Agosin, E. (2005). Quantitative analysis of wine yeast gene expression profiles under winemaking conditions. *Yeast* 22, 369-383
- Verwaal, R., Paalman, J. W., Hogenkamp, A., Verkleij, A. J., Verrips, C. T., Boonstra, J. (2002). HXT5 expression is determined by growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19, 1029-1038

- Walker, M. E., Nguyen, T. D., Liccioli, T., Schmid, F., Kalatzis, N., Sundstrom, J. F., Gardner, J. M., Jiranek, V. (2014). Genome-wide identification of the Fermentom; genes required for successful and timely completion of wine-like fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 15, 552
- Walsh, M. C., Smits, H. P., Scholte, M., van Dam, K. (1994). Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *Journal of Bacteriology* 176, 953-958
- Wang, Q. M., Liu, W. Q., Liti, G., Wang, S. A., Bai, F. Y. (2012). Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Molecular Ecology* 21, 5404-5417
- Wendell, D. L., Bisson, L. F. (1994). Expression of high-affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. *Journal of Bacteriology* 176, 3730-3737
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P., Boles, E. (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 464, 123-128
- Wisedchaisri, G., Park, M. S., Iadanza, M. G., Zheng, H., Gonen, T. (2014). Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein XylE. *Nature Communications* 5, 4521
- www.worthington-biochem.com/index/manual.html
- Ye, L., Berden, J. A., van Dam, K., Kruckeberg, A. L. (2001). Expression and activity of the Hxt7 high-affinity hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18, 1257-1267
- You, K. M., Rosenfield, C.-L., Knipple, D. C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1499-1503
- Young, E. T., Dombek, K. M., Tachibana, C., Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *Journal of Biological Chemistry* 278, 26146-26158
- Yun, C. W., Tamaki, H., Nakayama, R., Yamamoto, K., Kumagai, H. (1997). G-protein coupled receptor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240, 287-292
- Zinnai, A., Venturi, F., Sanmartin, C., Quartacci, M. F., Andrich, G. (2013). Kinetics of D-glucose and D-fructose conversion during the alcoholic fermentation promoted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 115, 43-49
- Zuzuarregui, A., Monteoliva, L., Gil, C., del Olmo, M. (2006). Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 836-847

8 Anhang

Tabelle 16: OD₅₉₀-Werte (Mittelwert und Standardabweichung) während des Wachstums der Stämme 16.1, 54.41, Fermichamp[®], Fermivin[®], HL77 und HL78 im Sabouraud-Medium ohne Ethanol.

Stamm		Tag					
		0	1	4	7	10	14
		15 °C					
16.1	MW	0,00	0,06	6,50	9,10	9,00	9,40
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,30
54.41	MW	0,00	0,07	2,10	6,70	6,80	6,80
	STABW	0,00	0,00	0,40	0,10	0,30	0,30
Fermichamp [®]	MW	0,00	0,09	5,40	8,00	7,80	8,50
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,00	0,60	0,40
Fermivin [®]	MW	0,00	0,11	8,60	10,10	10,10	10,40
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,10	0,10	0,30
HL77	MW	0,00	0,12	8,10	9,40	10,10	10,90
	STABW	0,00	0,00	0,40	0,30	1,30	1,00
HL78	MW	0,00	0,06	7,60	9,10	8,80	9,20
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,10	0,60	0,30
		20 °C					
16.1	MW	0,00	0,31	7,50	7,60	7,60	7,90
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,10
54.41	MW	0,00	0,23	5,30	6,00	6,10	8,30
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,30	0,70	0,10
Fermichamp [®]	MW	0,00	0,22	5,70	6,40	7,00	8,20
	STABW	0,00	0,00	0,70	0,00	0,00	0,30
Fermivin [®]	MW	0,00	0,20	7,70	7,90	7,90	8,60
	STABW	0,00	0,00	0,40	0,40	0,40	0,60
HL77	MW	0,00	0,18	5,50	6,80	7,50	7,80
	STABW	0,00	0,00	0,40	0,30	1,30	0,00
HL78	MW	0,00	0,22	6,90	7,40	7,60	9,20
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,00	0,80	0,30

Tabelle 17: OD₅₉₀-Werte (Mittelwert und Standardabweichung) während des Wachstums der Stämme 16.1, 54.41, Fermichamp[®], Fermivin[®], HL77 und HL78 im Sabouraud-Medium 1,0 Vol% Ethanol.

Stamm		Tag					
		0	1	4	7	10	14
		15 °C					
16.1	MW	0,00	0,07	7,80	9,50	9,10	9,30
	STABW	0,00	0,00	1,10	0,10	0,10	1,00
54.41	MW	0,00	0,07	3,30	7,50	7,10	6,60
	STABW	0,00	0,00	1,30	0,10	0,10	0,80
Fermichamp [®]	MW	0,00	0,10	5,70	8,20	7,70	8,20
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,00	0,10	0,30
Fermivin [®]	MW	0,00	0,10	9,80	9,70	8,80	9,40
	STABW	0,00	0,00	1,40	0,40	0,30	0,30
HL77	MW	0,00	0,09	8,50	9,10	8,80	9,40
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,30
HL78	MW	0,00	0,06	8,40	9,40	9,00	9,10
	STABW	0,00	0,00	0,60	0,30	0,60	0,40
		20 °C					
16.1	MW	0,00	0,27	7,40	7,80	8,70	8,80
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,00	1,00	0,00
54.41	MW	0,00	0,24	5,10	5,70	6,00	7,30
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,10	0,60	0,40
Fermichamp [®]	MW	0,00	0,22	5,30	6,50	6,60	7,10
	STABW	0,00	0,00	0,70	0,10	0,30	0,10
Fermivin [®]	MW	0,00	0,18	7,70	8,60	8,60	9,60
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,00	1,10	0,30
HL77	MW	0,00	0,21	5,20	6,80	6,80	8,50
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,00	0,80	1,00
HL78	MW	0,00	0,24	7,20	8,40	9,20	10,20
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,30	1,10	0,80

Tabelle 18: OD₅₉₀-Werte (Mittelwert und Standardabweichung) während des Wachstums der Stämme 16.1, 54.41, Fermichamp[®], Fermivin[®], HL77 und HL78 im Sabouraud-Medium mit 5,0 Vol% Ethanol.

Stamm		Tag					
		0	1	4	7	10	14
		15 °C					
16.1	MW	0,00	0,06	4,30	8,90	9,30	9,50
	STABW	0,00	0,00	0,40	0,40	0,70	0,70
54.41	MW	0,00	0,08	2,60	7,10	7,10	7,10
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,10	0,40	0,40
Fermichamp [®]	MW	0,00	0,10	4,80	7,70	7,50	8,30
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,10	0,10	0,40
Fermivin [®]	MW	0,00	0,10	7,50	9,10	8,60	8,60
	STABW	0,00	0,00	0,70	0,10	0,00	0,00
HL77	MW	0,00	0,10	6,90	7,90	8,00	10,30
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,10	0,60	3,00
HL78	MW	0,00	0,07	5,60	9,00	8,40	9,00
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30
		20 °C					
16.1	MW	0,00	0,23	7,30	8,00	8,40	8,70
	STABW	0,00	0,00	0,70	0,00	0,60	0,70
54.41	MW	0,00	0,24	4,80	5,50	5,50	8,00
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,40	0,10	0,60
Fermichamp [®]	MW	0,00	0,20	5,00	6,40	7,10	8,30
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,30	0,40	0,70
Fermivin [®]	MW	0,00	0,16	8,10	8,10	8,20	8,70
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,10
HL77	MW	0,00	0,17	5,60	6,60	7,10	8,50
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,60	0,10	0,40
HL78	MW	0,00	0,16	7,00	8,00	8,30	9,10
	STABW	0,00	0,00	0,60	0,30	0,10	0,10

Tabelle 19: OD₅₉₀-Werte (Mittelwert und Standardabweichung) während des Wachstums der Stämme 16.1, 54.41, Fermichamp[®], Fermivin[®], HL77 und HL78 im Sabouraud-Medium mit 10,0 Vol% Ethanol.

Stamm		Tag					
		0	1	4	7	10	14
		15 °C					
16.1	MW	0,00	0,08	0,80	6,30	7,60	7,10
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,40
54.41	MW	0,00	0,09	0,90	5,60	6,90	7,00
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,60
Fermichamp [®]	MW	0,00	0,09	1,90	5,85	7,30	7,50
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,10	0,10	0,10
Fermivin [®]	MW	0,00	0,07	1,35	6,95	8,30	8,40
	STABW	0,00	0,00	0,20	0,40	0,10	0,60
HL77	MW	0,00	0,08	0,45	6,10	6,70	7,80
	STABW	0,00	0,00	0,20	0,00	0,10	0,00
HL78	MW	0,00	0,08	0,60	6,25	7,10	7,60
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,10	0,10	0,30
		20 °C					
16.1	MW	0,00	0,16	5,10	6,90	6,90	6,40
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,40	0,40	0,60
54.41	MW	0,00	0,13	3,50	5,50	5,50	7,60
	STABW	0,00	0,00	0,40	0,10	0,10	0,30
Fermichamp [®]	MW	0,00	0,14	4,00	5,70	6,30	7,20
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,40	1,30	0,80
Fermivin [®]	MW	0,00	0,13	5,10	7,20	7,20	7,30
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	1,00
HL77	MW	0,00	0,12	3,40	5,70	5,70	6,10
	STABW	0,00	0,00	0,30	0,10	0,10	0,40
HL78	MW	0,00	0,09	5,60	6,60	6,90	7,00
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,30	0,70	0,80

Tabelle 20: OD₅₉₀-Werte (Mittelwert und Standardabweichung) während des Wachstums der Stämme 16.1, 54.41, Fermichamp[®], Fermivin[®], HL77 und HL78 im Sabouraud-Medium mit 15,0 Vol% Ethanol.

Stamm		Tag					
		0	1	4	7	10	14
		15 °C					
16.1	MW	0,00	0,08	0,13	0,26	2,20	6,50
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,20	2,00	0,40
54.41	MW	0,00	0,07	0,15	0,68	3,70	6,50
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,50	1,60	0,10
Fermichamp [®]	MW	0,00	0,09	0,24	1,70	5,25	6,60
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,70	0,60	0,60
Fermivin [®]	MW	0,00	0,10	0,12	0,11	0,09	0,31
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HL77	MW	0,00	0,08	0,11	0,10	0,09	0,96
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,20
HL78	MW	0,00	0,10	0,11	0,10	0,16	4,80
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60
		20 °C					
16.1	MW	0,00	0,08	0,18	0,96	4,50	5,80
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,90	0,40	0,30
54.41	MW	0,00	0,09	0,12	0,65	4,00	5,40
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,60
Fermichamp [®]	MW	0,00	0,09	0,22	1,85	3,80	5,10
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,40	0,30	0,40
Fermivin [®]	MW	0,00	0,07	0,10	0,11	0,11	0,50
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40
HL77	MW	0,00	0,09	0,12	0,11	0,11	3,40
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,10
HL78	MW	0,00	0,08	0,12	0,11	0,12	1,90
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10

Tabelle 21: Herkunft aller im Laufe dieser Arbeit zur Cluster-Analyse herangezogener Stämme mit Acc. No. der verwendeten Sequenzen.

Spezies/Stamm	Eigenschaften/Habitat/ geographische Herkunft	Acc. No.		
		Hxt3p	Hxk1p	Hxk2p
<i>S. cerevisiae</i>				
16.1*	Weinhefe, Deutschland	siehe 8.2	siehe 8.2	siehe 8.2
29 (ATCC 48427)*	Weinhefe, Deutschland	NP_010632 ^a	EEU04176 ^a	x
33 (ATCC 48428)*	Weinhefe, Deutschland	NP_010632 ^a	AEP68300 ^a	x
54.41*	Weinhefe, Deutschland	LN651378 ^a	EGA75150 ^a	CAY79521 ^a
72 (CBS 429)*	Weinhefe, Deutschland	LN651378	AEP68300 ^a	NP_011261 ^a
73*	Weinhefe, Griechenland	LN651378 ^a	EGA75150 ^a	NP_011261 ^a
101 (ATCC 712)*	Weinhefe, Deutschland	NP_010632 ^a	AEP68293 ^a	x
3211-1*	Weinhefe, Deutschland	siehe 8.2	siehe 8.2	siehe 8.2
596*	Weinhefe, Deutschland	ABW76627 ^a	siehe 8.2	siehe 8.2
657 (SIHA 4 [®])*	Kommerzielle Sektheffe, Deutschland	LN651378 ^a	siehe 8.2	CAY79521 ^a
642 (Lalvin DV10 [®])*	Kommerzielle Wein-/Sektheffe, Frankreich	LN651378 ^a	AEP68300 ^a	NP_011261 ^a
Fermivin [®] (INRA 7013)*	Kommerzielle Weinhefe, Frankreich	siehe 8.2	siehe 8.2	CAY79521 ^a
Fermichamp [®] (INRA 67J)*	Kommerzielle Weinhefe, Frankreich	NP_010632 ^a	AEP68300 ^a	x
VL3 [®]	Kommerzielle Weinhefe, Frankreich	LN651378 ^a	siehe 8.2	CAY79521 ^a
Lalvin QA23 [®]	Kommerzielle Weinhefe, Frankreich	x	x	EGA86979
Lalvin EC1118 [®]	Kommerzielle Wein-/Sektheffe, Frankreich	x	EGA83051	x
UCD2031	Kommerzielle Weinhefe, Frankreich	CAY78845	CAY79505	CAY79521
UCD939	Weinhefe, Italien	ABW76627	x	x
AWRI796 [®]	Kommerzielle Weinhefe, Australien	ABW76625	x	x
DBVPG1106	Weintrauben-Isolat, Australien	NP_010632 ^a	EGA75150	x
VIN13 [®]	Kommerzielle Weinhefe, Südafrika	x	x	x
QFPT32	Weintrauben-Isolat, China	x	AEP68293	x
SH17-1	Weinhefe, China	x	AEP68270	x
L-1374	Weinhefe, Chile	**	AEP68300 ^a	NP_011261 ^a
BC187	Weinhefe, USA	NP_010632 ^a	NP_116711 ^a	NP_011261 ^a
RM11-1a	Laborstamm, USA	x	EDV09895	x
S288c	Laboratorstamm, Feigen-Isolat	NP_010632	NP_116711	NP_011261
SK1	Laboratorstamm, Boden-Isolat	**	***	NP_011261 ^a
Y55	Laboratorstamm, Weintrauben-Isolat	**	AEP68300 ^a	NP_011261 ^a
156*	Bierhefe, DE	x	x	siehe 8.2
DSM 70449 ^T (CBS1171)*	Bierhefe, Niederlande	LN651379	EGA75150 ^a	x
FostersB [®]	Bierhefe, Dänemark/Australien	EGA59181	EGA58845	x
FostersO [®]	Bierhefe, Dänemark/Australien	EGA62869	x	x
NCYC361	Bier-Isolat, Irland	**	AEP68300 ^a	NP_011261 ^a
Kyokai No.7 [®] (NBRC 101557)	Sakehefe, Japan	GAA22565	x	x
K11	Sakehefe, Japan	Siehe Liti <i>et al.</i> , 2009	x	x

Spezies/Stamm	Eigenschaften/Habitat/geographische Herkunft	Acc. No.		
		Hxt3p	Hxk1p	Hxk2p
YS9	Bäckerhefe, Singapur	NP_010632 ^a	AEP68270 ^a	NP_011261 ^a
Y12	Palmweinhafe, Elfenbeinküste	**	AEP68270 ^a	NP_011261 ^a
YS2	Bäckerhefe, Australien	NP_010632 ^a	AEP68300 ^a	NP_011261 ^a
DBVPG1373	Boden-Isolat, Niederlande	**	AEP68300 ^a	NP_011261 ^a
YPS128	Boden-Isolat, USA	**	AEP68270 ^a	NP_011261 ^a
AS2.381	Papiermühle-Isolat, Russland	x	AEP68304	x
AS2.521	Pflanzliches Isolat	x	AEP68300	x
P8-1	Apfel-Isolat, China	x	AEP68277	x
BYC1	Eichenrinde-Isolat, China	x	AEP68276	x
SHM4	Baumrinde-Isolat, China	x	AEP68282	x
AS2	Baumrinde-Isolat, China	x	AEP68306	x
YPS606	Eichenrinde-Isolat, USA	**	AEP68270 ^a	NP_011261 ^a
UWOPS05-217.3	Palmen-Isolat, Malaysia	**	AEP68270 ^a	NP_011261 ^a
UWOPS05-227.2	<i>Trigona</i> spp-Isolat, Malaysia	**	AEP68270 ^a	NP_011261 ^a
JF1	Holz-Isolat, China	x	AEP68312	x
HNG26	Holz-Isolat, China	x	AEP68314	x
UWOPS83-787.3	<i>Opuntia stricta</i> -Isolat, Bahamas	**	AEP68312 ^a	NP_011261 ^a
UWOPS87-2421	<i>Opuntia megacantha</i> -Isolat, Hawaii	**	AEP68312 ^a	NP_011261 ^a
JAY291	unbekannt	x	EEU04176	x
YJM975	Klinisches Isolat, Italien	NP_010632 ^a	AEP68300 ^a	NP_011261 ^a
YJM978	Klinisches Isolat, Italien	NP_010632 ^a	AEP68300 ^a	NP_011261 ^a
YJM981	Klinisches Isolat, Italien	NP_010632 ^a	AEP68300 ^a	NP_011261 ^a
YJM993	Klinisches Isolat, Italien	AHY75316	x	x
YJM789	Klinisches Isolat, USA	x	EDN59204	x
378604X	Klinisches Isolat, UK	NP_010632 ^a	EEU04176 ^a	NP_011261 ^a
273614N	Klinisches Isolat, UK	NP_010632 ^a	EDN59204 ^a	NP_011261 ^a
DBVPG6765	unbekannt	NP_010632 ^a	AEP68300 ^a	EGA86979 ^a
<i>S. kudriavzevii</i> IFO 1802	Blatt-Isolat, Japan	EJT44694	x	EJT42730
<i>S. kudriavzevii</i> NCYC 3518*	Bierhefe, Europa	x	siehe 8.2	x
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> VIN7 [®]	Kommerzielle Weinhefe, Südafrika	EHN07391	EHN07391	EHN02544
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i> 3211-2*	Weinhefe, Deutschland	EHN07391 ^a	siehe 8.2	x
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i> CBS 8614*	Cidre-Isolat, Frankreich	x	siehe 8.2	x
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. bayanus</i> VIN13 [®]	Kommerzielle Weinhefe, Südafrika	x	x	EGA78968
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> x <i>S. bayanus</i> HL78*	Weinhefe, Deutschland	EHN07391 ^a	siehe 8.2	CAY79521 ^a
<i>S. pastorianus</i> NCYC 529*	Bierhefe, Europa	x	siehe 8.2	x
<i>S. pastorianus</i> DSM 6580*	Bierhefe, Europa	x	x	siehe 8.2

