

Einfluss von Stressfaktoren auf
die Regulation der Glycerin-Bildung
und -Sekretion
am Beispiel Weinhefen

Aus dem
Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie
der Forschungsanstalt Geisenheim
Prof. Dr. M.K. Großmann

und dem

Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig Universität Giessen
Prof. Dr. I. Bitsch

**Einfluss von Stressfaktoren auf
die Regulation der Glycerin-Bildung und -Sekretion
am Beispiel Weinhefen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig Universität Giessen

1. Gutachter: Prof. Dr. I. Bitsch
2. Gutachter: Prof. Dr. M.K. Großmann

vorgelegt von
Dipl. Oenologe Ilona Schneider
Giessen, 2001

*Meiner Mutter und
meinen Brüdern
gewidmet*

*Weg und Waage,
Steg und Sage
finden sich in einem Gang.*

*Geh und trage
Fehl und Frage
Deinen einen Pfad entlang.*

(Martin Heidegger)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

I.	Einleitung	13
II.	Glycerin-Metabolismus von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.1.	Glycerin-Metabolismus	15
2.1.1.	Biosynthese	16
2.1.1.1.	Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH)	17
2.1.1.2.	Glycerin-3-phosphatase (GPP)	19
2.1.2.	Katabolismus	20
2.1.2.1.	Alternativer Assimilationsweg	20
2.1.2.2.	Transport	21
2.2.	Stress der Hefe	23
2.2.1.	Osmostress	24
2.2.1.1.	Zelluläre Reaktion auf osmotischen Stress	25
2.2.1.2.	Akkumulation von Ausgleichssubstanzen („compatible solute“)	25
2.2.2.	Osmoregulation	27
2.2.2.1.	Einfluss auf die Glycerinsynthese	27
2.2.2.1.1.	Induktion der Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH) Synthese	27
2.2.2.1.2.	Induktion der Glycerin-3-phosphatase (GPP) Synthese	28
2.2.3.	Akkumulation von Glycerin	28
2.2.3.1.	Eintritt von Glycerin	29
2.2.4.	Signaltransduktion	29
2.3.	Glycerin und das Redoxpotenzial der Zelle	33
2.3.1.	Die Redoxpaare NAD/NADH ₂ und NADP/NADPH ₂	33
2.3.2.	Redoxgleichgewicht unter anaeroben Verhältnissen	34
2.3.2.1.	Glycerinbildung	35
2.3.2.2.	Weitere Fermentationsprodukte	36
2.3.2.2.1.	Acetaldehyd	36

2.3.2.2.2.	Acetat	37
2.3.2.2.3.	Succinat	37
2.3.3.	Redoxgleichgewicht unter aeroben Bedingungen	40
2.4.	Vorkommen, Bildung und Bedeutung von Glycerin in der Weinbereitung	41
2.4.1.	Aromastoffe des Weines	41
2.4.2.	Bedeutung von Glycerin bei der alkoholischen Gärung	43
2.4.2.1.	Spontangärung - Reinzuchthefgärung	43
2.4.2.2.	Glycerinbildung während der alkoholischen Gärung	44
2.4.2.3.	Weitere Fermentationsprodukte	44
2.4.2.3.1.	Acetaldehyd, Pyruvat und α -Ketoglutarat	44
2.4.2.3.2.	Höhere Alkohole	45
2.4.2.3.3.	Fettsäuren und deren Ester	46
2.4.3.	Faktoren, die die Glycerinbildung im Verlauf der Gärung beeinflussen	47
2.4.3.1.	Zusammensetzung des Traubenmostes	47
2.4.3.2.	Temperatur und Sauerstoffverfügbarkeit	48
2.4.3.3.	pH-Wert und SO_2 -Konzentrationen	48
2.4.3.4.	Hefestamm und Hefezellzahlinokulation	49
III.	Material und Methoden	50
3.1.	Material	50
3.1.1.	Hefestämme	50
3.1.1.1.	Laborhefestämme	50
3.1.1.2.	Weinhefestämme	51
3.1.1.3.	Gentechnisch veränderte Weinhefestämme	51
3.1.2.	Medien	52
3.1.2.1.	Medien für Kreuzungsversuche	52
3.1.2.2.	Medien für Drop-Test-Experimente	53
3.1.2.3.	Medien für Gärversuche mit Laborhefestämmen	54
3.1.3.	Zusatz von Antibiotika	57
3.1.4.	Kultivierungsbedingungen für Gärversuche mit Weinhefestämmen	58

3.1.5.	Kultivierungsbedingungen für Gärversuche mit Laborhefestämmen	58
3.1.6.	Zellzahlbestimmung	59
3.1.6.1.	Zellzahlbestimmung mit der Thoma-Zählkammer	59
3.1.6.2.	Zellzahlbestimmung durch optische Dichte	59
3.1.7.	Bestimmung des Nass- und Trocken-Gewichtes	60
3.1.8.	Bestimmung der sekundären Gärungsprodukte	61
3.1.8.1.	Bestimmungen nach nasschemischen Analysemethoden	61
3.1.8.2.	Bestimmungen nach enzymatischen Analysemethoden	61
3.1.8.3.	Bestimmung des Glyceringehaltes	61
3.1.8.4.	Chromatographische Analysen	62
3.1.8.4.1.	Hochauflösungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	62
3.1.8.4.1.1.	HPLC-RI-Analyse	62
3.1.8.4.1.2.	HPLC-UV-Analyse	63
3.1.8.4.2.	Gaschromatographie	65
3.2.	Methoden	68
3.2.1.	Kreuzungsexperimente mit Laborhefestämmen	68
3.2.1.1.	Bildung von diploiden Zellen	68
3.2.1.2.	Trennung von diploiden und haploiden Zellen	69
3.2.1.3.	Sporulation von diploiden Zellen	69
3.2.1.4.	Drop-Test mit Labor- und Weinhefe-Stämmen	72
3.3.	Fermentationsexperimente mit Laborhefestämmen in Traubensaftmedium	73
3.4.	Fermentationsexperimente mit Laborhefestämmen mit verschiedenen synthetischen Nährmedien und unterschiedlichen Zuckerkonzentrationen	73
3.5.	Fermentationsexperimente zur Ermittlung der Glycerinbildungsfähigkeit von Weinhefestämmen und gentechnisch veränderten Hefestämmen	74
3.6.	Fermentationsexperimente zur Bestimmung des intra- und extra-zellulären Glycerinbildungsvermögens von Weinhefestämmen	75

IV.	Ergebnisse	76
4.1.	Weinhefestämme	76
4.1.1.	Einfluss der Gärtemperatur auf die Glycerinbildung, den Endvergärungsgrad und die Bildung von sekundären Gärungsprodukten	76
4.1.1.1.	Einfluss der Gärtemperatur auf die Glycerinbildung	76
4.1.1.2.	Einfluss der Gärtemperatur auf die Bildung von weiteren sekundären Gärungsprodukten	78
4.1.2.	Einfluss der Nährstoffzusammensetzung des Gärmediums	80
4.1.2.1.	Einfluss der Nährstoffzusammensetzung des Gärmediums auf die Glycerinbildung	80
4.1.2.2.	Einfluss der Nährstoffzusammensetzung des Gärmediums auf die Bildung von weiteren sekundären Gärungsprodukten	81
4.2.	Gentechnisch veränderte Hefestämme	84
4.2.1.	Einfluss von gentechnisch veränderten Hefestämmen auf die Glycerinbildung	84
4.2.2.	Einfluss von gentechnisch veränderten Hefestämmen auf die Fermentationsleistung	85
4.2.3.	Einfluss der Gärtemperatur auf die Bildung von Acetat und Acetaldehyd	86
4.3.	Ergebnisse der Drop-Test-Versuche	87
4.3.1.	Ergebnisse der Drop-Test-Versuche mit Weinhefestämmen und mit gentechnisch veränderten Laborhefestämmen	88
4.3.1.1.	Kontrolle: YPDA-Medium unter anaeroben Bedingungen	89
4.3.1.2.	YPDA-Medium mit 4 % NaCl unter anaeroben Bedingungen	89
4.3.1.3.	YPDA-Medium mit 6 % NaCl unter anaeroben Bedingungen	90
4.3.1.4.	YPDA-Medium mit 8 % NaCl unter anaeroben Bedingungen	90
4.3.1.5.	YPDA-Medium mit 1 % Sorbitol unter anaeroben Bedingungen	91
4.3.2.	Ergebnisse der Drop-Test-Versuche mit Glycerin-Deletions-Laborhefen	91
4.3.2.1.	Kontrolle: YPDA-Platte unter aeroben Bedingungen	92

4.3.2.2.	YPDA-Platte unter anaeroben Bedingungen	92
4.4.	Hefestämme W 303A, S3 und K1m/GPD1	93
4.4.1.	Einfluss der Hefestämme auf die Glycerinbildung, den Endvergärungsgrad und die Bildung weiterer sekundärer Gärungsprodukte	93
4.4.1.1.	Einfluss der Hefestämme auf die Glycerinbildung	93
4.4.1.2.	Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von 2-/3-Methylbutanol und 2-/3-Methylbutylacetat	94
4.4.1.3.	Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von Hexanol und Hexylacetat	96
4.4.1.4.	Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von 2-Phenylethanol und Phenylethylacetat	97
4.4.1.5.	Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von Capronsäure und Capronsäureethylester	98
4.4.2.	Einfluss des Stammes W 303A, des Deletionsstammes <i>gpd1Δgpd2Δ</i> , des Deletionsstammes <i>gpp1Δgpp2Δ</i> und des Deletionsstammes <i>gpd1Δgpd2Δ gpp1Δgpp2Δ</i>	99
4.4.2.1.	Einfluss der Hefestämme W 303A, <i>gpd1Δgpd2Δ</i> , <i>gpp1Δgpp2Δ</i> und <i>gpd1Δgpd2Δ gpp1Δgpp2Δ</i> auf die Glycerinbildung	99
4.4.2.2.	Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von 2-/3-Methylbutanol und 2-/3-Methylbutylacetat	101
4.4.2.3.	Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von Hexanol und Hexylacetat	102
4.4.2.4.	Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von 2-Phenylethanol und Phenylethylacetat	103
4.4.2.5.	Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von Caprinsäure und Caprinsäureethylester	105
4.4.2.6.	Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von Fumarat und Succinat	106
4.4.3.	Einfluss des Hefestammes W 303A und des Deletionsstammes <i>gpd1Δgpd2Δ gpp1Δgpp2Δ</i>	107

4.4.3.1.	Einfluss der Hefestämme W 303A und des Deletionsstammes <i>gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ</i> auf die Glycerinbildung	107
4.4.3.2.	Einfluss des Hefestammes auf die Aromenbildung von 2- und 3-Methylbutanol	109
4.4.3.3.	Einfluss des Hefestammes auf die Aromenbildung von 2- und 3-Methylbutylacetat	110
4.4.3.4.	Einfluss des Hefestammes auf die Aromenbildung von Essigsäure	111
4.4.3.5.	Einfluss des Hefestammes auf die Aromenbildung von Ethylacetat	112
V.	Diskussion	114
5.1.	Weinhefestämme und Glycerinbildung	114
5.1.1	Einfluss von Weinhefestämmen auf die Glycerinbildung	114
5.1.2.	Einfluss der Nährstoffzusammensetzung auf die Glycerinbildung	115
5.2.	Gentechnisch veränderte Hefestämme	116
5.2.1.	Einfluss der Überexpression von <i>GPD1</i>	116
5.2.2.	Einfluss der Überexpression von <i>GPD1</i> auf die Bildung von Glycerin und weiteren sekundären Gärungsprodukten	117
5.3.	Drop-Test-Untersuchungen: Weinhefestämme	119
5.4.	Drop-Test-Untersuchungen: Gentechnisch veränderte Hefestämme	119
5.5.	Aktivität der Deletionsstämme <i>gpd1Δgpd2Δ</i> , <i>gpp1Δgpp2Δ</i> und <i>gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ</i> in Traubenmostmedien	120
5.5.1.	Ein Vergleich zwischen dem <i>gpd1Δgpd2Δ</i> - und dem <i>gpp1Δgpp2Δ</i> -Stamm	120
5.5.2.	Aktivität des Deletionsstammes <i>gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ</i> in synthetischem Nährmedium – Ein Hinweis auf eine Transhydrogenase-Aktivität in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ?	122

5.6.	Fragestellung der metabolischen Effektivität	124
5.7.	Ausblick	125
VI.	Zusammenfassung	127
VII.	Abbildungsverzeichnis	129
VIII.	Tabellenverzeichnis	131
IX.	Literaturverzeichnis	132

Abkürzungen

<u>Kurzform</u>	<u>Bedeutung</u>
α -Typ	Mating Typ α
522D/T	522D-Hefestamm mit Plasmid mit ZEO _r -Gen
522D/GPD1	522D-Hefestamm mit Plasmid mit GPD1-Aktivität
71B/T	71B-Hefestamm mit Plasmid mit ZEO _r -Gen
71B/GPD1	71B-Hefestamm mit Plasmid mit GPD1-Aktivität
ADH	Alkohol-dehydrogenase
Adh1, Adh2, Adh3	Alkohol-dehydrogenasen
ADP	Adenosindiphosphat
ALDH	Aldehyd-dehydrogenase
Ald6, Ald7	Aldehyd-dehydrogenasen
AMH	Assmannshausen
ASI	synthetisches Nährmedium (ASI)
ASII	synthetisches Nährmedium (ASII)
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
a-Typ	Mating Typ a
CAY	Champagne AY
CEG	Champagne Epernay Geisenheim
Del.	Deletion
Dak1, Dak2	Dihydroxyaceton-kinasen
Dan1	Zellwandmannoprotein (Pauperin Familie)
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
Eno1, Eno2	Enolasen (Phospho-glycerat-dehydrogenasen)
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavin-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
Fba1	Fructose-bisphosphat-aldolase
Del.	Deletion
C	Kohlenstoff
N	Stickstoff
Fps1	Glycerin channel protein

FRDS	Fumarat-reductase (MIP Familie)
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
G33	Geisenheim 33
G3P	Glycerin-3-phosphat
G49	Geisenheim 49
G74	Geisenheim 74
Gal2	Galactose permease
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GC-MS	Gaschromatographen mit Massenspektrometer
Gcy1	Protein induziert durch Galactose
GLD	Glycerin-dehydrogenase
GlpF	Glycerol-facilitator
<i>gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ</i>	Stamm deletiert in <i>GPD1</i> , <i>GPD2</i> , <i>GPP1</i> und <i>GPP2</i>
<i>Gpd1</i> , <i>Gpd2</i>	Glycerin-3-phosphat-dehydrogenasen
GPDH	Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase
GPP	Glycerin-3-phosphatase
<i>gpd1Δgpd2Δ</i>	Stamm deletiert in <i>GPD1</i> und <i>GPD2</i>
<i>gpp1Δgpp2Δ</i>	Stamm deletiert in <i>GPP1</i> und <i>GPP2</i>
<i>Gpp1</i> , <i>Gpp2</i>	Glycerin-3-phosphatasen
Gup1	„Putative Glycerol transporter“
Gut1	Glycerin-kinase
Gut2	FAD-abhängige Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase
HOG	„High Osmolarity Glycerol Pathway“ (HOG-Weg)
Hog1	MAPK, Hauptkomponente im „high osmolarity glycerol pathway“ (HOG-Weg)
HOR2	GPP2
HPLC-RI	Hochauflösungs-Flüssigkeitschromatographie mit RI-Detektor
HPLC-UV	Hochauflösungs-Flüssigkeitschromatographie mit UV-Detektor
HVS	Hautvillers
Hxt1, Hxt2, Hxt1-Hxt7	Hexokinasen
K1m	Hefestamm K1m

K1m/GPD1	K1m-Hefestamm mit Plasmid mit GPD1-Aktivität
K1m/T	K1m-Hefestamm mit Plasmid mit ZEO-Gen
KAc	Kalium Acetat
KDa	Kilo Dalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
K_i	Affinitätskonstante
M	Mol
MAP	„Mitogen Activated Protein“
MAPK	„Mitogen Activated Protein Kinase“
MAPKK	„Mitogen Activated Protein Kinase Kinase“
MAPKKK	„Mitogen Activated Protein Kinase Kinase“
MIP	„Membran Intrinsic Protein“
mM	mMol
M	Mol
MPa	mega Pascal
Msn2	Transkriptionaler Aktivator für Gene involviert in STRE-Elemente
Msn4	Transkriptionaler Aktivator, hohe Similarität zu Msn2
mtGPDH	mitochondriale Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase
NAD	Nicotin-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
NADH ₂	Nicotin-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotin-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidierte Form)
NADPH ₂	Nicotin-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
Nde1, Nde2	cytoplasmatische NADH-dehydrogenase
Ndi1	mitochondriale NADH-dehydrogenase
OD	optische Dichte
°Oe	Grad Oechsle
Osm1	mitochondriale Fumarat-reductase
Pbs2	MAPKK, aktiviert durch den „high osmolarity glycerol pathway“ (HOG-Weg)

Pdc1, Pdc2, Pdc5, Pdc6	Pyruvat-decarboxylase
Pfk1, Pfk2	Phosphofructo-kinasen
Pgi1	Phosphoglucose-isomerase
Pgk	Phosphoglycerat-kinase
Pgm1	Phosphogluco-mutase
P _i	anorganisches Phosphat
pntA, pntB	Transhydrogenasen in <i>Escheria coli</i>
Ptc1, Ptc3	PTCasen involviert in Pbs2p- und Hog1p-MAPKinase Aktivität
Ptp2, Ptp3	PTPasen involviert in Hog1p MAPKinase Aktivität
Pyk1	Pyruvat-kinase
s	Sekunden
r ²	Korrelationskoeffizient
Rgt2	Glucose-Sensor (niedrige Affinität)
<i>RHR2</i>	<i>GPPI</i>
Rox1, Rox3	Transkriptionaler Repressor von hypotoxic Genen (<i>CYC7, ANB1</i>)
S3	Siha 3
SHG	Scharzhofberg
Sho1	Osmosensor im „high osmolarity glycerol pathway“ (HOG-Weg)
Sln1	aktiviert den Phosphatübertrag (Sln1p nach Ypd1p zu Ssk1p)
Snf3	Glucose-Sensor (hohe Affinität)
Ssk1	zwei Komponenten Signal Überträger
Ssk2, Ssk22	MAPKKK involviert in den „high osmolarity glycerol pathway“ (HOG-Weg)
Ste11	MAPKKK involviert in den „pheromone pathway“ (Pheromon-Weg)
Ste20, Ste50	Serine/Threonine Proteinkinase des „pheromone pathway“ (Pheromon Weg)
STG	Steinberg

TG	Trockengewicht
Tdh1, Tdh2, Tdh3	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenasen
Tpi1	Triose-phosphat-isomerase
Tps1	Trehalose-6-phosphatase-synthase
W 303A	Hefestamm W 303A
W15	Wädenswil 15
YBR149w	Gcy1
YGL084c	Gup1
YNB	„Yeast Nitrogen Dextrose“
YPD	„Yeast Pepton Dextrose“
Ypd1	funktioniert im Zwei-Komponenten-System zwischen Sln1p und Ypd1p im „high osmolarity glycerol pathway“ (HOG-Weg)
YPDA	„Yeast Pepton Dextrose Adenin“
ZEOr	Phleomycin Resistenzgen

Molekularbiologische Nomenklatur

<u>Kurzform</u>	<u>Bedeutung</u>
GPD1	Genbezeichnung (3 Buchstaben und bis 3 Nummern)
<i>GPD1</i>	Wildtyp-Gen
<i>gpd1</i>	Stamm mit <i>GPD1</i> -Deletion
<i>gpd1Δ::HIS3</i>	Gendeletion von <i>GPD1</i> mit genetischen HIS3-Marker
Gpd1p	Proteinprodukt des <i>GPD1</i> Gens
<i>gpd1Δ</i>	Stamm in <i>GPD1</i> -Deletion

I. Einleitung

Wein ist das älteste Kulturgut der Menschheit. Zu Beginn der Zivilisation schrieb man seine Herkunft den Göttern zu. Er begleitet als Kulturgut seit Jahrtausenden die Entwicklung des Abendlandes. Die Erforschung der Gärung wurde durch den Chemiker und Mikrobiologen Louis Pasteur (1822-1895) im Auftrag des damaligen französischen Kaisers durchgeführt.

Im erbitterten Gelehrtenstreit mit dem deutschen Chemiker Justus von Liebig führte er den endgültigen Beweis für die mikrobielle Natur der alkoholischen Gärung. Mitte des 19. Jahrhunderts zeigte Louis Pasteur, dass 3,6 % der eingesetzten Glucosemenge während der alkoholischen Fermentation zu Glycerin umgewandelt wird. Erst die Entwicklung der molekularbiologischen und biochemischen Grundlagenforschung zeigte, dass im Verlauf der alkoholischen Gärung durch die Hefezelle *Saccharomyces cerevisiae* die Glycerinbildung der zweitwichtigste biochemische Vorgang neben der Bildung von Ethanol ist.

Durch die Beantwortung der Frage, welche Bedeutung Glycerin bzw. die Glycerinsynthese für die Hefezelle *Sacchromyces cerevisiae* hat, zeigt sich, dass einerseits Glycerin als osmotische Stressreaktion durch die Zelle produziert wird und andererseits für das Redoxverhältnis (intrazelluläre Redoxgleichgewicht NAD/NADH₂) wichtig ist. NADH₂ wird bei der Biomassenbildung der Hefezellen produziert und im Gegenzug NAD verbraucht. Um NAD immer wieder der Zelle als Kofaktor für Enzymreaktionen zur Verfügung zu stellen, muss NAD zurückgewonnen werden. Diese Recyclreaktion wird als intrazelluläres Redoxgleichgewicht bezeichnet, katalysiert durch die Glycerin-dehydrogenase. Das Ergebnis aus diesem Prozess ist weniger ein energieverbrauchender Zyklus, als ein Verlust an Ethanol und ein Gewinn an Glycerin. Ein Aspekt, der heute noch für die industrielle Ethanolproduktion auf der Grundlage des Fermentationsprozesses von Bedeutung ist. In großtechnischen Alkoholproduktionsstätten wäre eine geringe Reduzierung der Glycerinbildung mit Kosteneinsparungen im Rahmen von mehreren Millionen US-Dollar verbunden. Im Gegensatz hierzu gewährleistet eine Erhöhung des Glyceringehaltes der Backhefeindustrie eine effiziente Teigverarbeitung. Andere Industrien wie z. B. Kosmetikproduzenten nutzen die hohe Viskosität, die Farb- und Geruchlosigkeit von

Glycerin aus. Für lange Zeit wurde Glycerin aus dem Fermentationsprozess als Grundstoff zur Herstellung des Sicherheitssprengstoffes Dynamit gewonnen.

Betrachtet man die Glycerinbildung unter oenologischen Gesichtspunkten, so können zwei Hauptfunktionen erkannt werden: Zum einen bewirkt eine Erhöhung des Glyceringehaltes (um 4-6 g/l) im Wein eine Erhöhung der sensorischen Weinqualität, d.h. die Stärkung des Mouthfeels eines Weines. Zum anderen ist eine gesteigerte Glycerinproduktion der Hefezelle mit einer Reduktion der Ethanol synthese gekoppelt. Dies könnte ein weiterer Anwendungsbereich zur Herstellung alkoholreduzierter Getränke über einen natürlichen Fermentationsprozess sein.

Diese Arbeit soll unter Berücksichtigung oenologischer Aspekte einen weiterführenden Einblick in die biochemischen Grundlagen des Glycerinmetabolismus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* geben. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist in zwei Schwerpunktsthemen unterteilt:

1. Glycerinbildung von Weinhefestämmen und gentechnisch veränderten Hefestämmen

Die Variabilität der Glycerinbildung durch natürliche Faktoren (Nährstoffzusammensetzung, Hefestamm, Gärtemperatur) und moderne molekularbiologische Methoden (Überexpression des Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase-Gens *GPD1*) soll verglichen und bewertet werden.

2. Glycerinbildung von Deletionsstämmen unter oenologischen Bedingungen

Der Einfluss der Faktoren Nährstoffzusammensetzung und osmotischem Stress auf die Glycerinbildungsfähigkeit von Hefestämmen mit vollständiger Gendeletion des Glycerinbildungsweges.

II. Glycerin-Metabolismus von *Saccharomyces cerevisiae*

2.1. Glycerin-Metabolismus

Der Glycerin-Metabolismus von *Saccharomyces cerevisiae* ist unterteilt in Abbau- und Synthese-Mechanismen (Abb. 2.1.), d.h. Glycerin kann unter aeroben Bedingungen als Kohlenstoff- und Energie-Lieferant abgebaut und/oder als osmotisch aktive Substanz unter anaeroben Verhältnissen synthetisiert werden.

Die metabolische Schnittstelle von Synthese- und Abbau-Vorgängen ist Dihydroxyacetonphosphat (DHAP). DHAP wird größtenteils zu GAP (Glycerinaldehyd-3-phosphat) und anschließend zu Pyruvat abgebaut. Glycerin-3-phosphat (G3P), ein weiteres gemeinsames Zwischenprodukt von Synthese- und Abbau-Weg (Abb. 2.1.), ist eine Precursorsubstanz für die Phospholipid-Synthese. Es sind zwei weitere Acetylierungsschritte von G3P zur Bildung von Phosphatsäure notwendig, einem Hauptprodukt für die Biosynthese von Triglyceriden und Phospholipiden (Henry, 1982). Die Triglyceride werden für den Aufbau von Reservelipiden benötigt, hingegen dienen die Phospholipide als strukturelle Bestandteile von zellulären Plasmamembranen.

Eine besondere Funktion der Glycerinbildung ist die Freisetzung von anorganischem Phosphat (P_i), welches als Kofaktor für glycolytische Stoffwechselforgänge dient (Gancedo et al., 1968). Thevelein und Hohmann (1995) zeigten, dass die Glycerinproduktion und dementsprechend die Verfügbarkeit von intrazellulärem anorganischem Phosphat eine Schlüsselfunktion für die Kontrolle des glycolytischen Flusses einnimmt.

Im Verlauf dieser Arbeit wird der Glycerin-Metabolismus hinsichtlich zweier Funktionen betrachtet: Die Glycerin-Synthese zur Gewährleistung des intrazellulären Redoxpotenzials (Oura, 1977) und die Glycerin-Akkumulation bei Exposition der Hefezelle unter osmotischen Stressbedingungen (Brown, 1978).

2.1.1. Biosynthese

Ein essenzieller Vorgang für Hefezellen ist der Transport von Kohlenhydraten, wie Glucose, Fructose oder Mannose durch die Plasmamembran. Dieser Transport kann durch zwei verschiedene Mechanismen, dem Carrier-Diffusions-System oder dem aktiven Protonen-Symport-System erfolgen. Die Spezies *Saccharomyces cerevisiae* importiert Glucose und Fructose ausschließlich über ein passives Diffusions-System. Dieses System enthält 20 verschiedene Hexose Transporter Proteine (Hxt1p-Hxt17p, Gal2p, Snf3p, Rgt2p). Die Anpassungsfähigkeit an verschiedene Umgebungen und die Kontrolle des glycolytischen Flusses innerhalb der Hefezelle kann durch die große Variabilität und Vielfalt der Hexosetransporter gewährleistet werden (Boles et al., 1997). Wenn Glucose durch die Plasmamembran in die Hefezelle diffundiert, so entstehen im oberen Teil der Glycolyse DHAP und GAP zu äquimolaren Anteilen. Der Großteil von DHAP wird durch eine Triose-phosphat-isomerase in GAP umgewandelt und anschließend zu Pyruvat, dem Endprodukt der Glycolyse, abgebaut.

Die Reduktion von DHAP in G3P erfolgt durch die NAD-abhängige Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH). Die anschließende Dephosphorylierung von G3P wird durch die Glycerin-3-phosphatase (GPP) synthetisiert.

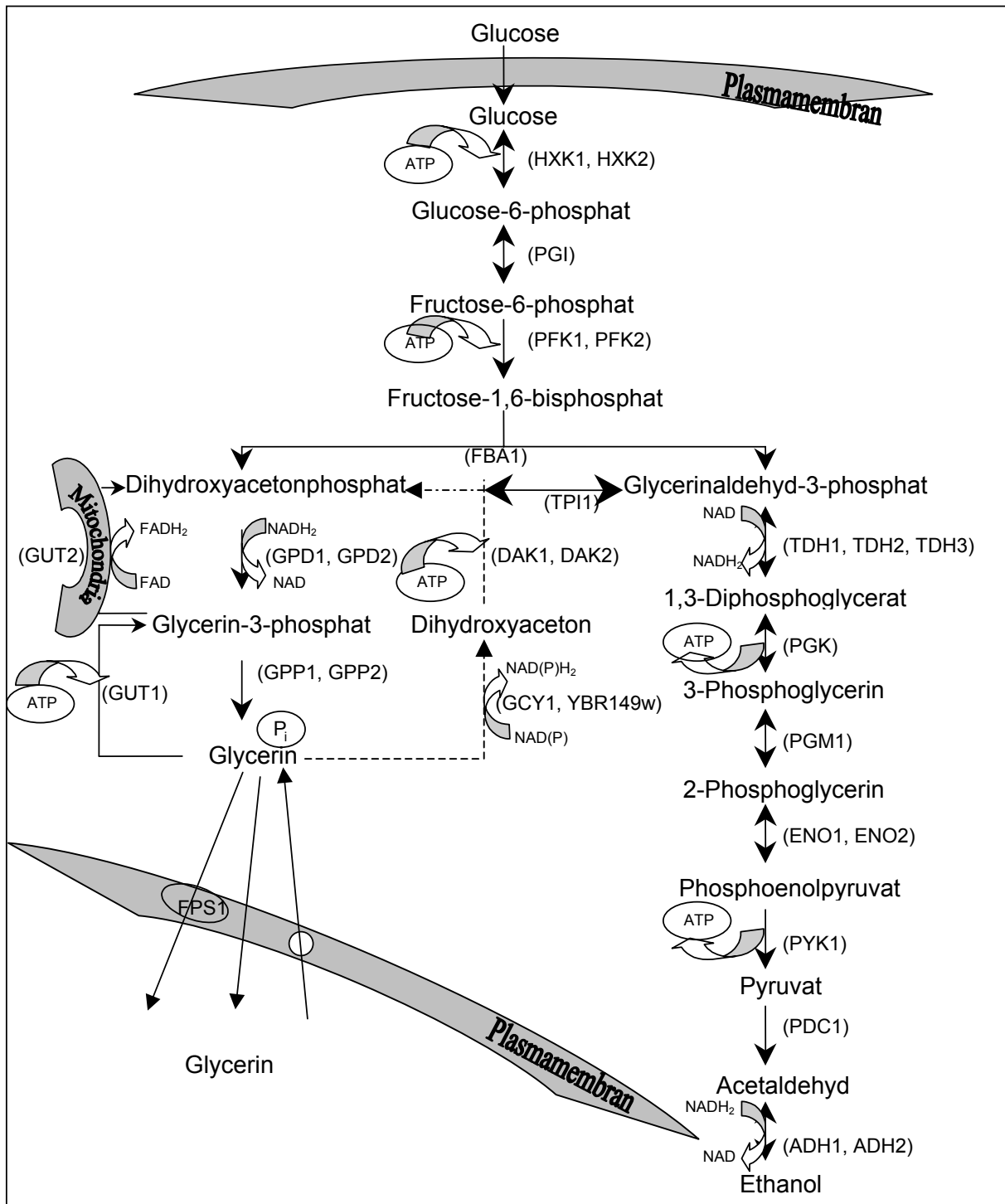


Abb. 2.1.: Glycerin-Metabolismus

2.1.1.1. Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH)

Das Enzym GPDH wird durch die beiden NAD-abhängigen Gene GPD1 bzw. GPD2 codiert. Sie katalysieren die Umwandlung von DHAP in G3P. Die Isoformen besitzen ein Molekulargewicht von 43 kDa und ihr pH-Wert Optimum liegt zwischen 6,8 und

7,6 (Albertyn et al., 1992; Cai et al., 1996; Michnick, 1995). Die Proteine weisen eine 69 %ige Übereinstimmung in ihrer Nukleotidsequenz auf und sind konserviert in der Gruppe der Eukaryonten.

Die Konstante (K_m -Wert) von Gpd1p ist vom jeweiligen Kosubstrat, NADH₂ bzw. DHAP, abhängig. Der K_m -Wert für das Kosubstrat NADH₂ ist 10-fach niedriger als der von DHAP (Gancedo et al., 1968; Nader et al., 1979; Nilsson and Adler, 1990; Albertyn et al., 1992; Michnick, 1995; Cai et al., 1996). Im Hinblick auf die Reaktionsgeschwindigkeit von Gpd1p bedeutet dies, dass die Oxidation von G3P durch NADH₂ nur 3 % der Geschwindigkeit der Reduktion von DHAP entspricht (Albertyn et al., 1992).

Ein weiterer inhibierender Faktor für die Enzym-Aktivität von GPDH ist NAD. Der K_i -Wert von NAD beträgt 0,1 mM (Nilsson and Adler, 1990; Albertyn et al., 1992; Michnick, 1995). Unter Verwendung von 2 %igen Glucosemedien wurden NAD-Konzentrationen von 0,5–1,5 mM analysiert (Gancedo and Gancedo, 1973). Folglich kann NAD zu einer Reduzierung der Enzymaktivität *in vivo* führen.

Weiterhin besitzen die Kofaktoren ATP und FAD eine hemmende Wirkung auf GPDH (Gancedo et al., 1968). Ein ATP mit einer Konzentration von 2,5 mM hemmt die Enzymaktivität um 90 % (Albertyn et al., 1992; Michnick, 1995).

Die (nicht kompetitive) Hemmwirkung von FAD ist mit 4,8 mM bei Albertyn et al. (1992) dokumentiert, wobei FAD bis 0,5 mM einen stimulierenden und oberhalb dieses Grenzwertes einen inaktivierenden Einfluss auf die enzymatische Aktivität besitzt. Bei Untersuchungen mit 2 %igen Glucosemedien konnten Affinitätskonstanten in einem Konzentrationsbereich von 0,6 bis 7,0 mM analysiert werden (Gancedo and Gancedo, 1973). Demnach ist ein Einfluss von FAD auf die Aktivität von GPDH *in vivo* möglich. Für eine Vielzahl weiterer metabolischer Zwischenprodukte konnte ein inhibierender Einfluss auf die Aktivität von GPDH nachgewiesen werden: Glycerin-3-phosphat, Lactat, Pyruvat, Oxalacetat, Glycerin, Acetaldehyd ab 450 mg/l und Ethanol ab 46 g/l (Albertyn et al., 1992; Michnick, 1995). Untersuchungen von Nagodwithana et al. (1977) dokumentierten, dass erst eine Hemmwirkung von Ethanol gegenüber dem Enzym GPDH ab Konzentrationen über 150 g/l beginnt.

Anhand von Messungen an *GPDI*-Stämmen wurde der K_m -Wert für Gpd2p festgelegt (Ansell et al., 1997). Für das Kosubstrat NADH₂ konnte ein K_m -Wert von 18 mM bzw.

für DHAP 0,86 mM ermittelt werden. Im Hinblick auf die Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit von Gpd2p entspricht dies der Interpretation für Gpd1p.

Das Gen *GPD1* ist auf dem Chromosom IV lokalisiert (Larsson et al., 1993) bzw. *GPD2* auf dem Chromosom VII.

Untersuchungen mit *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen unter aeroben Bedingungen bezüglich der Funktion von Gpd2p zeigten, dass eine Deletion von *GPD2* keinen Einfluss auf die Phänotyp-Ausbildung sowie auf die Glycerinsynthese besitzt. Unter den gleichen Versuchsbedingungen können bei einer Inaktivierung von *GPD1* keine phänotypischen Veränderungen fest gestellt werden. Hingegen ist die Glycerinsynthese und dementsprechend die Glycerinkonzentration um 80 % reduziert (Albertyn et al., 1994b). Sind beide Gene entfernt, dann ist die Glycerinbildung vollkommen blockiert, das phänotypische Zellwachstum ist nicht beeinflusst.

Hingegen sind die Hefestämme mit Deletionen von beiden Genen unter anaeroben Bedingungen nicht wachstumsfähig. Dies ist durch das Ungleichgewicht des Redoxpotenzials innerhalb der Zelle begründet (Ansell et al., 1997).

Experimente mit YNB-Media (2 % Glucose) unter aeroben Bedingungen zeigten, dass die Expression von *GPD2* 10-15-fach niedriger als die von *GPD1* ist. Folglich sind die Funktionen der beiden Enzyme unterschiedlich zu interpretieren: *GPD1* wird unter osmotischem Stress verstärkt exprimiert, während *GPD2* hauptsächlich unter anaeroben Bedingungen induziert wird.

2.1.1.2. Glycerin-3-phosphatase (GPP)

Das Enzym Glycerin-3-phosphatase dephosphoryliert G3P zu Glycerin. Das Enzym wird durch die Gene, *GPP1* (oder *RHR2*) und *GPP2* (oder *HOR2*) codiert. Die Gene sind auf dem Chromosom IX respektive dem Chromosom V lokalisiert und besitzen in ihrer Nukleotidsequenz eine 83 %ige Übereinstimmung. Das Molekulargewicht von *GPP1* beträgt 27,8 kDa und das von *GPP2* 30,4 kDa. Der K_m -Wert ist 3-4 mM und das pH-Wert Optimum liegt bei 6,5 (Norbeck et al., 1996).

Die Expression der beiden Gene *GPP1* und *GPP2* ist mit der Aktivierung von GPDH vergleichbar. Unter normalen Wachstumsbedingungen wird Gpp1p exprimiert (Norbeck et al., 1996), hingegen erfolgt die Induktion von *GPP2* bei hyperosmotischem Schock (Norbeck et al., 1996).

2.1.2. Katabolismus

Ist Glucose nicht als C-Quelle für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* im Nährmedium verfügbar, so wird Glycerin veratmet. Die Assimilation von Glycerin ist an die Elektronentransportkette gekoppelt. Glycerin wird durch das Enzym Glycerinkinase phosphoryliert und anschließend zu DHAP durch die GPDH oxidiert. Das gebildete DHAP kann im Stoffwechsel der Zelle weiter als Precursorsubstanz verwertet werden (Gancedo et al., 1968). Die mitochondriale Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase (mtGPDH) ist ein FAD-abhängiges Enzym, das an die innere Membran der Mitochondrien gebunden ist. Die beiden Gene *GUT1* und *GUT2* codieren die mtGPDH (Sleep et al., 1991; Ronnow und Kielland-Brandt, 1993).

Auf Nährböden mit Glycerin als einziger C-Quelle ist die Doppeldeletionen *gut1Δgut2Δ* nicht wachstumsfähig, folglich sind beide Enzyme essenziell für die Assimilation von Glycerin (Ronnow und Kielland-Brandt, 1993). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass glucosehaltige Nährmedien die Promoter-Aktivität von *GUT1* reduzieren, hingegen glycerinhaltige Medien die Aktivität stimulieren (Ronnow und Kielland-Brandt, 1993). Der biochemische Begriff "Glycerin-3-phosphat-Shuttle" bezeichnet die Kopplung von der mtGPDH und der GPDH. Dieses Shuttle-System kann unter aeroben Bedingungen 1 M NADH₂ im Cytoplasma oxidieren und 1 M FAD in der mitochondrialen Membran reduzieren.

2.1.2.1. Alternativer Assimilationsweg

Der alternative Assimilationsweg impliziert eine NADP-abhängige Glycerin-dehydrogenase und eine Dihydroxy-kinase. Bei Untersuchungen mit 2-D-Gelelektrophorese unter osmotischen Stressbedingungen konnten die Proteine Dak1p und Dak2p identifiziert werden. Die beiden Gene codieren das Enzym Dihydroxy-kinase während die Gene *YPR1* und *GCY1* die NADP-abhängige Glycerin-dehydrogenase codieren. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist nach Angaben von Norbeck und Blomberg (1997) *DAK1* stärker exprimiert als *DAK2*.

Die Aktivierungsfaktoren der beiden Enzyme Glycerin-dehydrogenase und Dihydroxy-kinase sind nicht eindeutig geklärt. Unter aeroben Bedingungen belegen die Ergebnisse der *gut1Δgut2Δ*-Doppeldeletionen, dass beide Enzyme nicht induziert werden.

Demnach ist der alternative Assimilationsweg unter spezifischen Bedingungen, u. a. bei osmotischem Stress, aktiviert.

Norbeck und Blomberg (1997) vermuten, dass der alternative Assimilationsweg unter osmotischen Stressbedingungen die Regulation des intrazellulären Glycerin-Pools der Zelle steuert. Eine weitere Hypothese wurde von Godon et al. (1998) diskutiert. Nach Ansicht der Autoren kann unter oxidativen Bedingungen NADP regeneriert werden und anschließend als Kofaktor für die allgemeine Stressantwort (General Stress Response) der Zelle zur Verfügung stehen.

Jüngste Erkenntnisse zeigen eine mögliche Kombination des alternativen Assimilationsweges und des Glycerinsyntheseweges. Diese Kopplung ist gleichbedeutend mit einer Transhydrogenase-Funktion bei der NADH_2 und NADPH_2 in äquimolaren Teilen zu NAD und NADP umgewandelt werden. In Untersuchungen von Anderlund et al. (1999) wurde eine Transhydrogenase-Aktivität (pntA, pntB) von *Escheria coli* in *Saccharomyces cerevisiae* Zellen exprimiert und unter anaeroben Bedingungen getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass bei gleichzeitiger Verminderung der Glycerinsynthese NADH_2 zu NAD oxidiert wird. Weiterhin stellten die Autoren fest, dass bei einer stark exprimierten Transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* die Konzentrationen von 2-Ketoglutarat und von Essigsäure ansteigen, was gleichbedeutend mit einem NADPH_2 -Verbrauch und einer NADH_2 -Produktion ist.

2.1.2.2. Transport

Glycerin kann die cytoplasmatische Membran permittieren (Gancedo et al., 1968) oder als Osmolyt in der Zelle akkumuliert werden (Blomberg and Adler, 1992).

Unter normalen Wachstumsbedingungen diffundiert durch passive Diffusion ein Großteil des synthetisierten Glycerins aus den Zellen und die intrazelluläre Glycerinkonzentration bleibt niedrig (André et al., 1991; Albertyn et al., 1994a). Hingegen erfolgt unter osmotischen Stressbedingungen eine deutliche intrazelluläre Akkumulation von Glycerin.

Folglich wird abhängig von den jeweiligen Wachstumsbedingungen der Glycerintransport der Zelle durch die Permeabilität der Plasmamembran gesteuert (Luyten et al., 1995).

Van Aelst et al. (1991) zeigten, dass die intrazelluläre Akkumulation von Glycerin unter osmotischen Stressbedingungen durch das Membranprotein Fps1p der Hefezelle

gesteuert wird.

