

**Zuckertransport und
Regulation des Hexosestoffwechsels
bei *Oenococcus oeni***

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

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

Hanno Richter

geb. am 27.10.1972 in Kiel

Mainz, August 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Doktorarbeit wurden von Oktober 2000 bis Mai 2004 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes-Gutenberg Universität Mainz unter Anleitung von Prof. Dr. Gottfried Uden durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Oktober 2004

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
3. Material und Methoden	12
3.1 Verwendete Stämme	12
3.2 Medien	12
3.3 Zellzucht	15
3.4 Analyse von Stoffwechselprodukten mittels HPLC	18
3.5 Ermittlung der [¹³ C]-Markierung durch NMR-Spektroskopie	18
3.6 Messung der enzymatischen Aktivitäten	19
3.7 Bestimmung von 6-P-Gluconat	28
3.8 Messung der Phosphotransferaseaktivität	31
3.9 Transportmessungen	33
3.10 Bioinformatische Methoden	35
4. Ergebnisse	40
4.1 Fructose-Stoffwechsel	40
4.1.1 Umschalten zwischen Phosphoketolase- und Mannitweg	40
4.1.2 Fructosefermentation und Wachstumsrate	43
4.1.3 Pyruvat unterdrückt die Mannitbildung	44
4.1.4 Die Wachstumsrate ist substratabhängig	46
4.1.5 Limitierung des Redoxstoffwechsels	47
4.1.6 Fructose als Elektronenakzeptor	49
4.1.7 Hemmung der Phosphoglucoseisomerase	50
4.1.8 Konzentration von 6-P-Gluconat	53
4.1.9 Pantothensäuremangel	54
4.2 Transport	56
4.2.1 Glucosetransport	56
4.2.2 Fructosetransport	66
4.2.3 Konkurrenzexperimente	69
4.2.4 Phosphotransferase- Aktivitäten	71

4.3 Genomauswertung	73
4.3.1 Sekundäre Carrier	73
4.3.2 Phosphotransferasesysteme	80
5. Diskussion	85
5.1 Fructosestoffwechsel	85
5.1.1 Zwei Stoffwechselwege für Fructose	85
5.1.2 Fructoselimitierung	86
5.1.3 Nutzung des Mannitweges wegen Limitierung im Ethanolweg	86
5.1.4 Einschätzung limitierender Schritte im ESW	91
5.1.5 Cosubstrate verändern die Fructosefermentation	93
5.1.6 Phosphoglucoseisomerase lenkt den Fructosefluß	93
5.2 Pyruvatstoffwechsel	96
5.3 Hexosetransport	100
5.3.1 Transport über sekundäre Carrier und erleichterte Diffusion	100
5.3.2 Existenz eines Phosphotransferasesystems	104
5.3.3 Regulative Funktion des PTS-Systems	107
6. Veröffentlichungen	111
7. Literatur	112
8. Internetseiten	121
9. Anhang	122

1. Zusammenfassung

Das Milchsäurebakterium *Oenococcus oeni*, welches für den biologischen Säureabbau im Wein eingesetzt wird, verstoffwechselt Hexosen über den Phosphoketolaseweg. Dabei können beträchtliche Mengen Acetat entstehen. Die Ursachen dafür wurden untersucht, insbesondere der Fructosestoffwechsel.

Außerdem wurde der Hexosetransport untersucht, über den bei *O. oeni* noch nichts bekannt war. Die Aufnahme von Hexosen in die Zelle erfolgt mit hoher Affinität ($K_M=10 \mu\text{M}$) über einen Symport mit H^+ , aber mit sehr niedriger spezifischer Aktivität ($V_{\max}=9 \text{ U / g TG}$). Zusätzlich werden Hexosen mit ausreichender Aktivität über (vermutlich erleichterte) Diffusion in die Zelle transportiert, allerdings nur bei hohen Hexosekonzentrationen. Es wurden Gene gefunden, die für ein Hexose-Phosphotransferasesystem kodieren, welches in *O. oeni* keine bedeutende Rolle beim Transport spielt, aber vermutlich eine regulative Funktion hat.

Zur Bildung von Essigsäure tragen verschiedene Faktoren bei:

Der Ethanolweg, der in der heterofermentativen Milchsäuregärung die Reoxidation von NAD(P)H bewerkstelligt, ist durch die niedrige spezifische Aktivität der Acetaldehyddehydrogenase limitiert. Diese Limitierung wird noch verstärkt, wenn die zellulären Gehalte von Coenzym A aufgrund von Pantothersäuremangel niedrig sind. *O. oeni* umgeht durch Bildung von Erythrit die Limitierung, und Acetylphosphat wird nicht zu Ethanol reduziert, sondern als Acetat ausgeschieden.

Bei Cofermentation von Hexosen mit externen Elektronenakzeptoren, wie Fructose, Pyruvat oder Sauerstoff, werden letztere zur Reoxidation von NAD(P)H genutzt, und als Folge wird Acetat ausgeschieden.

Der Fluss von Fructose in den Phosphoketolaseweg wird durch das Enzym Phosphoglucoseisomerase verhindert, wenn dieses durch 6-Phosphogluconat gehemmt wird. Als Konsequenz wird Fructose im Mannitweg reduziert, was die Bildung von Essigsäure im Phosphoketolaseweg fördert.

Bei niedrigen Wachstums- und Stoffwechselraten, z.B. bei C-Limitierung, ist der Ethanolweg nicht limitierend für den Stoffwechsel, und Hexosen werden über heterofermentative Milchsäuregärung umgesetzt, ohne daß Acetat entsteht.

Pyruvat kann gleichzeitig als Elektronenakzeptor und als Energiequelle dienen: *O. oeni* ist in der Lage, Pyruvat mittels Disproportionierung zu Lactat und Acetat+ CO_2 zu fermentieren, und dabei Energie zu konservieren ($0,5 \text{ ATP / Pyruvat}$).

2. Einleitung

Oenococcus oeni, früher *Leuconostoc oenos* (Dicks et al. 1995), ist ein heterofermentatives Milchsäurebakterium, das aus Wein isoliert werden kann. Es ist Gram-positiv, unbegeißelt, Katalase-negativ und benötigt zum Wachstum komplexe Medien, die eine Vielzahl von Aminosäuren und Vitaminen enthalten (Garvie 1967). Das Wachstum wird durch Sauerstoff gehemmt und durch 10 Prozent CO₂ stimuliert. Morphologisch bildet *O. oeni* ovale Coccen (0,5-1,0 µm x 0,7-1,5 µm, Deibel et al. 1974), die einzeln oder in Ketten vorkommen, wobei die Kettenlänge, abhängig von der Wachstumsphase und dem Substrat, variiert (Abb. 1A,B).

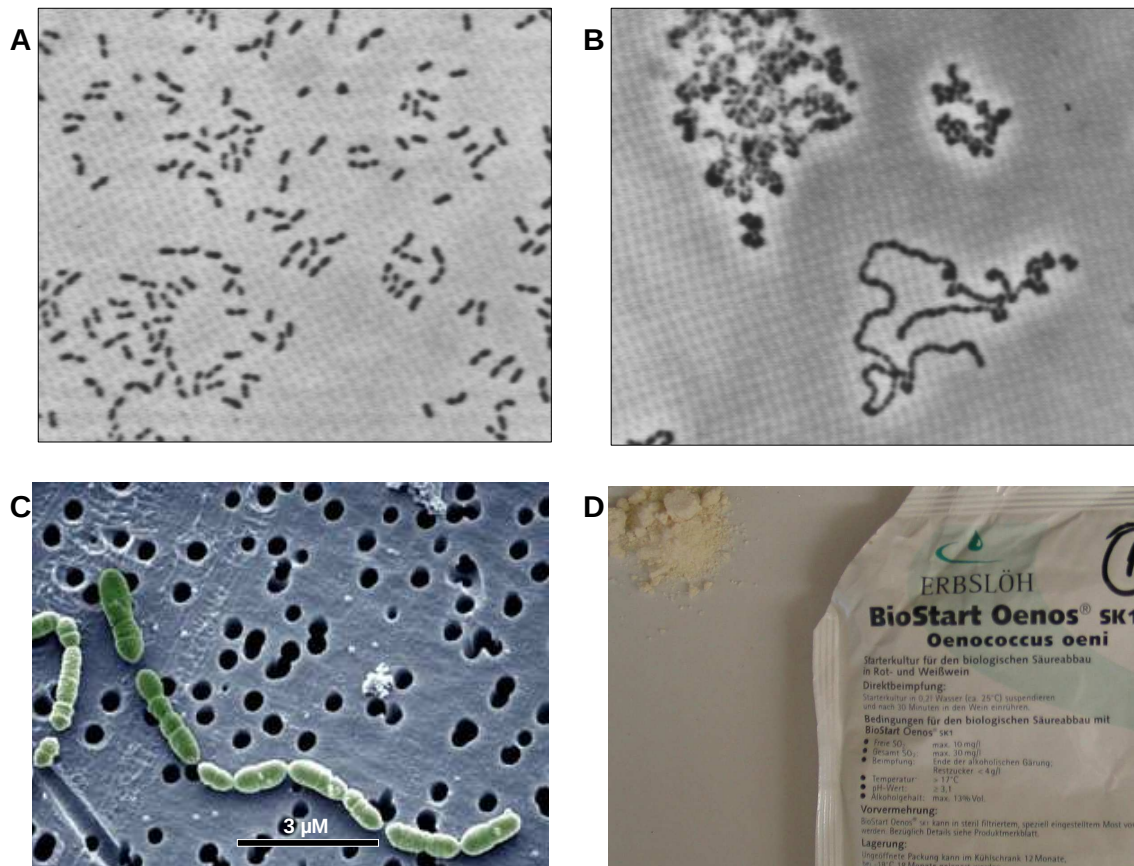


Abb. 1: *Oenococcus oeni*. (A) In einem frühen Vermehrungsstadium, Vergr. 1200x (Lüthi und Vetsch 1981). (B) Gegen Ende des Wachstums, Vergr. 1200x (Lemperle und Kerner 1982). (C) REM- Aufnahme, koloriert, Foto: Jeff Broadbent, Utah State University. (D) Gefriergetrocknet als Starterkultur für biologischen Säureabbau im Wein.

Oenococcus hat genetisch die höchste Ähnlichkeit zu den Gattungen *Leuconostoc* und *Weissella*. Nach 16S rRNA Sequenz-Vergleich ist die evolutive Distanz von *O. oeni* zu anderen Mitgliedern der Gattung *Leuconostoc* allerdings relativ hoch, und seine speziellen Eigenschaften (Resistenz gegen Ethanol und niedrigen pH) unterscheiden ihn von anderen Mitgliedern der Gattung *Leuconostoc*. Aus diesen Gründen wurde *Oenococcus* als eigenständige Gattung eingestuft (Dicks et al. 1995), und ihm wurde die Eigenschaft eines schnell evoluirenden Organismus zugeschrieben (Yang und Woese 1989). Letztere Eigenschaft wurde nach Sequenz-Vergleichen der Gene der DNA-abhängigen RNA-Polymerase allerdings in Frage gestellt (Morse et al. 1996).

O. oeni ist, im Gegensatz zu *L. mesenteroides*, in der Lage, sich an Alkoholkonzentrationen von 10 Prozent und an pH-Werte von unter 3,5 zu adaptieren und zu wachsen. Dabei scheinen Stressproteine (Hitzeschock, Transport) und besondere Membranlipide (Lactobacillic acid) eine Rolle zu spielen (Guzzo et al. 2000, Guerrini et al. 2001, Morel et al. 2001, Da Silveira et al. 2002, Teixeira et al. 2002, Tourdot-Marechal et al. 2000).

Ein besonderes Charakteristikum von *O. oeni* und anderen Milchsäurebakterien ist die Malolactatfermentation. Mit der Malolactatfermentation (Abb.2) ist *O. oeni* in der Lage, ein Membranpotential aufzubauen, und durch dieses mittels einer F_1F_0 -ATPase Energie für die Zelle zu konservieren (Poolman et al. 1991, Salema et al. 1996). Die Malolactatfermentation ist keine Gärung im herkömmlichen Sinne, sondern eine Decarboxylierung. Dabei wird einfach protoniertes H-Malat⁻ über einen Carrier in die Zelle aufgenommen und durch das Malolactatenzym decarboxyliert. Die Produkte des Malolactatenzym (malolactic enzyme) der Milchsäurebakterien sind Lactat und CO₂. Das Malatenzym (malic enzyme) von *E. coli* und anderen Bakterien dagegen decarboxyliert Malat oxidativ und produziert Pyruvat, NAD(P)H und CO₂. Die Gene für den Malat-Transporter *mleP* und das Malolactatenzym *mleA* oder *mleS* sind identifiziert und sequenziert worden (Labarre et al. 1996, Lonvaud-Funel 1999). Das entstandene Lactat⁻ verlässt die Zelle vermutlich durch Diffusion, wobei ein Proton mit über die Membran transportiert wird (Salema et al. 1994). Ob hier ein Carrier beteiligt ist, wurde noch nicht geklärt.

Für *Lactococcus lactis* (früher *Streptococcus cremoris*) wurde allerdings Exkretion von Lactat⁻ über einen carriervermittelten, sekundären Mechanismus beschrieben,

also Lactat⁻-Symport mit zwei oder mehr Protonen (Otto et al. 1980, 1982, Ten Brink & Konings 1982, Ten Brink et al. 1985). Bei niedrigen pH-Werten findet Transport nach diesem Mechanismus nicht mehr statt, und es erfolgt nur noch erleichterte (?) Diffusion von einfach protoniertem Lactat, wie bei *O. oeni* (Konings & Booth 1981, Konings 1997). Für *L. lactis* wurde zusätzlich ein Gegentauch von einfach protoniertem H-Malat⁻ und H-Lactat beschrieben (Poolman et al. 1991). Der zugehörige Carrier (MleP) ist inzwischen identifiziert und Gegenstand von Untersuchungen (Bandell et al. 2000). Bei *Oenococcus* wird einfach protoniertes H-Malat durch einen Uniport-Mechanismus aufgenommen, es findet kein H-Malat⁻/H-Lactat- Antiport statt (Salema et al. 1994).

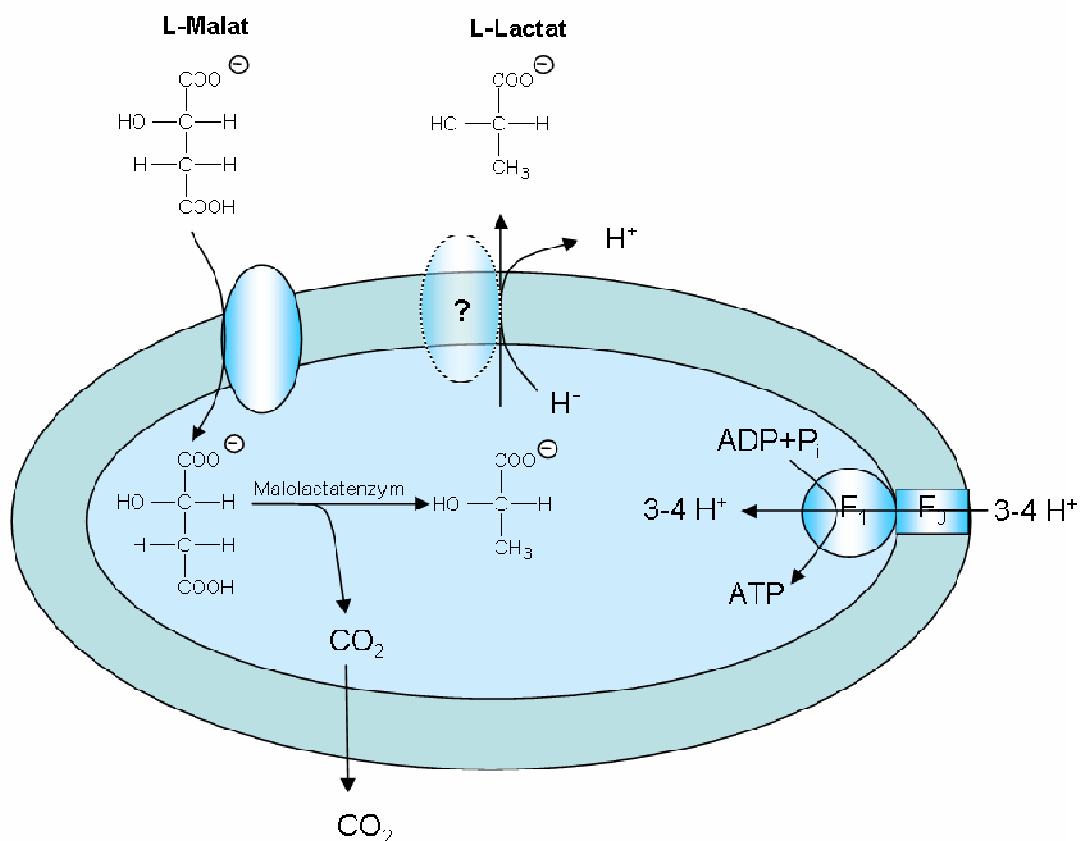


Abb. 2: Malolactatfermentation bei *Oenococcus oeni*. Nach Konings et al. 1997.

Bei der Malolactatfermentation wird nach diesem Mechanismus ein H⁺-Potential von 1 H⁺/Malat über der Membran aufgebaut. Das Potential wird dabei ausschließlich durch den Transport der Substrate und nicht durch die Decarboxylierungsreaktion gebildet. Damit wäre es möglich, 0,25 bis 0,3 mol ATP pro mol Malat zu bilden. Die

Malolactatgärung fördert das Zellwachstum bei Cofermentation mit Glucose durch Erhöhung der ATP-Ausbeute (Loubiere et al. 1992). Berichte, daß *O. oeni* auch mit Malat alleine Wachstum unterhalten kann, sind bisher nicht veröffentlicht worden.

Wegen seiner Fähigkeit zur Malolactatfermentation spielt *O. oeni* in der Weinherstellung für den biologischen Säureabbau, vor allem in Rotweinen, eine wichtige Rolle. Im biologischen Säureabbau wird durch die Decarboxylierung der zweiwertigen Äpfelsäure (Malat) zur einwertigen Milchsäure (Lactat) der Gesamtsäuregehalt des Weines verringert und der pH-Wert angehoben. Dadurch wird das Aroma der Weine verbessert (Lonvaud-Funel, 1999). Der biologische Säureabbau (BSA) kann spontan erfolgen, da die *Oenococcen* auf den Trauben und den Blättern leben und bei der Lese und der weiteren Verarbeitung in den Most gelangen. Oft wird der BSA aber auch durch den gezielten Zusatz von *Oenococcus*- Starterkulturen eingeleitet, die auf dem Markt erhältlich sind und für unterschiedliche Einsatz-Bedingungen optimiert wurden (Abb. 1D, <http://www.Lallemand.de>).

Der Einsatz von *O. oeni* im Biologischen Säureabbau hat allerdings nicht nur positive Auswirkungen auf den Wein. Abgesehen davon, daß ein Wein nach zu starkem Säureabbau das fruchtige Aroma verliert, können durch *Oenococcus* unerwünschte Nebenprodukte gebildet werden, die sich nachteilig auf das Aroma auswirken (Radler 1972, Dittrich 1987, Lonvaud-Funel 1999).

Im Citratstoffwechsel werden Diacetyl, Acetoin und Acetat gebildet. Die Schwellenwerte für die Wahrnehmung von Diacetyl und Acetoin liegen in Weißwein durchschnittlich bei jeweils etwa 5, bzw. 500 mg/L, in Rotwein sind sie etwa doppelt so hoch. Da die anfänglichen Citratgehalte im Wein größenordnungsmäßig 300 mg/L betragen, spielt im Citratstoffwechsel hauptsächlich Diacetyl (Konzentration im Wein normalerweise 5 bis 10 mg/L) eine Rolle. Diacetyl ist für ein butterähnliches Aroma verantwortlich, das von den meisten Menschen bei zu hoher Konzentration als negativ empfunden wird.

Weiterhin können biogene Amine aus dem Aminosäurestoffwechsel von *O. oeni* ein gesundheitliches Problem darstellen (Lonvaud-Funel 1996, Coton 1998, Liu et al. 1996). Durch Erhitzen oder bakteriellen Stoffwechsel kann es zur Bildung von Pyroglutamat kommen, welches ab einer Konzentration von 0,1 g/L im Wein

sensorisch wahrgenommen und negativ beurteilt wird. Ob *O. oeni* beteiligt ist, wurde noch nicht untersucht (Pfeiffer et al. 2002, 2004).

Mannit-Stich kann auftreten, wenn Milchsäurebakterien im Wein vorhandene Fructose zu Mannit reduzieren. Gleichzeitig wird Essigsäure gebildet (Jakob 1997).

Einen bedeutenden Weinefehler stellt die Bildung von Essigsäure dar. Essigsäure wird vor allem aus Restzuckern gebildet. Dafür sind hauptsächlich heterofermentative Milchsäurebakterien wie *O. oeni* verantwortlich (Lonvaud-Funel, 1999, Schneider, 2000). Sie setzen Hexosen zu D-Lactat, Ethanol und CO₂ um. Unter bestimmten Stoffwechselsituationen oder bei Anwesenheit weiterer Substrate werden oft beträchtliche Mengen an Acetat, und daran gekoppelt, weitere Produkte gebildet.

Gehalte von mehr als 1 g/L D-Lactat (Nicht L-Lactat, welches im BSA entsteht) gelten als Indikator für einen durch Milchsäurebakterien verdorbenen Wein. Weine mit Essigsäurekonzentrationen von mehr als 0,6 g/L haben den charakteristischen „Essigstich“ und zeichnen sich durch einen kratzigen Abgang aus. Ab einer Acetat-Konzentration von 1 g/L gilt ein Weißwein als nicht mehr verkäuflich (Rotwein ab 1,2 g/L). *O. oeni* macht wegen seiner hervorragenden Adaptation an das Wein-Milieu den größten, oft sogar den alleinigen, Teil der Bakterienpopulation aus. Um die Gründe für die Essigsäurebildung besser zu verstehen, wurde der Zuckerstoffwechsel von *O. oeni* im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Ziel der Untersuchung war die Aufklärung von Gärungsmechanismen, welche für die Bildung von Essigsäure in Wein und Traubenmost verantwortlich sind. Die Gründe für die Essigsäurebildung aus **Glucose** waren bereits aufgeklärt worden (Richter et al. 2001, Richter 2000), deshalb war der Fokus der Untersuchungen hauptsächlich auf den **Fructose**- Stoffwechsel ausgerichtet.

Der Zuckerstoffwechsel

Der Hexosestoffwechsel von *Oenococcus oeni* ist in Abb. 3 dargestellt. *O. oeni* konserviert Energie mittels heterofermentativer Milchsäuregärung. Dabei wird **Glucose** zu D-Lactat, Ethanol und CO₂ vergoren. Glucose-6-Phosphat wird im oxidativen Teil der Gärung über den Pentosephosphatweg zu Xylulose-5-Phosphat und CO₂ oxidiert, wobei vier Reduktionsäquivalente (2 x NAD(P)H+H⁺) entstehen. Xylulose-5-Phosphat wird darauf durch eine TPP-abhängige Phosphoketolase in

Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Acetyl-Phosphat gespalten (Phosphoketolaseweg). Das Endprodukt ist D-Lactat. Acetyl-Phosphat wird im reduktiven Teil der Fermentation zu Ethanol reduziert („Ethanolweg“), wodurch das aus dem oxidativen Teil stammende NADH wieder zu NAD^+ reoxidiert wird und erneut für die Oxidation von Glucose-6-Phosphat zur Verfügung steht. Bis hier entspricht der Hexosestoffwechsel der heterofermentativen Milchsäuregärung aus Lehrbüchern, und für eine Bildung von Essigsäure gäbe es keinen Grund.

Zusätzlich bildet *O. oeni* jedoch aus Glucose auch Erythrit und Essigsäure. Erythrit entsteht durch Isomerisierung von Glucose-6-P zu Fructose-6-P, welches durch Phosphoketolase in Erythrose-4-P und Acetyl-P gespalten wird. Erythrose-4-P wird

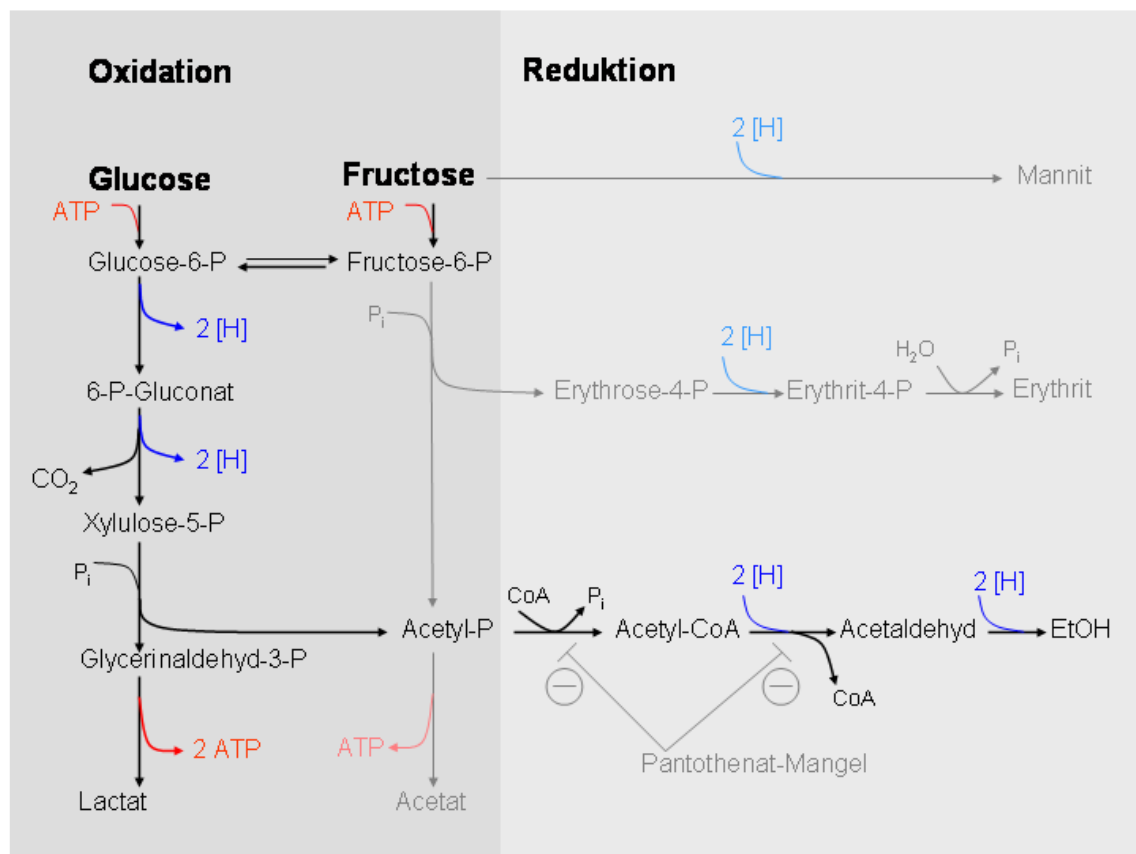


Abb. 3: Hexosestoffwechsel von *Oenococcus oeni*. Nach Veiga-Da-Cunha et al. 1993, ergänzt nach Richter et al. 2001.

zu Erythrit reduziert, und aus Acetyl-P entsteht Acetat, wobei die energiereiche Phosphatbindung durch die Acetatkinase in Form von ATP konserviert wird (Veigha-Da-Cunha et al. 1992, 1993). Die Erythritbildung stellt bei *O. oeni* einen Weg zur Reoxidation von NAD(P)H dar. Als Folge dient ein Teil des Acetyl-Phosphates nicht

als Elektronenakzeptor für die Reoxidation von NAD(P)H, und wird nach Dephosphorylierung und ATP-Bildung als Acetat ausgeschieden.

Es war gezeigt worden, daß *O. oeni* den Erythritweg aufgrund einer Limitierung im Ethanolweg nutzt (Richter et al. 2001, Richter 2000). Die Kapazität des Ethanolweges zur Reoxidation von NAD(P)H ist wegen der geringen spezifischen Aktivität der Acetaldehyddehydrogenase zu niedrig, um alleine die Reoxidation des im Pentosephosphatweg gebildeten NAD(P)H zu bewerkstelligen. Acetaldehyddehydrogenase benötigt Coenzym A als Cofaktor. Durch einen Mangel an Coenzym A, der bei einer Unterversorgung mit Pantothersäure auftritt, wird die Limitierung der Acetaldehyddehydrogenase sogar noch gravierender. Wenn *O. oeni* dagegen während des Wachstums ausreichend Pantothersäure zur Verfügung steht, wird die Bildung von Erythrit und Essigsäure fast vollständig unterdrückt. Der Erythritweg stellt somit einen Nebenweg dar, der eine Entsorgung der Reduktionsäquivalente bei Limitierung des Ethanolweges ermöglicht, und somit höhere Stoffwechsel- und Wachstumsraten erlaubt (Richter et al. 2001, Richter 2000). Die Ausscheidung von Essigsäure ist an die Bildung von Erythrit gekoppelt, und kann durch die Verabreichung von Pantothersäure abgeschwächt werden.

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

Es sollte hier untersucht werden, welche Faktoren die Umsetzung von Fructose über den Pentosephosphatweg oder über den Mannitweg steuern, und welche Auswirkungen dies auf den Stoffwechsel beim Wachstum mit Fructose unter verschiedenen Bedingungen hat.

Der Hexosetransport

Die Zuckeraufnahme in die Zelle ist ein wichtiger Teil des Stoffwechsels, der aber häufig wenig beachtet wird. Für eine quantitative Betrachtung des Energiestoffwechsels ist daher die Messung des Zuckertransportes und die Aufklärung des Aufnahme-Mechanismus von Bedeutung. Bei Bakterien gibt es passiven und aktiven Transport von Metaboliten. Die passiven Mechanismen beinhalten die Diffusion von Metaboliten, z.B. kurzkettigen Fettsäuren, über die Membran, oder die erleichterte Diffusion durch Proteinkanäle oder Trägermoleküle. Eine Anreicherung des Metaboliten gegen seinen Konzentrationsgradienten kann so nicht erreicht werden. Den aktiven Transportsystemen ist gemeinsam, daß sie ihr Substrat gegen einen Konzentrationsgradienten über die Membran transportieren und anreichern können.

Bei Bakterien sind drei prinzipielle Mechanismen oder Carriersysteme bekannt, welche die Energie zum aktiven Transport eines Metaboliten auf unterschiedliche Weise nutzen (Lengeler et al. 1999 und Abb 4). Dazu gehören erstens die **sekundären Carrier**, bei denen der Transport durch einen transmembranen Konzentrationsgradienten und/oder ein transmembranes elektrisches Potential getrieben wird. Viele sekundäre Hexose- Carrier gehören zusammen mit den Carriern, die die erleichterte Diffusion von Zuckern ermöglichen, zu einer großen Familie, der Major Facilitator Superfamily (MFS). Alle MFS- Carrier haben eine Struktur von meist zwei mal sechs Transmembranhelices gemeinsam. Zweitens gibt es **Phosphotransferasesysteme**, welche die Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat über eine Kaskade von mehreren Enzymen auf das transportierte Substrat übertragen, das beim Transport phosphoryliert wird. Zu einem Phosphotransferasesystem gehören immer mehrere Proteine: Enzym I, das HPr-Protein und das Enzym II. Das Enzym I übernimmt die Phosphatgruppe von PEP und überträgt sie auf HPr, die zweite Komponente. Enzym II transportiert und phosphoryliert den Zucker. Der Transport erfolgt substratspezifisch durch die Untereinheit IIC, die Phosphorylierung erfolgt ebenfalls substratspezifisch an Untereinheit IIB, welche die Phosphatgruppe von IIA übernimmt. Die Untereinheiten des Enzym II können Domänen eines einzigen Proteins sein, oder auf einzelne Proteine verteilt sein, die assoziiert sind. Das System arbeitet sehr effizient, da unter Aufwand von nur einer energiereichen Bindung der Zucker transportiert und für die weitere Umsetzung aktiviert, und dadurch dem Konzentrationsgleichgewicht

entzogen wird. Auf diese Weise wird ein nach innen gerichteter Konzentrationsgradient aufgebaut. Drittens gibt es die **ABC-Transporter**, welche die Energie für den Transport durch Hydrolyse von ATP und eine damit verbundene Konformationsänderung gewinnen. Sie sind prinzipiell aus 3 funktionell verschiedenen Proteinen aufgebaut: Eine membranständige Permease (2 Untereinheiten, die ein Dimer bilden), 2 Untereinheiten mit ATP-Bindekassette im Cytoplasma, und ein extrazelluläres Protein, welches für die spezifische Substratbindung mit hoher Affinität verantwortlich ist.

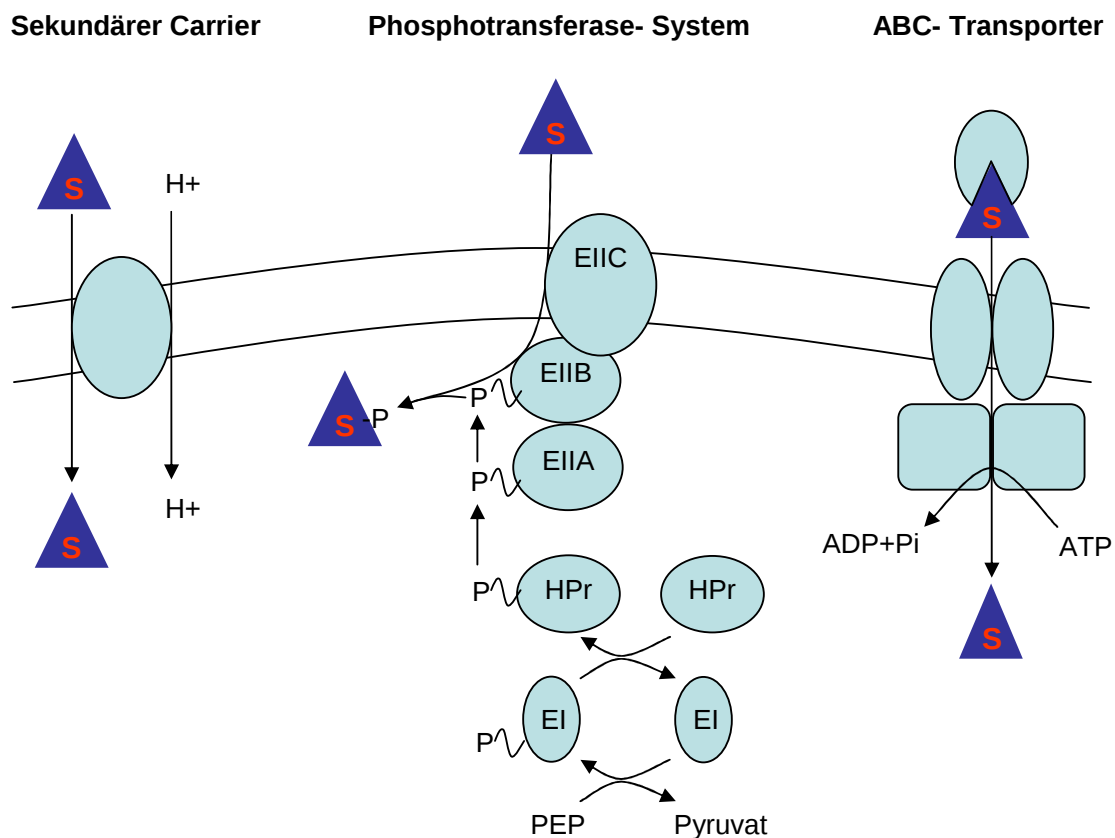


Abb. 4: Drei mögliche Mechanismen für aktive Hexoseaufnahme. Sekundäre Carrier nutzen Konzentrationsgradienten anderer Stoffe, z.B. das Protonenpotential. Phosphotransferasesysteme übertragen in einer Enzymkaskade eine Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat auf das Substrat (Gruppentranslokation), und ABC-Transporter nutzen die bei der Hydrolyse von ATP freiwerdende Energie für den Transport des Substrates.

Für die drei genannten Transportsysteme kann die theoretisch mögliche intrazelluläre Substrat-Anreicherung berechnet werden. Sie liegt für sekundäre Carrier im Bereich

von 10^2 bis 10^3 (Maloney 1990; Nicholls 1992), für PTS-Systeme in der Größenordnung von etwa 10^6 (Meadow 1990) und für ABC-Transporter etwa bei 10^5 (Ames 1990; Nicholls, D.G. 1992).

Der Hexosetransport von *O. oeni* war noch völlig unbekannt.

Das Ziel der Untersuchungen war, herauszufinden, über welchen Mechanismus *O. oeni* Glucose und Fructose aufnimmt.

Außerdem sollte der Hexosetransport quantitativ untersucht werden.

Weiterhin sollte nach Genen gesucht werden, die für Proteine kodieren, die die gefundenen Transportmechanismen ermöglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Bakterien- Stämme

Tab. 1: Verwendete Bakterien-Stämme

Gattung und Artnamen	Genotyp/Beschreibung	Referenz/Quelle
<i>Escherichia coli</i>	Stamm AN387. Wildtyp.	IMW; Wallace & Young, 1977
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Wildtyp.	IMW
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Stamm ATCC 9135. Wildtyp.	DSMZ 20240, IMW
<i>Oenococcus oeni</i>	Stamm B1. Wildtyp. Isoliert aus Wein	IMW
<i>Oenococcus oeni</i>	Stamm 5-1. Wildtyp. Defekt im hochaffinen sekundären Hexosetransport. Isoliert aus Wein	IMW
<i>Oenococcus oeni</i>	Stamm PSU-1. Wildtyp. Genom ist sequenziert (JGI). Kommerzielle Verwendung für BSA.	Penn State University (USA)

3.2 Medien

Tomatensaft – Medium (DSMZ-Katalog, Braunschweig), verändert

Abzentrifugierter Tomatensaft	250 ml
Pepton (aus Fleisch)	5 g/l
Trypton (aus Casein)	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
TWEEN 80	1 ml/l
pH = 6	

Autoklavieren bei 121°C, 20 min

C – Quelle getrennt autoklavieren

MLD – Medium (Cavin et al., 1989), verändert

Casaminosäuren, vitaminfrei	5 g/l
Hefeextrakt	4 g/l
KH ₂ PO ₄	0,6 g/l
KCl	0,45 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,13 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,13 g/l
MnSO ₄ * H ₂ O	0,003 g/l
TWEEN 80	2 ml/l
pH = 5,5	

Autoklavieren bei 121°C, 20 min

C-Quelle getrennt autoklavieren

(L–Malat 10 g/l wird normalerweise zugegeben, wurde aber immer weggelassen, da seine Anwesenheit die HPLC–Auswertung erschwert und die Fermentationsbilanzen unübersichtlicher macht.)

LB-Medium (Sambrook et al., 1989) für *E. coli*

Casein-Hydrolysat	10 g/l
NaCl	5 g/l
Hefeextrakt	5 g/l

Autoklavieren bei 121 °C, 20 min

Agarplatten:

Tomatensaftmedium oder LB-Medium mit 15 g/L Agar

MOPS-Medium (Neidhardt et al., 1974)

MOPS-Stammlösung (Konzentrat, 10 x)

MOPS, 1 M	400 ml/l
Tricine, 1 M	40 ml/l
FeSO ₄ , 0,01 M	10 ml/l
NH ₄ Cl, 1,9 M	50 ml/l
K ₂ SO ₄ , 0,276 M	10 ml/l
CaCl ₂ , 5×10^{-4} M	10 ml/l
MgCl ₂ (oder MgSO ₄), 0,528 M	10 ml/l
NaCl, 5 M	100 ml/l
Metallsalzlösung	10 ml/l

Metallsalzlösung

Na ₂ MoO ₄	3×10^{-6} M
H ₃ BO ₃	4×10^{-4} M
CoCl ₂	3×10^{-5} M
MnCl ₂	8×10^{-5} M
ZnSO ₄	1×10^{-5} M

Die Lösungen mit FeSO₄, MOPS und Tricine steril filtrieren. Die beiden Letzteren vorher mit KOH auf pH 7,4 einstellen. Die restlichen Lösungen getrennt autoklavieren und die sterilen Lösungen mischen (Stammlösung). Das 1 x MOPS-Medium mit steriler K₂HPO₄-Lösung ansetzen :

MOPS-Stammlösung (10 x)	100 ml/l
K ₂ HPO ₄ , 0,132 M	10 ml/l
mit sterilem deionisierten Wasser auf 1 L auffüllen	

3.3 Zellzucht

Vorkulturen

Je eine Kolonie von *Oenococcus*, *Leuconostoc* oder *Lactobacillus* wurde in 10 ml Tomatensaftmedium ohne zusätzliche C-Quelle in mit Alukappen verschlossenen sterilen Reagenzgläsern angeimpft und bei 30 °C ohne Schütteln inkubiert, bis eine starke Trübung zu sehen war. Dies dauerte bei *O. oeni* Stamm B1 zwei Tage, bei Stamm 5-1 mindestens drei Tage. Bei *Leuconostoc* und *Lactobacillus* war eine Inkubation über Nacht ausreichend.

E. coli wurde in 4 ml LB-Medium ohne C-Quelle über Nacht auf dem 37°C-Schüttler gezüchtet.

Hauptkulturen

Die Zucht von *O. oeni*, *L. mesenteroides* oder *Lb. plantarum* erfolgte immer anaerob in mit Gummistopfen verschlossenen Müller-Krempel-Flaschen. Es wurden 2 % Inoculum eingesetzt. Die Kulturen wurden mit Hilfe einer Kanüle, die über einen Sterilfilter mit einer Vakuumpumpe verbunden war, entgast und die Atmosphäre durch Stickstoff ersetzt. Der Vorgang des Entgasens und Stickstoffeinspülens wurde noch zweimal wiederholt. Um die anaeroben Bedingungen zu überprüfen, wurde einmal Resazurin (200 µg/l) mit oder ohne Na₂S (5g/l) zugegeben. Die Inkubation erfolgte immer bei 30 °C.

E. coli wurde aerob auf dem 37°C-Schüttler in LB-Medium gezüchtet.

Zellzucht für die Bestimmung der Wachstumsparameter und Fermentationsbilanzen

Die Zucht von *O. oeni* erfolgte in 50 ml MLD-Medium mit 20 mM Glucose, Fructose oder Ribose. Bei Cofermentation mit Fructose oder Pyruvat wurden jeweils 10 mM Zucker und 20 mM Elektronenakzeptor eingesetzt.

Zellzucht für die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Enzyme und des Hexose-Transports:

Oenococcus, *Leuconostoc* und *Lactobacillus* wurden jeweils anaerob in 200 ml MLD-Medium mit 40 mM C-Quelle, oder bei Cofermentation mit 20 mM Zucker + 40

mM Elektronenakzeptor (Fructose oder Pyruvat) bis zur Ernte in der spätlogarithmischen Wachstumsphase ($OD_{578}=0,7$) gezüchtet.

E. coli wurde aerob auf dem Schüttler bei 37 °C in 50 mL LB-Medium mit 40 mM Glucose gezüchtet, bis eine OD_{578} von etwa 1,2 erreicht war. Nach der Ernte wurden die Zellen sofort weiter verwendet oder bei -80°C eingefroren.

Zellzucht für die Bestimmung der zellulären Gehalte an

Glucose-6-Phosphat, 6-Phosphogluconat und Fructose-6-Phosphat

Die Zucht erfolgte anaerob bei 30 °C in MLD-Medium bis zu einer OD_{578} von ca. 0,8. Das Zuchtvolumen war 800 mL. Es wurde mit verschiedenen C-Quellen gezüchtet:

- 40 mM Glucose;
- 40 mM Glucose + 80 mM Fructose;
- 40 mM Fructose

Die Zellernte

erfolgte immer durch 20-minütige Zentrifugation bei 10000 g.

