

Vorkommen und Stoffwechsellleistungen
von Bakterien der Gattungen *Acetobacter* und *Gluconobacter*
während der Weinbereitung
unter Berücksichtigung des Zucker-Säure-Stoffwechsels

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
Periadnadi
aus Malampah Bonjol Indonesien

Frankfurt 2003
(D F 1)

Vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe - Universität als
Dissertation angenommen.

Dekan : Prof. Dr. B. Streit

Gutachter : Prof. Dr. M. Brendel
Prof. Dr. W.-R. Sponholz

Datum der Disputation : 28.11.2003

*Meiner Mutter
und meinem Vater
gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis:	v
Tabellenverzeichnis	viii
Anhangsverzeichnis	ix
Abkürzungsverzeichnis	x
1. Einleitung und Problemstellung	1
II. Essigsäurebakterien	4
2.1. Klassifikation	4
2.3. Vorkommen der Essigsäurebakterien bei der Weinbereitungen	7
2.3. Stoffwechsellleistungen von Essigsäurebakterien	10
2.3.1. Gluconsäure	15
2.3.2. 5-Ketogluconsäure	17
2.3.4. 2-Ketogluconsäure	18
2.3.5. 2,5-Diketogluconsäure	18
III. Untersuchung der Stoffwechsellleistungen der Essigsäurebakterien	20
3.1. Untersuchte Essigsäurebakterien	20
3.2. Medien und Probematerialien	20
3.4. Probenvorbereitung	23
3.4.1. Ionaustauscher Säule	23
3.4.2. Entsäuerung	24
3.4.3. Behandlung mit PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon)	24
3.4.4. Filtration und Zentrifugierung	24
3.4.5. Gefriertrocknung	24
3.5. Chromatographische Untersuchungen	24
3.5.1. Dünnschichtchromatographische Analyse	25
3.5.2. Säulenchromatographische Trennungen	28
3.5.3. HPLC-Analyse	30
IV. Animpfung von Essigsäurebakterien auf Traubenbeeren, in Mosten, Weinen und synthetischen Medien	37
4.1. Die Gewinnung der Bakterienkultur	37
4.2. Animpfung der Essigsäurebakterien auf Traubenbeeren	37
V. Das Wachstum der Essigsäurebakterien	44
5.1. Wachstum der Essigsäurebakterien auf Traubenbeeren	45

5.2. Wachstum der Essigsäurebakterien in Mosten	46
5.3. Wachstum der Essigsäurebakterien in Weinen	49
5.4. Essigsäurebildung in den Weinen	49
VI. Zuckersäurestoffwechsel der Essigsäurebakterien	51
6.1 Gluconsäure	54
6.2 2-Ketogluconsäure	57
6.3 5-Ketogluconsäure	60
6.4 2,5-Diketogluconsäure	63
6.5 Zusammenhänge zwischen den Ketogluconsäuren	64
VII. Untersuchung über Zuckersäurestoffwechselprodukte in Weinen	66
VIII. Zusammenfassung	75
IX. Summary	77
Literaturverzeichnis :	79
Anhang	84

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: <i>Botrytis cinerea</i> isoliert aus den Traubenbeeren	9
Abb. 2: Glucoseoxidation bei <i>Gluconobacter oxydans</i>	11
Abb. 3: Bildung von Essigsäure durch Essigsäurebakterien	12
Abb. 4: Schematische Essigsäurebildung durch Dismutation bei Essigsäurebakterien nach Asai (1968)	13
Abb. 5: Die Cellulosebildung aus Glucose bei der Essigsäurebakterienart <i>A. xylinum</i> (Gekürzt, nach Ross et al. 1991).	14
Abb. 6: Die von <i>A. xylinum</i> an der Oberfläche eines Glucose-Mediums gebildete Cellulose	14
Abb. 7: Oxidation von Glucose zu Gluconsäure mit Glucoseoxidase (Dellweg 1987, Kleber und Schlee 1988, Sponholz 1989)	15
Abb. 8: Die Braunschwarzfärbung auf <i>Acetobacter</i> -Medium nach 3-tägiger Beimpfung bei 30°C mit <i>A. liquefaciens</i>	16
Abb. 9: Oxidation von Gluconsäure zu 5-Ketogluconsäure durch Essigsäurebakterien (Sponholz 1990)	17
Abb. 10: Die Oxidation von Glucose zu 2,5-Diketogluconsäure (Sponholz 1990)	19
Abb. 11: Eine drei Tage alte Kultur von <i>Acetobacter aceti</i> auf Glucose Hefe Extrakt (CCM) Medium (l). Mikroskopisches Bild einer dreitägigen Kultur von <i>A. liquefaciens</i> nach Gramfärbung (r).	21
Abb. 12: Trogkammer mit normaler Sättigung (A) und totaler Sättigung (B)	26
Abb. 13: Schematische Darstellung zur qualitativen Auswertung der DC-Platten	26
Abb. 14: Dünnschichtchromatogramm von 2-Ketogluconsäure, 2,5-Diketogluconsäure und von <i>A. liquefaciens</i> beimpften Medien, nach 16 Stunden	28
Abb. 15: Chromatogramm eines Standardgemisches von Zuckersäuren (A) und Trauben der Sorte Rotberger 9 nach Tage Beimpfung mit <i>A. liquefaciens</i> (B):	30
Abb. 16: Aufbau und Funktionen eines HPLC-Systems (Unger 1989)	31
Abb. 17: Die Trennung der Zuckersäuren und anderer organischen Säuren auf der Fertigsäule RT 300-6,5 Polyspher OAHY (Merck, Darmstadt) bei verschiedenen Säulentemperaturen mit 0,5 ml/min 0.01 N H ₂ SO ₄ als mobiler Phase.	33
Abb. 18: Die Trennung eines Standardgemisches von Zucker- und anderen organischen Säuren (A) sowie Trauben der Sorte Rotberger 9 Tage nach Beimpfung mit <i>A.</i>	

<i>liquefaciens</i> (B) auf der Fertigsäule RT 300-6,5 Polyspher OAHY (Merck, Darmstadt) bei 65°C, 0,5 ml/min 0.01 N H ₂ SO ₄ als mobiler Phase	34
Abb. 19: Die Trennung eines Standardgemisches von Zuckern und Zuckeralkoholen auf Aminex HPX-87P-Säule bei 87°C, 0,6 ml/min bidestilliertes Wasser als mobile Phase.	35
Abb. 20: Traubenbeeren der Sorte Rotberger und Riesling nach der Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien	38
Abb. 21: Wachstumsvergleiche von <i>Acetobacter xylinum</i> durch unterschiedliche Art der Animpfung auf den Traubenbeeren. Sorte Rotberger, intakt (l) und Riesling, angestochen (r)	39
Abb. 22: Die Wirkung des Anstechens der Beeren auf das Wachstum der Bakterien auf Traubenbeeren	40
Abb. 23: Gluconsäure, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäurekonzentration in weißen und roten Traubenbeeren 15Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien bei unterschiedlichen Animpfungsarten	41
Abb. 24: Wachstumskurven verschiedener Essigsäurebakterienstämme in synthetischen Medien bei pH 4 und pH 5.	44
Abb. 25: Rieslingtraubenbeeren 12 Tage nach Beimpfung mit <i>Gluconobacter oxydans</i> var. <i>suboxydans</i>	46
Abb. 26: Wachstum der Essigsäurebakterien in den Traubenmosten	47
Abb. 27: Die Veränderungen der Most pH-Werte nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien während der 15 tägigen Untersuchungszeit	48
Abb. 28: Die Wachstumskurve von Essigsäurebakterien in Rieslingwein	49
Abb. 29: Die Bildung von Essigsäure durch verschiedene Essigsäurebakterien in Rotwein und Rieslingwein	50
Abb. 30: Dünnschichtchromatogramm von Zuckersäuren, die durch verschiedene Essigsäurebakterienstämme in synthetischen Medien gebildet wurden	51
Abb. 31 :Die Bildung von Zuckersäuren in synthetischen Medien 30 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien aus Glucose, Fructose und einem Glucose/Fructose 1/1.	53
Abb. 32: Gluconsäurekonzentrationen in synthetischen Medien mit bzw. ohne CaCO ₃ – Zusatz 30 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien	55
Abb. 33: Gluconsäurekonzentrationen in Traubenbeeren der Sorte Rotberger und Riesling nach Beimpfung mit Essigsäurebakterien im Laufe von 15 Tagen	56

Abb. 34: 2-Ketogluconsäurekonzentrationen in synthetischen Medien mit bzw. ohne CaCO ₃ -Zusatz 30 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien	58
Abb. 35: 2-Ketogluconsäurekonzentrationen in Traubenbeeren der Sorte Rotberger und Riesling während 15tägiger Bebrütung mit Essigsäurebakterien	59
Abb. 37: 5-Ketogluconsäurekonzentrationen in Traubenbeeren der Sorte Rotberger und Riesling während 15tägiger Bebrütung mit Essigsäurebakterien	62
Abb. 38 : Die Bildung von Ketogluconsäuren durch <i>A. liquefaciens</i> in synthetischen Medien mit Zusatz verschiedener Konzentrationen von Gluconsäure nach 7 Tagen	63
Abb. 39 : Die Abhängigkeit des Gehaltes von 2-Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure vom Gluconsäuregehalt in den Traubenbeeren nach 15tägiger Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien	64
Abb. 40: Zuckersäurezusammensetzung der in tunesischen Rose- und Rotweinen	66
Abb. 41: Die Abhängigkeit des Gehaltes von 2-Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure vom Gluconsäuregehalt	68
Abb. 42: Die Abhängigkeiten des 2,5-Diketogluconsäure Gehaltes von den Konzentrationen der Gluconsäure und der 2-Ketogluconsäure.	69
Abb. 43: Dihydroxyaceton-, Glycerin und Essigsäurekonzentrationen in tunesischen Rose- und Rotweinen	70
Abb. 44: Die Abhängigkeiten des Essigsäuregehaltes von Gluconsäure und 2-Ketogluconsäure und Essigsäure von Dihydroxyaceton.	71
Abb. 45: Die Korrelation zwischen Essigsäure und D- und L-Milchsäure	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wichtige Unterscheidungsmerkmale zwischen den Gattungen <i>Acetobacter</i> und <i>Gluconobacter</i>	1
Tabelle 2: Zusammensetzung der synthetischen Medien	22
Tabelle 3: Identifizierung von Ketogluconsäuren auf Phenylendiamin-HCl entwickelten DC-Platten unter Tages- und UV-Licht.	27
Tabelle 4: Zusammensetzung der HPLC-Standardlösung I	36
Tabelle 5: Zusammensetzung der HPLC-Standardlösung II	36
Tabelle 6: Restglucose und -fruktose, Gluconsäure-, und Essigsäurekonzentration (g/l) in Traubenbeeren 15 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien.	42
Tabelle 7: Konzentration von 2-Keto- 5-Keto- und 2,5-Diketogluconsäure (mg/l) in Traubenbeeren 15 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien	42

Anhangsverzeichnis

Tabelle A-1: Gluconsäure-, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäurekonzentrationen in Traubenbeeren (g/l) 15 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien	84
Tabelle A-2: Zuckersäurekonzentrationen in synthetischen Medien nach 30 Tage Beimpfung mit Essigsäurebakterien	85
Tabelle A-3: Das Populationswachstum der Essigsäurebakterien in synthetischen Medien pH 4 und pH 5, Most und Wein 15 Tage nach der Beimpfung	86
Tabelle A-4: Gluconsäure-, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäure-Konzentration in synthetischen Medien nach 30 Tage nach Beimpfung mit <i>A. aceti</i> var. <i>aceti</i>	87
Tabelle A-5: Gluconsäure-, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäure-Konzentration in synthetischen Medien nach 30 Tage nach Beimpfung mit <i>A. liquefaciens</i>	88
Tabelle A-6: Gluconsäure-, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäure-Konzentration in synthetischen Medien nach 30 Tage nach Beimpfung mit <i>A. xylinum</i>	89
Tabelle A-7: Gluconsäure-, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäure-Konzentration in synthetischen Medien nach 30 Tage nach Beimpfung mit <i>G. oxydans</i> var. <i>suboxydans</i>	90
Tabelle A-8: Die Bildung von Essigsäure durch verschiedene Essigsäurebakterien in Rotwein und Rieslingwein	91
Tabelle A-9: Dihydroxyaceton (g/l) in synthetischen Medien	92
Tabelle A-10: Zusammensetzung der tunesischen Rose- und Rotweine	93

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit werden folgenden Abkürzungen verwendet :

1. 1347-2 : *Acetobacter liquefaciens* Stamm 1347
2. 1348-1 : *Acetobacter liquefaciens* Stamm 1348-1
3. 1348-2 : *Acetobacter liquefaciens* Stamm 1348-2
4. 296 : *Acetobacter acetigenum* Stamm 296
5. 2-KGS : 2-Ketogluconsäure
6. 5-KGS : 5-Ketogluconsäure
7. 2,5-DKGS : 2,5-Diketogluconsäure
8. 691-1 : *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-1
9. 691-2 : *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-2
10. 691-3 : *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-3
11. 691-4 : *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-4
12. 8-1 : *Acetobacter peroxydans* Stamm 8
13. Aava : *Acetobacter aceti* var. *aceti*
14. Aliq : *Acetobacter liquefaciens*
15. Ar : *Acetobacter rancens*
16. Axy : *Acetobacter xylinum*
17. CCM : Czechoslovak Collection of Microorganisms
18. DHA : Dihydroxyaceton
19. Goxso : *Gluconobacter oxydans* var. *suboxydans*
20. B-548 : *Gluconobacter oxydans* Stamm B-548

1. Einleitung und Problemstellung

Bakterien der Gattungen *Acetobacter* und *Gluconobacter* gehören zur Familie der *Acetobacteraceae*, die sind gram-negativ oder gram-variabel, Kurzstäbchen oder kokkoide Stäbchen, die einzeln, in Paaren oder in Ketten vorliegen. Die Involutionsformen sind oft kugelförmig, verlängert oder in Riesenzellen vorkommend. Sie sind beweglich durch peritriche oder 1 – 8 polare Begeißelung, oder unbeweglich. Endosporen wurden nicht gebildet, die Bakterien sind Katalase-positiv, Oxidase-negativ (De Ley et al. 1984). Die Eigenschaften von *Acetobacter* und *Gluconobacter* werden in Tabelle 1 zusammengefasst und verglichen (De Ley et al. 1984):

Tabelle 1: Wichtige Unterscheidungsmerkmale zwischen den Gattungen *Acetobacter* und *Gluconobacter*

Merkmale	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
Begeißelung	peritrich (oder nicht)	polar (oder nicht)
Oxidation von:		
Ethanol zu Acetat (pH 4,5)	stark	langsam
Acetat zu CO ₂	+	-
Lactat zu CO ₂	+	-
Glucose zu Gluconat	unterschiedlich	+
Glucose zu 5-Ketogluconat	unterschiedlich	+
Tricarbonsäurezyklus	+	-

Den Essigsäurebakterien ist die Fähigkeit gemeinsam, aus Zuckern oder Alkoholen durch unvollständige Oxidation Säuren zu bilden, die vorübergehend oder als unverwertbare Endprodukte in die Nährlösung ausgeschieden werden. Zu den Essigsäurebakterien zählen Gram-negative Stäbchen, die mit entweder peritrich (*Acetobacter*) oder polar inserierten Geißeln (*Acetomonas-Gluconobacter*) schwach beweglich sind. Sie sind den Pseudomonaden ähnlich, unterscheiden sich jedoch von ihnen durch hohe Säuretoleranz, geringe peptolytische Aktivität, geringe Beweglichkeit und die Abwesenheit farbiger Pigmente. Die natürlichen Standorte der Essigsäurebakterien sind Pflanzen. Wo zuckerreiche Säfte frei werden, finden sich Hefen mit Essigsäurebakterien vergesellschaftet (Schlegel 1992).

Essigsäurebakterien haben vielfältige Oxidoreductasen, wie Alkohol-, Aldehyd, Glucose-, und Glycerindehydrogenase, in den zytoplasmatischen Membranen (Kondo und Ikeda 1999).

Die meisten Arten von Essigsäurebakterien können Glucose zu Gluconsäure, sekundäre Alkohole zu Ketonen und primäre Alkohole zu den entsprechenden Säure oxidieren. Die Fähigkeit Ethanol zu Essigsäure zu oxidieren hat der Gruppe ihren Namen gegeben und ist biotechnologisch (Essigsäureherstellung) von Bedeutung (Drews 1983). Essigsäure kann als Zwischen- oder Endprodukt gebildet werden (Herder 1995). Die ausgeschiedene Essigsäure kann wieder in den Stoffwechsel einbezogen und über den Tricarbonsäurezyklus abgebaut werden. Bei vielen Vertretern sind die Enzyme des oxidativen Pentosephosphatweges vertreten (Drews 1983).