Das Protein Fps1p gehört zur Gruppe der MIP (Membran Intrinsic Protein)-Familie, mit über 80 Mitgliedern im Pflanzen-, Tier-, Pilz- und Bakterien-Reich. Die MIP-Channel Proteine in Mikroorganismen transportieren hauptsächlich Polyole. Das Protein Fps1p von *Saccharomyces cerevisiae* und der Glycerintransporter GlpF von *Escherichia coli* besitzen gleich lange N- und C-terminale Enden (van Aelst et al., 1991).

Eine Deletion von *FPS1* in *Saccharomyces cerevisiae* Zellen führt zu einer Veränderung der intra- und extra-zellulären Glycerinkonzentration. Nach Luyten et al. (1995) ist die Funktion von Fps1p hauptsächlich auf den Export von Glycerin aus der Zelle beschränkt. Der Import wird durch dieses Transporterprotein nur in begrenztem Maße gesteuert (Luyten et al., 1995). Unter osmotischen Stressbedingungen sowie bei anaeroben Wachstumsbedingungen ist diese Kontrollfunktion zur Gewährleistung der Zellstabilität von Fps1p essenziell (Sutherland et al., 1997). Weiterhin konnte von den Autoren gezeigt werden, dass Fps1p notwendig für die Durchführung einer Zellfusion ist. Bei der Zellverschmelzung wachsen Hefestämme des α -Typ in Richtung des α -Typ, bis beide Zellmembranen sich berühren. Um eine Zellverschmelzung der beiden entgegengesetzten Hefestamm-Typen durchzuführen, muss eine Degradation der Zellwand erfolgen. Bei Fps1p-Deletionsstamm ist die Zellfusion an diesem Punkt blockiert. Folglich ist die Regulation des intrazellulären Glyceringehaltes durch Fps1p für den Erhalt der Zellintegrität von sehr großer Bedeutung (Hohmann and Mager, 1997; Philipps and Herskowitz, 1997).

Nach den bisherigen Erkenntnissen könnte der Import von Glycerin, unabhängig von *FPS1*, über einen aktiven Protonen-Symport erfolgen. Ein mögliches Gen *GUPI* (YGL084c) ist von Kielland-Brandt (2000) analysiert worden. Nach Angaben der Autoren codiert *GUPI* ein Membranprotein, dass den aktiven Transport von Glycerin in *Saccharomyces cerevisiae* unterstützt.

2.2. Stress der Hefe

Um den Begriff „Stress“ für Mikroorganismen zu beschreiben, sollte zuerst eine stressfreie Situation betrachtet werden. Unter natürlichen Bedingungen gewährleistet eine stressfreie Situation, dass z.B. geringe Veränderungen der Substratverfügbarkeit keinen Einfluss auf die Stoffwechselforgänge von Mikroorganismen ausüben.

Welche Faktoren stellen nun für Hefezellen eine Stresssituation dar? Sind die Wachstumsverhältnisse bei der Kultivierung von Mikroorganismen nicht optimal, führt dies zu Veränderungen der biochemischen Stoffwechselforgänge in den Zellen. Eine Vielzahl von Faktoren wie Nährstoffmangel, Sauerstoffverfügbarkeit, Temperaturniveau, Schwermetallkonzentration, Osmolarität, pH-Wert und DNA-zerstörende Substanzen, können für Hefezellen eine Stresssituation verursachen. Wie reagiert nun die Hefezelle?

Untersuchungen zeigten, dass Hefezellen, die unter moderaten Stressbedingungen kultiviert werden, mehreren Stressfaktoren gegenüber Resistenzeigenschaften entwickeln. Beispiel: Wachsen Zellen in einem Temperaturbereich von 27 °C (moderater Temperaturstress), so ist nach einer anschließenden Hitzeschockbehandlung (bei 37 °C) die Anzahl der überlebenden Zellen höher als bei Hefestämmen, die zuvor unter normalen Bedingungen bei 20 °C gezüchtet wurden. Weiterhin entwickelten die vitalen Zellen nach Hitzeschockbehandlung gegenüber osmotischem- und Hydrogenoxid-Stress Resistenzeigenschaften. Diese Adaptionsmechanismen verdeutlichen, dass die Hefezellen molekulare Mechanismen besitzen, die gegenüber einer Vielzahl von Stressfaktoren aktiviert werden können (Hohmann and Mager, 1997).

Für die Ausbildung von Resistenzeigenschaften und Adaptionsmechanismen ist eine funktionsfähige Plasmamembran essenziell. Die Plasmamembran der Hefezelle ist aus Proteinen und Fetten aufgebaut. Die Lipidbestandteile blockieren die Diffusion von hydrophilen oder geladenen Teilchen. Die Permeabilitätseigenschaften der Plasmamembran wird durch eine große Anzahl von verschiedenen Proteinen gewährleistet.

Diese physiologischen und metabolischen Charakteristika der Hefezellen dienen der Erhaltung von Zell-Integrität und -Stabilität unter kritischen Bedingungen. Ein

besonderer Stressfaktor für die Hefezelle stellt die Kontrolle der Wasserverfügbarkeit dar. Eine Veränderung des extrazellulären Wasserpotenzials verursacht eine Veränderung der Stoffwechselforgänge in den Zellen (Ruis and Schüller, 1995).

Hefezellen sind beispielsweise bei der alkoholischen Gärung zu Beginn von einer 20 %-igen Zuckerlösung und am Ende von einer 10 %-igen Ethanolösung umgeben und die Zellform sowie die Zellaktivität sind während des gesamten Gärprozesses stabil. So besitzen die Mikroorganismen die Möglichkeit, die Veränderungen des extrazellulären Mediums zu erkennen und weiterzuleiten, um intrazelluläre metabolische Stoffwechselforgänge zu steuern (Hohmann and Mager, 1997).

2.2.1. Osmostress

Im Folgenden werden die physiologischen und metabolischen Zellreaktionen unter osmotischem Stress diskutiert.

Die Diffusion von Wassermolekülen durch eine semipermeable Membran wird als Osmose bezeichnet. Bei einer Veränderung der Konzentration auf einer Seite der semipermeablen Membran diffundiert Wasser aus der niedriger konzentrierten Lösung solange in die höher konzentrierte Lösung, bis ein Konzentrationsausgleich auf beiden Seiten erreicht ist. Der Wasserfluss durch eine semipermeable Membran bewegt sich immer in die Richtung der höheren Osmolaritäten. Demnach ist die Osmolarität einer Lösung definiert als die molare Konzentration der gelösten Teilchen (Larsson et al, 1998).

Als Osmoregulation wird der Vorgang der Einstellung eines Gleichgewichts bezeichnet, bei dem Wachstum und Vermehrung von Mikroorganismen gewährleistet ist (Brown and Edgley, 1980). Osmotolerantes Verhalten zeigt die Fähigkeit einer Zelle, sich erhöhter Osmolarität anzupassen. Unter natürlichen Bedingungen ist die Hefezelle einer Vielzahl von gelösten Substanzen ausgesetzt. Für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte Blomberg und Adler (1992) ein osmotisches Potenzial im Cytoplasma von $-1,5$ bis $+2,2$ MPa nachweisen.

2.2.1.1. Zelluläre Reaktion auf osmotischen Stress

Ist eine Zelle osmotischem Stress ausgesetzt, können zwei Adaptionvorgänge beobachtet werden. Zuerst verringert sich innerhalb von 1-2 Minuten das Zellvolumen und anschließend erfolgt eine Akkumulation von osmotisch aktiven Substanzen. Diese verschiedenen Veränderungen der Stoffwechselfvorgänge gewährleisten die Zellstabilität der Mikroorganismen (Norbeck, 1996).

Bei einer Erhöhung der Osmolarität durch den Zusatz löslicher Substanz zum Nährmedium beobachtet man die Plasmolyse der Zelle. Das Volumen der Zelle verringert sich innerhalb einer Minute um 45 % bis 53 % des Ausgangsvolumens (Nishino et al., 1985; Meikle et al., 1988). Demnach gewährleistet die Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* eine sehr hohe Wasserpermeabilität (de Maronon et al., 1997), wodurch auch die Existenz von spezifischen Aquaporinen für den Wassertransport der Hefe belegt wird.

Einhergehend mit der Volumenverringering der Zelle reduziert sich das Volumen der Vakuole. Nach Latterich und Watson (1993) ist eine intakte Vakuole essenziell für ein Überleben der Zelle unter osmotischen Bedingungen. Neben den aufgelisteten Zellveränderungen konnte eine Veränderung der Actin-Zusammensetzung festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die Zelle ihre Polarität verliert (Chowdbury et al., 1992) und der Transport und die Synthese von Proteinen sowie eine Vielzahl von enzymatischen Reaktionen durch die Aufkonzentrierung des cytoplasmatischen Inhaltes verändert wurde (Valera et al., 1992). Ist die osmotische Stresssituation durch eine Substanz verursacht, die die Plasmamembran leicht durchdringt und intrazellulär akkumuliert wird, kann dies zu toxischen Schädigungen der Zelle führen (Singh and Norton, 1991; Chodburry et al., 1992).

2.2.1.2. Akkumulation von Ausgleichssubstanzen („compatible solute“)

Nachdem eine Adaption der Zelle an die niedrigere Wasseraktivität der Umgebung zur Aufrechterhaltung des Zellinnendruckes erfolgt ist, beginnt die Akkumulation von kompatiblen, osmotisch aktiven Substanzen. Für die Gewährleistung des Zellwachstums ist die Wiederherstellung des intrazellulären osmotischen Zelldruckes notwendig. Die

Rückführung des Volumens der Zelle in die Ausgangsgröße erfolgt innerhalb von 2 Stunden nach einem osmotischen Schock (Brown and Edgley, 1980). Der Begriff „Ausgleichssubstanz“ charakterisiert Ionen oder Moleküle, die osmotisch aktiv sind, aber eine Akkumulation dieser Stoffe beeinträchtigen nicht die intrazellulären Stoffwechselforgänge. Hefen akkumulieren hauptsächlich Polyole. Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte nur Glycerin als maßgebende Ausgleichssubstanz festgestellt werden (Brown and Edgley, 1980; Blomberg and Adler, 1992; Meikle et al., 1988). Durch die Bildung von Glycerin kann das osmotische Potenzial der Zelle bis zu 95 % den externen osmotischen Druck ausgleichen. Weiterhin können durch den "Osmoprotektor" Glycerin gelöste Proteine stabilisiert und osmosensitive Zellfunktionen innerhalb der Zelle geschützt werden. Neben Glycerin wird Trehalose als weitere osmotisch aktive Substanz von der Zelle synthetisiert. Im Vergleich zu den synthetisierten Glycerinkonzentrationen wird ca. 20 % Trehalose gebildet. Demnach wird die interne Osmolarität der Zelle nur in geringem Maße durch die Trehalosesynthese stabilisiert (André et al., 1991).

Die Kontrolle über die Akkumulation von Glycerin ist auf drei verschiedenen Ebenen vorstellbar: 1.) Kontrolle der Synthese; 2.) Kontrolle der Aufnahmekapazität aus dem extrazellulären Medium und 3.) Kontrolle des Glycerin-Exports aus der Zelle. Die verschiedenen Möglichkeiten sind weitestgehend abhängig von hefespezifischen Eigenschaften. Ein Beispiel ist die osmotolerante *Zygosaccharomyces rouxii*, sie weist das gleiche Glycerinbildungspotenzial auf wie *Saccharomyces cerevisiae*. Hingegen ist die Kontrolle der Permeabilität der Plasmamembran verändert (Brown et al., 1986; van Zyl et al., 1991). *Zygosaccharomyces rouxii* besitzt ein aktives Symport-Aufnahmesystem für Glycerin mit einer sehr hohen Effizienz bei hohen Konzentrationsgradienten entlang der Plasmamembran. *Saccharomyces cerevisiae* kontrolliert die Akkumulation von Glycerin hauptsächlich über den Syntheseweg und den Exportmechanismus der Substanz (Blomberg and Adler, 1989; André et al., 1991; Luyten et al., 1995).

2.2.2. Osmoregulation

Zellen der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* können bei steigender extrazellulärer Osmolarität intrazellulär bis zu 1 M Glycerin anreichern (Blomberg and Adler, 1992). Dieser physiologische Reaktionsmechanismus der Zelle ist seit längerer Zeit bewiesen. Hingegen ist die Regulation des Glycerinsyntheseweges auf der molekularbiologischen Grundlage erst in den letzten Jahren näher untersucht worden. Experimentelle Untersuchungen über die Signalübertragungswege sind z. Zt. Gegenstand der Forschung (Hohmann, 2000).

2.2.2.1. Einfluss auf die Glycerinsynthese

2.2.2.1.1. Induktion der Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH) Synthese

Unter osmotischen Stressbedingungen konnte eine positive Korrelation zwischen der Glycerinbildung und der Konzentration des Enzyms GPDH festgestellt werden (Blomberg and Adler, 1989; André et al., 1991). Bei einer einmaligen Exposition von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen in 0,7 M NaCl-Lösung wurde die Glycerinbildung verdoppelt und die Aktivität von GPDH um den Faktor 6 gesteigert. Zellen, die höherer Osmolarität (1,7 M NaCl) ausgesetzt wurden, steigerten die GPDH-Aktivität um den Faktor 30 (Edgley and Brown, 1983). Es zeigte sich, dass die Steigerung der GPDH-Aktivität nicht durch Stressinduzierung von NaCl, sondern aufgrund des osmotischen Druckes erfolgte (Albertyn et al., 1994a). Mehrere Untersuchungen beweisen, dass die vermehrte Bildung von GPDH auf einer erhöhten Stimulation der *GPD1*-Transkription basiert (Albertyn et al., 1994a; Eriksson et al., 1995; Hirayama et al., 1995; Ansell et al., 1997). Die Aktivität von *GPD1* auf Transkriptionsebene weist einen linearen Kurvenverlauf zur Glycerinsynthese auf (Eriksson et al., 1995). Deletionsstämme *gpd1Δ* zeigten eine begrenzte Wachstumsfähigkeit bei erhöhter Osmolarität auf, wobei *GPD2* diese physiologischen Störungen kompensieren konnte (Larsson et al., 1993; Albertyn et al., 1994b; Ansell et al., 1997). Im Gegensatz zu *gpd2Δ*-Deletionen, die unter anaeroben Bedingungen schlecht wuchsen, konnten bei den *gpd1Δ*-Deletionen keine Wachstumsveränderungen festgestellt werden. Die Doppeldeletionen *gpd1Δgpd2Δ* sind extrem sensitiv gegenüber osmotischem Stress und wuchsen nicht auf

synthetischen Minimalmedien unter anaeroben Bedingungen (Ansell et al., 1997). Diese Untersuchungsergebnisse verdeutlichen, dass *GPD1* und *GPD2* bezüglich der Osmoregulation und der Redoxbalance der Zelle unterschiedliche Funktionen besitzen (Bjorkquist et al., 1997).

2.2.2.1.2. Induktion der Glycerin-3-phosphatase (GPP) Synthese

Eine Induktion von Glycerin-3-phosphatase (GPP) konnte unter osmotischem Stress festgestellt werden (Hirayama et al., 1995; Norbeck et al., 1996; Norbeck and Blomberg, 1997). Die Aktivität von GPP in einer 0,7 M NaCl-Lösung ist zweifach höher als die Aktivität unter Normalbedingungen. Weiterhin zeigte sich, dass die Transkription aufgrund einer erhöhten Stimulation von *GPP2* und nicht von *GPP1* induziert wurde (Norbeck and Blomberg, 1997).

Eine Vielzahl weiterer Enzymaktivitäten ist neben der Induktion von *GDP* und *GPP* durch osmotischen Stress verändert. Diese Veränderungen dienen sehr wahrscheinlich der Reorganisation des C-Flusses in Richtung der Glycerinsynthese. Die Synthese von ca. 200 Proteinen konnte unter osmotischen Stressbedingungen (1,4 M NaCl) beobachtet werden, von denen 73 Proteine eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 3 aufwiesen (Blomberg, 1995; Norbeck and Blomberg, 1997). Nicht mit in Betracht genommen sind jene die über den HOG (High Osmolarity Glycerol Response Pathway)-Weg reguliert werden.

2.2.3. Akkumulation von Glycerin

Zellen, die unter osmotischen Stressbedingungen kultiviert wurden, akkumulierten in hohem Maße Glycerin (Edgley and Brown, 1983; Blomberg and Adler, 1989). Werden die gestressten Zellen anschließend in stressfreies Medium überführt, dann wird das intrazellulär akkumulierte Glycerin aus der Zelle exportiert.

Untersuchungen mit *fps1*Δ-Deletionen zeigten, dass die Stämme osmosensitiv reagierten (Philipps and Herskowitz, 1997). Deletionsstämme von *FPS1*, getestet unter normalen Wachstumsbedingungen, konnten eine erhöhte intrazelluläre und eine verringerte externe Glycerinkonzentration aufweisen. Die Exposition der

Deletionsstämme in ein osmotisches Medium zeigte einen schleppenden Export von Glycerin aus der Zelle. Demnach ist unter osmotischem Stress Fps1p reversibel aktiv (Luyten et al., 1995). Unter osmotischen Bedingungen blockiert Fps1p innerhalb 1-2 Minuten den Export von Glycerin, so dass eine Akkumulation von Glycerin erfolgt (Tamas et al., 1999).

Der funktionale Bereich für diese Schließfunktion scheint im N-terminalen Bereich des Fps1p codierenden Gens zu sein (Tamas et al., 1999). Untersuchungen zeigten, dass die Deletion dieser Regionen die Regulation des Fps1p-Protein unter osmotischem Schock vermindern. Diese Deletionsstämme konnten nach einem osmotischen Schock nicht länger als 3 h Glycerin akkumulieren und die Zellintegrität gewährleisten.

2.2.3.1. Eintritt von Glycerin

In *Saccharomyces cerevisiae* zeigte sich, dass die Aufnahme von Glycerin in die Zelle nicht von Fps1p beeinflusst wird. Nach Kielland-Brandt (2000) stellt ein aktiver Protonen-Symport durch Gup1p unter osmotischen Bedingungen einen möglichen Regulationsmechanismus dar.

2.2.4. Signaltransduktion

Werden Hefezellen in einem hyperosmotischen Medium ausgesetzt, dann bricht der Konzentrationsgradient entlang der Zellmembran zusammen, das Zellwachstum stoppt, die Konzentration des Actin-Cytoskeletts reduziert sich, die Proteinsynthese wird vermindert und die Konzentration von intrazellulären Makromolekülen steigt an (Gustin et al., 1998). Ein Großteil dieser Regulationsmechanismen wird bei steigender Osmolarität durch den HOG-Weg kontrolliert (Brewster et al., 1993; Davenport et al., 1995).

Der HOG-Signaltransduktionsweg gehört zu der Gruppe der MAP (Mitogen Activated Protein) Kinase Wege und ist aus einer Kaskade von drei Protein-Kinasen aufgebaut (Posas et al., 1996; Jakoby et al., 1997): einer MAP-Kinase (MAPK) codiert durch *HOG1*, einer MAP Kinase Kinase (MAPKK) codiert durch *PBS2* und einer MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) codiert durch *SSK2* und *SSK22* (Abb. 2.2.). Zwei Transmembrane Proteine Sln1p und Sho1p übernehmen die Funktion der

Osmosensoren. Bei geringer Osmolarität ist Sln1p autophosphoryliert und die Phosphatgruppe wird über Ypd1p nach Ssk1p übertragen. Liegt Ssk1p in der phosphorylierten Form vor, wird der HOG-Weg nicht stimuliert. Bei einer Veränderung der extrazellulären Osmolarität wird Sln1p inaktiviert, folglich das Protein Ssk1p dephosphoryliert und somit die nachfolgenden MAP Kinase Kaskade aktiviert. Der zweite Osmosensor Sho1p aktiviert über den gleichen Mechanismus wie Sln1p, das Protein Ste11p und anschließend die MAPKK Pbs2p.

Beide Osmosensoren aktivieren den HOG-Weg über die MAPKK Pbs2p. Bei geringer extrazellulärer Osmolarität ist die Signalübertragung über den Weg Sln1p/Pbs2p langsamer als über den Sho1p/Pbs2p-Weg. Die Bedeutung dieser unterschiedlichen funktionalen Übertragungswege ist nicht geklärt.

Hingegen beeinflussen die Transkriptionsfaktoren MSN2 und MSN4 die Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene. Die Transkriptionsfaktoren MSN2 und MSN4 sind für die Transkription von einer Vielzahl von Genen mit stressprotektiven Funktionen notwendig. Unter normalen Wachstumsbedingungen ist die Menge an gebildetem MSN2 und MSN4 im Cytosol gering. Hingegen in einer Stresssituation steigt der Gehalt von existierenden Transkriptionsfaktoren sehr schnell an und wird vom Cytosol in den Nukleus transferiert. Demnach ist der begrenzende Faktor der Regulation des HOG-Weges sehr wahrscheinlich die aktive Translokation von MSN2 und MSN4 (Schüller et al., 1994).

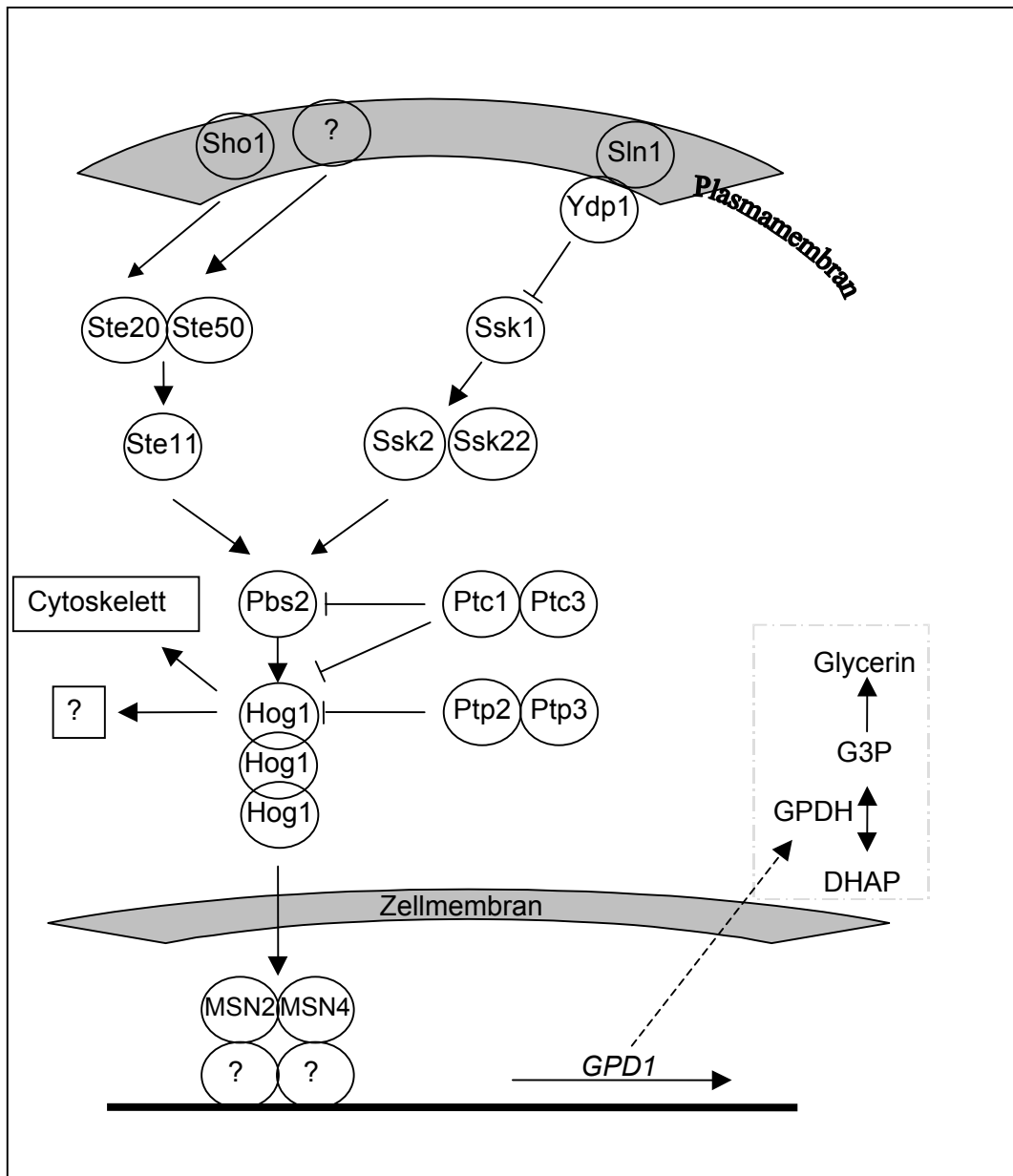


Abb. 2.2.: Der HOG-Weg in *Saccharomyces cerevisiae*

- Bemerkungen. —▶ = Aktivierung
 —| = Hemmung
 - - - -▶ = Codierung

Es ist gesichert, dass der HOG-Signaltransduktionsweg die Regulation von *GPD1* kontrolliert. Weiterhin zeigten Untersuchungen, dass eine Aktivierung von GPDH bei osmotischem Stress unter Verwendung von nicht fermentierbaren C-Quellen erfolgt. Bei oxidativem Stress und Diauxie ist die Proteinsynthese ebenfalls induziert (Godon et al., 1998; Boy Marcotte et al., 1998). Neben der Induktion von *GPD1* reguliert der

HOG-Weg eine Vielzahl weiterer Expressionen: *GPP2*, *HXT1*, *ALD6*, *GCY1* und *DAK1* (Hirayama et al., 1995; Norbeck et al., 1996; Akhtar et al., 1997).

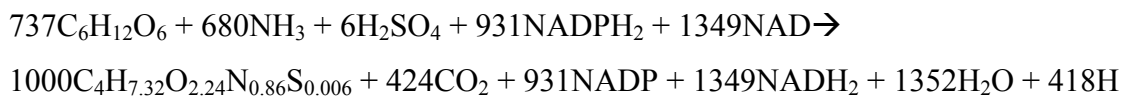
Unter oxidativen Stressbedingungen ist die Glycerinsynthese durch eine erhöhte Synthese von Gpd1p und Gpp2p stimuliert und gleichzeitig die Glycerinassimilation über Dak1p und YBR149w angeregt. Die glycolytischen Proteine Adh1p, Eno1p und Pdc1p wurden unter diesen Bedingungen nicht induziert. Demnach sind die Veränderungen der metabolischen Stoffwechselwege zur Regeneration von NADPH₂ notwendig, um eine oxidative Stressantwort der Zelle zu ermöglichen (Godon et al., 1998).

2.3. Glycerin und das Redoxpotenzial der Zelle

2.3.1. Die Redoxpaare NAD/NADH₂ und NADP/NADPH₂

Eine Voraussetzung für die Gewährleistung von metabolischen Stoffwechselfvorgängen in *Saccharomyces cerevisiae* Zellen ist die Regulation des intrazellulären Redoxpotenzials. Die Redoxbalance in der Zelle erfolgt durch die Redoxpaare NAD/NADH₂ und NADP/NADPH₂. Sie besitzen genau definierte Funktionen. Für katabolische Reaktionen ist das Redoxverhältnis zwischen NAD und NADH₂ und bei anabolischen Reaktionsabläufen ist die Gleichgewichtseinstellung von NADP zu NADPH₂ maßgebend (Lagunas and Gancedo, 1973; van Dijken and Scheffers, 1986; de Vries and Marres, 1987).

Anhand der nachfolgenden Gleichung für die Bildung von 100 g Hefebiomasse unter aeroben Bedingungen auf Glucose- und Ammonium-Medium wird die Bedeutung des intrazellulären Redoxpotenzials der Zelle aufgezeigt (van Dijken and Scheffers, 1986):



Es zeigte sich, dass 1349 mM NADH₂ und 931 mM NADP bei der Produktion von 100g Biomasse gebildet werden, jedoch 418 mM H-Äquivalente benötigt werden, um die Redoxbalance der NAD/NADH₂ zu gewährleisten. Demnach ist für das Überleben und das Wachstum der Zellen die Gleichgewichtseinstellung der Redoxpaare bedeutend. In den Hefezellen sind die Redoxreaktionen in verschiedene Zellkompartimente unterteilt. Die einzelnen Zellkompartimente sind durch semipermeable Membrane getrennt, wie z.B. die innere Membran der Mitochondrien, die für die oxidierte Form der Kofaktoren NAD und NADP undurchlässig ist.

Ein Redoxpaar reguliert die Gleichgewichtseinstellung des freien Redoxpotenzials eines definierten Zellkompartimentes. Die Übertragbarkeit der Redoxäquivalente zwischen den Kompartimenten erfolgt durch die gebildeten Substanzen des Zellstoffwechsels.

Während bei anabolischen Stoffwechselfvorgängen die Oxidation von NADPH₂ im Cytoplasma erfolgt, ist die Bildung von NADH₂ in den Mitochondrien der Zelle lokalisiert. Die Bildung des Kofaktors NADPH₂ erfolgt durch den cytoplasmatischen Abbau von Hexosemonophosphaten. Dieser Abbauweg repräsentiert 2,5-34 % des

gesamten C-Metabolismus der Biomassenbildung der Zelle (Lagunas and Gancedo, 1973; van Dijken and Scheffers., 1986).

Eine Besonderheit konnte von Norbeck und Blomberg (1997) festgestellt werden, sie vermuten eine mögliche Kombination des Glycerinsyntheseweges mit dem alternativen Assimilationsweg für Glycerin. Dies könnte ein Hinweis auf die Existenz einer Transhydrogenase-Funktion in der Hefezelle *Saccharomyces cerevisiae* sein.

Damit stellt sich die Frage, welche Möglichkeiten besitzen Hefezellen, die intrazelluläre Redoxbalance unter verschiedenen physiologischen Bedingungen zu gewährleisten?

2.3.2. Redoxgleichgewicht unter anaeroben Verhältnissen

Das Redoxpotenzial der Hefezelle unter anaeroben Bedingungen wird hauptsächlich durch das cytosolische Redoxpaar NAD/NADH₂ bestimmt. Zur Gewährleistung des intrazellulären Redoxpotenzials unter anaeroben Bedingungen sind die Ethanol- und Glycerin-Synthesen wichtige Ausgleichsreaktionen (Oura, 1977; Sigler et al., 1980; van Dijken and Scheffers, 1986). Bei der Umwandlung von Glucose in Ethanol und Kohlendioxid wird ATP, ein redox-neutrales Molekül, produziert. Die gebildeten Äquivalente des Kofaktors NADH₂ aus der Glycolyse werden durch die GPDH und die Alkohol-dehydrogenase (ADH) zu NAD oxidiert. Folglich wird der NAD(P)H₂-Überschuss aus der Biomassenproduktion und der Biosynthese von sekundären Gärungsprodukten durch die Synthese von Ethanol und von Glycerin ausgeglichen. Die Glycerinbildung wird auch als "Redoxventil-Reaktion" zur Gewährleistung des Redoxpotenzials der Zelle charakterisiert. Die Bedeutung der Glycerinbildung wurde in zahlreichen Untersuchungen belegt:

- ◆ Bei Untersuchungen unter anaeroben Bedingungen mit Zugabe von Bisulfit zu Hefezellen konnte eine erhöhte Glycerinproduktion festgestellt werden. Dies zeigt, dass die Reduktion in der Glycolyse gebildeten NADH₂ nicht durch den Reduktionsschritt Acetaldehyd-Ethanol erfolgte. Um dennoch das Redoxpotenzial innerhalb der Zelle zu gewährleisten, wurde durch die Glycerinsynthese der Überschuss an NADH₂ oxidiert (Bisping and Rehm, 1982). Dementsprechend wurde durch Zugaben von Aldehyden oder Ketonen eine Reduzierung der Glycerinbildung festgestellt.
- ◆ Ergebnisse aus Gärversuchen zeigen, dass die Glycerinbildung unter anaeroben Bedingungen höher ist als unter aeroben Bedingungen, da bei aeroben Verhältnissen

andere Zellmechanismen die Redoxbalance der Zelle gewährleisten (Oura, 1977). Bei einem Transfer von Hefezellen von aeroben in anaeroben Bedingungen konnte eine verstärkte Glycerinbildung nachgewiesen werden (Bjorkqvist et al., 1997).

- ◆ Beim Wachstum von Hefezellen auf nährstoff- und aminosäuren-armen Medien ist eine Reduzierung der Glycerinbildung feststellbar (Lagunas and Gancedo, 1973). Untersuchungen zeigen, dass eine Erhöhung der Glycerinbildung bis zu 50 % erfolgt, wenn anstatt eines Gemisches aus 20 essentiellen Aminosäuren Ammonium als einzige N-Quelle eingesetzt wird (Albers et al., 1996).

2.3.2.1. Glycerinbildung

Unter anaeroben Bedingungen können die Doppeldeletionen *gpd1Δgpd2Δ* nicht wachsen, jedoch wird diese Wachstumshemmung durch die Zugabe von Acetaldehyd oder Acetoin aufgehoben. Die Oxidation von NADH₂ durch die Bildungsreaktionen von Ethanol oder 2,3-Butandiol verdeutlicht die Bedeutung des Glycerin-Redoxventil-Systems für die Zelle (Bjorkqvist et al., 1997).

Es konnte gezeigt werden, dass *GPD2* unter anaeroben Bedingungen bei der Glycerinbildung eine besondere Funktion übernimmt (Bjorkqvist et al., 1997; Ansell et al., 1997). Hefezellen mit Deletion von *GPD2* können unter anaeroben Bedingungen in Minimalmedien sehr schlecht wachsen. Weiterhin ist im Vergleich zum Wildtyp-Stamm die Glycerinbildung um 25 % reduziert. Hingegen zeigten Stämme mit Deletionen von *GPD1* unter denselben Bedingungen keine physiologischen Veränderungen auf (Bjorkqvist et al., 1997; Ansell et al., 1997).

Zusätzlich konnte unter anaeroben Bedingungen eine Verdoppelung der Induktion von *GPD2* nachgewiesen werden (Ansell et al., 1997). Ansell et al. (1997) zeigten experimentell, dass die Induktion von *GPD2* unabhängig von *ROX1* und *ROX3* und vom HOG-Weg ist (Ansell et al., 1997). Dies bedeutet, dass in der Hefezelle *Saccharomyces cerevisiae* andere Regulationsmechanismen diese Genexpression steuern. Neuere Untersuchungen unter anaeroben Bedingungen von Sertil et al. (1997) belegen eine Induktion von *DAN1* und weisen auf einen möglichen Zusammenhang als Regulationsmechanismus u.a. für *GPD2* hin. Untersuchungen über die Genexpression von *GPD2* unter Zugabe von Bisulfit zeigten eine verstärkte Glycerinbildung und bei Additionen von Acetaldehyd eine Reduzierung der Glycerinsynthese.

2.3.2.2. Weitere Fermentationsprodukte

Neben der Glycerinsynthese sind andere biosynthetische Stoffwechselfvorgänge, wie die Synthesereaktionen von Acetaldehyd, Acetat, Succinat, Acetoin und 2,3-Butandiol für die Redoxbalance der Zelle von Bedeutung.

In der nachfolgenden Tabelle werden die wichtigsten Redoxbilanz-Reaktionen aufgelistet:

Tab. 2.1.: Redoxbilanz verschiedener Fermentationsprodukte (Wachstum auf glucosehaltigen Medien)

<u>Ethanol:</u>	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_6O + 2CO_2$
<u>Glycerin:</u>	$C_6H_{12}O_6 + 2NADH_2 \rightarrow 2C_3H_8O_3 + 2NAD$
<u>Acetaldehyd:</u>	$C_6H_{12}O_6 + 2NAD \rightarrow 2C_2H_4O + 2CO_2 + 2NADH_2$
<u>Acetat:</u>	$C_6H_{12}O_6 + 4NAD + 2H_2O \rightarrow 2C_2H_4O_2 + 2CO_2 + 4NADH_2$
<u>2,3-Butandiol:</u>	$C_6H_{12}O_6 + NAD \rightarrow C_4H_6O_5 + 2CO_2 + NADH_2$
<u>Malat:</u>	$C_6H_{12}O_6 + 2CO_2 \rightarrow 2C_4H_6O_5$
<u>„oxidativer Weg“</u>	
<u>Succinat:</u>	$C_6H_{12}O_6 + 5NAD + 2H_2O \rightarrow C_4H_6O_4 + 2CO_2 + 5NADH_2$
<u>„reduktiver Weg“</u>	
<u>Succinat:</u>	$C_6H_{12}O_6 + 2CO_2 + 2FADH_2 \rightarrow 2C_4H_6O_4 + 2FAD + 2H_2O$

2.3.2.2.1. Acetaldehyd

Acetaldehyd entsteht durch Decarboxylierung von Pyruvat. Der Decarboxylierungsschritt wird durch das Enzym Pyruvat-decarboxylase (PDC) katalysiert (Neuberg and Reinfurth, 1918). Für die Synthese von Acetaldehyd werden 1 M Glucose und 2 M des Oxidationsmittels NAD benötigt. Die PDC-Induktion wird durch *PDC1*, *PDC2*, *PDC5* und *PDC6* gesteuert (Schmitt and Zimmermann, 1982; Schmitt et al., 1983; Seeboth et al., 1990; Hohmann, 1991; Hohmann, 1993).

2.3.2.2.2. Acetat

Die Biosynthese von Acetat erfordert einen Redoxausgleich über das Redoxpaar NADP und NADPH₂. Ausgehend von 1 M Glucose wird durch die Aldehyd-dehydrogenase (ALDH) ein 1 M Acetat und 2 M NADPH₂ synthetisiert. Für *Saccharomyces cerevisiae* sind zwei ALDH dokumentiert.

- ◆ Steinman und Jakoby (1968) beschrieben die mitochondriale Isoform der ALDH. Das Enzym wird kompetitiv durch das Endprodukt Acetat gehemmt und benötigt Kalium als Kofaktor (Tamaki et al., 1977; Bostain and Betts, 1978a; Bostain and Betts, 1978b; Saigal et al., 1991). Beide Kofaktoren NAD und NADP können von diesem Enzym verwendet werden (Jakobson and Bernofsky, 1974; Tamaki et al., 1977; Wang et al., 1997). Unter anaeroben Verhältnissen ist die Proteinsynthese reprimiert (Lorente and de Castro, 1977). Die mitochondriale ALDH-Isoform ist durch das Gen *ALD7* (YER073w) codiert (Tessier et al., 1998; Wang et al. 1998).
- ◆ Die cytosolische Isoform der NADP-abhängigen Aldehyd-dehydrogenase wurde von Seegmiller (1953) und Jakobson und Bernofsky (1974) identifiziert. Die Autoren Wang et al. (1997) konnten nachweisen, dass die Affinität dieses Enzyms für NADP 170-fach höher ist als für NAD. Die cytoplasmatische Isoform wird durch *ALD6* codiert (Meaden et al., 1997).

2.3.2.2.3. Succinat

Die Succinat-Synthese kann durch zwei biochemische Wege erfolgen. Den „oxidativen Weg“ über α -Ketoglutarat katalysiert durch die α -Ketoglutarat-dehydrogenase und die Succinyl-CoA-synthase des Citronensäurezyklus, wobei α -Ketoglutarat via Glutamat oder via Pyruvat synthetisiert werden kann. Der „reduktive Weg“ ist gekennzeichnet durch die Umwandlung von Oxalacetat oder Aspartat in Succinat katalysiert durch Malat-dehydrogenase, Fumarase und Fumarat-reduktase. Die weiterführende Umwandlung von Succinat in Fumarat erfolgt durch eine FAD-abhängige Succinat-dehydrogenase. Diese Reaktion ist irreversibel. Hingegen wird die reversible Reduktion von Fumarat in Succinat durch eine FAD-unabhängige Fumarat-reduktase katalysiert.

Nach dem „oxidativen Weg“ werden für die Synthese von 1 M Succinat 5 M des Kofaktors NADH₂ oder NADPH₂ benötigt. Dies steht im Gegensatz zum „reduktiven Weg“, bei dem aus 1 M Glucose 2 M Succinat und 2 M des Kofaktors FAD synthetisiert werden.

Da ein Teil dieser Enzyme in den Mitochondrien lokalisiert ist und andere biochemische Vorgänge durch cytoplasmatische oder peroxysomale Enzyme synthetisiert werden, ist eine genaue Einteilung der jeweiligen Enzym-Funktionen sowie -Aktivitäten sehr schwierig.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, welcher Bildungsweg für Succinat unter Fermentationsbedingungen maßgebend ist. In der Literatur wird bei anaeroben Verhältnissen bevorzugt der „oxidative Weg“ diskutiert. Die Argumentation für diesen Syntheseweg läuft darauf hinaus, dass die Summe der Redoxgleichungen der Synthesereaktionen von Ethanol, CO₂, Glycerin, Acetat und Succinat die Redoxbalance in der Zelle gewährleisten (Nordström, 1968; Oura, 1977). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass unter anaeroben Bedingungen α -Ketoglutarat-dehydrogenase und Succinyl-CoA-synthase aktiviert wurden (Lupianez et al., 1974; Machado et al., 1975; Muratsubaki, 1987).

Diese gesteigerten Enzymaktivitäten konnten auch nachgewiesen werden, wenn Hefezellen auf Nährmedien mit Glutamat und α -Ketoglutarat als einzige N-Quelle kultiviert wurden (Heere and Radler, 1978; Schwartz et al., 1983; Albers et al., 1998). Diese Beobachtungen belegen, dass die Bildung von Succinat via α -Ketoglutarat von Glutamat aus verläuft. Neuere Untersuchungen bestätigen, dass Succinat ausgehend von Glutamat über den „oxidativen Weg“ mit teilweiser Einbindung des Citronensäurezyklus gebildet werden kann, jedoch konnte keine Bildung von Succinat über den „oxidativen Weg“ nachgewiesen werden, wenn den Hefezellen andere N-Quellen als Glutamat zur Verfügung standen.

Chapman und Barley (1968) wiesen auf die Möglichkeit des reduktiven Bildungsweges für Succinat unter anaeroben Bedingungen hin. Die cytoplasmatische Fumarase und Fumarat-reduktase sind unter anaeroben Bedingungen aktiviert (Muratsubaki und Katsume, 1982). Untersuchungen mit Stämmen mit überexprimierter cytoplasmatischer Malat-dehydrogenase konnten die Aktivität des reduktiven Bildungsweges unter anaeroben Verhältnissen nachweisen (Pines et al., 1997). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist

noch ungeklärt, warum durch die Inaktivierung von Fumarase (Magarifuchi et al., 1995) eine erhöhte Produktion von Fumarat und eine Reduktion von Succinat stattfindet. Eine bedeutende Rolle der mitochondrialen Fumarat-reduktase bezüglich des Redoxpotenzials in der Zelle konnte von Arikawa et al. (1998) festgestellt werden. Demnach wird Fumarat als Elektronenakzeptor unter anaeroben Bedingungen durch Fumarat-reduktase gebildet. Die Fumarat-reduktase ist durch eine cytoplasmatische und mitochondriale Isoform codiert und beide zeigen strukturelle Übereinstimmungen mit der Succinat-dehydrogenase auf. Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht die Elektronenübertragungsmöglichkeiten unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen.