Zellzucht in kontinuierlicher Kultur im Chemostaten

O. oeni B1 wurde im Chemostaten gezüchtet, um die Wachstumsrate kontrollieren zu können. Beträgt das Volumen des Kulturgefäßes V [mL] und fließt die Nährlösung mit der Zuflussrate f [mL/h] zu, so ist die Verdünnungsrate $D=f/V$ [h^{-1}]. Solange die Verdünnungsrate die maximal mögliche Wachstumsrate nicht übersteigt, ist die Wachstumsrate durch die Verdünnungsrate limitiert und lässt sich durch diese steuern (Madigan et al. 1997, Schlegel 1992).

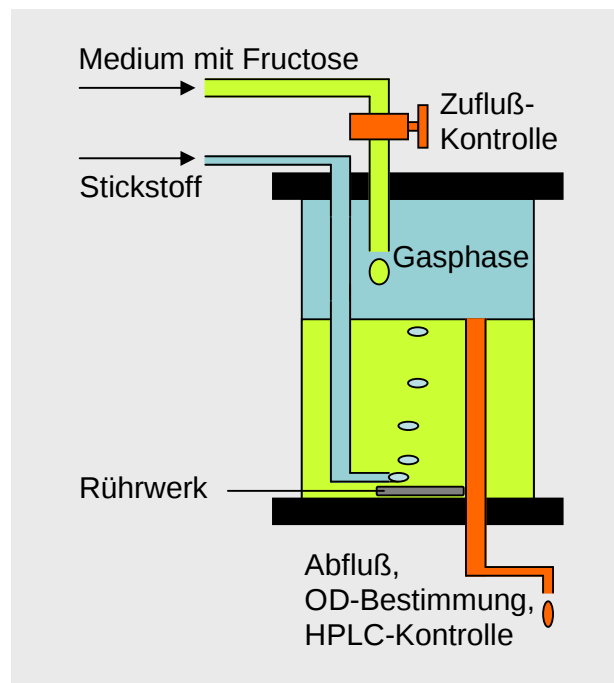


Abb. 4: Kontinuierliche anaerobe Kultur

O. oeni wurde in einem 400 mL Fermenter gezüchtet. Das Vorratsgefäß beinhaltete 10 L MLD-Medium mit 20 mM Fructose. Die Durchflussrate D wurde schrittweise von 9,2 bis 41,2 mL/h variiert, das entspricht einer maximalen Wachstumsrate μ von 0,023 bis 0,103. Zwischen den einzelnen Schritten musste immer zwei bis fünf Tage abgewartet werden, bis sich im Fermenter ein neues Gleichgewicht eingestellt hatte. Das gesamte Experiment dauerte zwei Wochen.

Zellsuspensionen für Fermentationsbilanzen

Die Zellen wurden anaerob in 400 mL MLD-Medium mit der entsprechenden C-Quelle (40 mM, oder bei Cofermentation 20 Zucker+40 mM Elektronenakzeptor, s.o.) gezüchtet, in der spätlogarithmischen Wachstumsphase geerntet und zwei mal mit 10 mL eiskaltem 1x MOPS-Medium gewaschen. Danach wurden sie in 10 ml eiskaltem 1x MOPS-Medium aufgenommen ($OD_{578} \approx 5$) und in sterile Sovirell-Röhrchen überführt. Die Zellsuspensionen wurden bei 4 °C anaerobisiert. Die entsprechende C-Quelle wurde in einer Konzentration von 10 mM, bzw. bei Cofermentation 10 mM Zucker+20 mM Elektronenakzeptor (Fructose oder Pyruvat) durch eine sterile Kanüle zugegeben. Sofort danach wurde die erste Probe (0,5 ml) für die HPLC mittels einer sterilen Kanüle entnommen, abzentrifugiert (10000 g, 5 min) und der Überstand eingefroren. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen bei 30 °C inkubiert, und es erfolgten in regelmäßigen Zeitabständen weitere Probenahmen, spätestens bis die C-Quelle verbraucht war.

Zellsuspensionen für das [^{13}C]-Markierungsexperiment

Alle Schritte waren dieselben wie die für Zellsuspensionen beschrieben. Die Zucht der Zellen und die Inkubation in Zellsuspension erfolgte mit Glucose plus Fructose. In Zellsuspension war jeweils entweder Glucose oder Fructose uniform [^{13}C]-markiert. Probenahmen erfolgten in kurzen Zeitabständen (10 min), um die Fermentation über HPLC-Analyse zu kontrollieren. Die Fermentation wurde durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 10000 g gestoppt, bevor eine der beiden Hexosen komplett verbraucht war. Die Überstände wurden mit einer Pipette abgenommen und eingefroren.

3.4 Analyse von Stoffwechselprodukten mittels HPLC

Von den Kulturen wurden am Anfang, während, und am Ende des Wachstums, oder der Inkubation in Zellsuspension, Proben von 600 µL entnommen. Diese wurden 5 min bei 10000 g abzentrifugiert. Die Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die in den Überständen gelösten Zucker, Pyruvat und die Stoffwechselprodukte Lactat, Ethanol, Acetat, Erythrit und Mannit wurden mittels einer HPLC-Säule (Aminex HPX 87H, 300 x 7,8 mm, „sulfonated divinyl benzene-styrene copolymer“, Biorad, München) bei einer Betriebstemperatur der Säule von 65 °C aufgetrennt. Bis auf Pyruvat wurden alle Substanzen mit einem Refraktometer (RID10A, Shimadzu) detektiert und mit einem Integrator (C-R6A, Shimadzu) quantifiziert. Pyruvat wurde über einen hinter das Refraktometer geschalteten UV-Detektor (Variable Wavelength Monitor, Knauer) bei 214 nm gemessen. Der verwendete Puffer war 6,5 mM H₂SO₄, und die Flussrate war 0,55 mL/min.

3.5 Ermittlung der [¹³C]-Markierung durch NMR-Spektroskopie

Die Überstände der Zellsuspensionen des [¹³C]-Markierungsexperiments wurden gefriergetrocknet. Die auskristallisierten Bestandteile wurden in 1 mL Wasser gelöst, in ein 1,5 mL Probengefäß (Eppendorf Cap) überführt und im Vakuum getrocknet.

Die ¹³C-Markierungsmuster von Glucose, Fructose, Lactat, Acetat und Mannit wurden über NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu wurde ein 400-MHz wide-bore NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) verwendet. Der getrocknete Überstand der Zellsuspension wurde in 1 mL Deuteriumoxid (D₂O; Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland) gelöst und in ein 5 mm NMR-Probengefäß überführt.

Die Feinstrukturen der [¹³C]-Multipletts, die die Isotopomer-Zusammensetzung widerspiegeln, wurden mit Hilfe der zweidimensionalen [¹H, ¹³C] HSQC NMR Spektren untersucht (Szyperski 1995). Die verwendeten Einstellungen waren $t_{1\max}=520$ ms, $t_{2\max}=231$ ms; „data size before zero filling“ war 3,072 Punkte bei t_1 und 2,048 Punkte bei t_2 . Die Bandbreite war 4,42 kHz für ¹H und 2,95 kHz für ¹³C. Die „Carrier Position“ war 4,78 ppm für ¹H und 63,1 ppm für ¹³C. (Petersen et al. 2000). Das „States Protokoll for Quadrature Detektion“ wurde angewendet. Die Pulsdauer war 10 µs, sowohl für ¹H, als auch für ¹³C. Ein „shifted squared sine bell window“

wurde vor der Fourier-Transformation in beiden Dimensionen verwendet. Alle NMR-Daten wurden mit der XWINNMR- Software von Bruker bearbeitet. Multipletts wurden aus dem 2D-Spektrum als 1D-Spuren extrahiert, indem die relevanten Spuren entlang der ^{13}C -Achse interaktiv addiert wurden. Zuordnungen wurden durch Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten über chemische Shifts erhalten und durch Laufspektren mit den Reinsubstanzen abgesichert. Die gesamte Anreicherung von ^{13}C in relevanten Kohlenstoffatom-Positionen von Polyolen und organischen Säuren wurde mittels einer eindimensionalen ^1H Spin Echo Differenz Spektroskopie untersucht (De Graaf 2000). Für die Messungen war vorteilhaft, daß die meisten Bestandteile eine oder mehrere gut aufgelöste Resonanzen im eindimensionalen Protonen-Spektrum der Kulturüberstände zeigten. Es wurde eine Gesamt-Spin-Echozeit von 7,6 ms und abwechselnde nicht-selektive Inversion von ^{13}C verwendet. Aus dem Differenzsignal wurde die gesamte Anreicherung von ^{13}C in den jeweiligen Kohlenstoffpositionen ermittelt. Da die Analyse mit der 2D-HSQC-NMR zeigte, daß alle Bestandteile im Überstand entweder uniform [^{13}C]-markiert oder nicht markiert waren, wurde die [^{13}C]-Markierung, welche über die Protonen-NMR von allen Resonanzen aus einer Substanz ermittelt wurde, als der [^{13}C]-Markierungsgrad dieser Substanz angenommen.

3.6 Messung der enzymatischen Aktivitäten

Präparation der zellfreien Extrakte

Die tief gefrorenen Zellen (-80 °C) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Danach erfolgte ein vorsichtiges Resuspendieren und Waschen der Zellen mit den folgenden Puffern:

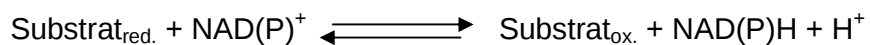
Für die Zellen für die Aktivitätsbestimmung der Dehydrogenasen aus dem Energiestoffwechsel (bis auf die Acetaldehyddehydrogenase und die Transhydrogenase) wurde 20 mL MOPS-Puffer (0,1 M, pH 6,5) verwendet.

Die Zellen für die Aktivitätsbestimmung der Acetaldehyddehydrogenase und der löslichen Transhydrogenase wurden in 10 mL TRIS/HCl (0,1 M, pH 7,4) mit 5 mM Dithiothreitol gewaschen.

Die Zellen für die Bestimmung der Aktivität der membranständigen Transhydrogenase wurden in 10 mL Kaliumphosphatpuffer (pH= 7,0, 50 mM KPi und 100 mM NaCl) gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in 10 mL des jeweiligen Puffers aufgenommen und mit 20 g Glasperlen (Zirkonia-Silica, 0,1 mm, Roth) in einer Zelmühle (Vibrogen V14, Bühler) aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte bei 4°C und 75 Hz in Intervallen von 3 mal 3 Minuten, mit Pausen von jeweils 30 Sekunden. Das Homogenat wurde dann für 10 min bei 10000 g zentrifugiert, und der Überstand (1,0-1,5 mg Protein/mL) wurde für die Messungen der Enzymaktivitäten verwendet. Der Gehalt an löslichem Protein im zellfreien Extrakt wurde mit Bradford-Proteinbestimmungs-Reagenz (Rotiquant, Firma Roth) im Microassay bestimmt.

Messung der Dehydrogenasen

Die Aktivitäten der Dehydrogenasen im Energiestoffwechsel wurden photometrisch über die NAD(P)^+ - oder NAD(P)H - abhängige Oxidation oder Reduktion ihrer Substrate bei 365 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von NAD(P)H bei 365 nm ist $3,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Über die Proteingehalte und die zeitliche Änderung der Konzentration von NAD(P)H wurde die spezifische Enzymaktivität berechnet. Es wurden immer frisch präparierte Zellextrakte eingesetzt, da nach einmaligem Einfrieren der Extrakte bei -80°C ein Aktivitätsverlust von etwa 10 Prozent beobachtet wurde. Das Reaktionsschema im Test war immer das Folgende:



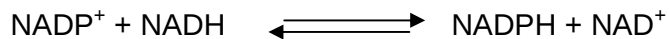
Die Pipettierschemata für die Messung der Dehydrogenasen aus dem Energiestoffwechsel sind in Tabelle 2 angegeben.

Tab. 2: Pipettierschemata für die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Dehydrogenasen im Energiestoffwechsel von *Oenococcus oeni*.

Enzym (Literatur)	Reagenz	µL im Test
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Veiga-Da-Cunha et al. 1993, Richter et al. 2003a)	Hepes (27,7 mM, pH 7,1, mit 150 mM MgCl ₂)	900
	Frischer zellfreier Extrakt	60
	NAD(P) ⁺ (50 mM)	20
	Start: Glucose-6-Phosphat (250 mM)	20
6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase (Veiga-Da-Cunha et al. 1993, Richter et al. 2003a)	Hepes (27,7 mM, pH 7,1, mit 150 mM MgCl ₂)	900
	Frischer zellfreier Extrakt	60
	NAD(P) ⁺ (50 mM)	20
	Start: 6-Phospho-Gluconat (250 mM)	20
Mannit-Dehydrogenase (Veiga-Da-Cunha et al. 1993, Richter et al. 2003a)	Hepes (27,7 mM, pH 7,1, mit 150 mM MgCl ₂)	900
	Frischer zellfreier Extrakt	60
	NAD(P)H (8,5 mM)	20
	Start: Fructose (2500 mM)	20
Erythrit-4-Phosphat-Dehydrogenase (Veiga-Da-Cunha et al. 1993, Richter et al. 2003a)	Hepes (27,7 mM, pH 7,1, mit 150 mM MgCl ₂)	900
	Frischer zellfreier Extrakt	60
	NADPH (8,5 mM)	20
	Start: Erythrose-4-Phosphat (50 mM)	20
Lactat-Dehydrogenase (Veiga-Da-Cunha et al. 1993, Richter et al. 2003a)	Hepes (27,7 mM, pH 7,1, mit 150 mM MgCl ₂)	900
	Frischer zellfreier Extrakt	60
	NAD(P)H (8,5 mM)	20
	Start: Pyruvat (25 mM / 50 mM)	20
Acetaldehyd-Dehydrogenase (Richter et al. 2001, 2003a)	TRIS/HCl (0,1 M, pH 7,4)	790
	Frischer zellfreier Extrakt	100
	NADH (12,5 mM)	50
	Dithiothreitol 250 mM	20
	Start: Acetyl-CoA (5,625 mM)	40

Messung der NADPH-Transhydrogenase

Pyridinnucleotidtranshydrogenasen katalysieren die reversible Übertragung von Reduktionsäquivalenten zwischen dem NAD- und dem NADP-Pool nach der folgenden Gleichung:



Die Transhydrogenaseaktivitäten wurden mit frischen zellfreien Extrakten bestimmt. Es wurden zwei unterschiedliche Tests verwendet. Einer war für die Messung einer löslichen, der andere für eine membranständige Transhydrogenase entwickelt worden. Beide Tests funktionieren über die Messung der Reduktion eines Substratanalogons für NAD^+ . Für die Messung der löslichen Transhydrogenase wurde die Reduktion von Thionicotinamid-Adenin-Dinucleotid (tNAD^+ , Sigma Chemical Co.) bei 400 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient von tNADH ist $11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Boonstra et al. 1999). Die Aktivität der membrangebundenen Transhydrogenase wurde mit Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid (AcPdAD^+) bei 375 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von AcPdADH ist $6,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hickman et al. 2001, Lever et al. 1991).

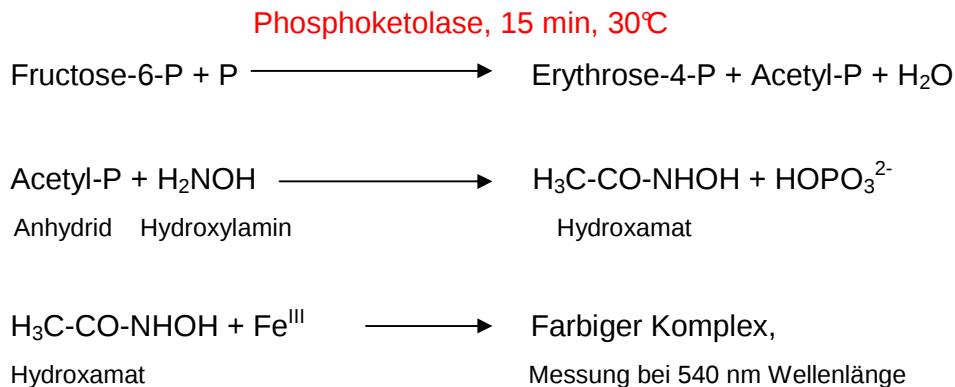
Tab. 3: Pipettierschema für die Messung der Transhydrogenaseaktivitäten.

Enzym	Reagenz	μL im Test
Lösliche Transhydrogenase	Tris/HCl (58 mM, pH 7,0)	860
	NADPH (5 mM)	20
	tNAD^+ (5 mM)	20
	Start: Zellextrakt	100
Membrangebundene Transhydrogenase	KP_i (60 mM, pH 7,0, + 120 mM NaCl)	840
	NADPH (5 mM)	20
	AcPdAD^+ (5 mM)	20
	Beta-Mercaptoethanol (500 mM)	20
	Start: Zellextrakt	100

Fructose-6-P-Phosphoketolase

Der Test basiert auf der Messung der Bildungsgeschwindigkeit von Acetyl-Phosphat bei der Phosphoketolasereaktion nach dem untenstehenden Reaktionsschema.

(Veigha-Da-Cunha et al. 1993, Evans and Ratledge 1984, Lipmann and Tuttle 1945).



Die Konzentration von Acetyl-Phosphat muss über eine Eichgerade bestimmt werden. Diese wird anstatt mit Acetyl-Phosphat mit Bernsteinsäure-Anhydrid erstellt. Eine Konzentration von 2,5 mM Bernsteinsäure-Anhydrid führt in der Testküvette zu derselben Extinktion, wie 2mM Acetyl-Phosphat, deshalb ist für die Bestimmung von Acetyl-Phosphat eine Umrechnung der erhaltenen Extinktionen erforderlich. Für die Eichgerade muß eine Verdünnungsreihe der Stammlösung hergestellt werden (0-2,5 mM). Pipettieren: je 500 µL Bernsteinsäurehydroxamatlösung und 500 µL FeCl₃ Lösung. Doppelbestimmung !

Reagenzien:

- Hydroxylamin-Lösung (instabil)
28%ige (w/v) Hydroxylaminhydrochlorid (4M) mit selbem Volumen 14%iger NaOH (3,5M) fast neutralisieren. PH-Wert sollte 5,4 sein. Die so hergestellte Lösung ist instabil und muß täglich frisch aus Stammlösungen hergestellt werden.
- FeCl₃-Lösung
20% (w/v) FeCl₃ in 0,1M HCl
- Bernsteinsäurehydroxamat-Stammlösung für Eichkurve (im 100 mL Meßkolben):
1 g (=10 mmol) Bernsteinsäureanhydrid in 40 mL 2 M Hydroxylaminlösung auflösen, 10 min warten, mit Wasser auf 100 mL auffüllen. 40-fach verdünnen.

Die Lösung enthält jetzt 2,5 mM Bernsteinsäurehydroxamat.

2,5 mM Lösung ergibt mit gleichem Volumen FeCl_3 Lösung dieselbe Farbintensität wie eine 2 mM Acetyl-Hydroxamat-Lösung, Farbintensität also 80 %. Deshalb Umrechnen erforderlich !

Tab. 4: Pipettierschema für die Messung der Phosphoketolaseaktivitäten

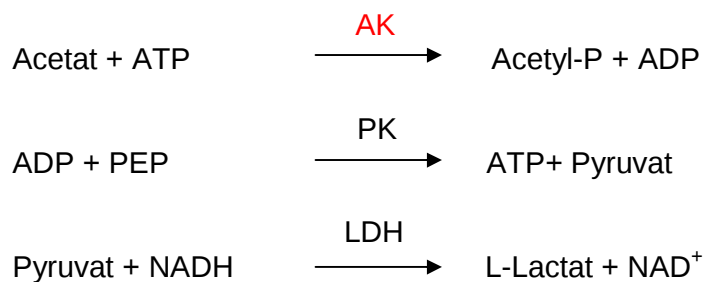
Reagenz	Konz. Stammlsg.	Konz. Im Test	μL im Test
Histidin/HCl Puffer, pH 6,9	150 mM	50 mM	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ Puffer, pH 7,0	150 mM	50 mM	370
MgCl_2	50 mM	1 mM	20
DTT	100 mM	2 mM	20
TPP	50 mM	1 mM	20
Zellfreier Extrakt			100
Start: Fructose-6-P	100 mM	10 mM	100
15 min bis 2 h bei 30 °C inkubieren , Zeit notieren			
Stop: Hydroxylamin hydrochlorid, pH 5,4	2 M		500
10 min bei Raumtemperatur Inkubieren			
Reagenz für Farbreaktion	20 % FeCl_3 (w/v) in 0,1 M HCl		1500
Präzipitat abzentrifugieren (5 min)			
Messung bei 540 nm			

Die spezifische Aktivität wird in $\mu\text{mol} / (\text{min g Protein})$ angegeben.

Acetatkinase**Tab. 5: Pipettierschema für die Messung der Acetatkinaseaktivitäten**

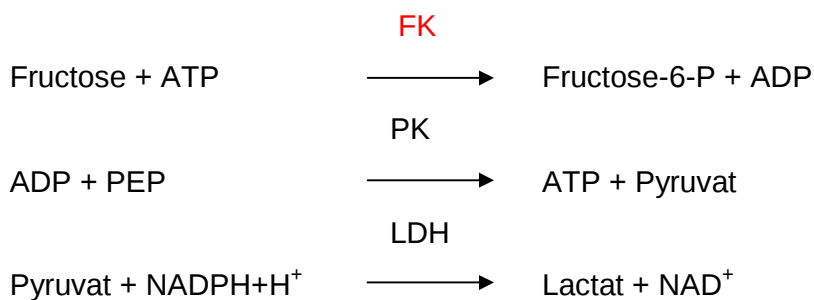
Reagenz	Konz. Stammlsg.	Konz. im Test	µL
TRIS/HCl pH 7,5	0,1 M	56 mM	580
MgCl ₂	1 M	5 mM	5
Na-Acetat	2 M	300 mM	150
ATP	80 mM	8 mM	100
PEP	33 mM	1,2 mM	35
NADH	12 mM	0,12 mM	10
PK	300 U/mL	3 U/mL	10
LDH	850 U/mL	8,5 U/mL	10
Warten, bis die Extinktionsänderung konstant ist			
Start: Zellfreier Extrakt			100

Die Messung der Acetat-Kinase-Aktivität funktioniert über einen Test mit drei gekoppelten enzymatischen Reaktionen, die von Acetatkinase (AK), Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) katalysiert werden. Die erste Reaktion ist die Acetatkinasereaktion, in der zweiten Reaktion dephosphoryliert Pyruvatkinase Phosphoenolpyruvat mit dem in der ersten Reaktion entstandenen ADP. In der letzten Reaktion wird NADH mit Pyruvat durch die Lactatdehydrogenase oxidiert. Die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme von NADH wird bei 365 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient von NADH beträgt $3,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Hilfsenzyme werden im Überschuß eingesetzt, so daß nicht sie die Reaktion limitieren, sondern die Acetatkinase (Bergmeyer 1983 S. 454). Das Reaktionsschema ist das Folgende:



Fructokinase

Das Prinzip der Messung der Aktivität der Fructokinase (FK) ist das selbe, wie für die Acetatkinase, nur wird hier nicht Acetat, sondern Fructose phosphoryliert (Schaffer 1997):



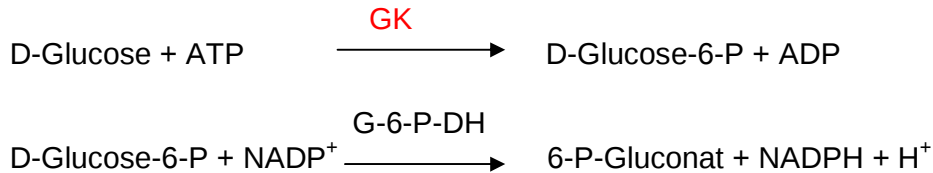
Tab. 6: Pipettierschema für die Messung der Fructokinaseaktivitäten

Reagenz	Konz. Stammlsg.	Konz. im Test	µL
TRIS/HCl pH 7,5	61 mM	50 mM	800
+ EDTA	1,2 mM	1 mM	
+ MgCl ₂	6,1 mM	5 mM	
+ KCl	24 mM	20 mM	
NADH	10 mM	0,2 mM	20
Fructose	100 mM	2 mM	20
PEP	50 mM	1 mM	20
PyrK	50 U	1 U	20
+ LDH	50 U	1 U	
Zellfreier Extrakt			100
5-10 min warten, bis die Extinktionsänderung konstant ist			
Start: ATP	50 mM	1 mM	20

Glucokinase

Die Messung der Glucokinase-Aktivität wurde mittels zweier gekoppelter enzymatischer Reaktionen durchgeführt, die von Glucokinase (GK) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysiert werden (Bergmeyer 1974). In der ersten Reaktion wird Glucose von der Glucokinase ATP-abhängig phosphoryliert. In der zweiten Reaktion wird das entstandene Glucose-6-Phosphat mit NADP⁺ oxidiert. Gemessen wird die Zunahme der Konzentration von NADPH, welches in der zweiten

Reaktion entsteht. G-6-P-DH wird in einer Aktivität zugesetzt, die die erste Reaktion nicht limitiert. Der Extinktionskoeffizient von NADPH bei 365 nm ist $3,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



Tab. 7: Pipettierschema für die Messung der Glucokinaseaktivitäten

Reagenz	Konz. Stammlsg.	Konz. im Test	μL
TRIS/HCl pH 7,6	0,1 M	40 mM	400
MgCl ₂	0,1 M	2 mM	20
NADP ⁺	11,5 mM	0,6 mM	50
ATP	16,2 mM	1,6 mM	10
G-6-P-DH	70 U/mL	1,4 U/mL	20
Glucose in Puffer	0,5 M	200 mM	400
Warten, bis die Extinktionsänderung konstant ist			
Start: Extrakt			100

Phosphoglucoseisomerase:

Die spezifische Aktivität der Phosphoglucoseisomerase, sowie die K_i - und K_i' -Werte von 6-Phospho-Gluconat und Erythrose-4-Phosphat wurden von Inka Hamann im Rahmen ihrer Diplomarbeit bestimmt. Genaue Angaben zur Durchführung und Berechnung sind dort zu finden (Hamann 2003).

Die Phosphoglucoseisomeraseaktivität wurde über die NADP-abhängige Oxidation von Glucose-6-Phosphat in HEPES-Puffer (25 mM, pH 7,1) mit 3 mM MgCl₂, 1mM NADP⁺, 0,2-10 mM Fructose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (2 U/mL) ermittelt (ähnlich wie in der Methode von Ruijter and Visser 1999).

Kinetiken der Reaktion wurden in Gegenwart von 0; 1,5; 3; 4,5 und 6 μM Erythrose-4-Phosphat und 0, 100, 150, 200 und 250 μM 6-Phospho-Gluconat ermittelt, um die Hemmung der PGI und die K_i -Werte für die beiden Metabolite zu bestimmen. Die Lineweaver-Burk-Plots wurden mittels eines Computerprogramms berechnet, welches die Fehler mit der Methode der kleinsten Quadrate minimiert (Jürgen Fröhlich, Download siehe Internetadressen).

3.7 Bestimmung der zellulären Konzentrationen von 6-Phospho-Gluconat, Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat

Herstellen, Inkubieren und Stoppen der Zellsuspensionen:

Nach der Zellzucht und Ernte (siehe oben) wurden die Zellen mit 10 mL MOPS-Medium pro 400 mL Zentrifugenbecher gewaschen. Danach wurden die Zellen erneut in MOPS-Medium (4°C) aufgenommen, so daß eine dickflüssige Zellsuspension erhalten wurde. Die OD₅₇₈ wurde notiert, sie sollte ca. 150 bis 200 betragen. Die Suspension wurde in Sovirellröhrchen überführt, so daß das Endvolumen mitsamt C-Quelle später 3 mL betrug (= 0,003 L = **Volumen_{Zellsuspension+Substrat}**). Zunächst wurden die Zellen jedoch ohne C-Quelle anaerobisiert (4°C). Danach wurde die Suspension für einige Minuten zum Aufwärmen bei 30°C inkubiert und die C-Quelle wurde über eine Kanüle zugespritzt. Die Endkonzentration der jeweiligen C-Quelle betrug für die fünf verschiedenen Ansätze:

Nach Glucosezucht:	50 mM Glucose, oder 40 mM Glucose + 80 mM Pyruvat
Nach Zucht mit Glucose+Fructose:	40 mM Glucose + 80 mM Fructose
Nach Zucht mit Fructose:	50 mM Fructose, oder 40 mM Fructose + 80 mM Pyruvat

Hier war es wichtig, die **OD_{Zellsusp+Substr}** zu berechnen und zu notieren, der Wert wurde für die spätere Berechnung gebraucht. Die Zellen wurden für 5 min bei 30 °C mit C-Quelle inkubiert. Die Konzentration der C-Quelle und die Inkubationsdauer waren so gewählt, daß kein Substrat zum Stopp-Zeitpunkt vollständig verbraucht war. Die Fermentation wurde mittels Schockgefrieren der Zellen durch Eintauchen des Sovirellröhrchens in flüssigen Stickstoff für 30 Sekunden und Schwenken (damit Glas nicht platzte) gestoppt.

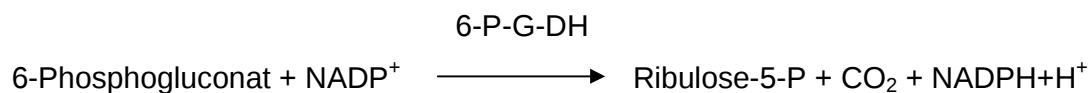
Herstellung der Zellextrakte (alle Schritte auf Eis):

Die 3 mL Zellsuspension wurden mit einem Fünftel Volumen 6N Perchlorsäure unter ständigem Vortexen aufgetaut. Danach wurden sie 3 x 3 min mit Ultraschall aufgeschlossen und dabei gleichzeitig gekühlt (4 °C). Es folgte ein

Zentrifugationsschritt (10000 g, 5 min). Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Das Pellet wurde mit 1 mL 3N Perchlorsäure aufgenommen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem Überstand aus dem vorigem Schritt vereinigt und dann mit 5N K₂CO₃ auf pH 7 (pH-Papier !) titriert. Es bildete sich ein milchiger Niederschlag (Kaliumperchlorat). Das **Gesamtvolumen_{Probe}** wurde bestimmt und notiert (wichtig für Berechnung !). Der weiße Niederschlag wurde abzentrifugiert (2 min, 10000 g). 1 mL des Überstandes wurde für die HPLC aufbewahrt, um zu kontrollieren, daß kein Substrat vollständig verbraucht worden war. Der Rest des Überstandes wurde bei -20°C tiefgefroren, oder direkt für die Bestimmung von 6-Phospho-Gluconat, Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat eingesetzt.

Bestimmung von 6-Phospho-Gluconat:

Für die Bestimmung von 6-Phospho-Gluconat wurde ein enzymatischer Test verwendet, der auf der photometrischen Messung des bei der Oxidation von 6-Phospho-Gluconat durch 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase entstehenden NADPH bei 365 nm basiert (Bergmeyer 1974):



Der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{\text{NADPH } 365 \text{ nm}}$ ist 3,5 mM⁻¹ cm⁻¹.

Tab. 8: Pipettierschema für die Messung der 6-P-Gluconatkonzentration

Reagenz	Konz.	Konz. Im Test	µL im Test
Triethanolamin-Puffer pH 7,6	200 mM	118 mM	588
Probe			367 *
NADP ⁺	11 mM	0,4 mM	36,7
5-10 min warten, bis die Extinktionszunahme konstant ist			
Start: 6-P-Gluconat-DH	24 U/mL	0,18 U/mL	7,3

* **Verdünnungsfaktor**_{Küvette} ist dann 2,72

Berechnung der zellulären Konzentration von 6-Phospho-Gluconat:

Das Verhältnis Zelltrockengewicht zu OD₅₇₈ betrug 300 mg TG L⁻¹ OD₅₇₈⁻¹. Mit der Kenntnis, daß 1 g Trockengewicht bei *O. oeni* einem Zellvolumen von 2,19 mL

entspricht (Salema et al. 1996), wurde für die Berechnung der zellulären Konzentration von 6-Phospho-Gluconat folgende Formel erstellt und verwendet:

$$\text{Zelluläre Konz (mM)} = \frac{\Delta E * \text{Verdünnungsfaktor}_{\text{Küvette}} * \text{Gesamtvol}_{\text{Probe (in mL)}}}{2,3 * \text{OD}_{\text{Zellsusp+Substr}} * \text{Vol}_{\text{Zellsusp+Substr}} \text{ (in L)}}$$

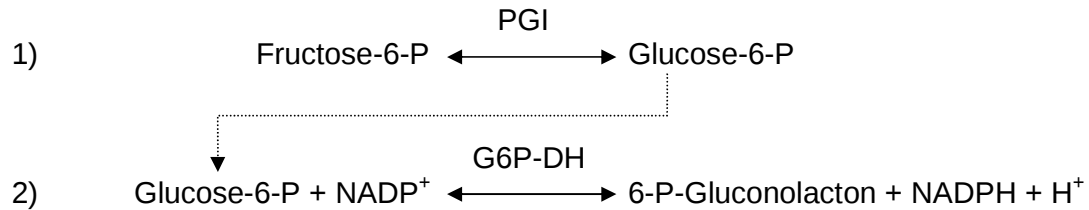
Bestimmung von D-Glucose-6-P und D-Fructose-6-P

Tab. 9: Pipettierschema für die Messung der Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat

In die Küvette pipettieren	Konz. Der Lösung	µL im Test	Konz. in Küvette
Triethanolamin; pH 7,6	0,43	470	0,2 M
Probe (Extrakt)	Bis 0,32 mM G-6-P + F-6-P	470	Bis 0,15 mM G-6-P + F-6-P
NADP ⁺	20 mM	10	0,2 mM
MgCl ₂	500 mM	10	5 mM
Mischen, Küvetteninhalt auf 25 °C temperieren, 5 min E ₃₆₅ messen (E1)			
G-6-P-DH-Suspension	17 U/mL	10	0,17 U/mL
Mischen, E ₃₆₅ bis zum Stillstand der Reaktion (ca. 5 min) messen (E2)			
PGI-Suspension	70 U/mL	10	0,7 U/mL
Mischen, E ₃₆₅ bis zum Stillstand der Reaktion (ca. 5 min) messen (E3)			

Die Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat wurden mittels eines enzymatischen Testes in zwei Schritten bestimmt (Bergmeyer 1974). Glucose-6-Phosphat wurde über Oxidation durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und die Messung der zeitabhängigen Zunahme der Konzentration von NADPH bei 365 nm bestimmt. $E_{\text{NADPH}(365)}$ ist $3,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Fructose-6-Phosphat wurde gemessen, sobald die Reaktion durch den Verbrauch von Glucose-6-Phosphat zum Stillstand gekommen war. Durch Zugabe von Phosphoglucoseisomerase wurde Fructose-6-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat isomerisiert und über Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase oxidiert. Auch hier wurde die Zunahme der Konzentration von NADPH verfolgt:



Berechnung der Metabolitkonzentrationen:

Die Formel ist die selbe wie für die Berechnung der Konzentrationen von 6-Phospho-Gluconat. Die Parameter waren folgende:

$$\Delta E_{\text{Glucose-6-P}} = E2 - E1; \text{ Verdünnungsfaktor}_{\text{Küvette}} = 2,06$$

$$\Delta E_{\text{Fructose-6-P}} = E3 - E2; \text{ Verdünnungsfaktor}_{\text{Küvette}} = 2,09$$

$\text{Konzentration (mM)} = \frac{\Delta E * \text{Verdünnungsfaktor}_{\text{Küvette}} * \text{Gesamtvolumen}_{\text{Probe}} \text{ (mL)}}{2,3 * \text{OD}_{\text{Zellsusp+Substr}} * \text{Volumen}_{\text{Zellsusp+Substr}} \text{ (L)}}$
--

3.8 Bestimmung der Phosphotransferaseaktivität (nach Chassy und Thompson, 1983)

Reagenzien:

- Glucose	50 mM
- Fructose	50 mM
- Kaliumphosphat- Puffer	10 mM; pH=7, MgCl ₂ 5 mM
- Toluol-Aceton	1:9 (v/v)
- Kaliumphosphat- Puffer	56 mM, pH 7, mit 5,6 mM MgCl ₂
- Phosphoenolpyruvat	250 mM
- NADH	15 mM
- D-Lactatdehydrogenase	EC 1.1.1.28; Typ XI, Sigma, 250 U/ml 1 Teil Originalsuspension und 5 Teile KP _i - Puffer)

Präparation toluenisierter Zellen

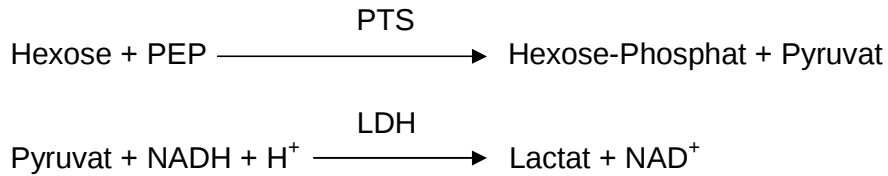
Nach Zucht mit dem entsprechenden Substrat und Zellernte wurden die Zellen in 10 mL KPi -Puffer (10 mM, 4°C) gewaschen und in 5 mL desselben Puffers wieder aufgenommen, die OD_{578} sollte 50 bis 60 betragen und wurde notiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis gestellt. Kurz vor dem Test wurde 1 mL Aliquot der Zellsuspension in einem 10 mL Reagenzglas gevortext, dabei wurden zur Permeabilisierung der Zellmembranen 50 μL Toluol-Aceton-Gemisch (1:9) zugegeben. Das Röhrchen wurde rasch mit Parafilm verschlossen und die Suspension weitere 5 min bei $V_{\max}$ gevortext. Sofort danach wurde der Test auf Phosphotransferaseaktivität durchgeführt.

Messung der Phosphotransferaseaktivität

Tab. 10: Pipettierschema für die Messung der Phosphotransferaseaktivität

Reagenz	Konz. Im Test	μL in Küvette
KPi - Puffer, 56 mM, pH = 6,5-7,5; mit 5,6 mM MgCl_2	50 mM KPi 5 mM MgCl_2	900
PEP 250 mM	5 mM	20
NADH 15 mM	0,3 mM	20
D-LDH (EC 1.1.1.28; Typ XI, Sigma), 250 U/ml	5 U/ml	20
Zellsuspension		20
5-20 min warten, bis sich konstante Temp. und Extinktionsabnahme eingestellt hat		
Start: Zucker 50 mM	1 mM	20
Absorption bei 365 nm verfolgen		

Der Test beinhaltet zwei gekoppelte enzymatische Reaktionen, die letztlich den Verbrauch von NADH zur Folge haben. Durch die PEP-abhängige Zuckerphosphorylierung entsteht Pyruvat. Dieses wird in einer Folgereaktion durch Lactatdehydrogenase zu Lactat reduziert. Die dadurch bedingte Abnahme der NADH-Konzentration pro Minute entspricht der Phosphotransferaseaktivität und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 365 nm verfolgt werden. Der Extinktionskoeffizient für NADPH beträgt $3,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Das Reaktionsschema ist folgendes:



Bei *Oenococcus oeni* können Nebenreaktionen die Messung stören. So sind in den permeabilisierten Zellen auch die Enzyme NADH-Oxidase und Mannitdehydrogenase vorhanden. Vor allem letztere stellt ein Problem dar, wenn man die PTS-Aktivität mit Fructose bestimmen will. Um nicht statt der PTS- die Mannitdehydrogenaseaktivität zu bestimmen, sollte in diesem Fall die Reaktion mit PEP gestartet werden.

Die spezifische Phosphotransferaseaktivität wurde in $\mu\text{mol} / (\text{g TG min})$ angegeben.

3.9 Transportmessungen:

Messung des Hexosetransportes

Reagenzien:

- FPT-Puffer (100 mM).

Dieser Puffer ist ein Drei-Komponenten-Puffer, und puffert über ein breites pH-Spektrum. Die Komponenten sind:

Fumarat-Puffer, (100 mM, $\text{pK}_{\text{S1}}=3,0$, $\text{pK}_{\text{S2}}=4,5$),

Kaliumphosphatpuffer (100 mM, $\text{pK}_{\text{S1}}=2,14$, $\text{pK}_{\text{S2}}=6,86$, $\text{pK}_{\text{S3}}=12,4$),

Tricine (100 mM, $\text{pK}_{\text{S}}=8,1$).

Die drei Puffer wurden jeweils einzeln mit dem gewünschten pH-Wert (3-9) angesetzt und in gleichem Volumenverhältnis gemischt.

- Ribose (100 mM)
- Glucose (1 M)
- Fructose (1 M)
- $[\text{U}^{14}\text{C}]$ -Glucose (Hartmann Analytic, 408 μM , 543900 DPM/nmol). Durch geeignete Verdünnung mit kalter Glucose (500 mM) wurde $[\text{U}^{14}\text{C}]$ -Glucose in einer Konzentration von 100 mM und einer spezifischen Aktivität von 1777 DPM/nmol erhalten.

- [^{14}C]-Fructose (Amersham Biosciences, 705 μM , 630000 DPM/nmol). Durch Verdünnung mit kalter Fructose (200 mM) wurde [^{14}C]-Fructose von mit einer Konzentration von 100 mM mit einer spezifischen Aktivität von 2226 DPM/nmol erhalten.
- Lithiumchlorid (0,1 M)
- Scintillationslösung (Rotiscint ecoplus, Roth)
- Ionophore in 100 % EtOH gelöst: 0,2 mM Valinomycin (Serva), 0,1 mM Nigericin (Sigma), 20 mM CCCP (Sigma), 1 mM SF6847 (Wako Chemicals, Neuss, Deutschland, nicht mehr erhältlich)

Herstellung der Zellsuspension

Nach der anfangs beschriebenen Zellzucht und –Ernte wurde das Zellpellet zweimal mit 20 mL FPT-Puffer mit dem gewünschten pH-Wert gewaschen und in FPT-Puffer resuspendiert. Die OD_{578} wurde eingestellt, sodaß sie etwa 3,0 betrug. Dies war wichtig, da bei einer zu großen Zellmasse die Membranfilter verstopfen und die Filtration nicht zügig genug vonstatten geht. Ist die OD zu niedrig, wird der Messwert zu klein und die Fehler zu groß. Zur Energetisierung wurden die Zellen 20 min mit 3 mM Ribose inkubiert. Bei Bedarf wurden nach 18 min die Ionophore Valinomycin (2 μM), Nigericin (1 μM), CCCP (200 μM) oder SF6847 (10 μM) zugesetzt und 2 min bis zur Transportmessung mit inkubiert.

Transportmessungen

Von einer [^{14}C]-Glucose- oder [^{14}C]-Fructoselösung wurde in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß 10 % des Gesamtvolumens des experimentellen Ansatzes (letzteres betrug normalerweise 200 μL) in der 10-fachen Endkonzentration vorgelegt. Die spezifische Aktivität war dabei 1777 bzw. 2226 DPM/nmol. Bei Bedarf wurde zusätzlich kompetitives Substrat (10 % des Gesamtvolumens, 10-fache Endkonzentration) zugegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von energetisierter Zellsuspension, so daß das Gesamtvolumen erreicht wurde. Die Endkonzentration des radioaktiven Substrates lag zwischen 5 μM und 50 mM. Nach 20 Sekunden wurde die Reaktion gestoppt, indem 100 μL Zellsuspension entnommen und in 900 μL eiskaltes LiCl (0,1 M) pipettiert wurden. Die Zellen wurden sofort mit einem Vakuum-Filtrationsgerät (FH 225V Ten-Place Filter Manifold, Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) filtriert. Dazu wurden die Membranfilter aus

Cellulosenitrat ($\varnothing$ 25 mm, 0,2 μ m Porengröße, Schleicher & Schuell) vor der Filtration mit 0,1 M LiCl-Lösung befeuchtet. Nach der Filtration wurden die Zellen auf dem Filter dreimal mit 1 mL 0,1 M LiCl-Lösung gewaschen.