Essigsäurebakterien oxidieren Ethanol zu Essigsäure und weiter zu CO_2 und H_2O . Nach dieser Fähigkeit unterscheidet man bei Essigsäurebakterien zwischen Peroxidanten und Suboxidanten. Während bei den Peroxidanten (Überoxidierer) Essigsäure weiteroxidiert wird, wird bei den Suboxydanten (Unteroxidierer) die Essigsäure nicht weiteroxidiert. Zu den Überoxidierern zählen *Acetobacter*-Arten. *Gluconobacter*-Arten sind der Prototyp der Unteroxidierer (Schlegel 1992).

Wegen der fehlenden Funktion des Tricarbonsäurezyklus ist *Gluconobacter* nicht in der Lage Essigsäure anzugreifen. Bei der Essigherstellung sind aber *Acetobacter* spp. Besonders *A. aceti* wegen ihrer höheren Oxidationsleitung weit verbreitet. Sie greifen keine Essigsäure an, solange noch geringe Mengen Ethanol vorhanden sind (Jucker und Ettliger 1985).

Für die Weinbereitung sind Essigsäurebakterien bedeutsam. Sie werden stets als Verderber angesehen, womit man ihrer Rolle nicht gerecht wird. Außer der Essigsäurebildung werden alle anderen Inhaltsstoffe in Mosten und Wein dem Stoffwechsel von *Botrytis cinerea* zugeschrieben, obwohl Essigsäurebakterien einen höheren und schnelleren Oxidationsstoffwechsel aufweisen (Sponholz 1994, nach mündlicher Information).

Die Gluconsäurebildung erfolgt aus Glucose durch *Gluconobacter* aerob sehr energisch. Daher ist die Gluconsäurebildung in verletzten und pilzinfizierten Traubenbeeren am

Rebstock durch Essigsäurebakterien im Vergleich zu *Botrytis* quantitativ bedeutsam (Eschenbruch und Dittrich 1986).

Essigsäure ist kein ursprüngliche Bestandteil eines gesunden Mostes, sie stammt aus dem Stoffwechsel von Essigsäurebakterien auf den Trauben. Moste aus Trauben, die durch *Botrytis cinerea* infiziert wurden, zeigen eine wesentlich komplexere Zusammensetzung ihres Säurespektrums. Neben den schon im Most aus gesunden Beeren vorhandenen Säuren treten zwei weitere Säuren aus dem Stoffwechsel des Pilzes hinzu, Gluconsäure und Schleimsäure (Sponholz 1989).

In den warmen Weinanbaugebieten, wie in Tunesien, sind bei manchen Weinen ungewöhnlich hohe Gluconsäuregehalt aufgefallen. Unter normalen Bedingungen (in Deutschland) sind diese Anomalien lediglich im Zusammenhang mit dem Befall von *Botrytis cinerea* zu erklären, aber dann mit einem ebenfalls erhöhten Gehalt von Glycerin, sowie Stoffwechselprodukten wie Gluconsäure und ihre Oxidationsprodukte 2-Keto-, 5-Keto- und 2,5-Diketogluconsäure, sowie 5-Ketofructose, deren Herkunft bisher unklar ist (Sponholz 1984).

Praktische Bedeutung für die Weinbeurteilung erhalten diese Untersuchungen dadurch, dass einige dieser Substanzen bisher auch in Weinen gefunden wurden, die nachweislich aus nicht *Botrytis*-infizierten Traubenbeeren hergestellt wurden.

Untersuchungen über den Zucker-Säure-Stoffwechsel von Essigsäurebakterien (*Acetobacter* und *Gluconobacter*) sollen zur Klarheit dieser Frage beitragen.

II. Essigsäurebakterien

2.1. Klassifikation

Es gibt keine offizielle Bakterienklassifikation aber es gibt eine offizielle Nomenklatur. Seit Januar 1980 ist die bearbeitete Liste der Bakterienamen vom International Journal of Systematic Bacteriology publiziert (Euzéby 1997).

Seit der Entdeckung der Essigsäurebakterien hat es viele Namen für die Essigsäurebakterien gegeben. Zuerst wurde *Mycoderma* von Persoon vorgeschlagen. *Mycoderma vini*, *Mycoderma cerevisiae* und *Mycoderma aceti* erschienen später in der Literatur. Im Laufe der Zeit wurden *Umbina* von Naegeli, *Termobacterium* von Zeidler, *Acetobacterium* von Ludwig und *Acetimonas* von Orla-Jensen vorgeschlagen (Asai 1968). Der Gattung *Acetobacter*, die heute im allgemeinen verwendet wird, wurde erst im Jahre 1900 von Beijerinck vorgeschlagen. Im Jahr 1935 schlug Asai vor, die Essigsäurebakterien in die Gattungen *Acetobacter* und die neue Gattung *Gluconobacter* zu unterscheiden (Asai 1968). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1, haben De Ley et al. (1984) ausführlich über Essigsäurebakterien berichtet. Die Essigsäurebakterien Familie (*Acetobacteraceae*) wurde in zwei Gattungen geteilt, *Acetobacter*, der Milch- oder Essigsäure zu CO₂ und H₂O oxidiert und *Gluconobacter*, der sie nicht oxidieren kann. Sie haben vier Arten *Acetobacter* und eine *Gluconobacter* beschrieben:

1. *Acetobacter aceti* (Pasteur 1864; Beijerinck 1894). Das Synonym für *A. aceti* ist *Mycoderma aceti* (Pasteur 1864).
2. *Acetobacter liquefaciens*, Sp. nov. Die Synonyme sind *Gluconoacetobacter liquefaciens* (Sic) Asai 1935, *G. aceti subsp. liquefaciens* De Ley und Frateur 1974, 277.
3. *Acetobacter pasteurianus* (Hansen 1879), Beijerinck 1916. Die Synonyme sind *Mycoderma pasteurianus* Hansen 1879, 230. *A. aceti subsp. xylinum* De Ley und Frateur 1974; *A. aceti subsp. orleanensis* De Ley und Frateur 1974; *A. pasteurianus subsp. ascendens* De Ley und Frateur 1974; *A. pasteurianus subsp. lovaniensis* De Ley und Frateur 1974 und *A. peroxydans* Visser 't Hooft 1925.
4. *Acetobacter hansenii* Sp. nov.
5. *Gluconobacter oxydans* var. *suboxydans*

Sievers et al. (1992) und Sievers und Teuber (1995) beschrieben eine neue Spezies von Essigsäurebakterien, *Acetobacter europaeus*, als Haupt Flora-Bestandteil der industriellen Essigherstellung in Mitteleuropa. Zwei neue Arten wurden auch von Sokollek et al. (1998), aus industrieller Essigherstellung isoliert, es waren *Acetobacter oboediens* sp. nov. und *Acetobacter pomorum* sp. nov. Boesch et al. (1998) schlugen eine neue Art, *Acetobacter intermedius* sp. nov. Franke et al. (1999) beschrieben ebenfalls eine neue Art von Essigsäurebakterien, *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., die aus Blättern von Zuckerrohr isoliert wurde.

Basierend auf dem Ubiquinon-System und 16S rDNA Sequenzen transferierte Yamada (2000) *A. oboediens* und *A. intermedius* zur Gattung *Gluconacetobacter*, und Yamada et al. (2000) haben eine neue Gattung Essigsäurebakterien vorgeschlagen, *Asaia bogorensis* gen. nov., Sp. nov., die neue Gattung von Essigsäurebakterien, die aus den Orchideenpflanzen (*Bauhinia purpurea*), Plumbago-pflanzen (*Plumbago auriculata*) und indonesischem traditionell fermentiertem Klebreis isoliert wurden.

Lisdiyanti et al. (2000) gruppieren 8 Arten *Acetobacter* nach dem Vergleich der Relation des phenotypischen Charakters, des Ubiquinon-Systems, der DNA-Basenkompositionen und dem Niveau der DNA-DNA-Relation. Die 8 *Acetobacter*-Arten sind: *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. peroxydans*, die neue Kombination *A. orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *A. lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., *A. estunensis* (Carr 1958) comb. nov., zwei neue Arten, *A. indonesiensis* sp. nov. und *A. tropicalis* sp. nov.

Die Familie *Acetobacteraceae* enthält zwei Gattungen; *Acetobacter* oxidiert Essigsäure und Milchsäure zu CO₂ und H₂O. Beweglich sind sie durch peritriche oder laterale Begeißelung oder sie sind unbeweglich. *Gluconobacter* oxidiert weder Essigsäure noch Milchsäure zu CO₂ und H₂O und hat polar inserierte Geißeln (De Ley et al. 1984).

Charakteristische Familienmerkmale sind der strikte Atmungsstoffwechsel sowie die Oxidation von Ethanol zu Essigsäure, in neutralen oder sauren Medien (pH 4,5). Weitere wichtige Merkmale sind die Assimilation verschiedener Zucker und Zuckeralkohole, jedoch keine Verwertung von Laktose und Stärke, sowie die Säurebildung aus Glucose und 1-Propanol. Die Nitratreduktion ist negativ. Das Temperaturoptimum bewegt sich zwischen 25 - 30°C, das pH Optimum bei pH 5 - 6. Die meisten Stämme wachsen noch bei pH 3,7. Das Temperaturmaximum liegt gewöhnlich unter 37°C (De Ley et al. 1984).

Die ubiquitär verbreiteten Essigsäurebakterien treten ausschließlich in stillen Getränken z.B. Fruchtsaftgetränken in Erscheinung (Dittrich 1987). Sie sind Verderber von Fruchtsäften, Wein, Bier, Ketchup, Senf (Schlegel 1992). Bei hohem Sauerstoffgehalt können sie sich gut vermehren und verursachen insbesondere durch die Bildung von Essigsäure, Essigsäureethylester und Gluconsäure einen unangenehmen Essigstich und außerdem oft eine schmutzig bräunliche Verfärbung. Sie sind gerade im Abfüllbereich sehr häufig in der Raumluft, in Getränkeresten sowie an allen möglichen feuchten Standorten vorhanden, so dass vorwiegend eine sekundäre Kontamination hervorgerufen wird (Dittrich 1987).

Bei *A. liquefaciens* sind die Zellen meist kokoid mit etwas unregelmäßigen Zellwänden. Sie liegen häufig in sehr langen Ketten vor. Die meisten Stämme sind unbeweglich. Die oft gebuchteten oder gelappten, bräunlichen, stark glänzenden, flachen Kolonien erreichen teilweise Durchmesser von über 1 cm. *A. aceti* und *A. pasteurianus* haben eine ähnliche Zellmorphologie wie *A. liquefaciens*, es werden aber mehr Einzel- oder Doppelzellen und nur selten kürzere Ketten gebildet. Die Kolonien dieser beiden Arten sind meist klein, flach oder etwas erhoben, weißlich oder beigefarben, weich, schwach glänzend, rund oder leicht gelappt (De Ley et al. 1984).

Bei *Gluconobacter oxydans* kommen die Zellen ellipsoidal bis zu Stäbchen vor. Die sind zwischen 0,5-0,8 x 0,9-4,2 µm groß, getrennt oder im Paar und selten in Ketten. Vergrößerte, unregelmäßige Zellformen (Involutionenformen) sind kaum vorhanden. Endosporen werden nicht gebildet. Die sind Gram-negativ (in einigen Fällen Gram-variabel), beweglich oder unbeweglich; wenn beweglich, haben die Zellen eine 3-8 polare Begeißelung (De Ley et al. 1984).

2.3. Vorkommen der Essigsäurebakterien bei der Weinbereitung

Der Essigstich, die Bildung von geruchlich und geschmacklich deutlich unangenehm wahrnehmbaren Mengen an Essigsäure, ist die häufigste und gefährlichste Weinkrankheit. Erhöhte Mengen an Essigsäure können bereits in Mosten nach Befall durch Essigsäurebakterien vorliegen (Sponholz et al. 1982).

Die Arten, die hauptsächlich verantwortlich für den Essigstich sind, sind *Gluconobacter oxydans*, *A. pasteurianus* und *A. aceti*. Sie können die Wein-Qualität während dreier Phasen beeinflussen (Sponholz 1992):

1. Durch Kontamination der Weintraube
2. Durch das möglicherweise vorhandene Wachstum während der alkoholischen Gärung
3. Durch das Wachstum im Wein während Lagerung im Keller.

In Fruchtsaft- und Erfrischungsgetränken kommen Vertreter beider Gattungen vor. Häufigste Arten sind *Gluconobacter oxydans* und *Acetobacter liquefaciens*, gelegentlich auch *A. aceti* und *A. pasteurianus* (Dittrich 1987). Liu et al. (1996) isolierten auch beide Arten aus fermentiertem Teegetränk Haipao.

In der Natur sind Essigsäurebakterien weit verbreitet, besonders auf Obst und Beerenfrüchten. Bei der Verletzung dieser Früchte, z. B. durch Insekten, wird ihnen der Saft zugänglich, der ihnen optimale Vermehrungsmöglichkeiten bietet. Ähnlich ist es bei Botrytis-infizierten Traubenbeeren. Da der Pilz die Beerenhaut durchstößt, kann Saft austreten (Dittrich 1993). Lambert et al. (1981) isolierten 57 Stämme *Gluconobacter* und *Acetobacter* aus Honigbienen von verschiedenen Regionen in Belgien.

Essigsäurebakterien kommen häufig auf Pflanzen (Blüten) in Gemeinschaft mit Hefen, auf Früchten, in Getränken und in Flüssigzucker vor. Sie sind als Verderber von Fruchtsäften, Wein, Bier, Ketchup, Senf (Essigsäurestich, Oxidation der Glucose zu Gluconsäure, Gasbildung durch *Acetobacter*) aufgefallen (Baumgart 1990). Neben Hefen und verschiedenen Schimmelpilzen können in kohlensäurefreien Getränken Essigsäurebakterien der Gattung *Gluconobacter* auftreten (Jährg und Schade 1993).

Pflanzensäfte und ähnliche zuckerhaltige Substrate bieten ihnen gute Vermehrungsbedingungen. Die Verletzungsstellen von Früchten und austretender Saft garantieren ihnen eine massenhafte Vermehrung. Sie sind säuretolerant, relativ osmotolerant und streng aerob. Deshalb können sie sich auf mäßig alkoholhaltigen und zuckerhaltigen Flüssigkeiten vermehren (Passmore und Carr 1975, Dittrich 1993). Außerdem können sie sich in leeren aber ungereinigten Tanks, auf ungereinigten Pressen u.a. Gerätschaften vermehren. Wegen ihres hohen Sauerstoffbedarfs ist ihre Schadwirkung bei Früchten am Größten. Säfte und Bierwürze, Bier und Wein sind weniger gefährdet. In den abgefüllten Getränken können sie sich kaum vermehren, sie können aber z. B. in Bier vermehrungsfähig bleiben. In Weinen ist es wegen des SO₂ Gehaltes und der viel längeren Lagerzeit nicht so (Dittrich 1993).

Die Essigsäurebakterien sind unerwünschte Begleitorganismen bei der Wein- und Bierherstellung. Sie vermehren sich aber nur dann und bilden Essigsäure, wenn die Gäransätze aerob werden (Drews 1983). Sie sind deshalb auch Kontaminanten von Traubenbeeren, von Traubenmosten und von Weinen, weil Essigsäurebakterien sowohl auf zuckerhaltigen, wie auch auf alkoholhaltigen Standorten vorkommen. Bei Verletzung der Fruchtschale, z. B. durch beißende Insekten oder durch infizierende Pilze, wird der zuckerhaltige Saft frei, der ihnen gute Vermehrungsmöglichkeiten bietet. Unter derartigen Bedingungen kann sich schon an den noch am Stock hängenden Beeren ein sogenannter Essigstich ausbilden. Vom Schimmelpilz *Botrytis cinerea* befallene Beeren (Abb. 1), die infolge ihrer Eintrocknung günstigenfalls eine Konzentration ihres Saftes erleiden, sind stets stark mit Essigbakterien infiziert. Aus ihrem Saft (Most) werden Spitzenweine gewonnen: Auslesen, Beeren-Auslesen oder Trockenbeerenauslesen (Dittrich 1987).



Abb. 1: *Botrytis cinerea* isoliert aus den Traubenbeeren

Die besondere Zusammensetzung der erwähnten Spitzenweine wird sicher wesentlich durch den Stoffwechsel der in der Beeren parasitierenden *Botrytis*-Hyphen bestimmt. Unbekannt ist aber, welchen Anteil die Essigsäurebakterien an diesen Stoffbildungen haben. Daher waren diese Stoffbildungen im Substrat Traubenmost abzuklären, soweit sie für die Herstellung und Zusammensetzung von Wein bedeutsam sind (Esschenbruch und Dittrich 1986).