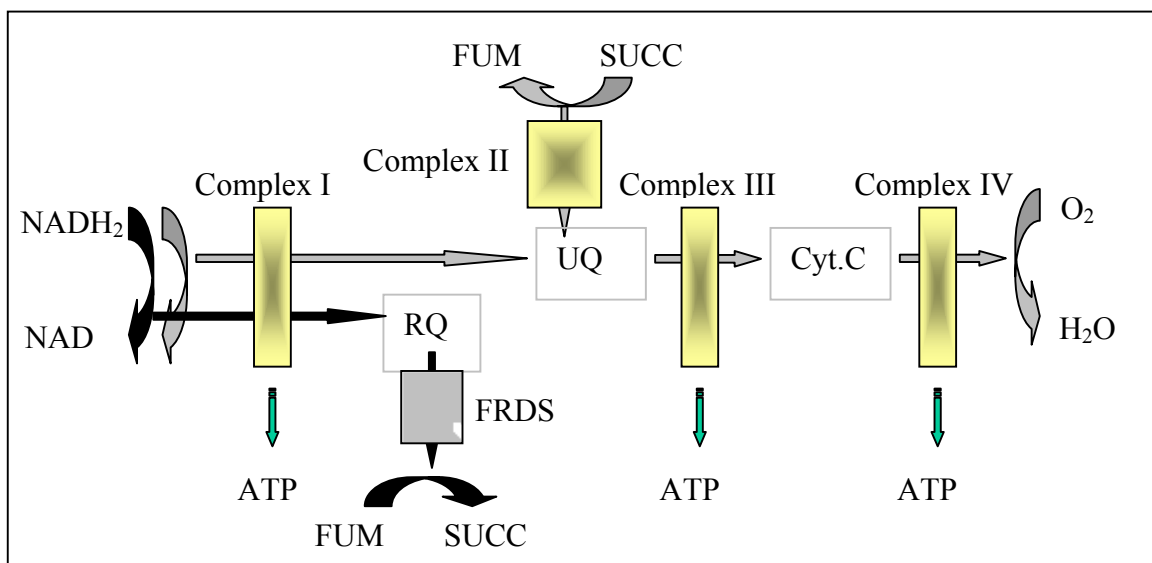


Abb. 2.3.: Elektronenübertragung unter anaeroben und aeroben Bedingungen

Bemerkungen: **→** = anaerobe Bedingungen;

→ = aerobe Bedingungen

Complex I, II, III, IV der Elektronentransportkette; Cyt.C = Cytochrom C;
FRDS = Fumarat-reduktase; FUM = Fumarat; SUCC = Succinat;
RQ = Rhoquoine; UB = Ubiquinon

Unter anaeroben Bedingungen sind die Komplexe II, III und IV inaktiviert, da Sauerstoff nicht als Elektronenakzeptor vorhanden ist. Die Elektronenübertragung erfolgt durch die Oxidation von NADH₂ zu NAD im Complex I durch die Phosphorylierung von ADP zu ATP via Rhoquoine zur Fumarat-reduktase (Tielens and van Hellemond, 1998). Untersuchungen von Stämmen mit Deletionen von Fumarat-reduktase unter anaeroben Bedingungen wiesen keine Wachstumsstörungen auf.

Folglich wird von den Hefezellen Fumarat als Elektronenakzeptor gebildet, um die Redoxbalance in der Zelle zu gewährleisten.

Unter anaeroben Bedingungen sind beide Bildungswege aktiviert, aber eine genaue Determination über die Aktivität eines Succinat-Syntheseweges z.B. unter osmotischen Bedingungen ist z. Zt. nicht möglich.

2.3.3. Redoxgleichgewicht unter aeroben Bedingungen

Unter aeroben Bedingungen wird NADH_2 durch eine mitochondriale NADH-dehydrogenase in der Atmungskette oxidiert. Die NADH-dehydrogenase wird durch das Gen *NDII* codiert und die katalytische Domäne des Enzyms ist in Richtung Mitochondrien positioniert (de Vries and Marres, 1987). Der Transfer von NADH_2 in *Saccharomyces cerevisiae* Zellen erfolgt durch die cytoplasmatische NADH-dehydrogenase codiert durch *NDE1* (YMR145c) und *NDE2* (YDL085w) (Small and McAlister-Henn, 1998; Luttk et al., 1998; Overkamp et al., 1998). Unter aeroben Bedingungen ist die Hauptform der cytoplasmatischen NADH-dehydrogenase das Nde1p, eine Inaktivierung des Enzyms (Nde1p) reduziert den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch bis zu 65 %.

Ein weiteres biochemisches System, welches die Reoxidation von NADH_2 im Cytoplasma beeinflusst, ist der Malat-Aspartat-Shuttle. Nach Angaben von De Vries und Marres (1987) ist dieser Stoffwechselweg in Hefezellen unter aeroben Bedingungen nicht aktiviert. Hingegen konnte experimentell nachgewiesen werden, dass bei einer Deletion von *NDE1* (cytoplasmatische NADH-dehydrogenase) der Malat-Aspartat-Shuttle aktiviert wurde. Demnach gewährleistet unter extremen physiologischen Bedingungen der Malat-Aspartat-Shuttle die cytosolische Reduzierung des NADH_2 -Gehaltes als Komplementärsystem zur cytoplasmatischen NADH-dehydrogenase (Small and Mc Alister-Henn, 1998).

Untersuchungen über die Aktivität des Glycerin-3-phosphat-Weges und Acetaldehyd-Ethanol-Weges unter aeroben Bedingungen zeigen, dass beide Systeme unbedeutend für die Oxidation von cytoplasmatischem NADH_2 sind (Overkamp et al., 1998; Luttk et al., 1998). Bei Experimenten unter aeroben Bedingungen mit Deletionsstämmen konnte keine Beeinträchtigung der Wachstumsfähigkeit nachgewiesen werden (Larsson et al., 1998; Overkamp et al., 1998).

2.4. Vorkommen, Bildung und Bedeutung von Glycerin in der Weinbereitung

Die Zusammensetzung von Traubenmost ist von mehreren Faktoren wie der Rebsorte, den Bodenverhältnissen, der Verwendung von Düngestoffen und den einzelnen Stufen der Traubenverarbeitung abhängig. Folglich werden durch die chemischen und physikalischen Zusammensetzungen des Traubenmostes die Fermentationsgeschwindigkeit und der Endvergärungsgrad sowie die Konzentration der sekundären Gärungsprodukte im Wein beeinflusst.

Bedeutende Faktoren für das Wachstum von Hefezellen sind u.a. die Zuckerkonzentration, die Stickstoffverfügbarkeit, das Vorkommen von essenziellen Nährstoffen und die Konzentration an gelöstem Sauerstoff sowie die Konzentration an schwefeliger Säure.

In den meisten Fällen enthält Traubenmost alle für das Wachstum der Hefen benötigten Nährstoffe (Fleet, 1992). Die Konzentration von fermentierbaren Kohlenhydraten, gekennzeichnet durch ein Glucose-Fructose-Verhältnis von 1:1, liegt im Most zwischen 125 g/l und 250 g/l. Der Gesamtstickstoffgehalt des Mostes kann von 60 mg/l bis 2400 mg/l variieren, wobei von der Hefe 20-50 % des Stickstoffes nicht verwertet werden kann (Fleet, 1992). Der pH-Wert des Traubenmostes liegt zwischen 2,8 bis 3,9.

2.4.1. Aromastoffe des Weines

Mehr als 800 Substanzen repräsentieren das Weinaroma und definieren den organoleptischen Charakter eines Weines. Eine Einordnung der im Wein vorkommenden Aromastoffe kann nach Rapp (1989) folgendermaßen erfolgen:

1. Primäre Traubenbukettstoffe: In der Zelle der unverletzten pflanzlichen Weinbeere vorkommende Aromastoffe.
2. Sekundäre Traubenbukettstoffe: Diese werden im Verlauf des Verarbeitungsprozesses (Mahlen, Maischen, Pressen) der Trauben bzw. des Traubenmostes durch chemische, enzymatisch-chemische oder thermische Reaktionen gebildet.
3. Gärbukettstoffe: Diese Aromakomponenten werden während der alkoholischen Gärung synthetisiert.

4. Lagerbukettstoffe: Aromastoffe, die sich durch chemische Reaktionen im Verlauf der Lagerung des Weines verändern und/oder bilden können.

Der Großteil des Weinaromas wird während der alkoholischen Gärung gebildet. Neben Ethanol, Glycerin und höheren Alkoholen werden zahlreiche weitere Weinhaltstoffe (Säuren, Ester, Aldehyde, Ketone) durch den Hefestoffwechsel produziert. Die wichtigsten Gruppen der synthetisierten Aromakomponenten der Hefen, die das Gärbukett ausbilden, sind die höheren Alkohole, Fettsäuren und Ester.

Zur Gruppe der höheren Alkohole gehören u.a. Propanol-1, 2-Methyl-propanol-1, 3-Methyl-butanol und 2-Methyl-butanol. Der Bildungsverlauf dieser Aromengruppe ist analog zu dem der Ethanolbildung.

Die dominierenden Estergruppen im Wein, die während der Hefegärung gebildet werden, sind Ethylester geradkettiger Fettsäuren und Acetate höherer Alkohole. Die Synthese der Fettsäuren erfolgt aus Acyl-CoA-Derivaten anschließender Hydrolyse. Die Abspaltung von CoA-SH durch Alkohole führt zur Esterbildung. Demnach werden während der Gärung die Fettsäuren zeitlich früher in größeren Mengen als die zugehörigen Ethylester gebildet. Erst wenn eine größere Menge an Ethanol synthetisiert wird, steigt die Fettsäureethylester-Konzentration an. Die Acetatbildung ist abhängig von der Konzentration des synthetisierten Acetyl-CoA sowie den höheren Alkoholen wie Hexanol (Traubenbestandteil), Ethanol oder i-Butanol (Gärungsalkohole). Dies bedeutet, dass erst am Ende der alkoholischen Gärung ein Maximalwert erreicht wird.

Hingegen kann für die Bildung von Acetaldehyd und anderen Acetalen das Konzentrationsmaximum in der Angärphase festgestellt werden. Die Endkonzentration nach Abschluss der Gärung repräsentiert nur noch einen Bruchteil des Höchstwertes. In Weinaromaextrakten konnten cyclische Acetale von threo- und meso-2,3-Butandiol und Glycerin als quantitativ höchste Gruppe aller Acetaldehydacetale festgestellt werden. Die gemischten Acetale, die sich aus Ethanol, den höheren Alkoholen und Acetaldehyd bilden, sind in niedrigerer Konzentration in Weinaromaextrakten nachweisbar (Rapp, 1989).

Eine besondere Bedeutung kommt flüchtigen organischen Schwefelverbindungen wegen ihrer z.T. extrem niedrigen Geruchsschwellenwerte zu. In Weinen wurden neben Thioethern, wie Dimethylsulfid und Diethylsulfid auch eine Gruppe weniger flüchtiger

Schwefelverbindungen nachgewiesen. Der Hefestoffwechsel spielt eine zentrale Rolle bei der Bildung derartiger Verbindungen in Wein (Rapp, 1989).

Eine bedeutende Aromagruppe des Traubenbuketts sind Terpenverbindungen. Sie gehören zur Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Mikroorganismen können Terpenverbindungen synthetisieren, jedoch konnte bei *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen dieser Bildungsweg noch nicht nachgewiesen werden (Rapp, 1989).

2.4.2. Bedeutung von Glycerin bei der alkoholischen Gärung

2.4.2.1. Spontangärung - Reinzuchthefegärung

In der Weinbereitung unterscheidet man zwischen der Spontangärung mit einer natürlichen Hefeflora und der Reinzuchthefegärung. Die spontan ablaufende Gärung erfolgt durch eine Vielzahl von Hefen. Die Diversität der Hefeflora ist geprägt durch einen natürlichen Selektionsprozess zwischen den "wilden" (Nichtsaccharomyceten) und den "echten" (Saccharomyceten) Hefen. In der Angärphase kommen hauptsächlich Nichtsaccharomyceten wie *Kloeckera*-, *Candida*-, *Pichia*- und *Metschnikowia*-Spezies vor, die im Verlauf der Gärung von den gärstarken *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen verdrängt werden.

Die Reinzuchtgärung ist seit den 70er Jahren in der Weinindustrie etabliert. Die Anforderungen nach den praktischen und kellerwirtschaftlichen Aspekten wie Reintönigkeit, vollständige Vergärung und schnelle Vermehrung sind nach den heutigen Kenntnissen grundsätzlich erfüllt. Zur Zeit wird verstärkt die Möglichkeit der Veränderung des Weinbuketts durch die Veränderung der Aromenspektren der Weine untersucht. Eine gezielte Lenkung der Gäraktivität und Produktion von aromabeeinflussenden Substanzen wie z.B. Glycerin soll den Charakter der Weine verstärkt typisieren (Degünther et al., 1999). Diese Forderungen könnten teilweise durch Selektionsversuche oder durch molekularbiologische Veränderungen auf genetischer Ebene der Hefen erfüllt werden.

2.4.2.2. Glycerinbildung während der alkoholischen Gärung

Nach Ethanol und CO₂ wird während der alkoholischen Gärung Glycerin quantitativ am stärksten gebildet. Abhängig von den jeweiligen Gärungsbedingungen kann das Ethanol-Glycerin-Verhältnis stark variieren. Bei Spontangärungen wird Glycerin durch Weinhefen in Mengen von durchschnittlich 8 %-10 % des entstandenen Alkohols synthetisiert. Bei der Fermentation mit Reinzuchthefen ist die Glycerinbildung etwas niedriger. In der Vielzahl der Weine ist eine Endkonzentration von Glycerin zwischen 5,0 bis 10,0 g/l analysierbar. Höhere Glyceringehalte über 10 g/l wurden in höheren Weinqualitäten wie z. B. Auslesen nachgewiesen. Aufgrund des botrytisfaulen Lesegutes enthalten diese Traubenmoste hohe Konzentrationen an Mostglycerin, so dass nach der Gärung eine erhöhte Endkonzentration an Gesamtglycerin festgestellt werden kann.

Aufgrund der viskosen Eigenschaften trägt Glycerin indirekt zur sensorischen Beurteilung der Weine bei. Bei Dosageversuchen mit Zugaben von Glycerin von 1-2 g/l in Wein bis zu einer Gesamtkonzentration von 10 g/l konnte keine positive sensorische Beurteilung festgestellt werden. Erst bei einem Gesamtglyceringehalt über 10 g/l wurden diese Weine positiv bewertet (Degünther et al., 1999). Folglich kann die Weinqualität durch eine Erhöhung des Gesamtglyceringehaltes über 10 g/l gesteigert werden (Pretorius und van der Westhuizen, 1991; Degré, 1992; Michnick et al., 1997).

2.4.2.3. Weitere Fermentationsprodukte

Für die Gewährleistung der Redoxbalance in der Zelle ist die Glycerinbildung von Bedeutung. Demnach beeinflusst eine Veränderung der Glycerinsynthese während der alkoholischen Gärung auch die Produktion von anderen Stoffgruppen wie die höheren Alkohole, die Aldehyde, die Fettsäuren und deren Estern.

2.4.2.3.1. Acetaldehyd, Pyruvat und α -Ketoglutarat

In der Weinbereitung sind Acetaldehyd, Pyruvat und α -Ketoglutarat wichtige Bindungspartner der schwefeligen Säure. Acetaldehyd bindet die schwefelige Säure am stärksten, Pyruvat weniger stark und die geringsten Bindungseigenschaften besitzt

α -Ketoglutarat. Demnach ist es für die Produktion von H_2SO_3 -armen Weinen wichtig, dass diese Bindungspartner während der Gärung in möglichst geringer Konzentration gebildet werden. Abhängig vom jeweiligen Hefestamm, der Gärführung und dem Thiamingehalt der Moste konnten Konzentrationen von Acetaldehyd im Wein zwischen 10 mg/l bis 170 mg/l, von Pyruvat bis 300 mg/l und von α -Ketoglutarat von 5 mg/l bis 150 mg/l, nachgewiesen werden (Würdig and Woller, 1989).

2.4.2.3.2. Höhere Alkohole

Die nachfolgende Abb. 2.4. stellt in vereinfachter Form die Bildungswege der wichtigsten Aromastoffgruppen durch den Hefestoffwechsel dar.

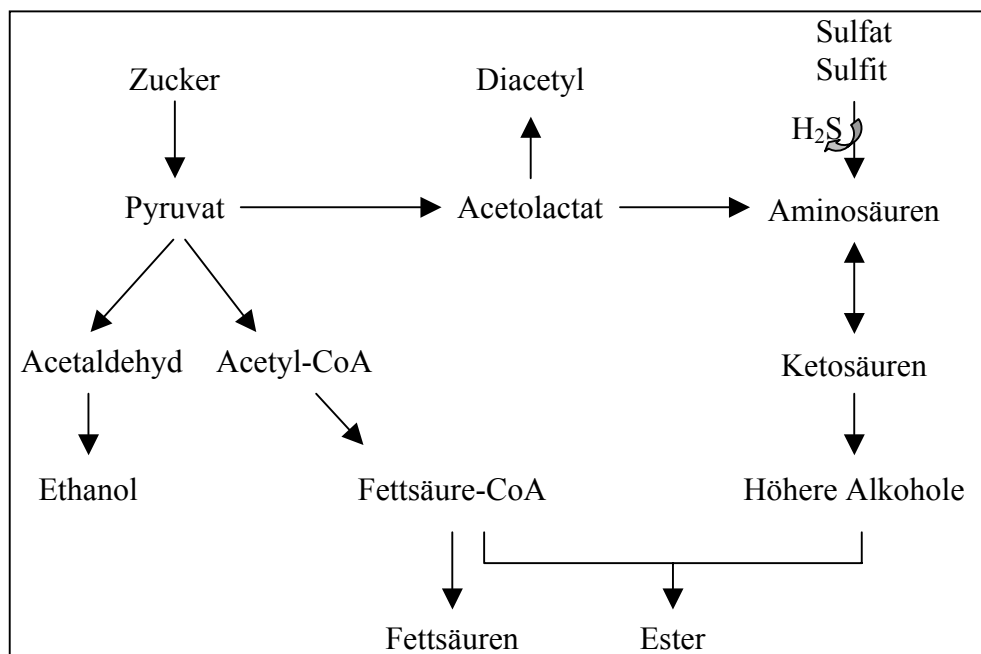


Abb. 2.4.: Bildungswege von Aroma-aktiven Substanzen durch *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet, 1992)

Die wichtigsten Vertreter der Gruppe der höheren Alkohole sind 2-Methyl-butanol und 3-Methyl-butanol (Gärungsalkohole) sowie 2-Phenylethanol. Das Verhältnis der Gärungsalkohole 2-/3-Methyl-butanol beträgt 1:4,3 bis 1:5,8. Es können Endkonzentrationen von 2-Methyl-butanol im Wein bis zu 60 mg/l und bei 3-Methyl-butanol bis 180 mg/l erreicht werden. Hingegen sind Gehalte von maximal 30 mg/l für 2-Phenylethanol dokumentiert (Würdig and Woller, 1989; Fleet, 1992).

Die Bildung der höheren Alkohole ist u.a. von der Konzentration der verfügbaren N-Quelle im Most abhängig. Hefen bildeten in synthetischen Nährmedien mit Ammonium als einzige N-Quelle nur in geringem Maße höhere Alkohole. Hingegen wird durch einen Zusatz von Aminosäuren eine Steigerung der Synthese von höheren Alkoholen erreicht. Derselbe Effekt der erhöhten Synthese ist auch bei Hefewachstum auf komplexen Medien festzustellen. Ein Zusammenhang konnte zwischen den von Hefen synthetisierten höheren Alkoholen und den zur Verfügung stehenden Aminosäuren nachgewiesen werden, obwohl Untersuchungen in Medien mit unterschiedlichen Aminosäuren- und Zucker-Konzentrationen zeigen, dass die Bildungswege von den jeweiligen Aminosäuren bis hin zu den korrespondierenden Alkoholen noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Fleet, 1992).

2.4.2.3.3. Fettsäuren und deren Ester

Zu der Gruppe der kurzkettigen Fettsäuren gehört die Essigsäure, Milchsäure, Propionsäure und Buttersäure. In der Weinbereitung ist die Essigsäure als Hauptbestandteil der "flüchtigen Säure" von besonderer Bedeutung. Unter normalen Bedingungen kann zwischen 0,2 und 0,8 g/l Essigsäure im Wein gebildet werden. Erkennbar als übel und stechend riechende Substanz und abhängig von der Rebsorte und dem Weinausbau liegt die sensorische Geruchsschwelle für flüchtige Säure bei ca. 0,7 g/l bis 1,1 g/l. Werden die gesetzlichen Grenzwerte für flüchtige Säure bei Weißweinen 1,08 g/l und bei Rotweinen 1,2 g/l überschritten, so sind diese Weine nicht mehr verkehrsfähig.

Die mittleren C₈- bis C₁₂-kettigen Fettsäuren sind Zwischenprodukte der Synthese für C₁₆- bis C₁₈-kettige Fettsäuren, die als strukturelle Komponenten für die Zellmembran dienen. Die C₆-Fettsäure Capronsäure (Hexansäure) kommt in Weinen in Konzentrationsbereichen von 1,0 bis 3,0 mg/l vor. Für die C₈-Fettsäure Caprylsäure (Octansäure) konnten Werte zwischen 1,0 und 4,5 mg/l sowie für die C₁₀-Fettsäure Caprinsäure (Decansäure) 0,3 bis 1,8 mg/l ermittelt werden.

Während der alkoholischen Gärung ist neben der Fettsäuresynthese die Esterbildung zu beobachten. Untersuchungen von Vielliers (1998) zeigen, dass C₆- bis C₁₀-Fettsäuren (MCFA-Middle Chain Fatty Acid) toxisch für die Hefezellen sind und die Bildung der Fettsäureester als Detoxifikationsreaktion erfolgt. Weiterführende Untersuchungen (Bardi et al., 1998) hingegen beweisen, dass es keine Korrelation zwischen der

MCFA-Synthese und der Esterbildung gibt. Nach Angaben von Bardi et al. (1998) korreliert die Estersynthese mit der Aufnahme von Zucker in die Zelle bzw. der Bildung von Ethanol. Bei Untersuchungen mit radioaktiv markierter Glucose und markierten Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass Glucose im Gegensatz zu Aminosäuren als Hauptbestandteil für die Esterbildung verwendet wird (Reazin et al., 1970). Calderbank und Hammond (1994) untersuchten die Bedeutung der Precursoralkohole bezüglich der Esterbildung. Demnach sind Primäralkohole besser geeignete Reaktionspartner als sekundäre oder tertiäre Alkohole.

Mit Ausnahme von Hexansäureethylester steigt die Konzentration der Ethylester- und Acetat-Bildung mit zunehmender Gärungsgeschwindigkeit und Hefemenge an. Die höchste Konzentration von Ethyl-, Propyl- und Isoamyl-Acetaten konnte bei Gärtemperaturen zwischen 15,5 °C und 21 °C festgestellt werden. Die flüchtigen Ester wie Isoamylacetat, Isobutylacetat, Ethylbutyrat und Hexylacetat wurden bei niedrigeren Gärtemperaturen gebildet. Bei höheren Gärtemperaturen hingegen synthetisierten Hefen hauptsächlich die aromatischen 2-Phenylacetate, Ethyloctanoate und Ethyldecanoate.

2.4.3. Faktoren, die die Glycerinbildung im Verlauf der Gärung beeinflussen

Im Folgenden werden die wichtigsten Einflussfaktoren der Glycerinsynthese diskutiert.

2.4.3.1. Zusammensetzung des Traubenmostes

Die Zuckerkonzentration des Traubenmostes beeinflusst die Glycerinproduktion. Michnick (1995) konnte eine lineare Beziehung zwischen der Glycerinbildung und der Steigerungen der Glucosekonzentrationen von 30 g/l auf 180 g/l in YNB-Medien feststellen. Hingegen konnten Radler und Schulz (1982) einen erhöhten Glyceringehalt erst ab 200 g/l Glucose in synthetischem Medium dokumentieren.

Weitere Faktoren wie der Stickstoffgehalt oder Hefenährstoffe beeinflussen ebenfalls die Glycerinproduktion (Rankine und Bridson, 1971). Bei Untersuchungen der Glycerinproduktion mit verschiedenen N-Quellen, d.h. Ammonium als einzige N-Quelle oder einem Gemisch von verschiedenen Aminosäuren, konnte die Glycerinproduktion beeinflusst werden. Radler und Schulz (1982) zeigten, dass die

Glycerinkonzentration bei Untersuchungen von zwei Hefestämme bei einem Stickstoffgehalt von 1880 mg/l um 26 % und um 40 % anstieg, wenn Ammonium als einzige N-Quelle der Hefe zur Verfügung gestellt wurde. Hingegen ist bei der Verwendung eines Aminosäuregemisches die NADH₂-Produktion wesentlich geringer und somit auch die Bildung von Glycerin zur Reoxidation von NADH₂ (Albers et al., 1996).

2.4.3.2. Temperatur und Sauerstoffverfügbarkeit

Bei zunehmender Gärtemperatur steigt die Glycerinsynthese (Ough et al., 1972; Degünther et al., 1999). Die Glycerinerhöhung beträgt 17 % (1 g/l) bei einer Gärtemperatursteigerung von 15 °C auf 25 °C. Abhängig vom eingesetzten Hefestamm konnten Schwankungsbreiten von 4-30 % festgestellt werden (Rankine and Bridson, 1971). Gardner et al. (1993) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Glycerinbildung und den Einflussfaktoren Gärtemperatur und Umrühren der Hefen. Es zeigte sich, dass durch Umrühren der Hefen die optimale Temperatur für die Glycerinbildung von 20 °C auf 25 °C anstieg, verursacht durch den Sauerstoffeintrag und dementsprechend einer Veränderung des intrazellulären Redoxgleichgewichtes der Zelle. Nach den Ausführungen der Autoren führte die Bewegung des Gärmediums einerseits zu einem erhöhten Eintrag von Sauerstoff ins Medium, andererseits reduzierte sich durch die erhöhte Temperatur die Sauerstofflöslichkeit im Medium.

Weiterhin konnte bei Versuchen von Radler und Schutz (1982) nachgewiesen werden, dass Zellen die gerührt wurden, höhere Anteil an Biomasse bildeten und verstärkt Glycerin synthetisiert wurde. Demnach korrelieren höhere NADH₂-Verbräuche mit der Bildung von Biomasse.

2.4.3.3. pH-Wert und SO₂-Konzentrationen

Für die Haltbarkeit, den Charakter und nicht zuletzt für die Qualität des Weines ist der Zusatz von schwefeliger Säure entscheidend. Die wichtigsten Bindungspartner der schwefeligen Säure sind Acetaldehyd, Pyruvat und α -Ketoglutarat. Sie werden abhängig von der Gärintensität und dem eingesetztem Hefestamm gebildet. Steht Acetaldehyd, der stärkste Komplexbildner von H₂SO₃, nicht als NADH₂-Akzeptor der Hefe zur Verfügung ist die Glycerinsynthese erhöht (Neuberg and Reinfurth, 1918).

Untersuchungen über die Glycerinbildung von Hefen unter Zugabe von 50 bis 200 mg/l SO₂ zu Most konnten keine signifikanten Veränderungen aufzeigen (Ough et al., 1972). Erst bei Dosagen über 200 mg/l SO₂ konnte bei selektionierten Hefestämmen eine erhöhte Glycerinkonzentration nachgewiesen werden (Gardner et al., 1993).

Rankine und Bridson (1971) konnten feststellen, dass aufgrund des Dissoziationsverhältnisses der schwefeligen Säure die Glycerinbildung bei Vergärungen von Traubenmost mit einem pH-Wert 3,3 höher ist als bei einem pH-Wert von 3,8. Bei pH 3,3 konnte eine Glycerinkonzentrationserhöhung um 5 % im Vergleich zu pH 3,8 festgestellt werden.

2.4.3.4. Hefestamm und Hefezellzahlinokulation

Die Glycerinbildung ist sehr stark abhängig vom jeweiligen Hefestamm. In einer Testreihe von 23 verschiedenen Hefestämmen in synthetischem Medium mit 10 % Glucose, konnten Glycerinkonzentrationen von 4,2 bis 10,0 g/l, im Durchschnitt 5,9 g/l, ermittelt werden (Radler and Schulz, 1982). Nach Degünther et al. (1999) können *Saccharomyces uvarum*-Stämme 1-3 g/l mehr an Glycerin synthetisieren als *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme. Weiterhin sind in spontan vergorenen Weinen höhere Glyceringehalte festgestellt worden als bei der Reinzuchtgärung (Dittrich, 1987). Ein weiterer Faktor für eine Beeinflussung der Glycerinbildung ist die Ausgangszellzahl (Inokulationszellzahl): Bei einer Inokulation von $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml konnte Watanabe et al. (1982) eine leichte Zunahme von Glycerin feststellen. Hingegen wurde diese Erhöhung von Radler und Schulz (1982) als nicht signifikant bezeichnet.

III. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Hefestämme

3.1.1.1 Laborhefestämme

Tab. 3.1.: Auflistung der Deletions-Hefestämme

Hefestamm	Abkürzung	Herkunft
<u>Wildtyp Hefestamm W 303-1A:</u> Mat a, leu 2-3/112, ura 3-1, trp 1-1, his 3-11/15, ade 2-1, can 1-100, GAL, SUC2	W 303A	Lundberg Labor, Göteborg
<u>Hefestamm mit <i>GPD1</i>-Deletion (111):</u> Mat a <i>gpd1</i> Δ::TRP1	<i>gpd1</i> Δ	Lundberg Labor, Göteborg
<u>Hefestamm mit <i>GPD2</i>-Deletion (112):</u> Mat a <i>gpd2</i> Δ::URA3	<i>gpd2</i> Δ	Lundberg Labor, Göteborg
<u>Hefestamm mit <i>GPD1</i>- und <i>GPD2</i>-Deletion (106, 107, 108, 109, 113, 117, 119):</u> Mat a <i>gpd1</i> Δ::TRP1 <i>gpd2</i> Δ::URA3	<i>gpd1</i> Δ <i>gpd2</i> Δ	Lundberg Labor, Göteborg
<u>Hefestamm mit <i>GPP1</i>- und <i>GPP2</i>-Deletion:</u> Mat α <i>gpp1</i> Δ::HIS 3 <i>gpp2</i> Δ::KAN 1	<i>gpp1</i> Δ <i>gpp2</i> Δ	Lundberg Labor, Göteborg
<u>Hefestamm mit <i>GPD1</i>-, <i>GPD2</i>-, <i>GPP1</i>- und <i>GPP2</i>- Deletionen:</u> Mat a <i>gpd1</i> Δ::TRP1 <i>gpd2</i> Δ::URA3 <i>gpp1</i> Δ::HIS 3 <i>gpp2</i> Δ::KAN 1	<i>gpd1</i> Δ <i>gpd2</i> Δ <i>gpp1</i> Δ <i>gpp2</i> Δ	Lundberg Labor, Göteborg

Die Deletions-Hefestämme wurden ausgehend vom Wildtyp-Stamm W 303A konstruiert.

3.1.1.2. Weinhefestämme

Tab. 3.2.: Auflistung der Weinhefestämme

Hefestamm	Abkürzung	Herkunft
Wädenswil 15	W15	FG Mikrobiologie, Geisenheim
Siha 3	S3	FG Mikrobiologie, Geisenheim
Champagne Epernay Geisenheim	CEG	FG Mikrobiologie, Geisenheim
Steinberg	STG	FG Mikrobiologie, Geisenheim
Assmannshausen	AMH	FG Mikrobiologie, Geisenheim
Hautvillers	HVS	FG Mikrobiologie, Geisenheim
Geisenheim 49	G49	FG Mikrobiologie, Geisenheim
Scharzhofberg	SHG	FG Mikrobiologie, Geisenheim
Geisenheim 33	G33	FG Mikrobiologie, Geisenheim
Geisenheim 74	G74	FG Mikrobiologie, Geisenheim
Champagne AY	CAY	FG Mikrobiologie, Geisenheim
K1m	K1m	INRA, Montpellier

3.1.1.3. Gentechnisch veränderte Weinhefestämme

Tab. 3.3.: Auflistung der gentechnisch veränderten Weinhefestämme

Hefestamm	Abkürzung	Herkunft
K1m-Hefestamm mit Plasmid mit GPD1-Aktivität	K1m/GPD1	INRA, Montpellier
K1m-Hefestamm mit Plasmid mit ZEO _r -Gen	K1m/T	INRA, Montpellier
522D-Hefestamm mit Plasmid mit GPD1-Aktivität	522D/GPD1	INRA, Montpellier
522D-Hefestamm mit Plasmid mit ZEO _r -Gen	522D/T	INRA, Montpellier
71B-Hefestamm mit Plasmid mit GPD1-Aktivität	71B/GPD1	INRA, Montpellier
71B-Hefestamm mit Plasmid mit ZEO _r -Gen	71B/T	INRA, Montpellier

Bei den Hefestämmen bezeichnet "mit Plasmid mit GPD1-Aktivität" wurde zur Überexpression von *GPD1* ein pVT100-U Vektor verwendet, ein Multikopie-Vektor,

der die *GPD1*-Expression unter einem *ADHI*-Promoter kontrolliert. Als Marker sind *URA3* sowie das Resistenzgen *ZEO* gegen dem Antibiotikum Phleomycin im Vektor integriert. Die aufgelisteten Hefestämme mit der Bezeichnung "mit Plasmid mit ZEO-Gen" wurden ebenfalls durch die Transformation eines pVT100-U Vektors hergestellt (Remize, 2000).

3.1.2. Medien

3.1.2.1. Medien für Kreuzungsversuche

Medium YPDA:

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

mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Medium YNB:

Hefestickstoff	
ohne Aminosäuren ohne Ammoniumsulfat	6,7 g
Ammoniumsulfat	5,0 g
Glucose	20,0 g

mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Zur Bereitung von festen Nährmedien wurde 17,0 g/l Agar zugegeben und anschließend bei 120 °C 20 min. autoklaviert.

Zugaben von spezifischen Aminosäuren in YNB-Medien ermöglichten das Wachstum von auxotrophen Hefestämmen. Autoklavierten YNB-Medien wurden sterile Adenin- und Leucin-Aminosäurelösungen (filtriert mit 0,22 µm Filter) in den Endkonzentrationen 0,005 g/l für Adenin und 0,025 g/l für Leucin zugesetzt.

Sporulationsmedium: KAc-Medium:

Kaliumacetat	10,0 g
Agar	20,0 g
mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.	

3.1.2.2. Medien für Drop-Test-Experimente

Medien 1 % Sorbitol:

Hefeextrakt	10,0 g
Pepton	20,0 g
Glucose	20,0 g
Sorbitol	10,0 g
Agar	17,0 g
mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.	

Die Medien wurden bei 120 °C 20 min. autoklaviert.

Medien 4 % NaCl:

Hefeextrakt	10,0 g
Pepton	20,0 g
Glucose	20,0 g
NaCl	40,0 g
Agar	17,0 g
mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.	

Die Medien wurden bei 120 °C 20 min. autoklaviert.

Medien 6 % NaCl:

Hefeextrakt	10,0 g
Pepton	20,0 g
Glucose	20,0 g
NaCl	60,0 g
Agar	17,0 g
mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.	

Die Medien wurden bei 120 °C 20 min. autoklaviert.

Medien 8 % NaCl:

Hefeextrakt	10,0 g
Pepton	20,0 g
Glucose	20,0 g
NaCl	80,0 g
Agar	17,0 g

mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Die Medien wurden bei 120 °C 20 min. autoklaviert.

3.1.2.3. Medien für Gärversuche mit Laborhefestämmen

Medien Traubensaft:

Glucose	90,0 g/l
Fructose	90,0 g/l
pH-Wert	3,2

Der verwendete Traubensaft war ein 1998er Rheingauer Riesling Traubensaft mit einem Ausgangsmostgewicht von 62 °Oe. Dies entspricht einer Glucosekonzentration von 55,8 g/l und einer Fructosekonzentration von 63,8 g/l. Der Traubenmost wurde auf 90,9 g/l Glucose und 90,0 g/l Fructose angereichert um eine Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten. Die Sterilisationstemperatur des Traubensaftmediums betrug 100 °C (15 min.).

Medien: synthetisches Nährmedium - Minimal-Aminosäuremedium (ASI)

Ammoniumsulfat	5,0 g
Glucose	90,0 g
Fructose	90,0 g
Gemisch Hefestickstoff (Difco)	
ohne Aminosäuren ohne Ammoniumsulfat	6,7 g
Aminosäurelösung ASI	250 ml

mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Der pH-Wert des synthetischen Nährmediums ASI wurde mit einer 5 M NaOH auf 3,3 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Das synthetische Nährmedium ASI wurde bei 100 °C 15 min. lang autoklaviert.

Zusammensetzung des Gemisches Hefestickstoff (Difco) ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat (Angaben pro Liter):

Biotin, Folsäure je	2,0 µg
Calciumphanthothenat, Niacin je	400,0 µg
Inosit	2,0 mg
p-Aminobenzoessäure, Riboflavin je	200,0 µg
Pyridoxinhydrochlorid, Thiaminhydrochlorid je	400,0 µg
Borsäure	500,0 µg
Kupfersulfat	40,0 µg
Kaliumjodid	100,0 µg
Eisenchlorid, Natriummolybdat je	200,0 µg
Kaliumphosphat	1,0 g
Magnesiumphosphat	0,5 g
Natriumchlorid, Calciumchlorid je	0,1 g

mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Zusammensetzung der Aminosäurelösung ASI (Angaben pro Liter):

L-Glutamin	140,0 mg
L-Serin	50,0 mg
L-Asparaginsäure	50,0 mg
L-Glutaminsäure	70,0 mg
L-Threonin	50,0 mg
L-Alanin	40,0 mg
L-Arginin	185,0 mg
L-Prolin	100,0 mg
L-Valin	25,0 mg
L-Tryptophan	10,0 mg
L-Isoleucin	25,0 mg
L-Leucin	120,0 mg
L-Phenylalanin	20,0 mg
L-Ornithin	3,0 mg
L-Lysin	2,0 mg
L-Histidin	15,0 mg

L-Tyrosin	7,0 mg
L-Methionin	5,0 mg
L-Alanin	120,0 mg

mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Nach der Sterilisation mittels 0,22 µm Filtration wurde die Aminosäurelösung bei 4 °C aufbewahrt.

Medien: synthetisches Nährmedium - reichhaltiges Aminosäuremedium (ASII)

Ammoniumsulfat	5,0 g
Glucose	90,0 g
Fructose	90,0 g
Hefestickstoff (Difco)	
ohne Aminosäuren ohne Ammoniumsulfat	6,7 g
Aminosäurelösung ASI	250 ml

mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Der pH-Wert des synthetischen Nährmediums ASII wurde auf 3,3 mit einer 5 M NaOH eingestellt und dann mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter-Marke eingestellt. Das synthetische Nährmedium ASII wurde bei 100 °C 15 min. lang autoklaviert.

Zusammensetzung des Gemisches Hefestickstoff (Difco) ohne Aminosäuren und ohne Ammoniumsulfat: (s. Medien: synthetisches Nährmedium - Minimal-Aminosäuremedium ASI).

Zusammensetzung der Aminosäurelösung ASII (Angaben pro Liter):

L-Glutamin	205,0 mg
L-Serin	40,0 mg
L-Asparaginsäure	40,0 mg
L-Glutaminsäure	50,0 mg
L-Threonin	60,0 mg
L-Alanin	55,0 mg
L-Arginin	350,0 mg
L-Prolin	100,0 mg
L-Valin	15,0 mg

L-Tryptophan	10,0 mg
L-Isoleucin	15,0 mg
L-Leucin	120,0 mg
L-Phenylalanin	6,0 mg
L-Ornithin	2,0 mg
L-Lysin	4,0 mg
L-Histidin	30,0 mg
L-Tyrosin	8,0 mg
L-Methionin	5,0 mg
L-Alanin	120,0 mg

mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Die Aminosäurelösung wurde mittels einer 0,22 µm Filtration sterilisiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

3.1.3. Zusatz von Antibiotika

Es wurde eine Positivselektion in YPDA- bzw. Traubensaft-Medien mit Antibiotika-Zusätzen durchgeführt, um gentechnisch veränderte Hefestämme mit plasmidständigen Resistenzgenen und plasmidlose Weinhefestämme zu unterscheiden. Zur Selektion der Hefestämme mit verändertem Glycerinbildungsvermögen (s. Kap. 3.1.1.3.) wurde Phleomycin als Antibiotikum eingesetzt. Eine Phleomycin-Stammlösung zusammengesetzt aus 100 mg Phleomycin gelöst 1 ml 10 %iger Ethanol-Wasser-Lösung (v/v) wurde hergestellt und mit einem 0,22 µm Filter sterilisiert. Die sterile Phleomycin-Stammlösung konnte anschließend dem autoklavierten YPDA- oder Traubensaft-Medium mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt werden.

Die Selektionierung von Laborhefestämmen (s. Kap. 3.1.1.1.) erfolgte mit dem Antibiotikum Kanamycin. Die Kanamycin-Stammlösung enthielt 100 mg Kanamycin gelöst in 1 ml entmineralisiertem Wasser. Die Endkonzentration im YPDA-Medium betrug 200 µg Kanamycin/ml. Die Sterilisation der Stammlösung Kanamycin wurde durch Filtration mit einem Filter mit 0,22 µm Porengröße gewährleistet.

3.1.4. Kultivierungsbedingungen für Gärversuche mit Weinhefestämmen

Die Voranzucht der Hefen wurde in sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben bei 27 °C über Nacht durchgeführt. Es ist zu beachten, dass bei den Hefestämmen mit plasmidständigem Resistenzgen gegen Phleomycin Medien mit Phleomycin-Zugaben verwendet werden, um eine Fremdfektion durch andere Hefestämme zu vermeiden. Nach der Inkubationszeit wird die Zellzahl mit der Thoma-Zählkammer bestimmt und die vorbereiteten, sterilen Gärbehälter (Sektflaschen 750 ml) mit 650 ml Gärmedium mit $2\text{-}3 \cdot 10^6$ Zellen/ml beimpft. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Nährstoffversorgung wird Thiamin (0,6 mg/l) zugesetzt. Die Gärbehälter werden mit Gärtrichtern (mit Wasser gefüllt) verschlossen. Alle Versuche werden mit einer Wiederholung pro Hefestamm durchgeführt.

3.1.5. Kultivierungsbedingungen für Gärversuche mit Laborhefestämmen

In dieser Versuchsreihe erfolgt die Vergärung in einem Batch-Fermenter mit einem Volumen von 1500 ml. Das Batch-Fermenter-System ist ausgestattet mit einem integrierten Temperaturfühler, einem Rührwerk-Regelsystem und einem Gaszufuhr-regelsystem. Die Gärbedingungen aller durchgeführten Gärversuche werden bei 25 °C Gärtemperatur mit 17 U./min. Rührwerkgeschwindigkeit eingestellt. Die anaeroben Gärbedingungen werden durch einen ständigen Zufuhr von Stickstoff (Qualität 5.0, Linde) ins Medium gewährleistet. Der hierbei entstehende Überdruck wird durch einen Gärtrichter (mit Wasser gefüllt) wieder ausgeblasen. Eine weitere Kontrolle der anaeroben Bedingungen konnte mittels Anaerob-Farbindikatorstäbchen (Merck), die im Fermenter eingesetzt wurden, erreicht werden.