Bestimmung der Radioaktivität in der Zelle

Die Membranfilter wurden in Probenröhrchen mit 4 mL Scintillationslösung überführt. Die Radioaktivität wurde im Scintillationszähler (Perkin Elmer) bestimmt. Zur Bestimmung der Aufnahmeaktivität wurde zusätzlich für jede Substratkonzentration ein Blindwert (unspezifische Bindung) ermittelt. Dazu wurden im Reaktionsgefäß die Stopplösung (0,1 M LiCl) mit dem [14 C]-Substrat vorgelegt und erst dann die Zellen zugegeben (Endvolumen = 1 mL), filtriert und gewaschen. Für jede Konzentration und für jeden Blindwert wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Berechnung der Aufnahmeaktivität

Von den gemessenen DPM-Werten der Proben wurde der jeweilige Blindwert abgezogen und die Transportaktivität in U/g (μ mol min $^{-1}$ g TG $^{-1}$) angegeben. Das Trockengewicht der Zellen auf dem Filter wurde über die gemessene OD₅₇₈ der Zellsuspension im Reaktionsansatz und das Volumen der filtrierten Zellsuspension berechnet (Für OD₅₇₈ von 1 wurde ein Trockengewicht von 300 mg TG / L bestimmt). Die intrazelluläre Konzentration an [14 C]-Substrat wurde berechnet, indem für 1 g Trockengewicht ein Zellvolumen von 2,19 mL angenommen wurde (Salema et al. 1996).

3.10 Bioinformatische Methoden

Die Genomsequenz von *Oenococcus oeni*

Das Genom von *Oenococcus oeni* (PSU-1) ist vom DOE Joint Genome Institute (JGI, Walnut Creek, Californien, USA) sequenziert und im Internet veröffentlicht worden (siehe Literatur, Internetadressen). Es handelt sich hierbei um einen vorläufigen Entwurf, der noch Lücken enthält. 1,8 Megabasen wurden sequenziert, und es wurden insgesamt 1800 potentielle Gene gefunden, die auf 50 einzelnen

Genomabschnitten (Scaffolds oder Contigs) verteilt sind (Stand: 13.09.2002 bis 09.08.2004).

BLAST-Analyse

Das Prinzip

Das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ist ein heuristischer Suchalgorithmus für einen schnellen Datenbankvergleich. Die BLAST-Programme ermöglichen es, in kurzer Zeit ganze Datenbanken zu durchsuchen und dabei Bereiche mit hoher Übereinstimmung zwischen der Suchsequenz und der Datenbanksequenz zu finden. Sie wurden 1990 am National Center for Biotechnology Information (NCBI) entwickelt (Atschul et al. 1990), ihre Benutzung wird auf einer Vielzahl von Websites angeboten. Als Ergebnis einer BLAST-Analyse werden folgende Elemente angegeben: die Suchsequenz (Query), die Vergleichssequenz in der Datenbank (Hit), die Länge der Vergleichssequenz (Length), die Länge des Alignments zwischen der Such- und Vergleichssequenz (Alignment length), die Signifikanz des Alignments (Score), der Erwartungswert (E-Wert, E-Value), der Anteil der identischen Positionen im Alignment (Identities) und der Anteil der konservativen Substitutionen (Positives) in Prozent (Hansen 2001, Rauhut 2001).

Die Übereinstimmung von miteinander verglichenen Sequenzen wird bei einer BLAST-Analyse in Form des Scores und des Erwartungswertes angegeben. Der Score gibt die Qualität der Übereinstimmung zwischen zwei Sequenzen an, ist aber von der Länge der Sequenz unabhängig, und somit nicht normiert. Deshalb wird ein zweiter Wert, der Erwartungswert, angegeben. Dieser berechnet sich aus dem Score und der Länge der Sequenz, d.h. er ist normiert. Verschiedene E-Werte sind miteinander vergleichbar. Der E-Wert ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, daß die gefundene Sequenz nur zufällig mit der vorgegebenen Sequenz übereinstimmt. Je kleiner der E-Wert, desto höher die Wahrscheinlichkeit, daß zwei Sequenzen homolog zueinander sind (http://itb.unistuttgart.de/training/bioinformatics02/GROUP6/session_4.html).

Eine Homologiesuche sollte möglichst mit einer Protein-Suchsequenz durchgeführt werden, denn mit Proteinsequenzen können entferntere Verwandtschaften besser

gefunden werden, als mit einer Nucleotidsequenz. Zum einen liegt dies am degenerierten genetischen Code, und zum anderen haben Aminosäuren chemische Eigenschaften, die den Grad der Ähnlichkeit weitaus besser verdeutlichen, als die für sie codierenden Nukleotid-Triplets (Rauhut, 2001).

Tab.11: Vergleichsoptionen der BLAST-Programme

Programm	Suchsequenz	Vergleichssequenz
blastn	DNA-Sequenz	DNA-Datenbank
blastp	Protein-Sequenz	Protein-Datenbank
blastx	DNA-Sequenz (alle Leseraster)	Protein-Datenbank
tblastn	Protein-Sequenz	DNA-Datenbank (alle Leseraster)
tblastx	DNA-Sequenz (alle Leseraster)	DNA-Datenbank (alle Leseraster)

BLAST von Proteinsequenzen gegen das Genom von *O. oeni*

Auf der Internetseite des JGI besteht die Möglichkeit, einen BLAST-Vergleich beliebiger Nucleotid- oder Aminosäuresequenzen mit dem Genom von *Oenococcus oeni* durchzuführen (Vgl. Internetadressen).

Aminosäuresequenzen von bekannten Hexosecarriern aus der Major Facilitator Superfamily wurden mit dem kompletten Genom von *O. oeni* verglichen. Dabei wurde das Programm „tblastn“ verwendet, das heißt, die Basensequenzen auf dem Genom wurden von dem Programm in Aminosäuren translatiert. Die Abschnitte auf dem Genom von *O. oeni*, welche Ähnlichkeit mit den Suchsequenzen zeigten, wurden mitsamt ihren Eigenschaften (Position im Genom, E-Value, Prozent identische Aminosäuren und Länge des Sequenzvergleichs) notiert.

Diese Genom-Bereiche wurden dann auf das Vorhandensein von Genen untersucht. Dies geschah mit Hilfe der auf der Webseite des JGI veröffentlichten Tabellen, in denen alle 1800 potentiellen Gene aufgelistet und nach Position geordnet sind.

Die im Genom von *O. oeni* gefundenen Gene, die für Proteine mit Aminosäuresequenzähnlichkeit zu Hexosecarriern aus der MFS-Familie kodieren, wurden tabellarisch festgehalten.

Dieselbe Prozedur wurde bei der Suche nach Genen durchgeführt, die für ein Phosphotransferasesystem kodieren könnten.

BLAST von *Oenococcus*-Genen gegen verschiedene Datenbanken

Die durch die gefundenen Gene potentiell kodierten Proteine wurden mittels BLAST-Analyse mit verschiedenen Datenbanken (SWISSPROT, GenBank (NCBI), Conserved Domain Database und Protein Information Resource) verglichen (siehe Internetadressen). Dadurch wurden Hinweise auf die Funktion erhalten.

TMHMM-Analyse

Die Anzahl und Lage der Transmembranhelices in einem Protein wurde über ein Computerprogramm vorhergesagt, welches aus der Aminosäuresequenz die Wahrscheinlichkeit von Transmembranhelices berechnet. Das Programm heißt TMHMM Server v. 2.0 und ist online nutzbar (siehe Internetadresse).

TMHMM steht für Trans Membrane Hidden Markov Model. In die Berechnung gehen verschiedene Faktoren ein, wie Aminosäuresequenz, Hydrophobizität und Länge einer hydrophoben Sequenz. Außer der Transmembranhelices wird die Position von intra-und-extrazellulären Proteinbereichen vorhergesagt, allerdings mit geringerer Sicherheit.

Erstellung eines Phylogramms mit CLUSTALW

Aus Aminosäuresequenzen von bekannten Hexosecarriern der MFS-Family, zusammen mit *Oenococcus*-Kandidatengenen, wurde mittels des Programms CLUSTALW (siehe Internetadressen) ein Alignment erstellt. Das Programm errechnete die evolutiven Distanzen der einzelnen Proteine zueinander und erstellte mit den Daten ein Phylogramm. Die verwendeten Parameter waren:

RESULTS:	interactive
ALIGNMENT:	full
CPU MODE:	single
KTUP (WORD SIZE):	default

WINDOW LENGTH:	default
SCORE TYPE:	percent
TOPDIAG:	default
PAIRGAP:	default
MATRIX:	default (blosum)
GAP OPEN	default (10)
END GAPS	default
GAP EXTENSION	default (0,05)
GAP DISTANCES	default (8)
OUTPUT FORMAT	aln w/numbers
OUTPUT ORDER	aligned
TREE TYPE	phylip
CORRECT DIST.	Off
IGNORE GAPS	off

4. Ergebnisse

4.1 Fructose- Stoffwechsel

4.1.1 Wachstum mit Fructose: Umschalten zwischen heterofermentativer Milchsäuregärung und Mannitbildung

Fructose wird von *O. oeni*, anders als Glucose, nicht nur zu Lactat, Ethanol und CO₂ umgesetzt (Salou et al. 1994). Bei Verwendung von Fructose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle werden hauptsächlich Mannit, Lactat, Acetat und CO₂, sowie kleinere Mengen Ethanol und etwas Erythrit gebildet. Zum genaueren Verständnis dieser Fermentation wurde zunächst das Wachstum mit Fructose in anaerober Batchkultur untersucht. In den Kulturen wurden kontinuierlich der pH- Wert und das Wachstum (OD₅₇₈) gemessen, sowie mittels HPLC- Analyse die Konzentration von Substrat und Fermentationsprodukten bestimmt.

Im Verlauf der Fermentation änderte sich das Fermentationsmuster. Bei Einteilung der Wachstumskurve in zwei Bereiche, die exponentielle Wachstumsphase (Phase I) und die spätlogarithmische Wachstumsphase (Phase II) ist zu sehen, daß in Phase I hauptsächlich Mannit, Lactat und Acetat gebildet werden, während in Phase II hauptsächlich Lactat und Ethanol entstehen (Abb. 5, Tab. 12). Zwischen beiden Phasen und Fermentationsmustern findet ein Übergang statt. Das Fermentationsmuster in Phase I entspricht der bekannten Fructoseumsetzung durch *O. oeni* und verwandte Bakterien (Kandler 1983, Salou et al. 1994), also einer Mischung aus heterofermentativer Milchsäuregärung und Mannitbildung. Fructose ist dabei gleichzeitig Energie lieferndes Substrat für den Pentosephosphatweg, als auch der hauptsächlichste Elektronenakzeptor für die Reduktionsäquivalente (NAD(P)H), die im oxidativen Pentosephosphatweg gebildet werden. Phase II gleicht dagegen der typischen heterofermentativen Milchsäuregärung (1 Hexose → 1 Lactat+1 Ethanol+1 CO₂), wie sie von vielen Milchsäurebakterien durchgeführt wird.

Die Änderung im Fermentationsmuster setzt zu einem Zeitpunkt ein, zu dem schon große Mengen Acetat ins Medium ausgeschieden wurden, und der pH- Wert von anfänglich 5,8 auf 4,3 abgesunken ist. Es wurde daher vermutet, daß der Fermentationsshift eine Reaktion auf die hohe Acetatkonzentration im Medium oder den niedrigen pH- Wert sein könnte.

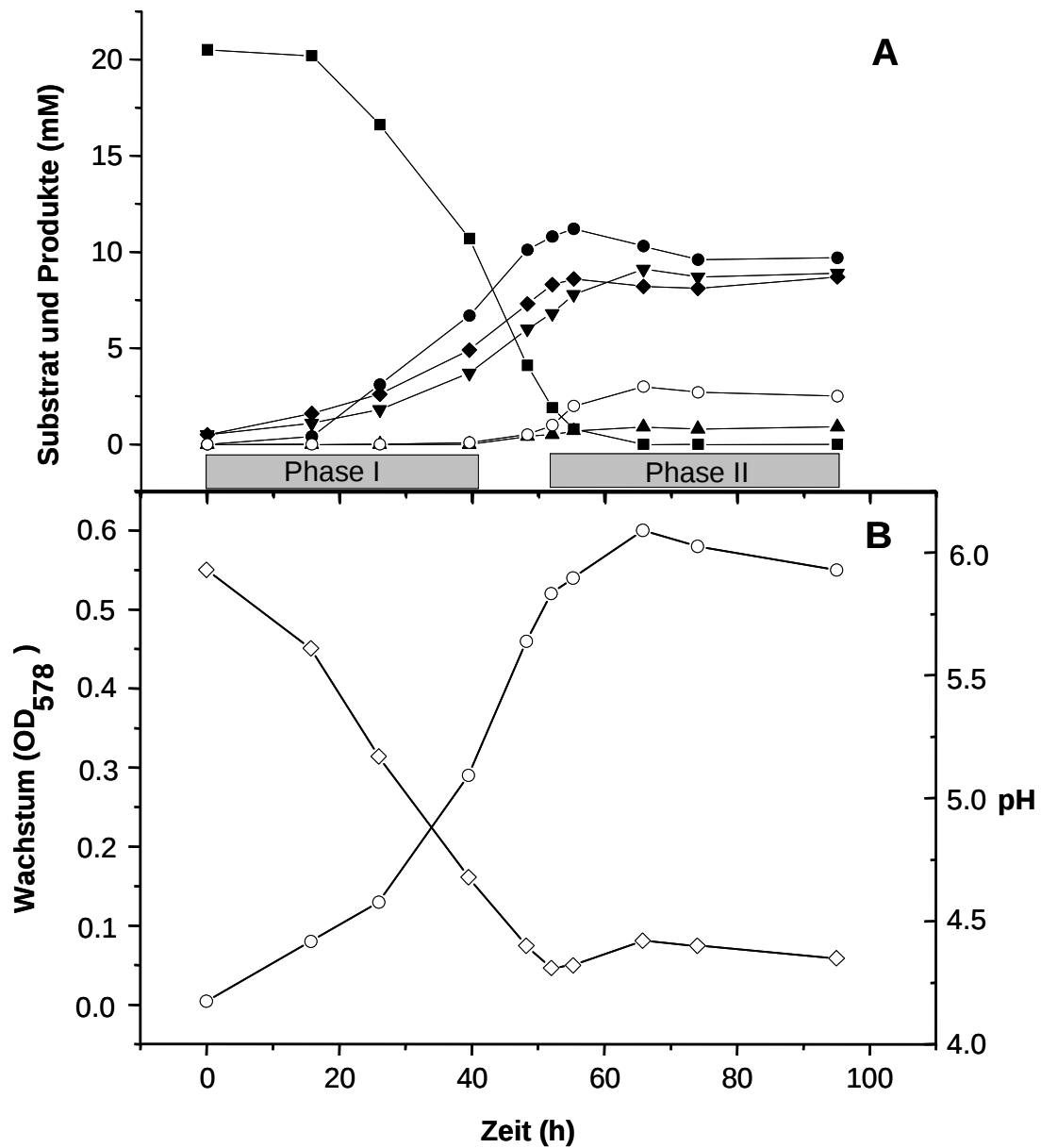


Abb. 5: Wachstum von *O. oeni* Stamm B1 in MLD- Medium mit 20 mM Fructose unter anaeroben Bedingungen. Die Konzentration von **(A)** Fructose (■), Lactat (▼), Ethanol (○), Acetat (◆), Mannit (●), Erythrit (▲), sowie **(B)** die OD₅₇₈ (○) und der pH-Wert (◇) wurden regelmäßig gemessen und sind gegen die Zeit aufgetragen. In Phase I wird gemischte heterofermentative/Mannit- Fermentation beobachtet und kein Ethanol wird gebildet. In Phase II findet nur heterofermentative Milchsäuregärung statt, ohne Bildung von Acetat.

Tab.12: Fructose- Fermentation während der exponentiellen Phase (I) und der spätlogarithmischen Phase (II) des Wachstums in einer Batchkultur von *Oenococcus oeni* B1. Die Fermentationsbilanzen wurden aus den Daten des Experiments aus Abb. 5 erstellt und beziehen sich auf die jeweils in Phase I und II verbrauchte Fructose und die daraus gebildeten Produkte. Die Fermentationsbilanzen spiegeln jeweils die Differenz der Substrat- und Produktkonzentrationen zwischen Beginn und Ende der jeweiligen Phase wider. Die gebildete CO₂- Menge wurde berechnet, sie entspricht der gebildeten Menge an Lactat.

	Produkte (Mol / Mol Fructose)						% C	O/R
	Lactat	Acetat	Ethanol	Mannitol	Erythrit	CO ₂		
Phase I	0,32	0,45	0,01	0,68	<0,01	0,32	105	0,91
Phase II	0,76	0,22	0,61	0,05	0,12	0,76	91	1,09

Oenococcus oeni wurde unter denselben Bedingungen wie im vorhergehenden Experiment gezüchtet, aber unter Zusatz von 10 mM Na-Acetat, oder bei einem anfänglichen pH- Wert von 4,5. Es wurde keine Veränderung in der Fructose-Fermentation beobachtet. Das Umschalten setzte zeitlich nicht früher ein, und die Fermentationsbilanzen glichen den vorherigen. Also haben weder die Acetatkonzentration noch der pH- Wert Einfluss auf den Fermentationsverlauf.

Oenococcus oeni wurde mit Fructose bis in Phase II gezüchtet, und die Zellen wurden in Zellsuspension mit Fructose inkubiert, um herauszufinden, ob das Umschalten durch eine veränderte Enzymausstattung hervorgerufen wird. Falls diese Annahme zutrifft, sollten die Bakterien in der Suspension vermehrt heterofermentative Milchsäuregärung betreiben. Die Fructose wurde von der Zellsuspension jedoch über gemischte heterofermentative/Mannit- Gärung umgesetzt. Dies war auch dann der Fall, wenn Chloramphenicol, ein Hemmstoff der Proteinbiosynthese, der eine de novo Enzymsynthese verhindert, nach der Zellzucht zugegeben wurde. Das bedeutet, daß für das Umschalten keine zusätzlichen Enzyme synthetisiert werden müssen, und daß die Regulation auf posttranslationaler Ebene stattfindet. Außerdem fiel auf, daß *O. oeni* in Zellsuspension mit Fructose überhaupt kein Ethanol bildete, im Gegensatz zu wachsenden Zellen. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich, daß in wachsenden Zellen der Energiestoffwechsel an die Wachstumsrate (Baustoffwechsel) gekoppelt ist. In Zellsuspension ist das nicht der Fall, und der Energiestoffwechsel wird nicht durch die Wachstumsrate limitiert. Im

Folgendes wird gezeigt, daß Limitierungen des Energiestoffwechsels eine erhebliche Rolle bei der Wahl des Fermentationsweges spielen.

Es blieb somit weiterhin die Frage offen, wodurch der Fermentationsshift bei wachsenden Zellen reguliert wird.

4.1.2 Die Wachstumsrate bestimmt den Fermentationsverlauf

Weitere Faktoren, die das Umschalten der Fermentation in statischer Kultur verursachen könnten, sind die Wachstumsrate und die Wachstumsphase. Die Wachstumsrate μ ist in Phase II mit $0,010 \text{ h}^{-1}$ deutlich niedriger, als in Phase I ($\mu = 0,065 \text{ h}^{-1}$). *O. oeni* wurde deshalb in kontinuierlicher Kultur in einem Chemostaten fructoselimitiert gezüchtet, um die Wachstumsrate gezielt zu verändern und die Auswirkungen auf die Fermentation beobachten zu können. Dabei wurde die Zuflußrate (Dilutionsrate) von frischem Medium mit 20 mM Fructose auf einen sehr niedrigen Wert gestellt und dann schrittweise gesteigert. Dazwischen wurde immer

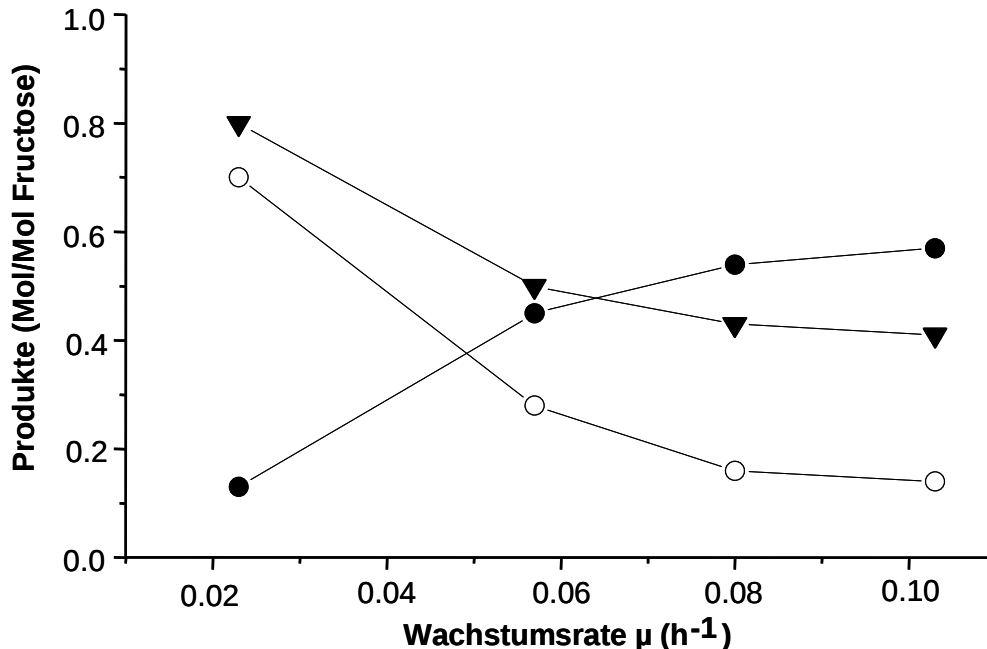


Abb. 6: Fructoselimitierung in kontinuierlicher Kultur beeinflusst die Wachstumsrate und den Fermentationsverlauf. *O. oeni* B1 wurde unter anaeroben Bedingungen im Chemostat gezüchtet. Die Zulauftrate von Medium mit 20 mM Fructose, und damit die Wachstumsrate, wurde schrittweise erhöht. Nach Gleichgewichtseinstellung wurden jeweils Proben entnommen und die OD_{578} , die Fructosekonzentration, sowie die Konzentrationen der Produkte Lactat (▼), Ethanol (○) und Mannit (●) gemessen.

abgewartet, bis sich im Chemostat ein neues Gleichgewicht eingestellt hatte. Dann entsprach die Wachstumsrate der Dilutionsrate und die Substrat- und Produktkonzentrationen blieben konstant. Die Substrat- und Produktkonzentrationen wurden bei verschiedenen Wachstumsraten bestimmt (Abb. 6).

Bei hohen Wachstumsraten ($\mu = 0,103 \text{ h}^{-1}$) wurde Mannit in großen Mengen ausgeschieden und seine Konzentration übertraf die des Ethanol um Faktor 4,1. Die Mannitbildung nahm mit abnehmender Wachstumsrate kontinuierlich ab, während die Ethanolkonzentration zunahm. Das Mannit/Ethanol- Verhältnis war bei einer Wachstumsrate von $\mu=0,023 \text{ h}^{-1}$ nur noch 0,19. Die gebildeten Mengen von Acetat änderten sich dabei kaum, wogegen die Erythritbildung mit kleinerer Wachstumsrate zunahm. Es dominierte also bei niedrigen Wachstumsraten die heterofermentative Milchsäuregärung, während bei hohen Wachstumsraten bis zu 57 Prozent der Fructose zu Mannit reduziert wurde. Dieser Wert liegt nahe dem für gemischte heterofermentative/Mannit- Fermentation theoretisch erwarteten Wert von 67 Prozent. Man kann deshalb die Schlußfolgerung ziehen, daß die Wachstumsrate einen großen Einfluss auf den Weg hat, über den Fructose umgesetzt wird. Sowohl in Batchkultur, als auch im Chemostat ist zu beobachten: Niedrige Wachstumsraten begünstigen die heterofermentative Milchsäuregärung, während bei hohen Wachstumsraten die gemischte heterofermentative/Mannit- Gärung bevorzugt wird.

4.1.3 Die Bildung von Mannit wird durch Pyruvat unterdrückt

Externe Elektronenakzeptoren können auch bei rein fermentativen Bakterien den Verlauf einer Fermentation verändern. So kann Pyruvat die Hexosefermentation von *O. oeni* beeinflussen (Nuraida et al. 1992). Deshalb wurde die Auswirkung von Pyruvat auf die Bildung von Mannit und anderen reduzierten Fermentationsprodukten genauer untersucht (Tab. 13). In Zellsuspensionen mit Glucose wurde letztere fast stöchiometrisch zu Lactat, Ethanol und CO_2 umgesetzt, wobei noch geringe Mengen an Erythrit gebildet wurden. War zusätzlich Pyruvat vorhanden, so waren die einzigen Fermentationsprodukte Lactat, Acetat und CO_2 . Ethanol oder Erythrit wurden nicht ausgeschieden. Diese Beobachtungen wurden auch bei wachsenden Zellen (Tab. 14) gemacht. Das bedeutet, daß Pyruvat als alleiniger Elektronenakzeptor für die Reoxidation des NAD(P)H diente und zu Lactat umgesetzt wurde. Ein Teil des Pyruvates wurde decarboxyliert und als Acetat ausgeschieden.

Acetyl-Phosphat aus dem Phosphoketolaseweg wurde ebenfalls als Acetat ausgeschieden.

Die Fermentation von Fructose wird durch Pyruvat ebenso beeinflusst. In Gegenwart von Pyruvat wurde die Mannitbildung unterdrückt, in Zellsuspension waren Lactat und Acetat die einzigen Produkte. In wachsenden Zellen wurde gegen Ende des Wachstums etwas Mannit, Ethanol und Erythrit gebildet. Allerdings war Pyruvat zu diesem Zeitpunkt bereits verbraucht, so daß die verbleibende Fructose nach dem

Tab. 13: Fermentationsbilanzen in Zellsuspensionen von *O. oeni* B1 und Auswirkung von Pyruvat auf die Fermentation von Glucose und Fructose. Die Zellen wurden in MLD- Medium mit Glucose bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase gezüchtet, abzentrifugiert und gewaschen und danach in Puffer mit 10 mM Glucose oder Fructose und einem Überschuß an Pyruvat inkubiert. Nach dem Verbrauch der Hexosen wurden die Fermentationsbilanzen ermittelt. Die C-Bilanzen sind vergleichbar mit denen aus Tab. 12.

Substrat	Produkte (Mol / Mol Hexose)				
	Lactat	Acetat	Ethanol	Mannit	Erythrit
1 Glucose	0,96	<0,05	0,93	<0,01	0,07
1 Glucose + 4 Pyruvat	4,0	1,99	<0,01	<0,01	<0,01
1 Fructose	0,35	0,40	<0,01	0,62	0,09
1 Fructose + 1,8 Pyruvat	3,2	1,63	<0,01	<0,01	<0,01

Tab. 14: Fermentationsbilanzen wachsender Zellen von *O. oeni* B1. Die Zellzucht erfolgte in MLD- Medium mit der jeweils angegebenen C- Quelle (40 mM Glucose, 20 mM Fructose, 20 mM Ribose , 10 mM Glucose plus 20 mM Pyruvat oder 20 mM Fructose). Die Werte geben den Verbrauch der einzelnen Substrate, bzw. die Bildung von Produkten an.

Mol Substrat	Mol Produkte					
	Lactat	Acetat	Ethanol	Mannit	Erythrit	CO ₂
1 Glucose	0,91	0,08	0,95	<0,01	0,04	0,91
1 Fructose	0,42	0,38	0,15	0,50	0,04	0,42
1 Ribose	1,13	1,01	0	0	0	1,13
1 Glucose + 2,2 Pyruvat	3,20	1,1	<0,01	<0,01	<0,01	1,1
1 Fructose + 0,99 Pyruvat	1,34	0,61	0,21	0,28	0,03	0,79
1 Glucose + 1,7 Fructose	1,23	0,88	0,68	1,21	0,15	1,23

gewohnten Schema umgesetzt wurde. In Gegenwart von externem Pyruvat werden also die anderen Wege zur Regeneration von NAD(P)^+ , d.h. die Ethanol-, Mannit- und Erythritbildung, nicht mehr genutzt.

4.1.4 Das Substrat bestimmt die Wachstumsrate

Wenn *O. oeni* mit verschiedenen Zuckern oder Elektronenakzeptoren gezüchtet wurde, unterschieden sich die Wachstumsraten deutlich voneinander (Tab. 15). Die Rate war mit Glucose am niedrigsten, mit Fructose war sie etwa doppelt so hoch, und mit Ribose war sie dreimal höher als mit Glucose. Wurde den Bakterien bei Wachstum mit Glucose zusätzlich Pyruvat oder Fructose verabreicht, dann erreichte die Wachstumsrate fast den Wert, der mit Ribose erzielt wird.

Tab. 15: Wachstumsraten (μ) und Zellerträge (Y_{Zucker} , Y_{ATP}) von *O. oeni* B1 bei Wachstum auf Zuckern ohne oder mit Elektronenakzeptoren (Fructose oder Pyruvat), sowie berechnete Zuckerumsatzgeschwindigkeiten. Die Wachstumsraten und Zellerträge wurden aus Batchkulturen in MLD- Medium ermittelt, in denen die jeweiligen Substrate enthalten waren. Die gebildete spezifische ATP- Menge (Mol/Mol Zucker) wurde über die ATP bildenden Reaktionen im Stoffwechsel unter Berücksichtigung der Fermentationsbilanzen berechnet. Y_{ATP} wurde aus Y_{Zucker} und dem im Stoffwechselweg spezifisch gebildeten ATP (Mol/Mol Zucker) berechnet. Der Zuckerumsatz A wurde über die Wachstumsrate μ und den Zellertrag Y_{Zucker} nach $A=\mu/Y$ berechnet, wie schon beschrieben (Richter 2001). TG Trockengewicht. Die Fermentationsbilanzen sind in Tab. 14 angegeben.

	μ (h^{-1})	Y_{Zucker} (gTG/Mol)	Mol ATP / Mol Zucker)	Y_{ATP} (gTG/Mol)	Zuckerumsatz ($\mu\text{mol}/(\text{gTG min})$)
Glucose	0,034	8,3	0,88	9,4	69
Fructose	0,074	6,7	0,72	9,3	184
Ribose	0,101	11,8	2,0	5,9	143
Glucose + Pyruvat	0,088	17,9	2,0	9,0	82
Fructose + Pyruvat	0,083	13,6	1,3	10,5	101
Glucose + Fructose	0,096	13,9 ^a	1,3	10,7	115 ^a

^a Bezogen auf die über den Phosphoketolase- und Erythritweg umgesetzten Hexosen (1,38 mol).

Alle Zucker werden über den Phosphoketolaseweg umgesetzt, das bedeutet, daß der energieliefernde (oxidative) Teil des Stoffwechsels unter allen Bedingungen derselbe ist. Zur Regeneration von NAD(P)^+ werden allerdings unterschiedliche Wege benutzt (vgl. Abb. 3). Bei Wachstum mit Ribose ist überhaupt keine Regeneration erforderlich, da im Energiestoffwechsel kein NAD(P)H produziert wird. Das lässt vermuten, daß die NADP^+ - Regenerationswege verantwortlich für die unterschiedlichen Wachstumsraten sind. Die Wachstumsrate wurde bei Wachstum mit Fructose durch Zusatz von Pyruvat nur unwesentlich gesteigert (von 0,074 auf 0,083 h^{-1}). Dies könnte damit zusammenhängen, daß bei Wachstum mit Fructose andere Faktoren als die NADP^+ - Regeneration limitierend werden. Dafür kommen Transport, oxidativer Pentosephosphatweg oder Baustoffwechsel in Frage.

Die Zellerträge Y_{Zucker} wurden aus der Zellmasse und dem Zuckerverbrauch berechnet (Tab. 15). Für das Wachstum mit Glucose oder Fructose wurden relativ niedrige Zellerträge erhalten. Die Zugabe von Pyruvat oder Fructose erhöhte die Erträge bei Wachstum mit Glucose beträchtlich. Die ATP- Ausbeute n wurde über die aus dem Stoffwechselweg theoretisch zu erwartende ATP-Ausbeute und die jeweilige Fermentationsbilanz berechnet. Die Y_{ATP} -Werte wurden über Y_{Zucker} und die ATP- Ausbeute n kalkuliert. Für alle Hexosen wurde ein ähnlicher Wert für Y_{ATP} nahe 10 g/mol berechnet, wodurch die experimentell erhaltenen Werte bestätigt wurden.

4.1.5 NAD(PH) bildende und reoxidierende Dehydrogenasen:

Die Enzyme des Ethanol-, Erythrit-, und Mannit- Weges sind limitierend

Die Aktivitäten der NAD(P)H reoxidierenden Enzyme aus den Ethanol-, Erythrit- und Mannit- Wegen wurden bestimmt und mit den Aktivitäten der NAD(P)H -produzierenden Enzyme des Phosphoketolaseweges, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase, verglichen (Tab. 16).

Die Aktivitäten der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase übertrafen die Aktivitäten der NAD(P)H reoxidierenden Enzyme Acetaldehyddehydrogenase, Erythritol-4-Phosphat-Dehydrogenase und Mannitdehydrogenase bei weitem, mindestens um den Faktor 2,6. Nur die Lactatdehydrogenase hatte bedeutend höhere Aktivitäten. Im Ethanolweg, der die Acetaldehyd- und Ethanoldehydrogenase beinhaltet, wurde nur die Acetaldehyddehydrogenase berücksichtigt, da diese immer eine sehr niedrige

Aktivität besitzt, und das limitierende Enzym in diesem Weg darstellt (Veiga-Da-Cunha et al. 1993; Richter et al. 2001). Die Aktivität der Ethanoldehydrogenase ist um zwei Größenordnungen höher und vermutlich unbedeutend für die Regulation des Ethanolweges. Zusätzlich wurde noch die Lactatdehydrogenase gemessen, die verantwortlich für die Reoxidation von NAD(P)H ist, wenn externes Pyruvat zur Verfügung steht. Die Aktivität der Lactatdehydrogenase übertraf die Aktivitäten der anderen Dehydrogenasen um ein bis zwei Größenordnungen. Mit Ausnahme der Acetaldehyddehydrogenase waren die Aktivitäten der Dehydrogenasen nach Zucht mit verschiedenen Zuckern und Elektronenakzeptoren relativ konstant, sie variierten höchstens um den Faktor 2,4. Das lässt vermuten, daß die Gene der Erythritol-4-Phosphat-, Mannit- und Lactatdehydrogenase nur schwach auf transkriptionaler oder translationaler Ebene reguliert werden.

Tab. 16: Aktivitäten der Dehydrogenasen des Phosphoketolaseweges (Glucose-6-P- und 6-P-Gluconat- Dehydrogenase) und der NAD(P)H reoxidierenden Enzyme der Ethanol-, Erythrit-, Mannit- und Lactat- bildenden Wege (in $\mu\text{mol} / (\text{g Trockengewicht} \times \text{min})$). G6P DH, Glucose-6-P-Dehydrogenase, 6PG DH, 6-P-Gluconatdehydrogenase, ALDH, Acetaldehyddehydrogenase, E4P DH, Erythritol-4-P-Dehydrogenase, MDH, Mannitdehydrogenase, LDH, Lactatdehydrogenase.

Zucht	Phosphoketolaseweg NAD(P)H- bildend		Dehydrogenasen zur Reoxidation des NAD(P)H			
	G6P DH	6PG DH	ALDH	E4P DH	MDH	LDH
Glucose	1440	360	55	41	150	3800
Fructose	1410	830	3	52	175	5060
Glucose + Fructose	1945	710	16	41	181	ND
Glucose + Pyruvat	ND	ND	2	98	120	4530

Die Aktivität der Acetaldehyddehydrogenase änderte sich jedoch stark mit den jeweiligen Zuchtbedingungen: Am höchsten war die Aktivität nach Wachstum mit Glucose. Unter dieser Bedingung wird das Enzym für die Ethanolproduktion benötigt. Nach Zucht mit Fructose oder in Gegenwart von Pyruvat fiel die Aktivität der Acetaldehyddehydrogenase auf sehr niedrige Werte und war kaum noch meßbar. Unter letzteren Bedingungen werden keine meßbaren Mengen Ethanol gebildet. Die

Acetaldehyddehydrogenase- Aktivität könnte auf der transkriptionalen oder posttranslationalen Ebene reguliert werden.

Die Lactatdehydrogenase von *O. oeni* hatte immer eine hohe Aktivität (Tab. 16), aber sie arbeitet nur mit NADH, und nicht mit NADPH (Veiga-Da-Cunha et al. 1993). Dies könnte Probleme bei der Reoxidation des im Phosphoketolaseweg gebildeten NADPH verursachen. Allerdings gibt es im Genom der Bakterien ein Cluster mit 3 Genen, nämlich die Gene 400, 401 und 402 auf Scaffold 14, welche homolog zu *pntAA*, *pntAB* und *pntB* sind (JGI, Internetseite). Letztere Gene codieren für eine aus drei Untereinheiten bestehende protonenpumpende NAD(P) Transhydrogenase, die für eine Transhydrogenierung von NADPH zu NAD⁺ verantwortlich sein könnte (Williams et al. 1994). Die gemessene spezifische Transhydrogenaseaktivität betrug höchstens 3,2 U/g Protein (Vgl. Anhang, Tab.26).

4.1.6 In Gegenwart von Glucose dient Fructose als Elektronenakzeptor

Einen Spezialfall stellt die gleichzeitige Anwesenheit von Glucose und Fructose im Medium dar. Die Fermentationsbilanz (Tab. 14) für diese Bedingung lässt vermuten, daß Glucose über den Phosphoketolaseweg zu Lactat und Acetat oxidiert wird. Fructose dient dagegen größtenteils als Elektronenakzeptor für die Reduktionsäquivalente aus dem Phosphoketolaseweg und wird zu Mannit reduziert. Diese Vermutung sollte überprüft werden. Es sollte gezeigt werden, welcher Zucker bei Cofermentation von Glucose und Fructose zu welchen Produkten umgesetzt wird. Dazu wurde *O. oeni* mit Glucose und Fructose gezüchtet, geerntet und gewaschen und danach in Zellsuspensionen mit 10 mM Glucose und 20 mM Fructose inkubiert. Jeweils war nur einer der beiden Zucker uniform mit [¹³C] markiert. Die Fermentationsprodukte wurden mittels NMR- Spektroskopie auf ihren Markierungsgrad untersucht. Auf diese Weise konnte der Weg der beiden Hexosen verfolgt werden.

Mehr als 90 Prozent der Markierung der [U-¹³C] Glucose wurden in Lactat und Acetat wiedergefunden, und nur ein sehr geringer Anteil in Mannit (Tab. 17, Experiment A). Im umgekehrten Experiment, wenn Fructose [U-¹³C]- markiert war, waren Lactat und Acetat nur zu einem geringen Anteil markiert, dafür bestand Mannit fast komplett aus ¹³C- Atomen (Experiment B).

Diese Daten zeigen, daß Fructose bei Cofermentation mit Glucose vorzugsweise zur Mannitbildung und damit als Elektronenakzeptor genutzt wird, womit frühere

Vermutungen bewiesen wurden (Salou et al. 1994). Nur ein kleiner Anteil der Fructose (<10 %) wurde über den Phosphoketolaseweg geleitet und abgebaut. Glucose andererseits wurde fast ausschließlich über den Phosphoketolaseweg verstoffwechselt und nicht im Mannitweg.

Tab.17: Cofermentation von ^{13}C - markierter Glucose und Fructose in Zellsuspensionen mit *O. oeni* B1. Die Zellen wurden nach Zucht mit Glucose+Fructose in Puffer mit 10 mM Glucose und 20 mM Fructose inkubiert. Entweder Glucose (A) oder Fructose (B) waren uniform ^{13}C - markiert. Der Anteil der ^{13}C - Markierung in den Produkten wurde bestimmt. Fermentationsbilanzen wurden mittels HPLC-Analyse der Zellsuspensionen erstellt.

Experiment	^{13}C - Markierung der Substrate (%)		^{13}C - Markierung der Produkte (%)		
	Glucose	Fructose	Lactat	Acetat	Mannit
A ^a	99	1,8	91,3	93,0	2,7
B ^b	<3	99	9,5	12,3	>95

Fermentationsbilanzen:

^a 1 [^{13}C] Glucose+2,26 Fructose → 0,72 Lactat+1,0 Acetat+2,39 Mannit+0,72 CO₂

^b 1 Glucose+1,53 [^{13}C] Fructose → 0,84 Lactat+0,67 Acetat+1,47 Mannit+0,14 Ethanol+0,84 CO₂

In Tab. 13 und 14 ist gezeigt, daß in Gegenwart von Pyruvat aus Fructose kein Mannit gebildet wird, sondern daß diese komplett über den Phosphoketolaseweg zu Lactat und Acetat umgesetzt wird. In diesem Fall dient Pyruvat als Elektronenakzeptor für die im Phosphoketolaseweg gebildeten Reduktionsäquivalente.

Es können also im Fructosestoffwechsel zwei völlig gegensätzliche Situationen vorliegen: In Cofermentation mit Glucose dient Fructose als Elektronenakzeptor und fließt über den Mannitweg. In Cofermentation mit Pyruvat dient Fructose als energielieferndes Substrat und wird über den Phosphoketolaseweg umgesetzt.

4.1.7 Hemmung der Phosphoglucoseisomerase

durch 6-Phosphogluconat und Erythrose-4-Phosphat

Aufgrund der Umsetzung von Fructose im Phosphoketolaseweg bei Wachstum mit limitierender Fructose oder Fructose plus Pyruvat, oder im Mannitweg bei Cofermentation von Glucose und Fructose, stellte sich die Frage nach dem

Regulationsmechanismus, der den Fluß der Fructose entweder in den Mannitweg, oder in den Phosphoketolaseweg steuert.

Phosphoglucoseisomerase (PGI) katalysiert die reversible Umwandlung von Fructose-6-Phosphat in Glucose-6-Phosphat (Abb. 7). Die Isomerase könnte folglich ein Schlüsselenzym für die Steuerung des Fructoseflusses in den Phosphoketolaseweg sein. Die Enzymaktivität der PGI war allerdings immer, selbst nach Zucht mit Glucose plus Fructose (1390 U/g TG), um eine Größenordnung höher, als für einen kompletten Fluß der Fructose über den Phosphoketolaseweg nötig wäre (Der maximale Hexosefluß über den Phosphoketolaseweg war 115 U/gTG, Vgl. Tab. 15, letzte Spalte „Zuckerverbrauch“). Trotzdem gelangt bei Zucht mit Glucose und Fructose weniger als zehn Prozent der Fructose in den Phosphoketolaseweg. Offensichtlich findet hier eine Regulation auf posttranslationaler Ebene statt, da die Menge des gebildeten Enzyms nie limitierend war. Als Regulationsmechanismus wurde eine Feedback-Hemmung durch Intermediärmetabolite des Stoffwechsels vermutet. Deshalb wurde die Wirkung der Stoffwechselmetabolite 6-Phospho-Gluconat und Erythrose-4-Phosphat (vgl. Abb 7) auf die Enzymaktivität der Phosphoglucoseisomerase untersucht. Dazu wurde die Enzymaktivität der Phosphoglucoseisomerase in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an 6-Phospho-Gluconat oder Erythrose-4-Phosphat bestimmt.