Schließlich war noch die Bildung der Essigsäure bzw. der flüchtigen Säure zu untersuchen. Ihr Gehalt darf in Weinen bestimmte Höchstwerte nicht überschreiten. Es war daher festzustellen, ob die Essigsäurebakterien die flüchtige Säure aus den Zuckern der Beere bzw. des daraus gepressten Mostes bilden können und ob ihre Zusammensetzung der entspricht, die von Hefen aus Zucker bei der Gärung gebildet wird (Sponholz et al. 1982).

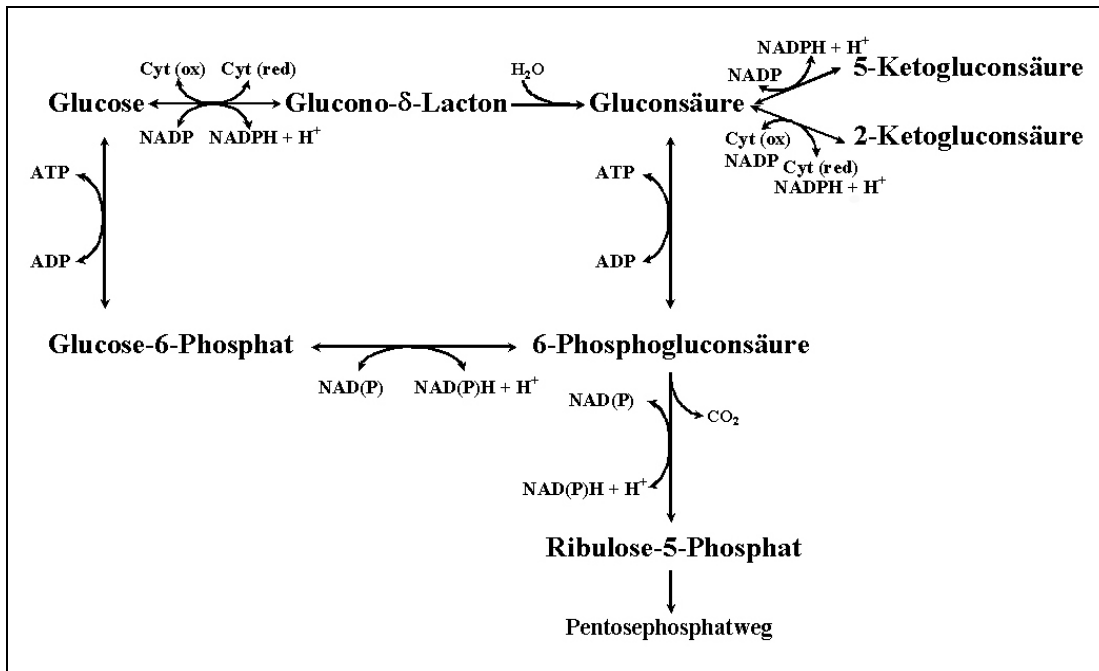
Essigsäurebakterien können Essigsäure bilden. Sie verursachen den Essigstich von verletzten, geplatzten oder eingemeischten Früchten o.ä. Pflanzenteilen. Nach Verletzung der Beeren durch Vogelfraß, Insekten, Hagelschlag und Schimmelpilze kann es zur Infektion mit Hefen und Bakterien kommen, die die Inhaltsstoffe der Trauben, insbesondere Zucker verstoffwechseln. Solche Trauben können dann schon deutlich nach Essigsäure riechen (Sponholz 1989).

2.3. StoffwechsellLeistungen von Essigsäurebakterien

Die biochemische Aktivität der Essigsäurebakterien wird durch die hohe oxidative Aktivität charakterisiert, die gebildeten Substanzen sind daher auch in den meisten Fällen Oxidationsprodukte der vorhandenen Substrate. Von den Essigsäurebakterienstämmen der Gattung *Gluconobacter* kann D-Glucose zu D-Gluconsäure und zu Ketogluconsäuren oxidiert werden. Solche oxidative Aktivität kann als eines der wichtigen Merkmale der *Gluconobacter*-Arten angesehen werden. Die oxidative Reaktion erfolgt an der zytoplasmatische Membran und ist mit dem Elektronen-Transport-System des Organismus verkettet (Shinagawa et al. 1984).

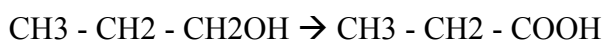
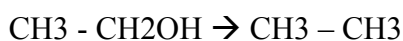
Dem größten Teil der *Acetobacter* und *Gluconobacter* Stämme fehlt das Phosphofruktokinase-Enzym, dieses ist wichtig für den Embden-Meyerhof Parnas Weg (Glycolyse). Sie sind deshalb unfähig, Hexosen über die Glycolyse zu verwerten. Alternative Wege sind Hexose- und Pentosezucker die oxidativ durch den Hexose-monophosphate-Weg verwandt wurden, oder durch eine direkte Oxidation von Hexosezuckern zu Gluconsäure und Ketogluconsäuren. Das hängt von der Zucker-Konzentration und von dem vorherrschenden pH-Wert ab (Olijve und Kok 1979b, Drysdale und Fleet 1988).

Glucose und Gluconsäure können von Essigsäurebakterien zu Ketogluconsäuren (5-Ketogluconsäure, 2-Ketogluconsäure, und 2,5-Diketogluconsäure) oxidiert werden. Von der Glucose, die über die Zellwände aufgenommen wird, wurden 30% als Gluconsäure ausgeschieden, 6% wurde zu CO₂ metabolisiert. Der Rest wurde in den Zelle akkumuliert. Es gab keinen Unterschied zwischen dem Wild-Typ und der Mutante (Flückiger und Ettliger 1977). Den schematischen Verlauf der Oxidation bei der Gattung *Gluconobacter* beschrieben Olijve und Kok (1979a) wie in der Abb. 2 dargestellt.

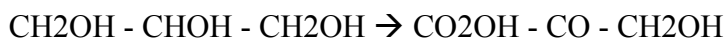
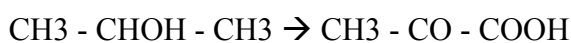
Abb. 2: Glucoseoxidation bei *Gluconobacter oxydans*

Die Oxidation von Ethyl-Alkohol zu Essigsäure charakterisiert die biochemischen Aktivitäten der Essigsäurebakterien. Nach Schlegel (1992) oxidieren die Essigsäurebakterien außerdem :

Primäre Alkohole zu den entsprechenden Fettsäuren z. B.:



Sekundäre Alkohole zu Ketonen, z. B.:



Zuckeralkohole zu Aldosen und Ketosen, z. B. Sorbit zu Sorbose. Wie Sorbit werden auch Glycerin, Tetrite, Pentite, Hexite und Heptite oxidiert (z. B. D-Mannit \rightarrow D-Fructose).

Aldehyde, Aldosen und Ketosen zu den entsprechenden Säuren z. B.:



Zu ihrer Entwicklung benötigen die Essigsäurebakterien unbedingt Sauerstoff. Sie sind aerob. Die Bildung der Essigsäure erfolgt aus dem durch Mischinfektion mit Hefen dann schon in den Beeren vorhandenen Ethanol. Aber erst im fertigen Wein steht den Essigsäurebakterien genügend Alkohol zur Verfügung, um größere Mengen an Essigsäure zu bilden. Dabei wird Ethanol zuerst durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Ethanal oxidiert und dieser dann durch eine der unspezifischen Aldehyddehydrogenasen irreversibel zu Essigsäure dehydriert (Sponholz 1989). Die Oxidation von Ethanol wird von einer prothetischer Gruppe Methoxatin oder Pyrroloquinolinkuinon (PQQ) katalysiert.

Methoxatin oder PQQ ist an der Außenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert und katalysiert die Oxidation von Ethanol, Glycerin oder Glucose zu den entsprechenden Säuren (Essigsäure, Glycerinsäure, Gluconsäure). Dabei werden die Elektronen an die Elektronentransportkette abgegeben. Methoxatin gelangt auch ins Nährmedium und in den Speiseessig (Schlegel 1992).

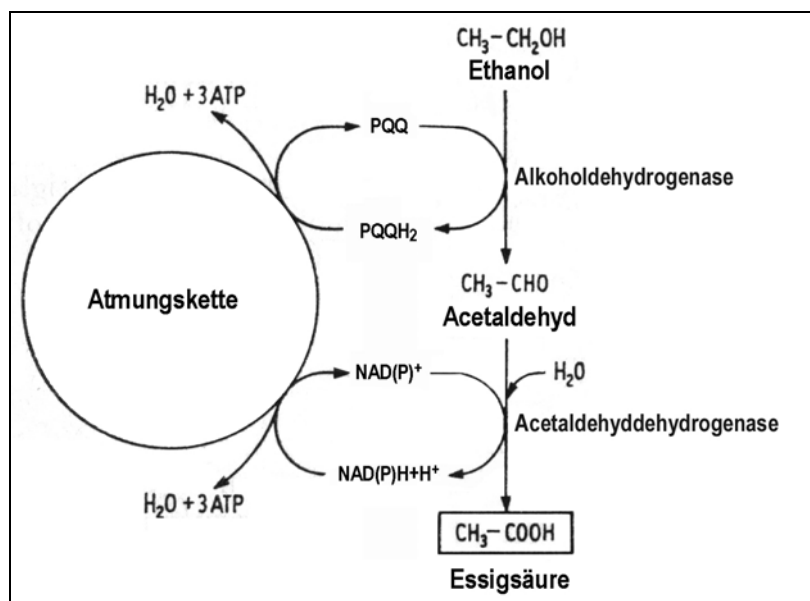


Abb. 3: Bildung von Essigsäure durch Essigsäurebakterien

Während die Oxidation von Acetaldehyd durch Alkoholdehydrogenase zu Essigsäure abläuft, wurden bei manchen Arten zur gleichen Zeit eine anaerobe Bildung von Ethanol aus Acetaldehyd gefunden. Eine Dismutationsreaktion, in der ein Mol Acetaldehyd zu Ethanol reduziert, während ein Mol Ethanol zu Essigsäure oxidiert wird (Asai 1968).

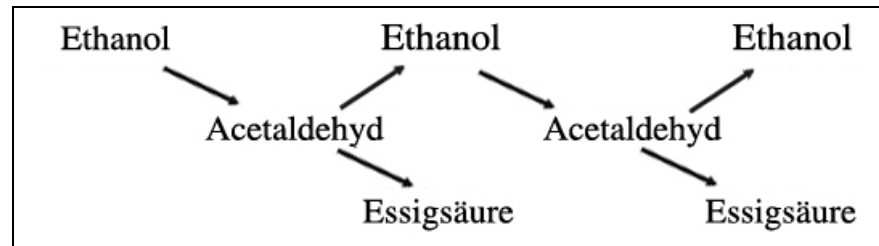


Abb. 4: Schematische Essigsäurebildung durch Dismutation bei Essigsäurebakterien nach Asai (1968)

Im Wein ist Essigsäure die Hauptkomponente der flüchtigen Säure. Zusammen mit Ameisensäure ist Essigsäure die flüchtige Säure (97%), wobei die Ameisensäure nur 2 – 4% Anteil an der flüchtigen Säure hatte (Sponholz und Dittrich 1986).

Bemerkenswert ist die Fähigkeit von *A. xylinum*, aus verschiedenen Hexosen, mehrwertige Alkohole und Gluconsäure an der Zelloberfläche Cellulose zu synthetisieren (Drews 1983). Sie wird in Form feiner Fibrillen ins Medium ausgeschieden und verleiht der Kolonie eine lederartige Festigkeit (Schlegel 1992).

Diese typischen Cellulosefibrillen sind lange polymere Ketten, die nur aus D-Glucose zusammengesetzt sind, sie können als ein Kabel aus langen Strähnen idealisiert werden. Jeder Kette, der Zucker kommt in der Pyranosylform vor, besteht aus β -1,4-glycosidischer Bindungen (Ross et al. 1991).

Joris und Vandamme (1993) berichtete über die Verwendung von Bakteriencellulose, die von *A. xylinum* produziert wurde. Die Anwendung dieser Cellulose reichte von einem temporären Hautersatz bis zu akustischen Membranen.

Die Bildung von Cellulose von *A. xylinum* aus Glucose verlief nach Ross et al. (1991) wie in Abb. 5.

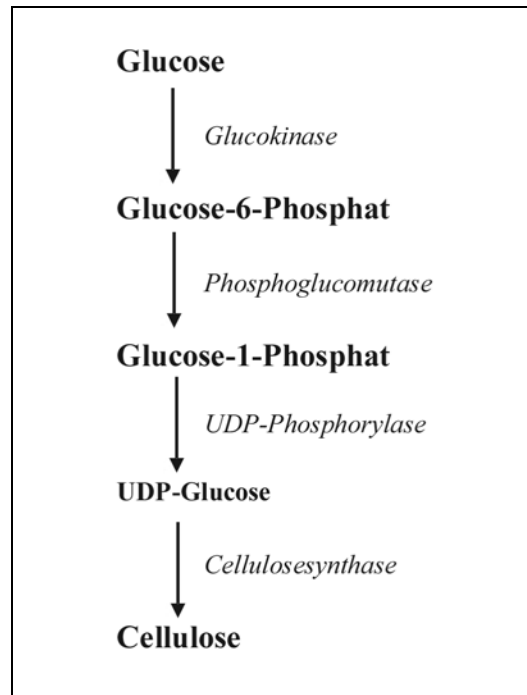


Abb. 5: Die Cellulosebildung aus Glucose bei der Essigsäurebakterienart *A. xylinum* (Gekürzt, nach Ross et al. 1991).



Abb. 6: Die von *A. xylinum* an der Oberfläche eines Glucose-Mediums gebildete Cellulose

Auf der Oberfläche von flüssigen oder halbflüssigen Medien kann durch Essigsäurebakterien eine dünne Haut aus Cellulose gebildet werden. Bei der Essigherstellung wird diese Haut als Essigmutter bezeichnet, die bis mehrere cm dick werden kann. In Fernost verwendet man diese Haut als Dessert. Diese stellt man aus zuckerreichen Medien wie z. B. Kokosnussmilch her, dann nennt man sie Nata de Coco.

Lisdiyanti et al. (2000) isolierten mehrere Stämme von *A. orleanensis* und *A. lovaniensis* aus verschiedenen fermentierten Nahrungsmitteln wie Nata de Coco sowie aus Früchten.

2.3.1. Gluconsäure

Gluconsäure, ein Oxidationsprodukt der Glucose, wurde erstmals von Rentschler und Tanner (1955) in Weinen aus mit *Botrytis* infizierten Trauben papierchromatographisch festgestellt. Inzwischen wurde Gluconsäure, wenn auch nur in geringen Konzentrationen von 10 bis 300 mg/l, auch in Mosten aus gesunden Beeren nachgewiesen. Gluconsäure ist demnach ein normaler Inhaltsstoff aller Traubenmoste und kommt in Mosten aus *Botrytis*-infizierten Beeren in sehr hohen Konzentrationen von mehr als 6 g/l vor. Hohe Gluconsäuremengen von mehr als 300 mg/l werden daher als Nachweis einer *Botrytis*-Infektion angesehen (Sponholz 1989 und dort zitierte Literatur).

Die Bildung der Gluconsäure beruht auf der enzymatischen Oxidation von Glucose, eingeleitet durch Glucose-Oxidase, die FAD als prosthetische Gruppe enthält. Bei Oxidation von Glucose entsteht als primäres Oxidationsprodukt β -D-Glucono- δ -lacton das spontan oder durch ein weiteres Enzym, Gluconolactonase zu Gluconsäure umgewandelt wird (Schlegel 1992).