[†] Typstamm; x nicht untersucht; ^a analog zur ursprünglichen Acc. No.; *im Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg Universität Mainz sequenzierte und hinterlegte Stämme.; **Sequenzen hinteregt unter <http://www.yeastrc.org/g2p/phenomeviewProtein.do?orfName=YDR345C&listing=HXT3+%2F+YDR345C>; ***Sequenzen hinterlegt unter <http://www.yeastrc.org/g2p/phenomeviewProtein.do?orfName=YFR053C&listing=HXK1+%2F+YFR053C>

Tabelle 22: Zucker-Konzentration [g/l] und OD₆₀₀-Werte während des Wachstums der Stämme Fermichamp[®], Fermivin[®], 54.41, 33 und HL78 im B-Medium. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Stamm		Tag								
		0	5	6	9	11	13	16	19	22
Fermichamp [®]	MW Glc	102,77	88,52	85,93	75,91	60,80	42,49	9,20	0,09	0,00
	STABW	0,00	5,50	6,72	3,54	7,45	10,14	3,85	0,03	0,00
	MW Fru	103,45	93,45	91,72	84,50	77,81	65,64	23,43	1,91	0,09
	STABW	0,00	5,53	7,99	0,98	6,64	13,52	7,44	0,79	0,05
	MW OD	0,00	0,01	0,06	2,08	4,55	6,18	7,73	8,55	8,38
	STABW	0,00	0,01	0,08	1,05	0,55	0,51	0,52	0,47	0,03
Fermivin [®]	MW Glc	101,33	88,38	77,73	33,34	21,33	7,08	0,23	0,02	0,00
	STABW	2,49	2,17	4,32	6,58	5,06	1,56	0,22	0,03	0,00
	MW Fru	104,03	94,47	91,57	65,93	55,70	42,19	10,46	1,84	0,45
	STABW	1,00	3,51	1,81	1,61	5,60	2,46	3,51	1,67	0,40
	MW OD	0,00	0,71	2,92	6,28	7,24	8,30	8,28	8,57	7,96
	STABW	0,00	0,52	0,31	0,27	0,70	0,89	1,32	1,22	0,77
54.41	MW Glc	100,61	91,98	86,79	67,41	40,50	12,18	1,41	0,01	0,00
	STABW	3,05	11,60	21,37	19,48	20,15	7,21	1,92	0,01	0,01
	MW Fru	104,32	96,93	94,76	83,37	65,16	28,43	6,87	0,07	0,01
	STABW	1,23	9,22	17,21	14,88	21,21	11,68	7,49	0,10	0,01
	MW OD	0,00	0,70	1,63	3,67	4,80	6,52	7,94	7,68	7,91
	STABW	0,00	0,96	2,18	1,49	2,18	1,05	0,14	0,00	0,33
33	MW Glc	100,61	91,11	85,93	44,87	16,75	1,81	0,01	0,00	0,00
	STABW	3,05	10,38	7,94	16,18	1,47	1,10	0,01	0,01	0,00
	MW Fru	104,32	96,06	94,32	76,59	57,46	25,82	0,94	0,04	0,01
	STABW	1,23	12,91	10,45	3,20	5,66	4,67	0,15	0,06	0,01
	MW OD	0,00	0,22	1,38	4,58	6,31	7,01	6,77	6,93	6,82
	STABW	0,00	0,04	0,33	0,41	1,82	0,84	1,94	1,03	0,88
HL78*	MW Glc	102,77	72,54	63,91	33,94	2,59	0,00	0,02	0,01	0,01
	STABW									
	MW Fru	103,45	85,20	80,85	67,55	25,91	4,43	0,20	0,02	0,01
	STABW									
	MW OD	0,00	3,50	4,54	5,84	7,78	7,80	7,90	8,10	8,34
	STABW									

*aus technischen Gründen nur eine Kultur gemessen

Tabelle 23: Zucker-Konzentration [%] und OD₆₀₀-Werte während des Wachstums der Stämme Fermichamp[®], Fermivin[®], 54.41, 33 und HL78 im Stress-Medium 1. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Stamm		Tag								
		0	2	5	6	9	11	13	16	19
Fermichamp [®]	MW Glc	100,00	87,56	51,39	37,06	8,40	2,27	0,84	0,08	0,02
	STABW	0,00	7,10	1,20	2,76	1,86	0,16	0,30	0,14	0,04
	MW Fru	100,00	99,33	69,70	58,82	34,88	23,10	13,12	3,29	0,47
	STABW	0,00	6,26	1,84	2,10	0,89	0,61	0,67	0,22	0,34
	MW OD	0,00	0,01	1,26	1,56	2,17	2,23	2,57	2,38	2,95
	STABW	0,00	0,00	0,07	0,17	0,22	0,31	0,04	0,35	0,37
Fermivin [®]	MW Glc	100,00	77,08	17,36	10,42	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00
	STABW	0,00	5,51	3,18	2,08	1,20	0,00	0,00	0,00	0,05
	MW Fru	100,00	82,85	52,10	43,53	20,23	11,49	6,06	1,50	0,44
	STABW	0,00	2,39	3,17	2,29	5,15	3,55	2,52	0,83	0,21
	MW OD	0,00	0,03	2,85	2,97	3,09	3,18	3,55	3,31	3,67
	STABW	0,00	0,02	0,17	0,06	0,30	0,54	0,22	0,18	0,18
54.41	MW Glc	100,00	111,25	65,00	73,75	9,37	4,69	1,56	0,00	0,00
	STABW	0,00	1,77	7,07	1,77	0,00	2,21	2,21	0,00	0,00
	MW Fru	100,00	109,14	82,23	71,32	23,00	11,58	4,44	1,11	0,14
	STABW	0,00	0,00	1,08	6,82	0,22	0,67	0,45	0,22	0,02
	MW OD	0,00	0,00	1,52	1,64	2,84	3,29	3,10	3,17	3,06
	STABW	0,00	0,00	0,09	0,11	0,13	0,03	0,20	0,13	0,24
33	MW Glc	100,00	112,50	78,75	47,50	4,69	3,12	0,00	0,00	0,16
	STABW	0,00	3,54	54,80	7,07	6,63	0,00	0,00	0,00	0,22
	MW Fru	100,00	109,90	81,35	75,13	17,13	2,86	0,79	0,63	0,05
	STABW	0,00	1,08	9,87	0,72	0,90	0,00	0,22	0,45	0,02
	MW OD	0,00	0,00	1,53	2,32	2,94	2,92	3,06	2,96	3,04
	STABW	0,00	0,00	0,02	0,03	0,15	0,09	0,14	0,06	0,06
HL78	MW Glc	100,00	79,86	67,13	54,40	4,63	0,00	0,00	0,00	0,02
	STABW	0,00	1,64	9,82	21,28	6,55	0,00	0,00	0,00	0,00
	MW Fru	100,00	90,88	86,97	78,07	31,01	11,60	2,87	0,23	0,04
	STABW	0,00	4,20	1,72	7,44	11,06	7,63	2,19	0,17	0,02
	MW OD	0,00	0,00	0,21	0,74	1,91	1,83	1,28	1,17	1,67
	STABW	0,00	0,00	0,29	0,85	0,08	0,27	0,00	0,05	0,55

Tabelle 24: Zucker-Konzentration [%] und OD₆₀₀-Werte während des Wachstums der Stämme Fermichamp[®], Fermivin[®], 54.41, 33 und HL78 im Stress-Medium 2. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Stamm		Tag								
		0	2	5	6	8	11	13	16	19
Fermichamp [®]	MW Glc	100,00	82,05	41,03	32,05	1,28	0,00	0,00	0,00	0,08
	STABW	0,00	8,01	15,54	4,44	2,22	0,00	0,00	0,00	0,08
	MW Fru	100,00	97,12	70,16	57,61	33,26	21,33	12,02	3,01	0,55
	STABW	0,00	1,15	1,25	0,41	0,52	0,31	1,08	0,64	0,16
	MW OD	0,00	0,01	1,37	1,78	2,21	2,30	2,71	2,62	2,86
	STABW	0,00	0,00	0,10	0,13	0,18	0,20	0,16	0,20	0,16
Fermivin [®]	MW Glc	100,00	76,92	21,79	14,10	11,53	6,46	0,38	0,51	0,08
	STABW	0,00	0,00	2,22	8,01	10,25	7,98	0,38	0,44	0,07
	MW Fru	100,00	79,01	52,13	40,95	19,00	9,47	4,45	1,07	0,26
	STABW	0,00	2,29	3,53	0,94	0,78	0,71	0,85	0,39	0,10
	MW OD	0,00	0,03	2,94	3,31	3,67	3,55	3,64	3,69	3,57
	STABW	0,00	0,01	0,13	0,07	0,04	0,29	0,11	0,11	0,06
54.41	MW Glc	100,00	87,04	51,85	51,89	12,96	0,00	0,00	0,00	0,00
	STABW	0,00	18,33	5,24	5,46	2,62	0,00	0,00	0,00	0,00
	MW Fru	100,00	95,23	76,97	62,34	31,74	9,85	3,01	0,52	0,05
	STABW	0,00	1,47	4,69	3,37	0,00	1,61	0,15	0,15	0,01
	MW OD	0,00	0,00	1,29	1,53	2,38	3,47	3,34	3,32	3,48
	STABW	0,00	0,00	0,02	0,08	0,16	0,21	0,16	0,10	0,07
33	MW Glc	100,00	88,89	40,74	48,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	STABW	0,00	10,48	10,48	20,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MW Fru	100,00	94,61	89,00	63,69	27,70	2,59	0,52	0,31	0,01
	STABW	0,00	1,76	9,68	0,29	0,15	0,15	0,15	0,15	0,01
	MW OD	0,00	0,00	1,24	2,28	2,82	3,18	3,13	3,11	3,17
	STABW	0,00	0,00	0,13	0,06	0,16	0,00	0,23	0,04	0,01
HL78	MW Glc	100,00	84,62	26,92	7,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MW Fru	100,00	96,60	64,61	46,60	10,60	1,85	0,34	0,07	0,01
	STABW	0,00	0,15	0,87	0,73	0,15	0,00	0,01	0,01	0,00
	MW OD	0,00	0,01	1,61	1,97	2,14	1,68	1,23	1,44	1,73
	STABW	0,00	0,00	0,16	0,28	0,40	0,06	0,02	0,02	0,33

Tabelle 25: Zucker-Konzentration [%] und OD₆₀₀-Werte während des Wachstums der Stämme Fermichamp[®], Fermivin[®], 54.41, 33 und HL78 im Stress-Medium 3. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Stamm		Tag								
		0	5	6	9	11	13	16	19	22
Fermichamp [®]	MW Glc	100,00	101,14	87,50	25,00	18,18	4,77	1,59	2,50	0,00
	STABW	0,00	1,61	8,04	7,31	4,18	0,31	1,07	1,68	0,00
	MW Fru	100,00	96,69	88,15	56,87	36,14	19,42	4,15	0,21	0,02
	STABW	0,00	2,03	6,03	3,69	1,51	0,79	0,17	0,10	0,03
	MW OD	0,00	0,30	1,17	2,14	2,53	2,24	2,87	2,81	2,60
	STABW	0,00	0,10	0,33	0,06	0,18	0,00	0,13	0,01	0,31
Fermivin [®]	MW Glc	100,00	75,79	50,94	7,52	0,70	0,73	0,00	0,00	0,00
	STABW	0,00	13,70	4,83	4,83	1,21	1,26	0,00	0,00	0,00
	MW Fru	100,00	95,90	85,59	54,93	39,36	22,79	9,69	3,01	0,89
	STABW	0,00	2,71	2,02	11,85	10,58	6,79	4,49	1,79	0,65
	MW OD	0,00	0,97	2,33	3,52	3,73	3,69	3,92	4,04	4,15
	STABW	0,00	0,57	0,83	0,17	0,35	0,29	0,20	0,51	0,64
54.41	MW Glc	100,00	93,40	78,30	18,85	8,38	3,14	0,00	0,00	0,00
	STABW	0,00	9,34	4,00	0,00	0,00	1,48	0,00	0,00	0,00
	MW Fru	100,00	107,66	85,30	44,47	26,08	13,44	3,33	0,53	0,15
	STABW	0,00	14,05	8,78	2,76	1,79	0,49	0,16	0,03	0,02
	MW OD	0,00	0,10	0,58	2,68	2,98	3,02	3,08	3,15	2,19
	STABW	0,00	0,02	0,11	0,13	0,12	0,01	0,12	0,04	0,12
33	MW Glc	100,00	92,45	92,45	29,32	6,28	0,00	0,00	0,00	0,00
	STABW	0,00	5,34	2,67	5,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MW Fru	100,00	102,17	101,04	71,47	42,63	15,86	1,15	0,06	0,02
	STABW	0,00	11,86	5,27	7,48	2,76	1,30	0,00	0,02	0,00
	MW OD	0,00	0,00	0,00	1,65	2,38	2,79	2,97	2,88	2,70
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,11	0,18	0,07	0,16	0,05	0,05
HL78	MW Glc	100,00	88,83	86,17	56,38	30,32	13,83	1,38	0,21	0,00
	STABW	0,00	2,26	1,50	16,55	24,82	13,54	1,35	0,30	0,00
	MW Fru	100,00	90,78	90,42	77,83	54,82	35,60	10,78	2,83	0,09
	STABW	0,00	4,34	0,09	8,18	16,87	18,66	11,73	3,66	0,13
	MW OD	0,00	0,01	0,04	0,64	0,96	1,43	1,85	2,11	1,86
	STABW	0,00	0,00	0,05	0,89	1,23	0,10	0,05	0,16	0,06