Die Voranzucht der untersuchten Hefestämme wurde in sterilen Erlenmeyerkolben bei 27 °C über Nacht durchgeführt und nach anschließender Bestimmung mit der Thoma-Zählkammer erfolgte die Beimpfung mit $2\text{-}3 \cdot 10^6$ Zellen/ml des sterilisierten (121 °C, 20 min.) Fermenters gefüllt mit 1400 ml Gärmedium.

3.1.6. Zellzahlbestimmung

3.1.6.1. Zellzahlbestimmung mit der Thoma-Zählkammer

Alle Zellzahlbestimmungen wurden mit der Thoma-Zählkammer durchgeführt. Die Zählkammer ist ein 3 mm dicker, plangeschliffener Objektträger, in dessen Mitte ein Steg eingeschliffen ist, der von zwei Rinnen begrenzt wird. Im Steg ist ein Netz eingätzt. Dieses Netz besteht aus 16 Großquadraten, die sich aus jeweils 16 Kleinquadraten zusammensetzen. Die Oberfläche des Steges liegt 0,1 mm unter der Oberfläche des Objektträgers. Hierbei entsteht bei der Auflage eines plangeschliffenen Deckglases ein Hohlraum. Bei der Bestimmung der Zellzahl werden 5 Großquadrate ausgezählt (max. 20 Zellen/Großquadrat) und der arithmetische Mittelwert der Zellzahlen ermittelt. Sind mehr als 20 Zellen pro Kleinquadrat enthalten so ist eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 aufzustellen.

Beim Ansatz einer Verdünnungsreihe ist auf eine intensive Vermischung der Proben zu achten. Zusätzlich kann durch eine anschließende Vitalfärbung mit einer 0,1 %igen Methylenblaulösung nach Löffler (Methylenblau 0,5 g, 95 % Methanol/Kalilauge-Lösung) der Anteil an lebenden Hefezellen ermittelt werden. Die Anfärbung erfolgt mit Methylenblaulösung nach Löffler, indem 1-2 Tropfen mit dem Untersuchungsmaterial versetzt werden. Nach ca. 3-5 min. ist eine Auszählung der vitalen Zellen möglich.

Berechnung der Gesamtzellzahl:

$$N = [(T \cdot 4000) / n] \cdot 10^3 = [(T \cdot 4000) / 80] \cdot 10^3 = T \cdot 5 \cdot 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

Hierbei ist:

N = Anzahl der Zellen pro 1 ml

T = Anzahl der Zellen in 5 Großquadraten (Mittelwert)

n = Anzahl der ausgezählten Kleinquadrate (5 * 16 = 80)

3.1.6.2. Zellzahlbestimmung durch optische Dichte

Die zu untersuchenden Hefestämme wurden in Falconröhrchen gefüllt mit 5 ml sterilem YPDA-Medien bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die anschließende Bestimmung der

Zellzahl erfolgte durch Messung der optische Dichte (OD) an einem Photometer eingestellt auf eine Wellenlänge von 600 nm. Die Zellzahl sollte auf einen OD-Wert von 1,0 eingestellt werden, d. h. zu einer bestimmten Menge an Zellsuspension wird flüssiges YPDA-Media bis zu 1 ml Gesamtvolumen zugegeben. Der OD-Wert von 1,0 entspricht einer Zellzahl von $20 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

3.1.7. Bestimmung des Nass- und Trocken-Gewichtes

Zur Bestimmung des Nass- und Trocken-Gewichtes während des Gärverlaufes werden 40 ml Probe aus dem Batch-Fermenter bzw. am Ende der Gärung aus dem Gärbehälter entnommen. Um eine Fremdinfection des Fermenters zu vermeiden, ist bei der Probenentnahme zu beachten, dass sterile Pipetten verwendet werden. Die entnommenen Proben werden zentrifugiert (3000 U./min. bei 5 min.) und das sich am Boden des Zentrifugenglas gesammelte Hefesediment wird zur Nass- bzw. Trocken-Gewichtsbestimmung verwendet.

Der Überstand wird dekantiert und kann für weitere Analysen verwendet werden. Zur Bestimmung des Nass- bzw. Trocken-Gewichtes wird ein Membranfilter vor der Filtration in eine Petrischale gelegt und das Gewicht an einer Analysenwaage auf 1000-ster Stelle genau notiert. Dieses Gewicht wird als Leergewicht (G_0 -Gewicht) aufgezeichnet. Das Hefesediment wird nun mit einer Membranfiltrationsanlage mit Vakuum-Wasserstrahl-Pumpe über den abgewogenen Membranfilter (0,2 μm Porengröße, \varnothing 40 mm, steril) filtriert. Es erfolgt nun eine zweite Wägung des Membranfilters, dieser Wert wird als G_1 -Gewicht aufgezeichnet. Zur Bestimmung des Trockengewichtes wird der Membranfilter mit dem Hefesediment in einen Trockenschrank bei 80 °C 60 min. getrocknet und nach einer Abkühlungszeit von 15 min. wieder auf einer Analysenwaage abgewogen (G_2 -Gewicht).

Ermittlung des Nassgewichtes:

$$G_1\text{-Gewicht} - G_0\text{-Gewicht} = \text{mg Nassgewicht}/40 \text{ ml Probe}$$

Dieser ermittelte Wert wird auf Gramm Nassgewicht pro Liter Probe berechnet.

Ermittlung des Trockengewichtes:

$$G_2\text{-Gewicht} - G_0\text{-Gewicht} = \text{mg Trockengewicht}/40 \text{ ml Probe}$$

Dieser ermittelte Wert wird auf Gramm Nassgewicht pro Liter Probe berechnet.

3.1.8. Bestimmung der sekundären Gärungsprodukte

3.1.8.1. Bestimmungen nach nasschemischen Analysemethoden

Von den vergorenen Ansätzen wurde der Restzuckergehalt, der Alkoholgehalt und die flüchtige Säure bestimmt. Die Restzucker- und Alkohol-konzentrationen wurden nach den Bestimmungsmethoden von Rebelein (Tanner and Brunner, 1987) durchgeführt. Die Ermittlung der flüchtigen Säure erfolgte nach der Methode Wädenswil (Tanner and Brunner, 1987).

3.1.8.2. Bestimmung nach enzymatischen Analysemethoden

Die enzymatischen Analysen wurden alle mit Test-Combinationen von Boehringer durchgeführt.

Komponente	Test-Combination
Glucose/Fructose	Boehringer Test-Combination Nr. 138789 (Boehringer, 1984)
Glycerin	Boehringer Test-Combination Nr. 148270 (Boehringer, 1984)
Acetaldehyd	Boehringer Test-Combination Nr. 668613 (Boehringer, 1984)
Acetat	Boehringer Test-Combination Nr. 139068 (Boehringer, 1984)

3.1.8.3. Bestimmung des Glyceringehaltes

Bestimmung des intrazellulären Glyceringehaltes:

40 ml einer homogenen Probe wird bei Raumtemperatur 5 min. bei 4000 U./min. zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und zu dem abgesetzten Sediment werden 2 ml 5 %ige Trichloressigsäure hinzugegeben. Die Suspension bleibt dann innerhalb der nächsten 45 min. alle 10 min. geschüttelt und anschließend bei 4000 U./min. 10 min. lang zentrifugiert. Der klare Überstand wird entnommen und eine enzymatische

Glycerinbestimmung durchgeführt. Die Konzentration des intrazellulären Glyceringehaltes wird auf das Trockengewicht der Hefen bezogen (s. Kap. 3.1.7.).

3.1.8.4. Chromatographische Analysen

3.1.8.4.1. Hochauflösungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

3.1.8.4.1.1. HPLC-RI-Analyse

Probenvorbereitung:

Die Proben von den vergorenen Gäransätzen werden 1:10 verdünnt und anschließend mit einer Mikroliter-Spritze direkt in die HPLC-Anlage eingespritzt. Das effektive Einspritzvolumen beträgt 20 µl.

Einstellungen der HPLC-RI-Anlage: s. Tab. 3.4.

Tab. 3.4.: Technische Daten der HPLC-RI-Anlage

Chromatograph	HPLC-Latek
Detektor	RI-SP 8430
Pumpe	Latek Pump
Integrator	PU 481 Philipps Integrator
Injektortemperatur (°C)	20
Säulentemperatur (°C)	90 ± 2
Fließmittel	dest. Wasser
Fließgeschwindigkeit	0,6 ml/min.
Kapillaren	HPX 87-P
Innendurchmesser (mm)	0,32

Die HPLC-RI-Anlage wird über eine externe Standard-Lösung kalibriert. In der Tabelle 3.5. sind die entsprechenden Werte wie Komponentennamen, Retentionszeiten, Peakflächen und Konzentrationen aufgelistet.

Tab. 3.5.: Kalibrierdaten für die HPLC-RI-Anlage

Komponenten	Retentionszeit (min.)	Konzentration (mg/l)	Peakfläche
Raffinose	9,73	0,4	41907
Trehalose	10,68	0,2	28244
Melibiose	11,57	0,2	25463
Glucose	12,73	4,0	503170
Xylose	13,73	0,2	27846
Galactose	14,69	0,4	72434
Arabinose	15,85	0,2	33427
Fructose	16,77	4,0	605174
Glycerin	19,71	1,26	144349

3.1.8.4.1.2. HPLC-UV-Analyse

Die Proben von den vergorenen Gäransätzen werden 1:10 verdünnt und anschließend mit einer Mikroliter-Spritze direkt in die HPLC-Anlage eingespritzt. Das effektive Einspritzvolumen beträgt 20 µl.

Einstellungen der HPLC-UV-Anlage: s. Tab. 3.6.

Tab. 3.6.: Technische Daten der HPLC-UV-Anlage

Chromatograph	HPLC-Latek
Detektor	Merck Hitachi L-4250 UV-VIS
Pumpe	Merck Hitachi L-6200A Pump
Integrator	Merck Hitachi D-2500 Chromato-Integrator
Wellenlänge (nm)	210
Mode	UV
Injektortemperatur (°C)	20
Säulentemperatur (°C)	90 ± 2
Fließmittel	0,02 N H ₂ SO ₃
Kapillaren	Biorad fermentation monitoring
Kapillarenmaße (mm)	150*7,8
Vorsäule	Polyspher OAHY

Die HPLC-UV-Anlage wird wie die HPLC-RI-Anlage über eine externe Standardlösung kalibriert. Die Eichsubstanzen sind mit ihren entsprechenden Konzentrationen sowie Retentionszeiten und Peakflächen in der nachfolgenden Tabelle 3.7. aufgelistet.

Tab. 3.7.: Kalibrierdaten für die HPLC-UV-Anlage

Komponenten	Retentionszeit (min.)	Konzentration (mg/l)	Peakfläche
Oxalacetat	4,97	0,4	82450
Citrat	6,33	0,4	73566
Pyruvat	7,26	1,0	64186
Malat	7,61	0,2	93819
Succinat	9,48	0,2	42155
Lactat	10,10	0,2	59967
Formiat	10,96	0,4	117819
Fumarat	11,50	1,0	30466946
Acetat	11,96	1,0	58260
Isobutytrat	16,27	0,4	56706
Butytrat	17,65	0,4	42656

3.1.8.4.2. Gaschromatographie

Die Probenvorbereitung erfolgt nach der Kaltronmethode für die „Bestimmung der flüchtigen Aromastoffe“ (Rapp et al., 1994).

Von den vergorenen Gäransätzen werden 10 ml in ein Spitzbodenzentrifugiergläschen, 5 µl Standardlösung (100 µl 2,6-Dimethyl-5-hepten-2-ol in 10 ml Ethanol gelöst) und 100 µl Kaltronlösung (Trichlor-1,1,2-trifluorethan) einpipettiert. Zusätzlich werden in das Reagenzglas 1,5 g NaCl zugegeben. Es ist zu beachten, dass der Glasstopfen fest mit dem Zentrifugierglas verbunden ist, um Flüssigkeitsverluste zu vermeiden. Anschließend wird 15 min. lang maschinell geschüttelt. Ist keine eindeutige Trennung eines 2-Phasen-Gemisches sichtbar, so wird zusätzlich 5-10 min. bei 3000 U./min. zentrifugiert. Die Lösungsmittelphase wird dem entstandenen 2-Phasen-Gemisch entnommen. Von dem aus dem Trocknungsschritt mit Natriumsulfat (20 µg) gewonnenen Extrakt können 2 µl entnommen und in den GC injiziert werden.

Einstellungen des Gaschromatographen mit Massenspektrometer

Tab. 3.8.: Technische Daten der GC-MS-Anlage

Chromatograph	HP5640
Detektor	MSD
Fließmittel	Helium
Fließgeschwindigkeit	1,2 ml/min.
Kapillaren	Supelco 2-4050 SPB-5
Kapillarenmaße	60m*320µm*25,0µm
Scan-Modus	SIM
EM-Voltage	2000
MS Scan Parameter	Start 3.90 min.
Mass Range	0-3000
Temperaturprogramm	50 °C, 2.00 min. 10 °C/min. auf 150 °C, 5 °C/min. auf 160 °C, 10 °C/min. auf 220 °C, 220 °C 10 min.
Starttemperatur	50 °C (2 min.)
Dauer (min.)	30

Es wird eine qualitative und quantitative Auswertung durchgeführt. Die Kalibrierung des GC-MS erfolgt durch Einspritzungen von in 10 %iger Ethanol-Wasser-Lösung gelösten Reinsubstanzen. In der nachfolgenden Tabelle 3.9. sind die Komponenten, die Retentionszeiten, die Konzentrationsbereiche sowie das Korrelationsmaß für die jeweiligen Kalibrierungen angegeben.

Tab. 3.9.: Kalibrierdaten der GC-MS-Anlage

Komponenten	Retentionszeit (min.)	Konzentration (mg/l)	Korrelations- maß (r²)
Ethylacetat	4,10	2-20	0,987
3-Methylbutanol	5,24	7,5-75	0,98
2-Methylbutanol	5,33	3,5-35	0,994
Iso-Buttersäureethylester	5,64	0,06-0,6	0,998
Iso-Butylacetat	5,84	0,06-0,6	0,988
Buttersäureethylester	6,25	0,075-0,75	0,999
Milchsäureethylester	6,47	5-50	0,975
Hexanol	7,37	0,15-1,5	0,996
3-Methylbutylacetat	7,48	0,04-0,4	0,991
Capronsäure	9,23	0,5-10	0,831
Capronsäureethylester	9,60	0,05-0,5	0,996
Hexylacetat	9,84	0,1-1,0	0,996
Cis-Linalooloxid	10,90	0,075-0,75	1,0
Trans-Linalooloxid	11,15	0,075-0,75	1,0
Linalool	11,35	0,04-0,4	0,993
2-Phenylethanol	11,60	4-40	0,994
Neroloxid	12,23	0,04-0,4	0,997
Caprylsäure	12,30	0,5-10	0,896
Diethylsuccinat	12,50	0,15-1,5	0,995
Caprylsäureethylester	12,82	0,125-1,25	0,983
α-Terpineol	12,89	0,05-0,5	0,993
Nerol	13,40	0,1-1,0	0,994
Phenylethylester	13,66	0,1-1,0	0,996
Geraniol	13,78	0,025-0,25	0,922
Phenylethylacetat	13,85	0,075-0,75	0,999
Caprinsäure	15,40	0,5-10	0,914
Caprinsäureethylester	15,90	0,025-0,25	0,964

3.2. Methoden

3.2.1. Kreuzungsexperimente mit Laborhefestämmen

Die Experimente werden im Folgenden in den drei Abschnitten beschrieben: Bildung von diploiden Zellen, Trennung von diploiden und haploiden Zellen und anschließende Sporulation der Zellen.

3.2.1.1. Bildung von diploiden Zellen

Eine Kolonie vom *a-gpd1Δgpd2Δ*- und eine vom *α-gpp1Δgpp2Δ*-Stamm werden jeweils auf YPDA-Agarplatten ausgestrichen und 1 Tag bei 30 °C inkubiert. Anschließend wird eine Kolonie der Ausstrichkultur in 5 ml flüssigem YPDA-Media in Falconröhrchen bei 30 °C über Nacht gezüchtet. Die Konjugation der haploiden Zellen erfolgt durch pipettieren von 10 µl der *a-gpd1Δgpd2Δ*- und 10 µl von der *α-gpp1Δgpp2Δ*-Zellsuspension in die Mitte einer YPDA-Agarplatte. Zur Kontrolle werden jeweils 10 µl der haploiden Stämme getrennt voneinander am Rande der Petrischale aufgebracht. Die nachfolgende Abbildung zeigt das Beimpfungsschema auf der Agarplatte.

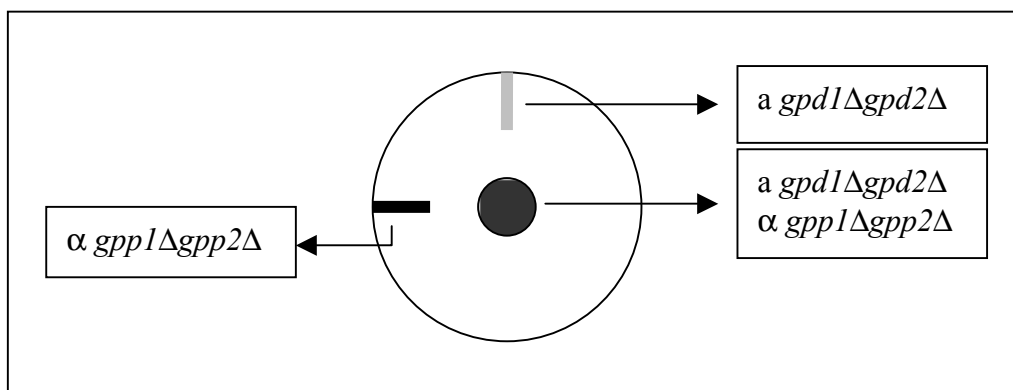


Abb. 3.1.: Anordnung von *a-gpd1Δgpd2Δ*- und *α-gpp1Δgpp2Δ*-Zellen auf einer YPDA-Agarplatte

Die beimpfte YPDA-Agarplatte wird über Nacht bei 30 °C inkubiert. Nach 5-8 Stunden kann die "Shmoos"-Bildung der Zellen unter dem Mikroskop (40-fach) beobachtet werden. Nach 12 Stunden werden die beimpften Agarplatten ausgewertet.

3.2.1.2. Trennung von diploiden und haploiden Zellen

Die Trennung der Zellen, d. h. der haploiden und neu gebildeten diploiden Zellen, wird durch Replica-Plating auf Selektivmedien durchgeführt.

Die Kolonien der inkubierten Zellen werden auf einen „Lederberg-Stempel“ übertragen. Der Lederberg-Stempel besteht aus einem zylinderförmigen Metallblock (10 cm Höhe und 8 cm Durchmesser) passend um eine Petrischale von 9 cm Durchmesser überziehen zu können. Über diesen Metallblock wird ein Samttuch gelegt und mittels eines Metallrings fixiert. Die Agarplatte mit den diploiden und den haploiden Zellen (s. Abb. 3.1.) wird auf den Stempel gelegt und leicht angedrückt, so dass ein Großteil der Zellkolonien auf das Samttuch übertragen werden. Anschließend werden Agarplatten mit Selektivmedien auf den beimpften Lederberg-Stempel gedrückt. Die überstempelten Kolonien werden bei 30 °C 2 Tage lang inkubiert.

Bei der anschließenden Auswertung der Agarplatten mit Selektivmedium können nur diejenigen Zellen wachsen, welche die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Dies bedeutet, dass bei der Kreuzung von Mat α *gpd1* Δ ::TRP1 *gpd2* Δ ::URA3-Zellen mit Mat α *gpp1* Δ ::HIS3 *gpp2* Δ ::KAN1-Zellen nur diejenigen diploiden Zellen auf YNB-Medien wachsen, die Zusätze der Aminosäuren Adenin und Leucin sowie des Antibiotikums Kanamycin enthalten. Die entstandenen diploiden Zellen sind demnach quadrupel Deletionsstämmen mit den Deletionen von *GPD1*, *GPD2*, *GPP1* und *GPP2*.

3.2.1.3. Sporulation von diploiden Zellen

Es werden mit einem sterilem Zahnstocher einige Zellen die auf dem YNB-Selektivmedium wachsen entnommen und über Nacht in 5 ml YDP-Flüssigmedium bei 30 °C in Falconröhrchen inkubiert. Die Zellsuspension wird zentrifugiert (1 min. bei 3000 U./min.), der Überstand dekantiert und die Zellen mit einer Mikroliter-Spritze auf ein Sporulationsmedium (KAc-Medium) überimpft. Die Inkubationszeit beträgt 2 bis 3 Tage bei 30 °C, wobei die Sporenbildung mikroskopisch kontrolliert wird. Sind ausreichend Sporen vorhanden, dann wird von der KAc-Agarplatte eine Kolonie entnommen und in ein Eppendorf-Tube (1 ml Volumen) gegeben. Im Eppendorf-Tube sind 50 μ l einer 2,5 %igen Lyticase-Enzymlösung vorgelegt. Die Sporen werden mit der Lyticase-Lösung 2-3 mal leicht geschüttelt und

im Brutschrank bei 30 °C 5-10 min. lang inkubiert. Nach 5 Minuten sollte jede Minute die Auflösung der Asciscläuche unter dem Mikroskop beobachtet werden. Ist eine deutliche Zerstörung der Asciwände erkennbar und sind die Sporen größtenteils zusammenhängend, dann wird die Lyticase-Aktivität durch Abstellen des Eppendorf-Tubes in Eis gestoppt. Mit einer sterilen Impföse werden die Ascosporen aus der Lösung entnommen und auf einer YPDA-Platte ausgestrichen, den sog. Matrixstreifen, um die Mikromanipulation der Sporen durchzuführen (s. Abb. 3.2.).

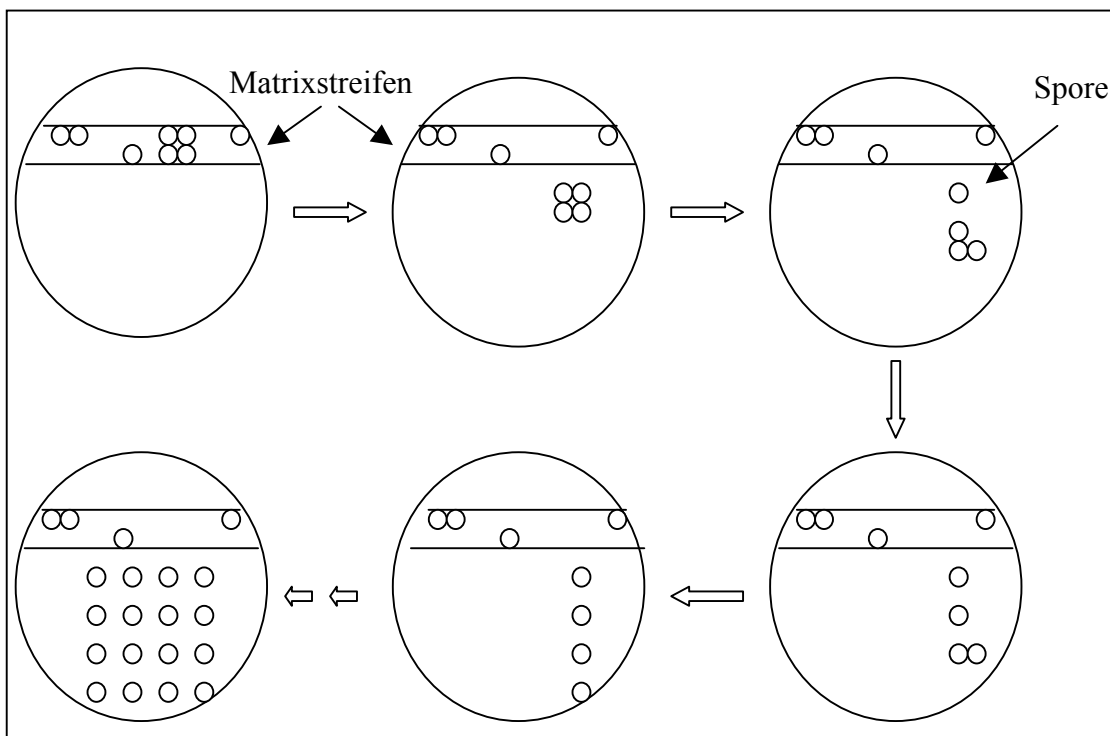


Abb. 3.2.: Schematische Darstellung der Mikromanipulation

Unter dem Mikroskop des Mikromanipulators werden bei einer 100-fachen Vergrößerung jeweils 4 zusammenhängende Sporen vom Matrixstreifen entnommen, wie in der schematischen Darstellung in Abb. 3.2. dargestellt, und getrennt. Die Mikromanipulation erfolgte mit einem Singer MSM System, das mit einem elektrisch angetriebenen Mikroprozessor ausgestattet ist. Die Bewegungen der Nadel und die Positionierung der Einzelsporen erfolgte durch ein automatisiertes Joystick-System. Die YPDA-Platten mit Einzelsporen werden 2 bis 3 Tage lang bei 30 °C inkubiert und anschließend auf YNB-Selektivmedienplatten ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Ein Tag nach der Mikromanipulation kann eine Auswertung der gewachsenen Sporen erfolgen.

3.2.1.4. Drop-Test mit Labor- und Weinhefe-Stämmen (Lundberg Labor, 1999)

Die Wachstumsfähigkeit von Wildtyp- und Deletions-Hefestämmen unter osmotischen Stressbedingungen kann durch Drop-Test-Experimente überprüft werden. Hierbei werden Hefestämme mit einem OD-Wert von 1,0 in einer 1:10-Verdünnungs-Reihe auf Agarplatten mit 4 %, 6 % und 8 % NaCl und 1 % Sorbitol getestet (s. Kap.3.1.6.2.).

Die zu untersuchenden Hefestämme werden in 5 ml YPDA-Media in Falconröhrchen bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Zellzahl der Zellsuspension wird auf einen OD-Wert von 1,0 eingestellt und die Verdünnungsreihe in 1 ml Eppendorf-Tubes (s. Abb. 3.3.) vorbereitet.

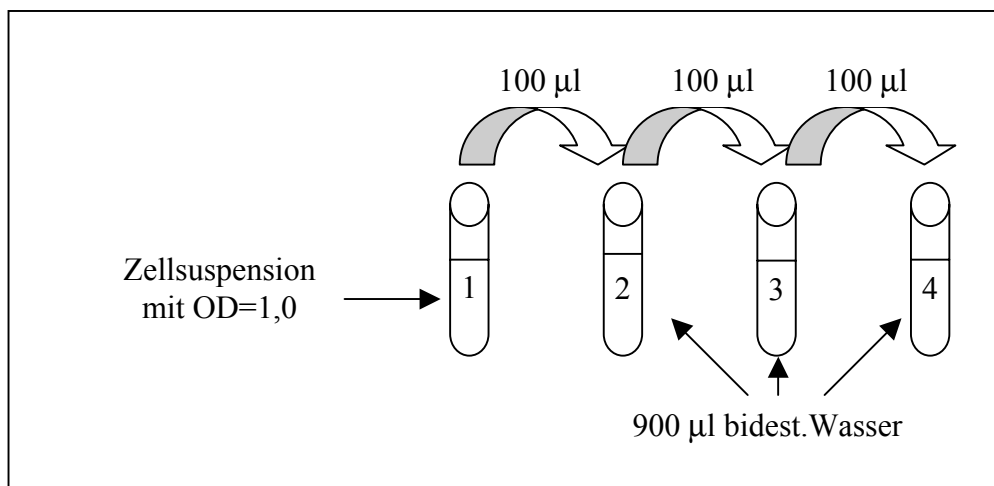


Abb. 3.3.: Schematische Darstellung der Verdünnungsstufen

In Eppendorf-Tube 1 ist die Zellsuspension mit OD von 1,0 vorgegeben. In Eppendorf-Tube 2,3 und 4 werden jeweils 900 µl steriles bidest. Wasser vorgelegt. Aus der Zellsuspension (Eppendorf-Tube 1) werden nun 100 µl in Eppendorf-Tube 2 zu den 900 µl Wasser zugegeben, gemischt (Vortex-Mixer, 30 s) und von dieser Suspension wiederum 100 µl in Eppendorf-Tube 3 pipettiert, usw.. Diese Verdünnungsreihe ist für jeden einzelnen zu testenden Hefestamm aufzustellen. Die anschließende Verteilung auf YPDA-Platten mit unterschiedlichen NaCl- und Sorbitol-Konzentrationen erfolgt nach folgendem Schema:

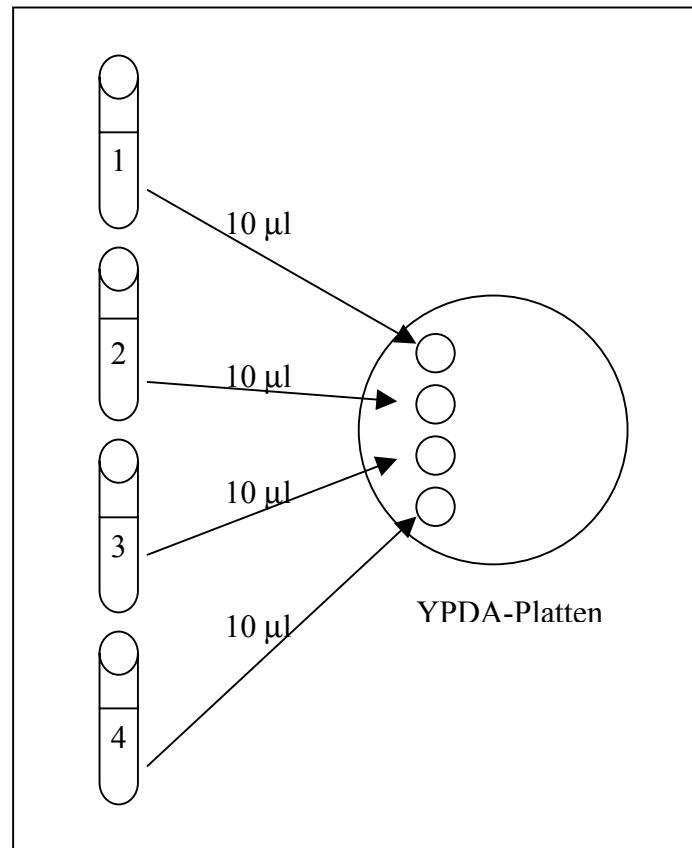


Abb. 3.4.: Schematische Darstellung der Verdünnungsstufen-Verteilung bei einem Drop-Test-Versuch für einen Hefestamm

Nach diesem Verteilungsschema werden mit einer Mikroliter-Spitze 10 µl Tropfen aus den einzelnen Verdünnungsreihen nacheinander auf eine YPDA-(Kontrolle) sowie YPDA-Platten mit 4 % NaCl, 6 % NaCl, 8 % NaCl und 1 % Sorbitol aufgetragen. Es können maximal 4 Hefestämme mit jeweils 4 Verdünnungsstufen pro Agarplatte getestet werden.

Anschließend werden die beimpften Platten unter anaeroben Bedingungen in einer Spezial-Anaerob-Kammer (Lundberg Labor) bei 30 °C inkubiert und nach 2 Tagen das Wachstum bewertet.

3.3. Fermentationsexperimente mit Laborhefestämmen in Traubensaftmedium (FH Geisenheim, FG Mikrobiologie, 1999)

Zur Überprüfung der Fermentationsfähigkeit von Laborhefestämmen, die bestimmte Deletionen des Glycerinbildungsweges aufweisen, wurden Gärversuche unter oenologischen Bedingungen in Traubensaftmedium durchgeführt.

Die Hefezellen von Laborstämmen wurden in Erlenmeyerkolben, befüllt mit 50 ml sterilem Traubensaftmedium, im Brutschrank bei 27 °C 12 h lang inkubiert. Bei der anschließenden Zellzahlbestimmung wird die Gesamtzellzahl sowie der Anteil an toten und vitalen Zellen bestimmt. Diese Fermentationsexperimente wurden im Batch-Fermenter durchgeführt. Nach einer 12-stündigen Inkubationszeit wurde die erste Probe entnommen und in den nachfolgenden 60 h Fermentationszeit alle 1-2 h über den gesamten Arbeitstag. Die Proben wurden zur Bestimmung von Nass- und Trockengewicht der Zellsuspension bei 3000 U./min. 5 min. lang zentrifugiert. Hingegen wurde der Überstand aus den Zentrifugiergläsern in Proberöhrchen (4*10 ml) gefüllt und bei 20 °C aufbewahrt. Diese Proben wurden auf sekundäre Gärungsprodukte während der Fermentation untersucht.

3.4. Fermentationsexperimente mit Laborhefestämmen mit verschiedenen synthetischen Nährmedien und unterschiedlichen Zuckerkonzentrationen (FH Geisenheim, FG Mikrobiologie, 1999)

Zur Überprüfung der Fermentationsfähigkeit von Hefezellen mit Deletionen von Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase (*GPD1*, *GPD2*) und von Glycerin-2-phosphatase (*GPPI*, *GPP2*) wurden Experimente unter oenologischen Bedingungen durchgeführt. In der Versuchsanordnung wurden unterschiedliche Aminosäuren- und Zuckerkonzentrationen in den Gärmedien getestet, um Einflüsse der Nährstoffversorgung und des osmotischen Druckes auf die Zellen zu ermitteln.

Die Versuche wurden in einem Batch-Fermenter mit synthetischen Nährmedien, Minimal-Aminosäuremedium (ASI) und reichhaltigem Aminosäuremedium (ASII), durchgeführt. Weiterhin wurden variierende Gesamtzuckerkonzentrationen, 20 g/l und 180 g/l, eingesetzt.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 3.5.) verdeutlicht den experimentellen Aufbau:

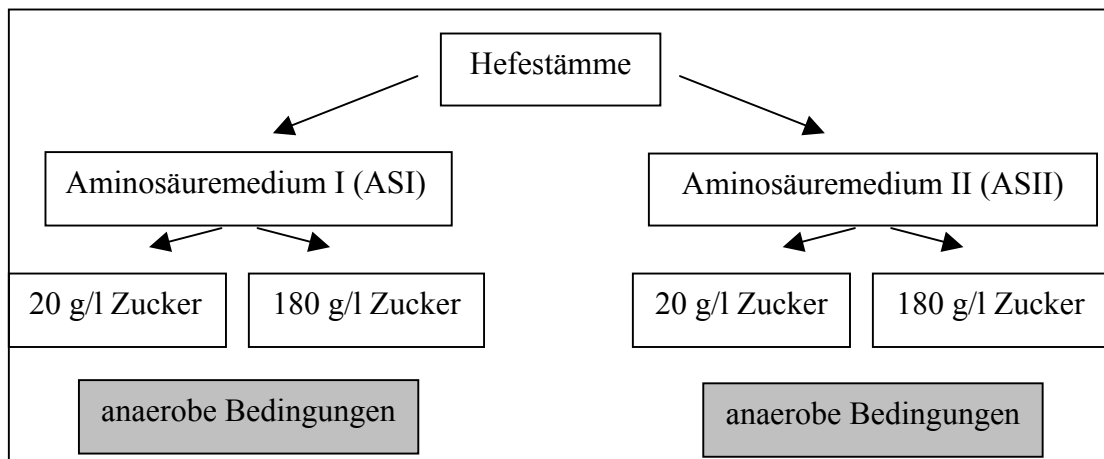


Abb. 3.5.: Schematischer Aufbau des 7. Fermentationsexperimentes

Das erste Fermentationsexperiment wurde unter anaeroben Bedingungen mit Hefezellen des Stammes W 303-A als Kontrollhefestamm durchgeführt. Das Gärmedium: ein synthetisches Nährmedium ASI mit 20 g/l Gesamtzuckergehalt. Im zweiten Experiment wurde wiederum das Wachstum der Hefezellen des Stammes W 303-A (Kontrolle) im synthetischen Nährmedium ASI mit 180 g/l Gesamtzuckergehalt getestet. Nach dieser Testreihe konnten die Zellen des *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*-Stammes in derselben Reihenfolge wie bei der Testreihe des Stammes W 303A untersucht werden. Nachdem beide Hefestämme die Fermentationsexperimente im synthetischem Nährmedium ASI durchlaufen hatten, wurde die komplette Testreihe auch mit dem synthetischem Nährmedium ASII durchgeführt.

Die Inkubationszeiten, die Fermentationszeiten und Probenahmen wurden wie unter Punkt 3.2. beschrieben, durchgeführt.

3.5. Fermentationsexperimente zur Ermittlung der Glycerinbildungsfähigkeit von Weinhefestämmen und gentechnisch veränderten Hefestämmen (FH Geisenheim, FG Mikrobiologie, 1999)

Unter oenologischen Fermentationsbedingungen wurde das Glycerinbildungsvermögen von in der Praxis eingesetzten Weinhefestämmen verglichen mit dem von gentechnisch veränderten Hefestämme, welche überexprimierte *GPD1*-Aktivität enthielten.

Die verschiedenen Hefestämme wurden in Erlenmeyerkolben mit 150 ml Traubensaftmedium inokuliert. Es ist zu beachten, dass bei den Hefestämmen mit plasmidständigen Resistenzgenen Traubensaftmedium mit Phleomycin-Zusatz verwendet werden muss, um das Wachstum von plasmidlosen Hefezellen zu unterdrücken. Die Fermentation erfolgt in Sektflaschen (Volumen 750 ml), die mit 650 ml sterilem Traubenmostmedium gefüllt sind. Die Gärtemperatur beträgt 20 °C und 25 °C. Am Gärende werden die Proben zentrifugiert 5 min. lang bei 3000 U./min. und der 100 ml Überstand in Probeflaschen (2*50 ml) eingefroren für chromatographische Bestimmungen und für nasschemische und enzymatische Untersuchungen.

3.6. Fermentationsexperimente zur Bestimmung des intra- und extra-zellulären Glycerinbildungsvermögens von Weinhefestämmen (FH Geisenheim, FG Mikrobiologie, 1999)

Die Durchführung dieses Fermentationsexperimentes diente der Bestimmung des intra- und extra-zellulären Glycerinbildungsvermögens von 12 verschiedenen Weinhefestämmen aus den Bereichen der Weißwein- und Sekt-Bereitung.

Bei dieser Versuchsanordnung werden zwei verschiedene Gärmedien verwendet. Die Zusammensetzung des ersten Gärmediums entspricht dem synthetischem Nährmedium ASII mit einer Gesamtzuckerkonzentration von 180 g/l und das zweite Gärmedium besteht aus angereichertem Traubenmost mit einer Konzentration von 180 g/l Gesamtzucker. Von jedem untersuchtem Hefestamm wird pro Gärvariante eine Wiederholung angesetzt. Die verwendeten Gärbehälter sind Sektflaschen (Volumen 750 ml) und die Fermentationstemperatur beträgt 15 °C und 20 °C.

Nach Abschluss der Gärung werden die einzelnen Gärvarianten 10 min. lang bei 3000 U./min. abzentrifugiert und 100 ml Überstand werden eingefroren und später für chromatographische, nasschemische und enzymatische Untersuchungen verwendet.

IV. Ergebnisse

Das nachfolgende Kapitel Ergebnisse ist in die Teilbereiche Untersuchungen der Fermentationsleistung von Weinhefestämmen und gentechnisch veränderten Hefestämmen untergliedert. Die Zielsetzung dieses Abschnittes ist es, einen Vergleich der Glycerinbildung, der Fermentationsleistung und der Bildung von sekundären Gärungsprodukten zwischen Weinhefestämmen und gentechnisch veränderten Hefestämmen durchzuführen. Im zweiten Teilbereich des Kapitels Ergebnisse werden Untersuchungen mit Deletionsstämmen, d. h. Stämmen, die Deletionen der Glycerin-dehydrogenase (*gpd1Δgpd2Δ*), der Glycerin-phosphatase (*gpp1Δ gpp2Δ*) sowie vollständige Gendeletion von beiden Enzymen (*gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*) enthalten, aufgezeigt. In diesem Zusammenhang sollen folgende Fragestellungen diskutiert werden:

- Ist ein Wachstum der Deletionsstämme unter anaeroben Bedingungen möglich?
- Welchen Einfluss hat die Verwendung von verschiedenen Nährmedien auf die Wachstumsbedingungen dieser Deletionsstämme?

4.1. Weinhefestämme

Im diesem Kapitel werden die Ergebnisse über die Variabilität der Fermentationsleistung von Weinhefestämmen dargestellt.

4.1.1. Einfluss der Gärtemperatur auf die Glycerinbildung, den Endvergärungsgrad und die Bildung von sekundären Gärungsprodukten

4.1.1.1. Einfluss der Gärtemperatur auf die Glycerinbildung

Im Folgenden wurde der Einfluss der Gärtemperatur auf die Bildung von Glycerin unter oenologischen Bedingungen untersucht.

Die verwendeten Weinhefestämme dieser Testreihe sind handelsübliche Präparate, welche hauptsächlich für die Weißwein- und Sektproduktion eingesetzt werden.

Um den Einfluss der Gärtemperatur auf die Glycerinbildung zu ermitteln, erfolgte die Fermentation der verschiedenen Hefestämme sowohl bei 15 °C als auch bei 20 °C in Traubenmostmedium mit 180 g/l Zuckerkonzentration.

Nach Beendigung der Gärung wurden die Restzucker-, die Glycerin- (intra- und extra-zellulär), die Alkohol-, die Acetaldehyd-, die Acetat- und die Pyruvat-Konzentrationen ermittelt und eine Bestimmung der Gesamtzellzahl durchgeführt. In der nachfolgenden Abbildung sind die Restzucker- sowie die intra-/extra-zellulären Glycerin-Konzentrationen aufgelistet.