In Gegenwart von 6-Phospho-Gluconat wurde die Phosphoglucoseisomerase stark gehemmt (Abb. 7A). Die doppelt reziproke Auftragung der Enzymaktivität gegen die Substratkonzentration im Lineweaver- Burk- Plot ergab für verschiedene 6-P-Gluconatkonzentrationen lineare Funktionen mit unterschiedlichen Schnittpunkten auf der Ordinate. Ebenso wurde die Abszisse abhängig von der 6-P-Gluconatkonzentration an verschiedenen Punkten geschnitten. Dieses Verhalten deutet auf eine gemischte Hemmung hin, die sich aus einem kompetitiven und einem unkompetitiven Anteil zusammensetzt. Für jede Konzentration von 6-P-Gluconat wurden die K_i -Werte für den kompetitiven (K_i) und den unkompetitiven (K'_i) Anteil berechnet. Die ermittelten Werte $K_i=180 \mu\text{M}$ und $K'_i=350 \mu\text{M}$ lassen einen wesentlichen Beitrag der kompetitiven Hemmung durch 6-Phospho-Gluconat an der Regulation der Phosphoglucoseisomerase vermuten. Der K_m -Wert des Enzyms für Fructose-6-Phosphat war 0,42 mM; $V_{\max}$ war 1390 U/g Trockengewicht.

Die gemischte Hemmung könnte auf das Vorhandensein verschiedener oligomerer Formen der PGI mit unterschiedlichen K_i -Werten zurückzuführen sein. Das

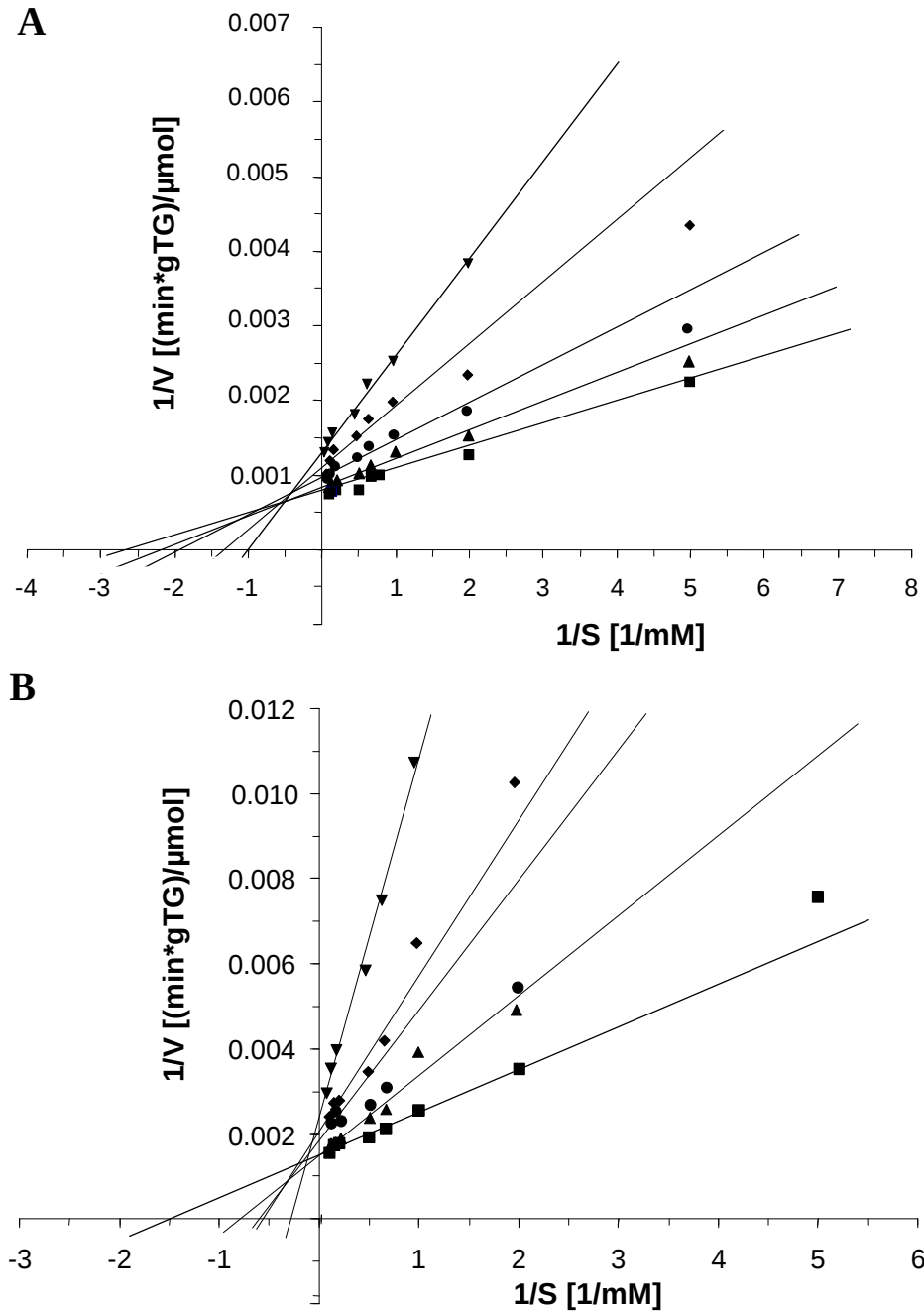


Abb. 7: Hemmung der Phosphoglucoseisomerase durch 6-Phosphogluconat und Erythrose-4-Phosphat. Lineweaver Burk Plots für unterschiedliche Substratkonzentrationen (Fructose-6-P) in Gegenwart von **A** 0(■), 100(▲), 150(●), 200(◆), 250(▼) μM 6-Phosphogluconat und **B** 0(■), 1,5(▲), 3(●), 4,5(◆), 6(▼) μM Erythrose-4-Phosphat.

Vorhandensein verschiedener Gene, die Isoenzyme der PGI codieren, wurde nach einer Genomanalyse (Hamann 2003) ausgeschlossen. In *Lactobacillus casei* kommt die Phosphoglucoseisomerase als Dimer und als Tetramer vor. Die dimere und die tetramere Form setzen sich vermutlich aus denselben Untereinheiten zusammen, haben aber unterschiedliche kinetische Eigenschaften (Pradhan und Nadkarni 1980). In Anwesenheit von Erythrose-4-Phosphat wurde ein ähnlicher gemischter Hemmtyp wie für 6-Phospho-Gluconat beobachtet (Abb. 7B). Aus den Lineweaver-Burk-Plots wurden die Werte $K_i=1,3 \mu\text{M}$ und $K'_i=13 \mu\text{M}$ erhalten. Die Hemmung durch Erythrose-4-P ist folglich größtenteils vom kompetitiven Typ. Somit ähnelt die Phosphoglucoseisomerase von *O. oeni* den Enzymen von *Aspergillus niger* und *Lactobacillus casei* (Ruijter und Visser 1999; Pradhan und Nadkarni 1980), die ebenfalls kompetitiv durch Erythrose-4-Phosphat und 6-Phospho-Gluconat gehemmt werden.

4.1.8 Konzentrationen von 6-Phospho-Gluconat

Die Anwesenheit von Glucose oder Pyruvat und die Wachstumsgeschwindigkeit entscheiden offensichtlich darüber, ob Fructose über den Mannitweg oder den Phosphoketolaseweg verstoffwechselt wird (vgl. Tab. 13, 14, Abb. 3). Die Entscheidung für den gewählten Weg findet offenbar auf posttranslatiionaler Ebene statt, und die Regulation der Phosphoglucoseisomerase durch ihre Inhibitoren 6-Phospho-Gluconat und Erythrose-4-Phosphat spielt vermutlich eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurden die intrazellulären Konzentrationen von 6-Phospho-Gluconat in Zellen gemessen, die in Zellsuspensionen mit Glucose oder Fructose, mit oder ohne Elektronenakzeptor (Fructose oder Pyruvat), inkubiert wurden.

Tab. 18: Intrazelluläre Konzentrationen von 6-Phosphogluconat in Gegenwart von Glucose oder Fructose plus Elektronenakzeptoren (Pyruvat oder Fructose). Die zellulären Gehalte wurden in Zellsuspensionen bestimmt, die mit den angegebenen Substraten inkubiert wurden.

	Intrazelluläre 6-P-Gluconatkonzentration (μM)		
	-	+Pyruvat (80 mM)	+Fructose (80 mM)
Fructose (45 mM)	550	<75	ND
Glucose (45 mM)	1170	490	406

Während der Inkubation mit Glucose war die intrazelluläre Konzentration von 6-Phospho-Gluconat mit 1170 μM sehr hoch. Sie nahm um etwa Faktor 2,4 ab, wenn zusätzlich Fructose oder Pyruvat im Medium vorlag. Die Konzentration von 6-Phospho-Gluconat lag dann aber noch weit über dem K_i - und K'_i -Wert der Phosphoglucoseisomerase für 6-Phospho-Gluconat. Demzufolge war das Enzym wahrscheinlich immer stark gehemmt, wenn Glucose als Substrat im Medium vorhanden war.

Bei Inkubation mit Fructose war die Situation anders. Mit Fructose als einzigem Substrat waren die Gehalte an 6-Phosphogluconat um Faktor 2,1 niedriger als die für Inkubation mit Glucose erhaltenen. Die Gehalte sanken weiter um mindestens Faktor 7,3 auf unter 75 μM , wenn zusätzlich Pyruvat vorhanden war. Diese Konzentrationen liegen deutlich unterhalb den K_i - und K'_i -Werten der PGI für 6-Phospho-Gluconat. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß bei Wachstum mit Fructose plus Pyruvat die zellulären Gehalte an 6-Phospho-Gluconat niedrig genug waren, um eine hohe Aktivität der Phosphoglucoseisomerase zu ermöglichen.

Die Gehalte an Erythrose-4-Phosphat wurden über HPLC-Analyse bestimmt, weil frühere Tests mit ^{31}P -NMR und einer enzymatischen Methode gezeigt hatten, daß dieser Metabolit in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methoden vorkommt (Veiga-Da-Cunha et al. 1993, Rujiter and Visser, 1999). Die Erythrose-4-Phosphat-Gehalte lagen bei *O. oeni* auch unterhalb der Konzentrationen, die mit der HPLC-Methode bestimmt werden konnten ($< 50 \mu\text{M}$), jedoch möglicherweise über den K_i -Werten der PGI für Erythrose-4-Phosphat (1,3 μM). Wegen des Fehlens eines ausreichend empfindlichen Tests für Erythrose-4-Phosphat konnte deshalb nicht untersucht werden, ob Erythrose-4-Phosphat durch Hemmung zur Regulation der Phosphoglucoseisomerase beiträgt.

4.1.9 Pantothersäure fördert die Ethanolproduktion

Bei der Fermentation von Fructose in Zellsuspensionen wurden außer Lactat, Acetat und Mannit geringe Mengen Erythrit produziert (0,09 Mol/Mol Fructose, vgl. Tab. 13), aber kein Ethanol. Während der Fermentation von Glucose wird der Erythritweg vor allem dann genutzt, wenn durch einen Mangel an Pantothersäure kein Coenzym A gebildet werden kann. Unter dieser Bedingung ist die Acetaldehyddehydrogenase durch einen Mangel an Coenzym A limitiert, und mit diesem Enzym auch der gesamte Ethanolweg (Richter et al. 2000). Wenn die Bakterien während der Zucht

und der Inkubation in Zellsuspension mit Pantothersäure versorgt wurden (1 mg/L Medium), dann nahm die Ethanolkonzentration bei Fermentation von Fructose signifikant zu (0,07 Mol/Mol Fructose), während die Konzentrationen von Mannit und Erythrit um die gleiche Größenordnung abnahmen. Folglich kann auch bei der Fermentation von Fructose der Ethanolweg stimuliert werden, wenn auch in geringerem Umfang als bei der Fermentation von Glucose.

Zusammenfassend

wurden für den Fructosestoffwechsel folgende Ergebnisse erhalten. Fructose kann von *O. oeni* auf zwei unterschiedlichen Wegen verstoffwechselt werden:

a) der heterofermentativen Milchsäuregärung, oder

b) der Mannitbildung,

oder über eine Kombination aus beiden Wegen. Mannitbildung ist dabei immer mit Bildung von Acetat verbunden. In dieser Arbeit wurden Faktoren identifiziert, die einen Einfluß auf den Anteil des Fructoseflusses durch den jeweiligen Weg haben.

Die wichtigsten sind:

1. Die Wachstumsrate,
2. Externe Elektronenakzeptoren,
3. Regulation der Aktivität der Acetaldehyddehydrogenase,
4. Regulation der Aktivität der Phosphoglucoseisomerase durch die Konzentration der Metabolite 6-Phosphogluconat und (möglicherweise) Erythrose-4-Phosphat.
5. Die Verfügbarkeit von Pantothersäure spielt in geringem Umfang ebenfalls eine Rolle.

4.2 Transport von Glucose und Fructose

Für das Verständnis des Zuckerstoffwechsels sind Informationen über Mechanismus, Geschwindigkeit und Energetik der Substrataufnahme wichtig. Der Hexosetransport wurde in ganzen Zellen gemessen, da keine Vesikelsysteme verfügbar waren. Die Bakterien wurden anaerob in MLD-Medium mit der entsprechenden C-Quelle und, wenn nicht anders angegeben, bei einem anfänglichen pH-Wert von 5,8 gezüchtet. In der spätlogarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in Puffer mit ^{14}C -Substrat inkubiert. In geeigneten Zeitabständen wurden Proben in Stopplösung überführt und durch Membranfilter gesaugt. Über die Radioaktivität der auf den Filtern verbleibenden Zellen wurde die spezifisch aufgenommene Menge an Substrat berechnet. 1 U (Unit) bedeutet in diesem Zusammenhang 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

4.2.1 Glucosetransport

Zellsuspensionen von *Oenococcus oeni*, die mit 0,1 mM ^{14}C -markierter Glucose bei einem physiologischen pH-Wert von 5 inkubiert werden, zeigen über einen Zeitraum von Minuten eine langsame Aufnahme von Glucose (Abb. 8). Werden die Zellen vor der Inkubation „energetisiert“, das heißt, mit der Pentose Ribose gefüttert, so steigt

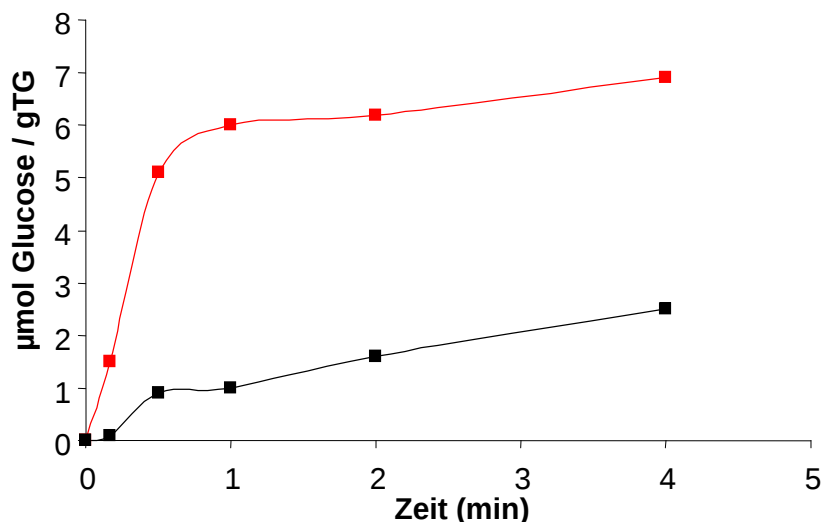


Abb.8: Glucoseaufnahme bei pH = 5 in energetisierte und nicht energetisierte Zellen. Glucosekonzentration 100 μM . Die Zellen wurden 20 min mit 3 mM Ribose energetisiert (■), bzw. nicht energetisiert (■)

die anfängliche Glucose-Aufnahmegeschwindigkeit von etwa 1 U/gTG auf etwa 5 U/gTG an. Somit ist die Aufnahme von Glucose „energieabhängig“. In allen folgenden Versuchen wurden deshalb energetisierte Zellen verwendet.

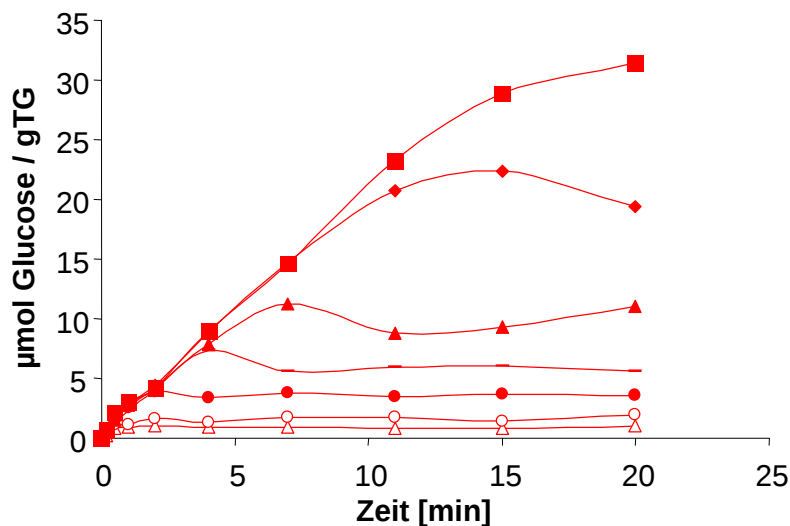


Abb. 9: Glucoseaufnahme bei pH 5 in energetisierte Zellen.

[Glucose] = 10 (Δ); 20 (○); 50 (●); 100 (—); 200 (▲); 500 (◆); 1000 (■) µM.

Die Aufnahme von Glucose wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 1 mM Glucose über 20 min hinweg gemessen (Abb. 9). Abhängig von der Glucosekonzentration im Medium wird in den Zellen eine bestimmte Glucosekonzentration erreicht, die dann konstant bleibt.

Um zu bestätigen, daß es sich bei der Glucoseaufnahme durch *O. oeni* um einen energiegetriebenen aktiven Transport handelt, wurde die Anreicherung für die Glucose bestimmt. Dazu wurde die intrazelluläre Glucosekonzentration nach 20 min Inkubation mit Glucose (Abb. 9) berechnet und durch die verbliebene Glucosekonzentration im Medium dividiert (Abb. 10). Der Anreicherungsfaktor ist nicht konstant, sondern nimmt mit zunehmender Glucosekonzentration im Medium ab. Der höchste Faktor war 55 bei einer extrazellulären Glucosekonzentration von 8,6 µM, der niedrigste Wert war Faktor 15 bei 960 µM extrazellulärer Glucose.

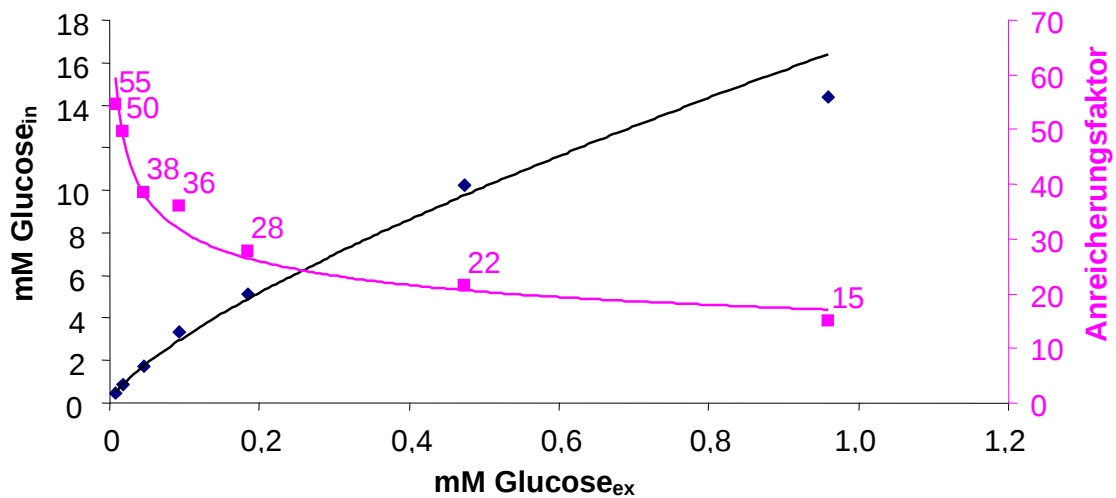


Abb. 10: Intrazelluläre Anreicherung von Glucose. Intrazelluläre Glucosekonzentration nach 20 min Inkubation(◆) und Anreicherungsfaktor(■). Die Regressionskurve durch die Meßpunkte(◆) entspricht einer Potenzfunktion mit der Formel $\text{Glucose}_{\text{in}} = 105,34 * [\text{Glucose}_{\text{ex}}]^{0,7351}$. Dabei sind $[\text{Glucose}_{\text{in}}]$ und $[\text{Glucose}_{\text{ex}}]$ jeweils in μM anzugeben.

Glucosetransport: pH-Optimum

Das pH-Optimum für den Glucosetransport wurde in einem Mehrkomponenten- (FPT-) Puffer bestimmt, dessen pH-Wert über eine Spanne von pH 3 bis 9 in Schritten von 0,5 pH- Einheiten erhöht wurde. Bei Werten unterhalb von pH 4 findet kein (messbarer) Glucosetransport mehr statt. Desweiteren scheint es nicht nur EIN pH- Optimum zu geben, sondern ZWEI. Nach Zellzucht bei einem Anfangs-pH von 5,8 (Abb. 11) zeigt der Kurvenverlauf ein Maximum bei etwa pH 7 und außerdem eine Schulter bei pH 5. Nach Zellzucht bei einem Anfangs-pH von 4 im Medium ist das Maximum bei pH 7 niedriger als nach Zucht bei pH 5,8, und aus der Schulter bei pH 5 wird ein eigenständiges Maximum.

Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, daß zwei unterschiedliche Carrier existieren. Der erste hat ein pH- Optimum bei pH 5, der zweite bei pH 7. Der erste Carrier ist - unabhängig vom pH- Wert des Zuchtmediums immer in gleichen Aktivitäten zu finden. Der Carrier mit dem pH- Optimum bei pH 7 ist dagegen nur nach Zucht bei höheren pH- Werten in maximalen Aktivitäten zu finden.

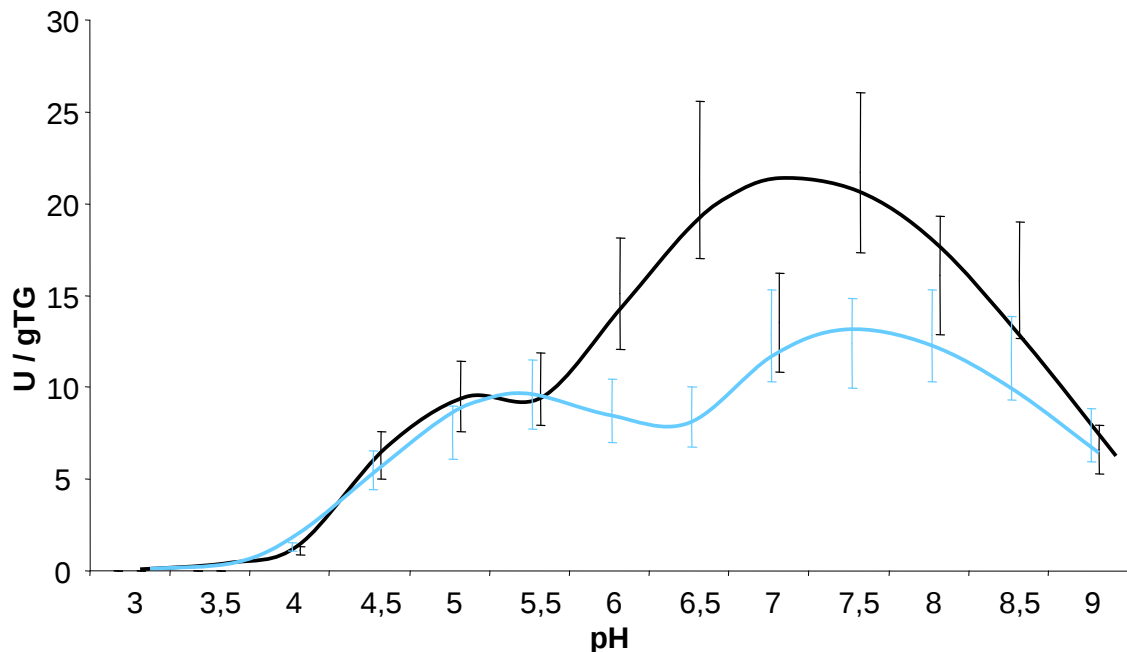


Abb. 11: Einfluß des pH-Wertes in der Umgebung auf die Aktivität des Glucosetransports. Die Glucosekonzentration im Experiment war 200 μ M. Nach Zellzucht bei pH=5,8 ist eine Kurve mit einem Maximum im neutralen pH-Bereich und einer Schulter bei pH=5 zu erkennen (schwarz). Nach Zellzucht bei pH=4 ist eine Kurve mit 2 Maxima zu beobachten (hellblau). Die Höhe des Maximums im neutralen Bereich ist niedriger, als nach Zucht bei pH=5,8.

Glucosetransport: Effekt von Ethanol

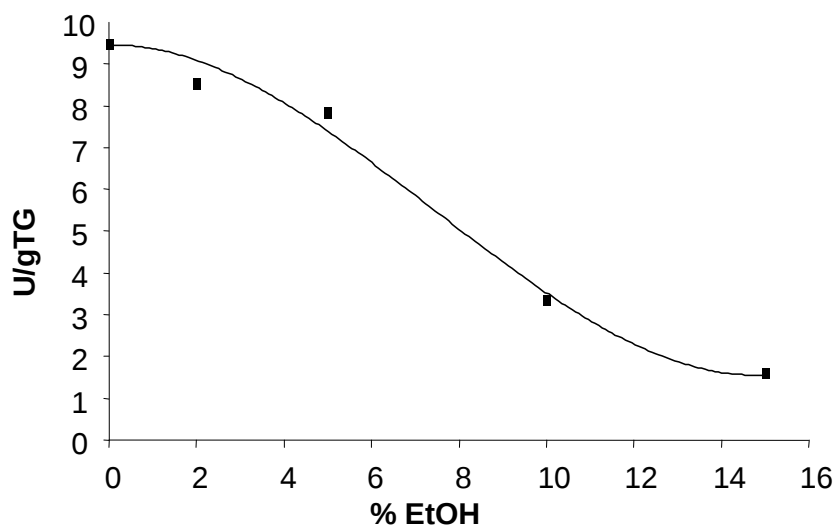


Abb. 12: Glucosetransport bei steigender Ethanolkonzentration (in vol %). Die Zellen wurden in MLD- Medium mit 40 mM Glucose ohne Ethanol gezüchtet. Der Transport wurde in Puffer bei pH 7 mit 50 μ M Glucose bestimmt.

Da *O. oeni* in seinem natürlichen Habitat neben niedrigem pH auch Ethanol ausgesetzt ist, wurde der Einfluß der Alkoholkonzentration untersucht (Abb. 12). Die Bakterien wurden ohne Adaptation (ohne Ethanol) im Medium gezüchtet. Bei solchen Zellen nimmt die Transportrate mit steigender Ethanolkonzentration im Puffer ab, und bei Ethanolgehalten zwischen 10 und 15 Prozent findet so gut wie kein Glucosetransport mehr statt.

Glucosetransport: Einfluß von Ionophoren

Zur Untersuchung der Energetik des Glucosetransports wurde der Transport in Gegenwart verschiedener Ionophore bestimmt. Die verwendeten Ionophore transportieren spezifisch bestimmte Ionen über die Membran und lassen auf diese Weise das Membranpotential, oder Teile davon, zusammenbrechen. Das Membranpotential $\Delta\mu$ setzt sich aus der elektrischen Komponente $\Delta\Psi$, welche durch Ladungstrennung entsteht, und einem Konzentrationsgradienten, z.B. dem pH-Gradienten ΔpH zusammen. In dem FPT-Puffer waren immer 33 mM Kaliumkationen vorhanden. Die intrazelluläre Kaliumkonzentration in *O. oeni* wurde nicht bestimmt, aber es ist anzunehmen, daß ein K^+ -Ionophor einen Einfluß auf einen wie auch immer gerichteten K^+ -Gradienten und damit auf die elektrische Komponente des Membranpotentials haben sollte.

Der Einfluß der Ionophore Valinomycin, Nigericin und der Entkoppler CCCP und SF6847 wurde untersucht. Valinomycin ist ein K^+ -Ionophor mit Einfluß auf die elektrische Komponente $\Delta\Psi$ des Membranpotentials $\Delta\mu$. Nigericin, ein K^+/H^+ Antiporter, baut ΔpH ab (Nicholls 1992, Salema et Al. 1994). Valinomycin und Nigericin sollten bei gleichzeitiger Verwendung sowohl den K^+ - als auch einen H^+ -Gradienten, und damit das gesamte Membranpotential zum Erliegen bringen (Nicholls 1992). CCCP und SF6847 sind Protonophore, die speziell das durch den H^+ -Gradienten aufgebaute Membranpotential $\Delta\mu\text{H}^+$ zusammenbrechen lassen (Nicholls 1992, Veyrat 1994, Hayashi 1999).

Bei pH 5 (Abb. 13A) ist der Glucose-Transport bei energetisierten Zellen um den Faktor 4,1 aktiver als bei nicht energetisierten Zellen. Die Ionophore zeigen hier starke Effekte: Valinomycin verringert die Transportrate auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Die anderen Ionophore senken die Aktivität auf denselben Wert, der mit nicht energetisierten Zellen erhalten wird.

Bei pH 7 sehen die Verhältnisse anders aus (Abb. 13B). Auch hier ist die Transportaktivität energetisierter Zellen vier bis fünfmal höher als die nichtenergetisierter Zellen. Die Zugabe von Valinomycin und Nigericin hat weder einzeln, noch in Kombination, einen hemmenden Effekt. Die Zugabe der Protonophore CCCP und SF6847 bewirkt nur ein schwaches Sinken der Aktivität. In manchen Experimenten war kein Sinken zu beobachten.

Die Schlußfolgerung ist, daß bei pH 5 der Transport über das Membranpotential $\Delta\mu\text{H}^+$ angetrieben wird. Bei pH 7 muß der Transport dagegen durch einen anderen (aktiven) Mechanismus getrieben werden.

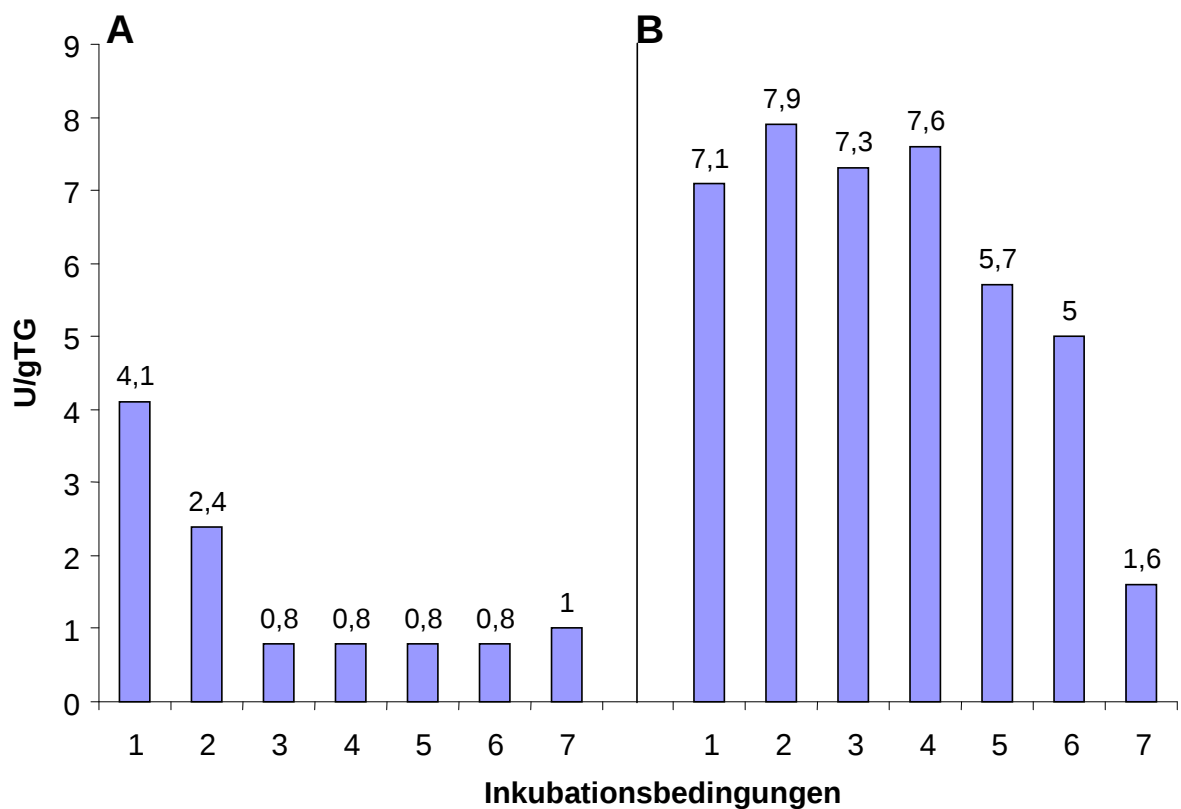


Abb. 13: Glucosetransport mit Ionophoren bei pH 5 (A) oder pH 7 (B).

Energetisierte Zellen wurden ohne Hemmstoff (1) oder mit 2 μM Valinomycin (2), 1 μM Nigericin (3), 2 μM Valinomycin+1 μM Nigericin (4), 200 μM CCCP (5) oder 10 μM SF6847 (6) inkubiert. (7) zeigt den Transport von nicht energetisierten Bakterien. Der Transport wurde mit 100 μM [^{14}C]-Glucose bestimmt.

Glucosetransport: K_M und V_{max}

Zur Charakterisierung der Carrier sollten die kinetischen Parameter K_M und V_{max} bestimmt werden. Die Transportaktivität wurde bei pH 7 und pH 5 für Glucosekonzentrationen zwischen 5 μ M und 5 mM ermittelt. K_M und V_{max} wurden über ein Computerprogramm aus den jeweiligen Anfangsgeschwindigkeiten berechnet. Das Programm basiert auf der Michaelis-Menten-Gleichung und minimiert die Fehler mit der Methode der kleinsten Quadrate (Froehlich).

Bei einem pH-Wert von 7 ist bereits bei niedrigen Glucose-Konzentrationen Transport zu beobachten; der K_M -Wert liegt bei 9 μ M, und bereits bei 20 μ M Glucose ist eine Sättigung und ein V_{max} von ca. 12 U/gTG erreicht (Abb. 14A). Die Anwesenheit des Protonophors CCCP hat nur einen geringen Effekt, wie bereits vorher gezeigt (Abb. 13B). Bei weiter steigender Glucosekonzentration nimmt die Transportgeschwindigkeit im millimolaren Bereich weiter zu. K_M und V_{max} sind nicht bestimmbar. Während die Beziehung zwischen Transportgeschwindigkeit und

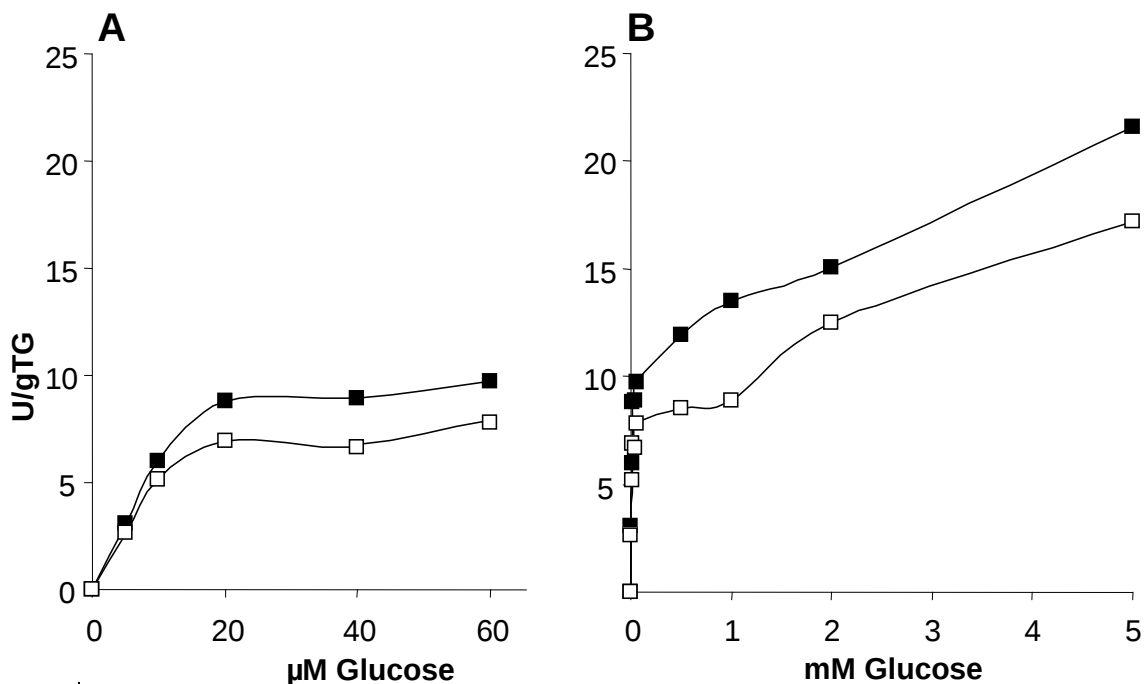


Abb. 14: Zweiphasige Zunahme des Glucosetransports in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration bei pH 7. Energetisierte Zellen wurden mit steigenden Glucosekonzentrationen inkubiert und die Transportaktivität bestimmt.

(A) Bei niedrigen Konzentrationen findet Transport mit hoher Affinität statt, der durch 200 μ M CCCP kaum beeinträchtigt wird. Ohne CCCP (■) wird für K_M 9,1 μ M und für V_{max} 12,5 U/gTG erhalten. Mit CCCP (□) sind K_M 7,6 μ M und V_{max} 10,0 U/gTG.

(B) Bei hohen Glucosekonzentrationen wird keine Sättigung erreicht und CCCP hat keinen Effekt.

Konzentration des Substrates bei niedrigen Substratkonzentrationen einer Michaelis-Menten Kinetik gehorcht, ist dies bei hohen Substratkonzentrationen nicht mehr der Fall (Abb. 14B).

Bei einem pH-Wert von 5 im Puffer (Abb. 15A) erhält man ebenfalls eine Sättigung des Glucosetransportes bei niedrigen Glucosekonzentrationen mit einem K_M -Wert von 9 μM . Allerdings ist V_{max} mit 9 U/gTG hier niedriger als bei pH 7. Im millimolaren Bereich (Abb. 15B) nimmt der Glucosetransport mit steigender Glucosekonzentration weiter zu. Auch hier gehorcht die Zunahme bei hohen Konzentrationen keiner Michaelis-Menten Kinetik. Deshalb sind weder K_M noch V_{max} bestimmbar. Auch mit 50 mM Glucose ist V_{max} nicht erreicht (Abb. 16). Die Anwesenheit des Protonophors

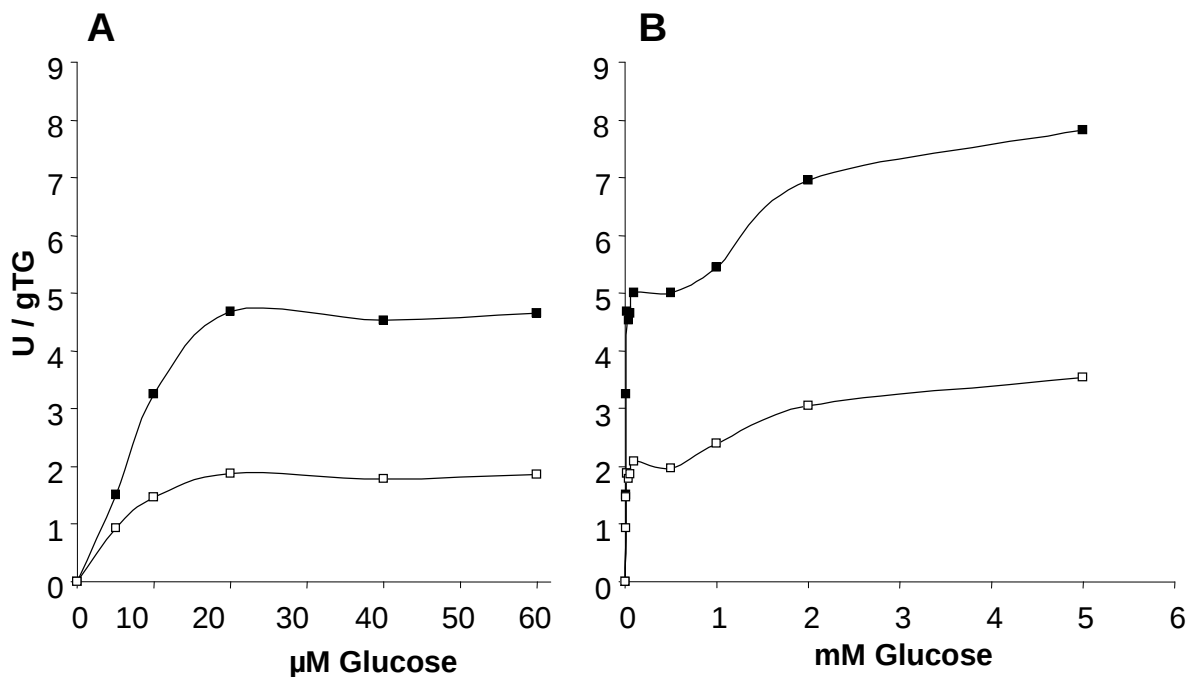


Abb. 15: Zweiphasige Zunahme des Glucosetransports in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration bei pH 5. Energetisierte Zellen wurden mit steigenden Glucosekonzentrationen inkubiert und die Transportaktivität bestimmt.

(A) Bei niedrigen Konzentrationen findet Transport mit hoher Affinität statt, der durch 200 μM CCCP stark beeinträchtigt wird. Ohne CCCP (■) ist $K_m = 9,3 \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 8,7 \text{ U/gTG}$. Mit CCCP (□) ist $K_m = 3,2 \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 2,6 \text{ U/gTG}$

(B) Niederaffiner Transport: Eine Sättigung wird nicht erreicht

CCCP hat nur auf den hochaffinen Transport einen hemmenden Effekt, nicht aber auf den niederaffinen Transport (Abb. 15).