Tabelle 26: Zucker-Konzentration [%] und OD₆₀₀-Werte während des Wachstums der Stämme Fermichamp[®], Fermivin[®], 54.41, 33 und HL78 im Stress-Medium 4. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Stamm		Tag										
		0	6	9	11	13	16	19	22	26	30	35
Fermichamp [®]	MWGlc	100,00	99,90	95,10	66,67	46,08	19,61	1,96	0,39	0,10	0,00	0,00
	STABW	0,00	0,00	6,93	16,64	9,71	2,77	1,11	0,55	0,14	0,00	0,00
	MWFru	100,00	109,02	102,16	87,80	72,96	30,77	9,04	1,20	0,08	0,14	0,01
	STABW	0,00	0,84	0,33	18,10	25,67	1,70	0,24	0,03	0,08	0,20	0,00
	MWOD	0,00	0,03	1,00	1,63	1,59	1,94	1,90	2,05	1,96	2,32	2,23
	STABW	0,00	0,00	0,03	0,04	0,21	0,20	0,00	0,07	0,06	0,11	0,13
Fermivin [®]	MWGlc	100,00	101,96	100,98	102,94	91,18	54,90	9,80	13,73	1,57	0,00	0,00
	STABW	0,00	0,00	4,16	9,71	20,80	49,91	5,55	8,32	0,55	0,00	0,00
	MWFru	100,00	110,70	107,93	109,86	106,01	87,14	60,46	49,64	22,19	7,94	0,81
	STABW	0,00	1,19	2,38	0,68	8,50	27,03	13,77	12,07	10,84	6,03	0,71
	MWOD	0,00	0,02	0,03	0,12	0,99	2,16	2,43	2,51	2,83	2,94	3,27
	STABW	0,00	0,00	0,02	0,14	0,73	0,54	0,04	0,10	0,33	0,03	0,42
54.41	MWGlc	100,00	100,09	68,89	42,22	27,78	12,22	4,44	0,00	0,00	0,00	0,00
	STABW	0,00	0,00	15,71	12,57	4,71	4,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MWFru	100,00	89,54	65,42	52,59	39,86	27,33	12,42	3,93	0,62	0,06	0,03
	STABW	0,00	2,49	10,54	7,03	4,54	3,81	2,05	0,59	0,00	0,00	0,04
	MWOD	0,00	0,00	0,77	1,71	1,82	2,39	2,73	2,08	2,21	2,45	2,27
	STABW	0,00	0,00	0,21	0,16	0,06	0,10	0,04	0,06	0,18	0,05	0,51
33	MWGlc	100,00	96,49	96,49	79,50	52,08	5,21	2,08	2,08	1,04	0,01	0,00
	STABW	0,00	0,00	0,00	24,04	44,19	7,37	2,95	2,95	1,47	0,01	0,00
	MWFru	100,00	97,21	93,37	78,64	59,86	23,83	3,29	0,47	0,12	0,01	0,00
	STABW	0,00	0,00	0,75	8,30	8,30	2,82	1,33	0,66	0,17	0,00	0,00
	MWOD	0,00	0,00	0,12	1,48	2,10	2,34	2,42	2,55	2,67	3,00	2,65
	STABW	0,00	0,00	0,04	0,31	0,20	0,03	0,08	0,04	0,01	0,40	0,16
HL78*	MWGlc	100,00	91,67	33,33	18,75	14,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	STABW											
	MWFru	100,00	103,05	76,53	49,77	30,05	5,54	0,35	0,03	0,00	0,01	0,00
	STABW											
	MWOD	0,00	0,01	0,29	1,06	1,26	2,62	2,50	2,54	2,50	2,52	2,32
	STABW											

*aus technischen Gründen nur eine Kultur gemessen

Tabelle 27: Zucker-Konzentration [%] und OD₆₀₀-Werte während des Wachstums des Stammes HL78 im Stress-Medium 5. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Stamm		Tag										
		0	18	19	21	22	27	29	32	36	39	41
HL78	MWGlc	100,00	100,00	99,66	97,61	95,11	94,43	91,70	10,80	4,91	2,94	2,94
	STABW	0,00	0,96	0,80	5,62	0,16	3,37	1,12	6,94	1,39	4,16	4,16
	MWFru	100,00	94,92	90,16	87,67	84,15	81,86	75,72	36,66	0,00	0,00	0,00
	STABW	0,00	5,17	5,09	5,08	3,40	0,00	8,52	13,09	0,00	0,00	0,00
	MWOD	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,33	2,91	4,84	5,11	5,32
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,22	1,04	0,21	0,37	0,08

Tabelle 28: Zucker-Konzentration [%] und OD₆₀₀-Werte während des Wachstums des Stammes Fermichamp[®] im Stress-Medium 6. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Stamm		Tag													
		0	19	21	25	27	31	35	38	41	45	48	52	56	60
Fermichamp [®]	MWGlc	100,00	104,28	103,54	103,83	88,95	86,75	58,59	42,18	16,56	10,19	1,27	0,00	0,00	0,00
	STABW	0,00	1,04	4,17	2,09	17,71	14,22	25,22	19,61	23,42	14,41	1,80	0,00	0,00	0,00
	MWFru	100,00	99,93	100,79	99,90	100,94	101,31	81,86	61,15	38,35	22,00	7,19	1,32	0,17	0,05
	STABW	0,00	0,53	0,06	0,57	0,94	1,57	20,23	12,80	21,93	11,05	9,89	1,87	0,24	0,07
	MWOD	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,03	1,01	1,50	1,73	1,92	1,85	1,96	1,96	2,10
	STABW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,94	0,50	0,41	0,58	0,39	0,28	0,19	0,08

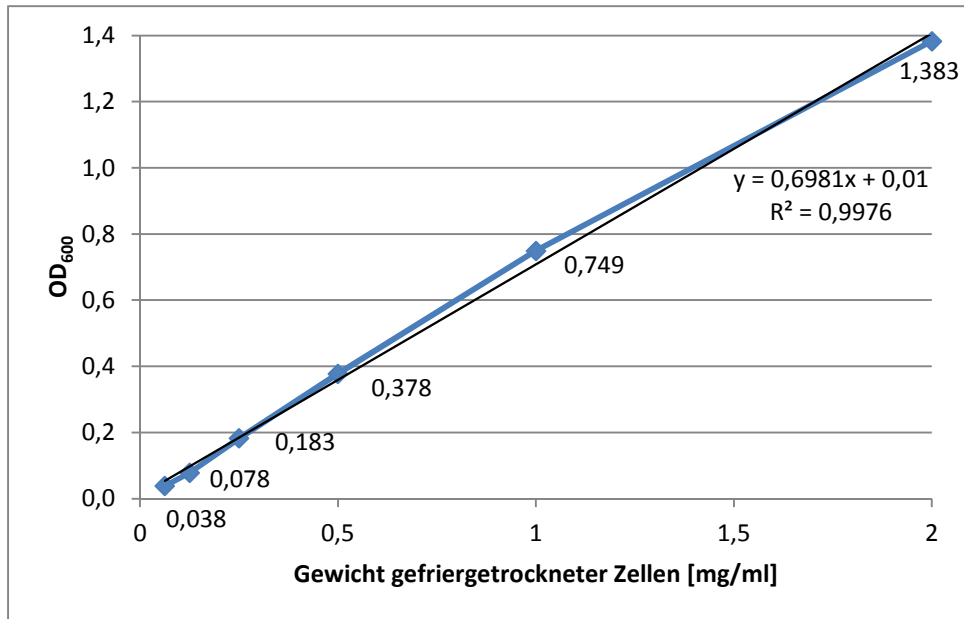


Abbildung 24: Abhängigkeit der OD₆₀₀ vom Gewicht gefriergetrockneter Zellen [mg/ml] für *S. cerevisiae*-Stamm Fermichamp®.

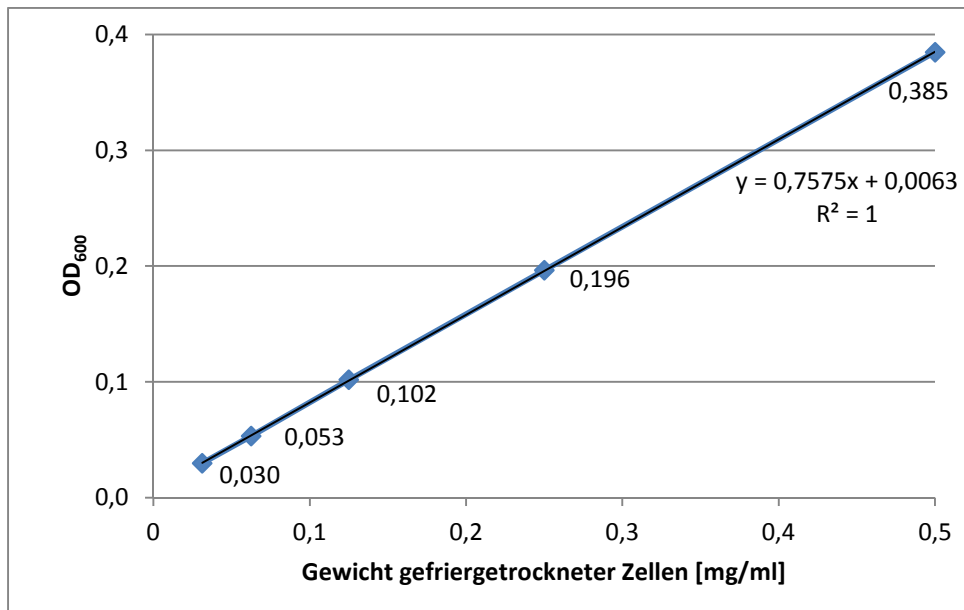


Abbildung 25: Abhängigkeit der OD₆₀₀ vom Gewicht gefriergetrockneter Zellen [mg/ml] für *S. cerevisiae*-Stamm Fermivin®.

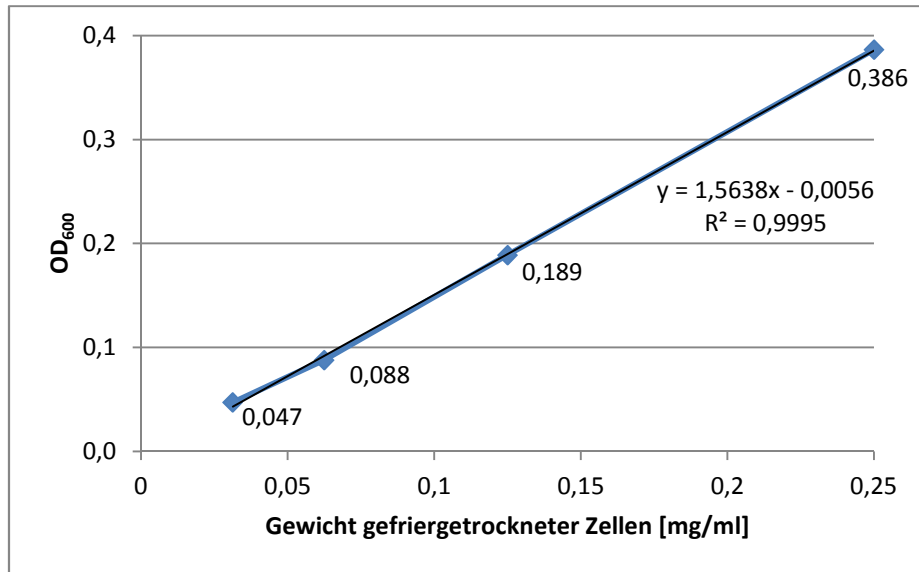


Abbildung 26: Abhängigkeit der OD₆₀₀ vom Gewicht gefriergetrockneter Zellen [mg/ml] für *S. cerevisiae*-Stamm 54.41.

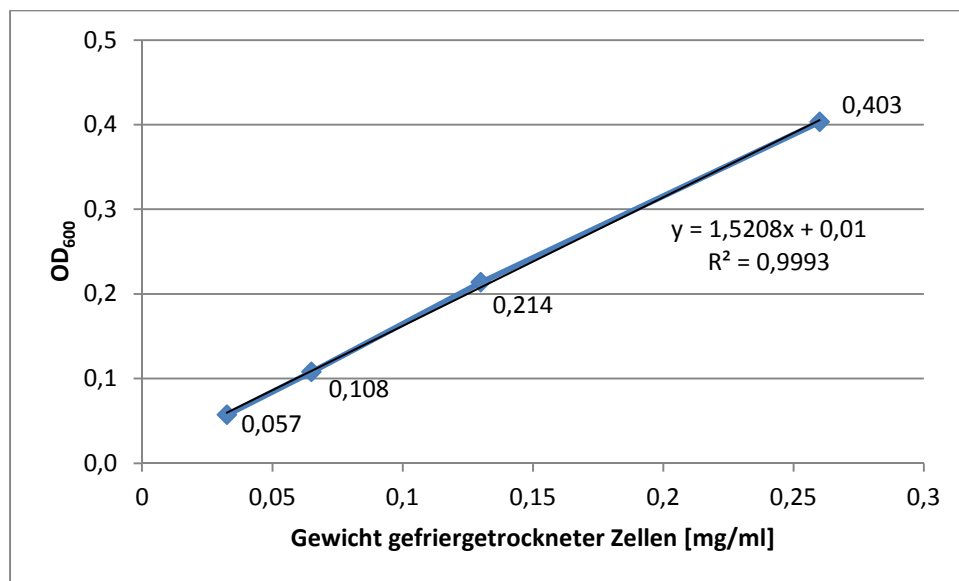


Abbildung 27: Abhängigkeit der OD₆₀₀ vom Gewicht gefriergetrockneter Zellen [mg/ml] für *S. cerevisiae*-Stamm 33.

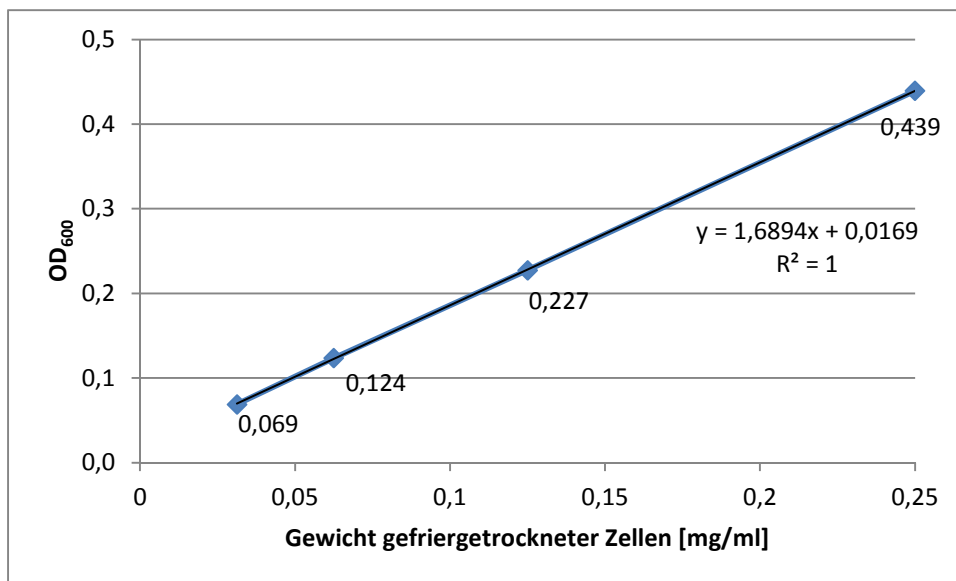


Abbildung 28: Abhängigkeit der OD₆₀₀ vom Gewicht gefriergetrockneter Zellen [mg/ml] für *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus*-Stamm HL78.

Tabelle 29: Ergebnisse der Zuckeraufnahme-Messungen des Stammes Fermichamp®.

Konz.	Glucose [nmol/mg]*						Fructose [nmol/mg]*					
					MW	STABW					MW	STABW
0,1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01
0,2	0,04	0,03	0,01	0,03	0,03	0,01	0,03	0,05	0,02	0,03	0,03	0,01
0,5	0,06	0,07	0,08	0,10	0,08	0,01	0,08	0,06	0,05	0,06	0,06	0,01
1,0	0,17	0,07	0,06	0,08	0,09	0,05	0,10	0,13	0,10	0,05	0,09	0,04
2,0	0,14	0,12	0,21	0,30	0,19	0,08	0,31	0,37	0,24	0,17	0,27	0,09
3,0	0,34	0,43	0,25	0,41	0,36	0,08	0,06	0,42	0,35	0,33	0,29	0,16
5,0	0,81	0,53	0,28	0,14	0,44	0,29	0,72	0,62	0,50	0,36	0,55	0,16
10,0	0,63	0,71	2,01	1,43	1,19	0,66	0,99	1,53	0,76	2,30	1,40	0,68
5,0 4% EtOH	0,37	0,37	0,49	0,26	0,37	0,09	0,25	0,22	0,14	0,16	0,19	0,05
5,0 4% EtOH 24h	2,00	1,53	1,40	1,77	1,68	0,27	5,25	1,89	1,45	4,99	3,39	2,00
5,0 10% EtOH 24h	1,80	1,26	1,50	0,51	1,27	0,55	1,03	2,51	1,12	1,90	1,64	0,70

*bezieht sich auf Gewicht gefriergetrockneter Zellen

Tabelle 30: Ergebnisse der Zuckeraufnahme-Messungen des Stammes Fermivin®.

Konz.	Glucose [nmol/mg]*						Fructose [nmol/mg]*					
	MW		STABW		MW		STABW		MW		STABW	
0,1	0,04	0,03	0,02	0,03	0,03	0,01	0,04	0,05	0,03	0,03	0,04	0,01
0,2	0,08	0,09	0,07	0,06	0,07	0,01	0,06	0,05	0,09	0,09	0,07	0,02
0,5	0,18	0,18	0,20	0,25	0,20	0,03	0,16	0,18	0,17	0,17	0,17	0,00
1,0	0,37	0,34	0,51	0,48	0,43	0,08	0,21	0,19	0,13	0,22	0,19	0,04
2,0	0,70	0,60	0,56	0,48	0,58	0,09	0,33	0,54	0,41	0,21	0,37	0,14
3,0	0,62	0,89	0,53	0,71	0,69	0,15	0,56	0,50	0,69	0,23	0,50	0,19
5,0	1,29	1,53	0,93	0,82	1,14	0,33	0,55	0,86	0,44	0,64	0,62	0,18
10,0	1,57	0,80	1,61	1,24	1,30	0,37	0,83	0,82	0,53	0,32	0,63	0,25
5,0 4% EtOH	0,99	1,00	1,23	1,19	1,10	0,12	0,42	0,45	0,78	0,58	0,55	0,16
5,0 4% EtOH 24h	1,70	1,71	1,86	1,79	1,76	0,08	1,12	1,42	3,33	2,86	2,18	1,08
5,0 10% EtOH 24h	0,81	1,77	1,20	1,53	1,33	0,41	4,62	4,04	3,41	3,80	3,97	0,50

*bezieht sich auf Gewicht gefriergetrockneter Zellen

Tabelle 31: Ergebnisse der Zuckeraufnahme-Messungen der Stämme 54.41, 33 und HL78. Werte wurden in nmol/mg gefriergetrockneter Zellen angegeben.