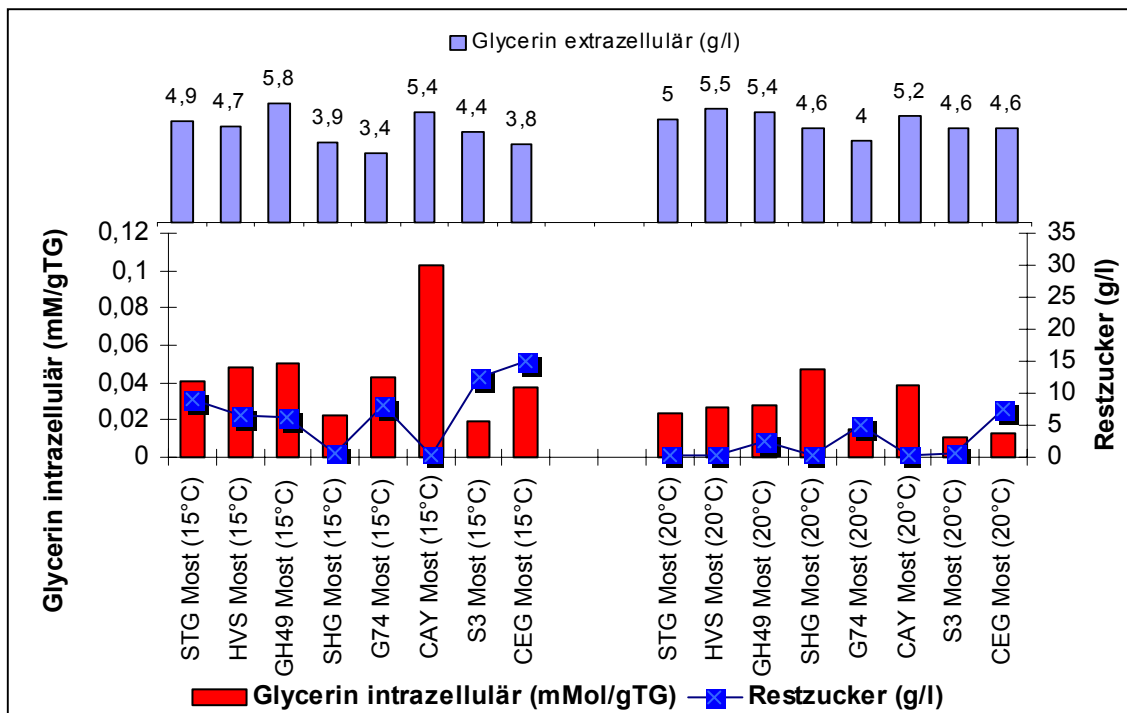


Abb. 4.1.: Glycerin- (intra-/extra-zellulär) und Restzucker-Konzentrationen von Weinhefestämmen bei 15 °C und 20 °C

Aus den Ergebnissen ist zu ersehen, dass die Fermentationsleistung der untersuchten Weinhefestämme bei 15 °C Gärtemperatur geringer ist als bei 20 °C.

Mit Ausnahme der Hefestämme SHG und CAY konnte keine der untersuchten Hefestämme der 15 °C-Testreihe den Gesamtzuckergehalt des Traubenmostes vollständig umsetzen. Die höchste Restzuckerkonzentration mit 14,9 g/l wurde bei der CEG-Gärvariante festgestellt. Hingegen variierten die Restzuckerkonzentrationen der 20 °C-Varianten zwischen 0,2 g/l und 7,5 g/l ($\bar{\Delta}$ 2,3 g/l). Aus der Abb. 4.1. ist erkennbar, dass bei der 15 °C-Testreihe die extrazellulären Glycerinkonzentrationen zwischen 3,4 und 5,8 g/l ($\bar{\Delta}$ 4,5 g/l) Glycerin lagen. Der höchste extrazelluläre Glycerinwert wurde in der Probe vergoren mit dem Hefestamm GH49 mit 5,8 g/l und der niedrigste Wert mit 3,4 g/l bei der Gärvariante mit dem CAY-Hefestamm ermittelt.

Die extrazellulären Glycerinkonzentrationen lagen bei den 5 °C wärmer vergorenen Proben zwischen 4,4 und 5,5 g/l (Ø 4,8 g/l) Glycerin.

Die Ergebnisse der intrazellulären Glycerinkonzentrationen verdeutlichen, dass die Untersuchungen bei 20 °C niedrigere Konzentrationen (Ø 0,029 mM/gTG) aufwiesen als die 15 °C-Varianten (Ø 0,045 mM/gTG). Dies ist ein Hinweis, dass ein Temperaturniveau von 15 °C für Weinhefen ein höheres Stresspotenzial darstellt, als Temperaturen von 20 °C.

Zusammenfassend ist feststellbar, dass bei einer Fermentation unter oenologischen Bedingungen bei 15 °C die Gäraktivität von Weinhefen im Vergleich zu den bei 20 °C vergorenen Varianten geringer ist, dass die extrazellulären Glyceringehalte bei den wärmer vergorenen Varianten höher sind und bei der 15 °C Gärtemperatur eine Erhöhung der intrazellulären Glycerinkonzentration erfolgt.

4.1.1.2. Einfluss der Gärtemperatur auf die Bildung von weiteren sekundären Gärungsprodukten

Tab. 4.1.: Alkohol-, Acetaldehyd-, Pyruvat-, Acetat-Konzentrationen sowie die Bestimmung der Gesamtzellzahl von Weinhefestämmen bei 15 °C und 20 °C

Gärvarianten	Alkohol (g/l)	Acetaldehyd (mg/l)	Pyruvat (mg/l)	Acetat (g/l)	Gesamtzellzahl (* 10 ⁶ Zellen/ml)
STG Most (15 °C)	75,3	19	19,2	0,55	24,9
HVS Most (15 °C)	76,4	22	20,0	0,49	16,2
GH49 Most (15 °C)	77,5	35	21,4	0,61	22,2
SHG Most (15 °C)	81,3	20	13,4	0,48	16,9
G74 Most (15 °C)	74,3	31	12,9	0,22	33,2
CAY Most (15 °C)	78,1	19	18,3	0,52	18,4
S3 Most (15 °C)	75,9	37	18,5	0,32	28,5
CEG Most (15 °C)	69,5	25	12,5	0,37	24,2
Ø 15 °C-Varianten	76,0	26	17,0	0,44	23,1

Gärvarianten	Alkohol (g/l)	Acetaldehyd (mg/l)	Pyruvat (mg/l)	Acetat (g/l)	Gesamtzellzahl (* 10 ⁶ Zellen/ml)
STG Most (20 °C)	79,0	10	15,3	0,49	21,5
HVS Most (20 °C)	81,7	27	20,3	0,46	11,5
GH49 Most (20 °C)	79,8	30	19,7	0,59	24,0
SHG Most (20 °C)	81,3	22	18,5	0,43	15,6
G74 Most (20 °C)	79,9	25	17,2	0,2	28,8
CAY Most (20 °C)	81,6	31	16,3	0,52	14,3
S3 Most (20 °C)	80,7	32	18,5	0,19	22,5
CEG Most (20 °C)	73,7	21	12,2	0,36	20,9
Ø 20 °C-Varianten	79,7	25	17,2	0,40	19,9

Hinsichtlich der sekundären Gärungsprodukte (Acetaldehyd, Pyruvat und Acetat) konnte keine Korrelation zur Glycerinbildung zwischen den 15 °C- und den 20°C-Varianten festgestellt werden. Die Alkoholgehalte bei der Gärung bei 15 °C variierten zwischen 69,5 g/l-81,3 g/l (Ø 76,0 g/l) Alkohol bzw. 73,7 g/l und 81,7 g/l (Ø 79,7 g/l) Alkohol bei den 5 °C wärmer vergorenen Proben. Diese unterschiedlichen Konzentrationsschwankungen spiegeln die unterschiedliche Fermentationsleistung der getesteten Weinhefestämme wider.

Anhand der Gesamtzellzahl-Bestimmung bei den 15 °C- und 20 °C-Gärvarianten ist erkennbar, dass bei den kühler vergorenen Varianten (Ø 23,1 * 10⁶ Zellen/ml) eine höhere Biomassenbildung als bei den 20 °C Gärvarianten (Ø19,9 * 10⁶ Zellen/ml) erfolgte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine Erhöhung der Hefebiomasse nicht einhergeht mit einer erhöhten biochemischen Verstoffwechslung des Mostzuckers.

4.1.2. Einfluss der Nährstoffzusammensetzung des Gärmediums

4.1.2.1. Einfluss der Nährstoffzusammensetzung des Gärmediums auf die Glycerinbildung

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Fermentationsversuche von Weinhefestämmen bei 20 °C in Traubenmost (Most) und im synthetischem Nährmedium (ASII) dargestellt. In der Abb. 4.2. sind die Restzucker- sowie die intra-/extra-zellulären Glycerin-Konzentrationen der einzelnen Gärvarianten dargestellt.

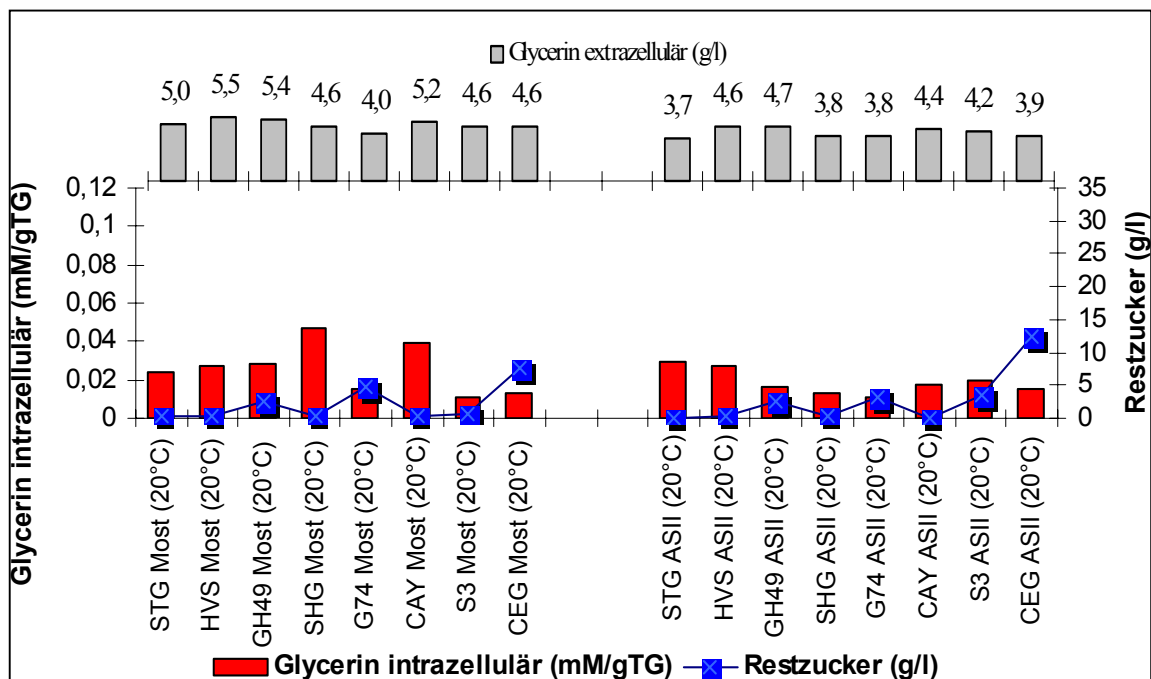


Abb. 4.2.: Glycerin- (intra-/extra-zellulär) und Restzucker-Konzentrationen von Weinhefestämmen in Traubenmost und synthetischem Nährmedium bei 20 °C

Anhand der ermittelten Restzuckergehalte zeigt sich, dass mit Ausnahme des Hefestammes CEG nur geringe Unterschiede zwischen den Gärvarianten vorhanden sind. Die Restzuckerkonzentrationen der Most-Gärvarianten variierten zwischen 0,2 und 7,5 g/l ($\bar{\Delta}$ 2,1 g/l). Im Vergleich dazu ergaben die mit synthetischem Nährmedien untersuchten Varianten Restzuckerwerte von 0,2 bis 14,5 g/l ($\bar{\Delta}$ 2,8 g/l). Es zeigte sich, dass die Hefestämme STG, HVS, SHG und CAY in beiden Versuchsansätzen vollständig vergoren. Hingegen konnten bei der Verwendung der G74- und CEG-

Hefestämme Restzuckerkonzentrationen von über 3,0 g/l in den Proben nachgewiesen werden.

Die extrazellulären Glycerinkonzentrationen bei den Traubenmost-Gärvarianten schwankten zwischen 4,0 g/l und 5,5 g/l (Ø 4,9 g/l) im Vergleich zu 3,7 g/l bis 4,7 g/l (Ø 4,1 g/l) bei den synthetischen Nährmedium-Gärvarianten.

Die mit Traubenmost vergorenen Proben enthielten intrazelluläre Glycerinkonzentrationen zwischen 0,011 mM/gTG und 0,047 mM/gTG (Ø 0,0255 mM/gTG) bzw. 0,011 mM/gTG und 0,029 mM/gTG (Ø 0,0185 mM/gTG) in den synthetischen Nährmedium-Proben.

Im Hinblick auf die hefeverfügbaren Nährstoffe zeigt sich, dass Weinhefestämme eine höhere Fermentationsleistung in Traubenmostmedien aufweisen als in vergleichbaren synthetischen Nährmedien.

4.1.2.2. Einfluss der Nährstoffzusammensetzung des Gärmediums auf die Bildung von weiteren sekundären Gärungsprodukten

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Fermentationsversuche von Weinhefestämmen bei 20 °C vergoren mit Traubenmostmedium (180 g/l Zuckerkonzentration) und mit einem synthetischem Nährmedium ASII (180 g/l Zuckerkonzentration) dargestellt. Dieser Vergleich soll den Einfluss der Nährstoffverfügbarkeit hinsichtlich der intra-/extra-zellulären Glycerinkonzentration von Weinhefestämmen aufzeigen.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Konzentrationen an Alkohol, Acetaldehyd, Pyruvat und Acetat sowie die Bestimmung der Gesamtzellzahl aufgelistet.

Tab. 4.2.: Alkohol-, Acetaldehyd-, Pyruvat-, Acetat-Konzentrationen sowie die Bestimmung der Gesamtzellzahl von Weinhefestämmen in Traubenmost und synthetischem Nährmedium (ASII) bei 20 °C

Gärvarianten	Alkohol (g/l)	Acetaldehyd (mg/l)	Pyruvat (mg/l)	Acetat (g/l)	Gesamtzellzahl (*10 ⁶ Zellen/ml)
STG Most (20 °C)	79,0	10	15,3	0,49	21,5
HVS Most (20 °C)	81,7	27	20,3	0,46	11,5
GH49 Most (20 °C)	79,8	30	19,7	0,59	24,0
SHG Most (20 °C)	81,3	22	18,5	0,43	15,6
G74 Most (20 °C)	79,9	25	17,2	0,20	28,8
CAY Most (20 °C)	81,6	31	16,3	0,52	14,3
S3 Most (20 °C)	80,7	32	18,5	0,19	22,5
CEG Most (20 °C)	73,7	21	12,2	0,36	20,9
Ø Most (20 °C)-Varianten	79,7	25	17,2	0,41	19,9
STG synthetisches Nährmedium (ASII) (20 °C)	81,3	9	36,0	0,65	17,6
HVS synthetisches Nährmedium (ASII) (20 °C)	81,1	9	28,0	0,73	14,4
GH49 synthetisches Nährmedium (ASII) (20 °C)	79,3	25	36,0	0,93	15,4
SHG synthetisches Nährmedium (ASII) (20 °C)	80,8	7	17,0	0,69	14,6
G74 synthetisches Nährmedium (ASII) (20 °C)	79,3	28	17,0	0,56	26,6
CAY synthetisches Nährmedium (ASII) (20 °C)	81,1	10	18,0	0,85	14,9
S3 synthetisches Nährmedium (ASII) (20 °C)	78,7	25	12,0	0,50	22,8
CEG synthetisches Nährmedium (ASII) (20 °C)	75,0	17	34,0	0,80	20,6
Ø synthetische Nährmedien (20 °C)-Varianten	79,6	16	25,0	0,71	18,4

Der Vergleich der Gehalte von gebildeten sekundären Gärungsprodukten zeigte, dass die Mostproben eine höhere durchschnittliche Acetaldehydkonzentration (\bar{x} 25 mg/l) als die mit dem synthetischen Nährmedium vergorenen Proben (\bar{x} 16 mg/l) enthielten. Der Korrelationskoeffizient zwischen den beiden sekundären Gärungsprodukten Acetaldehyd und Glycerin betrug bei den Mostproben $r^2 = 0,14$ und bei den synthetischen Nährmediumproben $r^2 = 0,07$. Dies zeigt, dass bei den Mostproben eine relativ hohe gemessene Konzentration an Acetaldehyd mit einer niedrigeren Konzentration an extrazellulärem Glycerin ermittelt werden konnte. Diese Korrelation konnte jedoch nur in geringerem Maße in den mit synthetischen Nährmedien vergorenen Proben festgestellt werden.

Bei den Gärvarianten mit synthetischem Nährmedium konnten höhere durchschnittliche Acetatkonzentrationen ermittelt werden. Die synthetischen Nährmedium-Varianten enthielten 0,71 g/l und die Mostproben 0,41 g/l Acetat. Die Berechnungen über die Beziehung zwischen dem extrazellulären Glyceringehalt und der Acetatkonzentration ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,82$ für die Mostproben und $r^2 = 0,55$ für die synthetischen Nährmediumproben. Hinsichtlich der Pyruvatkonzentrationen konnten bei den Mostproben durchschnittlich 17,2 mg/l bzw. 24,7 mg/l Pyruvat bei den synthetischen Nährmediumproben.

Hinsichtlich der Nährstoffzusammensetzung konnte keine Veränderung der Gesamtzellzahl festgestellt werden.

Anhand der dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass die Vergärung mit synthetischem Nährmedium unter den durchgeführten Gärbedingungen keinen signifikanten Effekt auf den Endvergärungsgrad der Weine hat. Die niedrigeren intra- und extra-zellulären Glycerinkonzentrationen der synthetischen Nährmedium-Gärvarianten deuten daraufhin, dass die Verwendung von synthetischem Nährmedium ein niedrigeres Stresspotenzial für die untersuchten Weinhefestämme darstellt. Dementsprechend konnte für das Medium Traubenmost ein stärkerer Zusammenhang zwischen der extrazellulären Glycerinkonzentration und den sekundären Gärungsprodukten Acetaldehyd und Acetat nachgewiesen werden.

Weiterhin verdeutlichen die Ergebnisse, dass eine Steigerung der Glycerinsynthese von Weinhefestämmen durch oenologische Faktoren nur in begrenztem Umfang erzielt werden kann. Im Folgenden wird der Einfluss der transformierten Weinhefestämme

sowie der handelsüblichen Weinhefestämme auf die Glycerinbildung bei unterschiedlichen Gärtemperaturen und Nährmedienzusammensetzungen vorgestellt.

4.2. Gentechnisch veränderte Hefestämme

Die transformierten Weinhefen enthielten Vektoren ohne *GPD1*- oder Multi-Kopie-Vektoren mit *GPD1*-Aktivität.

Warum Überexpression von *GPD1*? Einen Zusammenhang zwischen der Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase Aktivität und der Glycerinbildung konnten Radler und Schutz (1982) und Michnick et al. (1997) nachweisen. Radler und Schutz (1982) transformierten in haploiden *Saccharomyces cerevisiae* Weinhefestämmen Vektoren mit *GPD1*-Aktivität unter der Kontrolle eines *ADHI*-Promoters und erzielten eine 4-fache Steigerung der Glycerinkonzentration in Weinen. Gleichzeitig ergaben die Untersuchungen der sekundären Gärungsprodukte eine Reduktion der Ethanolwerte und eine Erhöhung von Acetaldehyd-, Essigsäure-, Acetoin-, Succinat- und 2,3-Butandiol-Konzentrationen.

4.2.1. Einfluss von gentechnisch veränderten Hefestämmen auf die Glycerinbildung

Die zu testenden transformierten Hefestämme mit integriertem ZEO-Gen im Plasmid sind im Folgenden mit dem Kürzel T gekennzeichnet. So steht 522D/T für den transformierten Hefestamm 522D, 71B/T für den Stamm 71B und K1m/T für den Hefestamm K1m.

Die Hefestämme, in denen *GPD1* durch die Transformation mit dem pVT100-U-GPD1-ZEO-Vektor überexprimiert wurde, werden als 522B/GPD1, 71B/GPD1 und K1m/GPD1 bezeichnet.

Mit den kommerziell erhältlichen K1m, CEG, W15 und S3 wurden weitere Weinhefestämme zum Vergleich herangezogen.

Bei den Versuchsansätzen mit transformierten Hefen wurde das Gärmedium mit dem Antibiotikum Phleomycin versetzt, um eine weitere Vermehrung von Hefen, welche die Plasmide verloren hatten, zu unterdrücken. Die Untersuchungen wurden bei einer Gärtemperatur von 20 °C und 25 °C durchgeführt, um einen möglichen Temperatureinfluss auf die Glycerinbildung nachweisen zu können.

Die vergorenen Proben wurden auf Restzucker-, Alkohol-, Glycerin-, Acetaldehyd- und Acetat-Gehalte untersucht.

4.2.2. Einfluss von gentechnisch veränderten Hefestämmen auf die Fermentationsleistung

Im Folgenden sind die Endvergärungsparameter, Restzucker- und Alkohol- sowie die Glycerin-Konzentrationen der vergorenen Proben graphisch dargestellt.

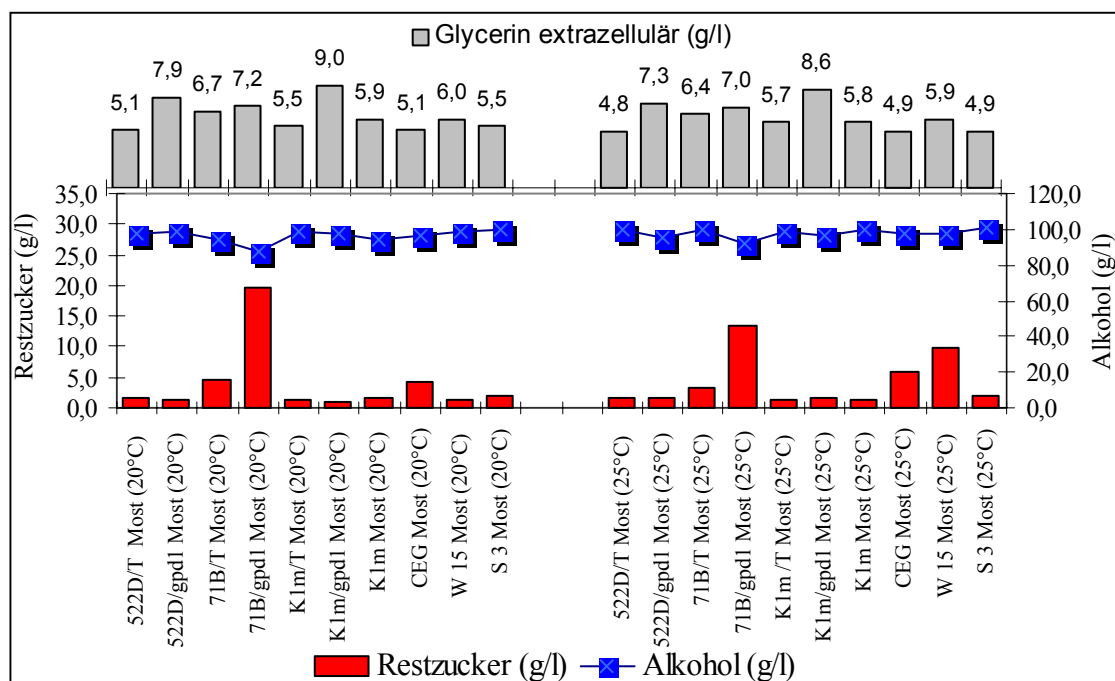


Abb. 4.3.: Restzucker-, Alkohol- und extrazelluläre Glycerin-Konzentrationen von 10 verschiedenen Hefestämmen bei 20 °C und 25 °C

Bei dieser Versuchsdurchführung zeigte sich, dass nicht alle Gärvarianten den vorhandenen Gesamtzuckergehalt vollständig verstoffwechseln konnten. Die Restzuckerkonzentration der verschiedenen Gärvarianten lag zwischen 0,9 g/l und 18,8 g/l. Eine vollständige Vergärung des Ausgangzuckergehaltes konnte bei 2/3 der untersuchten Hefestämme festgestellt werden. Ausnahmen bildeten die Stämme 71B, CEG und W15. Bei Verwendung des Hefestammes 71B/GPD1 wurde mit einem Wert von 18,75 g/l die höchste Restzuckerkonzentration aller untersuchten Proben ermittelt. Weiterhin war erkennbar, dass die Gärvarianten des CEG-Hefestammes nach der

Gärung über 5 g/l Restzucker aufwiesen. Unabhängig von der Gärtemperatur konnte bei den gentechnischen veränderten Hefen mit Ausnahme der Hefestämme 71B/T und 71B/GPD1 kein Restzuckergehalt über 1,5 g/l festgestellt werden. Dies ist ein Indiz für eine gute Fermentationseigenschaft dieser Hefestämme.

Die ermittelten Glyceringehalte aller untersuchten vergorenen Proben variierten zwischen 4,6 g/l und 9,0 g/l Glycerin. Die durchschnittliche Glycerinkonzentration der kommerziell erhältlichen Weinhefestämme lag im Mittel bei 5,5 g/l und der Gehalt der gentechnischen veränderten Hefestämme durchschnittlich bei 6,8 g/l Glycerin. Es zeigte sich, dass die Hefestämme mit Plasmiden ohne *GPD1* durchgängig eine geringere Glycerinkonzentration aufwiesen als die Hefestämme mit überexprimierter *GPD1*-Aktivität. Den höchsten Glyceringehalt konnte bei den Gärvarianten mit dem Hefestamm K1m/GPD1 mit 9,0 g/l erreicht werden. Im Vergleich zu den Proben vergoren mit dem Hefestamm K1m entsprach dies einer Erhöhung um ca. 3,0 g/l Glycerin.

4.2.3. Einfluss der Gärtemperatur auf die Bildung von Acetat und Acetaldehyd

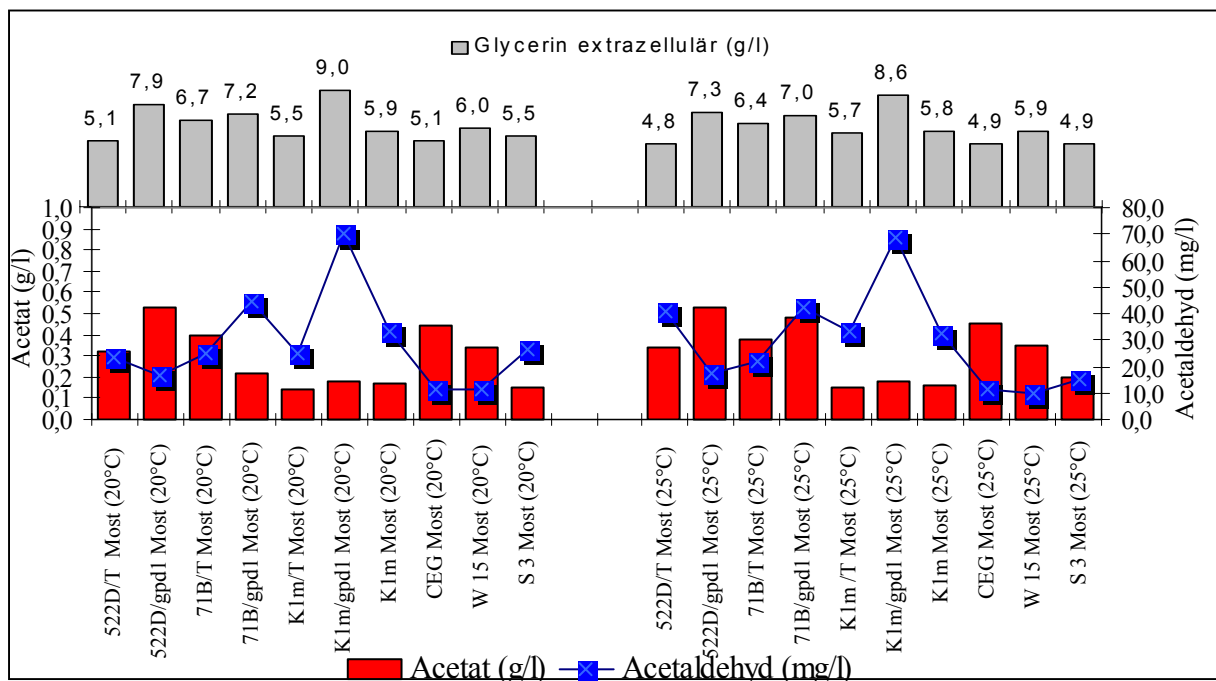


Abb. 4.4.: Acetat-, Acetaldehyd- und extrazelluläre Glycerin-Konzentrationen von 10 verschiedenen Weinhefestämmen bei 20 °C und 25 °C

Die Aussage: Hefen mit hohem Glycerinbildungsvermögen weisen aufgrund der Verschiebung des NAD/NADH₂-Redoxgleichgewichtes relativ hohe Acetaldehydgehalte auf, trifft teilweise auch auf die getesteten Hefestämme zu. Die mit nicht modifizierten Weinhefestämmen vergorenen Proben wiesen Acetaldehydgehalte zwischen 10 mg/l und 30 mg/l auf. Hingegen konnten bei den gentechnisch veränderten Hefestämmen große Konzentrationsschwankungen ermittelt werden. Die Acetaldehydkonzentrationen der Proben mit veränderten Hefestämmen lagen zwischen 10 mg/l und 70 mg/l. Besonders auffällig hohe Konzentrationen an Acetaldehyd konnten beim Hefestamm 71B/GPD1 und noch stärker beim Hefestamm K1m/GPD1 nachgewiesen werden. Die entsprechenden T-Plasmide, wiesen diese erhöhten Acetaldehydkonzentrationen nicht auf.

Hefen mit höherem Glycerinbildungsvermögen bilden verstärkt Acetaldehyd, da das NAD/NADH₂-Gleichgewicht zugunsten der Glycerinsynthese verschoben wird. Diese Verschiebung spiegelt sich in den ermittelten Acetatkonzentrationen der Proben wider. Die untersuchten Proben mit hohen Acetaldehydkonzentrationen (> 40 mg/l) enthielten niedrige Acetatgehalte (< 0,2 g/l). Demnach konnten negative Korrelationskoeffizienten für die 20 °C-Varianten $r^2=-0,4$ und die 25 °C-Proben $r^2=-0,6$ zwischen den Acetaldehyd- und Acetat-Konzentrationen ermittelt werden.

4.3. Ergebnisse der Drop-Test-Versuche

Hefen können durch unterschiedliche NaCl-haltige Nährmedien auf ihre Wachstumsfähigkeit hin getestet werden. NaCl induziert gegenüber der Hefezelle zwei verschiedene Stresssituationen: osmotischen und Ionentoxizität-Stress. Osmotischer Stress ist nicht spezifisch NaCl zuzuordnen. Andere Substanzen können ebenfalls diese Stressart hervorrufen. Die Ionentoxizität beinhaltet die Einflussgröße, in welchem Ausmaß das Zellwachstum durch NaCl beeinträchtigt werden kann. In glucosehaltigen Medien ist die Na⁺-Konzentration ein limitierender Faktor, da NaCl wesentlich toxischer als die gleichwertige osmotische Konzentration an Sorbitol oder KCl ist.

Einige Hefestämme sind nicht in der Lage, in einem 2 %igen NaCl-haltigen Medium zu wachsen. Die für Untersuchungen der osmotischen Stressbedingungen am häufigsten verwendeten Hefestämme sind W 303A und YPH. Beide Hefestämme besitzen die Fähigkeit, noch in 10 %igen NaCl-Medien zu wachsen. Testergebnissen zufolge

entspricht das Wachstum der Hefestämme in 7 %igen NaCl-Lösung (1,2 M) einer Wasseraktivität von 0,960, was einem hyperosmotischen Schock gleichzusetzen ist. Eine 7 %ige NaCl-Lösung besitzt die gleiche Wasseraktivität wie eine 65 %ige Saccharoselösung (1,8 M). Dies erklärt auch, warum man eher eine geringere Quantität an NaCl verwendet, anstatt hohe Gehalte an Zucker für die gleichen Bedingungen in einer Lösung herzustellen (Hohmann and Mager, 1997).

Hefezellen, welche nicht in der Lage sind bei 1M NaCl zu wachsen, sind per Definition sensitiv gegenüber hyperosmotischem Stress.

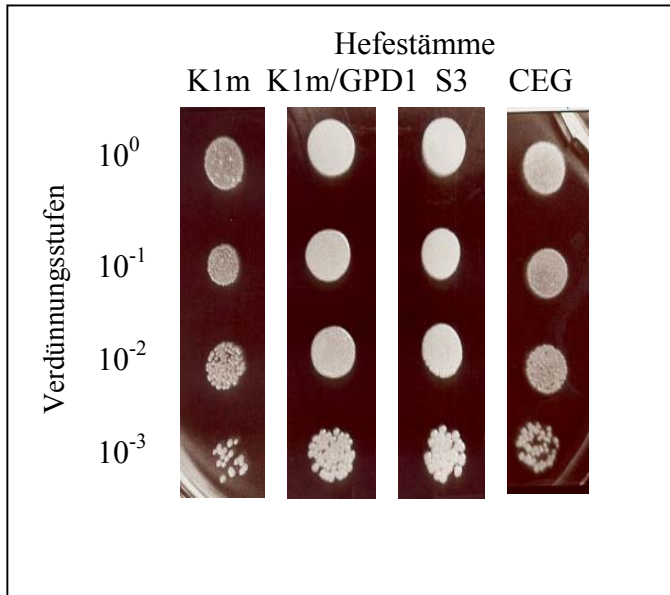
Die osmotischen Verhältnisse von Traubenmost sind charakterisiert durch die hohen Konzentrationen an Glucose und Fructose zu Beginn der Gärung und durch Ethanol am Ende der alkoholischen Gärung. Beispielsweise werden aus 200 g/l Gesamtzucker zu Beginn der Gärung durchschnittlich 93 g/l Gesamtalkohol gebildet, dies entspricht einer Reduzierung der Wasseraktivität von 0,9765 zu 0,9592. Diese Reduktion der Wasseraktivität ist mit einer verringerten NaCl-Konzentration von 1,2 M (7 % NaCl) auf 0,7 M (4 % NaCl) gleichzusetzen.

4.3.1. Ergebnisse der Drop-Test-Versuche mit Weinhefestämmen und mit gentechnisch veränderten Laborhefestämmen

Im Folgenden wird die Untersuchung der Weinhefestämme K1m, S3 und CEG sowie des transformierten Hefestammes K1m/GPD1 unter anaeroben Bedingungen auf unterschiedlichen Nährmedien beschrieben. Ziel war es, herauszufinden ob bei einer Steigerung des extrazellulären osmotischen Druckes eine Wachstumsstörung der verschiedenen Stämme verursacht wird. Als Kontrollmedium wurde YPDA-Medium verwendet und zur Überprüfung des osmotischen Stressempfindens wurden YPDA-Medien mit 4 % NaCl, 6 % NaCl, 8 % NaCl sowie 1 % Sorbitol getestet. YPDA-Medium enthält neben den herkömmlichen YPD-Medium einen Adeninzusatz. Für diese Untersuchungsserie ist der Adeninzusatz nicht von Bedeutung, jedoch ist er für die Versuchsanstellung mit Deletionsstämmen wichtig. Alle Deletionsstämmen enthalten eine *ade2*-Deletion, was einen Einfluss auf die Phänotypausbildung der Stämme hat. Die Deletionsstämmen würden nicht als weiße Kolonien sondern in rötlicher Farbe wachsen. Dementsprechend wurde zur Einhaltung der Vergleichbarkeit der Testbedingungen bei allen Drop-Test Untersuchungen Adenin in YPD-Medien zugeben.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

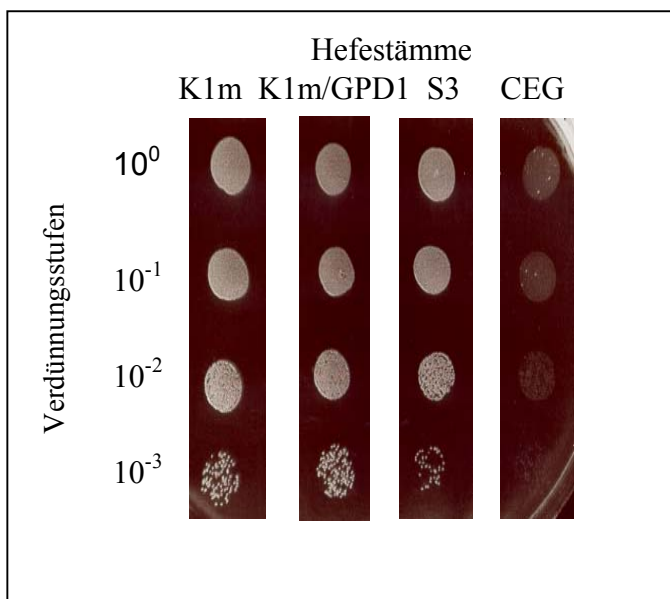
4.3.1.1. Kontrolle: YPDA-Medium unter anaeroben Bedingungen



Unter anaeroben Bedingungen auf YPDA-Medium wiesen die untersuchten Hefestämme keine Wachstumsstörungen auf.

Abb. 4.5.: Drop-Test: Kontrolle: YPDA-Platte

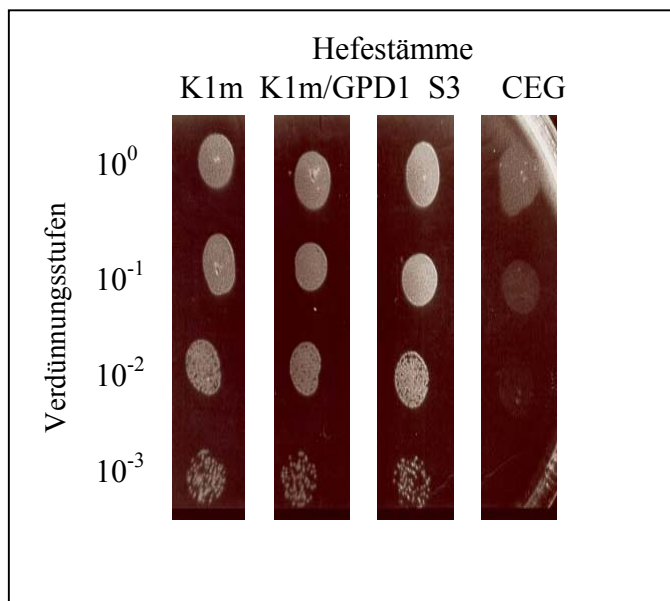
4.3.1.2. YPDA-Medium mit 4 % NaCl unter anaeroben Bedingungen



Eine 4 %ige NaCl Konzentration entspricht einer 0,7 M NaCl-Lösung bzw. dem osmotischen Druck eines durchgorenen Weines. Es zeigte sich, dass bei dieser Konzentration alle Hefestämme mit Ausnahme der Stammes CEG wachsen. Auffällig ist, dass auch bei der kleinsten Verdünnungsstufe kein Zellwachstum des Hefestammes CEG erkennbar war.

Abb. 4.6.: Drop-Test: YPDA-Platte 4 % NaCl

4.3.1.3. YPDA-Medium mit 6 % NaCl unter anaeroben Bedingungen

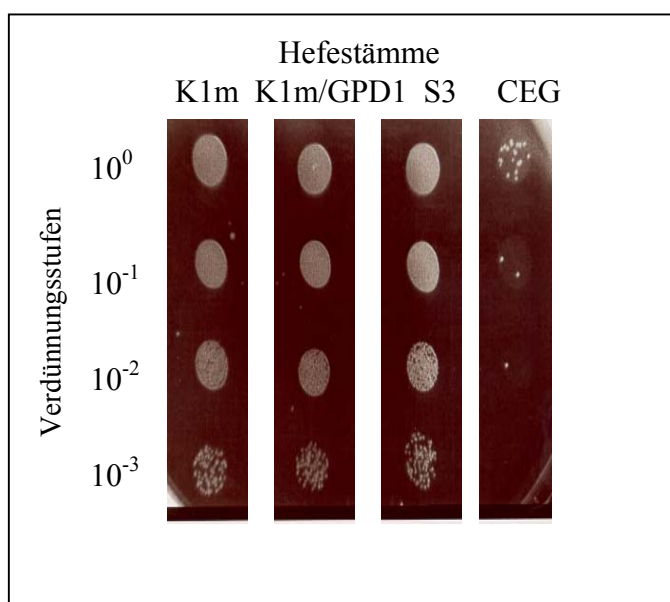


Eine Steigerung des osmotischen Druckes scheint für den transformierten Hefestamm K1m/GPD1 sowie für die Weinhefestämme K1m und S3 keine Wachstumsstörungen hervorzurufen. Hingegen ist beim Hefestamm CEG kein Wachstum erkennbar.

Abb. 4.7.: Drop-Test: YPDA-Platte 6 % NaCl

4.3.1.4. YPDA-Medium mit 8 % NaCl unter anaeroben Bedingungen

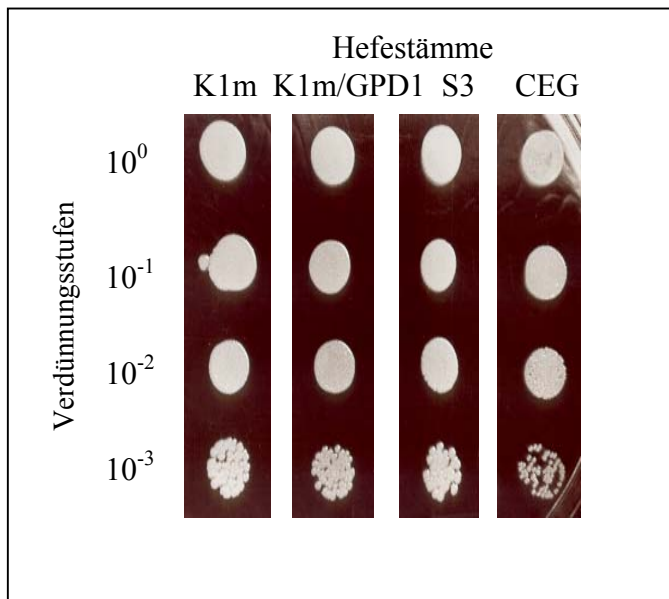
Die Konzentration von 8 % NaCl entspricht einer 1,4 M NaCl-Lösung, was per Definition einem hyperosmotischem Schockmedium entspricht. Dieser Konzentrationsbereich ist höher als



der osmotische Druck eines Traubenmostes zu Beginn der Gärung. Die Hefestämme K1m, K1m/GPD1 und S3 zeigen keine Wachstumsstörungen. Hingegen wuchsen bei der niedrigsten Verdünnungsstufe einige Zellen des Hefestammes CEG.

Abb. 4.8.: Drop-Test: YPDA-Platte 8 % NaCl

4.3.1.5. YPDA-Medium mit 1 % Sorbitol unter anaeroben Bedingungen



Die Konzentration von 1 % Sorbitol entspricht einer 0,05 M Sorbitollösung bzw. 0,1 % NaCl oder 0,02 M NaCl-Lösung. Alle vier untersuchten Hefestämme wiesen keine Wachstumsstörungen auf.

Abb. 4.9.: Drop-Test: YPDA-Platte 1 % Sorbitol

Im Gegensatz zum Weinhefestamm CEG konnten die Weinhefestämme K1m, S3 sowie der transformierte Hefestamm K1m/GPD1 bei steigenden externen osmotischen Drücken unter anaeroben Bedingungen wachsen. Die Zellen des Hefestammes CEG konnten nur bei 1 %-haltigem Sorbitolmedium (dies entspricht einer 0,1 %igen NaCl-Lösung) wachsen. Diese Versuchsergebnisse bestätigen, dass die Weinhefestämme K1m, K1m/GPD1 und S3 per se nicht sensitiv gegenüber hyperosmotischem Stress sind.