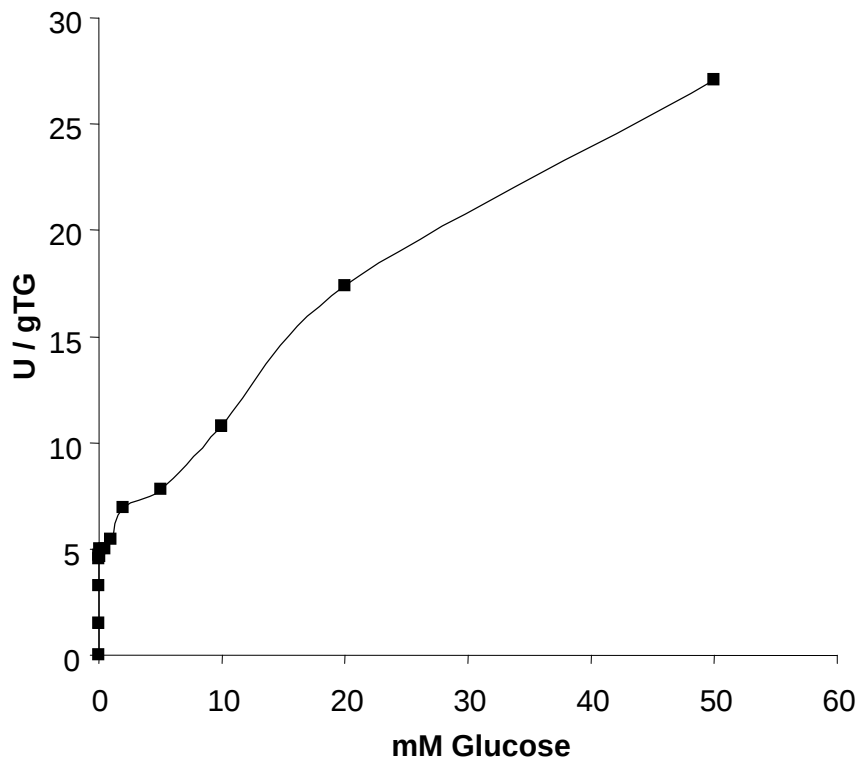


Abb. 16: Zunahme des Glucosetransportes in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration bei sehr hohen Glucosekonzentrationen. Energetisierte Zellen wurden in Puffer bei pH = 5 und steigenden Glucosekonzentrationen inkubiert.

Diese Ergebnisse unterstützen die Interpretation, daß zwei Glucosecarrier vorliegen: Bei pH 5 arbeitet hauptsächlich ein sekundärer, vom Membranpotential getriebener Carrier mit hoher Substrataffinität, während bei pH 7 ein anderer, wahrscheinlich ebenfalls aktiver, Carrier vorliegt. Sowohl bei pH 5, als auch bei pH 7 wird außerdem bei hohen Glucosekonzentrationen eine Glucoseaufnahme beobachtet, die über (erleichterte ?) Diffusion erfolgen könnte, und somit einen dritten Carrier erforderlich macht.

Glucosetransport: Einfluß des Zuchtsubstrates

Die folgenden Untersuchungen wurden nur bei pH 5 durchgeführt, da es sich hierbei um den für *O. oeni* physiologischen pH-Wert handelt. In MLD-Medium ist *O. oeni* nicht in der Lage, bei pH 7 mit Glucose zu wachsen (Wachstumskurven nicht gezeigt).

Oenococcus oeni B1 wurde mit Glucose, Fructose oder Ribose gezüchtet, und die Transportaktivität mit Glucose wurde untersucht. Der hochaffine Glucosetransport ist nach Zucht mit Fructose doppelt so hoch wie nach Zucht mit Glucose (Abb. 17A). Der hemmende Effekt von CCCP ist nach Zucht mit Fructose etwas größer als nach Zucht mit Glucose. Nach Zucht mit der Pentose Ribose ist die Glucosetransportaktivität extrem gering, sie liegt dann sogar noch unterhalb der nach Glucosezucht in Gegenwart von CCCP gemessenen Aktivität.

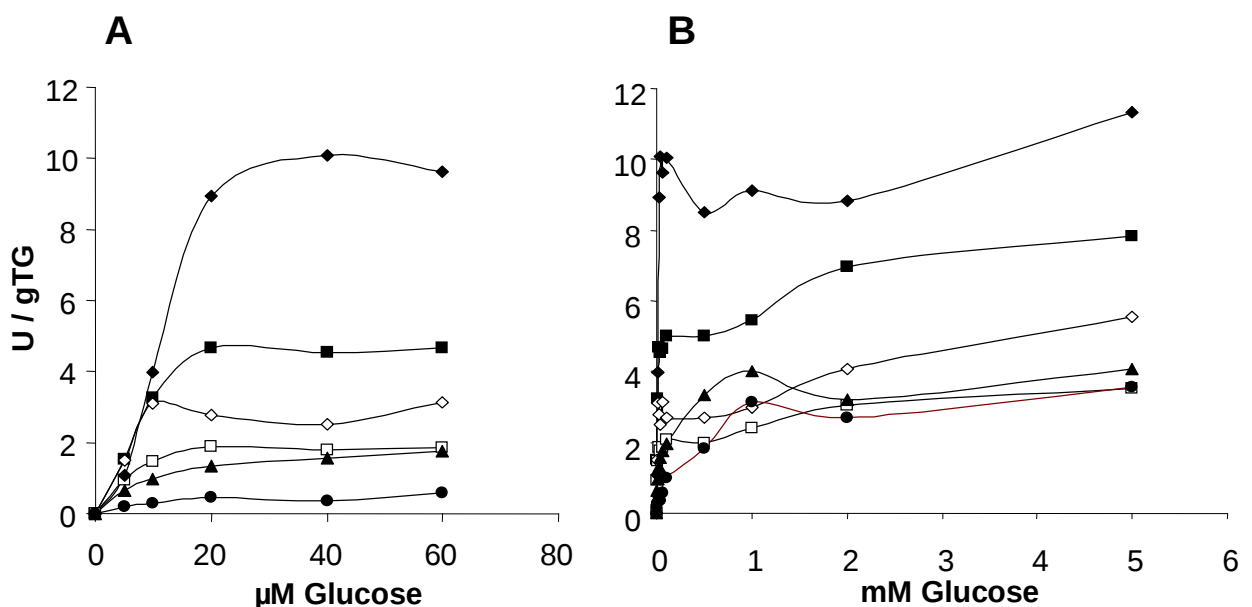


Abb. 17: Glucosetransport bei pH 5 nach Zucht mit verschiedenen Zuckern. Die Glucosetransportgeschwindigkeit wurde bei niedrigen (A) und hohen (B) Konzentrationen gemessen: ohne CCCP nach Zucht mit Glucose (■), Fructose (◆) oder Ribose (▲). Außerdem mit 200 µM CCCP nach Zucht mit Glucose (□) oder Fructose (◇). Zusätzlich wurde der Transport bei Stamm 5-1 nach Zucht mit Glucose+Fructose (●) gemessen.

Zusätzlich wurde der Glucosetransport eines weiteren *Oenococcus* Stamms untersucht, der mit Glucose oder Fructose als einziger C-Quelle nicht wachsen kann und gleichzeitige Anwesenheit von Glucose und Fructose benötigt (Stamm 5-1). Dieser Stamm scheint keinen hochaffinen Glucoseaufnahmecarrier zu besitzen. Aufnahmeaktivitäten für Glucose fehlen fast vollständig (Abb. 17A).

Im millimolaren Bereich ist sowohl beim Stamm B1, als auch bei 5-1 die niederaffine Glucoseaufnahmeaktivität zu beobachten. Diese Transportaktivität ist unabhängig vom verwendeten Wuchssubstrat vorhanden (Abb. 17B).

4.2.2 Fructosetransport

Die Aufnahme von Fructose in die Zellen von *O. oeni* ist, wie die Glucoseaufnahme, ein relativ langsamer Prozeß (Abb. 18). Durch Energetisieren der Zellen erhöht sich die anfängliche Transportaktivität fast um den Faktor 3 auf 4,1 U/gTG. Bei einer Fructosekonzentration im Medium von 100 μM wird die Fructose um den Faktor 26 in den Zellen angereichert. Die Anwesenheit von CCCP im Medium drückt den Fructosetransport auf das Niveau nichtenergetisierter Zellen.

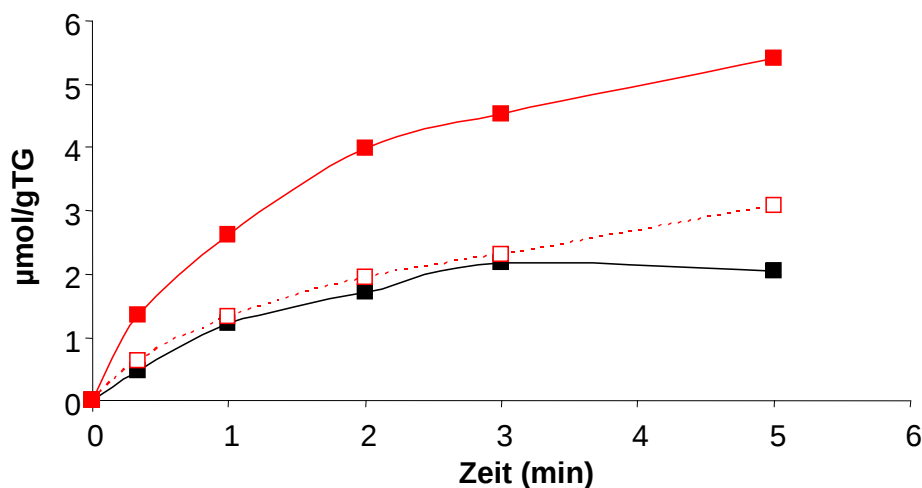


Abb. 18: Fructoseaufnahme bei pH = 5 im Puffer. Die Fructoseaufnahme in energetisierte Zellen wurde ohne (■) und in Anwesenheit von 200 μM CCCP (□) gemessen. Zusätzlich wurde die Aufnahme in nicht energetisierte Zellen bestimmt (■).

Fructosetransport: K_M , $V_{\max}$ und Einfluß des Zuchtsubstrates

Wie für den Glucosetransport beschrieben, wurde *O. oeni* mit Glucose, Fructose oder Ribose gezüchtet und anschließend die Fructoseaufnahmeaktivität bei pH 5 und steigenden Fructosekonzentrationen gemessen (Abb. 19). Nach Zucht mit Fructose ergibt sich bei niedrigen Fructosekonzentrationen eine Michaelis-Menten Kinetik, und es lassen sich K_M mit 38 μM und $V_{\max}$ mit 5,8 U/gTG bestimmen. Bei hohen Fructosekonzentrationen (>100 μM) steigt die Transportgeschwindigkeit weiter an, die Kinetik ist aber nicht vom Michaelis-Menten Typ, und $V_{\max}$ oder K_M können nicht bestimmt werden. Auch mit 50 mM Fructose wird noch keine Sättigung erreicht (Abb. 20).

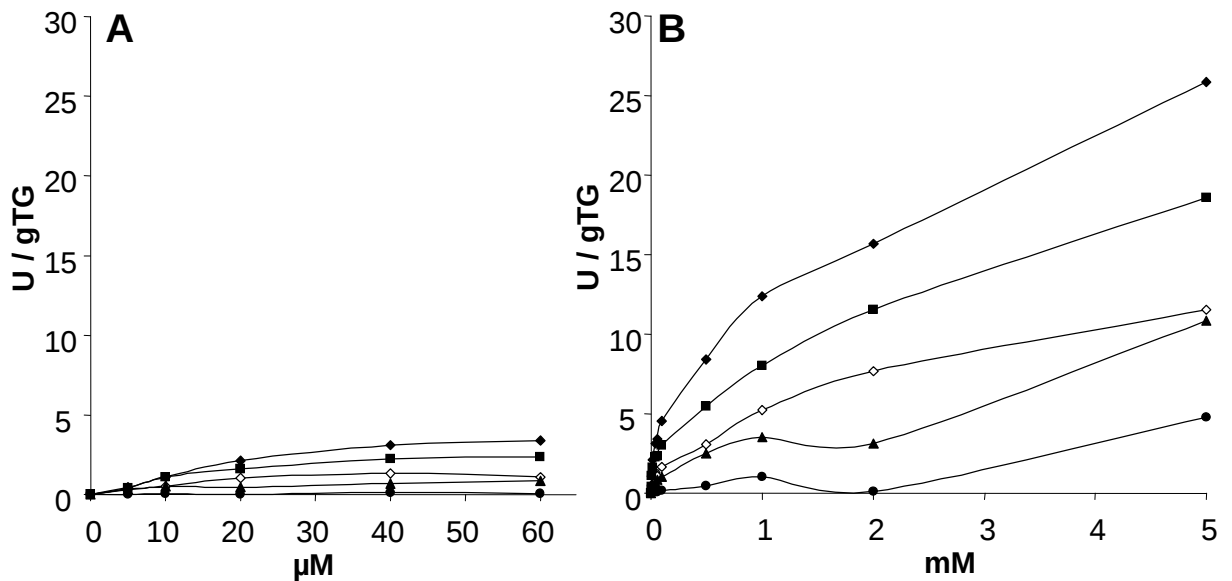


Abb. 19: Fructosetransport bei pH 5 nach Zucht mit verschiedenen Zuckern. Die Transportgeschwindigkeit wurde bei niedrigen (A) und hohen (B) Konzentrationen gemessen: ohne CCCP nach Zucht mit Glucose (■), Fructose (♦) oder Ribose (▲). Außerdem mit 200 µM CCCP nach Zucht mit Fructose (◇). Zusätzlich wurde der Transport bei Stamm 5-1 nach Zucht mit Glucose+Fructose (●) gemessen.

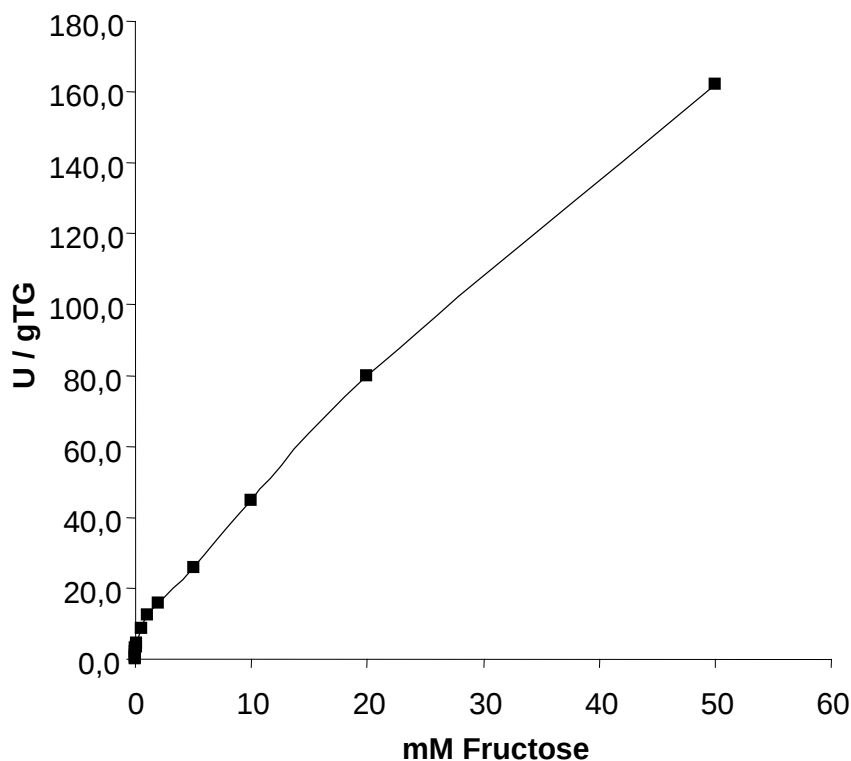


Abb. 20: Zunahme des Fructosetransportes in Abhängigkeit von der Fructosekonzentration bei sehr hohen Fructosekonzentrationen. Energetisierte Zellen wurden in Puffer bei pH = 5 und steigenden Glucosekonzentrationen inkubiert.

Der hochaffine Fructosetransport ist nach Zucht mit Fructose am höchsten, und nach Zucht mit Ribose kaum noch meßbar. Der Stamm 5-1 transportiert bei niedrigen Konzentrationen keine Fructose (Abb. 19A). Bei hohen Fructosekonzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) kann man bei allen Zucht- und Inkubationsbedingungen einen kontinuierlichen Anstieg des Fructosetransports beobachten (Abb. 19B). Allerdings ist der Fructosetransport, der mit 5 mM erreicht wird, etwa doppelt so hoch wie der Glucosetransport.

Wirkung von CCCP

Der Einfluß des Entkopplers CCCP auf den Fructosetransport energetisierter Zellen wurde bei pH 5 und 7 gemessen, (Abb. 21). Bei pH 5 hat CCCP einen deutlichen Effekt, bei pH 7 nur einen schwachen. Es ergeben sich für den Fructosetransport folgende Schlußfolgerungen:

Bei pH 7 scheint analog zu Glucose ein aktiver Fructosetransport mit zu existieren, der nicht durch CCCP hemmbar ist. Zusätzlich gibt es bei pH 5, wie bei Glucose, einen sekundären Fructosetransport, der vom Membranpotential abhängig ist.

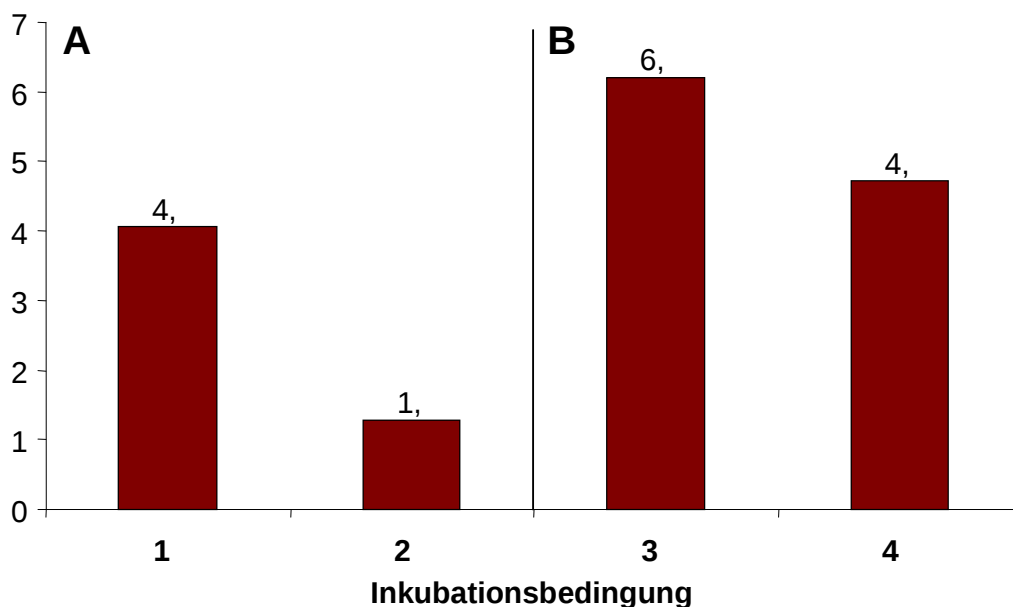


Abb. 21: Effekt von CCCP auf den Fructosetransport bei pH 5 oder pH 7. Energetisierte Zellen wurden in Puffer bei pH = 5 (A) oder pH = 7 (B) inkubiert. Die anfängliche Transportgeschwindigkeit wurde mit 100 μM ^{14}C -Fructose ohne (1, 3) oder mit 200 μM CCCP (2, 4) gemessen.

4.2.3 Konkurrenzexperimente

Die Transportmessungen wurden mit 100 μM Glucose oder Fructose in Anwesenheit anderer Zucker oder Zuckeralkohole in 100-fachem Überschuß durchgeführt (Abb. 22), um Aussagen über die Substratspezifität des hochaffinen Carriers machen zu können. Das getestete Zuckerspektrum enthält Zucker, die bevorzugt von Milchsäurebakterien verstoffwechselt werden (Bergey 1974). Der Glucosetransport wird sehr stark durch die Hexosen Mannose und 2-Deoxy-Glucose gehemmt, außerdem stark durch die Disaccharide Maltose und

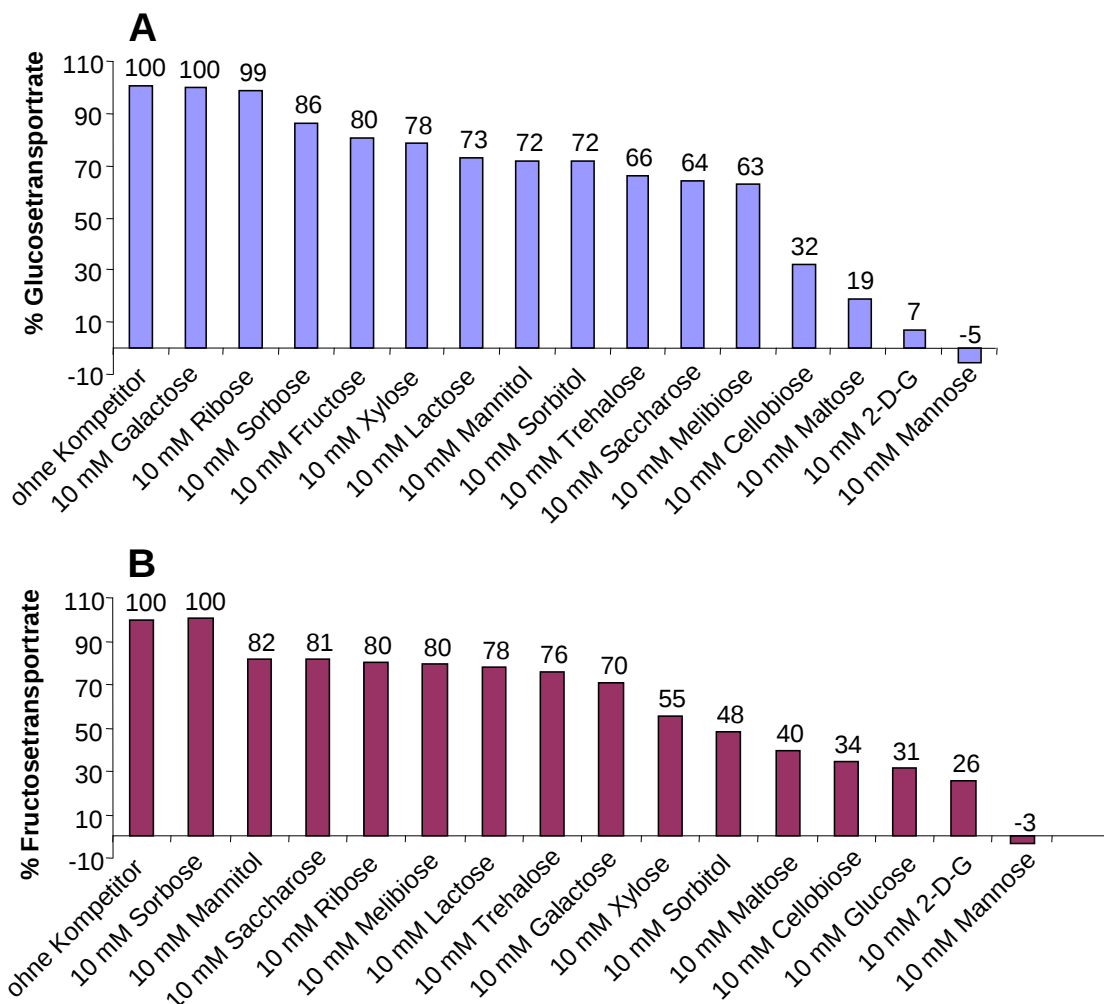


Abb. 22: Transport von Glucose oder Fructose in Anwesenheit von Kompetitoren. Die Aufnahme von 100 μM [^{14}C]-Glucose (**A**) oder 100 μM [^{14}C]-Fructose (**B**) in energetisierte Zellen wurde bei pH = 5 gemessen. Die Kompetitoren waren in 100-fachem Überschuß vorhanden. Die Transportaktivität ist in Prozent angegeben, ohne Kompetitor ist sie 100 %.

Cellobiose (Abb. 22). Die anderen getesteten Pentosen, Hexosen (einschließlich Fructose), Zuckeralkohole und Disaccharide sind nur schwache oder keine Kompetitoren. Die Pentose Ribose ist nicht kompetitiv.

Ganz ähnlich sieht es beim Fructosetransport aus. Auch dieser wird am stärksten durch Mannose gehemmt, außerdem stark durch 2-Deoxy-Glucose, Glucose, Cellobiose und Maltose. Der Rest der getesteten Zucker verhält sich ähnlich wie beim Glucosetransport schwach bis nicht kompetitiv, wobei es allerdings graduelle Unterschiede gibt. Am auffälligsten ist hier, daß Sorbitol, Xylose und Ribose den Fructosetransport im Vergleich zum Glucosetransport etwas stärker hemmen.

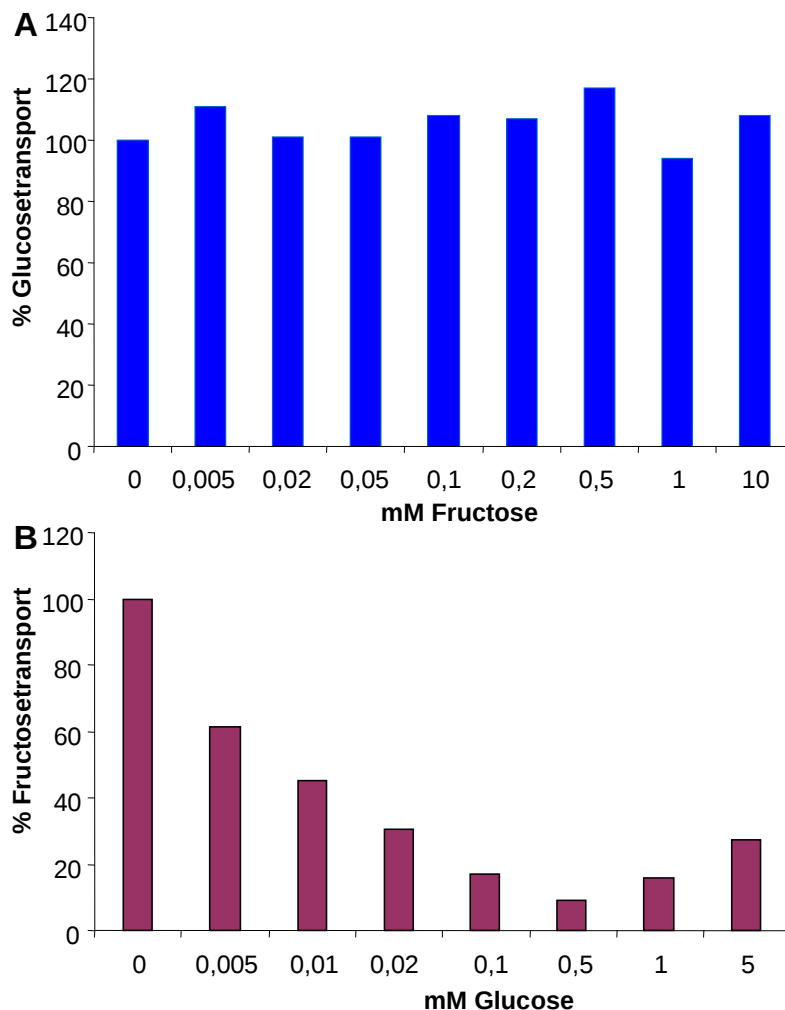


Abb. 23: Transport von Glucose oder Fructose in Anwesenheit des jeweils anderen Zuckers. Die Aufnahmegeschwindigkeit von 200 μM [^{14}C]-Glucose bei steigender Konzentration kalter Fructose (**A**) oder 100 μM [^{14}C]-Fructose (**B**) bei steigender Konzentration kalter Glucose in energetisierte Zellen wurde bei pH = 5 gemessen.

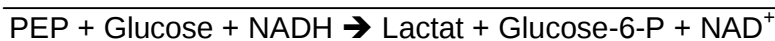
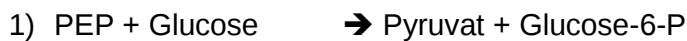
Die kompetitive Hemmung des Glucose- und Fructosetransportes durch den jeweils anderen Zucker wurde durch eine Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit genauer untersucht. Der hochaffine Glucose- und Fructosetransport wurden in Gegenwart steigender Konzentrationen des jeweils anderen Zuckers gemessen. Der Glucosetransport (Abb. 23A) wurde durch Fructose nicht gehemmt. Auch bei einem 50- fachen Überschuß Fructose war keine Hemmung zu sehen. Der Fructosetransport dagegen wurde bereits durch niedrige Glucosekonzentrationen inhibiert (Abb. 23B). Bei einer Glucosekonzentration von 10 μM wurde der Fructosetransport zu 50 % gehemmt, und bei äquimolarer Konzentration (100 μM) zu 83 %. Das bedeutet, daß Glucose von diesem Carrier mit höherer Affinität akzeptiert wird. Ein K_i - Wert für die Hemmung des hochaffinen Fructosetransports durch Glucose wurde nicht genau bestimmt, er dürfte aber im Bereich von 10 μM Glucose liegen.

Die Ergebnisse legen insgesamt die Schlußfolgerung nahe, daß es erstens einen sekundären, vom Membranpotential abhängigen, Carrier gibt, der eine hohe Affinität zu Glucose, und eine weniger hohe Affinität zu Fructose hat. Möglicherweise gibt es sogar noch einen zweiten sekundären Carrier, der nur Glucose, nicht aber Fructose, transportiert. Zweitens gibt es wahrscheinlich einen passiven Carrier mit niedriger Affinität zu Glucose und Fructose, der bei hohen Substratkonzentrationen arbeitet und nicht durch CCCP hemmbar ist. Drittens ist wahrscheinlich noch ein aktiver Carrier für Glucose und Fructose vorhanden, der sich durch CCCP nicht hemmen lässt.

4.2.4 Phosphotransferase- Aktivitäten

Aus den bisherigen Transportmessungen lässt sich schließen, daß es in *O. oeni* neben den hochaffinen sekundären Carriern (bei pH 5) andere hochaffine aktive Carrier (bei pH 7) geben sollte, die nach einem anderen Mechanismus arbeiten und unabhängig vom Membranpotential sind. Bei diesen Carriern könnte es sich um ein Phosphotransferasesystem handeln (siehe Diskussion). Aus diesem Grund wurden permeabilisierte Zellen auf das Vorhandensein einer Phosphotransferaseaktivität getestet (Tab. 19).

Die Anwesenheit dieser Carrier wird nicht durch Aufnahme der Substrate in die Zelle, sondern durch Nachweis einer Phosphotransferaseaktivität gemessen. Bei diesem Test wird der PEP- abhängige Verbrauch von NADH nach Zusatz des Transportsubstrates Glucose oder Fructose in permeabilisierten Zellen gemessen. Es handelt sich um einen gekoppelten Enzymtest. Im ersten Schritt wird bei der Zuckerphosphorylierung PEP zu Pyruvat dephosphoryliert. Im zweiten Schritt wird Pyruvat unter NADH- Verbrauch zu Lactat reduziert:



Tab. 19: Phosphotransferaseaktivität mit Glucose und Fructose. Mit permeabilisierten Zellen wurde nach Zucht mit Glucose oder Fructose der NADH-Verbrauch gemessen, der aus der Reduktion des durch die PEP- abhängige Zuckerphosphorylierung gebildeten Pyruvats zu Lactat resultiert.

<i>Organismus</i>	Zucht- Substrat	PTS- Aktivität in U / gTG mit	
		Glucose	Fructose
<i>O. oeni</i>	Glucose	<1	<1
	Fructose	<1	<2
<i>L. mesenteroides</i>	Glucose	<1	<2
	Fructose	<1	<2
<i>E. coli</i> AN387	Glucose	114	ND
<i>Lb. Plantarum</i>	Glucose	24	<1

In *E. coli* und *Lactobacillus plantarum*, in denen das Vorliegen dieser Transportaktivitäten bekannt ist, konnte ein Glucose- abhängiges PTS- System nachgewiesen werden (Tab. 19). Für *Oenococcus oeni* und *Leuconostoc mesenteroides* konnte jedoch weder ein Glucose- noch ein Fructose- abhängiges PTS- System nachgewiesen werden. Da in dem Milchsäurebakterium *Lb. plantarum* mit der Methode ein PTS- System meßbar ist, ist davon auszugehen, daß in *O. oeni* und *L. mesenteroides* vergleichbare PTS- Systeme fehlen oder nur in sehr geringen Aktivitäten vorliegen.

4.3 Genomauswertung

Das Genom des *Oenococcus oeni* Stamm PSU-1 wurde vom Joint Genome Institute (vgl. Internetseite) sequenziert. Es enthält mindestens 1800 Gene, die für mögliche Proteine codieren können (Eichert 2004). Es wurden die Gene identifiziert, die für am Transport von Glucose oder Fructose beteiligte Proteine codieren könnten.

4.3.1 Sekundäre Carrier (Major Facilitator Superfamily)

Alle bekannten Uniporter, Symporter und Antiporter werden gemeinsam in der Major Facilitator Superfamily (MFS) zusammengefasst. Allen MFS- Carriern ist gemeinsam, daß sie aus 400 bis 800 Aminosäuren bestehen, und in ihrer Struktur 12 bis 14 (normalerweise zweimal sechs) Transmembranhelices vorkommen. Die MFS besteht aus 18 Unterfamilien, die sich aus den unterschiedlichen Stoffklassen der transportierten Substrate ergeben. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der einzelnen Proteine in einer Unterfamilie ist untereinander größer, als die Ähnlichkeit mit Proteinen aus anderen Unterfamilien. Eine der Unterfamilien ist die Familie der Zuckertransporter (Sugar Porter Family). Sie umfasst alle sekundären und passiven Carrier, die bevorzugt Hexosen transportieren (Pao et Al. 1998).

Aus den vom JGI gefundenen Genen sollten Kandidatengene identifiziert werden, die für die postulierten hochaffinen Hexose:H⁺- Symporter codieren. Dazu wurden die Gene von bereits bekannten Hexosecarriern aus der Sugar Porter Family gegen das Genom von *Oenococcus* geblastet (Tab. 20). Die Stellen im *Oenococcus* Genom, die lange Abschnitte (mindestens 300 AS) mit Sequenzähnlichkeit zu den MFS- Genen (mehr als 20 % identische AS) enthalten, wurden identifiziert. Dies sind in Tab. 20 alle Sequenzen oberhalb der gestrichelten Linie. Die Gene, die unterhalb der gestrichelten Linie aufgeführt sind, weisen mit denselben Stellen im *Oenococcus* Genom Sequenzähnlichkeiten auf, die sich aber über viel kürzere Abschnitte erstrecken. Da hier nicht komplette Gene, sondern nur einzelne Genabschnitte (Domänen) verglichen werden, sind die Werte für E-Value und Aminosäure- Identität teilweise besser als die der langen Sequenzvergleiche. Da sich die Ähnlichkeit bei den langen Abschnitten jedoch in der Regel über das gesamte Protein erstreckt,

Tab. 20: Sequenzvergleich von Hexosecarrier- Genen mit dem Genom von *O. oeni*. Der linke Teil der Tabelle zeigt die bekannten Hexosecarrier, der rechte Teil entsprechende Genomabschnitte von *O. oeni* mit Sequenzähnlichkeit. Von den bekannten Carriern sind Genname, Organismus, die Eintrags- Nr. in der entsprechenden Datenbank (gi= NCBI, pir= Protein Information Resource ,sp= SwissProt) und die Funktion angegeben. Für die ähnlichen Abschnitte auf dem *Oenococcus* Genom sind der Genomabschnitt („Scaffold“), die Lage des Sequenzvergleichs (in Nucleotiden), der E- Value, die Anzahl der kodierten identischen Aminosäuren und die Länge des Sequenzvergleichs in Aminosäuren angegeben.

Bekannte sekundäre Carrier:				Blastergebnisse vs. <i>O.oeni</i> / Genom:					
Gen	Organismus	Datenbank Eintrags Nr	Funktion	Scaffold	Pos. Von Bis	E-Val	% ID	Sequenz Vergleich Länge(AS)	
GTR	<i>Synechocystis sp.</i>	sp P15729	Glucose:H+ Symport	21	21830 20466	5E-55	28	474	
xyIE	<i>E.coli K12-MG1655</i>	gi 16131857	Xylose/H+ Symport	6	38052 39368	2E-55	30	473	
Glf	<i>Zymomonas mobilis</i>	sp P21906	Glucose Transport, erleichterte Diffusion	6	38094 39368	6E-45	27	455	
829	<i>Oenococcus oeni</i>	scaffold 21	Ähnlichkeit zu Zuckercarrier	20	2063 3229	2E-12	24	453	
GTR	<i>Synechocystis sp.</i>	sp P15729	Glucose:H+ Symport	5	86190 84895	2E-52	29	447	
GTR	<i>Synechocystis sp.</i>	sp P15729	Glucose:H+ Symport	3	11104 12351	3E-47	28	437	
GTR	<i>Synechocystis sp.</i>	sp P15729	Glucose:H+ Symport	8	45698 46888	6E-08	22	432	
GTR	<i>Synechocystis sp.</i>	sp P15729	Glucose:H+ Symport	3	46474 47502	1E-08	21	407	
GlcP	<i>Bacillus subtilis</i>	sp Q796S3	Glucose/Mannose:H+ Symporter	22	5632 6756	4E-07	22	402	
GlcP	<i>Bacillus subtilis</i>	sp Q796S3	Glucose/Mannose:H+ Symporter	28	9320 8247	7E-06	23	382	
GTR	<i>Synechocystis sp.</i>	sp P15729	Glucose:H+ Symport	36	11724 10720	1E-35	25	354	
GTR	<i>Synechocystis sp.</i>	sp P15729	Glucose:H+ Symport	5	47 898	1E-47	35	295	
Hxt3	<i>S.cerevisiae</i>	sp P32466	Glucose Transporter, niedrige Affinität	3	11236 11649	1E-35	36	138	
Hxt2	<i>S.cerevisiae</i>	sp P23585	Glucose Transporter, hohe Affinität	3	11236 11643	3E-37	33	136	
Hxt4	<i>S.cerevisiae</i>	sp P32467	Glucose Transporter, niedrige Affinität	3	11236 11634	6E-32	35	133	
Glut4	<i>Rattus norvegicus</i>	sp P19357	Glucose Transporter Typ 4, insulin	21	20927 20568	9E-21	27	120	
Hxt1	<i>S.cerevisiae</i>	sp P32465	Glucose Transporter, niedrige Affinität	3	11305 11649	5E-36	40	115	
Hgt1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	sp P49374	Glucose Transporter, hohe Affinität	21	21686 21348	1E-32	23	113	
Glut1	<i>Rattus norvegicus</i>	sp P11167	Glucose Transporter Typ 1, Erythrocyten	21	20927 20592	2E-29	27	112	
Hxt5	<i>S.cerevisiae</i>	sp P38695	Glucose Transporter	3	11314 11643	8E-35	36	110	
Hxt6	<i>S.cerevisiae</i>	sp P39003	Hexose transporter, hohe Affinität	3	11305 11634	7E-33	37	110	
Hxt7	<i>S.cerevisiae</i>	sp P39004	Hexose transporter, hohe Affinität	3	11305 11634	7E-33	37	110	
Rag1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	sp P18631	Glucose transporter, niedrige Affinität	3	11314 11643	2E-35	40	110	
Hex6	<i>Ricinus communis</i>	GB L08188	Hexose transporter	3	11314 11640	2E-24	33	109	
HT1	<i>Trypanosoma vivax</i>	GB L47540	Glucose transporter	5	85224 84943	3E-07	19	94	
Hup1	<i>Chorella kessleri</i>	sp P15686	Hexose:Proton Symporter	5	584 856	1E-25	35	91	
Glut7	<i>Rattus norvegicus</i>	sp Q00712	Glucose Transporter Typ 7, Leber	3	11320 11478	5E-07	41	53	
GT2	<i>Mus musculus</i>	pir B30310	Glucose Transporter	3	11320 11478	3E-09	41	53	
GTP1	<i>Taenia solium</i>	GB U39197	Glucose Transporter	3	11320 11478	2E-08	32	53	
SGTP2	<i>Schistosoma mansoni</i>	pir B53153	Glucose Transporter	3	11320 11478	7E-11	39	53	
Glut2	<i>Rattus norvegicus</i>	sp P12336	Glucose Transporter Typ 2, Leber	3	11320 11475	9E-21	48	52	
Glut3	<i>Rattus norvegicus</i>	sp Q07647	Glucose Transporter Typ 3, Gehirn	3	11320 11475	2E-29	40	52	
Glut5	<i>Homo sapiens</i>	sp P22732	Glucose (Fructose) Transporter Typ 5	3	11320 11475	1E-18	40	52	
Hup3	<i>Chorella kessleri</i>	pir S38435	Glucose Transporter	5	605 856	3E-26	60	46	
SGTP4	<i>Schistosoma mansoni</i>	pir C53153	Glucose Transporter	3	11371 11478	3E-08	36	36	
SGTP1	<i>Schistosoma mansoni</i>	GB A53153	Glucose transporte	33	3146 3045	4E-06	32	34	
TcrHT1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	GB U05588	Hexose transporter	Kein	kein	kein	kein	0	0
Tht1E	<i>Trypanosoma brucei</i>	sp Q09037	Glucose (Fructose) Transporter	Kein	kein	kein	kein	0	0
Tht2A	<i>Trypanosoma brucei</i>	sp Q06222	Glucose transporter	Kein	kein	kein	kein	0	0
Tht2B	<i>Trypanosoma brucei</i>	sp Q06221	Glucose transporter	kein	kein	kein	kein	0	0

wurde dem Kriterium „Länge des Sequenzvergleichs“ die größte Bedeutung beigemessen. Alle Gene mit langen Sequenzvergleichen stammen aus Bakterien, alle mit kurzen Alignments dagegen aus Eucaryoten. Es wurden darauf die *Oenococcus*-Gene identifiziert, die für das Protein mit der entsprechenden Sequenzähnlichkeit kodieren. Diese Gene stellten mögliche Kandidaten für sekundäre Hexosecarrier dar und wurden durch einen Vergleich mit anderen Datenbanken (NCBI, SWISSPROT) auf ihre mögliche Funktion hin untersucht (Tab. 21).

Tab. 21: Vergleich Hexosecarrier-ähnlicher *Oenococcus*-Genprodukte mit den Datenbanken von NCBI und SWISSPROT. Der linke Teil der Tabelle zeigt „Kandidaten“-Gene aus dem Genom von *O. oeni*, die in Tab. 20 positive Sequenzvergleiche mit Hexosecarriern ergaben. Angegeben sind der Scaffold, die Gen-Nummer bei JGI, die Länge des Proteins in AS, sowie die genaue Genposition auf dem jeweiligen Scaffold.

Der rechte Teil der Tabelle zeigt zu jedem *Oenococcus* Kandidatenprotein das ähnlichste in einem Vergleich mit einer Datenbank gefundene Protein. Angegeben sind der Quell-Organismus, der Gen- oder Proteinname, die Länge in AS, die (vermutliche) Funktion, die Zugangsnummer des Proteins in der jeweiligen Datenbank, Prozent identische Aminosäuren, der E-Value und die Länge des Sequenzvergleiches.