Stamm		Glc	Fru	Glc 4% EtOH 24h	Fru 4% EtOH 24h
54.41		1,76	3,34	3,86	2,19
		2,56	1,48	2,24	2,25
		4,03	1,95	0,57	1,80
		1,90	6,62	2,04	2,78
	MW	2,56	3,35	2,18	2,25
	STABW	1,04	2,32	1,35	0,40
33		2,18	1,24	5,94	2,20
		2,50	1,63	5,17	2,12
		2,83	1,22	2,87	1,77
		2,55	1,11	6,11	3,77
	MW	2,52	1,30	5,02	2,46
	STABW	0,27	0,23	1,49	0,89
HL78		1,40	1,51	4,25	1,59
		0,33	2,21	3,51	1,51
		1,01	1,24	2,01	0,42
		0,85	2,26	4,22	0,72
	MW	0,90	1,80	3,50	1,06
	STABW	0,44	0,51	1,05	0,58

Tabelle 32: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes 16.1 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,141	0,084
0,2	0,205	0,096
0,5	0,343	0,136
1,0	0,510	0,180
2,0	0,610	0,306
3,0	0,672	0,366
5,0	0,691	0,501
10,0	0,872	0,676

Tabelle 33: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes 712 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,099	0,059
0,2	0,135	0,065
0,5	0,242	0,087
1,0	0,341	0,131
2,0	0,451	0,215
3,0	0,467	0,274
5,0	0,544	0,365
10,0	0,642	0,480

Tabelle 34: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes 156 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,196	0,114
0,2	0,255	0,130
0,5	0,418	0,161
1,0	0,551	0,216
2,0	0,696	0,349
3,0	0,823	0,446
5,0	0,897	0,618
10,0	0,967	0,796

Tabelle 35: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes Fermichamp® für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,131	0,051
0,2	0,174	0,069
0,5	0,271	0,086
1,0	0,381	0,097
2,0	0,430	0,196
3,0	0,494	0,229
5,0	0,546	0,318
10,0	0,582	0,485

Tabelle 36: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes Fermivin® für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,133	0,035
0,2	0,202	0,047
0,5	0,322	0,074
1,0	0,465	0,102
2,0	0,539	0,156
3,0	0,574	0,208
5,0	0,629	0,280
10,0	0,665	0,381

Tabelle 37: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes 54.41 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,084	0,054
0,2	0,184	0,057
0,5	0,354	0,081
1,0	0,513	0,130
2,0	0,647	0,220
3,0	0,707	0,299
5,0	0,838	0,398
10,0	0,927	0,590

Tabelle 38: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes 72 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,060	0,017
0,2	0,089	0,033
0,5	0,144	0,051
1,0	0,240	0,015
2,0	0,338	0,146
3,0	0,359	0,185
5,0	0,374	0,331
10,0	0,456	0,363

Tabelle 39: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes 73 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,114	0,060
0,2	0,216	0,098
0,5	0,370	0,120
1,0	0,597	0,153
2,0	0,810	0,307
3,0	0,870	0,463
5,0	1,058	0,621
10,0	1,180	0,879

Tabelle 40: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes 596 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,136	0,043
0,2	0,166	0,053
0,5	0,279	0,073
1,0	0,364	0,098
2,0	0,451	0,142
3,0	0,479	0,200
5,0	0,483	0,274
10,0	0,549	0,384

Tabelle 41: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes 642 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,184	0,079
0,2	0,266	0,141
0,5	0,440	0,189
1,0	0,673	0,243
2,0	0,858	0,374
3,0	0,911	0,568
5,0	1,080	0,879
10,0	1,202	0,990

Tabelle 42: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes 657 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,251	0,116
0,2	0,404	0,136
0,5	0,701	0,238
1,0	1,105	0,376
2,0	1,326	0,673
3,0	1,607	0,846
5,0	1,876	1,155
10,0	1,954	1,574

Tabelle 43: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes 3211-1 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,288	0,200
0,2	0,398	0,214
0,5	0,550	0,286
1,0	0,781	0,419
2,0	0,961	0,607
3,0	1,047	0,786
5,0	1,207	1,043
10,0	1,379	1,355

Tabelle 44: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes HL77 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,053	0,047
0,2	0,181	0,053
0,5	0,341	0,093
1,0	0,433	0,133
2,0	0,604	0,223
3,0	0,670	0,303
5,0	0,797	0,425
10,0	0,840	0,569

Tabelle 45: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes 3211-2 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,165	0,079
0,2	0,248	0,103
0,5	0,364	0,166
1,0	0,552	0,227
2,0	0,684	0,416
3,0	0,798	0,549
5,0	0,801	0,733
10,0	0,914	1,017

Tabelle 46: Hexokinase-Aktivität [U/mg Gesamt-Protein] des Stammes HL78 für die Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte.

Konzentration [mM]	Aktivität [U/mg Gesamt-Protein]	
	Glucose	Fructose
0,1	0,184	0,058
0,2	0,286	0,121
0,5	0,459	0,199
1,0	0,676	0,280
2,0	0,851	0,443
3,0	0,918	0,559
5,0	1,086	0,902
10,0	1,177	0,971

8.1 Nukleotidsequenzen von *HXT3*, *HXK1* und *HXK2*

*HXT3*_16.1

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTCGAATGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAAGGTGCATATGTCACCTGTGTC
 TATCTGTTGTGTTATGGTTGCCTTCGGTGGTTTTCGTTTTCGGTTGGGATACTGGTACCATTTCTGGTTTTGTGCGCCAAACTGATTTCTTGAGA
 AGATTCGGTATGAAGCATAAAGATGGTAGTTATTATTTGTCTAAGGTTAGAAGTGGTTAATTGTCTCCATTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAATTTGGGTGATATGTACGGTCGTAATAATGGGTTTGATTGTCGTTGTTGTTATCTACATCATCGGTATTATTATTTCA
 AATTGCATCCATCAACAAATGGTACCAATACTTCATCGGTAGAAATTATTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTACTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATGATTACCTTGGGTATTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ACTTCGGTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTCCATTAGGTTTGTGTTTTGCTTGGGCTTTGTTTATGATCGGTGGTATGAC
 TTTCGTTCCAGAAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATGACGAAGCAAGAGCATCTCTTCCAAAGTTAACAAAGGTTGCCCCAGAC
 CATCCATTCATTCAACAAGAGTTGGAAGTTATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAGTTGTTCACTG
 GTAAGCCGGCCATGTTTAAAGCGTACTATGATAGGTATCATGATCCAATCTCTACAACAATTGACTGGTGATAACTATTTCTTCTACTATGGTAC
 TACCGTTTTTAAACGCTGTTGGTATGAGTGATTTCTTCAAACCTCTATTGTTTTCGGTGTCGTCAACTTCTTCCACTTGTGTTCTCTGTAC
 ACCGTCGATCGTTTTGGCCGTCGTAACGTTTTGTATATAGGTGCCATCGGTATGGTCTGCTGTTATGTAGTCTACGCTTCTGTTGGTGTACCA
 GATTATGGCCAAATGGTCAAACAATGGTTCATCCAAGGGTGCGGTAACTGTATGATTGCTTTGCCTGTTCTATATTTCTGTTTGGCTAC
 YACYTGGGCTCCAATTGCTTATGTCGTRTTTCTGAAACTTTCCCATTTAGAGTCAAGCTAAGGCTATGTCTATTGCTACAGCTGCTAATTGG
 ATGTGGGTTTTCTTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTACTGGTGTCTAATACTTCTACTACGGTTACGTTTTTCATGGGCTGTATGGTTTTCG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTTACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

*HXT3*_712

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTCGAATGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAAGGTGCATATGTCACCTGTGTC
 TATCTGTTGTGTTATGGTTGCCTTCGGTGGTTTTCGTTTTCGGTTGGGATACTGGTACCATTTCTGGTTTTGTGCGCCAAACTGATTTCTTGAGA
 AGATTCGGTATGAAGCATAAAGATGGTAGTTATTATTTGTCTAAGGTTAGAAGTGGTTAATTGTCTCCATTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAATTTGGGTGATATGTACGGTCGTAATAATGGGTTTGATTGTCGTTGTTGTTATCTACATCATCGGTATTATTATTTCA
 AATTGCATCCATCAACAAATGGTACCAATACTTCATCGGTAGAAATTATTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTGCTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATGATTACCTTGGGTATTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ACTTCGGTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTCCATTAGGTTTGTGTTTTGCTTGGGCTTTGTTTATGATCGGTGGTATGAC
 TTTCGTTCCAGAAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATGACGAAGCAAGAGCATCTCTTCCAAAGTTAACAAAGGTTGCCCCAGAC
 CATCCATTCATTCAACAAGAGTTGGAAGTTATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAGTTGTTCACTG
 GTAAGCCGGCCATGTTTAAAGCGTACTATGATRGGTATCATGATCCAATCTCTACAACAATTGACTGGTGATAACTATTTCTTCTACTATGGTAC
 TACCGTTTTTAAACGCTGTTGGTATGAGTGATTTCTTCAAACCTCTATTGTTTTCGGTGTCGTCAACTTCTTCCACTTGTGTTCTCTGTAC
 ACTGTCGATCGTTTTTGGCCGTCGTAACGTTTTGATATATGGTGCCATCGGTATGGTCTGCTGTTATGTAGTCTACGCTTCTGTTGGWGTACTA
 GACTATGGCCAAATGGTSAAGGYAAYGGYTCATCCAAGGGTGCGGTAACTGTATGATTGCTTTGCCTGTTTCTATATTTCTGTTTTYGCTAC
 CACCTGGGCCCAATGCTTATGTCGTTATTTCTGAAACTTTCCCATTTAGAGTCAAGTCTAAGGCTATGTCTATTGCTACAGCTGCTAATTGG
 ATGTGGGTTTTCTTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTACTGGTGTCTAATACTTCTACTACGGTTACGTTTTTCATGGGCTGTATGGTTTTCG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTTACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_642

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTCGAATGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAGGTGCATATGTCACCTGTGTC
 TATCTGTTGTGTTATGGTTGCCCTCCGGTGGTTTTCGTTTTCCGGTGGGATACTGGTACCATTTCTGGTTTTCGTCGCCCAAACCTGATTTCTTGAGA
 AGATTCGGTATGAAGCATAAAGATGGTAGTTATTATTTGTCTAAGGTTAGAAGCTGGTTTTAATTGTCTCCATTTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAAATGGGTGATATGTACGGTCGTAAAATGGGTTTGATTGTCTGTTGTTGTTATCTACATCATCGGTATTATTATTCA
 AATTGCATCCATCAACAAATGGTACCAATACTTCATCGGTAGAATTATTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTRCTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATGRTTACCTTGGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ACTTCCGTTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTGTTTTGGCTGGGCTTTGTTTATGATCGGTGGTATGAC
 TTTCCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCTCTTCCAAAGTTAACAAGGTTGCCCCAGAC
 CATCCATTCATCAACAAGAGTTGGAAGTTATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAGTTGTTCACTG
 GTAAGCCGGCCATGTTTTAAGCGTACTATGATAGGTATCATGATCCAATCTCTACAACAATTGACTGGTGATAAATTTCTTCTACTATGGTAC
 TACCGTTTTTAAACGCTGTTGGTATGAGTGATTTCTCGAACTTCTATTGTTTTCCGGTGTCTCAACTTCTTCTCCACTGTTGTTCTCTGTAC
 ACCGTCGACCGTTTTGGCCGTCGTAACGTTTGTATGTATGGTGCCGTCGGTATGGTCTGCTGTTATGTAGTCTACGTTCTGTTGGAGTCACCA
 GACTATGGCCAAATGGTGAAGGYAAYGGYTCATCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATTGTCTTTGCCGTTTTCTATATTTTCTGTTTTGCTAC
 TACYTGGGCTCCAATTGCTTATGTTGTRTTTTCTGAACTTTCCCAATTGAGAGTCAAGCTAAGGCTATGTCTATTGCTACAGCTGCTAACTGG
 ATGTGGGGTTTTCTTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTACTGGTGCTATTAACCTTCTACTACGGTTACGTTTTTCATGGGCTGTATGGTTTTCG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_29/33

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTCGAATGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAGGTGCATATGTCACCTGTGTC
 TATCTGTTGTGTTATGGTTGCCCTCCGGTGGTTTTCGTTTTCCGGTGGGATACTGGTACCATTTCTGGTTTTCGTCGCCCAAACCTGATTTCTTGAGA
 AGATTCGGTATGAAGCATAAAGATGGTAGTTATTATTTGTCTAAGGTTAGAAGCTGGTTAATTGTCTCCATTTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAAATGGGTGATATGTACGGTCGTAAAATGGGTTTGATTGTCTGTTGTTGTTATCTACATCATCGGTATTATTATTCA
 AATTGCATCCATCAACAAATGGTACCAATATTTTCATCGGTAGAATTATTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTACTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATGATTACCTTGGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ACTTCCGTTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTGTTTTGGCTGGGCTTTGTTTATGATCGGTGGTATGAC
 TTTCCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCTCTTCCAAAGTTAACAAGGTTGCCCCAGAC
 CATCCATTCATCAACAAGAGTTGGAAGTTATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAGTTGTTCACTG
 GTAAGCCGGCCATGTTTTAAGCGTACTATGATGGGTATCATGATCCAATCTCTACAACAATTGACTGGTGATAAATTTCTTCTACTATGGTAC
 TACCGTTTTTAAACGCTGTTGGTATGAGTGATTTCTTCGAACTTCTATTGTTTTCCGGTGTCTCAACTTCTTCTACTGTTGTTGTTTTGTAC
 ACTGTCCGATCGTTTTGGACGTCGTAACGTTTGTATATAGGTGCCATTGGTATGGTCTGCTGTTATGTAGTTTACGTTCTGTTGGTGTACCA
 GACTATGGCCAAATGGTGAAGGTAATGGTTCATCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATTGTCTTTGCCGTTTTCTATATTTTCTGTTTTGCTAC
 CACTTGGGCTCCAATTGCTTATGTTGTTATTTCTGAACTTTCCCAATTGAGAGTCAAGCTAAGGCTATGTCTATTGCTACAGCTGCTAATTGG
 TTGTGGGGTTTTCTTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTACTGGTGCTATTAACCTTCTACTACGGTTACGTTTTTCATGGGCTGTATGGTTTTCG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_101

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTCGAATGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAGGTGCATATGTCACCTGTGTC
 TATCTGTTGTGTTATGGTTGCCCTCCGGTGGTTTTCGTTTTCCGGTGGGATACTGGTACCATTTCTGGTTTTCGTCGCCCAAACCTGATTTCTTGAGA
 AGATTCGGTATGAAGCATAAAGATGGTAGTTATTATTTGTCTAAGGTTAGAAGCTGGTTTTGATTGTCTCCATTTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAAATGGGTGATATGTACGGTCGTAAAATGGGTTTGATTGTCTGTTGTTTATCTACATCATCGGTATTATTATTCA
 AATTGCATCCATCAACAAATGGTACCAATATTTTCATCGGTAGAATTATTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTACTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATGATTACCTTGGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ACTTCCGTTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTGTTTTGGCTGGGCTTTGTTTATGATCGGTGGTATGAC
 TTTCCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCTCTTCCAAAGTTAACAAGGTTGCCCCAGAC
 CATCCATTCATCAACAAGAGTTGGAAGTTATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAGTTGTTCACTG
 GTAAGCCGGCCATGTTTTAAGCGTACTATGATGGGTATCATGATCCAATCTCTACAACAATTGACTGGTGATAAATTTCTTCTACTATGGTAC
 TACCGTTTTTAAACGCTGTTGGTATGAGTGATTTCTTCGAACTTCTATTGTTTTCCGGTGTCTCAACTTCTTCTACTGTTGTTGTTTTGTAC
 ACTGTCCGATCGTTTTGGACGTCGTAACGTTTGTATATAGGTGCCATTGGTATGGTCTGCTGTTATGTAGTTTACGTTCTGTTGGTGTACCA
 GACTATGGCCAAATGGTGAAGGTAATGGTTCATCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATTGTCTTTGCCGTTTTCTATATTTTCTGTTTTGCTAC
 CACTTGGGCTCCAATTGCTTATGTTGTTATTTCTGAACTTTCCCAATTGAGAGTCAAGCTAAGGCTATGTCTATTGCTACAGCTGCTAATTGG
 TTGTGGGGTTTTCTTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTACTGGTGCTATTAACCTTCTACTACGGTTACGTTTTTCATGGGCTGTATGGTTTTCG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_Fermivin[®]