4.3.2. Ergebnisse der Drop-Test-Versuche mit Glycerin-Deletions-Laborhefen

Um die physiologischen Eigenschaften der Deletionsstämmen zu untersuchen, wurden der Kontrollstamm W 303A und dessen Deletionen mit *gpd1Δgpd2Δ* nach der Drop-Test-Methode mit 4 %, 6 %, 8 % NaCl und 1 % Sorbitol versetzten Medien untersucht. Zielsetzung dieser Untersuchungsreihe ist es, festzustellen ob ein Wachstum der Doppeldeletionen unter anaeroben Bedingungen möglich ist. Ein Wachstum der Doppeldeletionen würde einen Hinweis darauf geben, dass die Stämme noch Restaktivität von Glycerin-dehydrogenasen aufweisen oder dass in der Versuchsanordnung kein vollständig anaerobes Milieu vorherrscht.

4.3.2.1. Kontrolle: YPDA-Platte unter aeroben Bedingungen

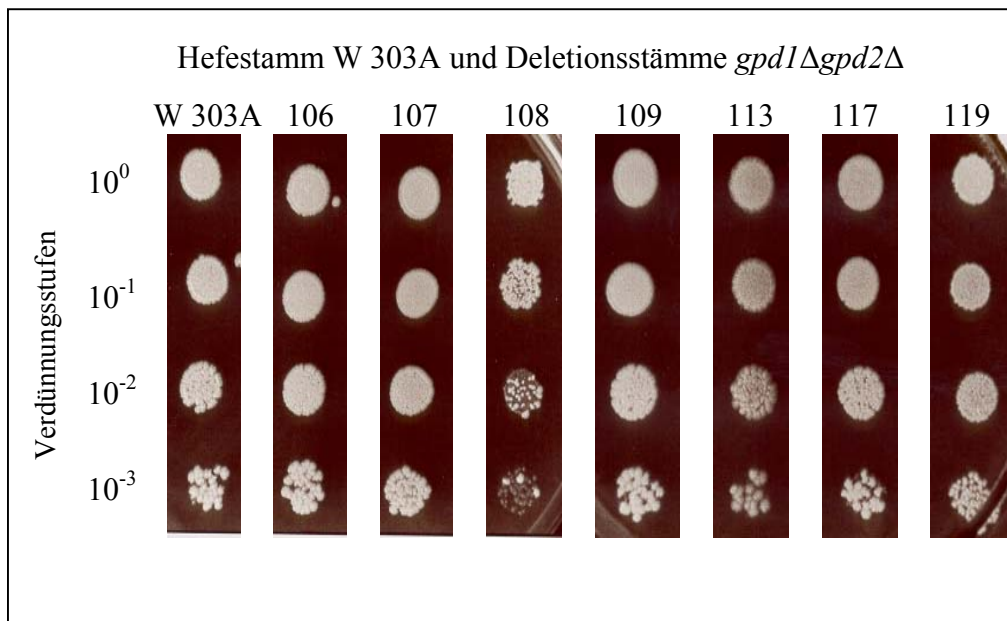


Abb. 4.10.: Drop-Test: aerobe Kontrolle: YPDA-Platte

Unter aeroben Bedingungen zeigen alle getesteten Hefestämme normales Wachstum.

4.3.2.2. YPDA-Platte unter anaeroben Bedingungen

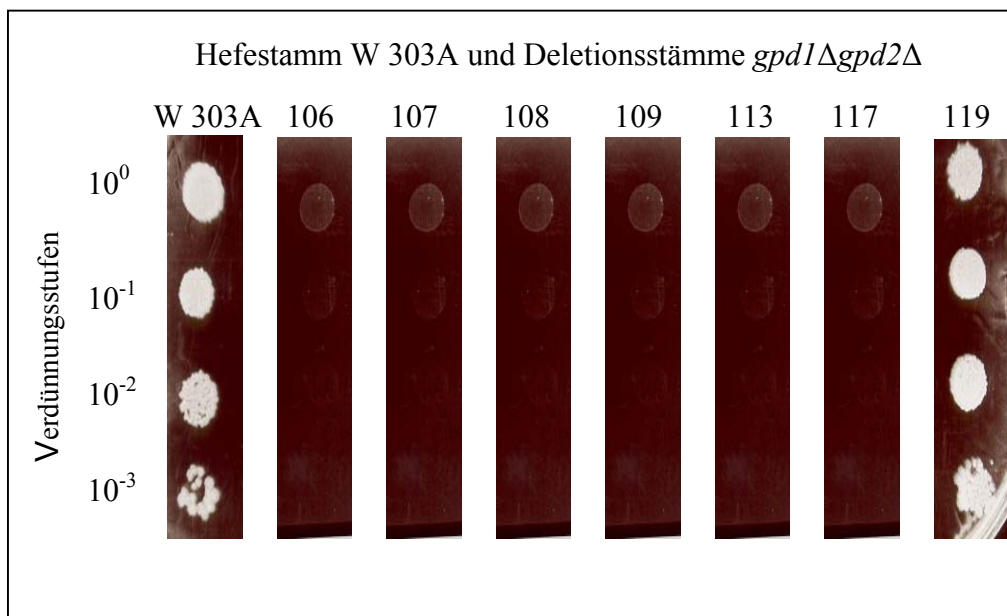


Abb. 4.11.: Drop-Test: YPDA-Platte

Mit Ausnahme des W 303A-Stammes und des Deletionsstammes 119 ist für die untersuchten Hefestämme kein Zellwachstum erkennbar. Die Testreihe wurde auch unter anaeroben Bedingungen mit YPDA-Platten mit 4 % NaCl, 6 % NaCl, 8 % NaCl und 1 % Sorbitol durchgeführt. Die Ergebnisse wurden nicht explizit aufgezeigt, da sie mit der Abb. 4.11 von YPDA-Medium unter anaeroben Bedingungen identisch sind.

Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse aus den Wachstumsuntersuchungen wurde aus der Gruppe der zur Verfügung gestellten Deletionsstämme *gpd1Δgpd2Δ* die Deletion 119 von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Denn eine Deletion der Isoformen von *GPD1* und *GPD2* verursacht ein intrazelluläres Redoxungleichgewicht, welches in einer vollständigen Wachstumshemmung unter anaeroben Bedingungen resultiert.

4.4. Hefestämme W 303A, S3 und K1m/GPD1

4.4.1. Einfluss der Hefestämme auf die Glycerinbildung, den Endvergärungsgrad und die Bildung weiterer sekundärer Gärungsprodukte

4.4.1.1. Einfluss der Hefestämme auf die Glycerinbildung

Anhand der Drop-Test Ergebnisse (s. Kap. 4.3.) konnte gezeigt werden, dass das Zellwachstum der Hefestämme K1m/GPD1 und S3 mit Ausnahme der Verwendung von CEG unter anaeroben Bedingungen nicht gehemmt wird.

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde innerhalb der ersten 40 Stunden der Fermentation der Weinhefestamm (S3), der Laborhefestamm (W 303A) sowie der gentechnisch veränderte Hefestamm (K1m/GPD1) hinsichtlich des Glycerinbildungsvermögens und sekundärer Aromenkomponenten untersucht.

In der folgenden Tabelle sind die Glucose- und Fructose-Abnahmen sowie die extrazellulären Glycerinkonzentrationen aufgelistet.

Tab. 4.3.: Glucose- und Fructose-Abnahmen sowie extrazelluläre Glycerinkonzentrationen der Hefestämme W 303A, S3 und K1m/GPD1

	W 303A	S3	K1m/GPD1
Glucoseabnahme (%)	8,4	9,9	8,9
Fructoseabnahme (%)	5,8	6,9	7,4
Glycerin (g/l)	0,88	0,91	1,25

Es zeigt sich, dass nach ca. 40 Stunden der Fermentation vom W 303A der geringste Anteil an Glucose verstoffwechselt wird. Der prozentuale Anteil beträgt 8,4 % gegenüber 9,9 % beim Weinhefestamm S3 und 8,9 % beim gentechnisch veränderten Stamm überexprimiert in *GPD1*-Aktivität. Der stärkere Abbau von Glucose ist für die glucophilen Weinhefestämme S3 und K1m/GPD1 kennzeichnend. Weiterhin ist erkennbar, dass der W 303A-Hefestamm im Vergleich zu den beiden anderen Weinhefestämmen eine geringere Verstoffwechslung von Fructose aufweist.

In den mit W 303A vergorenen Proben ist die Konzentration von Glycerin mit 0,88 g/l am geringsten. Die Gärvarianten der Hefestämme S3 und K1m/GPD1 enthielten 0,91 g/l bzw. 1,25 g/l Glycerin. Werden die Glucose- und Fructose-Abnahmen bei den mit dem Hefestamm K1m/GPD1 vergorenen Proben mit dem W 303A-Stamm verglichen, so ist festzustellen, dass trotz niedriger Fermentationsleistung des K1m/GPD1-Stammes eine hohe Konzentration an Glycerin nachgewiesen werden kann. Es zeigt sich, dass eine Überexpression von *GPD1* eine Reduzierung der Fermentationsleistung bei gleichzeitiger Erhöhung der Glycerinsynthese bewirkt.

4.4.1.2. Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von 2-/3-Methylbutanol und 2-/3-Methylbutylacetat

Erst nach 20-25 Fermentationsstunden beginnt die Synthese der Aromastoffe 2- und 3-Methylbutanol sowie deren Acetate. Anhand der Konzentrationsentwicklung zeigt sich, dass bei den Hefestämmen W 303A und S3 die Bildung von 3-Methylbutanol im Vergleich zur Bildung von 2-Methylbutanol stärker ist. Folglich ist auch ein stärkerer Konzentrationsanstieg des Folgeproduktes 3-Methylbutylacetat nachweisbar. Besonders auffällig ist die Synthese von 3-Methylbutanol bei den mit der Weinhefe S3 vergorenen

Proben. Dies kann als weinhefespezifisches Charakteristikum bezeichnet werden. Hingegen zeichnen sich die mit dem gentechnisch veränderten Hefestamm K1m/GPD1 vergorenen Proben durch eine höhere Konzentration von 3-Methylbutylacetat (0,067 mg/l) aus. Dies ist ein Indiz dafür, dass eine schnellere Verstoffwechslung von 3-Methylbutanol durch den Stamm K1m /GPD1 erfolgt.

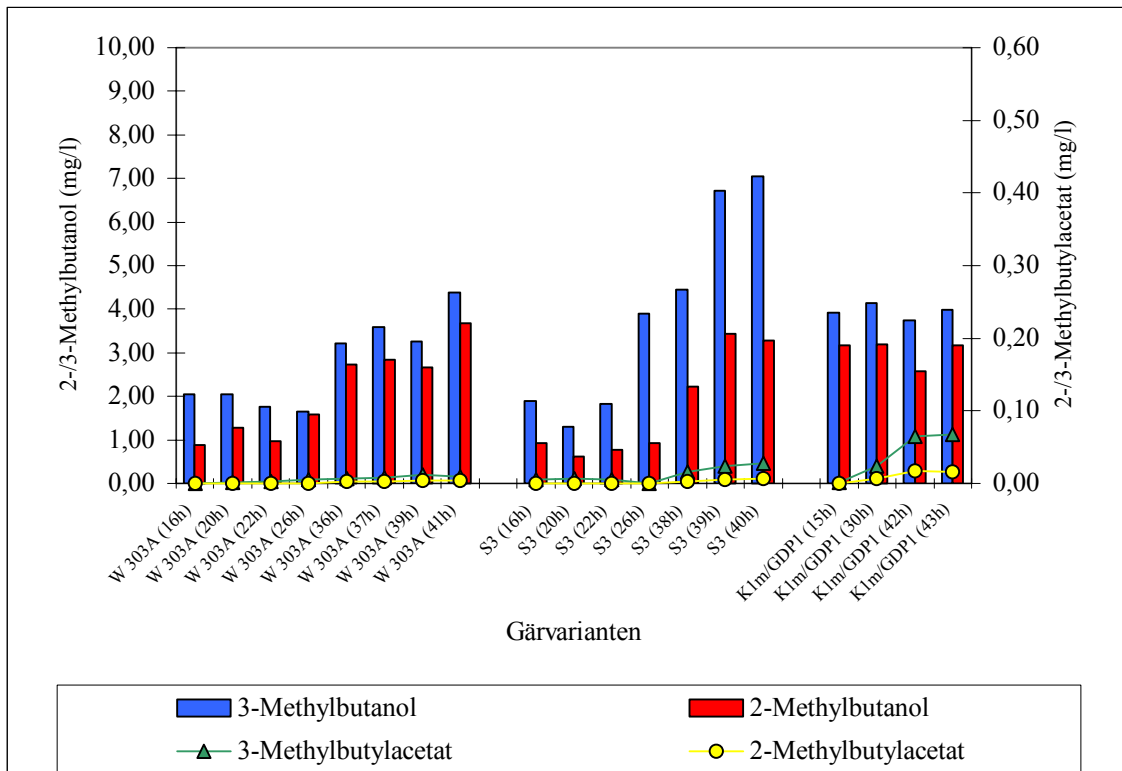


Abb. 4.12.: Aromenbildung von 2-/3-Methylbutanol und 2-/3-Methylbutylacetat

4.4.1.3. Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von Hexanol und Hexylacetat

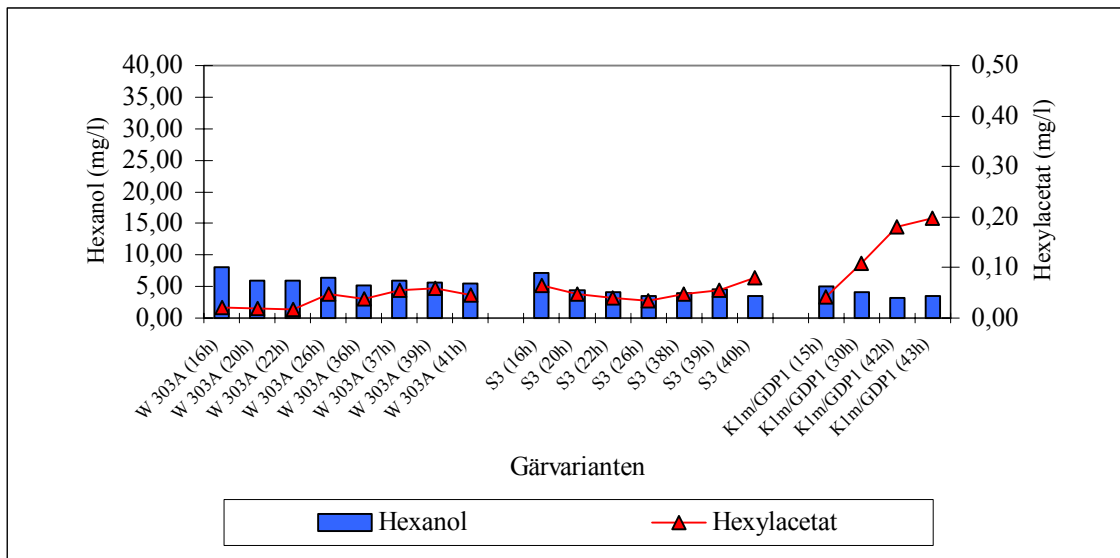


Abb. 4.13.: Aromenbildung von Hexanol und Hexylacetat

Die Konzentration von Hexanol, wird von *Saccharomyces cerevisiae* Hefen nur geringfügig quantitativ verändert. Hexanol, als Traubenbeereninhaltsstoff wird nicht von *Saccharomyces cerevisiae* Hefen gebildet, sondern wird im Verlauf der alkoholischen Gärung mit einem Teil des gebildeten Acetyl-CoA zu Hexylacetat umgewandelt. In der Abbildung 4.13. spiegelt sich dieser Sachverhalt wieder. In den untersuchten Gärproben variierten die Hexanolgehalte um 5,0 mg/l. Die Hexylacetatkonzentrationen der untersuchten Gärproben hingegen ergaben große Differenzen. Nach 40 Fermentationsstunden wiesen mit dem Hefestamm K1m/GDP1 vergorenen Proben eine 2-fach höhere Konzentration an Hexylacetat auf, als die mit den Hefestämmen S3 und W 303A vergorenen Proben.

4.4.1.4. Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von 2-Phenylethanol und Phenylethylacetat

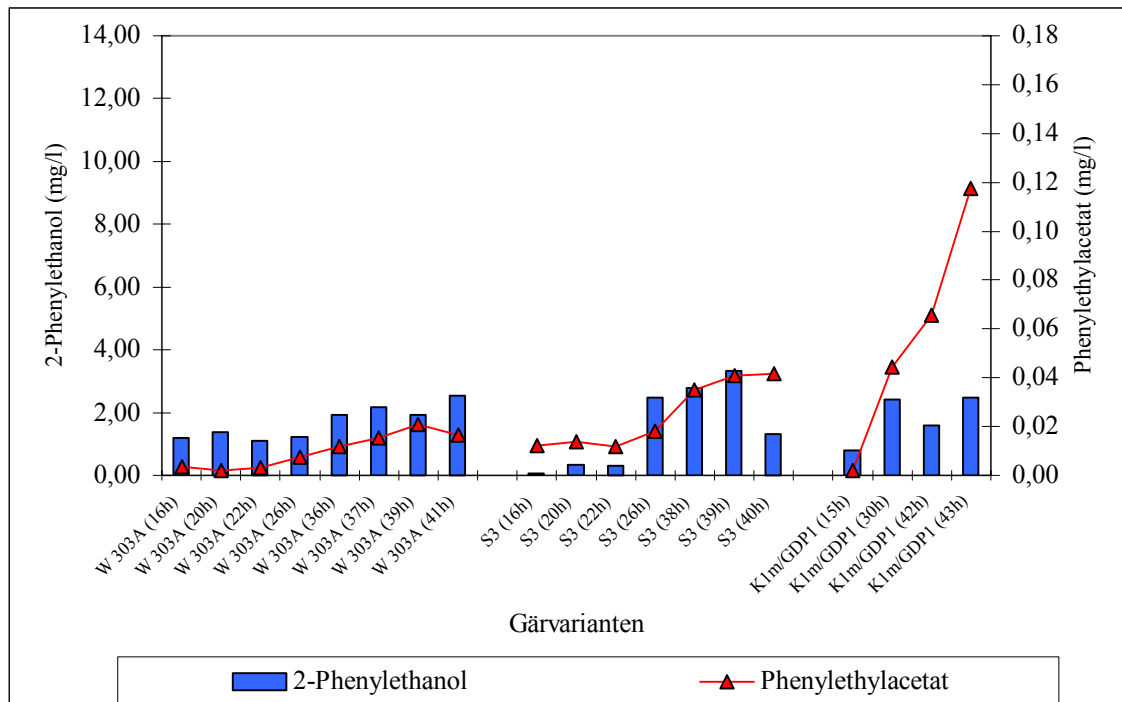


Abb. 4.14.: Aromenbildung von 2-Phenylethanol und Phenylethylacetat

Eine weitere Substanz von *Saccharomyces cerevisiae* Hefen ist der während der alkoholischen Gärung synthetisierte nach Rosen duftende Aromastoff 2-Phenylethanol. Die Quantifizierung von 2-Phenylethanol sowie dessen entsprechenden Ester (Phenylethylacetat) in den Gärproben zeigen die unterschiedlichen Syntheseleistungen der Hefestämme. Im Vergleich zu den anderen Stämmen sind die Bildungseigenschaften des Hefestammes W 303A am geringsten. Die Bildung von 2-Phenylethanol erfolgt beim Weinhefestamm S3 erst ab der 26-ten Fermentationsstunde. Dies macht sich bemerkbar durch einen stetigen Konzentrationsanstieg mit einhergehender verstärkter Synthese des Esters.

Beim Hefestamm K1m/GPD1 ist nach 40 Fermentationsstunden ein vollständig verändertes Konzentrationsbild zu erkennen. In diesen Proben ist ein sehr starker Anstieg der Phenylethylacetat-Konzentrationen analysiert worden. Nach 43 Stunden wurde in den mit K1m/GPD1 vergorenen Proben ein Gehalt von 0,117 mg/l im Vergleich zu 0,041 mg/l bei S3 und 0,016 mg/l bei W 303A ermittelt. Dies entspricht in

den Gärvarianten von K1m/GPD1 einer 3-fach höheren Konzentration des Esters als im Vergleich zu den restlichen Teststämmen.

4.4.1.5. Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von Capronsäure und Capronsäureethylester

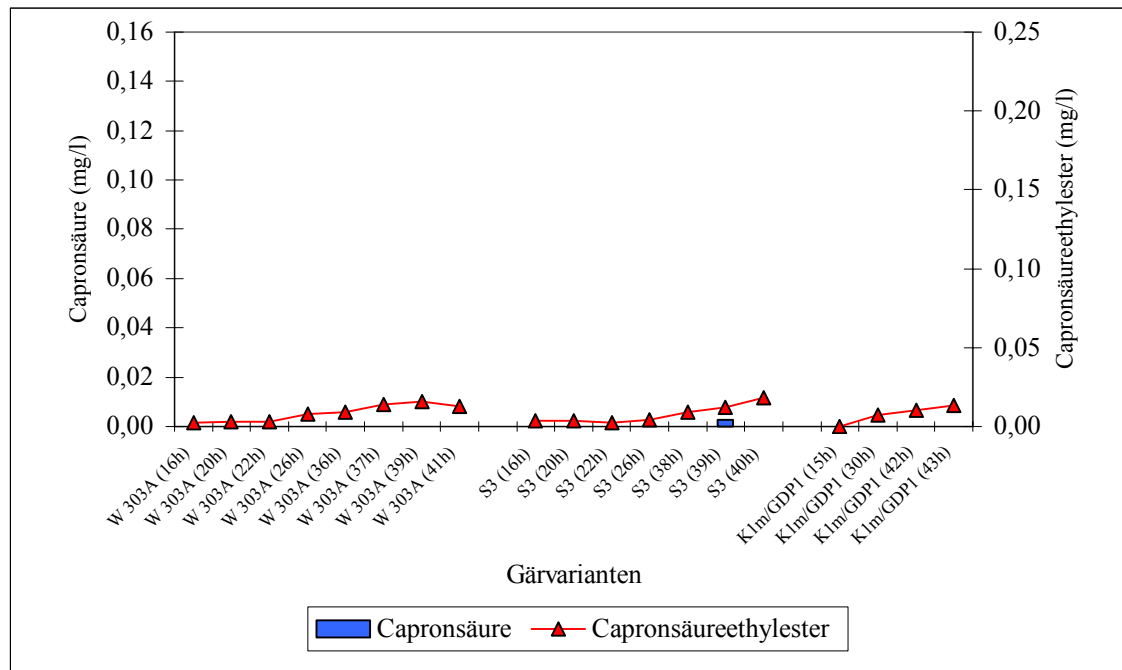


Abb. 4.15.: Aromenbildung von Capronsäure und Capronsäureethylester

In der Abb. 4.15. ist die Syntheseleistung der untersuchten Hefestämme hinsichtlich Capronsäure und dem dazugehörigen Ester aufgezeigt. Nach 40 Stunden konnte in keiner der untersuchten Gärproben, unabhängig vom jeweiligen Hefestamm, Capronsäure bzw. Capronsäureethylester in nennenswerten Mengen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist auch für die Caprylsäure und Caprinsäure sowie deren Esterderivate ermittelt worden (Daten nicht dargestellt).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass hefestammspezifische Eigenschaften unter den durchgeführten Versuchsbedingungen hinsichtlich der Aromastoffsynthese in geringem Maße vorhanden sind. Der Hefestamm W 303A unterscheidet sich nur geringfügig von den restlichen Stämmen. Die Fermentationsleistung sowie die Aromenbildung ist vergleichbar mit dem Weinhefestamm S3. Der Hefestamm

K1m/GPD1 ist durch seine starke Bildung von Esterverbindungen besonders auffällig. Dies ist ein Indiz dafür, dass durch die erhöhte Glycerinbildung eine höhere Umsetzung von NAD/NADH₂ über den Acetyl-CoA-Pool in Richtung NADP/NADPH₂ erfolgt, so dass die Gleichgewichtseinstellung des NADP/NADPH₂-Pools gewährleistet wird.

4.4.2. Einfluss des Stammes W 303A, des Deletionsstammes *gpd1Δgpd2Δ*, des Deletionsstammes *gpp1Δgpp2Δ* und des Deletionsstammes *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*

4.4.2.1. Einfluss der Hefestämme W 303A, *gpd1Δgpd2Δ*, *gpp1Δgpp2Δ* und *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* auf die Glycerinbildung

Die nachfolgenden Untersuchungsergebnisse resultieren aus den Fermentationsexperimenten mit verschiedenen Glycerin-Deletionsstämmen. Die untersuchten Hefestämme sind der Stamm W 303A, der Stamm *gpd1Δgpd2Δ* (aus der Deletion von Glycerin-dehydrogenasen), der Stamm *gpp1Δgpp2Δ* (aus der Deletion von Glycerin-phosphatasen) sowie der Stamm *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* (aus der Deletion von Glycerin-dehydrogenasen und -phosphatasen).

Unter strikt anaeroben Laborbedingungen können auf YPDA-Medien *gpd1Δgpd2Δ*-Deletionen nicht wachsen. Die nachfolgende Untersuchungsreihe sollte die Fragestellung diskutieren, in welchem Ausmaß unter oenologischen Bedingungen eine vollständige Wachstumshemmung erfolgt. Außerdem sollten weiterführende Erkenntnisse über biochemischen Stoffwechselforgänge der deletierten Hefestämme gewonnen werden. Weinhefestämme wurde in dieser Versuchsreihe nicht betrachtet, da die Ergebnisse bereits in vorhergehend besprochenem Kapitel (s. Kap. 4.4.) dargestellt wurden.

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgezeigten Ergebnisse stellen die prozentuale Abnahme von Glucose und Fructose sowie die Konzentration von gebildetem extrazellulären Glycerin nach 60 Stunden Fermentation dar.

Tab. 4.4.: Glucose- und Fructose-Abnahmen sowie extrazelluläre Glycerinkonzentrationen des Hefestammes W 303A und den Deletionsstämmen (*gpd1Δgpd2Δ*, *gpp1Δgpp2Δ* und *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*)

	W 303A	<i>gpd1Δgpd2Δ</i>	<i>gpp1Δgpp2Δ</i>	<i>gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ</i>
Glucoseabnahme (%)	19,8	11,8	8,8	7,5
Fructoseabnahme (%)	11,7	5,1	7,7	4,4
Glycerin (g/l)	1,21	0,73	0,63	0,85

Die Fermentationsleistung ist erwartungsgemäß beim Stamm W 303A am höchsten. Die Abnahmen von Glucose und Fructose betrug innerhalb der ersten 60 Stunden der Fermentation 19,8 % bzw. 11,7 %. Die Konzentration von gebildetem Glycerin ist im Vergleich zu den mit den Deletionsstämmen vergorenen Proben mit 1,21 g/l am höchsten. Im Gegensatz zu den ermittelten Ergebnissen der Drop-Test-Versuchsreihe zeigt sich, dass unter diesen Versuchsbedingungen alle drei Deletionsstämme in der Lage sind, zu wachsen.

Innerhalb der ersten 60 Fermentationsstunden sind die Fermentationsleistungen der Doppeldeletionsstämme *gpd1Δgpd2Δ* und *gpp1Δgpp2Δ* im Vergleich zum W 303A-Stamm um 40 % bis 50 % niedriger. Es zeigt sich weiterhin, dass beide Doppeldeletionsstämme 0,73 g/l bzw. 0,63 g/l Glycerin bilden können. Dies ist ein Hinweis, dass die Stämme mit Gendelektionen unter oenologischen Bedingungen Glycerin synthetisieren können, um das Redoxgleichgewicht innerhalb der Zelle zu gewährleisten.

Eine stärkere Einschränkung der Fermentationsleistung konnte beim Deletionsstamm *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* festgestellt werden. Die Ergebnisse der Glucose- und Fructose-Abnahmen zeigen, dass unter anaeroben Bedingungen die Fermentationseigenschaften extrem gemindert sind. Die prozentuale Abnahme an Glucose und Fructose beträgt 7,5 % bzw. 4,4 %. Die in den mit dem Hefestamm *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* vergorenen Proben ermittelte Glycerinkonzentration von 0,85 g/l ist im Vergleich zu den restlichen Gärvarianten extrem hoch.

Weiterhin lässt sich feststellen, dass die Hefezellen eine weitere alternative Möglichkeit unabhängig zum originären Syntheseweg für die Bildung von Glycerin besitzen, um die Integrität der Zelle zu bewahren und zu gewährleisten.

4.4.2.2. Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von 2-/3-Methylbutanol und 2-/3-Methylbutylacetat

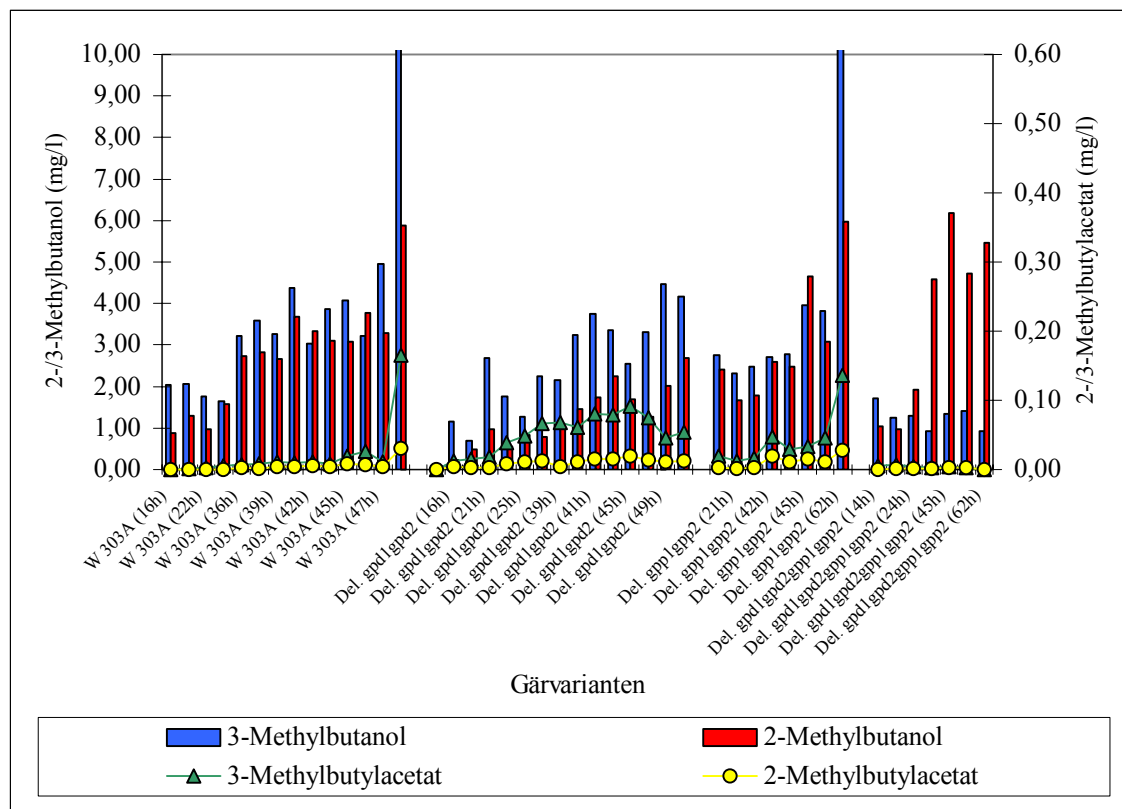


Abb. 4.16.: Aromenbildung von 2-/3-Methylbutanol und 2-/3-Methylbutylacetat

In der Abbildung 4.16. sind die Ergebnisse des Konzentrationsverlaufes der Gärungsalkohole 2-/3-Methylbutanol und deren dazugehörige Acetate aufgezeigt. Der Gärungsalkohol 3-Methylbutanol wird mit Ausnahme vom Hefestamm *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* stärker synthetisiert als 2-Methylbutanol. Weiterhin zeigt sich, dass in den Gärproben mit dem Stamm W 303A, vergoren nach 60 Fermentationsstunden, stärker 2-/3-Methylbutanol synthetisiert wurde als bei den Deletionsstämmen. Es zeigt sich auch, dass in den mit Doppeldeletionen vergorenen Proben vermehrt 3-Methylbutylacetat synthetisiert wird. Hingegen konnte bei den

nach 25 Fermentationsstunden einem max. Wert von 0,45 mg/l auf, der anschließende Konzentrationsrückgang auf 0,10 mg/l Hexylacetat ist nicht erklärbar. Gleichzeitig ist im Verlauf des Beobachtungszeitraumes eine Reduktion der Hexanolkonzentration nachweisbar. Ein ähnlicher Konzentrationsverlauf von Hexylacetat konnte bei den mit *gpp1Δgpp2Δ*-Deletionsstämmen fermentierten Proben festgestellt werden. Der Hexylacetatgehalt ist um 50 % geringer als bei den Doppeldelationen *gpd1Δgpd2Δ*. Die Hexanol- und Hexylacetat-Konzentrationen der Gärproben von *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*-Deletionsdeletionen spiegeln die geringe Fermentationsleistung des Hefestammes wider.

4.4.2.4. Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von 2-Phenylethanol und Phenylethylacetat

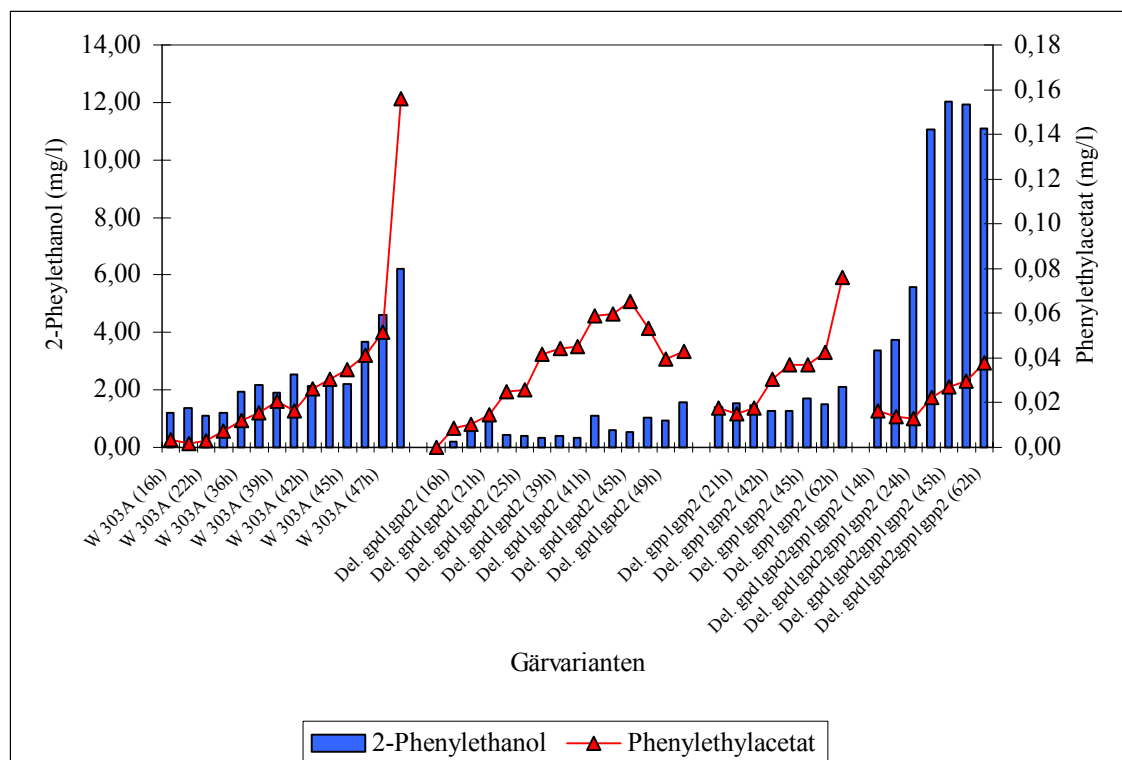


Abb. 4.18.: Aromenbildung von 2-Phenylethanol und Phenylethylacetat

Die ermittelten Ergebnisse des W 303A-Stammes weisen auf eine kontinuierliche Synthese von 2-Phenylethanol und Phenylethylacetat hin. Nach 60 Fermentationsstunden konnten in den Gärproben 6 mg/l 2-Phenylethanol und

0,16 mg/l Phenylethylacetat nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich bei der *gpd1Δgpd2Δ*-Testreihe, dass nach 60 Stunden 2 mg/l Phenylethanol gebildet wurde. Zusätzlich deutet der schnelle Konzentrationsanstieg auf 0,08 mg/l Phenylethylacetat auf eine verstärkte Veresterungsreaktion des Stammes hin. Ein etwas verändertes Konzentrationsgefüge ist beim Hefestamm *gpp1Δgpp2Δ* erkennbar. Nach 60 Stunden Fermentation ist die Konzentration an 2-Phenylethanol unverändert bei 2 mg/l. Die entsprechende Konzentration der Komponente Phenylethylacetat steigt nach 40 Stunden kontinuierlich auf eine Endkonzentration von 0,08 mg/l. Die Testreihen der quadripel Deletionsstämme zeigen weitergehende Veränderungen der Syntheseleistung des Hefestammes auf. In diesen Proben konnte nach 39 Stunden 11,0 mg/l 2-Phenylethanol nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die mit den quadripel Deletionen vergorenen Proben nach 39 Stunden den gleichen Gehalt an 2-Phenylethanol aufwiesen als der W 303A-Stamm nach 60 Stunden.

4.4.2.5. Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von Caprinsäure und Caprinsäureethylester

In der nachfolgenden Abbildung sind die Ergebnisse des Einflusses der Hefestämme auf die Bildung der Aromastoffe Caprinsäure und dem dazugehörigen Ester aufgezeigt.

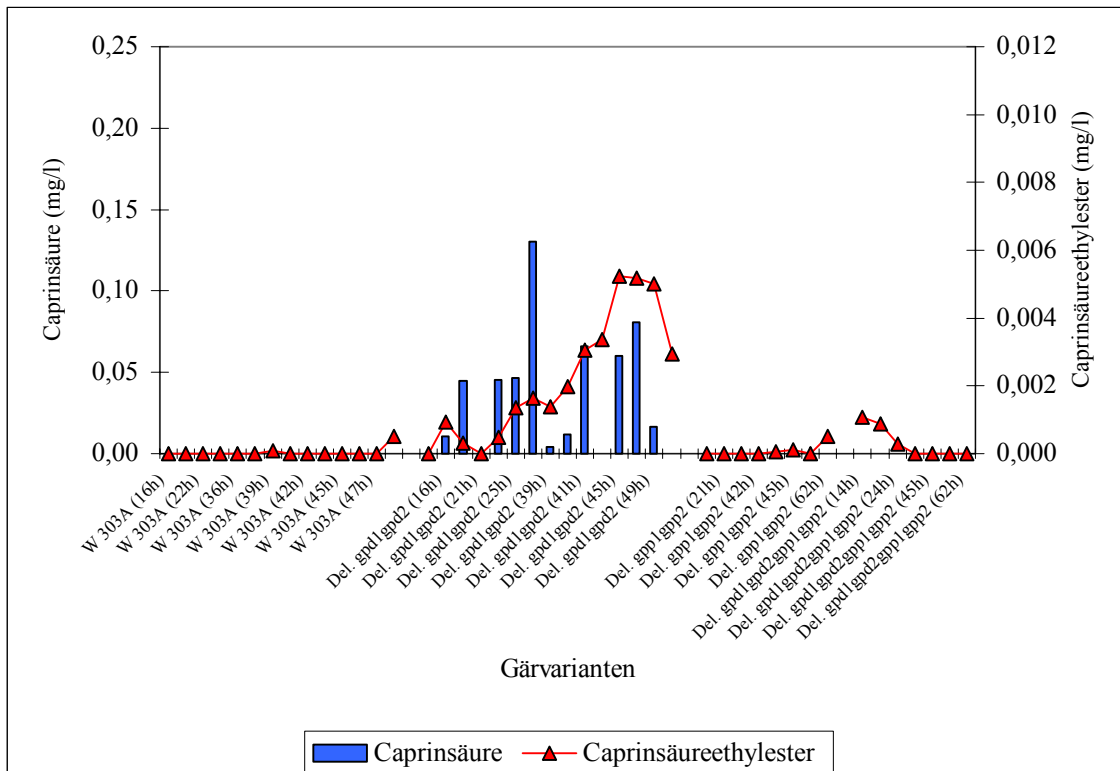


Abb. 4.19.: Aromenbildung von Caprinsäure und Caprinsäureethylester

Diese Ergebnisse spiegeln die gleichen Konzentrationsverläufe wie bei der Aromenbildung von Caprylsäure/Caprylsäureethylester sowie Capronsäure/Capronsäureethylester wider (Daten nicht dargestellt).

Anhand der Konzentrationen der Fettsäure Caprinsäure sowie des entsprechenden Esters zeigte sich, dass mit Ausnahme der Testreihe *gpd1Δgpd2Δ* nach 60 Stunden Fermentation die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze der GC-MS-Analytik lag. Hingegen zeigte sich anhand der Testreihe *gpd1Δgpd2Δ*, dass diese Hefen innerhalb der ersten 60 Stunden Caprinsäure bilden. Die extremen Schwankungen der Konzentration in den einzelnen Proben sind jedoch nicht erklärbar. Hingegen konnte in den Proben mit *gpd1Δgpd2Δ* von der 20-ten Stunde an ein kontinuierlicher Anstieg der Konzentration der Esterverbindung Caprinsäureethylester nachgewiesen werden.