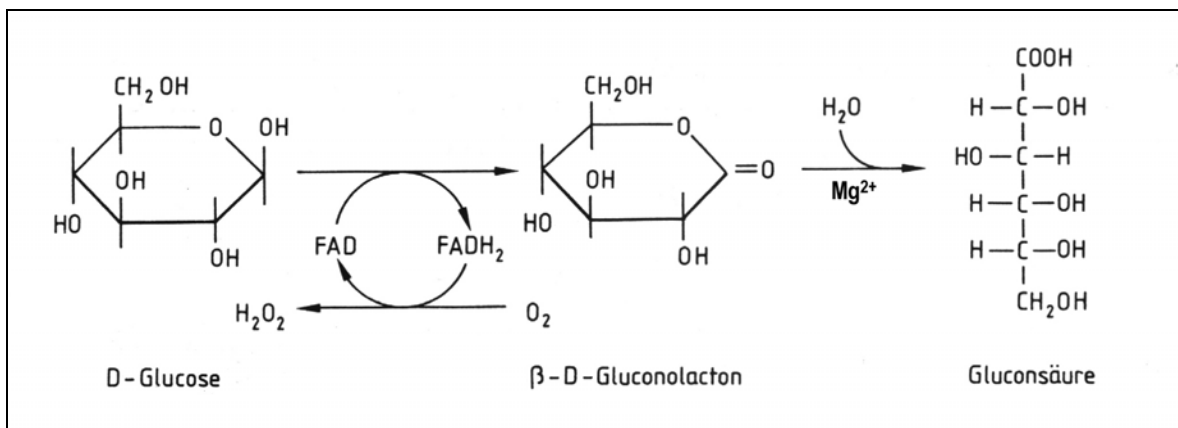


Abb. 7: Oxidation von Glucose zu Gluconsäure mit Glucoseoxidase (Dellweg 1987, Kleber und Schlee 1988, Sponholz 1989)

Die optimale Temperatur für die Produktion von Gluconsäure war um 25°C bei pH-Wert zwischen 4,0 – 6,0. Der Zusatz von CaCO₃ in den Medien kann die Produktion der Gluconsäure in der Anfangsphase erhöhen, aber die Gluconsäure wurde zu 5-Ketogluconsäure oder 2-Ketogluconsäure weiter oxidiert (Asai 1868).

Die Essigsäurebakterien unterscheiden sich in der Fähigkeit D-Gluconsäure zu Ketogluconsäuren zu oxidieren, sie bilden entweder 2- oder 5-Ketogluconsäure. *G. melanogenum* produziert über 2-Keto- das 2,5-Diketogluconat. Diese bei einem pH-Wert von 4,5 instabile Säure wird für die Braunschwarzfärbung der Kolonien von *G. melanogenum* auf Glucoseagar verantwortlich gemacht (Schlegel 1992).

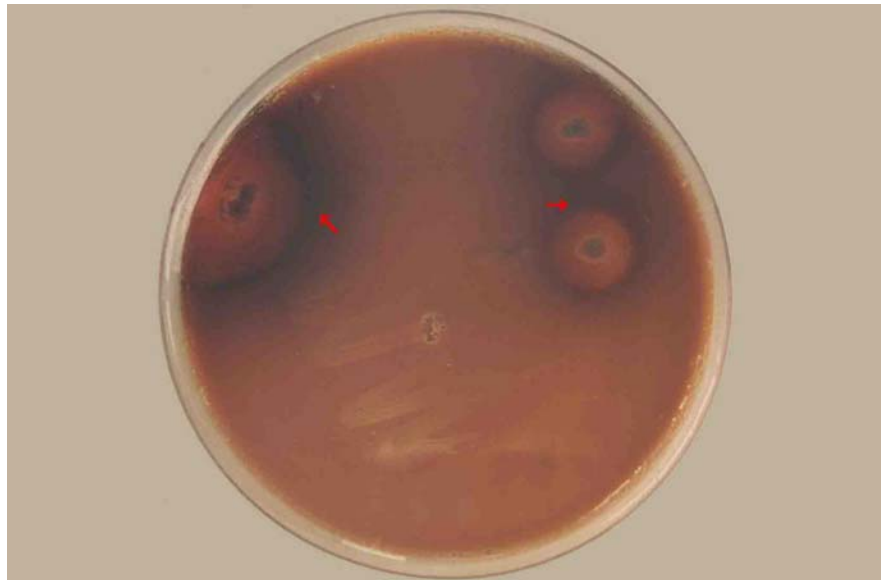


Abb. 8: Die Braunschwarzfärbung auf *Acetobacter*-Medium nach 3-tägiger Beimpfung bei 30°C mit *A. liquefaciens*

Wird *G. oxydans* in einem Komplexmedien mit Glucose kultiviert, wird bei einem pH-Wert von 5,5 Ketogluconsäure produziert. Ohne pH-Kontrolle wurde aus Glucose nur Gluconsäure. Bei einem pH-Wert von 5,5 wurde zuerst Gluconsäure produziert, die weiter zu Ketogluconsäure oxidiert wurde. Die Ketogluconsäureproduktion setzt dann ein, nachdem fast alle Glucose verbraucht war.

Das ketogene Vermögen von *Gluconobacter* ist seit langem bekannt. Es ist schon beschrieben, dass Kalk enthaltene Glucosemedien, die mit *Gluconobacter* bewachsen sind, Ca-5-Ketogluconsäure entnommen werden kann. Andere Arbeiten haben festgestellt, dass Zugabe von CaCO_3 die Bildung von unlöslichem Ca-5-Ketogluconat verursachte und damit die Produktion von Ca-2-Ketogluconsäure verhindert wird (Weenk et al. 1984). Die Oxidation von Gluconsäure zu Ketogluconsäuren erfolgte mit Hilfe der TPN-spezifischen (NAD) Dehydrogenasen (De Ley und Stouthamer 1959).

Die Bakterien, die zur Gattung *Gluconobacter* gehören, haben in allgemein die Fähigkeit verschiedene organische Säuren zu oxidieren, auch verschiedene Zucker und Polyalkohole werden zu den entsprechenden Säuren, Aldehyden und Ketonen umgewandelt (Asai 1968). Viele von diesen Oxidationsprodukten sind von industrieller Bedeutung wie z. B. die Oxidation von Sorbit zu Sorbose, Fermentation von Gluconsäure und die Bildung von Ketogluconsäuren aus Glucose (Weenk et al. 1984).

Gluconsäure in den Mosten wird nicht nur von Essigsäurebakterien gebildet. Viele Arten von Schimmelpilzen z. B. *Botrytis cinerea* produzieren auch Gluconsäure. In den faulen Mosten unterschiedlicher Qualitäten, einschließlich Mosten aus schwund- und sauerfaulen Beeren, fand man Gluconat-Konzentrationen von 1 bis 4 g/l bzw. bis zu 6,5 g/l (Dittrich et al. 1974).

2.3.2. 5-Ketogluconsäure

In Trauben ist die 5-Ketogluconsäure als Zwischenprodukt der Weinsäuresynthese natürlich vorhanden, ebenso wird 5-Ketogluconsäure auch von Essigsäurebakterien aus Glucose produziert (Sponholz 1989).

Die Oxidation von Glucose zu 5-Ketogluconsäure verläuft in zwei Schritten, zuerst die Oxidation von Glucose zu Gluconsäure. Dann hört das Wachstum der Essigsäurebakterien praktisch auf. Der weitere Schritt ist dann die Oxidation von Gluconsäure zu 5-Ketogluconsäure (Asai 1968). Das beteiligte Enzym ist 5-Ketogluconoreduktase (De Ley und Stouthamer 1959).

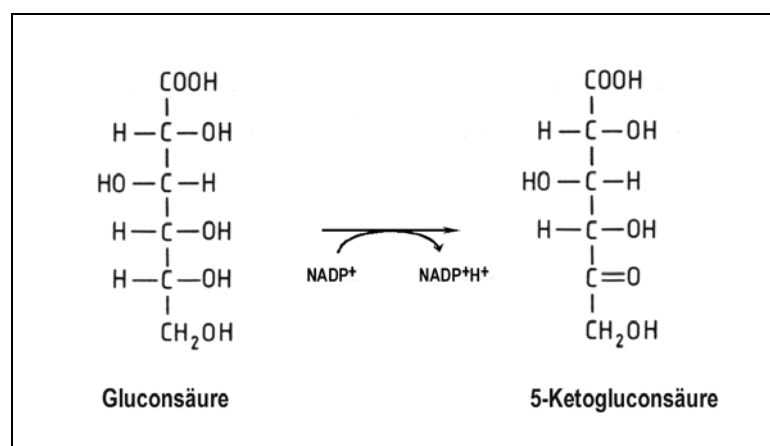


Abb. 9: Oxidation von Gluconsäure zu 5-Ketogluconsäure durch Essigsäurebakterien (Sponholz 1990)

2.3.4. 2-Ketogluconsäure

Die Produktion von 2-Ketogluconsäure durch *Acetobacter* oder *Gluconobacter* bringt gewöhnlich niedrige Erträge. Sie wird oft durch eine 5-Ketogluconsäure Produktion begleitet (Asai 1968).

Die Essigsäurebakterien der Arten *A. orleanensis*, *A. estunensis*, *A. indonesiensis* und *A. tropicalis* produzieren aus Glucose außer Gluconsäure nur 2-Ketogluconsäure (Lisdiyanti et al. 2000), aber De Ley et al. (1984) beschrieben, dass von allen *Acetobacter*-Arten 2-Ketogluconsäure aus Glucose gebildet wurde.

Die Produktion von 2-Ketogluconsäure aus Glucose verläuft wie bei 5-Ketogluconsäure über Gluconsäure. Gluconsäure wird mit Hilfe des Enzyms 2-Ketogluconsäurereduktase zu 2-Ketogluconsäure oxidiert (De Ley und Stouthamer 1959).

2.3.5. 2,5-Diketogluconsäure

In Mosten und Weinen wird 2,5-Diketogluconsäure neben 5-Ketogluconsäure und 2-Ketogluconsäure gefunden, die als Oxidationsprodukte der Gluconsäure durch *Gluconobacter*- und *Acetobacter*-Arten vermutet wird (Sponholz 1989).

Die Produktion von 2,5-Diketogluconsäure wurde von De Ley et al. (1984) nur *A. liquefaciens* zugeschrieben. Da *A. liquefaciens* schon zu *Gluconoacetobacter liquefaciens* transferiert wurde, beschrieben Lisdiyanti et al. (2000) dass *Acetobacter*-Arten keine 2,5-Diketogluconsäure aus Glucose produzieren.

Die Produktion von 2,5-Diketogluconsäure aus Glucose kann nur über Gluconsäure und 2-Ketogluconsäure stattfinden. Die Oxidation von Glucose, Gluconsäure und 2-Ketogluconsäure wurde in der Abb. 10 zusammengefasst.

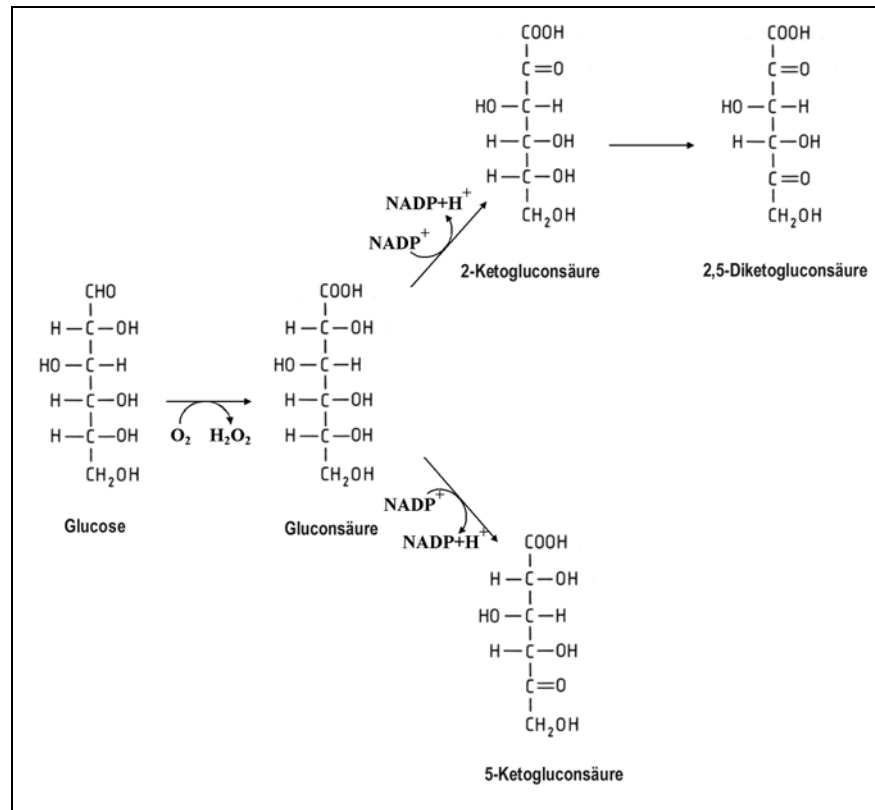


Abb. 10: Die Oxidation von Glucose zu 2,5-Diketogluconsäure (Sponholz 1990)

Die 2,5-Diketogluconsäure wurde auch in Weinen aus *Botrytis*-infizierten Leseget gefunden. Diese Oxidation der Gluconsäure dürfte weniger von *Botrytis* in Beeren gebildet worden sein (Dittrich 1989).

III. Untersuchung der Stoffwechselleistungen der Essigsäurebakterien

3.1. Untersuchte Essigsäurebakterien

In dieser Arbeit wurden 13 Stämme von *Acetobacter* und 2 Stämme von *Gluconobacter* verwendet, die Stämme 1-5 stammen aus der Sammlung des Fachgebietes Mikrobiologie und Biochemie der Forschungsanstalt Geisenheim. Die Stämme 6-15 stammen ursprünglich von CCM:

1. *Acetobacter aceti* var. *aceti*
2. *Acetobacter aceti* var. *xylinum*
3. *Acetobacter xylinum*
4. *Acetobacter rancens*
5. *Gluconobacter oxydans* var. *suboxydans*
6. *Acetobacter liquefaciens* Stamm 1347
7. *Acetobacter liquefaciens* Stamm 1348-1
8. *Acetobacter liquefaciens* Stamm 1348-2
9. *Acetobacter acetigenum* Stamm 296
10. *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-1
11. *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-2
12. *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-3
13. *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-4
14. *Acetobacter peroxydans* Stamm 8
15. *Gluconobacter oxydans* Stamm B-548

3.2. Medien und Probematerialien

Für die Aufbewahrung der Bakterien wurde *Acetobacter*-Medium (CCM) verwendet. Die Zusammensetzung des *Acetobacter*-Medium ist folgende:

Glucose bzw. Fructose	100 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
Agar	25 g/l
Calciumcarbonat	20 g/l

Das Überimpfen der Bakterien erfolgte in 2wöchigen Abständen. Das Impfmateriel für die Versuche wurde einer 3 Tage alten Kultur entnommen. Der Anzucht der Starterkulturen für die Versuche erfolgte in synthetischen Medien sowie in Mosten und Weinen.

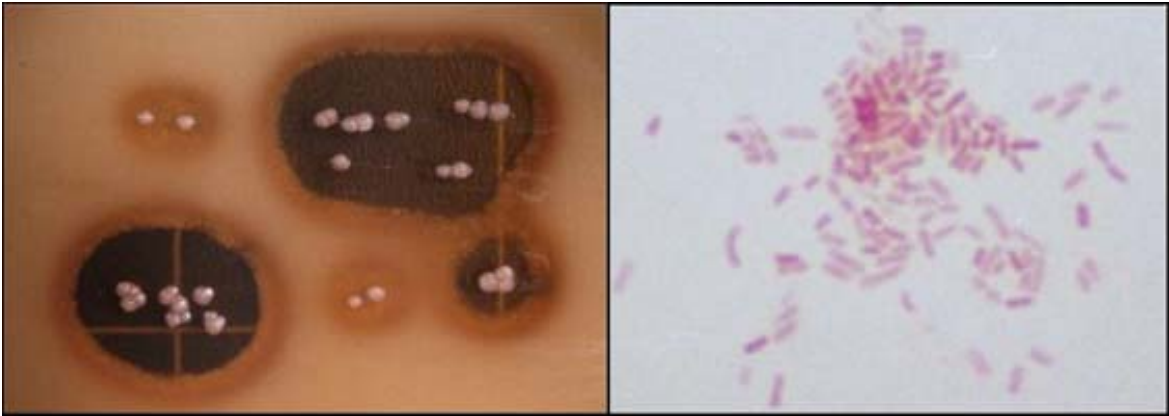


Abb. 11: Eine drei Tage alte Kultur von *Acetobacter aceti* auf Glucose Hefe Extrakt (CCM) Medium (l). Mikroskopisches Bild einer dreitägigen Kultur von *A. liquefaciens* nach Gramfärbung (r).

Um die Stoffwechselaktivität der Essigsäurebakterien zu untersuchen, wurden die Stämme auf verschiedenen Sorten Traubenbeeren, in Mosten und in Weinen sowie in verschiedenen synthetischen Medien kultiviert.

Für die Untersuchungen dienten folgende Sorten Weintrauben, Moste und Weine:

1. Trauben der Sorten Riesling, Rotberger, Portugieser und Reichensteiner
2. Moste von Trauben der Sorten Riesling und Rotberger
3. Weißweine der Sorten Riesling, Müller Thurgau und Rotwein eines Sortengemisches.
4. Weiß- und Rotweine verschiedener Jahrgänge aus Tunesischen Weinanbaugebieten.