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTCGAATGCTGACCTGCCTTCTAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAGGTGCATATGCACTGTGTC
 TATCTGTTGTGTTATGGTTGCCTTCGGTGGTTTTCGTTTTTCGGTTGGGATACTGGTACCATTCTGGTTTTCGTCGCCCAAACCTGATTTCTTGAGA
 AGATTCGGTATGAAGCATAAAGATGGTAGTTATTATTTGTCTAAGGTTAGAAGCTGGTTAATTGTCTCCATTTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAAATGGGTGATATGTACGGTCGTAAAATGGGTTTGATTTGTCGTTGTTGTTATCTACATCATCGGTATTATTATTCA
 AATTGCATCCATCAACAAATGGTACCAATATTTTCATCGGTAGAAATTTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTACTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATGATTACCTTGGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ACTTCGGTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTGTTTTGCTGGGCTTTGTTTATGATCGGTGGTATGAC
 TTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCTCTTCCAAAGTTAACAAGGTTGCCCCAGAC
 CATCCATTCATCAACAAGAGTTGGAAGTTATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAGTTGTTCACTG
 GTAAGCCGGCCATGTTTTAAGCGTACTATGATGGGTATCATGATCCAATCTCTACAACAATTGACTGGTGATAACTATTTCTTCTACTATGGTAC
 TACCGTTTTTAACGCTGTTGGTATGAGTGATTTCTTCGAACTTCTATTGTTTTCGGTGTCGTCAACTTCTTCTACTTGTGTTCTTTGTAC
 ACTGTCGATCGTTTTGGACGTCGTAACGTTTTGTATATGGTGCCATTGGTATGGTCTGCTGTTATGTAGTTTACGTTCTGTTGGTGTCCACCA
 GACTATGGCCAAATGGTGAAGGTAATGGTTCATCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATGTCTTTGCCTGTTTCTATATTTCTGTTTTGCTAC
 CACTTGGGCTCCAATTGCTTATGTTGTTATTTCTGAACTTTCCCAATTGAGAGTCAAGTCTAAGGCTATGTCTATTGCTACAGCTGCTAATTGG
 TTGTGGGGTTTTCTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTACTGGTGCTATTAACCTTCTACTACGGTTACGTTTTTCATGGGCTGTATGGTTTTCG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_Fermichamp[®]/54.41/596

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTCGAATGCTGACCTGCCTTCTAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAGGTGCATATGCACTGTGTC
 TATCTGTTGTGTTATGGTTGCCTTCGGTGGTTTTCGTTTTTCGGTTGGGATACTGGTACCATTCTGGTTTTCGTCGCCCAAACCTGATTTCTTGAGA
 AGATTCGGTATGAAGCATAAAGATGGTAGTTATTATTTGTCTAAGGTTAGAAGCTGGTTAATTGTCTCCATTTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAAATGGGTGATATGTACGGTCGTAAAATGGGTTTGATTTGTCGTTGTTGTTATCTACATCATCGGTATTATTATTCA
 AATTGCATCCATCAACAAATGGTACCAATACTTCATCGGTAGAAATTTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTGCTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATGGTTACCTTGGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ACTTCGGTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTGTTTTGCTGGGCTTTGTTTATGATCGGTGGTATGAC
 TTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCTCTTCCAAAGTTAACAAGGTTGCCCCAGAC
 CATCCATTCATCAACAAGAGTTGGAAGTTATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAGTTGTTCACTG
 GTAAGCCGGCCATGTTTTAAGCGTACTATGATAGGTATCATGATCCAATCTCTACAACAATTGACTGGTGATAACTATTTCTTCTACTATGGTAC
 TACCGTTTTTAACGCTGTTGGTATGAGTGATTTCTTCGAACTTCTATTGTTTTCGGTGTCGTCAACTTCTTCTCCACTGTTGTTCTCTGTAC
 ACCGTTGACCGTTTTGGCCGTCGTAACGTTTTGATGTTGGGGTGTCTCGGTATGGTCTGCTGTTATGTTGTCTATGCTTCTGTTGGAGTCACTA
 GATTATGGCCAAATGGTCAAACAACGGCTCATCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATGTCTTTGCCTGTTTCTATATTTCTGTTTCGCTAC
 TACCTGGGCCCAATTGCTTATGTCGTTGTTTCTGAACTTTCCCAATTGAGAGTCAAGTCTAAGGCTATGTCTATTGCTACAGCTGCTAACTGG
 ATCTGGGGTTTTCTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTACTGGTGCTATTAACCTTCTACTACGGTTACGTTTTTCATGGGCTGTATGGTTTTCG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_72

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTCGAATGCTGACCTGCCTTCTAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAGGTGCATATGCACTGTGTC
 TATCTGTTGTGTTATGGTTGCCTTCGGTGGTTTTCGTTTTTCGGTTGGGATACTGGTACCATTCTGGTTTTCGTCGCCCAAACCTGATTTCTTGAGA
 AGATTCGGTATGAAGCATAAAGATGGTAGTTATTATTTGTCTAAGGTTAGAAGCTGGTTAATTGTCTCCATTTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAAATGGGTGATATGTACGGTCGTAAAATGGGTTTGATTTGTCGTTGTTGTTATCTACATCATCGGTATTATTATTCA
 AATTGCATCCATCAACAAATGGTACCAATACTTCATCGGTAGAAATTTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTGCTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATGGTTACCTTGGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ACTTCGGTACTAAAAAGTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTGTTTTGCTGGGCTTTGTTTATGATCGGTGGTATGAC
 TTTTCGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATTGACGAAGCAAGAGCATCTCTTCCAAAGTTAACAAGGTTGCCCCAGAC
 CATCCATTCATCAACAAGAGTTGGAAGTTATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAGTTGTTCACTG
 GTAAGCCGGCCATGTTTTAAGCGTACTATGATAGGTATCATGATCCAATCTCTACAACAATTGACTGGTGATAACTATTTCTTCTACTATGGTAC
 TACCGTTTTTAACGCTGTTGGTATGAGTGATTTCTTCGAACTTCTATTGTTTTCGGTGTCGTCAACTTCTTCTCCACTGTTGTTCTCTGTAC
 ACCGTTGACCGTTTTGGCCGTCGTAACGTTTTGATGTTGGGGTGTCTCGGTATGGTCTGCTGTTATGTTGTCTATGCTTCTGTTGGAGTCACTA
 GATTATGGCCAAATGGTCAAACAACGGCTCATCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATGTCTTTGCCTGTTTCTATATTTCTGTTTCGCTAC
 TACCTGGGCCCAATTGCTTATGTCGTTGTTTCTGAACTTTCCCAATTGAGAGTCAAGTCTAAGGCTATGTCTATTGCTACAGCTGCTAACTGG
 ATCTGGGGTTTTCTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTACTGGTGCTATTAACCTTCTACTACGGTTACGTTTTTCATGGGCTGTATGGTTTTCG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_73

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTGCAATGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAGGTGCATATGTCACCTGTGTC
 TATCTGTTGTGTTATGGTTGCCCTCCGGTGGTTTTCGTTTTCGGTTGGGATACTGGTACCATTTCTGGTTTTGTGCGCCAAACTGATTTCTTGAGA
 AGATTCGGTATGAAGCATAAAGATGGTAGTTATATTTGTCTAAGGTTAGAAGCTGGTTTTAATTGTCTCCATTTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAAATGGGTGATATGTACGGTCGTAAAATGGGTTTGATTTGTCGTTGTTGTTATCTACATCATCGGTATTATTATTCA
 AATTGCATCCATCAACAAATGGTACCAATACTTCATCGGTAGAATTATTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTGCTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATGGTTACCTTGGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ACTTCCGTTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTCCATTAGGTTTGTGTTTTGCTGGGCTTTGTTTATGATCGGTGGTATGAC
 TTTYGTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATGACGAAGCAAGAGCATCTCTTCCAAAGTTAACAAGGTTGCCCCAGAC
 CATCCATTCAACAAAGATTGGAAGTTATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAATTTGTTCACTG
 GTAAGCCGGCCATGTTTTAAGCGTACTATGATAGGTATCATGATCCAATCTCTACAACAATTGACTGGTGATAAATTTCTTCTACTATGGTAC
 TACCGTTTTTAACGCTGTTGGTATGAGTGATTTCTTCGAACTTCTATTGTTTTCGGTGTCGTCAACTTCTTCTCCACTGTTGTTCTCTGTAC
 ACCGTTGACCGTTTTGGCCGTCGTAACGTTTGTATGTTGGGTGCTGTCGGTATGGTCTGCTGTTATGTTGTCTATGCTTCTGTTGGAGTCACTA
 GATTATGGCCAAATGGTCAAACAACGGCTCATCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATGTTCTTTGCCTGTTTCTATATTTCTGTTTCGCTAC
 TACCTGGGCCCAATTGCTTATGTCGTTGTTCTGAACTTTCCATTGAGAGTCAAGCTAAGGCTATGCTATGCTACAGCTGCTAACTGG
 ATCTGGGGTTTTCTTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTACTGGTGCTATTAACTTCTACTACGGTTACGTTTTTCATGGGCTGTATGGTTTTCG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_657

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTGCAATGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAGGTGCATATGTCACCTGTGTC
 TATCTGTTGTGTTATGGTTGCCCTCCGGTGGTTTTCGTTTTCGGTTGGGATACTGGTACCATTTCTGGTTTTGTGCGCCAAACTGATTTCTTGAGA
 AGATTCGGTATGAAGCATAAAGATGGTAGTTATATTTGTCTAAGGTTAGAAGCTGGTTAATTGTCTCCATTTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAAATGGGTGATATGTACGGTCGTAAAATGGGTTTGATTTGTCGTTGTTGTTATCTACATCATCGGTATTATTATTCA
 AATTGCATCCATCAACAAATGGTACCAATACTTCATCGGTAGAATTATTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTGCTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATGGTTACCTTGGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ACTTCCGTTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTCCATTAGGTTTGTGTTTTGCTGGGCTTTGTTTATGATCGGTGGTATGAC
 TTTCTGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGTCAAATGACGAAGCAAGAGCATCTCTTCCAAAGTTAACAAGGTTGCCCCAGAC
 CATCCATTCAACAAAGATTGGAAGTTATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAATTTGTTCACTG
 GTAAGCCGGCCATGTTTTAAGCGTACTATGATAGGTATCATGATCCAATCTCTACAACAATTGACTGGTGATAAATTTCTTCTACTATGGTAC
 TACCGTTTTTAACGCTGTTGGTATGAGTGATTTCTTCGAACTTCTATTGTTTTCGGTGTCGTCAACTTCTTCTCCACTGTTGTTCTCTGTAC
 ACCGTTGACCGTTTTGGCCGTCGTAACGTTTGTATGTTGGGTGCTGTCGGTATGGTCTGCTGTTATGTTGTCTATGCTTCTGTTGGAGTCACTA
 GATTATGGCCAAATGGTCAAACAACGGCTCATCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATGTTCTTTGCCTGTTTCTATATTTCTGTTTCGCTAC
 TACCTGGGCCCAATTGCTTATGTCGTTGTTCTGAACTTTCCATTGAGAGTCAAGCTAAGGCTATGCTATGCTACAGCTGCTAACTGG
 ATCTGGGGTTTTCTTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTACTGGTGCTATTAACTTCTACTACGGTTACGTTTTTCATGGGCTGTATGGTTTTCG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_DSM 70449^T

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTGCAATGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAGGTGCATATGTCACCTGTGTC
 TATCTGTTGTGTTATGGTTGCCCTCCGGTGGTTTTGTTTTCGGTTGGGATACTGGTACCATTTCTGGTTTTGTGCTCAACCGATTTCATCAGA
 AGATTTGGTATGAAGCATAAAGATGGTACTAATATTTGTCTAAGGTTAGAAGCTGGTTGATTGTTCTCCATTTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAAATGGGTGATATGTACGGTCGTAAAATGGGTTTGATTTGTCGTTGTTGTTATCTACATCATCGGTATTATTATTCA
 AATTGCATCCATCAACAAATGGTACCAATACTTCATCGGTAGAATTATTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTACTTTAGTCTCCTGTTACCAACTGATGATTACCTTGGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ACTTCCGTTACTAAGAACTACTCCAACCTCTGTGCAATGGAGAGTCCATTAGGTTTGTGTTTTGCTGGGCTTTGTTTATGATCGGTGGTATGAC
 TTTCTGTTCCAGAATCCCCACGTTATTTGGTAGAAGCTGGTCAAATGACGAAGCAAGAGCATCTCTTCCAAAGTTAACAAGGTTGCCCCAGAC
 CATCCATTCAACAAAGATTGGAAGTTATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAATTTGTTCACTG
 GTAAGCCGGCCATGTTTTAAGCGTACTATGATGGGTATCATGATCCAATCTCTACAACAATTGACTGGTGATAAATTTCTTCTACTATGGTAC
 TACCGTTTTTAAGCGTGTGGTATGAGTGATTTCTTCGAACTTCTATTGTTTTCGGTGTCGTCAACTTCTTCTCCACTGTTGTTCTCTGTAC
 ACTGTCGATCGTTTTGGACGTCGTAACGTTTGTATATGTTGGTGCATTTGGTATGGTCTGCTGTTATGATGTTTACGCTTCTGTTGGTGTCAACA
 GACTATGGCCAAATGGTCAAGACCAACCATTTCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATGTTCTTTGCCTGTTTCTATATTTCTGTTTGGCTAC
 CACTTGGGCTCCAATTGCTTATGTTGTTATTTCTGAACTTTCCATTGAGAGTCAAGCTAAGGCTATGCTATGCTACAGCTGCTAATTGG
 TTGTGGGGTTTTCTTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTACTGGTGCTATTAACTTCTACTACGGTTACGTTTTTCATGGGCTGTATGGTTTTCG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_3211-1

ATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTCCACAAAAGTCAAGTGAGAATTCGAATGCTGACCTGCCTTCGAATAGCTCTCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAAGCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGGTAAGGTGCATATGCTACTGTGTC
 TACTGTGTGTATGGTTGCCCTCGGTGGTTTTCGTTTTCGGTTGGGATACTGGTACCAATTTCTGGTTTTGTCGCCAAAAGTATTCTTGAGA
 AGATTCGGTATGAAGCATAAAGATGGTAGTTATATTTGTCTAAGGTTAGAAGCTGGTTAATTGTCTCCATTTTCAACATTGGTTGTGCCATTG
 GTGGTATTATTTGGCTAAAATGGGTGATATGTACGGTCGTAAAATGGGTTTGATTTGTCGTTGTTGTTATCTACATCATCGGTATTATCATTCA
 AATTGCATCTATCAACAAATGGTACCAATACTTTCATCGGTAGAATTATTTCCGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGCTTATCTCCTATGCTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTAAGTACTTTAGTCTCCTGTTACCAATTGATGATTACTGCCGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ATTTCCGGTACTAAAACTATTCTAAGTCTGTCCAATGGAGAGTTCATTAGGTCTGTGCTTCGGTTCGGCCCTTGTATGATTGGTGGTATGAC
 TTTTGTTCCTGAATCTCCACGTTACTTGGTCAAGCTGGTCAAATCGACGAAGCTAGAGTCTCTCTAGCTAAGGTGAACAAAAGTCTCCAGAC
 CATCCATTCAACAAAGAACTAGAATTTCATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCCAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAATTGTTCACTG
 GTAAACCAGCTATGCTTCAACGTAATGATGGGTATTATGATTCAGTCTTTGCAACAATTGACTGGTGATAAATTTCTTCTATACGGTAC
 TACTGTTTTCAAGGCTGTGGTATGAGTATTCTTTGAAAATCTATTGTTTTCGGTGTCGTAACCTTCTTCTACTTGTGTTCTTTGTAC
 ACTGTCGATCGTTTTGGACGTCGTAACGTTTTGTTATATGGTGCCATTGGTATGGTCTGCTGTTATGTAGTTTACGCTTCTGTTGGTGTACCA
 GACTATGGCCAAATGGTGAAGGTAATGGTTCATCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATTGCTTTGCCTGTTTCTATATTTCTGTTTTGCTAC
 CACTTGGGCTCCAATTGCTTATGTTGTTATTTCTGAAAATTTCCCATTTGAGAGTCAAGCTAAGGCTATGCTATTTGCTACAGCTGCTAATTGG
 TTGTGGGGTTTTCTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTAAGTGGTCTATTAACCTTCTACTACGGTTACGTTTTTCTATGGGCTGTATGGTTTTG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_HL78