4.4.2.6. Einfluss der Hefestämme auf die Aromenbildung von Fumarat und Succinat

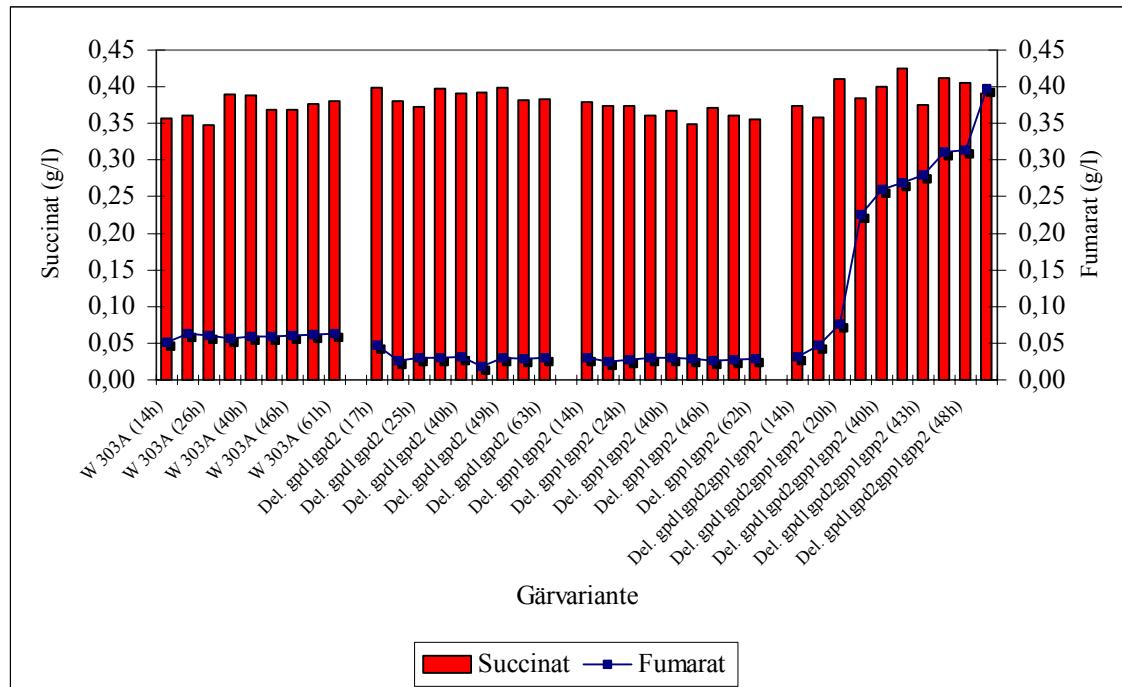


Abb. 4.20.: Aromenbildung von Fumarat und Succinat

Anhand der Abbildung ist erkennbar, dass die ermittelten Succinatkonzentrationen in dem Bereich zwischen 300 und 400 mg/l schwankten und innerhalb des Beobachtungszeitraumes keine Konzentrationsveränderung nachgewiesen werden konnte. Die Fumaratkonzentration variierte, mit Ausnahme der mit *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* vergorenen Gärproben, unterhalb 0,1 mg/l. Hingegen konnte in den mit *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*-Deletionsstamm vergorenen Proben ein kontinuierlicher Anstieg der Fumaratkonzentration auf 400 mg/l nachgewiesen werden. Ein Erklärungshinweis für die Synthese von Fumarat könnte sein, dass dieser Hefestamm Fumarat als sogenannte Redoxsink-Komponenten verwendet.

4.4.3. Einfluss des Stammes W 303A und des Deletionsstammes *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*

4.4.3.1 Einfluss der Hefestämme W 303A und des Deletionsstammes *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* auf die Glycerinbildung

Im nachfolgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Testreihe der beiden Hefestämme W 303A und des quadripel Deletionsstammes *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* innerhalb der ersten 80 Fermentationsstunden dargestellt.

Diese Gärversuche wurden mit definierten synthetischen Nährmedien (Aminosäuremedien) durchgeführt, um weiterführende Aussagen über die biochemischen Vorgänge zu erhalten. In dieser Versuchsaufstellung wurde ein synthetisches Minimalnährmedium ASI mit einer Aminosäurekonzentration von 1037 mg/l

(s. Kap. 3.1.2.3.) gegenüber einem synthetischem Nährmedium ASII mit 1235 mg/l (s. Kap. 3.1.2.3.) eingesetzt. Anhand dieses Versuchsaufbaus soll der Einfluss der Aminosäurekonzentration im Gärmedium auf die Ausbildung von Glycerin und die sekundären Aromakomponenten analysiert werden. Weiterhin werden durch die Verwendung unterschiedlicher Zuckerkonzentrationen von 20 g/l bzw. 180 g/l weiterführende Daten über die hefestammspezifischen biochemischen Stoffwechselfvorgänge bei verschiedenen osmotischen Verhältnissen ermittelt.

Tab. 4.5.: Glucoseabnahmen und extrazelluläre Glycerinkonzentrationen der Hefestämme W 303A und *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*

Hefestamm	W 303A	Del.	W 303A	Del.	W 303A	Del.	Del.
Aminosäuremedium	ASI	ASI	ASII	ASII	ASI	ASI	ASII
Glucosegehalt (g/l)	20	20	20	20	180	180	180
Glucoseabnahme (%)	4,0	3,5	11,8	6,0	14,0	7,4	8,7
Glycerin (g/l)	0,21	0,26	0,47	0,42	0,55	0,54	0,63

Die aufgelisteten prozentualen Abnahmen der Glucosekonzentration nach 80 Stunden Fermentation weisen deutliche Unterschiede der Fermentationsleistung der beiden Hefestämme auf. Unter den verschiedenen Versuchsbedingungen ist, mit Ausnahme der Gärvariante ASI mit 20 g/l Glucosekonzentration, die Kohlenhydratabnahme des W 303A-Stammes um 50 % höher als die des Deletionsstammes *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*. Dies ist ein Indiz für die Hemmungen des Stoffwechselsystems des Deletionsstammes. Obwohl bei diesem Hefestamm die Glycerinbildung blockiert sein müsste (Ansell et al., 1997), ist nach 80 Stunden eine Glycerinkonzentration zwischen 0,26 g/l und 0,63 g/l nachweisbar. Je höher das zur Verfügung stehende Nährstoffangebot und der extrazelluläre osmotische Druck, desto stärker wird Glycerin in den Zellen des Deletionsstammes synthetisiert und aus der Zelle exportiert.

4.4.3.2. Einfluss des Hefestammes auf die Aromenbildung von 2- und 3-Methylbutanol

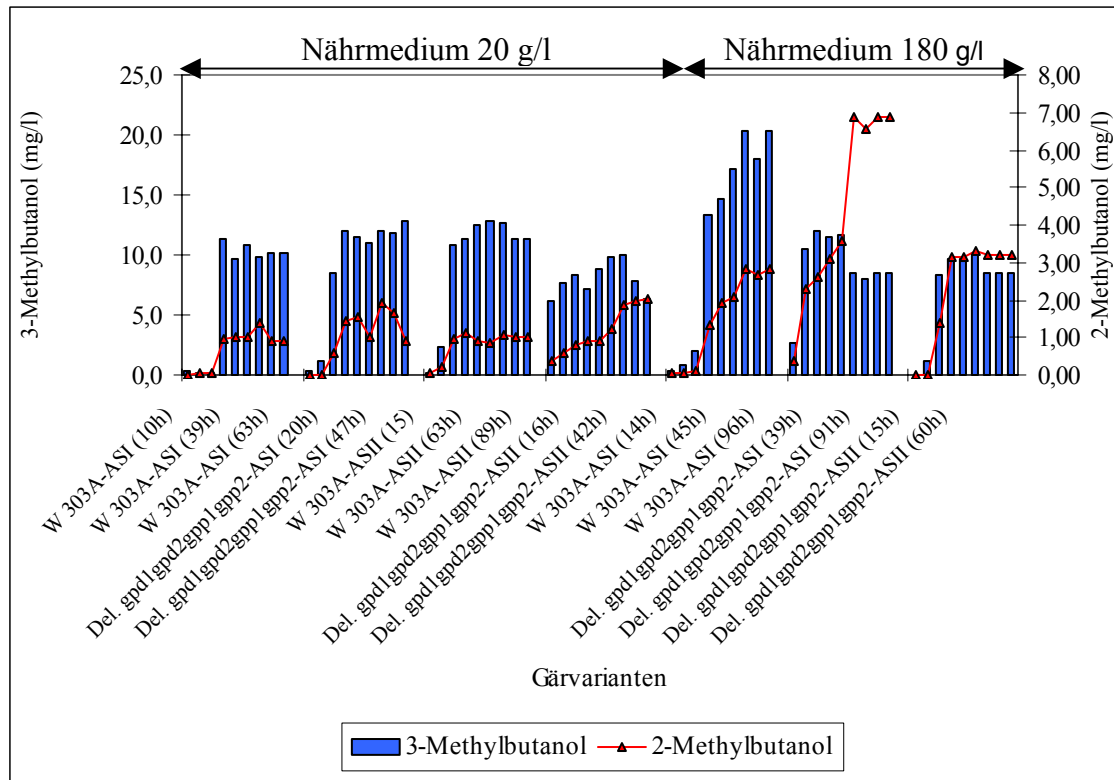


Abb. 4.21.: Aromenbildung vom 2-/3-Methylbutanol

Anhand der Abbildung 4.21. zeigt sich, dass bei der Verwendung von Aminosäuremedien mit 20 g/l Glucosekonzentration bei den untersuchten Hefestämmen keine Unterschiede bezüglich der Synthese von 2-/3-Methylbutanol analysiert werden konnten. Nach 80 Stunden Fermentation liegen die Konzentrationen von 3-Methylbutanol beim W 303A-Stamm sowie dem quadripel Deletionensstamm bei 10 mg/l und die Konzentration für 2-Methylbutanol schwankt um 2,0 mg/l. Hingegen zeigt sich bei der Bewertung der Verstoffwechselung von zuckerreichem (180 g/l Glucose) synthetischen Nährmedium, dass abhängig von der Nährstoffversorgung des Gärmediums eine stärkere Bildung von 2-Methylbutanol beim Deletionsstamm erfolgt. Die mit dem W 303A-Stamm vergorenen Proben wiesen diese Verschiebung in Richtung 2-Methylbutanolbildung nicht auf. Die Synthese von 2-Methylbutanol bei der Vergärung von aminosäurearmem Nährmedium durch den Deletionsstamm erreicht nach 80 Stunden eine Endkonzentration von 7,0 mg/l. Hingegen konnte bei einer

Fermentation von aminosäurereichem Nährmedium nach 80 Stunden eine Konzentration von 3,45 mg/l 2-Methylbutanol analysiert werden. Ein Indiz, dass die Verfügbarkeit von Aminosäuren und ein hoher osmotischer Druck eine additive Stressreaktion auf den *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* Stamm verursachen und dementsprechend einen extremen Einfluss auf die biochemischen Stoffwechselfvorgänge bewirken, um das Redoxgleichgewicht innerhalb der Zelle zu gewährleisten.

4.4.3.3. Einfluss des Hefestammes auf die Aromenbildung von 2- und 3-Methylbutylacetat

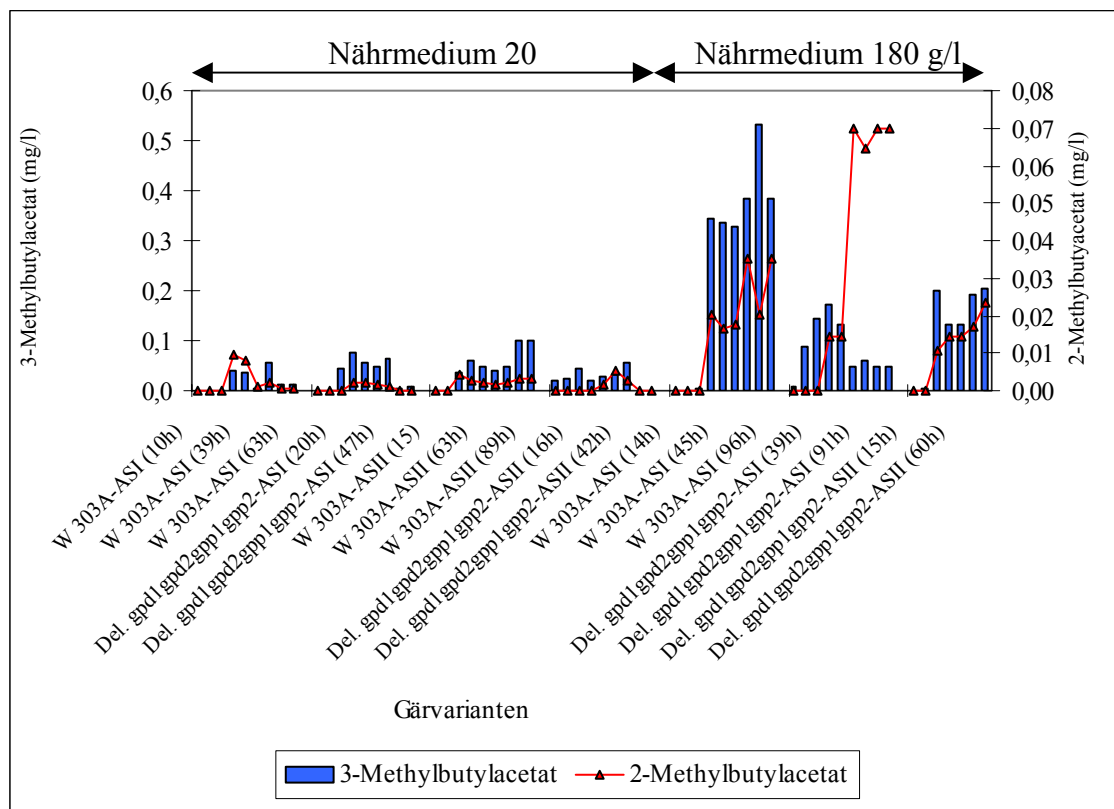


Abb. 4.22.: Aromenbildung von 2-/3-Methylbutylacetat

Die Synthese von 2-/3-Methylbutylacetat ist an die Bildungswege von 2-/3-Methylbutanol gekoppelt. Bei geringer Zuckerkonzentration (20 g/l Glucose) sind keine hefestammspezifischen Konzentrationsunterschiede erkennbar. Erst bei einer Erhöhung des osmotischen Druckes erfolgt eine verstärkte Synthese der Acetatverbindungen. Wie bereits in der Abb. 4.21. (2-/3-Methylbutanol) ist bei der

Fermentation von zuckerreichen und nährstoffarmen Gärmedien in den mit dem Deletionsstamm vergorenen Proben höhere Konzentrationen von 2-Methylbutanol analysiert worden. Dementsprechend ist der Konzentrationsanstieg von 2-Methylbutylacetat erklärbar. Weiterhin zeigt sich, dass die Bildung von 2-Methylbutylacetat in zuckerreichen und nährstoffhaltigen Aminosäuremedien in geringerem Maße ausgeprägt ist.

4.4.3.4. Einfluss des Hefestammes auf die Aromenbildung von Essigsäure

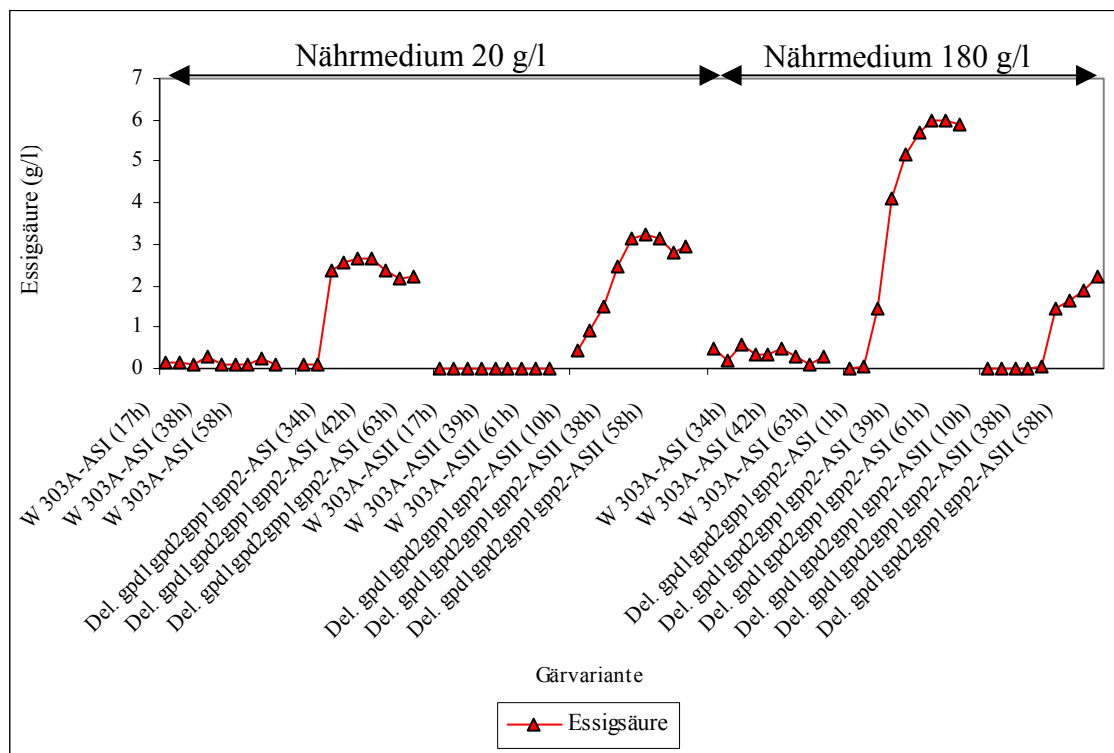


Abb. 4.23.: Aromenbildung von Essigsäure

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass durch den W 303A-Stamm in den Medien mit 20 g/l Zuckerkonzentration deutlich weniger (< 1 g/l) Essigsäure gebildet wird als beim Vergleich zu den Nährmedien mit 180 g/l Zucker. Hingegen konnte in den mit der Deletionsstamm in zuckerarmen Nährmedien vergorenen Gärvarianten unabhängig vom Aminosäuregehalt Konzentrationen von 3,0 g/l Essigsäure analysiert werden. Die Erhöhung des osmotischen Druckes durch Steigerung der Glucosekonzentration des

synthetischen Nährmediums resultierte in einer Erhöhung der Synthese von Essigsäure auf 6 g/l.

4.4.3.5. Einfluss des Hefestammes auf die Aromenbildung von Ethylacetat

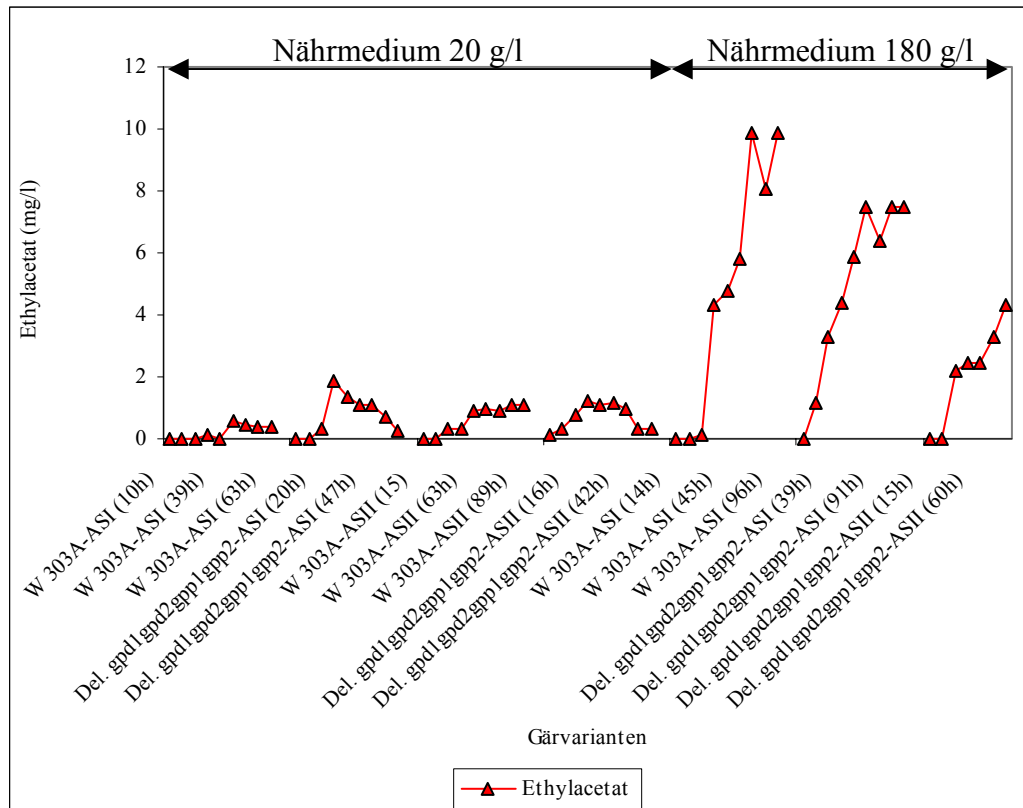


Abb. 4.24.: Aromenbildung von Ethylacetat

Die Synthese von Ethylacetat ist abhängig von der Ethanol- und der Acetat-Konzentration. Die Versuchsreihen mit 20 g/l Zuckerkonzentration weisen keine Unterschiede bezüglich der Ethylacetatkonzentration auf. Die Konzentrationen nach 80 Stunden Fermentation sind unterhalb 2,0 mg/l. Hingegen ist bei der Vergärung von 180 g/l glucosehaltigen Aminosäuremedien ein starker Konzentrationsanstieg von Ethylacetat erkennbar. Den höchsten Gehalt an Ethylacetat ist in den mit dem W 303A-Stamm vergorenen Gärproben feststellbar. Auffällig ist jedoch auch der hohe Gehalt an Ethylacetat bei den Deletionsstämmen. Die Fermentationsleistung dieses Hefestammes ist um 50 % niedriger als die des W 303A-Stammes.

Unter Berücksichtigung der Acetatkonzentrationen ist erkennbar, dass die Synthese von Ethylacetat für den W 303A-Stamm eine vorherrschende Bedeutung hat. Bei dem

Deletionsstamm erfolgte eine starke Anreicherung von Acetat und eine geringere Bildung von Ethylacetat.

V. Diskussion

Allgemeiner Einblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass ein Überleben einer Zelle abhängig ist von der Fähigkeit, Veränderungen von Umweltbedingungen zu erkennen und eine zielgerichtete Reaktion auf die neue Situation zu gewährleisten. Der einzellige Eukaryont *Saccharomyces cerevisiae* muss sich ständig an wechselnde Umweltbedingungen adaptieren. In den dargestellten Ergebnissen spiegelt sich diese Fähigkeit wider. Das nachfolgende Kapitel Diskussion ist untergliedert in vier Teilbereiche:

1. Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit Weinhefestämmen
2. Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit gentechnisch veränderten Hefestämmen
3. Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit Deletionsstämmen
4. Diskussion über die metabolische Effektivität eines zweiten alternativen Glycerinbildungsweges in *Saccharomyces cerevisiae*

5.1. Weinhefestämme und Glycerinbildung

5.1.1. Einfluss von Weinhefestämmen auf die Glycerinbildung

Die intrazelluläre Akkumulation von Glycerin in Weinhefestämmen ist bei verschiedenen Gärtemperaturen (15 °C und 20 °C) untersucht worden. Bei diesen Untersuchungen wurden in den 15 °C Gärvarianten eine höhere intrazelluläre Glycerinkonzentration nachgewiesen als bei 20 °C. Dies zeigt, dass unter anaeroben Bedingungen die Erniedrigung der Gärtemperatur ein zusätzlicher Stressfaktor für die Hefezelle darstellt. Die *Saccharomyces cerevisiae* Zelle reagiert auf diese ungünstigen Wachstumsbedingungen durch intrazelluläre Glycerinakkumulation (Brown and Edgley, 1980; Blomberg and Adler, 1992; Reed et al., 1987). Weiterhin ist erkennbar, dass Weinhefestämme mit einem hohen intrazellulären Glyceringehalt besser vergären (Pretorius, 2000). Die intrazelluläre Konzentration korreliert jedoch nicht mit der extrazellulären Konzentration (Großmann, 1999). Die extrazellulären Glyceringehalte schwankten zwischen 8-10 % vom Gesamtalkohol.

Hinsichtlich der Trendentwicklung in der modernen Kellerwirtschaft, verstärkt eine kühlere Vergärung bei Temperaturen von 15 °C bis hin zu 12 °C durchzuführen, ist eine Selektion von gezielten Hefestämmen sehr wichtig. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen, dass die Stämme SHG und CAY im Vergleich zu den restlichen untersuchten Weinhefestämmen für die Kaltvergärung besonders gut geeignet sind. Eine Selektion über die Temperatursensibilität, d.h. über die Eigenschaft Glycerin intrazellulär zu akkumulieren, wird ein wichtiger Faktor sein, der über den Erfolg und Misserfolg einer gezügelten Vergärung von Traubenmost entscheidet.

5.1.2. Einfluss der Nährstoffzusammensetzung auf die Glycerinbildung

Im Hinblick auf die Untersuchungsergebnisse der intrazellulären Glycerinkonzentrationen in den mit Traubenmost- oder synthetischen Nähr-Medien vergorenen Proben zeigte sich, dass die synthetischen Nährmedien ein niedrigeres Stresspotenzial für die *Saccharomyces cerevisiae* Zellen darstellen. Dieses niedrigere Stresspotenzial der synthetischen Nährmedien kann auf die optimale Verfügbarkeit der Aminosäuren und die niedrigere Wasseraktivität des synthetischen Nährmediums zurückgeführt werden.

Die Betrachtung des NADH₂-Pools könnte eine Erklärung für die geringere intrazelluläre Akkumulation von Glycerin in der Hefezelle geben. Nissen et al. (2001) zeigten, dass bei anaerob wachsenden Kulturen der mitochondriale NADH₂ Überschuss hauptsächlich durch die Synthese von 2-Oxoglutarat, der Vorstufe von Glutamat, gebildet wird. Im Allgemeinen stellt die Aminosäuresynthese zusammen mit der Biomassenbildung von *Saccharomyces cerevisiae* 60-80 % des gesamten NADH₂-Pools der Zelle dar. Einer groben Schätzung zufolge werden ca. 30-50 % dieses NADH₂-Überschusses in der Mitochondrie in *Saccharomyces cerevisiae* wieder oxidiert (Bakker et al., 2001). Dies bedeutet, dass durch die bessere Verfügbarkeit der Aminosäuren in dem synthetischen Nährmedium für die Zelle ein geringerer NADH₂-Überschuss entsteht. Dementsprechend wird eine reduzierte Glycerinsyntheseleistung zum Redoxausgleich der Zelle benötigt.

Ein Kritikpunkt an dieser Argumentation ist, dass unter anaeroben Bedingungen in *Saccharomyces cerevisiae* nur Promitochondrien existieren (Bakker et al., 2001). Wenn

eine mitochondriale Reduzierung des NADH₂-Gehaltes erfolgt, so muss es auch einen Transport der Redoxäquivalente von den Promitochondrien ins Cytosol geben. Ein Beispiel für ein solches Transfersystem könnte der Ethanol-Acetaldehyd-Shuttle sein. *Saccharomyces cerevisiae* besitzt eine mitochondriale Alkohol-dehydrogenase Adh3p, und zwei cytosolische Alkohol-dehydrogenasen, Adh2p und Adh1p. Experimente (Bakker et al., 2001) mit *adh3Δ*-Deletion bewiesen, dass in anaerob wachsenden Kulturen das Wachstum der Deletionsstämme um ca. 30 % niedriger ist als im Vergleich zum W 303A Stamm. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist noch nicht bekannt, welches Gen oder welche Gene diese Restaktivität der Alkohol-dehydrogenase *ADH3* steuern.

Die Antwort auf die Frage, ob der Ethanol-Acetaldehyd-Shuttle für den Transport von Redoxäquivalente vom Cytosol in die Mitochondrien von Bedeutung ist, könnte bei einer Untersuchungen der *nde1Δnde2Δgut2Δ*-Deletion gefunden werden.

Der Alkohol-Acetaldehyd-Shuttle ist nur ein Beispiel neben anderen Shuttle Systemen in *Saccharomyces cerevisiae*, wie z. B. Malat-Oxaloacetat-Shuttle, Malat-Aspartat-Shuttle oder Malat-Pyruvat-Shuttle. Welche Funktionen bzw. Reaktionen diese Systeme in *Saccharomyces cerevisiae* unter anaeroben Bedingungen haben, ist noch nicht vollständig geklärt (Blomberg, 2000).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die intrazelluläre Akkumulation von Glycerin in Weinhefestämmen als Stressantwort auf die Gärtemperatur, den Alkoholgehalt und die Nährstoffverfügbarkeit mit abfallender Bedeutung reagiert. Eine geringfügige Überproduktion von *GPD1* bzw. eine Reduktion von *FPS1* (ohne Beeinflussung des extrazellulären Glyceringehaltes) könnte die Stabilität der Weinhefen erhöhen. Es konnte gezeigt werden, dass eine schleppende oder verzögerte Gärung bei niedrigeren Gärtemperaturen mit dem Mangel an Akkumulation von intrazellulärem Glycerin verbunden ist.

5.2. Gentechnisch veränderte Hefestämme

5.2.1. Einfluss der Überexpression von *GPD1*

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung von Hefen, welche *GPD1* überexprimierten. Die Zielsetzung der Überexpression war es, durch die

Verwendung eines Multi-Kopie-Vektors eine erhöhte Glycerinsynthese und dementsprechend eine erhöhte extrazelluläre Glycerinkonzentration im Wein zu erhalten. In Kultivierungsuntersuchungen (Großmann, 1999) zeigte sich, dass ein kontinuierlicher Plasmidverlust unter nicht selektiven Bedingungen auftrat. Auffällig war, dass trotz des Plasmidverlustes eine erhöhte Glycerinbildung weitergehend erfolgte. Die Existenz von Plasmiden ohne *GPDI*-Expression konnte auch in hohen Kopienzahlen keine metabolischen Veränderungen bewirken. Der Einsatz eines Multi-Kopie-Vektors kann somit als erster Schritt in Richtung einer stabilen gentechnischen Veränderung eines Hefestammes bezeichnet werden. Die Probleme, die bei der spezifischen Integration des Vektors durch unterschiedliche Sequenzabfolgen auftreten, können der Grund für die Schwierigkeiten der Rekombination sowie die Instabilität des Plasmids sein. Für eine industrielle Produktion eines stabilen glycerinbildenden Stammes bei gleichzeitiger Optimierung von sekundärer Gärungsprodukten sollten weitergehende Untersuchungen zur chromosomalen Struktur von Weinhefestämmen durchgeführt werden.

5.2.2. Einfluss der Überexpression von *GPDI* auf die Bildung von Glycerin und weiteren sekundären Gärungsprodukten

Eine Überexpression von *GPDI* bewirkte eine Erhöhung der Glycerinsynthese und demzufolge eine höhere Konzentration an extrazellulärem Glycerin. Es konnte gezeigt werden, dass die Variabilität der Glycerinproduktion stärker von hefestammspezifischen Eigenschaften abhängig ist, als von einer Gärtemperatursteigerung von 20 °C auf 25 °C. Die maximale Erhöhung der Glycerinkonzentration um 3 g/l wurde beim Hefestamm K1m/*GPDI* festgestellt. Einhergehend mit der Überexpression von *GPDI* in diesem Hefestamm resultierte eine Erhöhung des Acetaldehydgehaltes. Dies ist ein Indiz dafür, dass durch die erhöhte Produktion von Glycerin ein Redoxungleichgewicht zwischen dem NADH_2 -Pool und dem NAD-Pool entsteht. Da eine größere Umsetzung von NADH_2 durch die Überexpression von *GPDI* verursacht wird, kann die Kopplungsreaktion Acetaldehyd zu Ethanol nicht vollständig ablaufen. Eine Erhöhung der Acetaldehydkonzentration ist unter oenologischen Gesichtspunkten nicht gewünscht, da Acetaldehyd einen negativen sensorischen Einfluss auf den Wein ausübt und der Hauptbindungspartner von SO_2 ist. Eine Steigerung der Acetaldehydkonzentration würde einen höheren SO_2 -Bedarf der Weine verursachen und

gleichzeitig zu einer höheren Gesamtschwefelkonzentration führen. Die Zugabe von SO_2 unterliegt gesetzlichen Grenzwerten, so dass in einigen Fällen eine erhöhte Glycerinkonzentration zu einem nicht verkehrsfähigen Produkt führen könnte.

Weiterhin konnte besonders bei dem überexprimierten Stamm K1m/GPD1 eine negative Korrelation zwischen der Acetaldehyd- und der Acetat-Konzentration festgestellt werden. Bei Betrachtung der Redoxbilanz von Acetat in *Saccharomyces cerevisiae* lässt sich feststellen, dass 1 M Glucose durch die Acetaldehyddehydrogenase in 1 M Acetat und 2 M NAD(P)H_2 synthetisiert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass neben der Regulation des NAD/NADH_2 -Redoxverhältnisses auch das Gleichgewicht von NADP/NADPH_2 durch die Glycerinsynthese beeinflusst wird.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des intrazellulären Redoxgleichgewichtes in *Saccharomyces cerevisiae* als eine Hauptfunktion für den Metabolismus. Die Reoxidation von NADH_2 zu NAD , welches ein essentieller Kofaktor für die Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase ist, scheint ein limitierender Faktor der Glycerinbildung zu sein. Für die Gewährleistung der Redoxbilanz innerhalb der *Saccharomyces cerevisiae*, scheint das NAD/NADH_2 -Paar für den Transport von äquivalenten Reduktionen eine wichtige Funktion zu haben (Lagunas and Gancedo, 1973; de Vries and Marres, 1987). Man könnte sich einen Kontrollmechanismus aufgrund des Gleichgewichtes der beiden Kofaktoren und des Substrates vorstellen. Bei einer Zugabe von Acetaldehyd zu *Saccharomyces cerevisiae* Kulturen konnte nämlich eine Veränderung des NAD/NADH_2 -Gleichgewichtes erreicht und die transkriptionale Induktion von *GPD2* um den Faktor 2 erhöht werden (Liden et al., 1996).

Beide Tatsachen (Acetaldehydsynthese und Acetatreduktion) zeigen, dass das Redoxpotenzial im Cytosol u. a. auf ein Gleichgewicht von NAD/NADH_2 angewiesen ist. Jedoch verdeutlicht es weiterhin, dass von diesem Weg unabhängig ein weiterer Redoxmechanismus existieren muss, denn beim direkten Vergleich von Weinhefestämmen mit dem K1m/GPD1-Stamm konnte eine höhere metabolische Stoffumsetzung in Richtung sekundäre Gärungsprodukte festgestellt werden. Sowohl die Konzentrationen an höheren Alkoholen sowie an Acetat- und Ester-Verbindungen waren in dem mit K1m/GPD1 vergorenen Proben höher als bei den untersuchten

Weinhefestämmen. Diese Erhöhung von sekundären Gärungsprodukten ist nicht nur abhängig vom NAD/NADH₂-Pool, sondern auch vom NADP/NADPH₂-Pool der Zelle.

5.3. Drop-Test-Untersuchungen: Weinhefestämme

Aus den Ergebnissen der Drop-Test Untersuchungen konnte bei der Unterscheidung der Weinhefestämme aufgezeigt werden, dass große Unterschiede hinsichtlich der osmotischen Sensibilität existieren. Unter oenologischen Bedingungen sind die Hefen bei der Inokulation einem osmotischen Schock ausgesetzt, wenn die Anzucht in dem zu beimpfenden Traubenmost erfolgt (Scanes et al., 1998). Die osmotischen Verhältnisse während der alkoholischen Gärung mit Traubenmost sind durch die hohen Konzentrationen an Glucose und Fructose zu Beginn der Gärung und durch Ethanol am Ende der alkoholischen Gärung charakterisiert. Beispielsweise werden aus 200 g/l Gesamtzucker zu Beginn der Gärung durchschnittlich 93 g/l Gesamtalkohol gebildet, dies entspricht einer Reduktion der Wasseraktivität von 0,975 zu 0,9592. Diese Reduktion der Wasseraktivität ist mit einer Änderung der NaCl-Konzentration von 1,2 M (7 % NaCl) auf 0,7 M (4 % NaCl) gleichzusetzen (Hohmann and Mager, 1997). Es zeigte sich, dass der Hefestamm CEG unter anaeroben Bedingungen nicht auf Medien mit einem Salzgehalt über 0,02 M NaCl wuchs. Demnach ist dieser Stamm per definitionem gegenüber hyperosmotischen Stress sensitiv. Diese hohe Sensibilität gegenüber osmotischen Drücken erklärt, warum dieser Stamm in der Weinbereitung als langsam gärender Weinhefestamm mit der Tendenz der Erzeugung von steckengebliebenen Weinen bekannt ist.

5.4. Drop-Test-Untersuchungen: Gentechnisch veränderte Hefestämme

Um die physiologischen Eigenschaften der *gpd1Δgpd2Δ*-Deletionen zu untersuchen, wurde der Kontrollstamm W 303A und die Deletionsstämme mit 4 %, 6 %, 8 % NaCl und 1 % Sorbitol versetzten Medien untersucht. Die Drop-Test Ergebnisse der *gpd1Δgpd2Δ*-Deletionsstämme zeigten, dass unter anaeroben Bedingungen ein Wachstum der Deletionsstämme begründet durch die intrazelluläre Akkumulation von NADH₂, nicht möglich ist. Ein Wachstum der *gpd1Δgpd2Δ*-Deletion unter anaeroben Bedingungen kann erreicht werden, wenn Acetaldehyd oder Acetoin als NADH₂-Verbrauchsquelle zugegeben wird (Liden et al., 1996).

5.5. Aktivität der Deletionsstämme *gpd1Δgpd2Δ*, *gpp1Δgpp2Δ* und *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* in Traubenmostmedium

Die Untersuchungsergebnisse mit den einzelnen Deletionsstämmen in Traubenmostmedien zeigen, dass die *gpd1Δgpd2Δ*-, *gpp1Δgpp2Δ*- sowie die *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*-Deletionsstämme unter anaeroben Bedingungen wachstumsfähig sind. Diese Tatsache stellt eine völlig neue Erkenntnis dar und zeigt die Komplexität des einzelligen Eukaryont *Saccharomyces cerevisiae* auf.

Weiterhin ist erkennbar, dass die Fermentationsleistungen und dementsprechend die Stoffwechselaktivitäten der unterschiedlichen Deletionsstämme verschieden sind. Die Bildung von Glycerin durch die Deletionsstämme konnte nachgewiesen werden. All diese Ergebnisse zeigen, dass die Glycerinsynthese für das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen eine essenzielle Funktion übernimmt. Wenn diese Synthese von Glycerin gestört wird, erfolgt eine Verschiebung verschiedener zellulärer Reaktionswege.

5.5.1. Ein Vergleich zwischen dem *gpd1Δgpd2Δ*- und dem *gpp1Δgpp2Δ*-Stamm

Alle oben aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass bei einem Vergleich der Deletionsstämme *gpd1Δgpd2Δ* und *gpp1Δgpp2Δ* ein größeres Redoxungleichgewicht in den Zellen mit Deletionen von *gpd1Δgpd2Δ* vorliegt. In den *gpd1Δgpd2Δ* Zellen erfolgt aufgrund des stärkeren NAD/NADH₂-Ungleichgewichtes die Umlenkung des Energieflusses in Richtung höherer Alkohole und Acetate. Hingegen wird der Deletionsstamm *gpp1Δgpp2Δ* durch den osmotischen Stress von Traubenmost in seinem Wachstum weniger gestört. Die Deletionen von *gpp1Δgpp2Δ* führen zu einer Akkumulation von Glycerin-3-phosphat. Die Reduktion von NAD kann somit erfolgen und das intrazelluläre Gleichgewicht bewahrt werden. Das Intermediärprodukt Glycerin-3-phosphat kann über eine Nebenreaktion der Dihydroxyaceton-phosphat-acyltransferase und Acyl-dihydroxyaceton-phosphat-reduktase zu Glycerin synthetisiert werden (Albertyn et al., 1992; Albertyn et al., 1994a).

Die niedrigste Fermentationsrate konnte bei den *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*-Deletion festgestellt werden. Bei diesem Stamm konnte ebenfalls eine vermehrte Bildung von höheren Alkoholen sowie Ester- und Acetat-Verbindungen festgestellt werden. Im Besonderen zeigte sich in den mit *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*-Deletion vergorenen Proben unter anaeroben Bedingungen ein extremer Konzentrationsanstieg an Fumarat. Dieser Sachverhalt lässt sich mit der Tatsache erklären, dass unter anaeroben Bedingungen Fumarat als Elektronenakzeptor dient. Untersuchungen von Camarase et al. (2001) zeigen, dass Laborhefestämme mit Deletionen von *FRDS* und *OSMI* unter anaeroben Bedingungen nicht wachstumsfähig sind. Die Wachstumsstörungen dieses Stammes konnten auch durch eine Addition von Succinat nicht substituiert werden. Hingegen wurde gezeigt, dass die Einzeldelationen *frds* und *osm1* hinsichtlich des Wachstums und der Succinatsynthese zu dem W 303A-Stamm vergleichbar waren. Aus diesen Untersuchungsergebnissen sowie den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich ableiten, dass *FRDS* und/oder *OSMI* nicht nur vom FAD-Pool der *Saccharomyces cerevisiae* Zelle reguliert werden, sondern auch für die Gewährleistung des Redoxgleichgewichtes des NAD/NADH₂-Pools verantwortlich sind.

Zusammenfassend betrachtet werfen die Untersuchungsergebnisse in Traubenmost folgende Diskussionspunkte auf: Ist für diese Versuchsanstellung mit Deletionsstämmen Traubenmost als Nährmedium geeignet? Eine Vielzahl von definierten und undefinierten chemischen Komponenten können auf die Hefezellen wirken. Die Folge ist, dass zellmetabolische Reaktionen gemessen werden, die nicht auf den eigentlichen betrachteten Metabolismus, in diesem Falle Glycerinmetabolismus, zurückzuführen sind.

Weiterhin stellt das Medium Traubenmost im Vergleich zu Untersuchungen mit definierten Labormedien, bei denen jeweils nur ein Stressfaktor wie z. B. Temperatur oder Wasseraktivität geändert werden kann, nicht nur ein osmotisches sondern auch ein globales Stresspotenzial dar.

Diese Argumentation relativiert sich dadurch, dass die Untersuchungsergebnisse mit synthetischen Nährmedien die Ergebnisse mit Traubenmostmedien bestätigten.

5.5.2. Aktivität des Deletionsstammes *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* in synthetischem Nährmedium - Ein Hinweis auf eine Transhydrogenase-Aktivität in *Saccharomyces cerevisiae*?

Bei den Untersuchungen mit *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*-Deletionen sollten sowohl die unterschiedlichen osmotischen Verhältnisse als auch die Nährstoffverwertbarkeit durch die Hefen untersucht werden. Die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe zeigen, dass die *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*-Deletion in den zuckerarmen (20 g/l Zucker) und in den zuckerreichen (180 g/l Zucker) synthetischen Nährmedien wuchsen. Bei der Verwendung von synthetischen Nährmedien mit 20 g/l Zucker ist die Bildung von sekundären Gärungsprodukten durch *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*-Deletion vergleichbar mit den Ergebnissen des Wildtyp-Stammes. Mit Ausnahme der Bildung der höheren Alkohole konnte in den nährstoffarmen synthetischen Nährmedien eine Konzentration von 3,0 g/l Acetat (*gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*-Deletion) im Vergleich zu 0,2 g/l Acetat (Wildtyp-Stamm) festgestellt werden. Diese starke Acetatbildung lässt sich mit dem Redoxgleichgewicht der Zelle erklären. Die Biosynthese von Acetat erfordert einen Redoxausgleich durch den NAD(P)/NAD(P)H₂-Pool. In diesen Ausgleich ist die Aldehyd-dehydrogenase involviert, codiert durch eine mitochondriale Ald7 und die cytosolische Ald6. Untersuchungen von Remize (2000) zeigten, dass eine Überexpression von *GPD1* möglicherweise eine Inaktivierung von *ALD6* zur Folge hat. Nach diesen Ergebnissen (Remize, 2000) erfolgt bei einer Deletion von Glycerin-3-phosphat-dehydrogenasen und Glycerin-phosphatasen eine Aktivitätsänderung der Aldehyd-dehydrogenase, was zu einem extremen Konzentrationsanstieg von Acetat führt.