<i>Oenococcus oeni</i>					Ähnlich zu							
Scaf- fold	Gen-Nr.	AS	von pos.	bis pos.	Organismus	Gen	AS	Funktion	Access Nr.	% id	e- value	Seq. Vergl. Länge
21	829	474	21872	20430	<i>Lb.plantarum</i>	?	488	Zucker Transport Protein, MFS Familie	sp Q88S35	61	0	420
6	1834	219	38619	39278	<i>Lactococcus lactis</i>	YhfE	217	Vermutlich Methyltransferase	gi 15672731	42	1E-47	219
20	773	409	2003	3232	<i>Lactococcus lactis</i>	?	398	Permease MDR Typ	gi 15672108	46	1E-104	395
5	1719	462	86076	84808	<i>B.subtilis</i>	YfiG	482	Metabolit Transport Protein (ähnlich)	gi 16077893	39	3E-82	436
3	1076	383	11101	12252	<i>Lb.brevis</i>	XylT	457	D-Xylose:Proton Symporter	gi 3915309	42	1E-69	355
8	2070	563	45665	47356	<i>Cl.acetobutylicum</i>	?	545	Permease MDR Typ	gi 15004812	30	3E-66	555
3	1113	361	46474	47523	<i>H. influenzae</i>	Ybo4	407	Vermutlich Transport Protein	sp P71369	46	2E-89	350
22	839	395	5605	6792	<i>L. monocytogenes</i>	?	405	Vermutlich Transport Protein	gi 16802987	30	4E-45	376
28	1047	403	9410	8199	<i>S. pneumoniae</i>	?	383	Vermutlich Transport Protein, MFS Familie	gi 15901440	27	1E-37	389
36	1349	343	11682	10696	<i>B.subtilis</i>	YfiG	482	Wahrscheinlich Transport Protein	sp P54723	48	3E-88	343
5	1629	310	74	940	<i>Lb.brevis</i>	XylT	457	D-Xylose:Proton Symporter	gi 3915309	42	1E-62	307

Von den elf postulierten Carriergenen (Gene 829, 1834, 773, 1719, 1076, 2070, 1113, 839, 1047, 1349, 1629) weisen nur zehn Genprodukte eine ausreichende Größe von mehr als 400 Aminosäuren auf. Das Genprodukt von Gen 1834 ist wesentlich kleiner (217 AS) und stellt vermutlich eine Methyltransferase dar. Von den verbleibenden 10 Genen oder Genprodukten wiesen alle die größte Ähnlichkeit zu sekundären Carriern auf, drei sogar zu Zuckercarriern (Gen 829, 1076, 1629). Von den Proteinen, die die größte Ähnlichkeit zu den vermuteten Carriern in *O. oeni* aufwiesen, war jedoch keines ein Hexosecarrier. Die Genprodukte, die Ähnlichkeiten zu Carriern für Pentosen oder zu Multidrug- Resistance- Carriern (MDR) aufweisen (Gene Nr. 1076, 1629, 773, 2070), sind vermutlich keine Hexosecarrier. Somit bleiben als gute Kandidaten für Hexosecarrier die sechs Gene 829, 1719, 1113, 839, 1047 und 1349 übrig.

Für die zehn postulierten sekundären Carrier wurde mittels des TMHMM-Servers V. 2.0 (vgl. Internetseiten) die Anzahl vorhersagbarer Transmembranhelices bestimmt. Für typische bekannte Hexosecarrier werden mit diesem Programm zweimal sechs Transmembranhelices vorhergesagt (Abb. 24). Von den zehn postulierten sekundären Carriern von *O. oeni* wurde nur für vier Genprodukte eine „zweimal sechs Transmembran- Helix Struktur“ vorausgesagt (Abb. 25; Gene 1719, 829, 839, 1047). Für die übrigen Proteine werden weniger oder mehr Transmembranhelices vorhergesagt, Genprodukt 1834 enthält keine mit diesem Programm vorhersagbare Transmembranhelix.

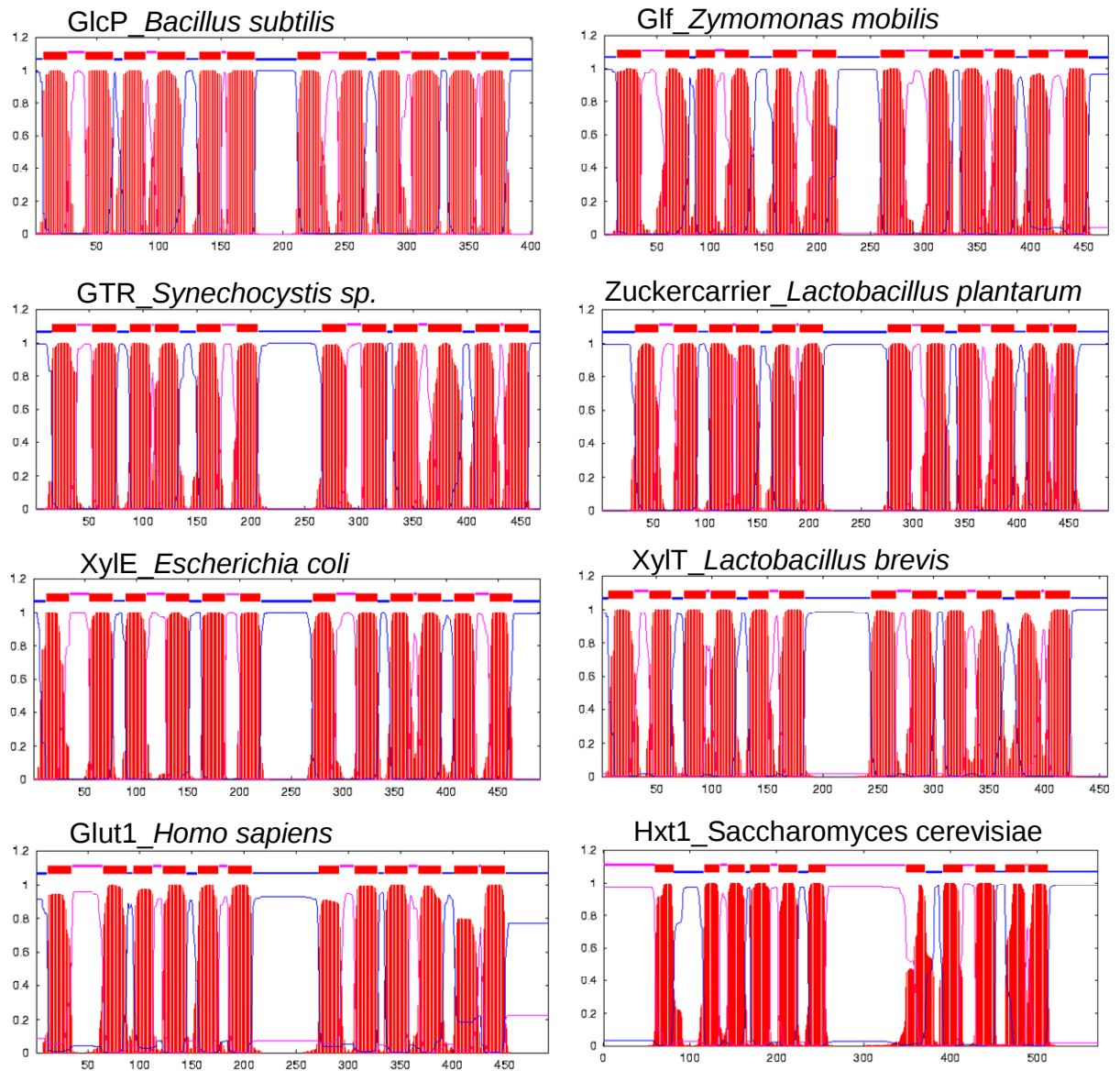


Abb. 24: Transmembranhelix- Struktur bekannter Zuckercarrier der Major Facilitator Superfamily (siehe Tab. 20). Charakteristisch ist die Sekundärstruktur mit 2 x 6 Transmembranhelices. Die Abbildungen wurden durch ein Computerprogramm (TMHMM- Server, siehe Text) nach Eingabe der Aminosäuresequenz automatisch erstellt. Rote Bereiche entsprechen Transmembranhelices, blaue Bereiche sollen intrazellulär liegen, pinkfarbene Bereiche extrazellulär. Die Kurven zeigen die Wahrscheinlichkeit von 0 bis 1 (=100%), mit der die Bereiche innerhalb oder außerhalb der Membran liegen.

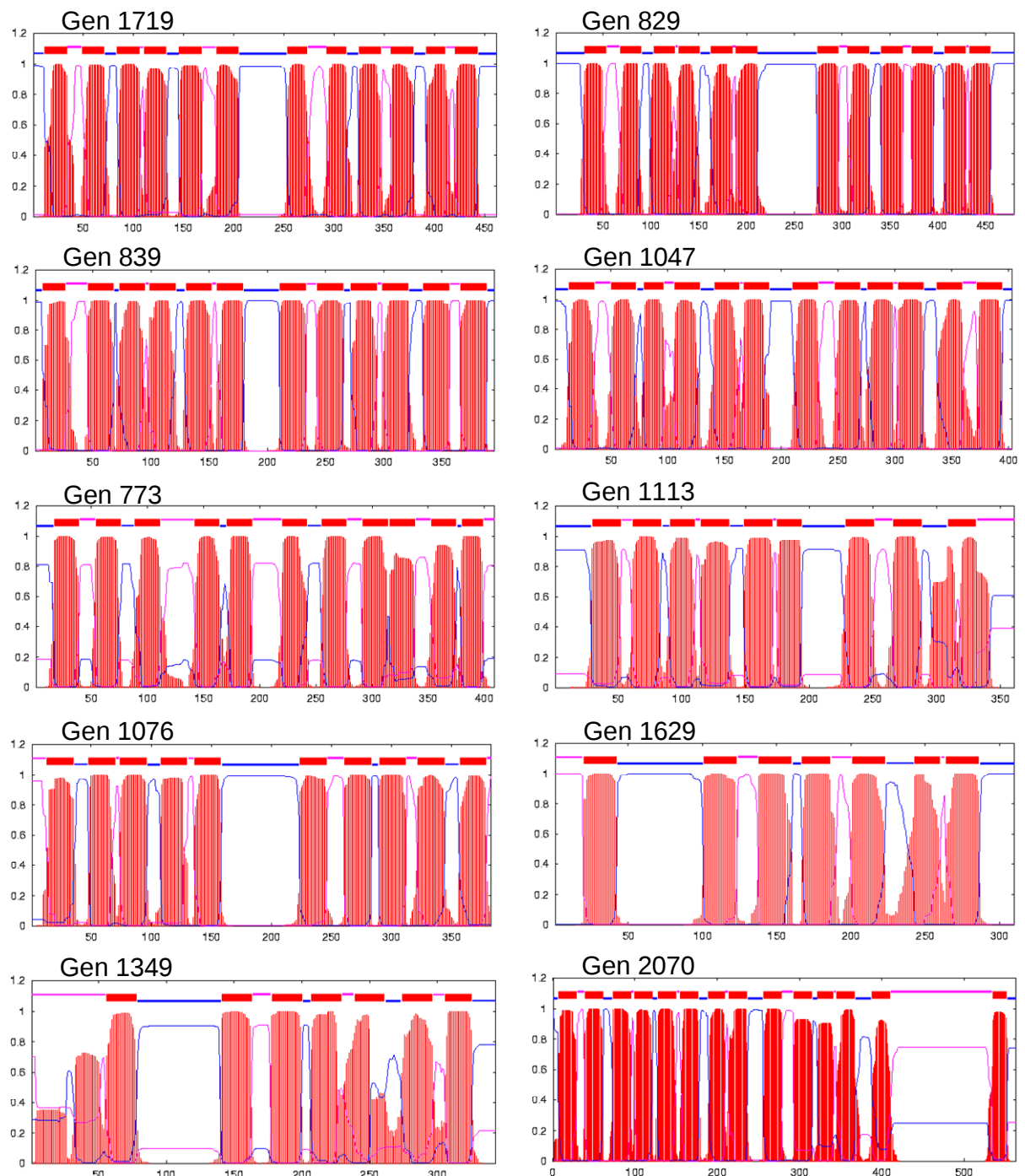


Abb. 25: Transmembranhelix- Struktur der translatierten Gene von *Oenococcus oeni* aus Tab. 21. Vier Gene, nämlich Gen 829, 839, 1047 und 1719 haben eine 2 x 6 Transmembranhelix- Struktur. Die Abbildungen wurden durch ein Computerprogramm (TMHMM- Server, siehe Text) nach Eingabe der Aminosäuresequenz automatisch erstellt. Rote Bereiche entsprechen Transmembranhelices, blaue Bereiche sollen intrazellulär liegen, pinkfarbene Bereiche extrazellulär. Die Kurven zeigen die Wahrscheinlichkeit von 0 bis 1 (=100%), mit der die Bereiche innerhalb oder außerhalb der Membran liegen.

Das letzte Kriterium, welches angewandt wurde, um unter den elf *Oenococcus*-Genprodukten den besten Kandidaten für einen sekundären Hexosecarrier herauszufinden, ist die Ähnlichkeit zu bereits bekannten sekundären Hexosecarriern. Diese wurde über ein Phylogramm ermittelt, welches aus einem Vergleich der Aminosäuresequenzen der 10 *Oenococcus*-Genprodukte mit bekannten sekundären Hexosecarriern von Bakterien und Eucaryonten, Pentosecarriern und MDR-Proteinen resultiert (Abb. 26).

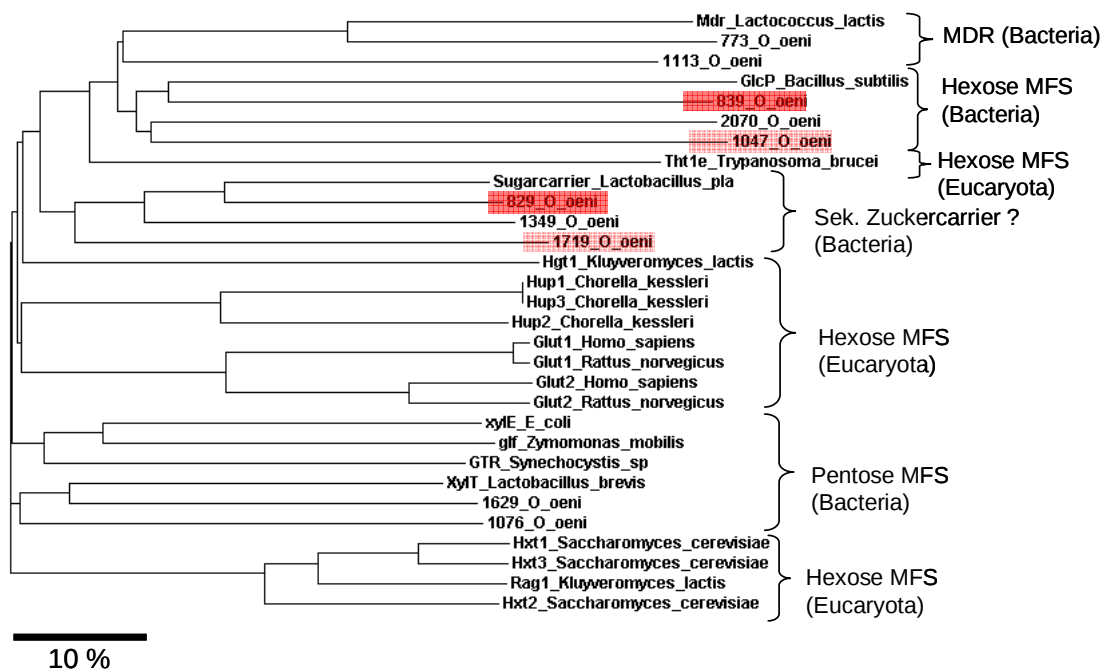


Abb. 26: Phylogramm (CLUSTALW) aufgrund der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen der *Oenococcus*-Kandidatengene mit bereits bekannten sekundären Carriern von Prokaryoten und Eucaryoten. Der Maßstab gibt den Abstand für 10 % Unterschied in der Aminosäuresequenz an. Farblich markiert: *Oenococcus*-Gene, die besonders gut (rot) oder gut (blaßrot) als sekundäre Hexose-Carrier in Frage kommen (Kriterien siehe Tab. 22).

In diesem Fall gruppieren die sechs Genprodukte 839, 2070, 1047, 829, 1349, 1719 mit bakteriellen sekundären Zuckercarriern.

Für die Auswertung wurde eine Tabelle erstellt, in welcher die Bewertung der *Oenococcus* Genprodukte nach allen angewandten Kriterien zusammengefasst ist (Tab. 22). Am besten werden die Kriterien durch die Produkte der Gene 829, 839,

1719 und 1047 erfüllt, die in allen Kriterien gute Übereinstimmung aufwiesen. Die Produkte der beiden Gene 829 und 839 gruppieren im Phylogramm (Abb. 26) am engsten mit einem anderen schon bekannten sekundären Hexosecarrier. Deshalb sind diese beiden wahrscheinlich die besten Kandidaten, gefolgt von den Genprodukten 1719 und 1047. Keiner der anderen Carrier kann jedoch als potentieller Kandidat sicher ausgeschlossen werden.

Tab. 22: Übersicht über *Oenococcus*-Kandidatenproteine und Kriterien für sekundäre Hexosecarrier.

Kriterium erfüllt (J), nicht erfüllt (N) oder Antwort unklar (?).

Genprodukt	Größe 400-600 AS	2 x 6 TM-Helices	Zucker als vermutl. Substrat	Ähnlichkeit zu Hexosecarrier
829	J	J	J	J
839	J	J	?	J
1719	J	J	?	J
1047	J	J	?	J
1349	J	N	?	J
2070	J	N	N	J
1113	J	N	?	N
1629	J	N	N	N
1076	J	N	N	N
773	J	N	N	N
1834	N	N	N	N

4.3.2 Gene für Phosphotransferasesysteme

Das Genom von *O. oeni* wurde ebenfalls nach potentiellen Kandidaten für Gene durchsucht, die für ein Phosphotransferasesystem für die Aufnahme von Glucose und/oder Fructose kodieren könnten. Der Zuckertransport bei pH 7 könnte durch solche Systeme katalysiert werden. In der Datenbank von JGI war bereits eine Liste von 19 Genen zusammengestellt, die für Proteinkomponenten von

Phosphotransferasesystemen kodieren. Diese wurde mittels Datenbankvergleich überprüft, teilweise korrigiert und auf 21 Gene vervollständigt.

Das Ergebnis ist in Tab. 23 gezeigt. Es finden sich im Genom von *O. oeni* die Gene für Enzym I und das HPr- Protein, die in allen PTS- Systemen eines Bakteriums gemeinsam arbeiten. Zusätzlich wurden mehrere Gene für die eigentlichen Carrier gefunden (EII- Enzyme), die für die Substratspezifität verantwortlich sind. Das Enzym II besteht aus den drei Untereinheiten A, B und C, die entweder als Domänen eines

Tab. 23: PTS- Gene von *Oenococcus oeni*. Mittels Datenbankvergleich wurden im Genom von *O. oeni* Gene identifiziert, die vermutlich für Komponenten von Phosphotransferasesystemen kodieren. In der Tabelle ist für jedes *Oenococcus* Gen der Genomabschnitt (Scaffold), die Gennummer, die Länge des kodierten Proteins in Aminosäuren, und das ähnlichste bekannte Protein mit Funktion, Substrat, Datenbank- Referenznummer und Herkunft angegeben.

Contig	Gen	AS	Ähnlichstes Protein	Vermutliches Substrat	Ref.-Nr.	Herkunft
27	1029	575	Enzym I	PEP	gi 8307835	Lb. gasseri
27	1025	87	HPr	EI-P/EIIA	sp P08877	B. subtilis
3	1080	153	EIIA	Fructose/ Mannitol	gi 20806707	Th. tengcongensis
	1081	445	EIIC (GatC)	Galacticol	sp P37189	E. coli
	1082	94	EIIB	Galacticol	gi 20806708	Th. tengcongensis
6	1882	100	EIIA	Fructose (Mannose)	gi 15894736	Cl. Acetobutylicum
3	1138	169	EIIA	Glucose/ Maltose	gi 2144427	St. carnosus
	1139	236	EIIB	Glucose/Saccharose	cd 00212.2	NCBI, CDDDB
			EIIC (PtsG)	Glucose/Maltose/N-Acetyl-Glucosamin	gi 23002628	Lb. gasseri
	1140	243	EIIC (PtsG)	Glucose/ Maltose/ N-Acetyl-Glucosamin	gi 23002628	Lb. gasseri
32	1269	444	EIIC	Glucose/Maltose/N-Acetyl-Glucosamin	gi 28377190	Lb. plantarum
3	1125	401	EIIC	Cellobiose	gi 16801965	L. innocua
3	1203	102	EIIB	Cellobiose	gi 15672395	Lactococcus lactis
	1204	107	EIIA	Cellobiose	gi 16801893	Listeria innocua
	1205	450	EIIC	Cellobiose	gi 15902326	Str. pneumoniae
6	1878	300	EIIC	Beta-Glycoside (Cellobiose)	gi 15901843	Str. pneumoniae
	1879	142	EIIC	Cellobiose	gi 15903876	Str. pneumoniae
	1880	102	EIIB	Cellobiose	gi 15903876	Lactococcus lactis
	1881	107	EIIA	Cellobiose	gi 16801893	L. innocua
45	1601	102	EIIB	Cellobiose	gi 16804720	L. monocytoges
	1602	111	EIIA	Cellobiose	gi 16800897	L. innocua
46	1608	424	EIIC	Cellobiose	sp Q88ZM5	Lb. plantarum

Proteins oder in zwei oder drei getrennten Genen bzw. Proteinen A, B und C vorliegen.

Es finden sich insgesamt fünf Genomabschnitte, von denen jeder jeweils für alle drei Untereinheiten kodiert. Drei liegen auf Scaffold 3 (Gene 1080-1082, 1138-1140, 1203-1205) einer auf Scaffold 6 (Gene 1878-1881) und einer erstreckt sich über Scaffold 45 und 46 (Gene 1601, 1602, 1608). Zusätzlich sind weitere einzelne versprengte Gene vorhanden, die meist für eine EII-Untereinheit kodieren. Das bedeutet, daß mindestens fünf verschiedene Phosphotransferasesysteme im Genom kodiert sind. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit ist eines davon mit großer Wahrscheinlichkeit spezifisch für Glucose/ Maltose/ N-Acetylglucosamin (Gene 1138, 1139, 1140), und ein weiteres für Fructose/ Mannose/ Mannitol/ Galactitol (Gene 1080, 1081, 1082).

Die drei weiteren vollständigen EII-Enzyme bevorzugen nach Datenbankangaben eher Disaccharide (Cellobiose). In Abb. 27 ist die Lage der für den Hexosetransport wichtigen Gene im *Oenococcus*-Genom grafisch dargestellt.

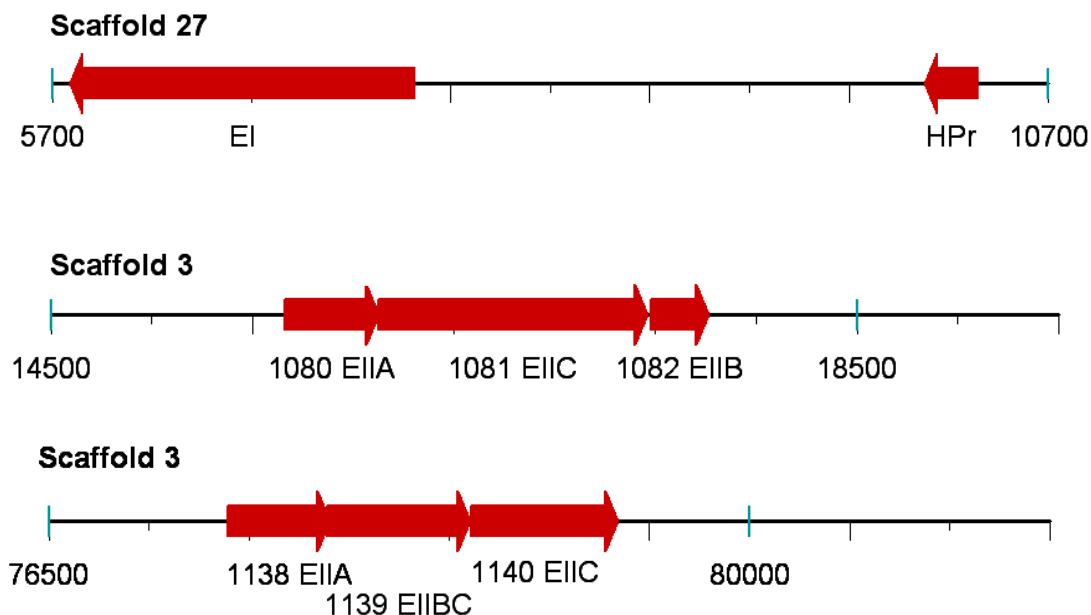


Abb. 27: Lage der für ein Hexose-Phosphotransferasesystem in Frage kommenden Gene im Genom von *Oenococcus oeni*. Oben: Enzym I und HPr, Mitte: Enzym IIABC (potenziell spezifisch für Fructose), Unten: Enzym IIABC (potenziell spezifisch für Glucose).

In gleicher Weise wurde das Genom von *Leuconostoc mesenteroides*, welches ebenfalls auf der Website vom JGI veröffentlicht ist, untersucht (Tab. 24). Auch in *L. mesenteroides* sind die gemeinsamen Proteine Enzym I und HPr vorhanden, und es gibt zusätzlich Gene für mindestens vier vollständige, vermutlich zuckerspezifische Enzym II- Proteine. Davon könnte eines spezifisch für Glucose sein (Gen 1778), und ein weiteres für Fructose (Gene 650-652). Die anderen beiden Enzym II- Proteine (Gene 19, 21, 23 und 30-32) sind vermutlich spezifisch für Disaccharide.

Tab. 24: PTS- Gene von *Leuconostoc mesenteroides*. Mittels Datenbankvergleich wurden im Genom von *L. mesenteroides* Gene identifiziert, die vermutlich für Komponenten von Phosphotransferasesystemen kodieren. In der Tabelle ist für jedes *Leuconostoc* Gen der Genomabschnitt (Scaffold), die Gennummer, die Länge des kodierten Proteins in Aminosäuren, und das ähnlichste bekannte Protein mit Funktion, Substrat, Datenbank- Referenznummer und Herkunft angegeben.

Contig	Gen	AS	Ähnlichstes Protein	Vermutliches Substrat	Ref.-Nr.	Herkunft
31	900	571	Enzym I	PEP	gi 8307835	Lb. casei
31	899	89	HPr	EI-P / EIIA	gi 1172721	Str.salivarius
7	1778	612	EII A,B,C (PtsG)	Glucose/Maltose	gn1 cdd 5375	NCBI CDDb
				N-Ac-Glucosamin	gn1 cdd 16543	NCBI CDDb
					gn1 cdd 10980	NCBI CDDb
16	366	568	EIIA,C	Saccharose	gi 15217138	Lb. Sakei
22	650	158	EIIA	Unbekannt	sp Q83615	Ent. faecalis
			EIIA (Ntr-Typ)	Fructose/Mannitol ?	gn1 cdd 16542	NCBI CDDb
22	651	503	EIIC	Unklar	gi 24378776	Str. mutans
22	652	101	EIIB	Unklar	gi 15901858	Str. pneumoniae
99	2118	478	EIIC	Beta-Glycoside	gi 15672409	Lc. Lactis
1	19	105	EIIB	Disaccharide oder	gi 15902322	Str. pneumoniae
1	21	119	EIIA	Polysaccharide	gi 15900241	Str. pneumoniae
1	23	449	EIIC		gi 15900243	Str. pneumoniae
1	30	101	EIIB	Disaccharide oder	gi 16799986	L. innocua
1	31	412	EIIC	Polysaccharide	gi 16802956	L. monocytogenes
1	32	109	EIIA		gi 15893674	C. acetobutylicum
41	1141	398	EIIC	Cellobiose	gi 16801965	L. innocua

Abschließend lässt sich die Genomauswertung folgendermaßen zusammenfassen:

Das Genom von *O. oeni* kodiert für mehrere potentielle sekundäre Carrier, von denen vier aufgrund der Größe, Anzahl der Transmembranhelices und der Sequenzähnlichkeit zu bekannten Hexosecarriern gute Kandidaten für die hochaffinen Glucose- und Fructosecarrier darstellen, die bei pH 5 aktiv sind. Es ist

auch möglich, daß eines dieser Kandidatengene für den gemessenen Hexosetransport mit niedriger Affinität kodiert, da solche Facilitatoren ebenfalls zu der MFS- Proteinfamilie mit zwei mal sechs Transmembranhelices gehören (Pao 1998).

Ein Hexose- Phosphotransferasesystem konnte enzymatisch nicht nachgewiesen werden. Die Genomanalyse zeigte jedoch, daß Gene für ein solches System nicht nur bei *Oenococcus oeni*, sondern auch bei *Leuconostoc mesenteroides* vorhanden sind.

5. Diskussion

5.1 Fructose- Stoffwechsel

Neben Glucose ist Fructose das häufigste Monosaccharid im natürlichen Habitat von *O. oeni* (Dinsmoor Webb 1974). Wachstum mit Fructose hat die Bildung großer Mengen an Essigsäure zur Folge, während aus Glucose hauptsächlich die Produkte der heterofermentativen Milchsäuregärung (Lactat, Ethanol und CO₂) und kleine Mengen an Erythrit und Acetat entstehen. Die Ursachen dafür, daß mit Fructose mehr Essigsäure als beim Wachstum mit Glucose gebildet wird, wurden untersucht.

5.1.1 Zwei Stoffwechselwege für Fructose in *O. oeni*

Es ist seit langem bekannt, daß Fructose im Stoffwechsel von *O. oeni* über zwei Wege gleichzeitig umgesetzt wird, nämlich über eine Kombination aus heterofermentativer Milchsäuregärung und der Bildung von Mannit (Schlegel 1992). Dabei ist Fructose einerseits Substrat für den oxidativen Pentosephosphatweg, welcher die Hexose zu Lactat, Acetat und CO₂ abbaut. Zum anderen dient sie als Elektronenakzeptor, der die überschüssigen Reduktionsäquivalente (NAD(P)H) reoxidiert, wobei Fructose zu Mannit reduziert wird (Abb. 3). Da bei der Oxidation der Fructose im Pentosephosphatweg zwei NAD(P)⁺ reduziert werden, bei der Bildung von Mannit aber nur ein NAD(P)H reoxidiert wird, sollte sich für die Umsetzung von Fructose über diese beiden Wege folgendes Verhältnis ergeben:

3 Fructose → 1 Lactat+1 Acetat+1 CO₂+2 Mannit.

Diese Stöchiometrie wird experimentell tatsächlich erhalten, wenn die Zellen exponentiell mit hoher Wachstumsrate wachsen, oder wenn Fructose durch Zellsuspensionen (ruhende Zellen) umgesetzt wird. In Zellsuspensionen ist der Energiestoffwechsel vom Baustoffwechsel, d.h. vom Zellwachstum entkoppelt und deshalb nicht durch die Wachstumsrate limitiert.

5.1.2 Fructoselimitierung verändert den Fermentationsverlauf.

Bei Erreichen der stationären Wachstumsphase, oder bei Limitierung der Fructose in kontinuierlicher Kultur, sinkt die Wachstumsrate. Gleichzeitig ändert sich der Fermentationsstoffwechsel deutlich. Es wird kaum noch Mannit gebildet; Fructose wird größtenteils zu Lactat, Ethanol und CO₂ umgesetzt. Nebenbei entstehen kleinere Mengen Acetat und Erythrit (4.2.1, 4.2.2). Es findet also eine Veränderung der Fermentation statt, und Fructose wird ähnlich wie Glucose über heterofermentative Milchsäuregärung umgesetzt. Der abnehmende pH-Wert und die zunehmende Acetatkonzentration im Medium sind dabei nicht die Ursache für den Fermentationsshift. Die Regulation des Fermentationsstoffwechsels erfolgt vermutlich auf posttranslationaler Ebene.

Die Konzentration von Fructose im Medium war immer niedrig (< 5 mM), wenn Fructose über heterofermentative Milchsäuregärung zu Lactat und Ethanol umgesetzt wurde. Bei niedrigen Fructose- Konzentrationen erfolgt der Transport von Fructose nur mit geringer Rate (vgl. Abschnitt. 4.2.2 Fructosetransport) und limitiert vermutlich den Fructosestoffwechsel, und damit auch das Wachstum. Insofern ist die niedrige Wachstumsrate nicht die Ursache für den Fermentationsshift, sondern die limitierende Versorgung mit Fructose, die auch das reduzierte Wachstum verursacht. Bei ausreichender Versorgung des Pentosephosphatweges mit Hexosen werden über diesen mehr Reduktionsäquivalente geliefert, als über den Ethanolweg reoxidiert werden können. Dadurch wird ein alternativer Weg zur Reoxidation von NAD(P)H benötigt. Bei der Glucosefermentation ist dies der Erythritweg (Richter et al. 2000), bei der Fructosefermentation übernimmt der Mannitweg offensichtlich diese Rolle. Sinken die Stoffwechselraten, so wird der Gesamtanteil des Ethanolweges an der Reoxidation des NAD(P)H immer größer, und die Fermentation ändert sich zugunsten der Ethanolbildung.

5.1.3 Nutzung des Mannitweges und Bildung von Essigsäure aufgrund der Limitierung im Ethanolweg

Die im oxidativen Teil des Pentosephosphatweges gemessenen Aktivitäten der NAD(P)H bildenden Enzyme sind mindestens 2,6 mal höher, als die einzelnen

Aktivitäten der NAD(P)H verbrauchenden Enzyme im reduktiven Stoffwechselteil (Mit Ausnahme der Lactatdehydrogenase). So erreichen bei Wachstum mit Fructose die spezifischen Aktivitäten der NAD(P)H reoxidierenden Enzyme Acetaldehyddehydrogenase (3 U/gTG) und Erythrit-4-P-Dehydrogenase (52 U/gTG) nicht die berechnete NAD(P)H-Bildungsgeschwindigkeit im Phosphoketolaseweg (136 U/gTG). Dies führte zu der Vermutung, daß der Energiestoffwechsel durch die NAD(P)H reoxidierenden Enzyme limitiert ist. Die Wachstumsrate von *O. oeni* ist mit Ribose am höchsten. Bei Wachstum mit Ribose wird im Phosphoketolaseweg kein NAD(P)H produziert, demzufolge kann keine Limitierung durch niedrige Reoxidationskapazität bestehen. Mit Glucose ist das Wachstum am langsamsten, und es war gezeigt worden, daß der Ethanolweg tatsächlich limitierend für den Glucosestoffwechsel ist (Richter et al. 2001). Um die Verhältnisse bei der Fructosefermentation quantitativ zu betrachten, wurden die NAD(P)H Bildungsraten, sowie die Kapazität zur Reoxidation des NAD(P)H für die Zucht mit verschiedenen Substraten berechnet (Tab. 25). Daraus ergibt sich folgendes Bild:

Bei Zucht mit **Glucose** ist die NAD(P)H Bildungsgeschwindigkeit im Pentosephosphatweg mit 124 U/g TG etwas höher als die Reoxidationskapazität des Ethanolweges (110 U/g TG). Aus diesem Grund muß der Erythritweg noch einen Teil zur Reoxidation des NAD(P)H beitragen. Die gebildeten Stoffwechselprodukte sind folglich Lactat, Ethanol, CO₂ und geringe Mengen Erythrit und Acetat. Die Enzymaktivität der Erythrit-4-Phosphat-Dehydrogenase ist allerdings ebenfalls niedrig, sodaß selbst mit diesem zusätzlichen Weg keine höheren Stoffwechsel- und Wachstumsraten möglich sind, als die gemessenen. Möglicherweise ist die Aktivität des Erythritweges sogar noch niedriger, als in Tab. 25 angegeben, da die gemessene Fructose-6-P-Phosphoketolaseaktivität bei Zucht mit Glucose nur 7 U/g TG betrug. Die NAD(P)H- Bildung entspricht damit der maximalen Kapazität zur NAD(P)H- Reoxidation und wird durch diese limitiert.

Der Mannitweg ist bei Zucht mit Glucose nicht aktiv, es wurde keine Mannitproduktion beobachtet (4.1.3). Für die Zelle macht dies energetisch Sinn, da die Bildung von Mannit nur aus vorher unter ATP- Verbrauch erzeugtem Glucose-6-Phosphat möglich ist (Abb. 3). Für die Bildung von Erythrit ist dies zwar auch der Fall, es wird aber zumindest ein ATP über die Acetatkinasereaktion zurückgewonnen, sodaß für die Glucosefermentation insgesamt eine positive Nettoenergiebilanz entsteht. Mit dem Mannitweg wäre *O. oeni* dagegen kein Energiegewinn aus Glucose

möglich. Da Mannitdehydrogenase Fructose als Substrat nutzt, nicht aber Fructose-6-Phosphat, wäre außerdem eine Fructose-6-Phosphat-Phosphatase nötig; es konnte aber keine Hexosephosphatase- Aktivität nachgewiesen werden (Veiga-Da-Cunha 1993).

Tab. 25: Vergleich der berechneten NAD(P)H- Bildungsraten mit den vorhandenen Kapazitäten (gemessene Dehydrogenaseaktivitäten) zur Reoxidation des NAD(P)H. Es wird dabei angenommen, daß für das Wachstum mit Glucose, Fructose, Glucose+Fructose, Glucose+Pyruvat, jeweils der Ethanol+Erythrit-, Ethanol+Mannit+Erythrit-, Ethanol+Mannit+Erythrit-, und der Lactat- Weg genutzt werden (Vgl. Fermentationsbilanzen, Tab. 14). Die NAD(P)H-Bildungsrate wurde mit den Zuckerstoffwechselraten aus Tab. 15 berechnet, unter Berücksichtigung des Zuckeranteils, der durch den Phosphoketolaseweg fließt (Vgl. Fermentationsbilanzen, Tab.14), und der Menge NAD(P)H, die in diesem Weg pro Zuckermolekül produziert wird (2 NAD(P)H). Die Kapazität zur NAD(P)H Reoxidation wurde aus den gemessenen Dehydrogenaseaktivitäten (Tab. 16) und der Menge an NAD(P)H, die im jeweiligen Weg reoxidiert wird, berechnet (2 im Ethanol-, 1 im Erythrit- und 1 im Mannit- Weg).

C- Quelle	NAD(P)H- Bildung (U/gTG)	Vorhandene Kapazität zur NAD(P)H Reoxidation (U/gTG) durch Bildung von				
		Ethanol	Mannit	Erythrit	Lactat aus ext. Pyruvat	Gesamt
Glucose	124	110		41		151
Glucose + Pyruvat	164				4530	4530
Fructose	136	6	175	52		233
Fructose + Pyruvat	202				~5000	~5000
Glucose + Fructose	248	32	181	41		254

Bei Zusatz von **Pyruvat** zu Zellen, die mit Glucose wachsen, wird nur noch Pyruvat als Elektronenakzeptor genutzt und statt Ethanol wird Acetat ausgeschieden (Tab. 14). Die Wachstumsrate mit Glucose wird durch die zusätzliche Verabreichung von Pyruvat mehr als verdoppelt. Die Umsatzrate von Glucose über den Phosphoketolaseweg erhöht sich aber nur schwach (Faktor 1,3). Die verdoppelte Wachstumsrate ist größtenteils auf die verdoppelte ATP-Ausbeute zurückzuführen. Acetylphosphat aus dem Phosphoketolaseweg wird nicht mehr für die NAD(P)H Reoxidation benötigt und dient zur Erzeugung eines zusätzlichen ATP mittels Acetatskinase.

Die Kapazität zur NAD(P)H Reoxidation ist sehr stark erhöht (Faktor 30). Die NAD(P)H Produktion durch Oxidation von Glucose steigt allerdings nur schwach um Faktor 1,3. Dies bedeutet, daß die Glucoseoxidation hier nicht durch die Lactatdehydrogenaseaktivität limitiert sein kann. Nach einer Aufhebung der Limitierung des Ethanol- und Erythritweges müssen also andere Beschränkungen eine Rolle spielen. Diese könnten sich beispielsweise durch eine niedrige Aktivität der NADP- Transhydrogenase, oder limitierende Enzyme im oxidativen Teil des Pentosephosphatweges, oder durch niedrige Glucosetransportraten ergeben.

Bei Wachstum mit **Fructose** entspricht die NAD(P)H Bildungsrate mit 184 U/g TG der gemessenen Kapazität zur Reoxidation über den Mannitweg (175 U/g TG). Entsprechend wird bei guter Versorgung mit Fructose nur der Mannitweg zur Reoxidation von NAD(P)H genutzt. Die NAD(P)H- Bildungsgeschwindigkeit liegt unterhalb der insgesamt zur Verfügung stehenden Reoxidationskapazität (233 U/g TG). Aus der fehlenden Erythritbildung ist zu folgern, daß der Erythritweg nicht merklich genutzt wird, obwohl er vorhanden ist. Daraus ergibt sich die Schlußfolgerung, daß die Reoxidation von NAD(P)H nicht wesentlich durch den Mannitweg limitiert ist. Allerdings wird die Kapazität des Mannitweges komplett ausgenutzt (Tab. 25). Der Fructoseumsatz und das Wachstum steigen nur geringfügig (höchstens Faktor 1,1), wenn den Zellen zur **Fructose zusätzlich Pyruvat** verabreicht wird, obwohl die Kapazität zur Reoxidation des NAD(P)H dadurch um 2 Größenordnungen erhöht wird. Die Reoxidation des NAD(P)H wird dann allerdings komplett von der Lactatdehydrogenase übernommen, sodaß der Mannitweg in Gegenwart von Pyruvat keine Rolle mehr spielt. Durch diese Befunde wird die oben geäußerte Vermutung unterstützt, daß der Mannitweg, bzw. die Kapazität zur Reoxidation von NAD(P)H, kaum limitierend für den Fructosestoffwechsel ist. Der Mannitweg ist allerdings nötig, um die Limitierung durch den Ethanol- und den Erythritweg zu kompensieren.

Beim Wachstum mit **Glucose plus Fructose** entspricht die NAD(P)H-Produktionsgeschwindigkeit (248 U/gTG) ungefähr der Kapazität zur Reoxidation des NAD(P)H, die von allen drei Wegen (Mannitweg, Erythritweg, Ethanolweg) gemeinsam bereitgestellt wird (254 U/gTG). Deshalb werden alle drei Wege gebraucht, um das anfallende NAD(P)H zu reoxidieren. Dies wird dadurch bestätigt,

daß alle jeweiligen Produkte gebildet werden (Tab. 14). Bei Cofermentation von Glucose und Fructose scheint also die Kapazität aller drei Wege zusammengenommen limitierend für den Pentosphosphatweg zu sein. Damit übereinstimmend sind der Zuckerumsatz im oxidativen Pentosephosphatweg (115 U/gTG) und die Wachstumsrate ($0,096 \text{ h}^{-1}$) niedriger als bei Wachstum mit Ribose (143 U/gTG und $0,101 \text{ h}^{-1}$).

Der Vergleich der Aktivitäten der NAD(P)H produzierenden und NAD(P)H verbrauchenden Enzyme zeigt, daß die niedrigen Kapazitäten zur NAD(P)H Reoxidation das primäre Problem bei der heterofermentativen Milchsäuregärung für *O. oeni* darstellen. Diese Limitierung kann verantwortlich für einen hohen NAD(P)H/NAD(P)⁺- Quotienten sein. Dem NAD(P)H/NAD⁺- Quotienten wird eine große Bedeutung bei der Regulation des Redoxstoffwechsels zugeschrieben (Maicas et Al. 2002).

Die spezifische Aktivität der Acetaldehyddehydrogenase war immer dann hoch, wenn die Oxidation von NAD(P)H limitiert, und demzufolge das NAD(P)H/NADP⁺- Verhältnis hoch war (Bei Zucht mit Glucose, oder Glucose+Fructose). Dies führte zu der Vermutung, daß eine Regulation des Ethanolweges über die Aktivität der Acetaldehyddehydrogenase erfolgt. Es war allerdings auch klar gezeigt worden, daß es sich um eine Regulation auf posttranslationaler Ebene handeln muß. Eventuell spielt eine (In-) Aktivierung des Enzyms über den Redoxstatus in der Zelle eine Rolle. Bei dem Effektor dieser Regulation könnte es sich möglicherweise um das NAD(P)H/NAD(P)- Verhältnis handeln.