ATGAATTCAACTCCAGATCTAATATCTCCTCAAAAATCAAGTGAGAATTCAAATGCTGAGTTGCCCTCAAATAGCTCCCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGACGACTTCCAAACTGAAGCTGACCAAGTATTACCAACCCAAACACAGGTAAGGTGCTTATGTTACCGTCTC
 CATCTGTTGTGTCATGGTTGCCCTTTGGTGGTTTTCGTTTTCGGTTGGGATACTGGTACTATTTCTGGTTTCGTTGCTCAAAGTACTTCTGAGA
 AGATTTGGTATGAAGCACCACGATGGTACACCTTATTTGTCTAAGGTCAGAAGCTGGTTAATTGTCGCTATTTTCAATATTGGTTGTGCCATCG
 GTGGTATTGTTTGGCCAAAGTTAGGTGATATGTACGGTCGTAAAGTGGGTTTGATTTGTCGTTGTTGTAATTTACATCATCGGTATTATCATTCA
 AATTGCATCTATCAACAAATGGTACCAATATTTTCATCGGTAGAATTATTTCTGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGCTTATCTCCTATGCTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTAAGTACTTTAGTCTCCTGTTACCAATTGATGATTACTGCCGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ATTTCCGGTACTAAAACTATTCTAAGTCTGTCCAATGGAGAGTTCATTAGGTCTGTGCTTCGGTTCGGCCCTTGTATGATTGGTGGTATGAC
 TTTTGTTCCTGAATCTCCACGTTACTTGGTCAAGCTGGTCAAATCGACGAAGCTAGAGTCTCTCTAGCTAAGGTGAACAAAAGTCTCCAGAC
 CATCCATTCAACAAAGAACTAGAATTTCATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCCAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAATTGTTCACTG
 GTAAACCAGCTATGCTTCAACGTAATGATGGGTATTATGATTCAGTCTTTGCAACAATTGACTGGTGATAAATTTCTTCTTCTATACGGTAC
 TACTGTTTTCAAGGCTGTGGTATGAGTATTCTTTGAAAATCTATTGTTTTCGGTGTCGTAACCTTCTTCTACTTGTGTTGTTCTTTGTAC
 ACTGTCGATCGTTTTGGACGTCGTAACGTTTTGTTATATGGTGCCATTGGTATGGTCTGCTGTTATGTAGTTTACGCTTCTGTTGGTGTACCA
 GACTATGGCCAAATGGTGAAGGTAATGGTTCATCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATTGCTTTGCCTGTTTCTATATTTCTGTTTTGCTAC
 CACTTGGGCTCCAATTGCTTATGTTGTTATTTCTGAAAATTTCCCATTTGAGAGTCAAGCTAAGGCTATGCTATTTGCTACAGCTGCTAATTGG
 TTGTGGGGTTTTCTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTAAGTGGTCTATTAACCTTCTACTACGGTTACGTTTTTCTATGGGCTGTATGGTTTTG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXT3_3211-2

ATGAATTCAACTCCAGATCTAATATCTCCTCAAAAATCAAGTGAGAATTCAAATGCTGAGTTGCCCTCAAATAGCTCCCAGGTAATGAACATGC
 CTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGACGACTTCCAAACTGAAGCTGACCAAGTATTACCAACCCAAACACAGGTAAGGTGCTTATGTTACCGTCTC
 CATCTGTTGTGTCATGGTTGCCCTTTGGTGGTTTTCGTTTTCGGTTGGGATACTGGTACTATTTCTGGTTTCGTTGCTCAAAGTACTTCTGAGA
 AGATTTGGTATGAAGCACCACGATGGTACACCTTATTTGTCTAAGGTCAGAAGCTGGTTAATTGTCGCTATTTTCAATATTGGTTGTGCCATCG
 GTGGTATTGTTTGGCCAAAGTTAGGTGATATGTACGGTCGTAAAGTGGGTTTGATTTGTCGTTGTTGTAATTTACATCATCGGTATTATCATTCA
 AATTGCATCTATCAACAAATGGTACCAATATTTTCATCGGTAGAATTATTTCTGGTTTGGGTGTTGGTGGTATTGCCGCTTATCTCCTATGCTG
 ATTTCTGAAGTCGCTCCTAAGGAAATGAGAGGTAAGTACTTTAGTCTCCTGTTACCAATTGATGATTACTGCCGGTATTTTCTTGGGTTACTGTACCA
 ATTTCCGGTACTAAAACTATTCTAAGTCTGTCCAATGGAGAGTTCATTAGGTCTGTGCTTCGGTTCGGCCCTTGTATGATTGGTGGTATGAC
 TTTTGTTCCTGAATCTCCACGTTACTTGGTCAAGCTGGTCAAATCGACGAAGCTAGAGTCTCTCTAGCTAAGGTGAACAAAAGTCTCCAGAC
 CATCCATTCAACAAAGAACTAGAATTTCATTGAAGCTAGTGTGAAGAAGCCAGAGCTGCTGGTTCAGCATCATGGGGTGAATTGTTCACTG
 GTAAACCAGCTATGCTTCAACGTAATGATGGGTATTATGATTCAGTCTTTGCAACAATTGACTGGTGATAAATTTCTTCTTCTATACGGTAC
 TACTGTTTTCAAGGCTGTGGTATGAGTATTCTTTGAAAATCTATTGTTTTCGGTGTCGTAACCTTCTTCTACTTGTGTTGTTCTTTGTAC
 ACTGTCGATCGTTTTGGACGTCGTAACGTTTTGTTATATGGTGCCATTGGTATGGTCTGCTGTTATGTAGTTTACGCTTCTGTTGGTGTACCA
 GACTATGGCCAAATGGTGAAGGTAATGGTTCATCCAAGGGTCTGGTAACTGTATGATTGCTTTGCCTGTTTCTATATTTCTGTTTTGCTAC
 CACTTGGGCTCCAATTGCTTATGTTGTTATTTCTGAAAATTTCCCATTTGAGAGTCAAGCTAAGGCTATGCTATTTGCTACAGCTGCTAATTGG
 TTGTGGGGTTTTCTGATTGGTTTTCTTCACTCCATTTATTAAGTGGTCTATTAACCTTCTACTACGGTTACGTTTTTCTATGGGCTGTATGGTTTTG
 CCTACTTCTACGTTTTCTTCTTTGTGCCAGAACTAAGGGTTGACTTTGGAAGAAGTCAATGATATGTACGCTGAAGGTGTTCTACCATGGAA
 GTCTGCTTCATGGGTTCAACATCTCAAAGAGGTGCTAACTACGATGCTGATGCATTGATGCATGATGACCAGCCATTCTACAAGAAAATGTTT
 GGCAAGAAATAA

HXK1_29

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTTCCAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGTCAACGGTGTCTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTGTGAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTACTACTTGGGTGAATTGT
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAACAACCATAACATCATGGATAACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTTGGAAGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATTGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTGCCGCTGACGGTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCCGCGCTAAGGGTTGAGAGATACTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAAGATCCAATTACGATTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCAGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXK1_73/54.41

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTTCCAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGTCAACGGTGTCTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTGTGAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTACTACTTGGGTGAATTGT
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAACAACCATAACATCATGGATAACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTTGGAAGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATTGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTGCCGCTGACGGTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCCGCGCTAAGGGTTGAGAGATACTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCAGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXK1_3211-1

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTTCCAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGTCAACGGTGTCTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTGTGAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTACTACTTGGGTGAATTGT
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAACAACCATAACATCATGGATAACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTTGGAAGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATTGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTGCCGCTGACGGTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCCGCGCTAAGGGTTGAGAGATACTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCAGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXKI_DSM 70449^T

ATGGTTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTTCCAAATGTGCAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGCAACGGTGCTTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTTGTAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTGCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTACTACTTTGGGTGAATTTG
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAAACAACCATAACATCATGGATACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTTGGAAGTACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCCGCTAAGGGTTTGAGAGATATCTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCCGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXKI_16.1/642/712

ATGGTTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTTCCAAATGTGCAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGCAACGGTGCTTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTTGTAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTGCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTACTACTTTGGGTGAATTTG
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAAACAACCATAACATCATGGATACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTTGGAAGTACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCGCTAAGGGTTTGAGAGATATCTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCCGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXKI_101

ATGGTTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTTCCAAATGTGCAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGCAACGGTGCTTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTTGTAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTGCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTACTACTTTGGGTGAATTTG
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAAACAACCATAACATCATGGATACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTTGGAAGTACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCCGCTAAGGGTTTGAGAGATATCTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAAGATCCAATTACGATTTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCCGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXK1_Fermivin®/33

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGGTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCTTTATTGCGGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTCAAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGCAACGGTGCTTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTGTGAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTTACTACTTGGGTGAATTGT
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAATTTGAAAACAACCATAACATCATGGATAACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTTGGAAGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATTGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCCGCTAAGGGTTTGAGAGATATCTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTGTTCCAGCTGAGGATGGTCCGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXK1_72

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGGTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCTTTATTGCGGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTCAAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGCAACGGTGCTTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTGTGAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTTACTACTTGGGTGAATTGT
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAATTTGAAAACAACCATAACATCATGGATAACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTTGGAAGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATTGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCCGCTAAGGGTTTGAGAGATATCTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTGTTCCAGCTGAGGATGGTCCGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTGA

HXK1_657

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGGTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCTTTATTGCGGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTCAAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGCAACGGTGCTTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTGTGAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTTACTACTTGGGTGAATTGT
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAATTTGAAAACAACCATAACATCATGGATAACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTTGGAAGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATTGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCCGCTAAGGGTTTGAGAGATATCTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTGTTCCAGCTGAGGATGGTCCGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXK1_Fermichamp[®]/596

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAECTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTTCCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTCCAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTAAATTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGTCAACGGTGTCTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTTGTAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAAG
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTACTACTTGGGTGAATTTG
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAACAACCATAACATCATGGATAACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTGGAAGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCCTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCCGCTAAGGGTTTGAGAGATACTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCCGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXK1_NCYC 3518

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAECTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTTCCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTCCAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGTCAACGGTGTCTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTTGTAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAAG
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTACTACTTGGGTGAATTTG
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAACAACCATAACATCATGGATAACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTGGAAGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCCTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCCGCTAAGGGTTTGAGAGATACTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCCGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXK1_NCYC 529

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAAGAATCTGGTAACTATTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAECTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTTCCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCCAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTGCAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTCCAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATGTGTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGTCAACGGTGTCTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTTGTAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAAG
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTACTACTTGGGTGAATTTG
 TCGCTAGTGTACTTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGACCAAGATCTAAGCAAGTTGAAACAACCATAACATCATGGATAACCTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTGGAAGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCCTCTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCCGCTAAGGGTTTGAGAGATACTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCCGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXKI_3211-2

ATGGTTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAGAATCTGGTAACATTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCACCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCACCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCCAAAACAAGATTAACGAAGGTTTTCGAAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTCCAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATTGCTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATGTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGCAACGGTGCTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTCCAAGTAACCTCCAATGGCTATCAATTGTGAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTTACTACTTGGGTGAATTGT
 TGCGTCTAGTGTACTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAACAACCACATACATCATGGATACTTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTGGATGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACCTTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATTGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCGCGCTAAGGGTTTGAGAGATATCTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCGGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXKI_CBS 8614

ATGGTTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAGAATCTGGTAACATTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCACCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCACCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCCAAAACAAGATTAACGAAGGTTTTCGAAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTCCAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATTGCTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATGTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGCAACGGTGCTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTCCAAGTAACCTCCAATGGCTATCAATTGTGAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTTACTACTTGGGTGAATTGT
 TGCGTCTAGTGTACTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAACAACCACATACATCATGGATACTTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTGGATGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACCTTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATTGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCGCGCTAAGGGTTTGAGAGATATCTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCGGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXKI_HL78

ATGGTTTCATTTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAAGGGTTCCATGGCTGATGTGCCAAGGAATTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAG
 ATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTGAGAAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAAGAAGGGAGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTTCCAACAGGTAAGAATCTGGTAACATTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTC
 GTGTTGGTCAAGTTGAGCGGTAACCATAACCTTTGACACCACCTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGACATGAGAACCACCTAAGCACCAGAGG
 AGTTATGGTCCTTTATTGCCGACTCTTTGAAGGACTTTATGGTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTCACCTT
 CTCGTACCCAGCTTCCCAAAACAAGATTAACGAAGGTTTTCGAAAGATGGACCAAGGGTTTCGATATTCCAAATGTCGAAGGCCACGATGTC
 GTCCCATTGCTACAAAACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATGTAGCATTGATTAATGATACTGTTGGTACTTTAGTTGCCTCAT
 ACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATTTTCGGTACTGGTGCAACGGTGCTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTGGA
 GGGCAAATTAGCAGACGATATTCCAAGTAACCTCCAATGGCTATCAATTGTGAATATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGA
 ACCAAGTACGATGTTGCTGTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGTTACTACTTGGGTGAATTGT
 TGCGTCTAGTGTACTTGAATTAACGAGAAGGGCTTGATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAACAACCACATACATCATGGATACTTC
 CTACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTGGATGATACTGATGACATCTTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACCTTGCCA
 GAACGTAAGTTGATTAGAAGACTTTGTGAATTGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCTATTTGCCAAAAGAGAG
 GTTACAAGACTGGTCACATTGCCGCTGACGGTTCTGTCTATAACAATAACCCAGGTTTCAAGGAAGCCGCGCTAAGGGTTTGAGAGATATCTA
 TGGATGGACTGGTGACGCAAGCAACGATCCAATTACGATTGTTCCAGCTGAGGATGGTTCGGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCC
 GAAAAAGAATTGCCAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAA

HXK2_72/73/657

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAAAACCACAAGCCAGAAAGGGTTCCATGGCCGATGTGCCAAAGGAATTGATGCAACAAATTGAGAATTTTGAAA
 AAATTTTCACTGTTCCAAGTAAACTTTACAAGCCGTTACCAAGCATTTCATTTCCGAATTGGAAAAGGGTTTGTTCCAAGAAGGGTGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCAGGTTGGGTTATGGATTTCCCAACTGGTAAGGAATCCGGTGATTTCTTGCCATTGATTTGGGTGGTACCAACTTGAGAGTT
 GTCTTAGTCAAGTTGGGCGGTGACCGTACCTTTGACACCCTCAATCTAAGTACAGATTACCAGATGCTATGAGAATACTCAAATCCAGACG
 AATTGTGGGAATTTATTGCCGACTCTTTGAAAGCTTTTATTGATGAGCAATCCCACAAGGTATCTCTGAGCCAATCCATTGGGTTTCACCTT
 TTCTTTCCAGCTTCTCAAACAAAATCAATGAAGGTATCTTGCAAGATGGACTAAAGGTTTTGATATTCCAAACATTGAAAACCACGATGTT
 GTTCCAATGTTGCAAAAGCAAATCACCAGAGGAATATCCCAATTGAAGTTGTTGCTTTGATAAACGACACTACCGGTACTTTGGTTGCTTCTT
 ACTACACTGACCCAGAACTAAGATGGGTGTTATCTTCGGTACTGGTGCAATGGTGCTTACTACGATGTTTGTTCGGATATCGAAAAGTACA
 AGGAAAATCTATCTGATGACATCCACCATCTGCTCCAATGGCCATCAACTGTGAATACGGTTCCTTCGATAATGAACATGTCGTTTTGCCAAGA
 ACTAAATACGATATCACCATTGATGAAGAATCTCCAAGACCAGGCCAACAACTTTGAAAAATGCTTCTGTTACTACTTAGGTGAAATTT
 TCGTTTTGGCCTTGATGGACATGTACAAACAAGGTTTCATCTTCAAGAACCAAGACTTGTCTAAGTTGCAACAAGCCTTTTCGTCATGGACACTTC
 TTACCCAGCCAGAATCGAGGAAGATCCATTCGAGAACCTAGAAGATACCGATGACTTGTTCAAAATGAGTTCGGTATCAACACTACTGTTCAA
 GAACGTAAATTGATCAGACGTTTATCTGAATTGATTGGTGCTAGAGCTGCTAGATTGTCCGTTTTGTGGTATTGCTGCTATCTGTCAAAGAGAG
 GTTACAAGACCGGTCACATCGCTGCAGACGGTTCGGTTTACAACAGATACCCAGGTTTCAAAGAAAAGGCTGCCAATGCTTTGAAGGACATTTA
 CGGCTGGACTCAAACCTCACTAGACGACTACCCAATCAAGATTGTTCCTGCTGAAGATGGTCCGGTGCTGGTGCCGCTGTTATTGCTGCTTTG
 GCCAAAAAAGAATTGCTGAAGGTAAGTCCGTTGGTATCATCGGTGCTTAA