Das zur Untersuchung verwendete synthetische Medium hatte die Zusammensetzung wie in Tabelle 2.

Tabelle 2: Zusammensetzung der synthetischen Medien

Substanzen	Konzentration		Substanzen	Konzentration	
Glucose bzw. Fructose	100	g/l	L-Isoleucin	0,1	g/l
Na-Acetat .3 H ₂ O	5	g/l	L-Methionin	0,1	g/l
L-Ascorbinsäure	5	g/l	L-Phenylalanin	0,1	g/l
Diammoniumhydrogencitrat	2	g/l	L-Serin	0,1	g/l
KH ₂ PO ₄	1,5	g/l	L-Threonin	0,1	g/l
K ₂ HPO ₄	1,5	g/l	L-Tryptophan	0,1	g/l
Tween 80	1	g/l	L-Tyrosin	0,1	g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	g/l	L-Valin	0,1	g/l
NaCl	20	mg/l	Guanin	10	mg/l
MnSO ₄ .1H ₂ O	20	mg/l	Adenin	10	mg/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	20	mg/l	Uracil	10	mg/l
L-Asparaginsäure	0,3	g/l	Xanthin	10	mg/l
L-Glutaminsäure	0,3	g/l	meso-Inosit	10	mg/l
DL- α -Alanin	0,2	g/l	Pyridoxolhydrochlorid	10	mg/l
L-Arginin.HCl	0,2	g/l	Nikotinsäure	10	mg/l
Glycin	0,2	g/l	Ca-D(+)-Pantothenat	10	mg/l
L-Histidin.HCl	0,2	g/l	Riboflavin	10	mg/l
L-Leucin	0,2	g/l	Thiaminiumdichlorid	0,5	mg/l
L-Lysin.HCl	0,2	g/l	Folsäure	0,2	mg/l
L-Prolin	0,2	g/l	4-Aminobenzoessäure	0,1	mg/l
DL- α -Aminobuttersäure	0,1	g/l	Cyanocobalamin	0,01	mg/l
L-Asparagin	0,1	g/l	D(+)-Biotin	0,01	mg/l
L-Cystein	0,1	g/l			

Die Substanzen wurden einzeln oder zu mehreren in bidestilliertem Wasser gelöst. Bei der Herstellung der synthetischen Medien wurden alle Substanzen außer Tryptophan, Cystein und Ascorbinsäure zusammengegeben, in 200 ml Erlenmeyerkolben (100 ml) abgefüllt und 15 Minuten bei 120°C autoklaviert. Die Lösung von Tryptophan, Cystein und Ascorbinsäure wurde sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium vor dem Ansatz zugegeben

Die Bestimmung der zu untersuchenden Substanzen erfolgte nach folgenden Methoden:

- Dünnschichtchromatographie nach Gosselé et al. (1980)
- Zur Bestimmung der Ketozuckersäuren wurde die Flüssigchromatographie nach Sponholz und Dittrich (1984) eingesetzt
- Zur Bestimmung der organischen Säuren, Zucker und Alkohole wurde die HPLC eingesetzt
- Spektrophotometrie (Enzymatisch nach Fa. Boehringer Mannheim) wurde für Gluconsäure, Essigsäure, Glucose und Fructose verwendet.

- Ethanol wurde nach Rebelein (1973) bestimmt.
- Die Bestimmung von Dihydroxyaceton wurde nach Sponholz und Wunsch (1980) durchgeführt.

Das Wachstum der Bakterien wurde durch Trübungsmessung im Photometer bei 546 nm gemessen. Die Lebendkeimzahl wurde mit dem Plattengussverfahren bestimmt. Als Vergleichswerte wurden die Extinktionen unbebrüteter Medien, sowie von Mosten und Weinen verwendet.

3.4. Probenvorbereitung

3.4.1. Ionaustauscher Säule

Um eine bessere Trennung bei der Flüssig- und der Dünnschichtchromatographie zu erhalten, mussten die Proben über eine Austauschersäule laufen. Beispielsweise lassen sich Zuckersäuren mit Hilfe eines Dowex 1 X 8-Anionenaustauscher Harzes 50 mesh in der Formiatform leicht von Kationen und ungeladenen Substanzen abtrennen.

Die Säule hat einen Durchmesser von 1 cm, eine Länge von 25 cm und ist mit dem Harz Dowex I X 8 gepackt. Das Harz wird zunächst mit 6 N Ameisensäure gewaschen und anschließend mit bidestilliertem Wasser bis zur Neutralität nachgespült. Dieser Schritt war sehr wichtig, weil zwischen Zuckern und Zuckersäuren, wie z. B. 2,5-Diketogluconsäure in der Chromatographie sehr schwer zu trennen ist und da beide Substanzgruppen mit dem Nachweisreagenz reagieren.

Über die Säule wurde 10 ml Probe gegeben. Während alle Säuren gebunden werden, laufen neutrale und basische Substanzen durch die Säule und werden zusätzlich mit 200 ml bidestilliertem Wasser ausgewaschen. Die an das Harz gebundenen Säuren werden mit 50 ml 6N-Ameisensäure eluiert, mit 50 ml Wasser nachgewaschen und das vereinigte Eluat am Rotationaverdampfer vorsichtig eingedampft.

Der Rückstand wurde mit bidestilliertem Wasser gelöst und aufgenommen. Diese Lösung wurde konzentriert zur Dünnschichtchromatographie und verdünnt bzw. unverdünnt zur Säulenchromatographie und HPLC verwendet.

3.4.2. Entsäuerung

Bei der HPLC-Analyse der Zuckersäuren von Mosten und Weinen mittels HPLC ist eine Entsäuerung durch Ausfällung mit Calciumcarbonat (CaCO_3) wichtig, um Weinsäure und Oxalsäure aus den Proben zu entfernen. Beide Säuren eluieren auf der HPLC-Chromatogrammen dicht bei den Zuckersäuren, besonders zwischen Weinsäure und 5-Ketogluconsäure wäre sonst eine Trennung nur schwer möglich, besonders da Weinsäure in sehr hohen Konzentrationen vorliegt..

3.4.3. Behandlung mit PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon)

PVPP wurde zur Polyphenolreduzierung eingesetzt. In der direkten HPLC-Analyse, ohne Vorbereitungen mit Ionenaustäusersäule war die Vorbehandlung mit PVPP sehr hilfreich, um die Zahl des Peaks zu reduzieren, besonders Peaks, die am Anfang des Chromatogrammes kommen, konnten so vermindert oder entfernt werden.

3.4.4. Filtration und Zentrifugierung

Bevor die Probe in den HPLC-Systeme injiziert wurde, ist eine Filtration sehr wichtig um die Verstopfung der Säule zu vermeiden. Die Proben wurden durch einen $0,2 \mu\text{m}$ Membranfilter filtriert. Für die Probe, die vorher mit CaCO_3 und oder mit PVPP behandelt worden war, wurde vor der Filtration noch zusätzlich zentrifugiert.

3.4.5. Gefriertrocknung

Für die Zuckeranalyse mittels HPLC ist es wichtig die Weinprobe zu entalkoholisieren um Fructose bestimmen zu können. 5 ml Probe wurden gefriergetrocknet. Nach der Trocknung wurde mit bidestilliertem Wasser wieder auf 5 ml aufgefüllt. Dann waren die Proben für die HPLC-Analyse gebrauchsfähig.

3.5. Chromatographische Untersuchungen

Chromatographie beruht ganz allgemein auf der unterschiedlichen Affinität von Stoffen zu einer stationären und einer mobilen Phase, dem Sorptionsmittel und dem Elutionsmittel. Während der Trennung wird ein Teilchen von der mobilen Phase mitgenommen, setzt sich für eine gewisse Zeit auf der stationären Phase fest, wird wieder mitgenommen - und das

viele Male. Dadurch wird das Teilchen im Vergleich zur Laufgeschwindigkeit der mobilen Phase verlangsamt, gebremst -und zwar um so mehr, je mehr es im Durchschnitt die stationäre Phase bevorzugt aufsucht. So werden auch Teilchen getrennt, die sich in ihrer Affinität zu den beiden Phasen sehr ähneln: auch kleine Unterschiede führen zu unterschiedlichem Laufverhalten, wenn sie sich nur häufig genug auswirken (Bauer et al. 1990).

Die Chromatographie ist als analytische Methode unverzichtbar bei der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, bei der Bestimmung von Aminosäuren in der biochemischen Analyse, in der Umweltanalytik. Sie wird auch zunehmend im präparativen Maßstab angewandt (Falbe und Regitz 1995).

In dieser Arbeit wurden verschiedene in der Literatur beschriebene chromatographische Verfahren eingesetzt und entwickelt, um qualitative und quantitative Analysen der Proben durchzuführen.

3.5.1. Dünnschichtchromatographische Analyse

Bei der Dünnschichtchromatographie (DC) handelt es sich um ein chromatographisches Verfahren mit einem mehrstufigen Verteilungsprozess, an dem ein geeignetes Sorptionsmittel als stationäre Phase, Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische - häufig auch Laufmittel genannt - als mobile Phase und die Probemoleküle beteiligt sind. Die stationäre Phase befindet sich dabei als dünne Schicht auf einem geeigneten Träger aus Glas, Polyester oder Aluminium. An dieser Schicht erfolgt die Trennung durch Elution mit dem Laufmittel. Die DC-Analyse beginnt nach geeigneter Probenvorbereitung mit dem Auftragen an der Startlinie. Diese erfolgt punkt-, linien- und für präparative Zwecke auch bandförmig. Dabei ist die punktförmige Auftragung mittels einer Kapillare die gängigste Methode (Falbe und Regitz 1995).

Die Entwicklung des DC erfolgt standardmäßig unter Benutzung eines Lösungsmittels (Linearentwicklung) aufsteigend in der herkömmlichen Trogkammer (Abb. 12). Mehrfachentwicklung mit Laufmittelwechsel (Stufenentwicklung) kann zu besseren Trennergebnissen führen.

Die Entwicklung des DC-Platten kann in normalen einer Sättigungstrogkammer durchgeführt werden. Bessere Ergebnisse wurden in der Trogkammer mit totaler Sättigung erreicht.

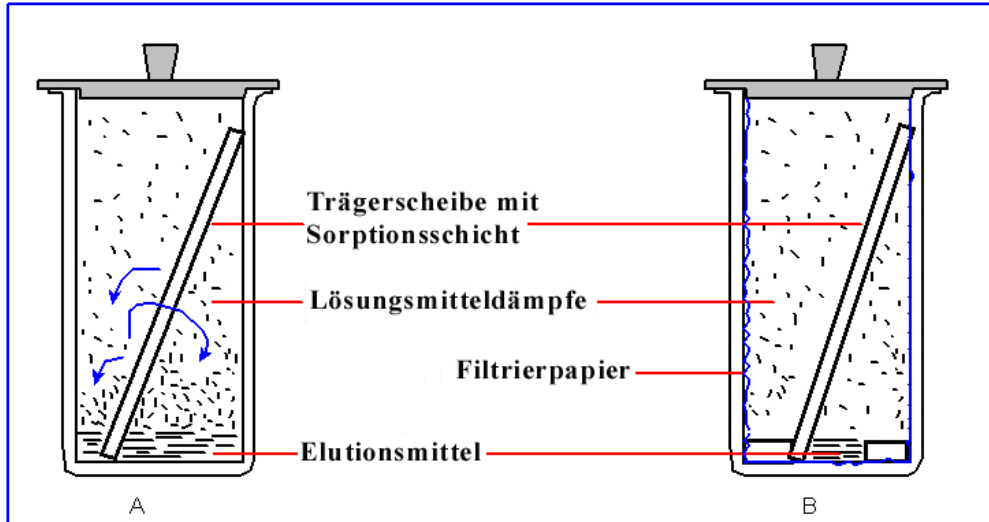


Abb. 12: Trogkammer mit normaler Sättigung (A) und totaler Sättigung (B)

Zur Auswertung genügt bei qualitativen Analysen die Sichtbarmachung und Lokalisierung der nachzuweisenden Substanzen. Am einfachsten geschieht dies durch Mitlaufen von Vergleichssubstanzen. Eine dabei häufig verwendete Größe ist der Rf-Wert (Retention Factor) oder der 100fache hRf-Wert. Als Definition des Rf-Wertes gilt das Verhältnis Abstand Start-Fleckenschwerpunkt (x) zum Abstand Start-Laufmittelfront (a) wie in der Abb. 13 dargestellt (Falbe und Regitz 1995).

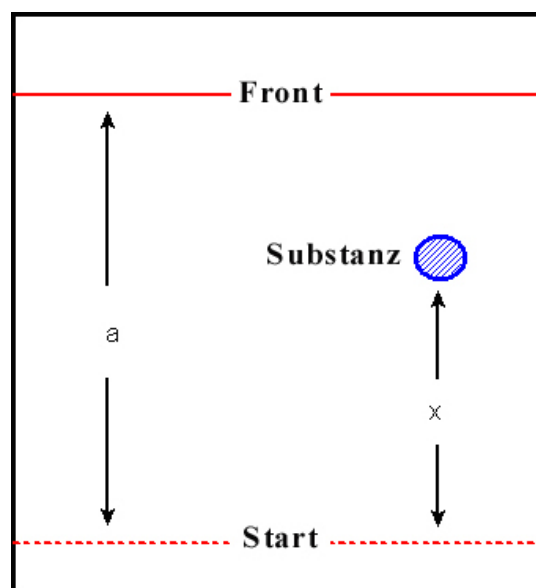


Abb. 13: Schematische Darstellung zur qualitativen Auswertung der DC-Platten

In dieser Arbeit wurde Dünnschichtchromatographie für den qualitativen Nachweis von 2-Keto-, 5-Keto- und 2,5 Diketogluconsäure nach der Methode von Gosselé et al. (1980) eingesetzt. Sie wurde auf Cellulose-Fertigplatten ohne Fluoreszenzindikator (Merck Darmstadt) durchgeführt. Die mobile Phase war ein Lösungsmittelgemisch von Ethylacetat, Ameisensäure, Essigsäure und Wasser (18 : 3 : 1 : 4). Der Lauf jeder Probe wurde nach jeweiliger Trocknung drei mal durchgeführt. Danach wurden die Platten mit Phenylendiamin-Lösung entwickelt (besprüht). 0,5 g o-Phenylendiamin-HCl mit 0,81 ml H₂SO₄ und 3,75 ml H₂O gelöst, anschließend wurde auf 25 ml mit Ethanol gebracht.

Obwohl bei dieser Methode Glucose und 2,5-Diketogluconsäure nicht getrennt werden, ist eine eindeutige Unterscheidung aufgrund des Fluoreszenzverhaltens von 2,5-Diketogluconsäure gegeben. Gosselé et al. (1980) wendeten diese Methode zur Überprüfung von *Gluconobacter*- und *Acetobacter*-Arten und als eine Grundlage für deren systematische Einordnung an.

Eine Tüpfelmethode auf Cellulose-DC-Platten gab sowohl in den Kulturlösungen, wie auch bei einer Säulenchromatographie einen schnellen Aufschluss darüber, wann die Kulturen geerntet werden müssen und wo sich die Hauptfraktionen der gesuchten Säure befanden. Der Test auf verunreinigende 2-Ketogluconsäure konnte dann nach chromatographischer Trennung erfolgen (Sponholz 1990).

Die Dünnschichtchromatogramme wurden unter Tages- und UV-Licht nach 3 Minuten und nach 16 Stunden identifiziert (Goselle et al. 1980). Die schematischen Farben der einzelnen Substanzen auf den Dünnschichtchromatogrammen sind in der folgenden Tabelle 2 und Abbildung 15 dargestellt.

Tabelle 3: Identifizierung von Ketogluconsäuren auf Phenylendiamin-HCl entwickelten DC-Platten unter Tages- und UV-Licht.