Existiert ein weiterer Glycerinbildungsweg in *Saccharomyces cerevisiae*, in dem das intrazelluläre Redoxgleichgewicht der Hefezelle über einen anderen Mechanismus gewährleistet wird, so kommt es zu keinem metabolischen Stillstand. Die funktionale Charakterisierung von zwei Dihydroxyacetonkinasen sowie von Glycerin-dehydrogenasen in *Saccharomyces cerevisiae* können in gewissem Umfang zur Erklärung dieser metabolischen Veränderungen der Deletionsstämme herangezogen werden. Es wurde festgestellt, dass *Saccharomyces cerevisiae* Homologe der Dihydroxyacetonkinase (DAK) von *Citrobacter freundii*, zwei open reading frames

DAK1 und *DAK2*, besitzt. *DAK1* wird bei osmotischem Stress induziert, hingegen ist *DAK2* nur in geringem Maße exprimiert. Wenn nun eine Deletion von *DAK1* und *DAK2* in *Saccharomyces cerevisiae* die Wachstumshemmungen von *gpd1Δgpd2Δ*-Deletion regeneriert und der Stamm in geringem Maße befähigt ist, Glycerin zu bilden, bedeutet dies, dass Glycerin zu DHA bzw. DHA zu Glycerin umgesetzt werden kann (Molin et al., 1999).

Bei Betrachtung der Funktion von DAK in *Schizosaccharomyces pombe* ist erkennbar, dass der Glycerinabbau in Verbindung mit einer Glycerin-dehydrogenase (GLD) erfolgt, welche Glycerin zu Dihydroxyacetonphosphat reduzieren kann. Der Nachweis einiger potentieller GLD-codierenden Gene in *Saccharomyces cerevisiae* wurde über einen Peptid-Sequenz Vergleich mit *Aspergillus niger* festgestellt (Norbeck et al., 1996). Durch Untersuchungen (Norbeck, 1996; Blomberg, 2000) auf dem Transkriptionsniveau konnte *GCY1* als salz- bzw. osmotisch-reguliertes Gen im *Saccharomyces cerevisiae* Genom identifiziert werden. Der Nachweis, dass im *Saccharomyces cerevisiae* Genom *GCY1* existiert, kombiniert mit den Untersuchungsergebnissen (Molin et al., 1999), dass Stämme mit Deletion von *DAK1* und *DAK2* in *gpd1Δgpd2Δ*-Deletion Glycerin bilden, unterstützen die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ*-Deletionsstämmen die Fähigkeit besitzen, Glycerin zu bilden. Darüber hinaus zeigt es, dass ein weiterer Glycerinbildungsweg über DHAP und/oder DHA zu Glycerin in der Hefezelle *Saccharomyces cerevisiae* existiert.

Ein solcher Bildungsweg setzt eine Transhydrogenase Aktivität in *Saccharomyces cerevisiae* voraus. Ein Hinweis auf die Aktivität wurde von Bakker et al. (2001) gegeben. In diesen Untersuchungen wurde eine cytoplasmatische Transhydrogenase von *Acetobacter vinelandii* in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und es zeigte sich, dass unter anaeroben Wachstumsbedingungen ein signifikanter Anstieg von Glycerin und von 2-Oxoglutarat erfolgte. Für die Reaktion von 2-Oxoglutarat zu Glutamat wird der Kofaktor NADPH_2 benötigt, hingegen wird die Glycerinsynthese durch das NAD/NADH_2 Redoxgleichgewicht bestimmt.

Außerdem konnte bei diesen Untersuchungen (Bakker et al., 2001) festgestellt werden, dass bei der Nettokalkulation von 17 mM NADPH_2 pro C Mol Glucose bzw.

19 mM NADH₂ pro C Mol Glucose entstehen. D.h. dass die Bildung von Glycerin nicht als alleiniges Argument betrachtet werden kann, um einen Ausgleich des vollständigen NADH₂-Pools der Biomassensynthese zu bewirken. Um die Balance der Kofaktoren NADH₂ und NADP sowie NADPH₂ und NAD zu gewährleisten, müsste demnach eine Transhydrogenaseaktivität in *Saccharomyces cerevisiae* existieren. Ein weiterer Hinweis auf diese Art von Transhydrogenase ist die NAD und NADP-abhängige Aldehyd-dehydrogenase, welche durch *ALD6* codiert ist (Remize, 2000). Jedoch sind hier die Kofaktoren-Spezifität, die Lokalisation sowie die regulierenden Enzyme noch nicht detailliert genug untersucht worden, um diese spekulative Transhydrogenase-Aktivität zu belegen.

5.6. Fragestellung der metabolischen Effektivität

Es stellt sich nun die Frage, wenn es ein Kreislaufsystem von Dihydroxyacetonphosphat über Glycerin-3-phosphat, Glycerin und Dihydroxyaceton zum Ausgangsprodukt Dihydroxyacetonphosphat gibt, welchen metabolischen Vorteil das der *Saccharomyces cerevisiae* Zelle bietet. Eine mögliche Funktion dieses Zyklussystems ist die Transhydrogenase-Funktion, um 1 Molekül NADH₂ zu NADPH₂ umzuwandeln. Jedoch sollte beachtet werden, dass dieser Kreislauf 1 ATP benötigt, d.h. es ist ein energiezehrendes System.

Wird der Bildungsweg einer weniger bedeutenden osmotisch aktiven Substanz (Trehalose) betrachtet, welche auch unter stressinduzierten Bedingungen synthetisiert wird, so kann man feststellen, dass die Umwandlung von Glucose über Glucose-6-phosphat nach Trehalose und wieder zu Glucose ebenfalls ein ATP benötigt wird um den Kreislauf zu erhalten.

Ist es für eine Zelle sinnvoll, zwei energieverbrauchende Systeme unter osmotischen Stressbedingungen zu haben?

Auf den ersten Blick nicht, jedoch ist unter den Bedingungen des osmotischen Stresses eine solche ATP-Antwort der Zelle effizient. Bei osmotischem Stress reagiert die Zelle mit extrem schneller Wachstumsreduzierung bis hin zum Wachstumsstopp. Eine Konsequenz ist eine Reduktion der Biosynthese von Makromolekülen und ein sehr

niedriger ATP-Bedarf. Die ATP-Bilanz zeigt, dass 2 ATP im oberen Teil der Glycolyse nämlich bei der Umwandlung von Glucose nach Glucose-6-phosphat und von Fructose-6-phosphat nach Fructose-1,6-bisphosphat gebildet werden und 2 ATP im unteren Teil bei der Reaktion von 1,3-Diphosphoglycerat nach 3-Phosphoglycerin sowie von Phosphoenolpyruvat nach Pyruvat, in Summe 4 ATP pro Moleküle Glucose gebildet werden. Die Überproduktion von ATP würde einen erhöhten ATP Flux im unteren Teil der Glycolyse verursachen, was zu einem Ungleichgewicht zwischen dem oberen und unteren Teil führen würde. Dies würde theoretisch eine Akkumulation der Zwischenprodukte Hexosephosphat und Fructose-1,6-bisphosphat verursachen, was zu einem Phosphatüberschuss bis hin zum Zelltod führen könnte. Gestützt wird die These, dass ein *tps1Δ*-Stamm auf glucosehaltigem Medium nicht wachstumsfähig ist (Neves et al., 1995). Folglich ist ein stressinduzierter Verbrauch von ATP durch Glycerin- und Trehalose-Kreisläufe eine Möglichkeit, die Zelle vor einer intrazellulären Akkumulation von glykolytischen Intermediärprodukten zu bewahren.

Ein gravierender Unterschied zwischen den beiden Zyklen ist, dass der Glycerinzyklus mit dem Redoxgleichgewicht der Zelle gekoppelt ist.

5.7. Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass ein Überleben einer Zelle abhängig ist von der Fähigkeit, Veränderungen von Umweltbedingungen zu adaptieren.

Wenn man sich die Oberfläche von Früchten betrachtet, ist die ausgeprägte natürliche Adaption von Hefen zu erkennen. Nach einem Regen sind genügend Wasser und Nährstoffe für die Hefezelle verfügbar. Die Hefe absorbiert die gelösten Nährstoffe und kann sich vermehren. Nach einigen sonnigen und trockenen Tagen sind die Wachstumsbedingungen für die Hefezelle schwieriger. Dann erfolgt durch Wasserrückhaltung und Übergang in eine stabilere Zellform eine Adaption der Hefe. Wenn die Fruchtoberfläche zerstört wird, dann besitzt die Hefezelle sehr gute Voraussetzungen zum schnellen Wachstum. Die Zellen besitzen einen hohen Glycolyseflux zur Umsetzung des fruchteigenen Zuckers in Ethanol unter Gewinnung von Energie. Diese schnelle Verstoffwechslung, einhergehend mit einer pH-Reduktion

und Ethanol- und Glycerin-Produktion, zeigt den Überlebensvorsprung von Hefen gegenüber anderen Mikroorganismen.

Aus all diesen Überlegungen zeigt sich, dass die Berücksichtigung und die Betrachtung einzelner Einflussfaktoren nur einen begrenzten Einblick in die zellulären Reaktionen von *Saccharomyces cerevisiae* geben. Dementsprechend ist die Bezeichnung des Begriffs *Saccharomyces cerevisiae* als „genetische Black Box“, wenn speziell oenologische Fragestellungen betrachtet werden, richtig. Es zeigt weiterhin, dass die vollständige Sequenzierung des *Saccharomyces cerevisiae*-Genoms und die Identifizierung von Proteinen nur grundlegende „Werkzeuge“ darstellen. Jedoch um das Zusammenspiel der verschiedenen - High Osmolarity Glycerol Response Pathway (HOG) - Kaskaden von *Saccharomyces cerevisiae* zu verstehen, besteht noch ein enormer Forschungsbedarf.

Für die Zukunft stellen sich folgende Fragen:

Welche Bedeutung haben GCY1p und andere aldo- und keto-Reduktasen unter Stressbedingungen in *Saccharomyces cerevisiae* Zellen für die Glycerinsynthese? Ist eine genaue Zuordnung der Kofaktoren (NAD/NADH₂ und NADP/NADPH₂) zu den einzelnen Reaktionsvorgängen unter anaeroben und aeroben Bedingungen möglich? Ist eine direkte Übertragbarkeit der Laborforschungsergebnisse in oenologische Fragestellungen möglich und wie wird in der Praxis der Weinherstellung und die Weinqualität hierdurch berührt?

VI. Zusammenfassung

Die vorgelegten Untersuchungen über den „Einfluss von Stressfaktoren auf die Glycerin-Bildung und -Sekretion am Beispiel Weinhefen“ führten zu folgenden, bedeutenden Erkenntnissen:

Die intrazelluläre Akkumulation von Glycerin in Weinhefestämmen ist als Stressantwort auf die Gärtemperatur, den Alkoholgehalt und die Nährstoffverfügbarkeit mit abfallender Bedeutung zu interpretieren. Eine geringfügige Überproduktion von *GPD1* bzw. eine Reduktion von *FPS1* (ohne Beeinflussung des extrazellulären Glyceringehaltes) könnte die Stabilität der Weinhefen erhöhen. Eine schleppende oder verzögernde Gärung bei niedrigeren Gärtemperaturen ist mit dem Mangel an Akkumulation von intrazellulärem Glycerin verbunden.

Die Überexpression von *GPD1* in den Weinhefestämmen (K1m, 522, 71B) zeigen, dass trotz des allmählichen Plasmidverlustes eine erhöhte Glycerinbildung festgestellt werden. Einhergehend mit der erhöhten Glycerinbildung konnte eine verstärkte Bildung von Acetaldehyd nachgewiesen werden. Da Acetaldehyd einen negativen sensorischen Einfluss auf den Wein ausübt und der Hauptbindungspartner von SO₂ ist, ist diese Nebenaktivität für die moderne Kellerwirtschaft nicht erwünscht.

Aus den Ergebnissen der Drop-Test-Untersuchungen konnte aufgezeigt werden, dass der Hefestamm CEG gegenüber osmotischem Druck hypersensitiv reagiert, was begründet, dass dieser Stamm als langsam gärender Stamm mit Tendenz zu steckengebliebenen Weinen in der praktischen Weinbereitung bekannt ist.

Aus den Untersuchungen mit den Deletionsstämmen *gpd1Δgpd2Δ*, *gpp1Δgpp2Δ* und *gpd1Δgpd2Δgpp1Δgpp2Δ* zeigte sich, dass ein Zellwachstum der Deletionsstäme in Traubenmost mit einhergehender reduzierter Glycerinbildung erfolgte. Aus diesen Erkenntnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine Transhydrogenase-Aktivität unter anaeroben Bedingungen in *Saccharomyces cerevisiae* existiert. Die metabolische Effektivität dieses Sachverhaltes wurde eingehend diskutiert.

Für die Zukunft lässt sich anhand dieser Ergebnisse festhalten, für eine industrielle Produktion eines glycerinbildenden Stammes bei gleichzeitiger Optimierung der sekundären Gärungsprodukten ist u.a. ein integriertes Plasmid mit *GPD1* Überexpression und eine Inaktivierung von *ALD6* notwendig, um den oenologischen Ansprüchen gerecht zu werden. Weiterhin ist die genaue Zuordnung der Kofaktoren

NAD/NADH₂ und NADP/NADPH₂ zu den einzelnen Reaktionsvorgängen unter aeroben und anaeroben Bedingungen notwendig.

Aus all diesen Erkenntnissen zeigt sich, dass die Betrachtung einzelner biochemischer Reaktionen nur einen begrenzten Einblick in *Saccharomyces cerevisiae* Hefen geben. Anhand der dargestellten Ergebnisse wurde der Begriff „genetische Black Box“ für *Saccharomyces cerevisiae*, speziell wenn oenologische Fragestellungen betrachtet werden, bestätigt.

VII. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1.	Glycerin-Metabolismus	17
Abb. 2.2.	Der HOG-Weg in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Abb. 2.3.	Elektronenübertragung unter anaeroben und aeroben Bedingungen	39
Abb. 2.4.	Bildungswege von Aroma-aktiven Substanzen durch <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fleet, 1992)	45
Abb. 3.1.	Anordnung von α <i>gpd1Δgpd2Δ</i> - und α <i>gpp1Δgpp2Δ</i> -Zellen auf einer YPDA-Agarplatte	68
Abb. 3.2.	Schematische Darstellung der Mikromanipulation	70
Abb. 3.3.	Schematische Darstellung der Verdünnungsstufen	71
Abb. 3.4.	Schematische Darstellung der Verdünnungsstufen-Verteilung bei einem Drop-Test-Versuch für einen Hefestamm	72
Abb. 3.5.	Schematischer Aufbau des 7. Fermentations-experimentes	74
Abb. 4.1.	Glycerin- (intra-/extra-zellulär) und Restzucker-Konzentrationen von Weinhefestämmen bei 15 °C und 20 °C	77
Abb. 4.2.	Glycerin- (intra-/extra-zellulär) und Restzucker-Konzentrationen von Weinhefestämmen in Traubenmost und synthetischem Nährmedium bei 20 °C	80
Abb. 4.3.	Restzucker-, Alkohol- und extrazelluläre Glycerinkonzentrationen von 10 verschiedenen Hefestämmen bei 20 °C und 25 °C	85
Abb. 4.4.	Acetat-, Acetaldehyd- und extrazelluläre Glycerinkonzentrationen von 10 verschiedenen Weinhefestämmen bei 20 °C und 25 °C	86
Abb. 4.5.	Drop-Test: Kontrolle: YPDA-Platte	89
Abb. 4.6.	Drop-Test: YPDA-Platte 4 % NaCl	89
Abb. 4.7.	Drop-Test: YPDA-Platte 6 % NaCl	90
Abb. 4.8.	Drop-Test: YPDA-Platte 8 % NaCl	90
Abb. 4.9.	Drop-Test: YPDA-Platte 1 % Sorbitol	91

Abb. 4.10.	Drop-Test: aerobe Kontrolle: YPDA-Platte	92
Abb. 4.11.	Drop-Test: YPDA-Platte	92
Abb. 4.12.	Aromenbildung von 2-/3-Methylbutanol und 2-/3-Methylbutylacetat	95
Abb. 4.13.	Aromenbildung von Hexanol und Hexylacetat	96
Abb. 4.14.	Aromenbildung von 2-Phenylethanol und Phenylethylacetat	97
Abb. 4.15.	Aromenbildung von Capronsäure und Capronsäure- ethylester	98
Abb. 4.16.	Aromenbildung von 2-/3-Methylbutanol und 2-/3-Methylbutylacetat	101
Abb. 4.17.	Aromenbildung von Hexanol und Hexylacetat	102
Abb. 4.18.	Aromenbildung von 2-Phenylethanol und Phenylethylacetat	103
Abb. 4.19.	Aromenbildung von Caprinsäure und Caprinsäure- ethylester	105
Abb. 4.20.	Aromenbildung von Fumarat und Succinat	106
Abb. 4.21.	Aromenbildung von 2-/3-Methylbutanol	109
Abb. 4.22.	Aromenbildung von 2-/3-Methylbutylacetat	110
Abb. 4.23.	Aromenbildung von Essigsäure	111
Abb. 4.24.	Aromenbildung von Ethylacetat	112

VIII. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Redoxbilanz verschiedener Fermentationsprodukte (Wachstum auf glucosehaltigen Medien)	36
Tab. 3.1.	Auflistung der Deletions-Hefestämme	50
Tab. 3.2.	Auflistung der Weinhefestämme	51
Tab. 3.3.	Auflistung der gentechnisch veränderten Weinhefestämme	51
Tab. 3.4.	Technische Daten der HPLC-RI-Anlage	62
Tab. 3.5.	Kalibrierdaten für die HPLC-RI-Anlage	63
Tab. 3.6.	Technische Daten der HPLC-UV-Anlage	64
Tab. 3.7.	Kalibrierdaten der HPLC-UV-Anlage	65
Tab. 3.8.	Technische Daten der GC-MS-Anlage	66
Tab. 3.9.	Kalibrierdaten der GC-MS-Anlage	67
Tab. 4.1.	Alkohol-, Acetaldehyd-, Pyruvat-, Acetat-Konzentrationen sowie die Bestimmung der Gesamtzellzahl von Weinhefestämmen bei 15 °C und 20 °C	78
Tab. 4.2.	Alkohol-, Acetaldehyd-, Pyruvat-, Acetat-Konzentrationen sowie die Bestimmung der Gesamtzellzahl von Weinhefestämmen in Traubenmost und synthetischem Nährmedium (ASII) bei 15 °C und 20 °C	82
Tab. 4.3.	Glucose- und Fructose-Abnahmen sowie extrazelluläre Glycerinkonzentrationen der Hefestämme W 303A, S3 und K1m/GPD1	94
Tab. 4.4.	Glucose- und Fructose-Abnahmen sowie extrazelluläre Glycerinkonzentrationen des Hefestammes W 303A und den Deletionsstämmen (<i>gpd1Δgpd2Δ</i> , <i>gpp1Δgpp2Δ</i> , <i>gpd1Δgpd2Δ gpp1Δgpp2Δ</i>)	100
Tab. 4.5.	Glucoseabnahmen sowie extrazelluläre Glycerinkonzentrationen der Hefestämme W 303A und <i>gpd1Δgpd2Δ gpp1Δgpp2Δ</i>	108

IX. Literaturverzeichnis

- Akhtar N., Blomberg A., Adler L. (1997): Osmoregulation and protein expression in a *pbs2Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to hypersaline stress. *FEBS Lett.*; 403: 173-180
- Albers E., Gustafsson L., Niklasson C., Liden G. (1998): Distribution of ¹⁴C-labelled carbon from glucose and glutamate during anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.*; 144: 1683-1690
- Albers E., Larsson C., Liden G., Niklasson C., Gustafsson L. (1996): Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.*; 62: 3187-3195
- Albertyn J., Hohmann S., Prior B.A. (1994a): Characterization of the osmotic-stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. *Curr. Genet.*; 25: 12-18
- Albertyn J., Hohmann S., Thevelein J.M., Prior B.A. (1994b): *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.*; 14: 4135-4144
- Albertyn J., van Tonder A., Prior B.A. (1992): Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*; 308: 130-132
- Anderlund M., Nissen T.L., Nielsen J., Villadsen J., Rydström J., Hahn-Hägerdal B., Kielland-Brandt M.C. (1999): Expression of the *Escheria coli* *pntA* und *pntB* genes, encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on product formation during anaerobic glucose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*; 65: 23333-40
- André L., Hemming A., Adler L., (1991): Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS Lett.*; 286: 13-17
- Ansell R., Granath K., Hohmann S., Thevelein J.M., Adler L. (1997): Two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *J. EMBO*; 16: 2179-2187

- Arikawa Y., Enomoto K., Muratsubaki I., Okazaki M. (1998): Soluble fumarate reductase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* are required for anaerobic growth. *FEMS Microbiol. Lett.*; 165: 111-116
- Bakker B.M., Overkamp K.M., van Maris A.J.A., Kötter P., Luttik M.A.H., van Dijken J.P., Pronk J.T. (2001): Stoichiometry and compartmentation von NADH₂ metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*; 25: 15-37
- Bardi L., Crivelli C., Marzona M. (1998): Esterase activity and release of ethyl esters of medium-chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth. *Can. J. Microbiol.*; 44: 1171-1176
- Bisping B. and Rehm H.J. (1982): Glycerol production by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*; *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 14: 136-139
- Bjorkqvist S., Ansell R., Adler L., Liden G. (1997): Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*; 63:128-132
- Blomberg A. (1995): Global changes in protein synthesis during adaptation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to 0,7 M NaCl. *J. Bacteriol.*; 177: 3563-3572
- Blomberg A. (2000): Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol. Lett.*; 182: 1-8
- Blomberg A. and Adler L. (1989): Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*; 171: 1087-1092
- Blomberg A. and Adler L. (1992): Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol.*; 33: 146-212
- Boehringer (1984): Methoden der biochemischen Analytik und Lebensmittelanalytik mit Test-Combination. Boehringer Mannheim GmbH Biochemica
- Bostain K.A. and Betts G.F. (1978a): Rapid purification and properties of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.*; 173: 773-786
- Bostain K.A. and Betts G.F. (1978b): Kinetics and reaction mechanism of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.*; 173: 787-798

- Boy Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., Jacquet M. (1998): Msn2p und Msn4p control a large number of genes induced at diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*; 180: 1044-1052
- Brewster J.L., de Valoir T., Dwyer N.D., Winter E., Gustin M.C. (1993): An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*; 259: 1760-1763
- Brown A.D. (1978): Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganism. *Microbial. Physiol.*; 17: 181-242
- Brown A.D. and Edgley M. (1980): Osmoregulation in yeast. DW. Rains, RC. Valentine, A. Hollander (eds.). In: Genetics engineering of osmoregulation. Impact on plant productivity for food, chemicals and energy. Plenum Press, New York: 75-90
- Brown A.D., Mackenzie K.F., Singh K.K. (1986): Selected aspects of microbial osmoregulation. *FEMS Microbiol. Rev.*; 39: 31-36
- Cai J., Piezsch M., Theobald U., Rizzi M., (1996): Fast purification and kinetic studies of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; *J. Biotechnol.*; 49: 19-27
- Calderbank J. and Hammond J.R.M. (1994): Influence of higher alcohol availability on ester formation by yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*; 52: 84-90
- Chapman C. and Barley W. (1968): The kinetics of enzyme changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. *J. Biochem.*; 107: 455-465
- Chowdbury S., Smith K.W., Gustin M.C. (1992): Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of actin mutation. *J. Cell. Biol.*; 118: 561-571
- Davenport K.R., Sohaskey M., Kamada Y., Levin D.E., Gustin M.C. (1995): A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase regulated cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.*; 270: 30157-30161
- de Maronon I.M., Gervais P., Molin P. (1997): Determination of cells water membrane permeability unexpected high osmotic permeability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*; 56: 62-70
- de Vries S. and Marres C.A. (1987): The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochem. Biophys Acta*; 895: 205-239

- Degré R. (1992): Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. G.H. Fleet (eds), In: Wine Microbiology and Biotechnology, Harwood Publishers: 421-449
- Degünther B., Großmann M.K., Ellwanger S. (1999): Aromaprofile bei unterschiedlichen Gärtemperaturen. *Deut. Weinm.*; 15: 12-17
- Dittrich H.H. (1987): Mikrobiologie des Weines, Eugen Ulmer Verlag, 2. Aufl.:148-164
- Edgley M. and Brown A.D. (1983): Yeast water relation: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *J. Gen. Microbiol.*; 129: 3453-3463
- Eriksson P., André L., Ansell R., Blomberg A., Adler L. (1995): Cloning and characterization of *GPD2*, a second gene sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae* and its comparison with *GPD1*. *Mol. Microbiol.*; 17: 95-107
- Fleet H.G. (1992): Yeasts-growth during fermentation. In: Wine Microbiology and Biotechnology, G.H. Fleet (eds), Harwood Publishers: 27-55
- Gancedo C., Gancedo J.M., Sols A. (1968): Glycerol metabolism in yeast. Pathways of utilization and production. *Eur. J. Biochem.*; 5: 165-172
- Gancedo J.M. and Gancedo C. (1973): Concentration of intermediary metabolites in yeast. *Biochemie*; 55: 205-211
- Gardner N., Rodrigue N., Champagne C.P. (1993): Combined effects of sulfites, temperature and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*; 59: 2022-2028
- Godon C., Lagniel G., Lee J., Buhler J.M., Kieffer S., Perrot M., Boucherie H., Toledano M.B., Labarre J. (1998): The H₂O₂ stimulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*; 273: 22480-22489
- Großmann M.K. (1999): Final Report, Partner 8:Geisenheim, EU Project: Yeast glycerol metabolism: 28-30
- Gustin M.C., Albertyn J., Alexander M., Davenport K. (1998): MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Rev.*; 66: 1281-1300
- Heere E. and Radler F. (1978): Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*; 117: 269-276

- Henry S.A. (1982): Membrane lipids of yeast: biochemical and genetic studies. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolism and gene expression*; 101-158
- Hirayama T., Maeda T., Saito H., Shinozaki K. (1995): Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*; 249: 127-138
- Hohmann S. (1991): Characterization of *PDC6*, a third structural gene of pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*; 173: 7963-7969
- Hohmann S. (1993): Characterization of *PDC2*, a gene necessary for high level expression of pyruvate decarboxylase structural genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*; 241:657-666
- Hohmann S. (2000), persönliche Mitteilung, University of Gothenburg-Lundberg Laboratories, Sweden
- Hohmann S. and Mager W.H. (1997): Crucial factors in salt stress tolerance. In: Yeast stress response. Molecular biology intelligence unit. Springer (eds.): 147-164
- Jakobson M.K. and Bernofsky C. (1974): Mitochondrial acetaldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta*; 350: 277-291
- Jakoby T., Flanagan H., Fakyin A., Seto A., Mattison C., Ota I. (1997): Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J. Bio. Chem.*; 272: 17742-17755
- Kielland-Brandt M.C. (2000), persönliche Mitteilung, University of Gothenburg-Lundberg Laboratories, Sweden
- Lagunas R. and Gancedo J.M. (1973): Reduced pyridine-nucleotides balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 37: 90-94
- Larsson C., Ansell R., Eriksson P., Adler L. (1993): A gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*; 10: 1101-1111
- Larsson C., Pahlmann I.L., Ansell R., Rigoulet M., Adler L., Gustafsson L. (1998): The importance of the glycerol-3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*; 14: 347-357

- Latterich M. and Watson M.D. (1993): Evidence for a dual osmoregulatory mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 191: 1111-1117
- Liden G., Walfridsson M., Ansell R., Anderlund M., Adler L., Hahn-Hägerdal B. (1996): A glycerol-3-phosphate dehydrogenase deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the heterologous *XYLI* gene. *Appl. Environ. Microbiol.*; 62: 3894-3896
- Lorente N. and de Castro I.N. (1977): Physiological role of yeast NAD(P)⁺ and NADP⁺-linked aldehyde dehydrogenase. *Rev. Esp. Fisiol.*; 33: 135-142
- Lupianez J.A., Machado A., Nunez de Castro I., Mayor F. (1974): Succinic acid production by yeast grown under different hypoxic conditions. *Mol. Cell. Biochem.*; 3: 113-116
- Luttik M.A.H., Overkamp K.M., Kotter P., de Vries S., van Dijken J.P., Pronk J.T. (1998): The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encodes separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Biol. Chem.*, 273: 24529-24534
- Luyten K., Albertyn J., Skibbe W.F., Prior B., Ramos J., Thevelein J.M., Hohmann S. (1995): Fps1p, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator of glycerol uptake and efflux and it is inactive under osmotic stress. *J. EMBO*; 14: 1360-1371
- Machado A., Nunez de Castro I., Mayor F. (1975): Isocitrate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase activities of baker yeast grown in a variety of hypotoxic conditions. *Mol. Cell. Biochem.*; 6: 93-100
- Magarifuchi T., Goto K., Iimura Y., Tadenuma M., Taruma G. (1995): Effect of yeast fumarase gene (*FUM1*) disruption on production of malic, fumaric and succinic acids in sake mash. *J. Ferment. Bioeng.*; 80: 355-361
- Meaden P.G., Dickinson F.M., Mifsud A., Tessier W.D., Westwater J., Bussey H., Midgley M. (1997): The *ALD6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic Mg²⁺-activated acetaldehyde dehydrogenase. *Yeast*; 13: 1319-1327
- Meikle A.J., Reed R.H., Gadd G.M. (1988): Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*; 134: 3049-3060
- Michnick S. (1995): Etude de la glycérol-3-phosphate déhydrogénase en relation avec la production de glycérol en fermentation oenologique chez *Saccharomyces*

- cerevisiae*. Conséquence de la sur expression et de la disruption du gène *GPD1*. Thèse, Université Montpellier II, France
- Michnick S., Roustan J.L., Remize F., Barre P., Dequin S. (1997): Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*; 13: 783-793
 - Molin M., Norbeck J., Blomberg A. (1999): Functional characterization of the two *Saccharomyces cerevisiae* homologs of bacterial dihydroxyacetone kinase. Conference Functional Genomics (Poster M2), Göteborg
 - Muratsubaki I. (1987): Regulation of reductive production of succinate under anaerobic conditions in baker yeast. *J. Biochem.*; 102: 705-714
 - Muratsubaki I. und Katsume T. (1982): Purification and properties of fumarate reductase from baker yeast. *Agric. Biol. Chem.*; 46: 2909-2917
 - Nader W., Betz A., Becker J.U. (1979): Partial purification, substrate specificity and regulation of α -L-glycerolphosphate dehydrogenase from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene*; 45: 299-310
 - Nagodwithana T.W., Whitt J.T., Cutaia A.J. (1977): Study of the feedback effect of ethanol on selected enzymes of the glycolytic pathway. *J. Am. Soc. Brew. Chemist.*; 39: 179-183
 - Neuberg C. and Reinfurth E. (1918): Natürliche und erzwungene Glycerinbildung bei der alkoholischen Gärung. *Z. Biochem.*; 100: 234-266
 - Neves M.J., Hohmann S., Bell W., Dumortier F., Luyten K., Ramos J., Cobbaert P., de Koenig W., Kaneva Z., Thevelein J.M. (1995): Control of glucose influx into glycolysis and pleiotropic effects studied in different isogenic sets of *Saccharomyces cerevisiae* mutants in trehalose biosynthesis. *Curr. Genet.*; 27: 110-122
 - Nilsson A. and Adler L. (1990): Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Biochem. Biophys. Acta*; 1034: 180-185
 - Nishino H., Miyazaki S., Tohjo K. (1985): Effect of osmotic pressure on the growth rate and fermentation activity of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*; 36: 170-174
 - Norbeck J. (1996): Protein expression of yeast during growth under osmotic stress. Thesis, University of Gothenburg, Sweden

- Norbeck J. and Blomberg A. (1997): Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1,4 M NaCl. *J. Biol. Chem.*; 272: 5544-5554
- Norbeck J., Pahlmann A.K., Akhtar N., Blomberg A., Adler L. (1996): Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*; 271: 13875-13881
- Nordström K. (1968): Yeast growth and glycerol formation. II. Carbon and redox balances. *J. Inst. Brew.*; 74: 429-432
- Ough C.S., Fong D., Amerine M.A. (1972): Glycerol in wine: determination and some factors affecting. *Am. J. Enol. Vitic.*; 23: 1-5
- Oura E. (1977): Reaction products of yeast fermentations. *Process. Biochem.*; 35: 19-21
- Overkamp K.M., Luttk M.A.H., Kötter P. de Vries S., van Dijken J.P., Pronk J.T. (1998): Oxidation of cytosolic NADH by mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. EC Framework IV symposium, Yeast as a cell factory; Poster
- Philipps J. and Herskowitz I. (1997): Osmotic balance regulates cell fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.*; 138: 961-974
- Pines O., Shemesh S., Battat E., Goldberg I. (1997): Overexpression of cytosolic malate dehydrogenase (*MDH2*) causes overproduction of specific organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Technol.*; 48: 248-255
- Posas F., Wurgler-Murphy S.M., Maeda T., Witten E.A., Thai T.C., Saito H. (1996): Yeast *HOG1* MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN-YPD-SSK1 „two-component“ osmosensor. *Cell*; 86: 865-875
- Pretorius I.S. and van der Westhuizen T.J. (1991): The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry – A review. *S. Afric. J. Enol. Vitic.*; 12: 3-31
- Pretorius, I.S. (2000): Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*; 16: 675-729
- Radler F. and Schutz H. (1982): Glycerol production of various strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.*; 33: 36-40
- Rankine B.C. and Bridson D.A. (1971): Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. *Am. J. Enol. Vitic.*; 22: 6-12
- Rapp A. (1989): Aromastoffe des Weines. *Weinwirt. Technik*; 7: 17-27

- Rapp A., Yavas I., Hastrich H. (1994): Einfache und schnelle Anreicherung („Kaltronmethode“) von Aromastoffen des Weines und deren quantitative Bestimmung mittels Kapillargaschromatographie. *Deut. Lebensm. Rundsch.*; 6: 171-174
- Reazin G., Scales H., Andreasen A. (1970): Mechanism of major congener formation in alcoholic grain fermentations. *J. Agric. Food Chem.*; 18: 585-589
- Remize F. (2000): Ingénierie de la production de glycérol chez *Saccharomyces cerevisiae* – Régulation, surproduction, et maîtrise des effets secondaires; Thèse, Université Montpellier II, France
- Ronnow B. und Kielland-Brandt M.C. (1993): *GUT2*, a gene for mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*; 9: 1121-1130
- Ruis H. and Schüller C. (1995): Stress signaling in yeast. *BioEssays*; 17: 959-965
- Saigal D., Cunningham S.J., Farres J., Weiner H. (1991): Molecular cloning of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene of *Saccharomyces cerevisiae* by genetic complementation. *J. Bacteriol.*; 173: 3199-3208
- Scanes K.T., Hohmann S., Prior B.A. (1998): Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*; 19: 17-24
- Schmitt H.D. and Zimmermann F.K. (1982): Genetic analysis of the pyruvate decarboxylase reaction in yeast glycolysis. *J. Bacteriol.*; 151: 1146-1152
- Schmitt H.D.; Ciriacy M., Zimmermann F.K. (1983): The synthesis of yeast pyruvate decarboxylase is regulated by large variation in the messenger RNA level. *Mol. Gen. Genet.*; 192: 247-252
- Schüller C., Brewster J.L., Alexander M.R., Gustin M.C., Ruis H. (1994): The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *J. EMBO*; 13: 4382-4389
- Schwartz H., Steitz H., Radler F. (1983): Partial purification and characterization of succinyl-CoA-synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Antonie van Leeuwenhoek*; 49: 69-78
- Seeboth P.G., Bohnsack K., Hollenberg C.P. (1990): *Pdc1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* give evidence for an additional structural PDC gene: cloning of *PDC5*, a gene homologous to *PDC1*. *J. Bacteriol.*; 172: 678-685

- Seegmiller J.E. (1953): Triphosphopyridine nucleotide-linked aldehyde dehydrogenase from yeast. *J. Biol. Chem.*; 201: 629-637
- Sigler K., Knotkova A., Paca J., Wurst M. (1980): Extrusion of metabolites from baker yeast during glucose-induced acidification. *Folia Microbiol.*; 25: 311-317
- Singh K.K. and Norton R.S. (1991): Metabolic changes induced during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to water stress. *Arch. Microbiol.*; 156: 38-42
- Sleep D., Ogden J.E., Roberts N.A., Goodey A.R. (1991): Cloning and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*GUT2*) promoter. *Gene*; 101: 89-96
- Small W.C. and McAlister-Henn L. (1998): Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*; 180: 4051-4055
- Steinman C.R. and Jakoby W.B. (1968): Yeast aldehyde dehydrogenase. II. Properties of the homogenous enzyme preparation. *J. Biol. Chem.*; 243: 730-734
- Sutherland F.C.W., Lages F., Lucas C., Luyten K., Albertyn J., Hohmann S., Prior B.A., Kilian S.G. (1997): Characteristics of *Fps1*-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*; 179: 7790-7795
- Tamaki N., Nakaruma M., Kimura K., Hama T. (1977): Purification and properties of aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.*; 82: 73-79
- Tamas M.J., Luyten K., Sutherland F.C.W., Hernandez A., Albertyn J., Valadi H., Li H., Prior B.A., Kilian S.G., Ramos J., Gustafsson L., Thevelein J.M., Hohmann S. (1999): *Fps1p* controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol. Microbiol.*; 31: 1087-1104
- Tanner H. and Brunner H.R. (1987): Getränke-Analytik. Verlag Heller Chemie- und Verwaltungsgesellschaft, 2. Aufl., Schwäbisch Hall
- Tessier W.D., Meaden P.G., Dickinson F.M., Midgley M. (1998): Identification and disruption of the gene encoding the K⁺-activated acetaldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*; 164: 29-34
- Thevelein J.M. and Hohmann S. (1995): Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.*; 20: 3-10
- Tielens G.M. and van Hellemond J.J. (1998): The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochem. Biophys. Acta*; 1365: 71-78
- Valera J.C.S., van Beekvelt C., Planta R.J., Mager W.H. (1992): Osmostress-induced changes in yeast gene expression. *Mol. Microbiol.*; 6: 2183-2190

- van Aelst L., Hohmann S., Zimmermann F.K. (1991): A yeast homolog of the bovine lens fibre MIP gene family complements the growth defect of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant on fermentable sugars but not its defect in glucose-induced RAS-mediated cAMP signaling. *J. EMBO*; 10:2095-2104
- van Dijken J.P. and Scheffers W.A. (1986): Redox balances in the metabolism of sugar by yeasts. *FEMS microbiol. rev.*; 32: 199-224
- van Zyl P.J., Prior B.A., Kilian S.G. (1991): Regulation of glycerol metabolism in *Zygosaccharomyces rouxii* in response to osmotic stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 36: 369-374
- Vielliers M. (1998): Ester production by yeast in wine and brandy. Master Thesis, University of Stellenbosch, South Africa: 47-52
- Wang X., Bai Y., Ni L., Weiner H. (1997): *Saccharomyces cerevisiae* aldehyde dehydrogenases. Identification and expression. *Adv. Exp. Med. Biol.*; 414: 277-280
- Wang X., Mann C.J., Bai Y., Ni L., Weiner H. (1998): Molecular cloning, characterization and potential roles of cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase in ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*; 180: 822-830
- Watanabe M., Uehara M., Shinohara T. (1982): Effect of cell number on the formation of glycerol and some volatile compounds by yeast. *J. Brew. Soc. Japan*; 77: 345-346
- Würdig G. and Woller R. (1989): Zusammensetzung und Beurteilung der Wein. In: Chemie des Weines. Eugen Ulmer Verlag: 584-615

Lebenslauf

<u>Persönliche Daten</u>	Ilona Schneider geb. 21. Oktober 1969 in Saarburg	
<u>Schulbildung</u>	1976 – 1980	Grundschule Wincheringen
	1980 – 1989	Gymnasium Saarburg
<u>Praktika:</u>	05.1989 – 08.1990	SLVA Trier-Versuchskellerei, Trier Weingut A. Kallfelz, Zell-Merl SLVA Trier – Weinchemie, Trier Sektkellerei St. Rochus, Nittel Merziger Fruchtsaft GmbH, Merzig
<u>Studium</u>	09.1990 – 01.1994	Getränketechnologie an der Fachhochschule Wiesbaden in Geisenheim
	01.1994	Diplom Getränketechnologie
	09.1994 – 04.1997	Aufbaustudium Oenologie an der Justus-Liebig Universität in Giessen
	04.1997	Diplom Oenologe
<u>Berufliche Tätigkeit</u>	04.1994 – 07.1994	Caves Bernard-Massard, Grevenmacher (Luxemburg)
	09.1996 – 12.1996	ETS Laboratories, St. Helena (USA)
	seit 07.1997	Doktorandin an der Justus-Liebig Universität in Giessen, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
	07.1997 – 11.1998	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie
	07.1998 – 11.1999	Stipendiat an der TU Chalmers, Universität Göteborg - Lundberg Labor (Schweden)
	11.1999 – 03.2000	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie
	02.2000 – 12.2000	Projektleiterin „Erstellung von Umweltkennzahlen im Weinbau“ an der SLFA Neustadt a. d. Weinstrasse
	12.2000	E. Begerow GmbH & Co. Produktmanagerin Biotechnologie

Danksagungen

Es ist mir ein Anliegen am Ende der Arbeit all denen meinen Dank auszusprechen, die es mir ermöglichten, sie in dieser Form vorzulegen.

Frau Prof. Dr. I. Bitsch möchte ich für die Durchführung des Promotionsverfahrens an der Universität Giessen danken.

Herrn Prof. Dr. M.K. Großmann danke ich für die Betreuung und die Möglichkeit, dieses Thema bearbeiten zu können. Besonders danke ich ihm für seine wertvollen Ratschläge und seine Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. S. Hohmann, Herrn Prof. Dr. L. Adler und Herrn Prof. Dr. J. Rydström für die fachliche Unterstützung während meines Aufenthaltes im Lundberg Labor an der Universität Göteborg.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lundberg Labors, besonders bei Anna-Karin Pählmann, Inga-Lill Pählmann, Åsa Manson, Burkhard Kaiser, Fabienne Remize und Ingrid Sørensen für die fachlich wertvollen Diskussionen.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachgebietes für Mikrobiologie und Biochemie, die in besonderem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich Frau Hildegard Diehl für die gute Zusammenarbeit.

Besonderen Dank gilt auch den internationalen Partnern des EU-Projektes „Yeast Glycerol Metabolism“ für die anregenden Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Für die Motivation und den ständigen Anstoß zur Ausarbeitung dieser Arbeit bedanke ich mich bei meiner Familie sowie meinem gesamten Freundeskreis.