HXK2_156

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAAAACCACAAGCCAGAAAGGGTTCCATGGCCGATGTGCCAAAGGAATTGATGCAACAAATTGAGAATTTTGAAA
 AAATTTTCACTGTTCCAAGTAAACTTTACAAGCCGTTACCAAGCATTTCATTTCCGAATTGGAAAAGGGTTTGTTCCAAGAAGGGTGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCAGGTTGGGTTATGGATTTCCCAACTGGTAAGGAATCCGGTGATTTCTTGCCATTGATTTGGGTGGTACCAACTTGAGAGTT
 GTCTTAGTCAAGTTGGGCGGTGACCGTACCTTTGACACCCTCAATCTAAGTACAGATTACCAGATGCTATGAGAATACTCAAATCCAGACG
 AATTGTGGGAATTTATTGCCGACTCTTTGAAAGCTTTTATTGATGAGCAATCCCACAAGGTATCTCTGAGCCAATCCATTGGGTTTCACCTT
 TTCTTTCCAGCTTCTCAAACAAAATCAATGAAGGTATCTTGCAAGATGGACTAAAGGTTTTGATATTCCAAACATTGAAAACCACGATGTT
 GTCCCAATGTTGCAAAAGCAAATCACCAGAGGAATATCCCAATTGAAGTTGTTGCTTTGATAAACGACACTACCGGTACTTTGGTTGCTTCTT
 ACTACACTGACCCAGAACTAAGATGGGTGTTATCTTCGGTACTGGTGCAATGGTGCTTACTACGATGTTTGTTCGGATATCGAAAAGTACA
 AGGAAAATCTATCTGATGACATCCACCATCTGCTCCAATGGCCATCAACTGTGAATACGGTTCCTTCGATAATGAACATGTCGTTTTGCCAAGA
 ACTAAATACGATATCACCATTGATGAAGAATCTCCAAGACCAGGCCAACAACTTTGAAAAATGCTTCTGTTACTACTTAGGTGAAATTT
 TCGTTTTGGCCTTGATGGACATGTACAAACAAGGTTTCATCTTCAAGAACCAAGACTTGTCTAAGTTGCAACAAGCCTTTTCGTCATGGACACTTC
 TTACCCAGCCAGAATCGAGGAAGATCCATTCGAGAACCTAGAAGATACCGATGACTTGTTCAGAGTGAGTTCGGTATCAACACTACTGTTCAA
 GAACGTAAATTGATCAGACGTTTATCTGAATTGATTGGTGCTAGAGCTGCTAGATTGTCCGTTTTGTGGTATTGCTGCTATCTGTCAAAGAGAG
 GTTACAAGACCGGTCACATTGCTGCAGACGGTTCGGTTTACAACAGATACCCAGGTTTCAAAGAAAAGGCTGCCAATGCTTTGAAGGACATTTA
 CGGCTGGACTCAAACCTCACTAGACGACTACCCAATCAAGATTGTTCCTGCTGAAGATGGTCCGGTGCTGGTGCCGCTGTTATTGCTGCTTTG
 GCCAAAAAAGAATTGCTGAAGGTAAGTCCGTTGGTATCATCGGTGCTTAA

HXK2_54.41/596/642/Fermichamp®

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAAAACCACAAGCCAGAAAGGGTTCCATGGCCGATGTGCCAAAGGAATTGATGCAACAAATTGAGAATTTTGAAA
 AAATTTTCACTGTTCCAAGTAAACTTTACAAGCCGTTACCAAGCATTTCATTTCCGAATTGGAAAAGGGTTTGTTCCAAGAAGGGTGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCAGGTTGGGTTATGGATTTCCCAACTGGTAAGGAATCCGGTGATTTCTTGCCATTGATTTGGGTGGTACCAACTTGAGAGTT
 GTCTTAGTCAAGTTGGGCGGTGACCGTACCTTTGACACCCTCAATCTAAGTACAGATTACCAGATGCTATGAGAATACTCAAATCCAGACG
 AATTGTGGGAATTTATTGCCGACTCTTTGAAAGCTTTTATTGATGAGCAATCCCACAAGGTATCTCTGAGCCAATCCATTGGGTTTCACCTT
 TTCTTTCCAGCTTCTCAAACAAAATCAATGAAGGTATCTTGCAAGATGGACTAAAGGTTTTGATGTTCCAAACATTGAAAACCACGATGTT
 GTTCCAATGTTGCAAAAGCAAATCACCAGAGGAATATCCCAATTGAAGTTGTTGCTTTGATAAACGACACTACCGGTACTTTGGTTGCTTCTT
 ACTACACTGACCCAGAACTAAGATGGGTGTTATCTTCGGTACTGGTGCAATGGTGCTTACTACGATGTTTGTTCGGATATCGAAAAGTACA
 AGGAAAATCTATCTGATGACATCCACCATCTGCTCCAATGGCCATCAACTGTGAATACGGTTCCTTCGATAATGAACATGTCGTTTTGCCAAGA
 ACTAAATACGATATCACCATTGATGAAGAATCTCCAAGACCAGGCCAACAACTTTGAAAAATGCTTCTGTTACTACTTAGGTGAAATTT
 TCGTTTTGGCCTTGATGGACATGTACAAACAAGGTTTCATCTTCAAGAACCAAGACTTGTCTAAGTTGCAACAAGCCTTTTCGTCATGGACACTTC
 TTACCCAGCCAGAATCGAGGAAGATCCATTCGAGAACCTAGAAGATACCGATGACTTGTTCAAAATGAGTTCGGTATCAACACTACTGTTCAA
 GAACGTAAATTGATCAGACGTTTATCTGAATTGATTGGTGCTAGAGCTGCTAGATTGTCCGTTTTGTGGTATTGCTGCTATCTGTCAAAGAGAG
 GTTACAAGACCGGTCACATCGCTGCAGACGGTTCGGTTTACAACAGATACCCAGGTTTCAAAGAAAAGGCTGCCAATGCTTTGAAGGACATTTA
 CGGCTGGACTCAAACCTCACTAGACGACTACCCAATCAAGATTGTTCCTGCTGAAGATGGTCCGGTGCTGGTGCCGCTGTTATTGCTGCTTTG
 GCCAAAAAAGAATTGCTGAAGGTAAGTCCGTTGGTATCATCGGTGCTTAA

HXK2_3211-1/712

ATGGTTTCATTTAGGTCCAAAAAACCACAAGCCAGAAAGGGTTCCATGGCCGATGTGCCAAAGGAATTGATGCAACAAATTGAGAATTTTGAAA
 AAATTTTCACTGTTCCAAGTAAACTTTACAAGCCGTTACCAAGCATTTCATTTCCGAATTGGAAAAGGGTTTGTTCCAAGAAGGGTGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCAGGTTGGGTTATGGATTTCCTCAACTGGTAAGGAATCCGGTGATTTCTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACCAACTTGAGAGTT
 GTCTTAGTCAAGTTGGGCGGTGACCGTACCTTTGACACCCTCAATCTAAGTACAGATTACCAGATGCTATGAGAAGTACTCAAATCCAGACG
 AATTGTGGGAATTTATTGCCGACTCTTTGAAAGCTTTTATTGATGAGCAATCCCACAAGGTATCTCTGAGCCAATCCATTGGGTTTCCACCTT
 TTCTTTCCAGCTTCTCAAACAAAATCAATGAAGGTATCTTGCAAGATGGACTAAAGGTTTTGATRTTCAAACATTGAAAACCACGATGTT
 GTTCCAATGTTGCAAAAGCAAATCACCAGAGGAATATCCCAATTGAAGTTGTTGCTTTGATAAACGACACTACCGGTACTTTGGTTGCTTCTT
 ACTACACTGACCCAGAACTAAGATGGGTGTTATCTTCGGTACTGGTGCAATGGTGCTTACTACGATGTTTGTTCGGATATCGAAAAGTACA
 AGGAAAATCTATCTGATGACATCCACCCTCTGCTCCAATGGCCATCAACTGTGAATACGGTTCCTTCGATAATGAACATGTCGTTTTGCCAAGA
 ACTAAATACGATATCACCATTGATGAAGAATCTCCAAGACCAGGCCAACAACTTTGAAAAATGCTCTCTGGTACTACTTAGGTGAAATTT
 TCGTTTTGGCCTTGATGGACATGTACAAACAAGGTTTCATCTTCAAGAACCAAGACTTGTCTAAGTTTCGACAAGCCTTTTCGTCATGGACACTTC
 TTACCCAGCCAGAATCGAGGAAGATCCATTCGAGAACCTAGAAGATACCGATGACTTGTTCAAAATGAGTTCGGTATCAACACTACTGTTCAA
 GAACGTAAATTGATCAGACGTTTATCTGAATTGATTGGTGCTAGAGCTGCTAGATTGTCCGTTTTGTGGTATTGCTGCTATCTGTCAAAGAGAG
 GTTACAAGACCGGTCACATCGCTGCAGACGGTTCGGTTTACAACAGATACCCAGGTTTCAAAGAAAAGGCTGCCAATGCTTTGAAGGACATTTA
 CGGCTGGACTCAAACCTCACTAGACGACTACCCAATCAAGATTGTTCCTGCTGAAGATGGTCCGGTGCTGGTGCCGCTGTTATTGCTGCTTTG
 GCCAAAAAAGAATTGCTGAAGGTAAGTCCGTTGGTATCATCGGTGCTTAA

HXK2_16.1

ATGGTTTCATTTAGGTCCAAAAAACCACAAGCCAGAAAGGGTTCCATGGCCGATGTGCCAAAGGAATTGATGCAACAAATTGAGAATTTTGAAA
 AAATTTTCACTGTTCCAAGTAAACTTTACAAGCCGTTACCAAGCATTTCATTTCCGAATTGGAAAAGGGTTTGTTCCAAGAAGGGTGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCAGGTTGGGTTATGGATTTCCTCAACTGGTAAGGAATCCGGTGATTTCTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACCAACTTGAGAGTT
 GTCTTAGTCAAGTTGGGCGGTGACCGTACCTTTGACACCCTCAATCTAAGTACAGATTACCAGATGCTATGAGAAGTACTCAAATCCAGACG
 AATTGTGGGAATTTATTGCCGACTCTTTGAAAGCTTTTATTGATGAGCAATCCCACAAGGTATCTCTGAGCCAATCCATTGGGTTTCCACCTT
 TTCTTTCCAGCTTCTCAAACAAAATCAATGAAGGTATCTTGCAAGATGGACTAAAGGTTTTGATRTTCAAACATTGAAAACCACGATGTT
 GTTCCAATGTTGCAAAAGCAAATCACCAGAGGAATATCCCAATTGAAGTTGTTGCTTTGATAAACGACACTACCGGTACTTTGGTTGCTTCTT
 ACTACACTGACCCAGAACTAAGATGGGTGTTATCTTCGGTACTGGTGCAATGGTGCTTACTACGATGTTTGTTCGGATATCGAAAAGTACA
 AGGAAAATCTATCTGATGACATCCACCCTCTGCTCCAATGGCCATCAACTGTGAATACGGTTCCTTCGATAATGAACATGTCGTTTTGCCAAGA
 ACTAAATACGATATCACCATTGATGAAGAATCTCCAAGACCAGGCCAACAACTTTGAAAAATGCTCTCTGGTACTACTTAGGTGAAATTT
 TCGTTTTGGCCTTGATGGACATGTACAAACAAGGTTTCATCTTCAAGAACCAAGACTTGTCTAAGTTTCGACAAGCCTTTTCGTCATGGACACTTC
 TTACCCAGCCAGAATCGAGGAAGATCCATTCGAGAACCTAGAAGATACCGATGACTTGTTCAAAATGAGTTCGGTATCAACACTACTGTTCAA
 GAACGTAAATTGATCAGACGTTTATCTGAATTGATTGGTGCTAGAGCTGCTAGATTGTCCGTTTTGTGGTATTGCTGCTATCTGTCAAAGAGAG
 GTTACAAGACCGGTCACATCGCTGCAGACGGTTCGGTTTACAACAGATACCCAGGTTTCAAAGAAAAGGCTGCCAATGCTTTGAAGGACATTTA
 CGGCTGGACTCAAACCTCACTAGACGACTACCCAATCAAGATTGTTCCTGCTGAAGATGGTCCGGTGCTGGTGCCGCTGTTATTGCTGCTTTG
 GCCAAAAAAGAATTGCTGAAGGTAAGTCCGTTGGTATCATCGGTGCTTAA

HXK2_DSM6580^T

ATGGTTTCATTTAGGTCCAAAAAACCACAAGCCAGAAAGGGTTCCATGGCCGATGTGCCAAAGGAATTGATGCAACAAATTGAGAATTTTGAAA
 AAATTTTCACTGTTCCAAGTAAACTTTACAAGCCGTTACCAAGCATTTCATTTCCGAATTGGAAAAGGGTTTGTTCCAAGAAGGGTGGTAACAT
 TCCAATGATTTCCAGGTTGGGTTATGGATTTCCTCAACTGGTAAGGAATCCGGTGATTTCTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACCAACTTGAGAGTT
 GTCTTAGTCAAGTTGGGCGGTGACCGTACCTTTGACACCCTCAATCTAAGTACAGATTACCAGATGCTATGAGAAGTACTCAAATCCAGACG
 AATTGTGGGAATTTATTGCCGACTCTTTGAAAGCTTTTATTGATGAGCAATCCCACAAGGTATCTCTGAGCCAATCCATTGGGTTTCCACCTT
 TTCTTTCCAGCTTCTCAAACAAAATCAATGAAGGTATCTTGCAAGATGGACTAAAGGTTTTGATRTTCAAACATTGAAAACCACGATGTT
 GTCCCAATGTTGCAAAAGCAAATCACCAGAGGAATATCCCAATTGAAGTTGTTGCTTTGATAAACGACACTACCGGTACTTTGGTTGCTTCTT
 ACTACACTGACCCAGAACTAAGATGGGTGTTATCTTCGGTACTGGTGCAATGGTGCTTACTACGATGTTTGTTCGGATATCGAAAAGTACA
 AGGAAAATCTATCTGATGACATCCACCCTCTGCTCCAATGGCCATCAACTGTGAATACGGTTCCTTCGATAATGAACATGTCGTTTTGCCAAGA
 ACTAAATACGATATCACCATTGATGAAGAATCTCCAAGACCAGGCCAACAACTTTGAAAAATGCTCTCTGGTACTACTTAGGTGAAATTT
 TCGTTTTGGCCTTGATGGACATGTACAAACAAGGTTTCATCTTCAAGAACCAAGACTTGTCTAAGTTTCGACAAGCCTTTTCGTCATGGACACTTC
 TTACCCAGCCAGAATCGAGGAAGATCCATTCGAGAACCTAGAAGATACCGATGACTTGTTCAGAATGAGTTCGGTATCAACACTACTGTTCAA
 GAACGTAAATTGATCAGACGTTTATCTGAATTGATTGGTGCTAGAGCTGCTAGATTGTCCGTTTTGTGGTATTGCTGCTATCTGTCAAAGAGAG
 GTTACAAGACCGGTCACATTGCTGCAGACGGTTCGGTTTACAACAGATACCCAGGTTTCAAAGAAAAGGCTGCCAATGCTTTGAAGGACATTTA
 CGGCTGGACTCAAACCTCACTAGACGACTACCCAATCAAGATTGTTCCTGCTGAAGATGGTCCGGTGCTGGTGCCGCTGTTATTGCTGCTTTG
 GCCAAAAAAGAATTGCTGAAGGTAAGTCCGTTGGTATCATCGGTGCTTAA

HXK2_HL78

ATGGTTCATTTAGGTCCAAAAAACCAAGCCAGAAAGGGTTCATGGCCGATGTGCCAAAGGAATTGATGCAACAAATTGAGAATTTTGAAA
 AAATTTTCACTGTTCCAAGTAACTTTACAAGCCGTTACCAAGCATTTCATTTCCGAATTGGAAAAGGGTTTGTCCAAGAAGGGTGGTAACAT
 TCCAATGATTCCAGGTTGGGTTATGGATTCCCAACTGGTAAGGAATCCGGTGATTTCTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACCAACTGAGAGTT
 GTCTTAGTCAAGTTGGCGGTGACCGTACCTTTGACACCCTCAATCTAAGTACAGATTACCAGATGCTATGAGAAGTACTCAAAATCCAGACG
 AATTGTGGGAATTTATTGCCACTCTTTGAAAGCTTTTATTGATGAGCAATCCCAAGGATCTCTGAGCCAAATCCATTGGGTTTCCACCTT
 TTCTTTCCAGCTTCTCAAAACAAAATCAATGAAGGTATCTTGCAAGATGGACTAAAGGTTTTGATGTTCCAAACATTGAAAACCACGATGTT
 GTTCCAATGTTGCCAAAGCAAATCACCAGAGGAATATCCCAATTGAAGTTGTTGCTTTGATAAACGACACTACCGGTACTTTGGTTGCTTCTT
 ACTACACTGACCCAGAACTAAGATGGGTGTTATCTTCGGTACTGGTGCAATGGTGCTTACTACGATGTTTGTTCGGATATCGAAAAGTACA
 AGGAAAATCATCTGATGACATCCACCATCTGCTCCAATGGCCATCAACTGTGAATACGGTTCCTTCGATAATGAACATGTCGTTTTGCCAAGA
 ACTAAATACGATATCACCATTGATGAAGAATCTCCAAGACCAGGCCAACAACTTTGAAAAAATGCTTCTGTTACTACTTAGGTGAAATTT
 TCGTTTTGGCCTTGATGGACATGTACAAACAAGTTTTCATCTTCAAGAACCAAGACTTGTCTAAGTTCGACAAGCCTTTTCGTATGGACACTTC
 TTACCCAGCCAGAATCGAGGAAGATCCATTCGAGAACCTAGAAGATACCGATGACTTGTTCAAAATGAGTTCGGTATCAACACTACTGTTCAA
 GAACGTAATGATCAGACGTTTATCTGAATTGATTGGTGCTAGAGCTGCTAGATTGTCGTTTTGTGGTATTGCTGCTATCTGTCAAAGAGAG
 GTTACAAGACCGTACATCGCTGCAGACGGTTCGGTTTACAACAGATACCCAGTTCCTTCAAGAAAAGGTCGCAATGCTTTGAAGGACATTTA
 CGGCTGGACTCAACCTCACTAGACGACTACCCAATCAAGATTGTTCCGCTGAAGATGGTCCGGTGCTGGTGCCGCTGTTATTGCTGCTTTG
 GCCAAAAAAGAATTGCTGAAGGTAAGTCCGTTGGTATCATCGGTGCTTAA