Substanzen	Farbe unter:			
	Tageslicht nach:		UV-Licht nach:	
	3 Minuten	16 Stunden	3 Minuten	16 Stunden
2-Ketogluconsäure	gelb	lila	gelb-fluoreszens	blau-fluoreszens
5-Ketogluconsäure	leichtblau	blaugrün	dunkelblau	grün
2,5-Diketogluconsäure	grün	gelb	gelb-fluoreszens	gelb-fluoreszens

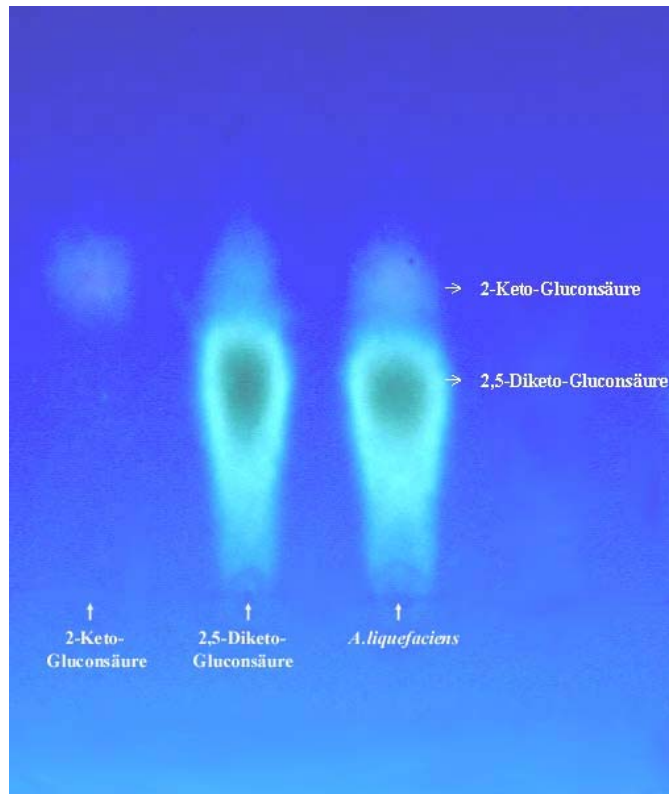


Abb. 14: Dünnschichtchromatogramm von 2-Ketogluconsäure, 2,5-Diketogluconsäure und von *A. liquefaciens* beimpften Medien, nach 16 Stunden

3.5.2. Säulenchromatographische Trennungen

Eine Darstellung über die säulenchromatographischen Trennungen von Keto- und Aldozuckersäuren wurde von Sponholz und Dittrich (1984) und Sponholz (1990) entwickelt. Als Grundlage diente die von der Fa. Biotronik ausgearbeitete Trennung von Zuckern mit Boratpuffer.

Zuckerderivate mit Säurefunktionen eluieren in diesem Programm erst sehr spät bei der Reinigung der Säulen, sind aber sehr gut zu trennen. Wie bei sehr vielen nieder- und mitteldruck-chromatographischen Trennungen liegt das Problem in dem sehr hohen Zeitbedarf für die Trennung und bei Proben aus natürlichen Quellen in den großen Konzentrationsunterschieden der Komponenten. So stehen in normalen Pflanzensäften 100-500 g/l Glucose, Fructose und Saccharose nur wenige Gramm oder Milligramm anderer interessierender Zucker gegenüber. Eine Verdünnung bringt zwar bei diesen

Zuckern auch mit dieser Technik gute Ergebnisse, verdünnt zugleich auch die anderen Substanzen unter die Nachweisgrenze. Bei der Analyse von Zuckersäuren kann man sehr einfach eine Trennung von Zuckern und Säuren an einem Anionenaustauscher durchführen (Sponholz 1990).

Die Bestimmung von Ketozuckersäuren erfolgt säulenchromatographisch mit dem Zuckeranalysator LC 6000 der Fa. Biotronik. Die Trennsäule des Analysators hat einen Durchmesser von 0,6 cm und eine Höhe von 19,2 cm. Sie ist mit einem Harz der Sorte DA-X8-II gepackt und wird auf einer Temperatur von 60°C gehalten. Als Puffer dient ein 1,25 M Boratpuffer, der mit 3M KOH auf pH 10 eingestellt ist. Die Vorsäule, deren Höhe 4 cm beträgt und die einen Durchmesser von 0,9 cm hat, ist mit dem Harz der Sorte Dowex 1x4, 200-400 mesh Cl⁻ gepackt.

Sinner und Puls (1978) verwendeten 4,4-Dicarboxy-2,2-Bichinolin, Asparaginsäure und Boratpuffer für die chromatographische Analyse reduzierender Zucker.

Als Nachweis dient die Reduktion von Cu⁺⁺ durch freie Ketogruppen zu Cu⁺ in alkalischer Lösung und die Reaktion dieser Ionen mit 4,4-Dicarboxy-2,2-Bichinolin Natriumsalz zu einem violetten wasserlöslichen Farbkomplex, der bei 570 nm in einer Durchflußküvette photometriert wird. Die Nachweisempfindlichkeit liegt deutlich unter 1 mg/l bei einer Aufgabe von 200 µl auf die Schleife und lässt sich bei Bedarf noch erhöhen.

Die Laufzeit pro Analyse betrug 220 Minuten, die sich wie folgt aufteilen:

Trennzeiten:

- 5 Minuten Puffer und Reagenz zur Einstellung der Nulllinie
- 200 Minuten Puffer und Reagenz zur Trennung
- 10 Minuten Puffer zur Reinigung des Reaktionscoils
- 5 Minuten Pause

Zusammensetzung des Farbreagenzes:

- 414 g K₂CO₃ in 1500 ml bidestilliertem Wasser lösen. Lösung abkühlen lassen und über Faltenfilter geben (Wichtig für die Haltbarkeit des Reagenzes)
- 5 g K₂CO₃, 3,7 g Asparaginsäure und 1,0 g CuSO₄·5H₂O in 100 ml bidestilliertem Wasser lösen. Zu Lösung 1 zumischen.

- 2 g 4,4-Dicarboxy-2,2' Bichinolin, Natriumsalz (Sigma D 5259) in 100 ml bidestilliertem Wasser lösen und zu Lösung 1 zugeben.

Auf 2000 ml mit bidestilliertem Wasser auffüllen und über eine Membran filtrieren. Das Reagenz ist kühl und dunkel zu lagern.

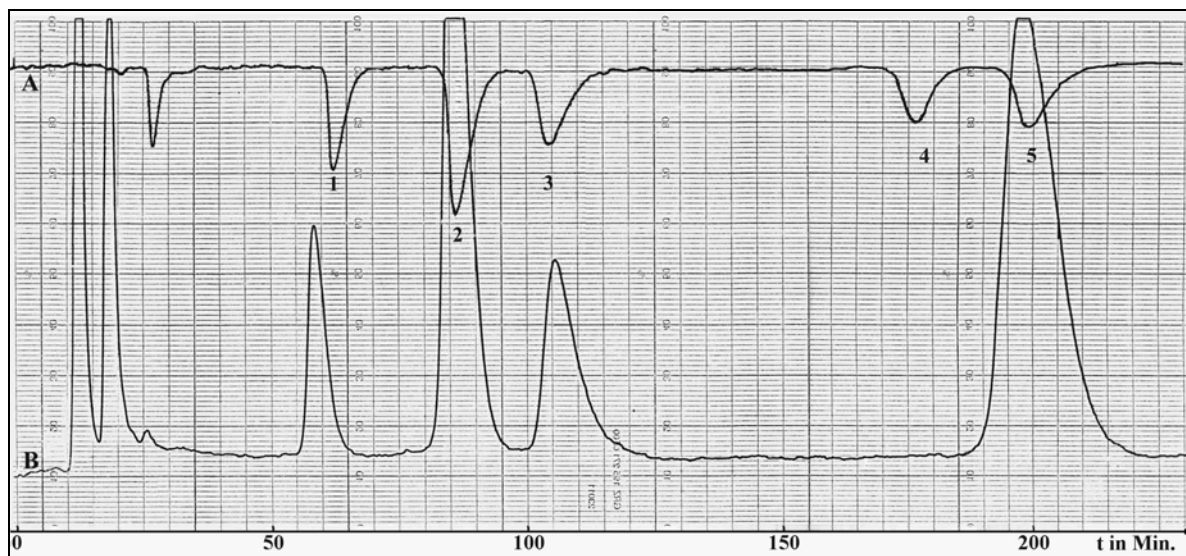


Abb. 15: Chromatogramm eines Standardgemisches von Zuckersäuren (A) und Trauben der Sorte Rotberger 9 nach Tage Beimpfung mit *A. liquefaciens* (B):
 1. Galacturonsäure, 2. 5-Ketogluconsäure, 3. 2-Ketogluconsäure, 4. Glucuronsäure und 5. 2,5-Diketogluconsäure

3.5.3. HPLC-Analyse

HPLC ist Abkürzung für englisch High Performance oder High Pressure Liquid Chromatography = Hochleistungs- oder Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie. Die HPLC hat sich in den 60er Jahren aus der Säulenchromatographie entwickelt, als man erkannte, dass die Trennleistung einer Säule mit abnehmender Korngröße der stationären Phase zunimmt. Man arbeitet daher bei der HPLC mit erheblich feinerem Material (3–10 µm) als bei der Gelchromatographie (35–75 µm) oder der Säulenchromatographie (120–200 µm). Die Feinteiligkeit der Trennmaterialien erfordert allerdings die Anwendung hoher Drücke (bis zu 400 bar), was mit technischem Aufwand verbunden ist. Trotz dieses Aufwands und der damit verbundenen Kosten hat sich die auch „Schnelle Flüssigkeitschromatographie“ genannte HPLC wegen ihrer Leistungsfähigkeit als Routinemethode durchgesetzt (Falbe und Regitz 1995).

Eine HPLC-Apparatur (Abb. 16) besteht im einfachsten Fall aus einer Pumpe mit Fließmittelreservoir, einem Probenaufgabe-System, einem Trennsäulensystem (Vor- und

Trennsäulen), einem Detektions- und Auswertesystem und einem Fraktioniersystem zum Isolieren.

Die Elution kann im einfachsten Fall mit einem Lösungsmittel oder einem konstanten Lösungsmittelgemisch isokratisch erfolgen. Schwierige Trennprobleme verlangen dagegen Gradientenelution. Lösungsmittel-Gradienten aus zwei oder drei Lösungsmitteln können niederdruckseitig mit einem Gradientenmischer und einer Pumpe bewerkstelligt werden. Bei hochdruckseitiger Mischung benötigt man mindestens zwei Pumpen. Die Steuerung derartiger Anlagen erfolgt mit Mikroprozessoren oder Computern, die dann auch die Auswertung übernehmen (Falbe und Regitz 1995).

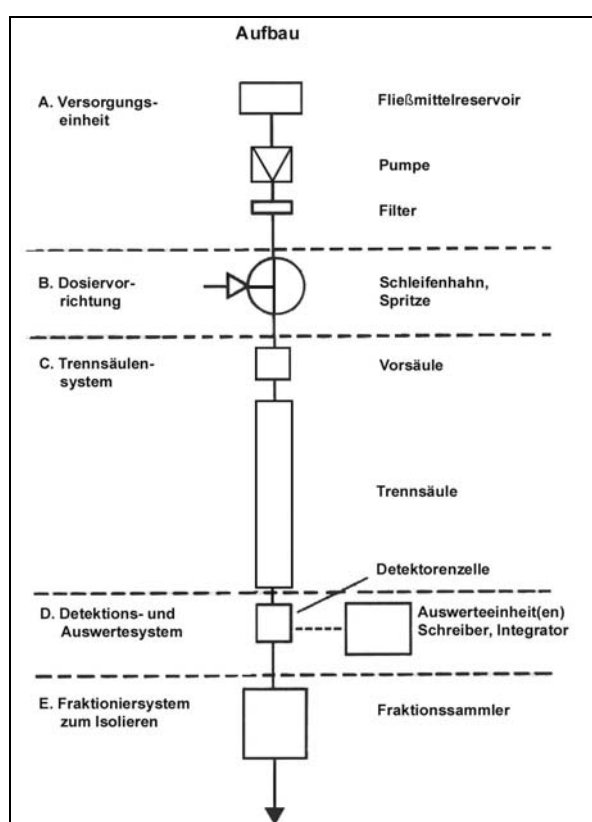


Abb. 16: Aufbau und Funktionen eines HPLC-Systems (Unger 1989)

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene HPLC-Systeme eingesetzt, um Gluconsäure, 2-Keto-, 5-Keto- und 2,5-Diketogluconsäure sowie andere organische Säuren einfach und schnell qualitativ und quantitativ zu bestimmen. HPLC-Systeme wurden auch für die Bestimmung verschiedener Zucker und Alkohole eingesetzt. Mit den folgenden Versuchen sollen verschiedene Parameter, die die qualitative Analyse beeinflussen, untersucht werden. Diese Parameter sind Laufmittelkonzentrationen, Durchflussraten und Temperaturen der Trennsäule.

Fischer et al. (1995) trennten verschiedene Zucker- und organische Säuren mittels HPLC-Fertigsäule RT 300-65 Polyspher OAHY von Fa. Merck Darmstadt bei Säulentemperaturen von 10°C bis 65°C. Um eine bessere Trennung der verschiedenen in den Mosten, Weinen sowie synthetischen Medien vorkommenden Zuckersäuren und anderen organischen Säuren zu erhalten, wurde die Säulentemperatur auf 55°C und 65°C geändert.

Calull et al. (1992) verwandten ION-300 Polymer-Säule mit 0,013 M H₂SO₄ als mobiler Phase bei einer Temperatur von 74°C mit einem HPLC-System mit RI-Detektor um Carbonsäuren, Zucker, Glycerin und Ethanol in Wein und Most zu trennen. Schwarzenbach (1982) trennte organischen Saure mit verschiedene Säule u.a. Aminex-HPX, LiChrosorb RP-18 und LiChrospher Si 100.

Die Zuckersäuren wurden bei einer Säulentemperatur von 65°C getrennt und identifiziert. Die Säulentemperatur von 55°C diente der Trennung und Identifizierung von anderen organischen Säuren. Für beide Konditionen wurde 0,01 N H₂SO₄ mit einer Durchflussrate von 0,5 ml/min als mobile Phase eingesetzt.

Die Trennung von Ketogluconsäuren war bei Zimmertemperatur am Schlechtesten. 2 Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure trennen sich erst ab Temperaturen von 40°C. Ähnliche Trennung sind auch bei den anderen organischen Säure festzustellen, so trennen sich z.. B. Bernsteinsäure und Milchsäure erst ab 45°C. Die beste Trennung für alle Säuren wurde bei einer Säulentemperatur von 65°C erreicht (Periadnadi 1996, unveröffentlicht). Die chromatographische Trennung von Zuckersäuren und anderen organischen Säure werden in Abb. 17 dargestellt.

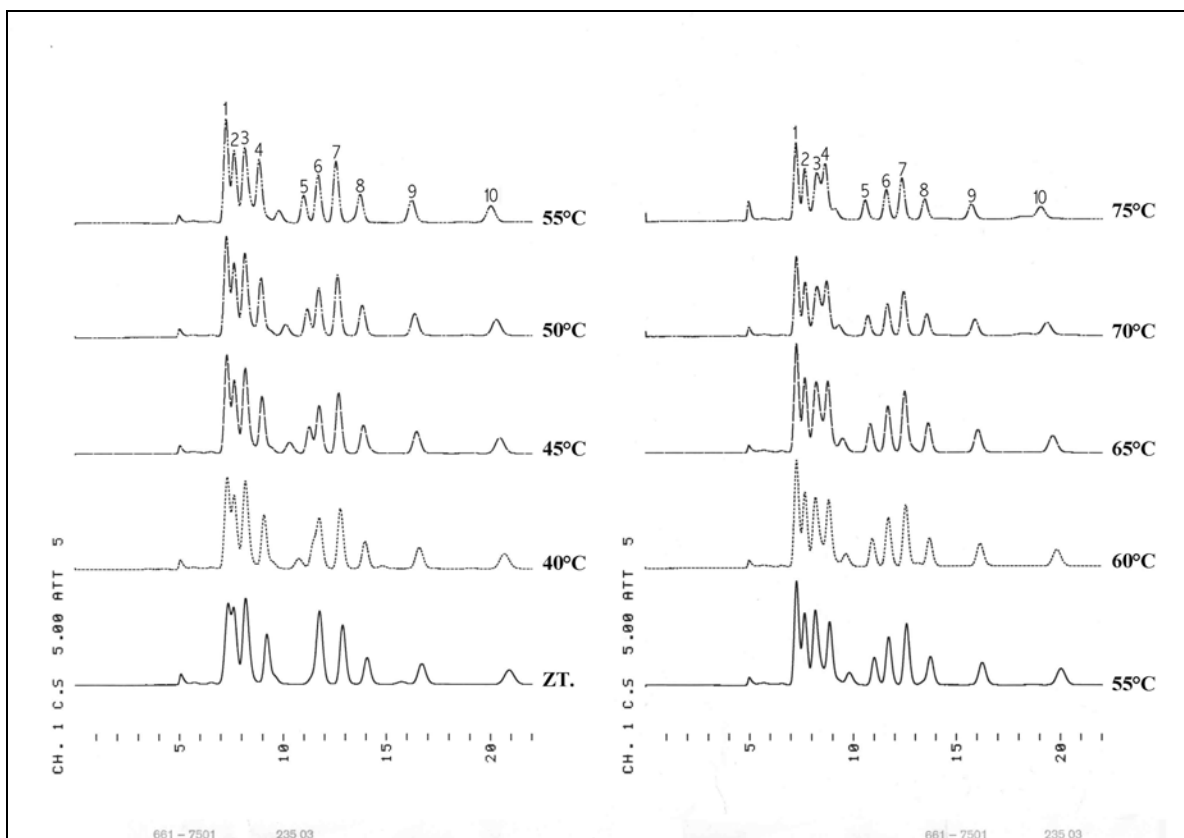


Abb. 17: Die Trennung der Zuckersäuren und anderer organischer Säuren auf der Fertigsäule RT 300-6,5 Polyspher OAHY (Merck, Darmstadt) bei verschiedenen Säulentemperaturen mit 0,5 ml/min 0.01 N H₂SO₄ als mobiler Phase.
 1. 2-Ketogluconsäure, 2. 5-Ketogluconsäure, 3. Gluconsäure, 4. Äpfelsäure, 5. Milchsäure 6. Bernsteinsäure, 7. Ameisensäure, 8. Essigsäure, 9. Propionsäure und 10. Buttersäure (Periadnadi 1996, unveröffentlicht)

Die Trennungen von Zuckersäuren und andere organischer Säuren sowie Zuckern und Alkoholen wurde mit verschiedenen HPLC-Analyse durchgeführt. Folgende HPLC-Systemvoraussetzungen wurde in dieser Arbeit verwendet.