Insgesamt fällt auf, daß die verschiedenen Wege zur Reoxidation von NAD(P)H in der Fermentation von **Fructose** je nach Situation in unterschiedlichem Ausmaß genutzt werden (Fermentationsshift bei Fructoselimitierung oder Cofermentation mit Pyruvat oder Glucose). Nach Veiga-Da-Cunha (1993) ist der K_M - Wert der Mannitdehydrogenase für Fructose sehr hoch (20 mM), deshalb sollte der Mannitweg nur bei hohen zellulären Konzentrationen von Fructose arbeiten. Hohe zelluläre Fructosekonzentrationen wären bei einer guten Versorgung mit Fructose oder einem durch mangelnde Reoxidationskapazität limitierten Fructosefluss durch den Phosphoketolaseweg gegeben. Niedrige zelluläre Fructosekonzentrationen sind bei Fructosemangel anzunehmen, oder bei einem unlimitierten Fructosefluss durch den Phosphoketolaseweg, wie es bei Anwesenheit von Pyruvat der Fall ist. Unter

letzteren Bedingungen ist der Mannitweg also möglicherweise wegen niedrigerer Fructosegehalte nicht gut nutzbar. Es wäre außerdem denkbar, daß bei der Regulation der unterschiedlichen Reoxidationswege die zellulären Konzentrationen von NAD(P)H zusammen mit den K_M Werten der Enzyme für NAD(P)H eine Rolle spielen. Die K_M -Werte der Mannitdehydrogenase für NADH und NADPH sind 115 und 25 μM (Hamann 2003). Die K_M -Werte der Acetaldehyddehydrogenase und der Erythritol-Phosphat-Dehydrogenase sind nicht bestimmt worden. Deshalb kann diese Vermutung nicht überprüft werden.

5.1.4 Einschätzung der Enzymaktivität des Phosphoketolaseweges und limitierender Schritte

Es ist offensichtlich, daß bei einer Aufhebung der Limitierung der NAD(P)H-reoxidierenden Enzyme andere Schritte den Stoffwechsel einschränken. Vermutet wurden Limitierungen der Xylulose-5-Phosphat-Phosphoketolase, der NADPH-Transhydrogenase, den Hexokinasen, und beim Transport

Die Aktivität der Xylulose-5-Phosphat- Phosphoketolase wurde nicht bestimmt, da das Substrat für den Enzymtest nicht erhältlich ist. Laut Veiga-Da-Cunha et Al. (1993) handelt es sich bei der Xylulose-5-P- und der Fructose-6-P-Phosphoketolase um ein- und dasselbe Enzym. Seine Aktivität ist mit Xylulose-5-Phosphat etwa 17 mal höher als mit Fructose-6-Phosphat. Unter den hier verwendeten Zuchtbedingungen betrug die Aktivität der Phosphoketolase mit Fructose-6-Phosphat 7 U/g TG. Folglich kann für *O. oeni* B1 eine Aktivität von etwa 120 U/ gTG für die Xylulose-5-Phosphat-Phosphoketolase angenommen werden. Die Zuckerumsatzgeschwindigkeit im Phosphoketolaseweg (62 U/gTG) wird nicht durch die Phosphoketolase limitiert. Auch bei Cofermentation von Glucose plus Fructose erreicht die Zuckerumsatzgeschwindigkeit (115 U/gTG) nicht die für diese Bedingungen geschätzte spezifische Aktivität der Phosphoketolase (290 U/gTG). Damit wäre dieses Enzym für den Hexosestoffwechsel nicht limitierend.

Über eine BLAST-Analyse wurden Gene, die für eine membrangebundene NADP-Transhydrogenase kodieren, vorhergesagt. Eine Aktivität der NADP-

Transhydrogenase war kaum nachzuweisen, sie betrug maximal 3,2 U/g Protein (Anhang, Tab. 26). Entweder war das Enzym nicht oder nur schwach aktiv oder nicht vorhanden, oder der Test versagte bei *Oenococcus*. Ohne eine Transhydrogenasereaktion ist allerdings eine Aufrechterhaltung des Stoffwechsels mit Pyruvat als einzigem Elektronenakzeptor nicht erklärbar, da die Lactatdehydrogenase nur NADH als Cosubstrat nutzt. Das im Pentosphosphatweg von der 6-Phosphogluconatdehydrogenase gebildete NADPH kann von der Lactatdehydrogenase nicht reoxidiert werden. Es wäre allerdings denkbar, daß es im Stoffwechsel noch andere Möglichkeiten zur Elektronenübertragung von NADPH auf NAD^+ gibt. Für *Aspergillus* sp. wurde ein Mannitzzyklus beschrieben, in welchem die Elektronenübertragung von NADH auf NAD(P) über Mannitdehydrogenase und Mannit-6-Phosphat-Dehydrogenase bewerkstelligt wird (Hult, K. et al. 1980). Es handelt sich hier um zwei verschiedene Redoxreaktionen, die jeweils in nur eine Richtung ablaufen, und die Nettoübertragung von Elektronen von NADH auf NADP^+ ist ATP- abhängig. Es wäre für *Oenococcus* energetisch nicht sinnvoll, diesen Zyklus zu betreiben. Möglich wäre aber die Existenz eines vergleichbaren Zyklus, der mit anderen Stoffwechsel- Metaboliten arbeitet.

Die Hexokinaseaktivitäten sind mit 55 und 57 U/gTG bei Wachstum mit Glucose bzw. Fructose so niedrig, daß sie den Hexosestoffwechsel limitieren könnten, wenn die Limitierung durch die NAD(P)H Reoxidation aufgehoben ist.

Die Transportmessungen ergaben für Glucose und für Fructose bei Substratkonzentrationen niedrige Aufnahmeraten, welche den Stoffwechsel durchaus einschränken könnten (4.2.1).

Bei Cofermentation von Glucose und Fructose übersteigt die gesamte Zuckerumsatzrate (225 U/g TG) die Summe der Zuckerumsatzraten von Glucose plus Pyruvat und Fructose plus Pyruvat (183 U/g TG). Eine Limitierung durch den Hexosetransport kann also bei Cofermentation von Glucose und Fructose gegeben sein, wenn man annimmt, daß Glucose- und Fructosetransport bei Cofermentation mit Pyruvat jeweils schon limitierend sind.

Vermutlich wird der Glucose- Stoffwechsel also durch Transport und Phosphorylierung limitiert, wenn genügend NAD(P)H- Reoxidationskapazität zur Verfügung steht.

5.1.5 Cosubstrate bestimmen den Fermentationsverlauf für Fructose

In Abschnitt 5.1.3 wurde erläutert, daß der Fermentationsweg für Fructose sich nicht nur bei Fructoselimitierung, sondern auch nach Zugabe von Cosubstraten ändert. Steht *O. oeni* zusätzlich zur **Fructose Pyruvat** zur Verfügung, wird die Bildung von Mannit unterdrückt. Fructose wird unter dieser Bedingung vollständig über den Pentosephosphatweg zu Lactat und Acetat verstoffwechselt. Es entsteht keines der reduzierten Endprodukte Mannit, Ethanol, oder Erythrit. Als Elektronenakzeptor dient stattdessen Pyruvat, dieses wird dabei zu Lactat reduziert. Außerdem wird ein Teil des Pyruvates zu Acetat oxidiert.

Der Fructosefluß wird in die entgegengesetzte Richtung gelenkt, wenn die Bakterien zusätzlich zur **Fructose** mit **Glucose** versorgt werden, anstatt mit Pyruvat. Während die Glucose als ATP- lieferndes Substrat komplett über den Pentosephosphatweg fließt, wird der größte Teil der Fructose zu Mannit reduziert, und nur ein geringer Teil der Fructose wird über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt (Abschnitt 4.1.6). Ein wichtiger Regulationsmechanismus, durch den Fructose je nach Cosubstrat entweder in den einen, oder in den anderen Stoffwechselweg geleitet wird, arbeitet über das Enzym Phosphoglucoseisomerase.

5.1.6 Phosphoglucoseisomerase ist ein Schlüsselenzym für die Steuerung des Fructoseflusses

Die Phosphoglucoseisomerase ist aufgrund ihrer Position im Stoffwechsel und aufgrund ihrer Hemmung durch die Metaboliten 6-Phospho-Gluconat und Erythrose-4-Phosphat ein Schlüsselenzym für die Regulation des Fructoseflusses in den Pentosephosphatweg (Abb. 3). Wenn nur Fructose zugegen ist, ist der Gehalt an 6-Phosphogluconat hoch und übertrifft den K_i - Wert der Isomerase (180 μ M) um Faktor 3,1. Mittels der Michaelis-Menten Gleichung kann eine Hemmung der

Phosphoglucoseisomerase von 85 % berechnet werden, wenn eine Hemmung vom gemischten Typ und eine halbmaximale Sättigung des Enzyms mit Substrat angenommen werden. Unter Stoffwechselbedingungen kann dies den Ausschluss eines Großteils der Fructose aus dem Pentosephosphatweg bewirken. Damit übereinstimmend wurde beobachtet, daß etwa zwei Drittel der Fructose in den Mannitweg gelangen.

Bei zusätzlicher Anwesenheit von Pyruvat liegt der zelluläre Gehalt an 6-Phosphogluconat weit unterhalb des K_i - Wertes der Isomerase, wodurch der Fluss von Fructose in den Pentosephosphatweg und die stöchiometrische Umwandlung zu Lactat und Acetat ermöglicht wird.

Bei Inkubation der Zellen mit Glucose ist die 6-Phosphogluconatkonzentration immer hoch und übertrifft den K_i - Wert des Enzyms bei weitem, auch wenn zusätzlich Pyruvat oder Fructose zugegen sind. Unter diesen Bedingungen ist die Phosphoglucoseisomerase inhibiert. Als Folge wird Fructose bei Cofermentation von Glucose und Fructose am Eintritt in den Pentosephosphatweg gehindert und stattdessen in den Mannitweg geleitet.

Analog zu den 6-Phosphogluconat-Gehalten steigen die Gehalte an Fructose-6-Phosphat. Sie sind bei Cofermentation von Fructose mit Glucose am höchsten (1650 μM) und übertreffen die Fructose-6-Phosphatgehalte bei Inkubation mit Fructose oder mit Fructose plus Pyruvat um Faktor 3,5, bzw. 4,5 (Vgl. Anhang, Tab. 28). Dies spricht dafür, daß vor der Phosphoglucoseisomerase ein Anstau von Fructose-6-Phosphat stattfindet, sobald das Enzym durch höhere Konzentrationen von 6-Phosphogluconat gehemmt ist.

Die 6-Phospho-Gluconat Gehalte sind sich sehr ähnlich, wenn die Zellen mit Fructose oder Fructose plus Glucose inkubiert wurden. Trotzdem wird bei der ersten Bedingung mindestens ein Drittel, bei letzterer nur etwa 10 % der Fructose über den Phosphoketolaseweg verstoffwechselt. Offensichtlich tragen auch noch andere Faktoren zur Regulation des Fructoseflusses bei. Außer der intrazellulären Fructosekonzentration und dem NAD(P)H/NAD(P) - Quotienten kommt dafür die Konzentration von Erythrose-4-Phosphat in Frage. Dieser Metabolit hemmt die Phosphoglucoseisomerase bereits bei Konzentrationen, die eine Größenordnung unterhalb seiner Nachweisgrenze (50 μM) liegen. Da die zellulären Erythrose-4-Phosphat- Konzentrationen nicht bestimmt werden konnten, kann der Beitrag dieses

Metaboliten zur Regulation der Phosphoglucoseisomerase nicht abgeschätzt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Fructosestoffwechsel über mehrere Mechanismen reguliert wird:

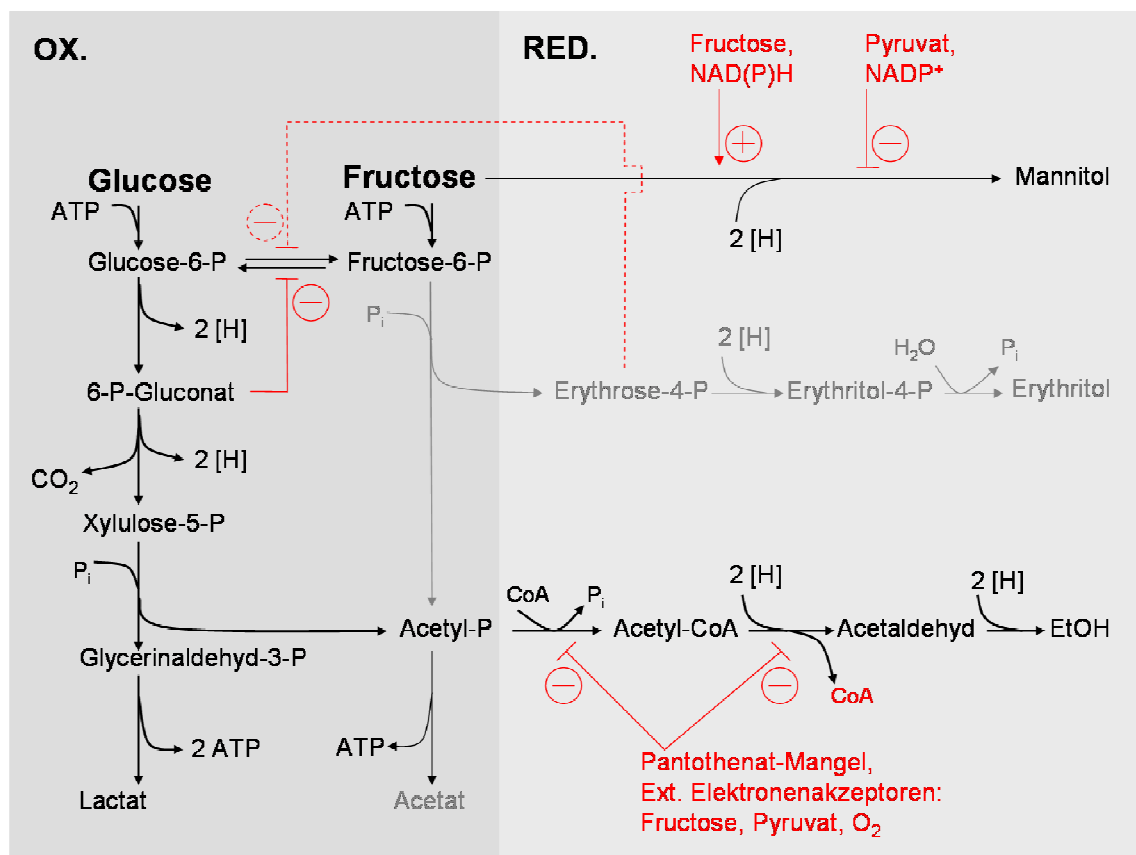


Abb. 28: Regulation des Fructosestoffwechsels. Die im Text erläuterten Mechanismen sind im Stoffwechselschema rot eingezeichnet.

Der Redoxstoffwechsel ist in den NAD(P)H reoxidierenden Enzymen limitiert, vor allem im Ethanolweg. Die Limitierung ist besonders ausgeprägt bei niedrigen zellulären Konzentrationen von Coenzym A aufgrund von Pantothen säuremangel.

Durch den Mannitweg oder zusätzliche Elektronenakzeptoren werden die Limitierungen des Redoxstoffwechsels beseitigt. Dies hat allerdings zur Folge, daß Acetylphosphat nicht zu Ethanol reduziert, sondern als Essigsäure ausgeschieden wird.

Bei niedrigen Stoffwechselraten ist der Ethanolweg nicht limitierend, wodurch auch mit Fructose eine klassische heterofermentative Milchsäuregärung ohne Acetatbildung ermöglicht wird. Niedrige Konzentrationen von Fructose tragen vermutlich dazu bei, daß der Mannitweg wegen des hohen K_M - Wertes der Mannitdehydrogenase für Fructose nicht ablaufen kann.

Zusätzlich wird der Fructosefluss über die Hemmung der Phosphoglucoseisomerase durch 6-Phospho-Gluconat (und möglicherweise Erythrose-4-Phosphat) reguliert.

5.2 Pyruvatstoffwechsel

Im Folgenden soll der Stoffwechsel von Pyruvat etwas genauer betrachtet werden, da die Fermentationsbilanzen zeigten, daß *O. oeni* unter anaeroben Bedingungen aus Pyruvat nicht nur Lactat, sondern auch Acetat bildet (Abschnitt 4.1.3). Dies ist bemerkenswert, da hier Pyruvat im anaeroben Stoffwechsel nicht nur als Elektronenakzeptor genutzt, sondern auch oxidiert wird. Die anaerobe Oxidation von Pyruvat ist bei heterofermentativen Milchsäurebakterien bisher noch nicht beschrieben worden. Die Diskussion erfolgt auf der Grundlage von Ergebnissen, die von Nicole Wagner im Rahmen ihrer Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung in Mainz (2004) produziert wurden.

Werden *O. oeni* oder *Leuconostoc mesenteroides* in anaerober Zellsuspension mit Pyruvat als einziger Kohlenstoffquelle inkubiert, so wird Pyruvat nach folgender Stöchiometrie umgesetzt:

2 Pyruvat → 1 Lactat + 1 Acetat + 1 CO₂.

Es findet eine Disproportionierung von Pyruvat zu Lactat und Acetat+CO₂ statt, wobei die Elektronen für die Reduktion eines Pyruvatmoleküls offensichtlich aus der oxidativen Decarboxylierung eines zweiten Pyruvats stammen.

Weiterhin wurde beobachtet, daß *O. oeni* und *L. mesenteroides* in der Lage sind, in MLD-Medium mit Pyruvat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Pyruvat wird nach derselben Stöchiometrie wie oben umgesetzt. Der Zellertrag beträgt hierbei etwa 4 bis 5 g Trockengewicht pro Mol Pyruvat. Für verschiedene Hexose fermentierende Bakterien ist ein Energieertragskoeffizient Y_{ATP} von 10 g Trockengewicht pro Mol ATP ermittelt worden. Daraus lässt sich für obige Fermentation eine ATP- Ausbeute von etwa 0,4 bis 0,5 ATP pro Mol Pyruvat berechnen. Folglich muß bei der Oxidation von einem Pyruvat zu Acetat und CO_2 ein ATP gebildet werden. Naheliegender ist hier die Annahme einer ATP- Bildung aus Acetyl-Phosphat über Acetatkinase. Dieses Enzym ist in heterofermentativen Milchsäurebakterien vorhanden. Acetyl-Phosphat kann prinzipiell über verschiedene Mechanismen aus Pyruvat gebildet werden:

- Pyruvatdehydrogenase (NAD(P)H-abhängig, Acetyl-CoA bildend) und Phosphotransacetylase
- Pyruvatdehydrogenase (Cytochromabhängig) und Phosphotransacetylase
- Pyruvatoxidase (Acetyl-Phosphat bildend)
- Pyruvatoxidase (CoA-acetylierend) und Phosphotransacetylase
- Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) und Phosphotransacetylase
- Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase und Phosphotransacetylase

Im Genom von *O. oeni* und *L. mesenteroides* sind Gene vorhanden, die für die vier Untereinheiten einer NADH-abhängigen Pyruvatdehydrogenase (E1 α , E1 β , E2, E3) codieren. Im *Oenococcus*- Genom gibt es zudem fünf Gene, die für Isoenzyme einer Acetyl-Phosphat bildenden Pyruvatoxidase codieren, bei *Leuconostoc* gibt es dagegen nur eines. Phosphotransacetylase ist in heterofermentativen Milchsäurebakterien immer vorhanden. Für die anderen aufgelisteten, Pyruvat oxidierenden Enzyme wurden keine Gene gefunden. Es wurde auch nie eine Bildung von Formiat beobachtet, was dafür spricht, daß eine PFL nicht vorhanden ist.

Eine Pyruvatdehydrogenaseaktivität wurde qualitativ über die Messung des gebildeten Acetyl-Phosphates nachgewiesen. Quantitativ war eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse allerdings nicht zu erreichen. Die gemessenen Aktivitäten waren immer niedrig und schwankten bei gleichen Testbedingungen stark. Bei *O. oeni* war nur nach Zucht mit Glucose plus Pyruvat eine Aktivität von 19 U/g

TG nachweisbar. Bei *Leuconostoc* waren die meßbaren Aktivitäten höher (bis 100 U/g TG) aber waren niedriger, als die Geschwindigkeit der Acetatbildung aus Pyruvat in wachsenden Zellen (592 U/gTG). Vermutlich ist die Aktivität niedrig, und wegen der Aktivität weiterer Enzyme, die Acetyl-Phosphat verbrauchen, schwer nachweisbar. Um die Störfaktoren zu beseitigen, wäre eine Aufreinigung der Pyruvatdehydrogenase aus dem zellfreien Extrakt hilfreich.

Eine Pyruvatoxidaseaktivität konnte nur bei *Leuconostoc*, nicht aber bei *Oenococcus*, nach Zucht mit Pyruvat plus O₂ nachgewiesen werden. Der enzymatische Test beruhte auf der Messung der Bildung von Acetyl-Phosphat in zellfreiem Extrakt, deshalb spielen wahrscheinlich dieselben Störfaktoren wie beim Pyruvatdehydrogenase-Test eine Rolle.

Anaerobe Pyruvatoxidation ist bei Bakterien allgemein nichts ungewöhnliches. Allerdings nutzen Bakterien unter anaeroben Bedingungen eher die Pyruvat-Formiat-Lyase, wie z.B. *E. coli* (Neidhardt et al. 1996), *Lactococcus lactis*, ssp. *cremoris* (Melchiorson et al. 2001), *Lactobacillus plantarum* (Liu, S.Q. et al. 2003) und *Campylobacter* ssp. (Mendz et al. 1997). Alternativ oxidieren Archaeobakterien und viele anaerobe Bakterien, wie z.B. *Clostridien*, Pyruvat reversibel mittels einer Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase, die auch Pyruvatsynthase genannt wird (Lengeler et al. 1999).

Die anaerobe Pyruvatoxidation mittels einer NADH-abhängigen Pyruvatdehydrogenase ist für *Bacillus subtilis* beschrieben worden (Nakano, M.M. et al. 1998). Das grampositive, fakultativ anaerobe Bakterium besitzt wie *Oenococcus* und *Leuconostoc* keine PFL (Kunst, F. et al. 1997). *B. subtilis* führt ebenfalls eine anaerobe Pyruvatfermentation durch, die Produkte sind Lactat, Acetat und Ethanol, sowie geringe Mengen Acetoin und 2,3-Butandiol (Nakano, M.M. et al. 1997). Die anaerobe Pyruvatfermentation von *Oenococcus oeni* und *Leuconostoc mesenteroides* ist in Abb. 29 dargestellt.

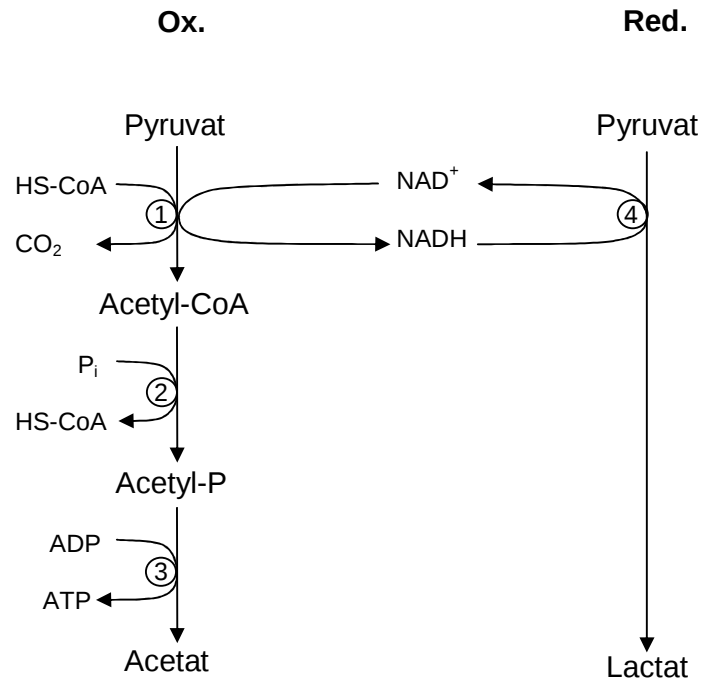


Abb. 29: Pyruvatfermentation bei *Oenococcus oeni*. Pyruvatdehydrogenase (1), Phosphotransacetylase (2), Acetatkinase (3), Lactatdehydrogenase (4). Bei Umsatz von 2 Molekülen Pyruvat wird ein ATP erzeugt.

5.3 Hexosetransport

5.3.1 Der Glucose- und Fructosetransport funktioniert über sekundäre Carrier und erleichterte Diffusion

Glucose:

Die Transportmessungen bei einem physiologischen pH-Wert von 5,0 und niedrigen Konzentrationen von Glucose (100 μM) zeigten, daß die Aufnahme in energetisierte Zellen bis zu fünf mal schneller, als in nicht energetisierten Zellen erfolgt. Die erreichte intrazelluläre Glucosekonzentration ist 55 mal höher, als die extrazelluläre Zuckerkonzentration. Da die Messungen mit ^{14}C -Glucose durchgeführt wurden, welche im Stoffwechsel umgesetzt und in Form ihrer Produkte wieder ausgeschieden wird, ist davon auszugehen, daß die theoretisch mögliche Anreicherung höher ist. Die Transportrate wurde durch Ionophore, die das Membranpotential $\Delta\mu\text{H}^+$ zusammenbrechen lassen, auf das Niveau nicht energetisierter Zellen gesenkt. Der K_M -Wert ist mit etwa 10 μM sehr niedrig, das bedeutet, daß die Affinität zu Glucose sehr hoch ist. Die V_{max} des Glucosetransportes ist niedrig, sie liegt um eine Größenordnung unter der Glucosestoffwechselrate. Nach Zucht mit Fructose scheint der Carrier doppelt so stark exprimiert zu sein, wie nach Zucht mit Glucose. Nach Zucht mit Ribose ist er kaum vorhanden. Bei Konkurrenzexperimenten wird die Glucoseaufnahme stark durch Mannose und das nicht verstoffwechselbare Glucoseanalogon 2-Deoxyglucose gehemmt. Fructose im Überschuß wirkt sich nicht negativ auf den Glucosetransport aus.

Die Befunde sprechen dafür, daß es einen sekundären, vom Membranpotential abhängigen Carrier gibt, der Glucose und wahrscheinlich auch Mannose spezifisch und mit hoher Affinität transportiert. Ein Glucose/Mannose: H^+ -Symporter (GlcP) wurde bereits in *Bacillus subtilis* identifiziert und hat auffallend ähnliche Eigenschaften (Paulsen I.T, 1997). Das von Gen Nr. 839 auf Scaffold 22 im Genom von *Oenococcus* kodierte, carrierähnliche Protein weist von allen möglichen Kandidaten die größte Ähnlichkeit zu GlcP auf (22 % identische, 40 % ähnliche AS, E-Value $3\text{e-}04$). Bei der Suche im *Oenococcus*-Genom nach Genen, die für sekundäre Hexosecarrier kodieren, war Gen 839 eines der beiden sehr guten

Kandidatengene. Zum Test, ob das Gen für einen sekundären Hexosecarrier kodiert, sollte überprüft werden, ob das Gen nach Klonierung in eine Δpts Mutante von *E. coli* komplementieren kann. Die Gene 829, 1047 und 1719 sind ebenfalls sehr gute Kandidaten für Hexosecarrier. Die anderen untersuchten Gene erfüllten mindestens eines der angewendeten Kriterien nicht, was sie zu weniger guten Kandidaten macht (Tab. 22). Prinzipiell kann aber für die Gene 1349, 2070, 1113, 1629, 1076 und 773 nicht ausgeschlossen werden, daß sie für Hexosecarrier kodieren.

Fructose:

Die Ergebnisse für den Fructosetransport sind denen für Glucose sehr ähnlich. Auch hier findet bei pH 5 und niedriger Fructosekonzentration ein langsamer, hochaffiner Transport in energetisierte Zellen, allerdings mit einem höheren K_M von etwa 40 μM statt. V_{max} ist etwa halb so hoch wie beim Glucosetransport. Fructose wurde maximal 26-fach gegenüber der extrazellulären Fructose angereichert. Der Fructosetransport lässt sich mit CCCP auf das Niveau nichtenergetisierter Zellen senken, aber wie bei Glucose bleibt auch hier eine Restaktivität meßbar.

Die Fructosetransportrate ist nach Zucht mit Fructose höher, als nach Zucht mit Glucose. Nach Zucht mit Ribose ist sie fast nicht mehr vorhanden (Abb. 19A). Die Konkurrenzexperimente zeigen in etwa das gleiche Spektrum an stark hemmenden Substraten, wie beim Glucosetransport. Mannose und 2-Deoxyglucose hemmen die Fructoseaufnahme sehr stark. Außerdem wird der Fructosetransport entscheidend durch Glucose beeinträchtigt, umgekehrt wurde der Glucosetransport nicht, oder nur ganz schwach gehemmt, wenn Fructose in 100-fachem Überschuß zugegen war (Abb. 22, 23).

Es zeigt sich also für Fructose ebenfalls ein sekundärer Aufnahmemechanismus, der das Membranpotential $\Delta\mu H^+$ nutzt. Glucose- und Fructoseaufnahme verhalten sich in fast allen Punkten (Energetisierung, Anreicherung, Ionophore, Induktion, Konkurrenz) gleich, mit der Ausnahme, daß Glucose schneller und mit höherer Affinität transportiert wird. Zusätzlich hemmt Glucose den Fructosetransport, Fructose den Glucosetransport aber nicht.

Aus diesem Grund kann man annehmen, daß ein sekundärer Glucose/ H^+ Symporter existiert, der als „Nebenaktivität“ auch Fructose transportiert (Abb. 30). Vermutlich ist dieser Carrier ebenfalls hochspezifisch für Mannose. *Oenococcus oeni* ist in der

Lage, mit Mannose zu wachsen (Abb. 33, Anhang), was die Existenz eines Mannosecarriers erfordert.

Der hochaffine Hexosetransport wird in dem von uns untersuchten *Oenococcus*-Stamm bei einem **pH-Wert** unter 4,0 und hohem **Ethanolgehalt** (>10%) um bis zu 100 %, bzw. über 80 % gesenkt. Die Ursachen wurden nicht aufgeklärt. Man kann spekulieren, daß der pH-Wert einen Einfluß auf die Konformation und die Funktionalität der Carrierproteine hat, und daß das Membranpotential der Zellen durch die mit hoher Ethanolkonzentration erhöhte Membranfluidität und Permeabilität zusammenbricht. Dies wiederum hätte einen negativen Einfluss auf den Energetisierungszustand und damit auf den Transport.

Erleichterte Diffusion:

Die Untersuchungen bei hohen Hexosekonzentrationen zeigen, daß es einen Transport mit niedriger Affinität zu Glucose und Fructose gibt, der nicht durch CCCP hemmbar ist, und der auch bei hohen Substratkonzentrationen keine Sättigung erreicht. Solche Kinetiken sind typisch für Diffusion (Lengeler 1999). Fructose wird bei diesem Transport gegenüber Glucose bevorzugt, denn bei hohen Hexosekonzentrationen von 10 bis 50 mM ist die Fructosetransportrate fünf bis sechsmal höher als die Glucosetransportrate. Da Glucose und Fructose als polare Moleküle nicht einfach über die Membran diffundieren können, ist von einer erleichterten Diffusion auszugehen. Diese Befunde sprechen für die Existenz eines passiven Hexosecarriers (Abb. 30). Dessen K_M -Wert liegt so hoch, daß er mit den von uns eingesetzten Hexosekonzentrationen nicht bestimmbar war.

Oenococcus wächst auch mit Trehalose. Trehalose ist allerdings kein guter Kompetitor für den Transport von Glucose oder Fructose. Deshalb ist es unwahrscheinlich, daß dieses Disaccharid vom selben sekundären Carrier transportiert wird. Möglicherweise wird Trehalose über einen anderen Carrier aus der Major Facilitator Superfamily aufgenommen. Dafür spricht, daß es noch weitere Kandidatengene für MFS-Transporter gibt. Für Disaccharide beschreiben Antuna et al. (1993) für die heterofermentativen Milchsäurebakterien *Lactobacillus brevis* und *L. mesenteroides* bei steigender Substratkonzentration eine lineare Zunahme des Transports, ohne Sättigung. Für Hexosen ist ähnlich wie bei *O. oeni* ein sekundärer

Transport beschrieben. Dies könnte bedeuten, daß Disaccharide auch bei *Oenococcus* über erleichterte Diffusion aufgenommen werden. Möglicherweise transportieren die verantwortlichen Facilitatoren auch Hexosen, wodurch der passive Hexosetransport erklärt werden könnte.

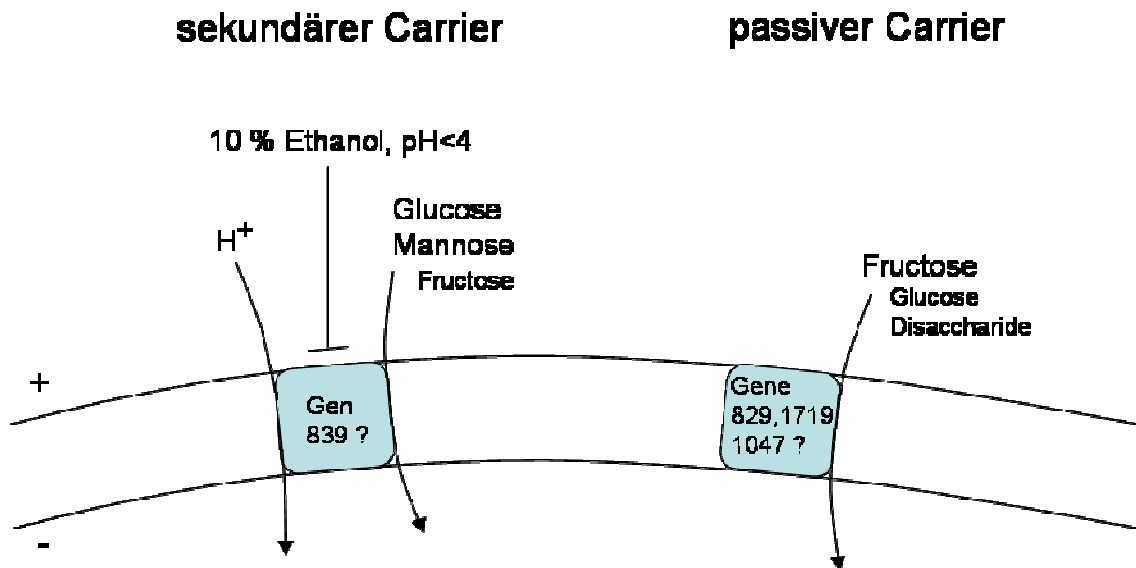


Abb. 30: Gefundene Carrier in *Oenococcus oeni*. Aufgrund der Ergebnisse der Transportexperimente sollten ein sekundärer, sowie mindestens ein passiver Hexosecarrier existieren. Der sekundäre Carrier bevorzugt Glucose, der passive Fructose. Die Zuordnung der Gennummern erfolgte spekulativ (vgl. Diskussion). In Gegenwart von 10 Vol% Ethanol ist der sekundäre Transport inhibiert, ebenso bei pH- Werten unter 4.

Werden in sekundären Carriern bestimmte Aminosäuren durch Mutagenese ausgetauscht, wird die Kopplung des Substrattransportes an die Translokation von Protonen aufgehoben, und aus dem sekundären Carrier wird ein Facilitator-Protein. Ein Beispiel dafür ist der Lactose:H⁺ Symporter von *E. coli* (Henderson, 1990; Kaback 1990). Aus diesem Grund ist es nicht möglich, alleine über die aus einem Alignment erhaltene Ähnlichkeit zweier Carrier Rückschlüsse auf die Funktion als sekundärer oder passiver Carrier zu ziehen.

Ein Carrier, der erleichterte Diffusion von Glucose ermöglicht, wurde bei dem Bakterium *Zymomonas mobilis* gefunden, das in Agavensaft mit hoher Zuckerkonzentration lebt (DiMarco et al. 1985, Struch et al. 1991, Weisser et al. 1995). Auch dieser Carrier mit dem Namen Glf gehört zur Major Facilitator

Superfamily. Unter den Kandidatengenomen für Carrier von *O. oeni* gibt es jedoch keines mit herausragender Ähnlichkeit zu Glf (Abb. 26). Das bedeutet allerdings nicht, daß bei *Oenococcus* kein Hexosecarrier für erleichterte Diffusion vorhanden ist.

Im Habitat von *O. oeni* (Fruchtsäfte, Most) ist die Konzentration von Glucose und Fructose sehr hoch. Deshalb ist es nicht unwahrscheinlich, daß ein passiver Carrier eine Rolle beim Hexosetransport spielt. Dagegen könnte der sekundäre Carrier wichtig werden, wenn die Hexosekonzentration auf niedrige Werte sinkt.

Der oben diskutierte Transport von Mannose und Trehalose spielt für *O. oeni* zumindest in Traubensaft und Wein keine große Rolle, da die Konzentrationen der betreffenden Zucker sehr gering sind. Zum Vergleich seien hier einige typische Zuckerkonzentrationen in reifen Trauben angegeben (Webb, 1974; Rozes 2003):

- Glucose: 60-90 g/L (= 330-500 mM);
- Fructose: 60-100 g/L;
- Saccharose: je nach Rebsorte 0-60 g/L;
- Trehalose: bis 1,75 mM;
- Nur in Spuren: Ribose, Xylose, Mannose, Galactose, Arabinose, Maltose.

Die Transportaktivitäten der sekundären Carrier alleine ermöglichen nur ungefähr 5 bis 10 Prozent des gemessenen Hexoseverbrauchs.

Die Transportaktivitäten, die bei hohen Hexosekonzentrationen durch passiven Transport erreicht werden, sind allerdings mit den Aktivitäten des Hexosestoffwechsels vergleichbar, oder etwas niedriger. Sie sind also nötig, um den Hexoseumsatz zu ermöglichen. Auch wenn man annimmt, daß die tatsächlichen Transportraten in vivo höher sind, ist anzunehmen, daß der Transport einen limitierenden Faktor für den Hexosestoffwechsel darstellt. Dies ist vor allem dann von Bedeutung, wenn bei Wachstum mit zusätzlichen Elektronenakzeptoren die Stoffwechselumsatzgeschwindigkeiten hoch sind.

5.3.2 Existenz eines Phosphotransferasesystems in *Oenococcus oeni*

In der bisherigen Diskussion wurde immer der Glucosetransport bei pH 5 betrachtet.

Transportmessungen über ein breites pH- Spektrum ergaben, daß die hochaffine Glucoseaufnahme zwei pH- Optima aufweist, eines bei pH 5, das andere bei pH 7. Nach Zucht bei einem anfänglich hohen pH- Wert (5,8) war die Transportrate bei pH 7 etwa doppelt so hoch, wie die bei pH 5. Wurden die Zellen von Anfang an bei niedrigem pH (4) gezüchtet, war die Transportrate bei pH 7 nur noch auf dem Niveau von der bei pH 5. Dies spricht für eine Induzierbarkeit des Transportes bei pH 7.

Der Glucosetransport bei pH 7 war in energetisierten Zellen gegenüber nicht energetisierten Zellen um Faktor 4,4 erhöht. Die Gegenwart von Ionophoren hatte aber nur einen schwachen bis keinen Effekt (Abb. 13B). Dieselben Beobachtungen wurden für Fructose gemacht (Abb. 21B). Offensichtlich werden die beiden Hexosen bei pH 7 aktiv transportiert, aber nicht durch einen vom Membranpotential abhängigen sekundären Carrier. Als alternative Mechanismen kommen Phosphotransferasesysteme oder ABC- Transporter in Betracht.

Für *Oenococcus oeni* ist eine vorläufige Liste mit Genen veröffentlicht, die für mögliche Untereinheiten von ABC- Transportsystemen kodieren könnten (http://genome.ornl.gov/microbial/ooen/16sep02/fc_Membrane_Transport.html).

Unter den insgesamt 97 Genen, die für ABC-Transporter-Proteine kodieren, finden sich fünf Gene für ein hypothetisches zuckerspezifisches Substratbindeprotein, 10 Gene für eine hypothetische membranständige zuckerspezifische Permease und neun Gene für Proteine mit einer ATP-Bindekassette und unbekannter Substratspezifität.

Trotzdem kommt ein aktiver Transport von Hexosen über ABC- Transporter für *O. oeni* nicht in Frage. Der Grund ist die Energetik. ABC-Carrier verbrauchen für den Transport eines Zuckermoleküls ein, oft sogar zwei Moleküle ATP (Nicholls, 1982). Da bei der heterofermentativen Milchsäuregärung die ATP-Ausbeute nur 1 ATP/Hexose beträgt (Abb. 3), kann dieses ATP nicht für den Transport des Zuckers verbraucht werden, wenn die Bakterien mit diesem Substrat wachsen sollen. Vorhandensein und Funktion solcher Carrier für die Zuckeraufnahme im Baustoffwechsel kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Für Disaccharide wie Trehalose wäre ein Transport mit einer Stöchiometrie von 1 ATP pro Molekül ebenfalls denkbar. Energetisch sinnvoller wäre allerdings ein Transport über erleichterte Diffusion, wie er in Abschnitt 5.3.1 diskutiert wurde.

Nach dem Ausschluss von ABC- Transportern im Energiestoffwechsel bleibt letztlich nur ein Phosphotransferasesystem für den aktiven Hexosetransport bei pH 7 übrig.

Mit dem NADH-abhängigen Enzymtest nach Chassy und Thompson (1983) war allerdings keine Phosphotransferaseaktivität bei *O. oeni* und *L. mesenteroides* mit Glucose oder Fructose feststellbar. Dies steht im Einklang mit der Annahme, daß Glucose- oder Fructose:Phosphotransferasesysteme nur in Bakterien mit Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glycolyse) zu finden sind, und nicht in heterofermentativen Milchsäurebakterien, die den Pentosophosphatweg nutzen (Romano et al. 1979). Im Pentosephosphatweg wird nur ein Mol Phosphoenolpyruvat aus einem Mol Hexose gebildet. Wenn dieses PEP für die Phosphorylierung der Hexose bei der Aufnahme verbraucht würde, stünde kein PEP für Biosynthesereaktionen (aromatische Aminosäuren und Muraminsäure) zur Verfügung.

Inzwischen wurden allerdings Ausnahmen von der Regel entdeckt: Das heterofermentative Milchsäurebakterium *Lactobacillus brevis* induziert z. B. bei anaerobem Wachstum mit Fructose ein funktionierendes Fructose:Phosphotransferasesystem (Saier et al. 1995). Allerdings werden auch die Glycolyseenzyme Fructose-1-Phosphat-Kinase und Fructosebisphosphataldolase zusätzlich gebildet.

Bei *Oenococcus oeni* wurden solche Beobachtungen bisher nicht gemacht, aber laut Genomanalyse (Abschnitt 4.3.2) sind auf dem Chromosom **Gene für fünf verschiedene Zucker:Phosphotransferasesysteme** vorhanden. Zwei der fünf Systeme weisen hohe Ähnlichkeit zu bereits bekannten Glucose- bzw. Fructose: Phosphotransferasesystemen auf. Die drei anderen Systeme sind laut Genomanalyse spezifisch für Disaccharide. Auch beim nahe verwandten heterofermentativen *Leuconostoc mesenteroides* sind Gene für vier Phosphotransferasesysteme zu finden, wovon auch wieder zwei Systeme spezifisch für Glucose bzw. Fructose sein könnten.