8.2 Aminosäuresequenzen von Hxt3p, Hxk1p und Hxk2p**Hxt3p_16.1**

MNSTPDLISPOKSSSENSNADLPSSNSQVMNMPPEEKGVQDDFQAEADQVLTNPNTGKGA YVTVSICCVMAVFGGFVFGWDTGTISGFVAQTDFLR
 RFGMKHKDGSYLLSKVRTGLIVSIFNIGCAIGGIILAKLGDYGRKMGLIVVVVYIYIIGI IQIASINKWYQYF IGRIISGLGVGGI AVLSPML
 ISEVAPKEMRGLTVSCYQLMITLGFIFLYCTNFGTKNYSNSVQWRVPLGLCFAWALFMI GGMTFVPESPRYLVEAGQIDEARASLSKVNKVAPD
 HPFIQQELEVI EASVEEARAAGSASWGELFTGK PAMFKRTMIGIMI QSLQQLTGDN YFFY YGTTVFNAVGM SDFS FETSIVFGV VNFSTCCSLY
 TVDRFGRNRCLLYGAIGMVCCYVYVASVGVTR LWPNGQNGSSK GAGNCMIVFACFYIFCFATTWAPIAYV VVXSETFPLRVKSKAMS IATAANW
 MWGFLIGFFTPFITGAINFYGYVFMGCMVFAYFYVFFVFPETKGLTLEEVNDMYAEGVLPWKSASWVPTSQRGANYDADALMHDDQPFYKMKF
 GKK-

Hxt3p_712

MNSTPDLISPOKSSSENSNADLPSSNSQVMNMPPEEKGVQDDFQAEADQVLTNPNTGKGA YVTVSICCVMAVFGGFVFGWDTGTISGFVAQTDFLR
 RFGMKHKDGSYLLSKVRTGLIVSIFNIGCAIGGIILAKLGDYGRKMGLIVVVVYIYIIGI IQIASINKWYQYF IGRIISGLGVGGI AVLSPML
 ISEVAPKEMRGLTVSCYQLMITLGFIFLYCTNFGTKNYSNSVQWRVPLGLCFAWALFMI GGMTFVPESPRYLVEAGQIDEARASLSKVNKVAPD
 HPFIQQELEVI EASVEEARAAGSASWGELFTGK PAMFKRTMIGIMI QSLQQLTGDN YFFY YGTTVFNAVGM SDFS FETSIVFGV VNFSTCCSLY
 TVDRFGRNRCLLYGAIGMVCCYVYVASVGVTR LWPNGXNGSSK GAGNCMIVFACFYIFCFATTWAPIAYV VVISETFPLRVKSKAMS IATAANW
 MWGFLIGFFTPFITGAINFYGYVFMGCMVFAYFYVFFVFPETKGLTLEEVNDMYAEGVLPWKSASWVPTSQRGANYDADALMHDDQPFYKMKF
 GKK-

Hxt3p_642

MNSTPDLISPOKSSSENSNADLPSSNSQVMNMPPEEKGVQDDFQAEADQVLTNPNTGKGA YVTVSICCVMAVFGGFVFGWDTGTISGFVAQTDFLR
 RFGMKHKDGSYLLSKVRTGLIVSIFNIGCAIGGIILAKLGDYGRKMGLIVVVVYIYIIGI IQIASINKWYQYF IGRIISGLGVGGI AVLSPML
 ISEVAPKEMRGLTVSCYQLMITLGFIFLYCTNFGTKNYSNSVQWRVPLGLCFAWALFMI GGMTFVPESPRYLVEAGQIDEARASLSKVNKVAPD
 HPFIQQELEVI EASVEEARAAGSASWGELFTGK PAMFKRTMIGIMI QSLQQLTGDN YFFY YGTTVFNAVGM SDFS FETSIVFGV VNFSTCCSLY
 TVDRFGRNRCLLYGAVGMVCCYVYVASVGVTR LWPNGEENGSSK GAGNCMIVFACFYIFCFATTWAPIAYV VVXSETFPLRVKSKAMS IATAANW
 MWGFLIGFFTPFITGAINFYGYVFMGCMVFAYFYVFFVFPETKGLTLEEVNDMYAEGVLPWKSASWVPTSQRGANYDADALMHDDQPFYKMKF
 GKK-

Hxk1p_3211-1

MVHLGPKKQARKGSMADVPKELMDEIHQLEDMFVTDSETLRKVVKHFIDELNKGLTKKGGNIPMIPGWVMEFPTGKESGNLYAIDLGGTNLVR
 VLVKLSGNHTFDTTQSKYKLPDMRTTKHQEELWSFIADSLKDFMVEQELLNKTDLPLGFTFSYPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNVEGHV
 VPLLQNEISKRELP IEIVALINDTVGTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAFYDVVSDIEKLEGLLADDIPSNPMAINCEYGSFDNEHLVLP
 TKYDVAVDEQSPRPQQAFKMTSGYLLGELLRLVLELNEKGLMLKQDL SKLKQPYIMDTSYPARIEDDPFENLDDTDDIFQKDFGKVTTL
 ERKLIRRLCELIGTRAARLAVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNYKYPGFKEAAAKGLRDIYGTWGDASNDPITIVPAEDGSGAGA AVIAALS
 EKRIAEGKSLGIIGA-

Hxk1p_DSM 70449^T

MVHLGPKKQARKGSMADVPKELMDEIHQLEDMFVTDSETLRKVVKHFIDELNKGLTKKGGNIPMIPGWVMEFPTGKESGNLYAIDLGGTNLVR
 VLVKLSGNHTFDTTQSKYKLPDMRTTKHQEELWSFIADSLKDFMVEQELLNKTDLPLGFTFSYPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNVEGHV
 VPLLQNEISKRELP IEIVALINDTVGTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAFYDVVSDIEKLEGLLADDIPSNPMAINCEYGSFDNEHLVLP
 TKYDVAVDEQSPRPQQAFKMTSGYLLGELLRLVLELNEKGLMLKQDL SKLKQPYIMDTSYPARIEDDPFENLDDTDDIFQKDFGKVTTL
 ERKLIRRLCELIGTRAARLAVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNYKYPGFKEAAAKGLRDIYGTWGDASNDPITIVPAEDGSGAGA AVIAALS
 EKRIAEGKSLGIIGA-

Hxk1p_16.1/642/712

MVHLGPKKPQARKGSMADVPKELMDEIHQLEDMFTVDSETLRKVVVXHFIDELNKGLTKKGGNIPMIPGWVMEFPTGKESGNYLAIDLGGTNLRV
 VLVKLSGNHTFDFTTQSKYKLPDMRRTTKHQEELWSFIADSLKDFMVEQELLNKTDLPLGFTFSYPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNVEGHV
 VPLLQNEISKRELP IEIVALINDTVGTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAFYDVVSDIEKLEGLKADDIPSNPMAINCEYGSFDNEHLVLP
 TKYDVAVDEQSPRPQQAFKEMTSGYYLGELLRLVLELNEKGLMLKQDLSKLPQYIMDTSYPARIEDDPFENLEDTDDIFQKDFGVKTTLP
 ERKLIRRLCELIGTRAARLAVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNKYPGFKEAXAKGLRDIYGTGDASNDPITIVPAEDGSGAGAAVIAALS
 EKRIAEKSLGIIGA-

Hxk1p_Fermichamp®/596

MVHLGPKKPQARKGSMADVPKELMDEIHQLEDMFTVDSETLRKVVVXHFIDELNKGLTKKGGNIPMIPGWVMEFPTGKESGNYLAIDLGGTNLRV
 VLVKLSGNHTFDFTTQSKYKLPDMRRTTKHQEELWSFIADSLKDFMVEQELLNKTDLPLGFTFSYPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNVEGHV
 VPLLQNEISKRELP IEIVALINDTVGTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAFYDVVSDIEKLEGLKADDIPSNPMAINCEYGSFDNEHLVLP
 TKYDVAVDEQSPRPQQAFKEMTSGYYLGELLRLVLELNEKGLMLKQDLSKLPQYIMDTSYPARIEDDPFENLEDTDDIFQKDFGVKTTLP
 ERKLIRRLCELIGTRAARLAVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNKYPGFKEAAAKGLRDIYGTGDASNDPITIVPAEDGSGAGAAVIAALS
 EKRIAEKSLGIIGA-

Hxk1p_NCYC 3518

MVHLGPKKPQARKGSMADVPKELMDEIHQLEDMFTVDSETLRKVVVXHFIDELNKGLTKKGGNIPMIPGWVMEFPTGKESGNYLAIDLGGTNLRV
 VLVKLSGNHTFDFTTQSKYKLPDMRRTTKHQEELWSFIADSLKDFMVEQELLNKTDLPLGFTFSYPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNVEGHV
 VPLLQNEISKRELP IEIVALINDTVGTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAFYDVVSDIEKLEGLKADDIPSNPMAINCEYGSFDNEHLVLP
 TKYDVAVDEQSPRPQQAFKEMTSGYYLGELLRLVLELNEKGLMLKQDLSKLPQYIMDTSYPARIEDDPFENLEDTDDIFQKDFGVKTTLP
 ERKLIRRLCELIGTRAARLAVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNKYPGFKEAVAKGLRDIYGTGDASNDPITIVPAEDGSGAGAAVIAALS
 EKRIAEKSLGIIGA-

Hxk1p_NCYC 529

MVHLGPKKPQARKGSMADVPKELMDEIHQLEDMFTVDSETLRKVVVXHFIDELNKGLTKKGGNIPMIPGWVMEFPTGKESGNYLAIDLGGTNLRV
 VLVKLSGNHTFDFTTQSKYKLPDMRRTTKHQEELWSFIADSLKDFMVEQELLNKTDLPLGFTFSYPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNVEGHV
 VPLLQNEISKRELP IEIVALINDTVGTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAFYDVVSDIEKLEGLKADDIPSNPMAINCEYGSFDNEHLVLP
 TKYDVAVDEQSPRPQQAFKEMTSGYYLGELLRLVLELNEKGLMLKQDLSKLPQYIMDTSYPARIEDDPFENLEDTDDIFQKDFGVKTTLP
 ERKLIRRLCELIGTRAARLAVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNKYPGFKEAAAKGLRDIYGTGDASNDPITIVPAEDGSGAGAAVIAALS
 EKRIAEKSLGIIGA-

Hxk1p_3211-2

MVHLGPKKPQARKGSMADVPKELMDEIHQLEDMFTVDSETLRKVVVXHFIDELNKGLTKKGGNIPMIPGWVMEFPTGKESGNYLAIDLGGTNLRV
 VLVKLSGNHTFDFTTQSKYKLPDMRRTTKHQEELWSFIADSLKDFMVEQELLNKTDLPLGFTFSYPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNVEGHV
 VPLLQNEISKRELP IEIVALINDTVGTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAFYDVVSDIEKLEGLKADDIPSNPMAINCEYGSFDNEHLVLP
 TKYDVAVDEQSPRPQQAFKEMTSGYYLGELLRLVLELNEKGLMLKQDLSKLPQYIMDTSYPARIEDDPFENLEDTDDIFQKDFGVKTTLP
 ERKLIRRLCELIGTRAARLAVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNKYPGFKEAAAKGLRDIYGTGDASNDPITIVPAEDGSGAGAAVIAALS
 EKRIAEKSLGIIGA-

Hxk1p_CBS 8614

MVHLGPKKPQARKGSMADVPKELMDEIHQLEDMFTVDSETLRKVVVXHFIDELNKGLTKKGGNIPMIPGWVMEFPTGKESGNYLAIDLGGTNLRV
 VLVKLSGNHTFDFTTQSKYKLPDMRRTTKHQEELWSFIADSLKDFMVEQELLNKTDLPLGFTFSYPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNVEGHV
 VPLLQNEISKRELP IEIVALINDTVGTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAFYDVVSDIEKLEGLKADDIPSNPMAINCEYGSFDNEHLVLP
 TKYDVAVDEQSPRPQQAFKEMTSGYYLGELLRLVLELNEKGLMLKQDLSKLPQYIMDTSYPARIEDDPFENLEDTDDIFQKDFGVKTTLP
 ERKLIRRLCELIGTRAARLAVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNKYPGFKEAVAKGLRDIYGTGDASNDPITIVPAEDGSGAGAAVIAALS
 EKRIAEKSLGIIGA-

Hxk1p_HL78

MVHLGPKKPQARKGSMADVPKELMDEIHQLEDMFTVDSETLRKVVVXHFIDELNKGLTKKGGNIPMIPGWVMEFPTGKESGNYLAIDLGGTNLRV
 VLVKLSGNHTFDFTTQSKYKLPDMRRTTKHQEELWSFIADSLKDFMVEQELLNKTDLPLGFTFSYPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNVEGHV
 VPLLQNEISKRELP IEIVALINDTVGTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAFYDVVSDIEKLEGLKADDIPSNPMAINCEYGSFDNEHLVLP
 TKYDVAVDEQSPRPQQAFKEMTSGYYLGELLRLVLELNEKGLMLKQDLSKLPQYIMDTSYPARIEDDPFENLEDTDDIFQKDFGVKTTLP
 ERKLIRRLCELIGTRAARLAVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNKYPGFKEAAAKGLRDIYGTGDASNDPITIVPAEDGSGAGAAVIAALS
 EKRIAEKSLGIIGA-

Hxk2p_156

MVHLGPKKPQARKGSMADVPKELMQIENFEKIFTVPTETLQAVTKHFISELEKGLSKKGGNIPMIPGWVMEFPTGKESGDFLAIDLGGTNLRV
 VLVKLGGDRFTDFTTQSKYRPLDAMRRTQNPDELWEFIAADSLKAFIDEQFPQGISSEPIPLGFTFSYPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNIEHNDV
 VPMLQKQITKRNIPIEVVALINDTGTTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAYYDVCSDIEKLGKLSDDIPSPMAINCEYGSFDNEHVLP
 TKYDITIDEESPRPQQTFEKMSGYYLGEILRLALMDMYKQGFIFKNQDLSKFDKPFVMDTSYPARIEDDPFENLEDTDDLQSEFGINTTVQ
 ERKLIRRLSELIGARAARLAVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNRYPGFKEAANALKDIYGTQTSLLDDYPIKIVPAEDGSGAGAAVIAAL
 AQKRIAEKSVGIIGA-

Hxk2p_3211-1/16.1/712

MVHLGPKKPQARKGSMADVPKELMQQIENFEKIFTVPTETLQAVTKHFI SELEKGLSKKGGNIPMIPGWVMDFPPTGKESGDFLAIDLGGTNLRV
 VLVKLGDRFTDFTTQSKYRLPDAMRTTQNPDELWEIFIADSLKAFIDEQFPQGI SEPIPLGFTFSFPASQNKINEGILQRWTKGFDXPNIENHDV
 VPMLQKQITKRNIP IEVVALINDTTGTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAYYDVCSDIEKLGKLSDDIPPSAPMAINCEYGSFDNEHVVLPR
 TKYDITIDEESPRPGQQTFEKMSSGYLGEILRLALMDMYKQGFIFKNQDLSKFDKPFVMDTSYPARIEEDPFENLEDTDDLQNEFGINTTVQ
 ERKLIIRLSELIGARAARLSVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNRYPGFKEKAANALKDIYGTQTSLDDYPIKIVPAEDGSGAGAAVIAAL
 AQKRIAEGKSVGIIGA-

Hxk2p_DSM 6580^T

MVHLGPKKPQARKGSMADVPKELMQQIENFEKIFTVPTETLQAVTKHFI SELEKGLSKKGGNIPMIPGWVMDFPPTGKESGDFLAIDLGGTNLRV
 VLVKLGDRFTDFTTQSKYRLPDAMRTTQNPDELWEIFIADSLKAFIDEQFPQGI SEPIPLGFTFSFPASQNKINEGILQRWTKGFDIPNIENHDV
 VPMLQKQITKRNIP IEVVALINDTTGTLVASYYTDPETKMGVIFGTGVNGAYYDVCSDIEKLGKLSDDIPPSAPMAINCEYGSFDNEHVVLPR
 TKYDITIDEESPRPGQQTFEKMSSGYLGEILRLALMDMYKQGFIFKNQDLSKFDKPFVMDTSYPARIEEDPFENLEDTDDLQNEFGINTTVQ
 ERKLIIRLSELIGARAARLSVCGIAAICQKRGYKTGHIAADGSVYNRYPGFKEKAANALKDIYGTQTSLDDYPIKIVPAEDGSGAGAAVIAAL
 AQKRIAEGKSVGIIGA-

ERKLÄRUNG

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