HPLC-System I:

HPLC-System I wurde zur Trennung und Analyse von Zuckersäuren und organischen Säuren verwendet

- | | |
|------------|---|
| Pumpe | : Merck-Hitachi L-6200A Intelligent Pump |
| Detektor | : Merck-Hitachi L-4250 UV-VIS Detektor |
| Integrator | : Merck-Hitachi D-2500 Chromato-Integrator |
| | Säule: Fertigsäule RT 300-6,5 Polyspher OAHY (Merck, Darmstadt) |
| Vorsäule | : Polyspher OAHY - Vorsäule (Merck, Darmstadt) |
| Mobilphase | : H ₂ SO ₄ in verschiedenen Konzentrationen |

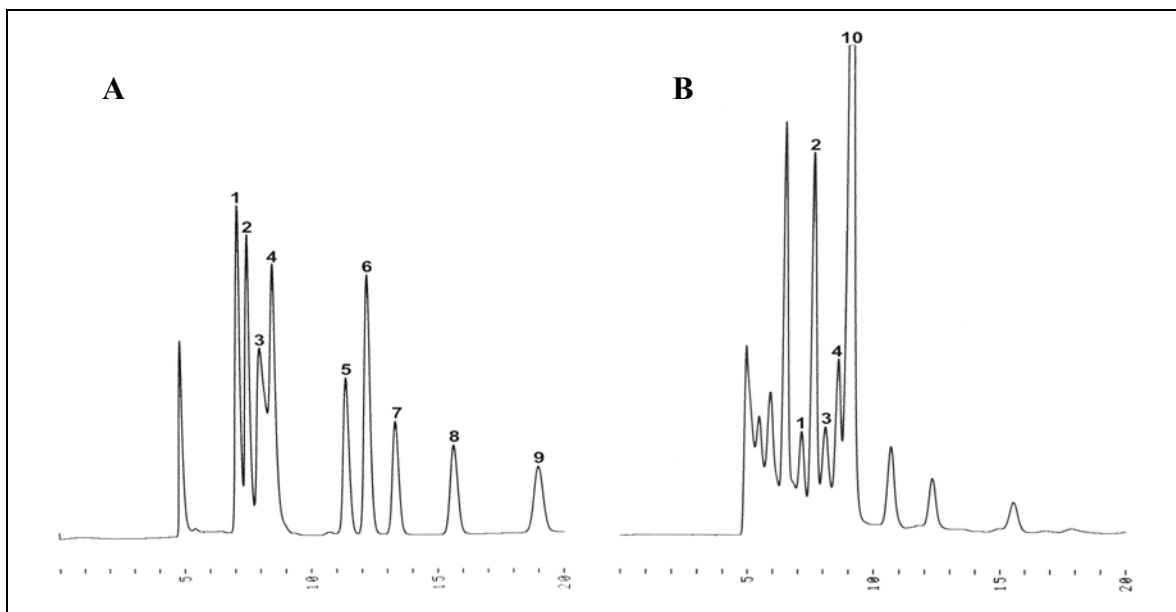


Abb. 18: Die Trennung eines Standardgemisches von Zucker- und anderen organischen Säuren (A) sowie Trauben der Sorte Rotberger 9 Tage nach Beimpfung mit *A. liquefaciens* (B) auf der Fertigsäule RT 300-6,5 Polyspher OAHY (Merck, Darmstadt) bei 65°C, 0,5 ml/min 0.01 N H₂SO₄ als mobiler Phase
 1. 2-Ketogluconsäure, 2. 5-Ketogluconsäure, 3. Gluconsäure, 4. Äpfelsäure, 5. Bernsteinsäure, 6. Ameisensäure, 7. Essigsäure, 8. Propionsäure, 9. Buttersäure und 10. 2,5-Diketogluconsäure

HPLC-System II:

Pumpe	: Latek S1021 Solvent Delivery System
Detektor	: Spectra-Physics SP8430 RI Detector
Integrator	: Spectra-Physics SP4290-Integrator
Säule	: Fertigsäule Aminex-HPX 87P von Bio-Rad
Säulenofen	: Alltech 530 Column Heater von Fa. Latek
Mobilphase	: Bidestilliertes Wasser

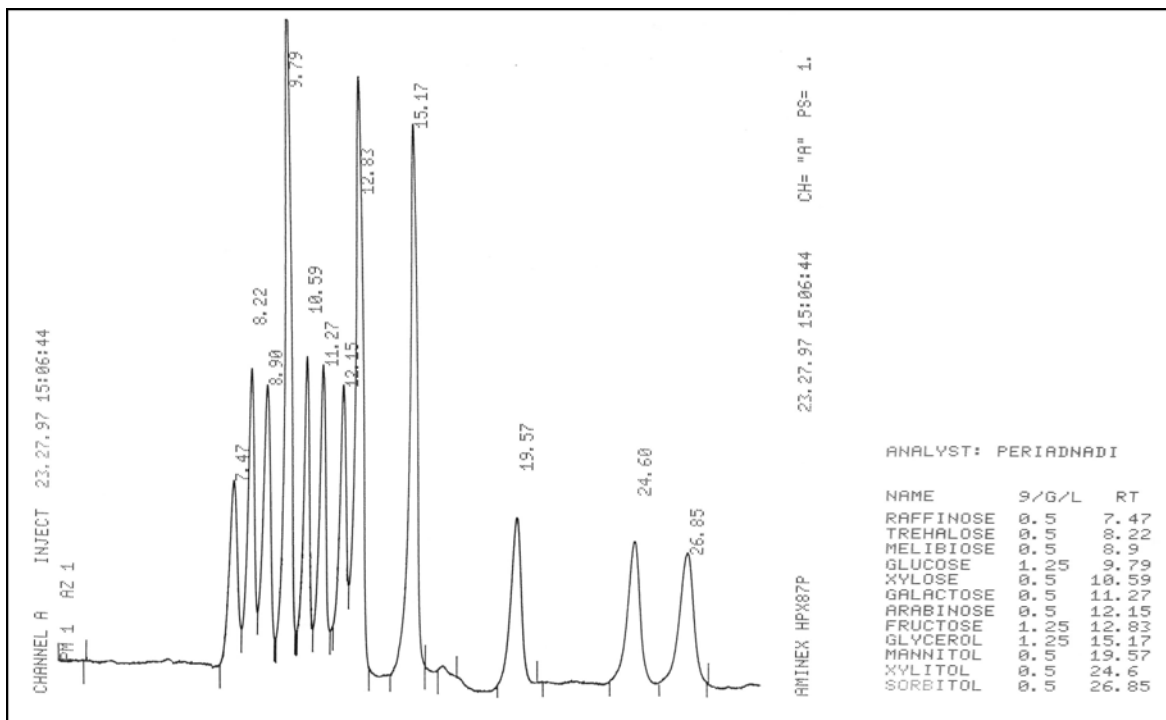


Abb. 19: Die Trennung eines Standardgemisches von Zuckern und Zuckeralkoholen auf Aminex HPX-87P-Säule bei 87°C, 0,6 ml/min bidestilliertes Wasser als mobile Phase.

HPLC-System III.

HPLC-System von Hewlett Packard 1100 Series mit Autosampler :

- Pumpe : G 1311A Quaternary Pump
- Degasser : G 1322
- Autosampler : G 1313 Auto Load Sampler
- Säulenoven : G 1316A Column Compressor
- Detektor : G 1315A DAD (Dioden Array Detector)

Erstellung der Standardlösung :

Zum Erstellen eines Chromatogramms mit genau identifizierbaren Peaks und deren Zuordnung zu einer bestimmten Komponente wurden Standardlösungen eingesetzt.

Die Standardlösungen sind in der Tabelle 4 und 5 angegeben.

Tabelle 4: Zusammensetzung der HPLC-Standardlösung I

Nr.	Substanzen	Konzentration
1	2-Ketogluconsäure	2,5 g/l
2	5-Ketogluconsäure	2,5 g/l
3	Gluconsäure	3 g/l
4	L-Milchsäure	1 g/l
5	Ameisensäure	1.22 g/l
6	Essigsäure	1.05 g/l
7	Propionsäure	0,99 g/l
8	Buttersäure	0,96 g/l

Tabelle 5: Zusammensetzung der HPLC-Standardlösung II

Nr.	Substanzen	Konzentration
1	Raffinose	0,4 g/l
2	Trehalose	0,2 g/l
3	Melibiose	0,2 g/l
4	Glucose	2 g/l
5	Xylose	0,2 g/l
6	Galactose	0,4 g/l
7	Arabinose	0,2 g/l
8	Fructose	2 g/l
9	Ethanol	0,79 g/l
10	Glycerin	1 g/l
11	2,3-Butandiol	1 g/l
12	Dihydroxyaceton	1 g/l
13	Mannit	0,5 g/l
14	Xylit	0,4 g/l
15	Sorbit	0,4 g/l

IV. Animpfung von Essigsäurebakterien auf Traubenbeeren, in Mosten, Weinen und synthetischen Medien

4.1. Die Gewinnung der Bakterienkultur

Um die StoffwechsellLeistungen der Essigsäurebakterien zu beobachten, wurden Traubenbeeren, Moste, Weine sowie synthetische Medien mit Reinkulturen der Essigsäurebakterien beimpft. Das ImpfmateriAl wurde aus 3 Tage alten Essigsäurebakterienkulturen gewonnen. Für diesen Zweck wurden alle zu beobachtenden Stämme auf *Acetobacter*-Medien (CCM) überimpft.

Die Agarplatten wurde mit Bakterien bestrichen. Nachdem die Bakterien gut gewachsen waren (3 Tage), kratzte man die Bakterienmasse vorsichtig unter sterilen Bedingungen mit einem sterilen Spatel heraus, sodass nur die Bakterienmasse von den Medien gekratzt wurde. Die Masse kam dann in steriles bidestilliertes Wasser bzw. in Moste, Weine oder flüssige Medien. Bei den Traubenbeeren wurde steriles Wasser als Trägermedium verwendet. Für die Beobachtungen der Moste, Weine sowie der synthetischen Medien wurden die gleichen Medien wie der zu untersuchenden Medien verwendet. Mittels eines Schüttlers konnte man die Masse danach homogenisieren.

Die Animpfung der Bakterien in den flüssigen Medien ist einfach. Die Bakteriensuspension wurde mit einem bestimmten Volumen direkt in die Medien inokuliert.

4.2. Animpfung der Essigsäurebakterien auf Traubenbeeren

Die Animpfung erfolgte auf zwei verschiedene Arten:

1. Bei den oberflächlich sterilen Trauben, die mit einer sterilen Impfnadel anangestochen wurden, um die Verletzung der Beerenhaut zu imitieren.
2. Bei den normalen oberflächlich sterilen Trauben.

Um die Kontamination mit Schimmelpilzen, Hefen sowie anderen Bakterien zu vermeiden, wurden die Traubenbeeren vor der Animpfung oberflächlich sterilisiert. Für die oberflächliche Sterilisation wurden die ganzen Trauben in einer 70%igen ethanolischen Lösung für 30 Sekunden untergetaucht. Der ethanolische Rest wurde dann mit einem

sterilen Papiertuch abgetupft bevor die Trauben dann unter der Sterilbank über Nacht mit steriler Luft überblasen wurden, um sie zu trocknen.

Die oberflächlich sterilen Trauben wurden dann in sterile Weckgläser eingelegt (Abb. 20) und mit homogenisierter Bakterienmasse (5 ml/kg Trauben) mittels einer Sprühdose besprüht. Anschließend wurden die Weckgläser mit einer luftdurchlässigen Kappe verschlossen. Für die Kontrolle wurden sterile Trauben von gleichem Volumen mit sterilem bidestilliertem Wasser besprüht.

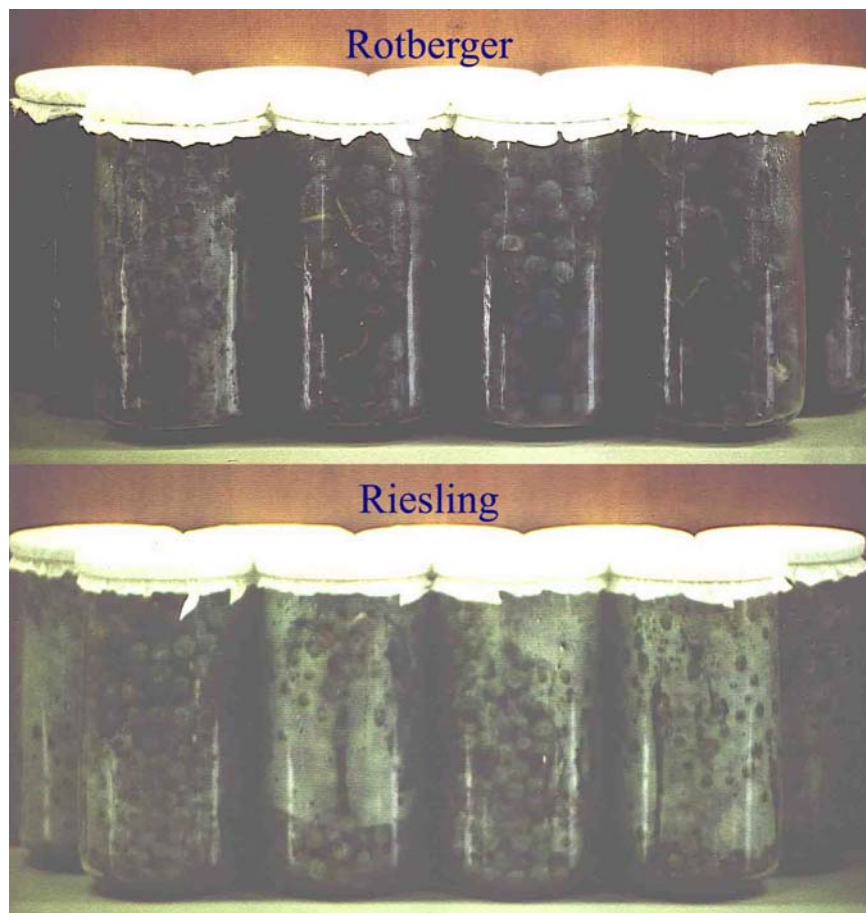


Abb. 20: Traubenbeeren der Sorte Rotberger und Riesling nach der Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien

Die Animpfung der Trauben erfolgte durch Besprühen der angestochenen und intakten Traubenbeeren. Durch beide Arten der Animpfung konnte gezeigt werden, dass die Kontamination durch die Bakterien unterschiedlich ist.

Für die Analyse wurden dann die Trauben nach bestimmten Untersuchungszeiten herausgenommen und gepresst. Der daraus gewonnene Most wurde direkt analysiert oder tiefgefroren.

In der Natur werden die Verletzungen der Beerenhaut durch Insekten oder Schimmelpilzen verursacht. Bei den angestochenen Beeren beginnt das Wachstum von den verletzten Teilen aus. Mit dem Anstechen der Beeren treten die zuckerhaltigen Säfte aus. Dadurch wird die Vermehrung der angeimpften Essigsäurebakterien ermöglicht. Dagegen wuchsen bei den intakten Beeren die Bakterien durch die Stiele der Beeren.