Die Gene für ein Glucose- und für ein Fructose:Phosphotransferasesystem sind also bei *O. oeni* vorhanden, und die Transportexperimente weisen ebenfalls darauf hin, daß ein Glucose- und ein Fructose:Phosphotransferasesystem aktiv sind, wenn auch mit schwacher Aktivität. Entsprechende Phosphotransferase- Enzymaktivitäten sind aber nicht messbar. Eine mögliche Erklärung könnte die folgende sein:

5.3.3 Das Phosphotransferasesystem hat möglicherweise eine regulative Funktion in *Oenococcus oeni*

Die dem PTS-System zugeschriebene Transportaktivität ist bei pH 7 am höchsten, aber auch hier insgesamt niedrig (5 bis 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gTG}^{-1}$). Bei einem physiologischen pH von 5 spielt sie offensichtlich keine Rolle für den Hexosetransport (Abb. 11, 13, 21 und Diskussion, Abschnitt 5.3.1). Mit dem von uns verwendeten Enzymtest zur Messung der PEP-abhängigen Zuckerphosphorylierung (über die NADH-abhängige Reduktion des gebildeten Pyruvat zu Lactat) waren die geringen Phosphotransferaseaktivitäten nicht nachzuweisen. Romano et al. (1979) wiesen bei *Leuconostoc* eine PEP-abhängige Phosphorylierung von radioaktiv markierter ^{14}C -Glucose nach. Die spezifische Phosphotransferaseaktivität war allerdings mit 4 U/gTG so niedrig, daß sie als „nicht vorhanden“ interpretiert wurde. Daraus wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß kein Phosphotransferasesystem in *L. mesenteroides* vorhanden sei.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Hexose:Phosphotransferasesysteme in *Oenococcus oeni* und anderen heterofermentativen Milchsäurebakterien ihre eigentliche Bedeutung für den Transport von Hexosen im Laufe der Evolution verloren haben, daß sie aber für die Regulation des Stoffwechsels nach wie vor notwendig sind.

Seit langem ist bekannt, daß Phosphotransferasesysteme nicht nur in Gram-negativen, sondern auch in Gram-positiven Bakterien zur Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels beitragen. Sogar für heterofermentative Milchsäurebakterien (*Lactobacillus brevis*) gibt es inzwischen gut untersuchte Beispiele (Poolman 2002). Im wesentlichen werden in Bakterien über die Phosphotransferasesysteme die hierarchische Nutzung verschiedener Kohlenstoffquellen, sowie die Einstellung der Stoffwechsel- und Transportraten auf die Bedürfnisse der Zelle reguliert. Die wichtigsten bei Gram-positiven Bakterien bekannten Mechanismen sollen hier kurz beschrieben werden. Abb. 31 veranschaulicht sie schematisch.

- Transkriptions- Kontrolle. Z.B. bei der Regulation des Glycerin-Abbaus. In manchen Gram-positiven Bakterien (*B. subtilis*) wird das glp-Operon durch HPr reguliert. Bei schlechter Versorgung mit Glucose ist die Konzentration von HPr-

His(15)-P hoch. HPr-His(15)-P phosphoryliert die Glycerinkinase, welche dadurch aktiviert wird. Der Induktor des glp-Operons, Glycerin-3-P, wird dadurch vermehrt gebildet. Dadurch kann der Glycerinabbau bei Abwesenheit von PTS-Zuckern eingeleitet, bzw. in Anwesenheit von PTS-Zuckern verhindert werden (Charrier et al. 1997, Deutscher et al. 1993).

- Katabolit- Repression durch CcpA und HPr-Ser-P. Das HPr-Protein kann bei Gram-positiven Bakterien nicht nur durch Enzym I am Histidin(15) phosphoryliert werden, sondern auch durch eine HPr-Ser(46)-Kinase am Serin(46). HPr wird am Serin(46) phosphoryliert, wenn durch gute Versorgung mit Glucose der Level an Glycolyseintermediaten (Fructose-1,6-BP, ATP) hoch ist. HPr-Ser-P bindet an CcpA und bildet mit diesem und der regulativen cre-Sequenz einen Komplex, der die Transkription von CcpA-abhängigen Genen reprimiert (Weickert & Chambliss 1990, Hueck & Hillen 1995, Deutscher et al. 1995, Reizer et al. 1996, Jones et al. 1997, Kim et al. 1995).
- Inducer exclusion. Bei Anwesenheit von Glucose-6-Phosphat steigt die Konzentration von Glycolyseintermediaten wie Fructose-1,6-Bisphosphat und ATP. Dadurch wird die Ser(46)-HPr-Kinase aktiviert, und HPr wird am Serin(46) phosphoryliert. HPr-Ser-P bindet an (nicht-PTS-) Transportproteine und hemmt durch Protein-Wechselwirkungen zum Beispiel die sekundären Carrier von Glucose, Lactose und Ribose in *Lactobacillus brevis* (Poolman 2002, Ye et al. 1994a,b).
- Inducer expulsion. In heterofermentativen MSB wie *Lactobacillus brevis* werden sekundäre Carrier wie der Glucose:H⁺-Transporter oder der Lactose:H⁺-Transporter durch die Bindung von HPr-Ser-P reversibel in passive Facilitatoren verwandelt. Wegen der Entkopplung vom Membranpotential fließen die spezifisch akkumulierten Zucker wieder aus der Zelle hinaus (Romano et al. 1987, Ye et al. 1994 a, b). In homofermentativen Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus lactis* stimuliert HPr-Ser-P die Phosphatase II. Dadurch werden angehäuften Glucose-6-Phosphat oder Lactose-Phosphat dephosphoryliert und darauf rasch ausgeschieden (Reizer & Panos 1980, Ye et al. 1996).

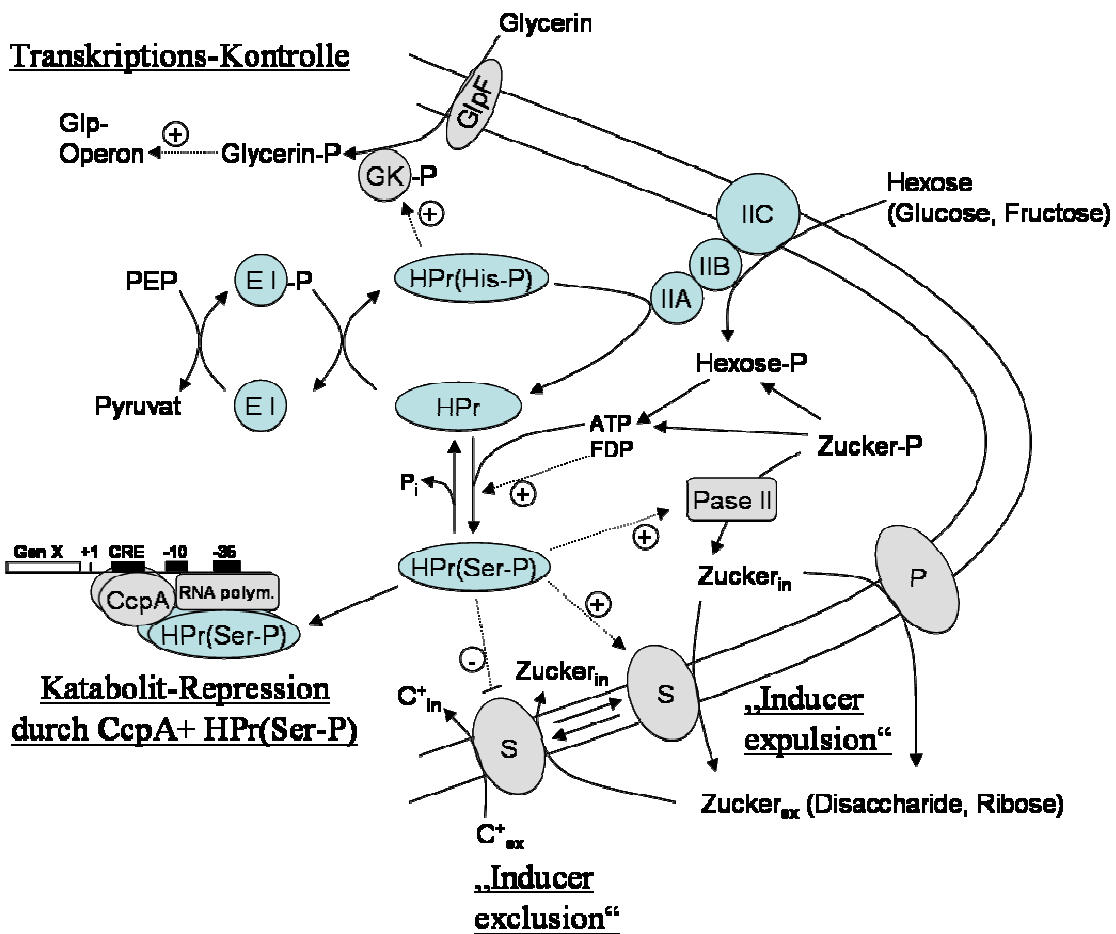


Abb. 31: Regulation des Zuckerstoffwechsels durch das Phosphotransferase-system. Das Schema stellt die wichtigsten bekannten Mechanismen dar (nach Poolman, 2002). Erläuterungen siehe Text.

IIA,B,C, Enzym II; C⁺, Kation; CcpA, catabolite control protein A; CRE, catabolite responsive element; EI, Enzym I; FDP, Fructose-1,6-bisphosphat; GK, Glycerin-kinase; GlpF, Glycerin-Facilitator; HPr, Hitzestabiles Protein; P, passiver Carrier; PEP, Phosphoenolpyruvat; P_i, freies Phosphat; Pase II, Zucker-Phosphatase II; RNA polym., RNA-Polymerase; S, Sekundärer Carrier.

Es ist offensichtlich, daß ein Phosphotransferasesystem der Bakterienzelle mannigfaltige Möglichkeiten zur Regulation ihres Stoffwechsels bietet. Eine sehr gute Übersicht über dieses Thema bieten die Veröffentlichungen von Bert Poolman (2002) und F. Titgemeyer und W. Hillen (2002). Nicht alle der erläuterten Mechanismen, wie z.B. „inducer expulsion“, wären für *Oenococcus* sinnvoll. Es ist zumindest schwer zu erklären, warum *O. oeni* Zucker erst energieaufwendig phosphorylieren und danach wieder ausschleusen sollte. Die anderen Mechanismen wie „Inducer exclusion“, Transkriptionskontrolle und Katabolitrepression jedoch könnten in *O. oeni* durchaus

eine Rolle bei der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels spielen. Es wäre eher ungewöhnlich, wenn *O. oeni* keinen dieser Mechanismen nutzen würde. Aus diesem Grund, und weil für die Phosphotransferasesysteme bei *O. oeni* keine bedeutende Rolle beim Hexose-Transport nachgewiesen werden kann, ist anzunehmen, daß ihre Funktion in der Zelle regulativ ist.

6. Veröffentlichungen

- Richter H, Vlad D, Uden G. (2001). Significance of pantothenate for glucose fermentation by *Oenococcus oeni* and for suppression of the erythritol and acetate production. Arch. Microbiol. 175: 26-31
- Richter H, Uden G. (2002). Alternative pathways for hexose fermentation by *Oenococcus oeni*. Lallemand, Yeast-Bacteria Interactions 10: 39-44
- Richter H, Hamann I, Uden G (2003a). Use of the mannitol pathway in fructose fermentation of *Oenococcus oeni* due to limiting redox regeneration capacity of the ethanol pathway. Arch. Microbiol. 179: 227-233
- Richter H, De Graaf A, Hamann I, Uden G. (2003b). Significance of phosphoglucose isomerase for the shift between heterolactic and mannitol fermentation of fructose by *Oenococcus oeni*. Arch. Microbiol. 180: 465-470

Patent

Patent-Nr: DE 100 58 144 C 1
Titel: Verminderung der Acetatbildung in Lebensmitteln, die eine alkoholische Fermentation erfahren, in Most, Wein oder Fruchtsaft während des biologischen Säureabbaus durch Milchsäurebakterien
Inhaber: Erbslöh Geisenheim Getränketechnologie GmbH & Co.
KG, 65366 Geisenheim, DE
Erfinder: Uden, Gottfried, 55296 Gau-Bischofsheim, DE
Richter, Hanno, 55116 Mainz, DE
Anmeldung: 22.11.2000
Erteilung: 31.01.2002

7. Literatur

- Ames Giovanna Ferro-Luzzi (1990). Energetic of periplasmic transport systems. In: *The Bacteria: Bacterial energetics* (T.A. Krulwich, ed.), Academic Press, San Diego, vol. XII: 225-246
- Ames Giovanna Ferro-Luzzi (1990). Energy coupling in bacterial periplasmic permeases. *J. Bacteriol.* 172: 4133-4137
- Atschul S.F, Gish W, Myers W.M.E.W, Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Bandell M, Lolkema J.S. (2000). The conserved C-terminus of the citrate (CitP) and malate (MleP) transporters of lactic acid bacteria is involved in substrate recognition. *Biochemistry* 39: 13059-13067
- Bergmeyer H.U. (1974). Methoden der enzymatischen Analyse. 3rd edition, Verlag Chemie, Weinheim
- Bergmeyer H.U. (1983). Enzymes: Acetate kinase from *Escherichia coli*. Methods of Enzymatic Analysis, Vol. III, 3rd edition, Verlag Chemie: 127-128
- Boonstra B, French C.E, Wainwright I. and Bruce N.C. (1999). The *udhA* gene of *Escherichia coli* encodes a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase. *J. Bacteriol.* 181: 1030-1034
- Cavin J.F, Prevost H, Lin J, Schmitt P, Divies C. (1989). Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 751-753
- Charrier V, Buckley E, Parsonage D, Galinier A, Darbon E, Jaquinod M, Forest E, Deutscher J. & Claiborne A. (1997). Cloning and sequencing of two enterococcal *glpK* genes and regulation of the encoded glycerol kinases by phosphoenolpyruvate-dependent, phosphotransferase system-catalyzed phosphorylation of a single histidyl residue. *J. Biol. Chem.* 272: 14166-14174
- Chassy B.M. and John Thompson (1983). Regulation of lactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system and β -D-phosphogalactoside galactohydrolase activities in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* 154: 1195-1203
- Coton E, Rollan G.C, Bertrand A. und Lonvaud-Funel A. (1998). Histamine-producing lactic acid bacteria in wines; early detection frequency and distribution. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 199-204
- Da Silveira M.G, San Romao V, Loureiro-Dias M.C, Rombouts F.M, Abee T. (2002). Flow Cytometric Assessment of Membrane Integrity of Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Appl. Env. Microbiol.* 68: 6087-6093

- De Graaf A.A, Mahle M, Möllney M, Wiechert W, Stahlmann P, Sahm H. (2000). Determination of full ^{13}C isotopomer distributions for metabolic flux analysis using heteronuclear spin echo difference NMR spectroscopy. J. Biotechnol. 77: 25-35
- Deibel R.H. und Seeley, H.W. (1974). Family II. Streptococcaceae fam. nov. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 3rd edition: 490-517.
- Deutscher J, Bauer B. & Sauerwald H. (1993). Regulation of glycerol metabolism in *Enterococcus faecalis* by phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of glycerol kinase catalyzed by enzyme I and HPr of the phosphotransferase system. J. Bacteriol. 175: 3730-3733
- Deutscher J, Kuster E, Bergstedt U, Charrier V. & Hillen W. (1995). Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. Mol. Microbiol. 15: 1049-153
- Dicks L.M, Dellaglio F, Collins M.D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 395-397
- DiMarco A.A, Romano A.H. (1985). D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. Appl. Environ. Microbiol. 49: 151-157
- Dinsmoor Webb A. (1974). Chemistry of Winemaking. Advances in chemistry series 137: 13-16
- Dittrich HH (1987) Mikrobielle Weinqualitätsminderungen. 2. Aufl. Mikrobiologie des Weines, Ulmer Verlag: 258-275
- Eichert M. (2004). Genomvergleich *Oenococcus oeni* – *Leuconostoc mesenteroides*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.
- Evans and Ratledge. (1984). Induction of xylulose-5-phosphate phosphoketolase in a variety of yeasts grown on D-xylose: the key to efficient xylose metabolism. Arch. Microbiol. 139: 48-52
- Garvie E.I (1967). The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. J. Gen. Microbiol. 48: 439-447
- Guerrini S, Bastianini A, Granchi L, Vincenzini M (2001). Effect of oleic acid on *oenococcus oeni* strains and malolactic fermentation in wine. Current Microbiology 44: 5-9
- Guzzo J, Jobin M.P, Delmas F, Fortier L.C, Garmyn D, Tourdot-Marechal R, Byong L, Divies C. (2000). Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as function of environmental changes and growth phase. International Journal of Food Microbiology 55: 27-31

- Hamann I. (2003). Redoxstoffwechsel von *Oenococcus oeni*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz, Deutschland
- Hansen A. (2001). Bioinformatik. Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler. Birkenhäuser Verlag Basel
- Hayashi, Mitsuko, Haga, Megumi, Yatsushiro, Shouki, Yamamoto, Akitsugo & Moriyama, Yoshinori (1999). Vesicular monoamine transporter 1 is responsible for storage of 5-Hydroxytryptamine in rat pinealocytes. *Journal of Neurochemistry* 73 (6), 2538-2545
- Henderson, P.J.F. (1990). Proton-linked sugar transport systems in bacteria. *J. Bioenerg. Biomemb.* 22: 525-569
- Hickman J.W, Barber R.D, Skaar E.P. and Donohue T.J. (2001). Link between the membrane-bound pyridine nucleotide transhydrogenase and glutathione-dependent processes in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 184: 400-409
- Hueck C.J. & Hillen W. (1995). Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria ? *Mol. Microbiol.* 15: 395-401
- Hult K, Veide A, Gatenbeck S. (1980). The distribution of the NADPH regenerating mannitol cycle among fungal species. *Arch. Microbiol* 128(2): 253-255
- Jakob L, Hamatschek J, Scholten G. (1997). Weinfehler. In: *Der Wein*, 10. Auflage: 170-186
- Jones B.E, Dossonnet V, Kuster E, Hillen W, Deutscher J. & Klevit R.E. (1997). Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J. Biol. Chem.* 272: 26530-26535
- Kaback H.R. (1990). Lac permease of *Escherichia coli*: on the path of the proton. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B326: 425-436
- Kim J.H, Guvener Z.T, Cho J.Y, Chung K.C. & Chambliss G.H. (1995). Specificity of DNA binding activity of the *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA. *J. Bacteriol.* 177: 5129-5134
- Konings W.N & Booth I.R (1981). Do the stoichiometries of ion-linked transport systems vary ? *Trends Biochem. Sci.* 6: 257-262
- Konings W.N, Lolkema J.S, Bolhuis H, van Veen H.W, Poolman B & Driessen A.J.M. (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71: 117-128
- Kornberg H.L. and Reeves R.E. (1972). Inducible Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase Activities in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 128: 1339-1344
- Labarre C, Guzzo J, Cavin J.F and Divies C. (1996). Cloning and Characterization of

- the Genes Encoding the Malolactic Enzyme and the Malate Permease of *Leuconostoc oenos*. Appl. environ. Microbiol. 62: 1274-1282
- Lemperle E, Kerner E. (1982). Identifizierung und Beurteilung von Trübungen und Ausscheidungen im Wein. Dt. Weinb. 37: 96-108
- Lengeler J.W, Drews G, Schlegel H.G. (1999). Biology of the Prokaryotes:68-87
- Lever T.M, Palmer T, Cunningham I.J, Cotton N.P.J, and Jackson J.B. (1991). Purification and properties of the H⁺-nicotinamide nucleotide Transhydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. Eur. J. Biochem. 197: 247-255
- Lipmann and Tuttle. (1945) A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. J. Biol. Chem., 159: 21-28
- Liu S.O, Pritchard G.G, Hardman M.J und Pilone G.J. (1996). Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway. J. Appl. Bacteriol. 81: 486-492
- Lonvaud-Funel A. (1999). Lactic acid bacteria and the quality improvement and depreciation of wine. Antonie van Leeuwenhoek 76: 317-331
- Loubiere P, Salou P, Leroy M.J, Lindley N.D. and Pareilleux A. (1992). Electrogenic malate uptake and Improved Growth Energetics of the Malolactic Bacterium *Leuconostoc oenos* Grown on Glucose-Malate Mixtures. J. Bacteriol. 174: 5302-5308
- Lüthi H, Vetsch U. (1981). Mikroskopische Beurteilung von Weinen und Fruchtsäften in der Praxis. 2. Aufl. Heller Chemie- u. Verw. Ges., Schw. Hall
- Madigan M.T, Martinko J.M, Parker J. (1997). Continuous culture. Brock, Biology of Microorganisms, Prentice Hall, 8. Auflage: 157-160
- Maloney P, Hastings Wilson T. (1996). Ion-coupled transport and transporters. In Neidhardt: Escherichia coli and Salmonella. 2nd edition. 74: 1130-1148
- Meadow N. D, Fox D. K, Roseman S. (July 1990). The bacterial phosphoenolpyruvate: glycolate phosphotransferase system. Ann. Rev. Biochem. 59: 497-542
- Morel F, Delmas F, Jobin M.P, Divies C and Guzzo J. (2001). Improved acid tolerance of a recombinant strain of *Escherichia coli* expressing genes from the acidophilic bacterium *Oenococcus oeni*. Lett. Appl. Microbiol. 33: 126-130
- Morse R, Collins M.D, O'Hanlon K, Wallbanks S, Richardson P.T. (1996). Analysis of the β' subunit of DNA-dependent RNA polymerase does not support the hypothesis inferred from 16S rRNA analysis that *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) is a tachytelic (fast-evolving) bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology 46: 1004-1009

- Neidhardt F.C., Bloch P.L. & Smith D.F. (1974). Culture medium for *Enterobacteria*. J. Bacteriol. 119: 736-747
- Neuhaus Anja (1999). Physiologische Charakterisierung von Oenococcen. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz, Deutschland
- Nicholls D. G. and Ferguson S. J. (1992). Bioenergetics 2
- Otto R, Sonnenberg ASM, Veldkamp H & Konings W.N. (1980). Generation of an electrochemical proton gradient in *Streptococcus cremoris* by lactate efflux. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5502-5506
- Otto R, Lageveen RG, Veldkamp H & Konings W.N (1982). Lactate efflux induced electrical potential in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. J Bacteriol. 146: 733-738
- Pao S.S, Paulsen I.T and Saier M.H.Jr. (1998). Major Facilitator Superfamily. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 1-34
- Paulsen I.T, Chauvaux S, Choi P, Saier M.H.Jr. (1997). Characterization of Glucose-Specific Catabolite Repression-Resistant Mutants of *Bacillus subtilis* : Identification of a novel Hexose:H⁺ Symporter. J. Bac. 180(3): 498-504
- Petersen S, de Graaf A.A, Eggeling L, Möllney M, Wiechert W, Sahm H. (2000). In vivo quantitation of parallel and bidirectional fluxes in the anapleosis of *Corynebacterium glutamicum*. J. Biol. Chem. 175: 35932-35949
- Pfeiffer P, Grünewald C und König H. (2002). Bildung von Pyroglutaminsäure und ihr Einfluss auf das Aroma des Weines. Deutsches Weinbau-Jahrbuch 53: 237-242
- Pfeiffer P, Grünewald C. und König H. (2004). Spontane Bildung und mikrobieller Abbau von L-Pyroglutamat im Wein. Deutsches Weinbau-Jahrbuch 55: 262-266
- Poolman B, Molenaar D, Smid E.J, Ubbink T, Abee T, Renault P.P and Konings W.N. (1991). Malolactic Fermentation: Electrogenic Malate Uptake and Malate/Lactate Antiport Generate Metabolic Energy. J. Bacteriol. 173(19): 6030-6037
- Poolman B. (2002). Transporters and their roles in LAB cell physiology. Antonie van Leeuwenhoek 82: 147-164
- Pradhan P.G, Nadkarni G.B. (1980). Functional multiplicity of phosphoglucose isomerase from *Lactobacillus casei*. Biochim Biophys Acta 615: 465-473
- Radler F. (1972). Problematik des bakteriellen Säureabbaus. Weinberg und Keller 19: 357-370
- Rauhut R. (2001). Bioinformatik. Sequenz –Struktur-Funktion. Wiley-VCH Verlag,

Weinheim

- Reizer J. & Panos C. (1980). Regulation of beta-galactoside phosphate accumulation in *Streptococcus pyogenes* by an expulsion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 5497-5501
- Reizer J, Bergstedt U, Galinier A, Kuster E, Saier M.H. Jr, Hillen W, Steinmetz M. & Deutscher J. (1996). Catabolite repression resistance of gnt operon expression in *Bacillus subtilis* conferred by mutation of His-15, the site of phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of the phosphocarrier protein HPr. *J. Bacteriol.* 178: 5480-5486
- Richter Hanno (2000). Bedeutung von Pantothenensäure für die Unterdrückung der Bildung von Erythrit und Essigsäure bei der Fermentation von Glucose durch *Oenococcus oeni*. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Richter H, Vlad D, Unden G. (2001). Significance of pantothenate for glucose fermentation by *Oenococcus oeni* and for suppression of the erythritol and acetate production. *Arch. Microbiol.* 175: 26-31
- Richter H, De Graaf A.A, Hamann I. and Unden G. (2003a). Significance of phosphoglucose isomerase for the shift between heterolactic and mannitol fermentation of fructose by *Oenococcus oeni*. *Arch. Microbiol.* 180: 465-470
- Richter H, Hamann I, Unden G. (2003b). Use of the mannitol pathway in fructose fermentation of *Oenococcus oeni* due to limiting redox regeneration capacity of the ethanol pathway. *Arch. Microbiol.* 179: 227-233
- Romano A.H, Trifone J.D, Brustolon M. (1979). Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria. *J. Bacteriol.* 139: 93-97
- Romano A.H, Brino G, Peterkofsky A. & Reizer J. (1987). Regulation of beta-galactoside transport and accumulation in heterofermentative lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 169: 5589-5596
- Rozes N, Arda L, Bordons A. (2003). Effect of phenolic compounds on the co-metabolism of citric acid and sugars by *O. oeni* from wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 36(5): 337-41
- Ruijter G.J.G, Visser J. (1999). Characterization of *Aspergillus niger* phosphoglucose isomerase. Use for quantitative determination of erythrose 4-phosphate. *Biochimie* 81: 267-272
- Saier M.H, Ye J.J, Klinke S. and Nino E. (1995). Identification of an anaerobically induced phosphoenolpyruvate-dependent fructose-specific phosphotransferase system and evidence for the Embden-Meyerhof glycolytic pathway in the heterofermentative bacterium *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* 178: 314-316

- Salema M, Poolman B, Lolkema J.S, Loureiro Dias M.C, Konings W.N. (1994). Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. Eur. J. Biochem. 225: 289-295
- Salema M, Lolkema J.S, San Romao M.V. and Loureiro Dias M.C. (1996). The Proton Motive Force Generated in *Leuconostoc oenos* by L-Malate Fermentation. J. Bacteriol. 178: 3127-3132
- Salema M, Capucho I, Poolman B, San Romao M.V. and Loureiro Dias M.C. (1996). In vitro reassembly of the malolactic fermentation pathway of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*). J. Bacteriol. 178: 5537-5539
- Salou P, Loubiere P. and Pareilleux A. (1994). Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1459-1466
- Sambrook j., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schaffer A.A. and Petreikov M. (1997). Inhibition of fructokinase and sucrose synthase by cytosolic levels of fructose in young tomato fruit undergoing transient starch synthesis. Physiologia Plantarum 101: 800-806
- Schlegel H.G (1992). Bakterienwachstum in kontinuierlicher Kultur. Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage: 216-219
- Schlegel H.G (1992). Milchsäuregärung und Lactobacteriaceae. Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage: 296-304
- Schneider V. (Januar 2000). Essigstich: Alter Fehler-neue Ursachen. Das deutsche Weinmagazin 2: 12-15
- Struch T, Neuss B, Bringer-Meyer S. und Sahm H. (1991). Osmotic adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 518-523
- Szyperski T. (1995). Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids – an efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. Eur. J. Biochem. 232: 433-448
- Teixeira H, Goncalves M.G, Rozes N, Ramos A, San Romao M.V. (2002). Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: A response to ethanol stress ? Microbial Ecology 43(1): 146-153
- Ten Brink B & Konings W.N. (1982). Electrochemical proton gradient and lactate concentration gradient in *Streptococcus cremoris* cells grown in Batch culture. J. Bacteriol. 152: 682-686

- Ten Brink B, Otto R, Hansen U.P. & Konings W.N. (1985). Energy recycling by lactate efflux in growing and nongrowing cells of *Streptococcus cremoris*. J. Bacteriol. 162: 383-390
- Titgemeyer F. and Hillen W. (2002). Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 59-71
- Tourdot-Marechal R, Gaboriau D, Beney L, Divies C. (2000). Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology* 55: 269-273
- Veigha-Da-Cunha M, Firme P, San Romao MV, Santos H. (1992) Application of ^{13}C nuclear magnetic resonance to elucidate the unexpected biosynthesis of erythritol by *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2271-2279
- Veigha-Da-Cunha M, Santos H, van Schaftingen E. (1993) Pathway and regulation of erythritol formation in *Leuconostoc oenos*. *J. Bacteriol* 175: 3941-3948
- Veyrat A, Monedero V and Perez-Martinez G (1994). Glucose transport by the phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system in *Lactobacillus casei* ATCC 393 and its role in carbon catabolite repression. *Microbiology* 140: 1141-1149
- Wagner N. (2004). Pyruvatstoffwechsel bei den heterofermentativen Milchsäurebakterien *Oenococcus oeni* und *Leuconostoc mesenteroides*. Diplomarbeit, Universität Mainz, Deutschland
- Wallace B.J. & Young I.G. (1977). Role of quinines in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 233: 109-122
- Weickert M.J. & Chambliss G.H. (1990). Site-directed mutagenesis of a catabolite repressor operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87: 6238- 6242
- Weisser P, Krämer R, Sahm H. und Sprenger G.A. (1995). Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *J. Bacteriol.* 177: 3351-3354
- Williams R, Cotton N.P, Thomas C.M. and Jackson J.B. (1994). Cloning and sequencing of the genes for the proton-translocating nicotinamide nucleotide transhydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the implications for the domain structure of the enzyme. *Microbiology* 140: 1595-1604
- Yang D. und Woese C.R. (1989). Phylogenetic structure of the „*Leuconostocs*“: An interesting Case of a Rapidly Evolving Organism. *System. Appl. Microbiol.* 12: 145-149
- Ye J.J, Neal J.W, Cui X, Reizer J & Saier M.H.Jr. (1994a). Regulation of the glucose: H^+ symporter by metabolite-activated ATP-dependent phosphorylation of HPr in *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* 176: 3484-3492

- Ye J.J, Reizer J, Cui X & Saier M.H.Jr. (1994b). ATP-dependent phosphorylation of serine-46 in the phosphocarrier Protein HPr regulates lactose/H⁺ symport in *Lactobacillus brevis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 3102-3106
- Ye J.J. & Saier M.H.Jr. (1996). Regulation of sugar uptake via the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems in *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* is mediated by ATP-dependent phosphorylation of seryl residue 46 in HPr. J. Bacteriol. 178: 3557-3563

8. Internetseiten

CLUSTALW

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

Conserved Domain Database

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>

Jürgen Fröhlich, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.
Enzymkinetik. Programm zur Berechnung von K_M und V_{max} .

<http://www.uni-mainz.de/FB/Biologie/Mikrobiologie/download>

GenBank

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

JGI

Genomsequenz von *Oenococcus oeni*.

http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/oenoe/oenoe.home.html

Protein Information Resource (PIR)

<http://pir.georgetown.edu/>

SWISSPROT

<http://us.expasy.org/sprot/sp-docu.html>

TMHMM Server v. 2.0

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

9. Anhang

Tab. 26: Enzymaktivitäten in Zellextrakten von *O. oeni*.

Enzym	Spez. Aktivität in U/g TG nach Zucht mit			
	Glucose	Fructose	Glucose +Fructose	Ribose
Glucokinase	55	176	ND	ND
Glucose-6-P-DH (NAD ⁺)	1285	1000	1080	810
(NADP ⁺)	1440	1410	1945	1110
6-P-Gluconat-DH (NAD ⁺)	20	15	15	5
(NADP ⁺)	360	830	710	435
Acetat-Kinase	7	23	ND	ND
Phosphotransacetylase	4600	ND	ND	ND
Acetaldehyd-DH (NADH)	55	3	16	ND
(NADPH)	2	ND	ND	ND
Alkohol-DH (NADH)	150	ND	ND	ND
(NADPH)	2400			
Lactat-DH (NADH)	3800	5060	ND	ND
PGI	ND	705	382	ND
Fructokinase	9	57	ND	ND
Fructose-6-P- Phosphoketolase	7	17	ND	ND
Erythritol-4-P-DH (NADPH)	41	52	41	ND
Mannitol-DH (NADH)	130	135	90	80
(NADPH)	150	175	181	90
Transhydrogenase (löslich)	<1	≤3,2	ND	ND
(Membran)	≤1,7	≤1,4	ND	ND

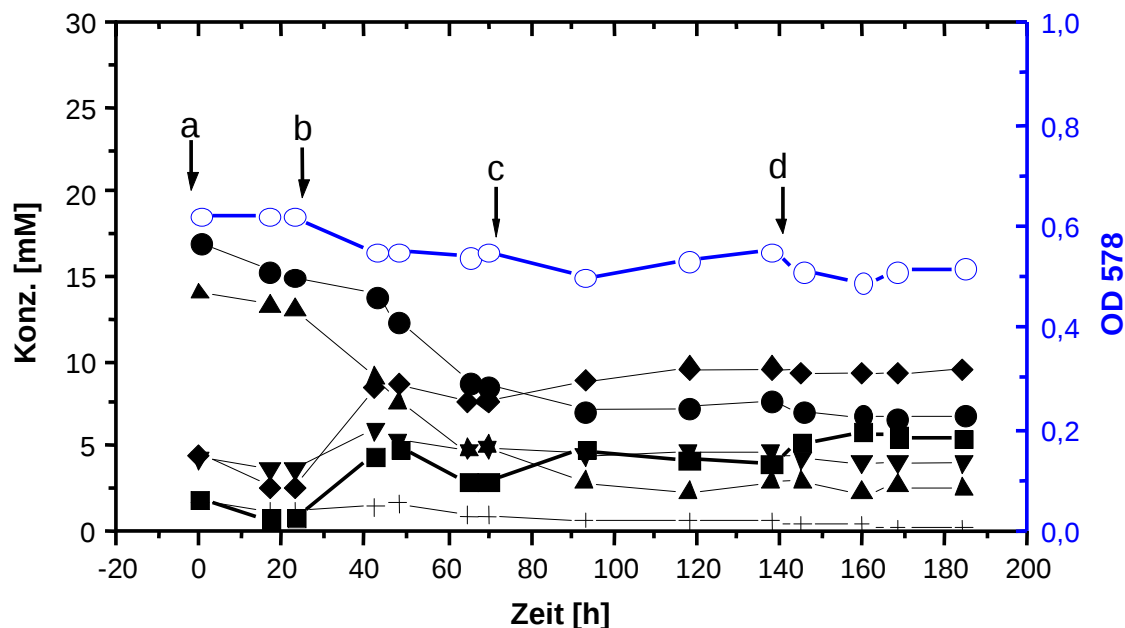


Abb. 32: Fructosefermentation durch *O. oeni* im Chemostat bei steigender Dilutionsrate. Der Zufluß von MLD-Medium mit 20 mM Fructose, d.h. die Dilutionsrate D , wurde stufenweise erhöht. $D = 0,023$ (a), $0,057$ (b), $0,080$ (c) und $0,103 \text{ h}^{-1}$. Die OD_{578} (○), sowie die Konzentrationen von Fructose(■), Lactat(●), Ethanol(▲), Acetat(▼), Mannit(◆) und Erythrit(I) wurden gemessen.

Tab.27: Zu Abb. 32 gehörende Meßwerte

Zeit [h]	Dilutionsrate (h^{-1})	mM Substrat und Produkte						
		OD_{578}	Fructose	Lactat	Ethanol	Acetat	Mannit	Erythrit
0	0,023	0,62	1,8	17	14	4,2	4,5	1,7
17	0,023	0,62	0,7	15,3	13,3	3,7	2,6	1,2
23	0,023	0,62	0,8	15	13	3,6	2,5	1,2
42,5	0,057	0,55	4,4	13,9	9	6	8,4	1,4
48	0,057	0,55	4,9	12,3	7,6	5,4	8,6	1,6
65	0,057	0,54	2,9	8,7	4,7	4,8	7,6	0,9
69,5	0,057	0,55	3	8,6	4,9	4,9	7,7	0,9
93	0,080	0,5	4,8	7,1	2,8	4,5	8,8	0,6
118	0,080	0,53	4,2	7,3	2,3	4,7	9,6	0,5
138	0,080	0,55	4	7,7	2,9	4,6	9,6	0,5
145,5	0,103	0,51	5,2	7	2,8	4,3	9,3	0,4
160	0,103	0,49	5,9	6,8	2,3	4	9,3	0,3
168,5	0,103	0,51	5,6	6,6	2,6	4	9,3	0,2
184,5	0,103	0,52	5,5	6,9	2,4	4	9,5	0,2

Tab.28: Zelluläre Gehalte von Glucose-6-Phosphat, 6-Phospho-Gluconat und Fructose-6-Phosphat in *O. oeni*.

Zucht und Inkubation	Metabolit- Gehalte in μM		
	Glucose-6-P	6-P-Gluconat	Fructose-6-P
Glucose	2257	1173	0
Glucose+Pyr	442	490	110
Glucose+Fruc	1381	406	1650
Fructose	1128	546	473
Fructose+Pyr	609	73	368

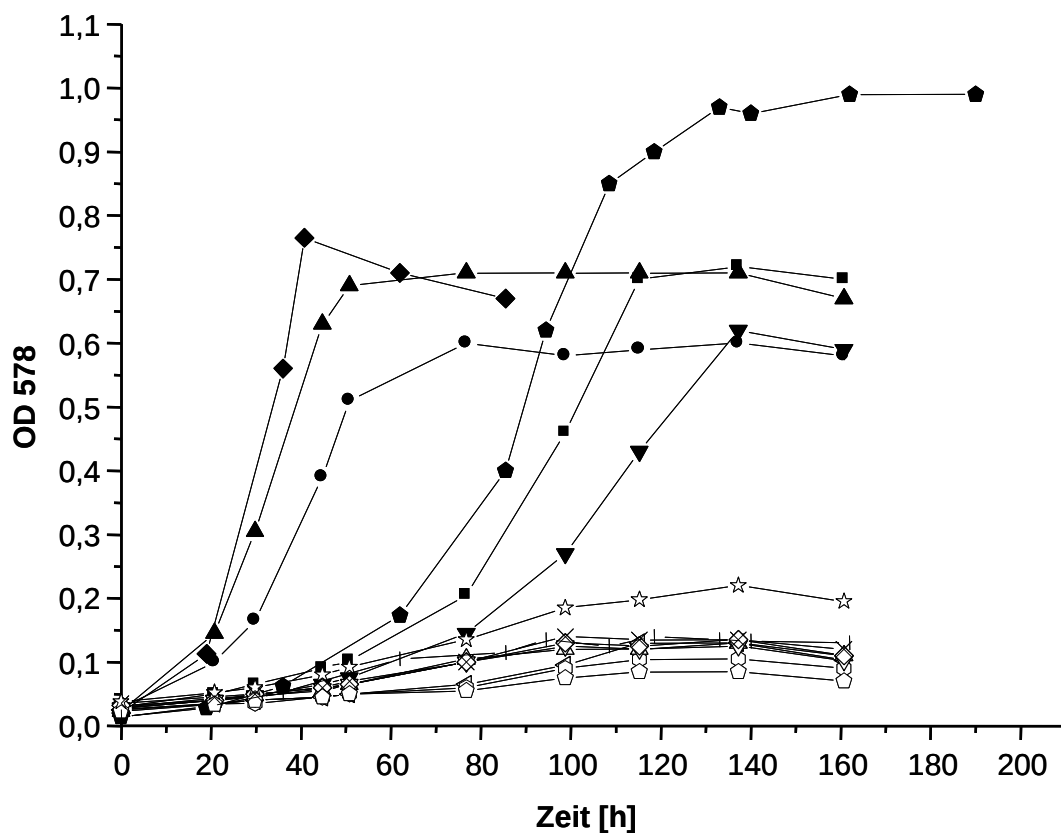


Abb. 33: Wachstumskurven von *Oenococcus oeni* B1 mit je 20 mM C-Quelle.
 Geschlossene oder offene Symbole bedeuten Wachstum bzw. kein Wachstum.
 Glucose (■); Fructose (●); 10mM Glucose+20mM Fructose (▲); Mannose (▼);
 Ribose (◆); Trehalose (◼); Melibiose (☆); Galactose (◁); Sorbose (◊); Cellobiose
 (△); Saccharose (▽); Maltose (◇); Lactose (◻); Xylose (✕); ohne C-Quelle (|)

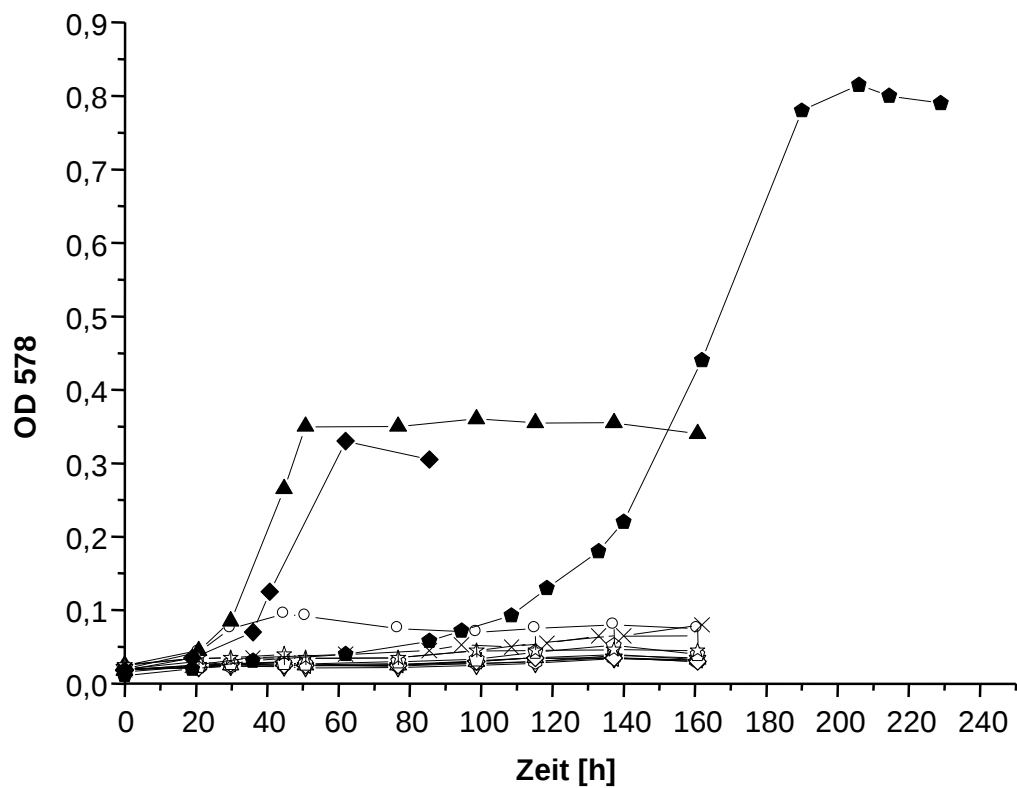


Abb. 34: Wachstumskurven von *Oenococcus oeni* 5-1 mit je 20 mM C-Quelle.
 Geschlossene oder offene Symbole bedeuten Wachstum bzw. kein Wachstum.
 10mM Glucose+20mM Fructose (▲); Ribose (◆); Trehalose (◆); Glucose (□);
 Fructose (○); Mannose (▽); Melibiose (☆); Galactose (◁); Sorbose (○); Cellobiose
 (△); Saccharose (▽); Maltose (◇); Lactose (◊); Xylose (×); ohne C-Quelle (|)