Das Wachstumsverhalten der Essigsäurebakterien bei den Trauben durch beide Arten von Animpfungen kann in Abb. 21 verglichen werden. Da *A. xylinum* als cellulosebildende Art auf zuckerhaltigen Medien bekannt ist, ist es einfacher das Wachstum der Bakterien zu beobachten. Wo zuckerreicher Saft ausgetreten ist, wird die Cellulosemasse von *A. xylinum* gebildet. Bei den intakten Beeren hat sich die Cellulosemasse am Stiel der Beeren angesammelt (Abb. 21. l), während bei den angestochenen Beeren die Cellulosebildung im Bereich des Stiches (Abb. 21. r) zu beobachten ist.



Abb. 21: Wachstumsvergleiche von *Acetobacter xylinum* durch unterschiedliche Art der Animpfung auf den Traubenbeeren. Sorte Rotberger, intakt (l) und Riesling, angestochen (r)

Durch Anstechen tritt der Saft der Beeren aus und damit wurde der Weg für die Essigsäurebakterien frei auf dem dann reichlich vorhandenen Zucker zu wachsen. Durch die von *A. xylinum* aus Glucose gebildete schleimige Cellulose, ist es noch einfacher zu erkennen, wie die Bakterien auf den Beeren gewachsen sind.

Bei den angestochenen Beeren war das Wachstum der Bakterien 3 Tage nach der Animpfung zu erkennen. Die ausgetretenen Säfte mit genügend Sauerstoff sind das beste Medium für das Wachstum der Essigsäurebakterien. Glucose wurde zu Gluconsäure oxidiert und je nach den Fähigkeiten der Stämme zu 5-Ketogluconsäure, 2-Ketogluconsäure oder weiter zu 2,5-Diketogluconsäure oxidiert.

Die Bakterien können die Beerenhaut ohne Hilfe von Schimmelpilzen oder andere Arten der Verletzung nicht infiltrieren. Einzige Schwachstelle bei den Beeren, durch die Essigsäurebakterien in die Beeren eindringen können, sind die Ansatzstellen der Stiele. Aber dieses findet erst dann statt, wenn Läsionen aufgetreten sind und sich die Stiele von den Beeren lösen (Abb. 22.4).

Die Wirkung dieser unterschiedlichen Animpfungen können anhand der Abb. 21 und Abb. 22 verglichen werden.



Abb. 22: Die Wirkung des Anstechens der Beeren auf das Wachstum der Bakterien auf Traubenbeeren

1. Angestochener Riesling mit *A. xylinum* nach 3 Tagen; 2. Angestochener Riesling ohne Bakterien nach 12 Tagen (Kontrolle); 3. Angestochener Riesling nach mit *A. aceti* nach 12 Tagen 4. Intakte Beeren mit *A. liquefaciens* nach 12 Tagen

Unterschiedliche Animpfungen zeigten auch unterschiedliche Wirkungen und Ergebnisse nach der Analyse. Bei den angestochenen Beeren wuchsen Essigsäurebakterien schneller als bei intakten Beeren. 3 Tage nach der Beimpfung der angestochenen Beeren konnte schon die Entwicklung der Bakterien beobachtet werden (Abb. 22.1), während bei den intakten Beeren erst nach 9-12 Tagen zu unterschieden werden konnte, ob die Bakterien gewachsen sind. Dieses hängt auch vom Zustand der einzelnen Beeren ab.

Die Analysen zeigten daher auch unterschiedliche Ergebnisse. Die Essigsäurebakterien produzierten bei den angestochenen Beeren mehr Zuckersäuren als bei den intakten Beeren. Die Ergebnisse werden in der Abb. 23 graphisch dargestellt.

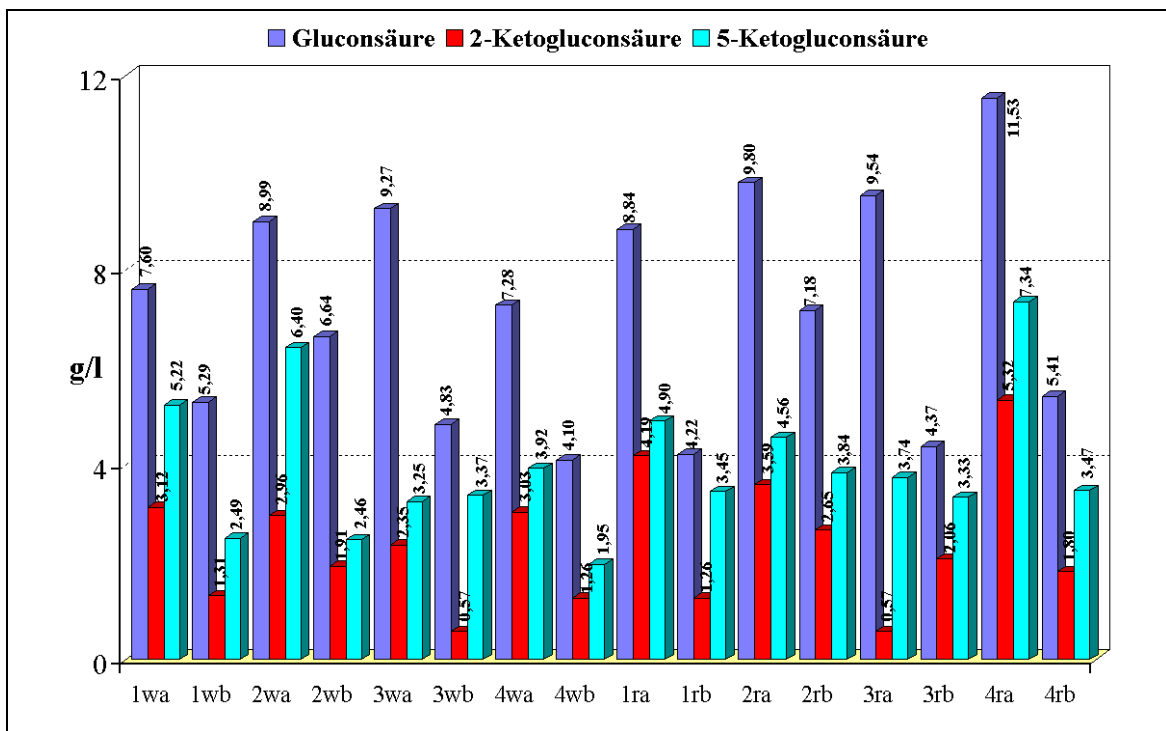


Abb. 23: Gluconsäure, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäurekonzentration in weißen und roten Traubenbeeren 15Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien bei unterschiedlichen Animpfungsarten
 Essigsäurebakterien :1. *A. aceti* var. *aceti*; 2. *A. liquefaciens*; 3. *A. xylinum*; 4. *G. oxydans* var. *suboxydans*; Traubenbeeren : w = Weiße Trauben ; r = Rote Trauben.; Animpfungen : a. Angestochen und b. Intakt

Da Essigsäurebakterien erstens unter normalen Konditionen ohne fremde Hilfe nicht in die Beeren einzudringen vermögen, zweitens der Zustand der Beeren in einer Traube nicht immer gleich ist und drittens die Entwicklung der Bakterien bei den intakten Beeren langsamer als bei den angestochenen Beeren ist, erfolgen die Animpfungen der

Essigsäurebakterien in Verlauf dieser Arbeit nur auf angestochenen Traubenbeeren. Durch das Anstechen der Beeren, wurde das Eindringen der Bakterien ähnlich wie in der Natur, durch z.B. Insektenstich oder Schimmelpilzbefall, nachgestellt.

Die Ergebnisse werden in Tabelle 4 und 5 dargestellt.

Tabelle 6: Restglucose und -fruktose, Gluconsäure-, und Essigsäurekonzentration (g/l) in Traubenbeeren 15 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien.

Bakterien	Glucose		Fruktose		Gluconsäure		Essigsäure	
	R	W	R	W	R	W	R	W
Aava	34,3	37,5	37,0	47,0	4,5	5,1	3,0	3,1
Aliq	33,3	37,0	33,7	48,3	7,9	4,1	3,3	2,7
Axy.	49,4	39,7	53,5	47,4	5,6	7,2	2,23	5,7
Goxso	46,0	33,3	44,7	36,9	2,7	5,9	2,4	3,8

Tabelle 7: Konzentration von 2-Keto- 5-Keto- und 2,5-Diketogluconsäure (mg/l) in Traubenbeeren 15 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien

Bakterien	5-Ketogluconsäure.		2-Ketogluconsäure		2,5-Diketogluconsäure	
	R	W	R	W	R	W
Aava	1866	1468	439	839	n.n	n.n
Aliq	1563	774	218	349	186	293
Axy	1956	1225	621	541	n.n	n.n
Goxso	194	372	364	382	n.n	n.n

n.n.= nicht nachweisbar

Diese ersten Ergebnisse dienen als Basis für die weitere Arbeit. Die Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Stämme eine große Menge Zuckersäuren gebildet haben. *A. aceti* var. *aceti* bildete 4,51 g/l Gluconsäure, bis 1866 mg/l 5-Keto- und bis 439 mg/l 2-Ketogluconsäure in roten Trauben; bis 5,1 g/l Gluconsäure, bis 1468 mg/l 5-Keto- und bis 839 mg/l 2-Ketogluconsäure in weißen Trauben. Dagegen bildeten *A. liquefaciens* bis 7,9 g/l Gluconsäure, bis 1563 mg/l 5-Ketogluconsäure, bis 393 mg/l 2-Ketogluconsäure und bis 225 mg 2,5-di-Ketogluconsäure in roten Trauben und bis 5,79 g/l Gluconsäure, 775

mg/l 5-Ketogluconsäure, bis 350 mg/l 2-Ketogluconsäure und bis 523 mg/l 2,5-Diketogluconsäure.

Da Hefe- und Schimmelpilzkontaminationen von Traubenbeeren im Weinanbau schwierig zu vermeiden sind, wurden andererseits von den Essigsäurebakterien bis zu 2,6 g/l Essigsäure gebildet. Die Kontaminationen mit Hefen und Schimmelpilzen ermöglichen die Bildung hoher Mengen von Ethanol und Dihydroxyaceton in den Trauben. Die Ethanolkonzentrationen lagen zwischen 2 g/l und 9 g/l und Dihydroxyaceton liegt zwischen 0,5 g/l und 1,9 g/l.

Von den 4 ausgewählten Stämmen bildete nur *A. liquefaciens* sowohl in roten als auch in weißen Traubenbeeren 2,5-Diketogluconsäure.

V. Das Wachstum der Essigsäurebakterien

Das Wachstum von Essigsäurebakterien in synthetischen Medien ist nicht vom pH-Wert der Medien abhängig, jedoch die Rate der Keto-D-Gluconsäureproduktion ist abhängig vom pH-Wert, besonders wenn neutralisierende Substanzen vorhanden sind. Kalziumionen sind für die Produktion der Ketogluconsäuren wichtig. Die Lag-Phase der Ketogluconsäureproduktion ist wahrscheinlich von der Biomasse als Biokatalisator und Gluconsäure als Substrat abhängig (Beschkov et al. 1995).

Die Wachstumskurven der Essigsäurebakterien in synthetischen Medien unterschieden sich bei verschiedenen pH-Werten nicht deutlich, aber das Wachstum der verschiedenen Stämme unterscheidet sich, wenn sie bei verschiedenen pH-Werten miteinander verglichen wurden. Die Wachstumskurven ausgewählter Essigsäurebakterienstämme bei pH 4 und 5 sind in Abb. 24 dargestellt.

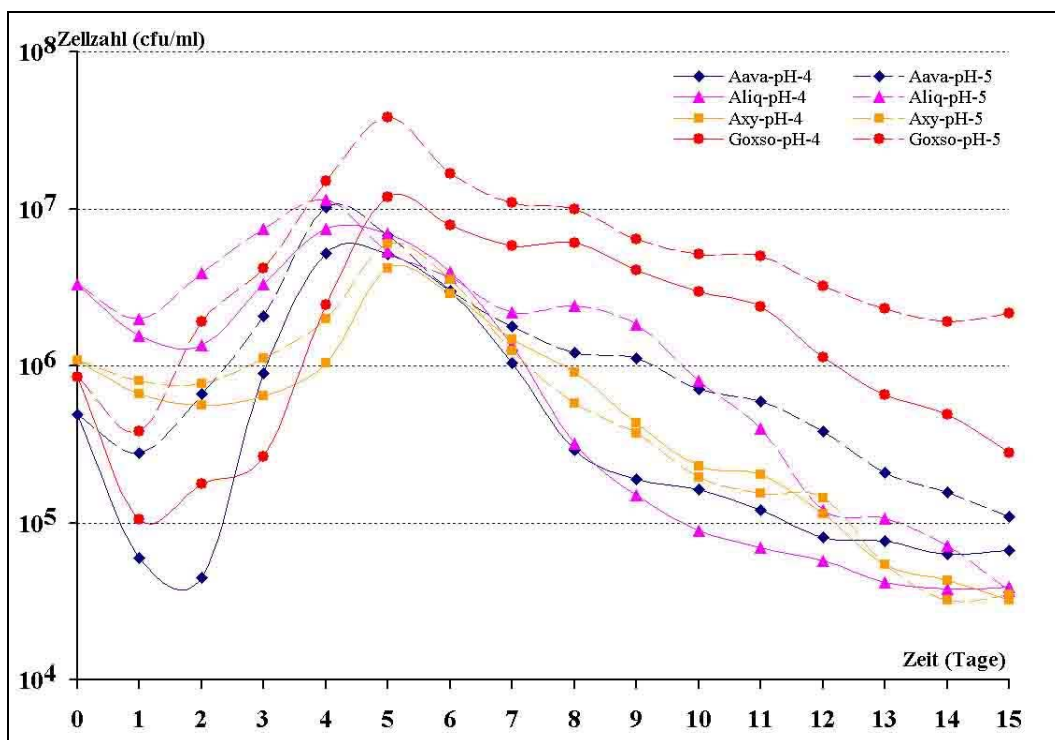


Abb. 24: Wachstumskurven verschiedener Essigsäurebakterienstämme in synthetischen Medien bei pH 4 und pH 5.

In der Abb. 24 kann beobachtet werden, dass die Populationen bei allen Stämme erst 24 Stunden nach der Beimpfung gewachsen sind. Im Allgemeinen sind die Wachstumskurven gleich. Die höchste Population bei beiden pH-Werten wurde von *A. aceti* var. *aceti* und *A.*

liquefaciens vier Tage nach der Beimpfung erreicht, bei *A. xylinum* und *G. oxydans* var. *suboxydans* erst nach dem fünften Tag.

Alle ausgewählten Stämme zeigten am ersten Tag noch kein Wachstum, sogar war bis zum zweiten Tag bei manchen Stämmen bei pH 5 eine Abnahme der Zellzahl zu verzeichnen. Die Veränderungen der Medien könnte diesen Rückgang verantwortlich sein. Da die Bakterien daran gewöhnt waren immer in festen Agar Medien mit Zusatz von Calciumcarbonat (CCM-*Acetobacter*-Medium) zu wachsen, könnte das flüssige Medium das Wachstum der Bakterien beeinflussen.

Die Wachstumskurven der Essigsäurebakterien, die bei pH 4 und pH 5 wuchsen, waren ähnlich, aber in allgemein war die Population bei pH 5 etwas höher als die bei pH 4. Hohes Populationswachstum wurde von *G. oxydans* var. *suboxydans* mit $0,38 \times 10^8$ cfu/ml in synthetischen Medium bei pH 5 bei einer Ausgangspopulation von $0,85 \times 10^6$ cfu/ml

5.1. Wachstum der Essigsäurebakterien auf Traubenbeeren

Essigsäurebakterien sind in der Natur weit verbreitet. Wenn die Früchte z.B. durch Insekten oder Schimmelpilzen verletzt sind, wird der Saft für die Essigsäurebakterien zugänglich. In Traubenbeeren wird das Vorkommen der Essigsäurebakterien meistens erst erkannt nachdem die Essigsäurebakterien die mit der Hefe vergesellschaftet sind und dann essigstichige Trauben resultieren.

Bei höherem Sauerstoffgehalt können Essigsäurebakterien sich gut vermehren und verursachen insbesondere durch die Bildung von Essigsäure, Essigsäureethylester und Gluconsäure einen unangenehmen Essigstich und außerdem oft eine schmutzig bräunliche Verfärbung.

Ein typischer Essigsäurebakterienbefall von Traubenbeeren ist in Abb. 25 dargestellt.



Abb. 25: Rieslingtraubenbeeren 12 Tage nach Beimpfung mit *Gluconobacter oxydans* var. *suboxydans*

5.2. Wachstum der Essigsäurebakterien in Mosten

Die Beobachtung des Wachstums von Essigsäurebakterien in Rieslingmost zeigte, dass am 12. Tag ein optimaler Punkt erreicht ist. 3 Tage nach Beimpfung zeigten alle Bakterienstämme noch kein deutliches Wachstum, in allen Fällen war ein Absterben festzustellen.

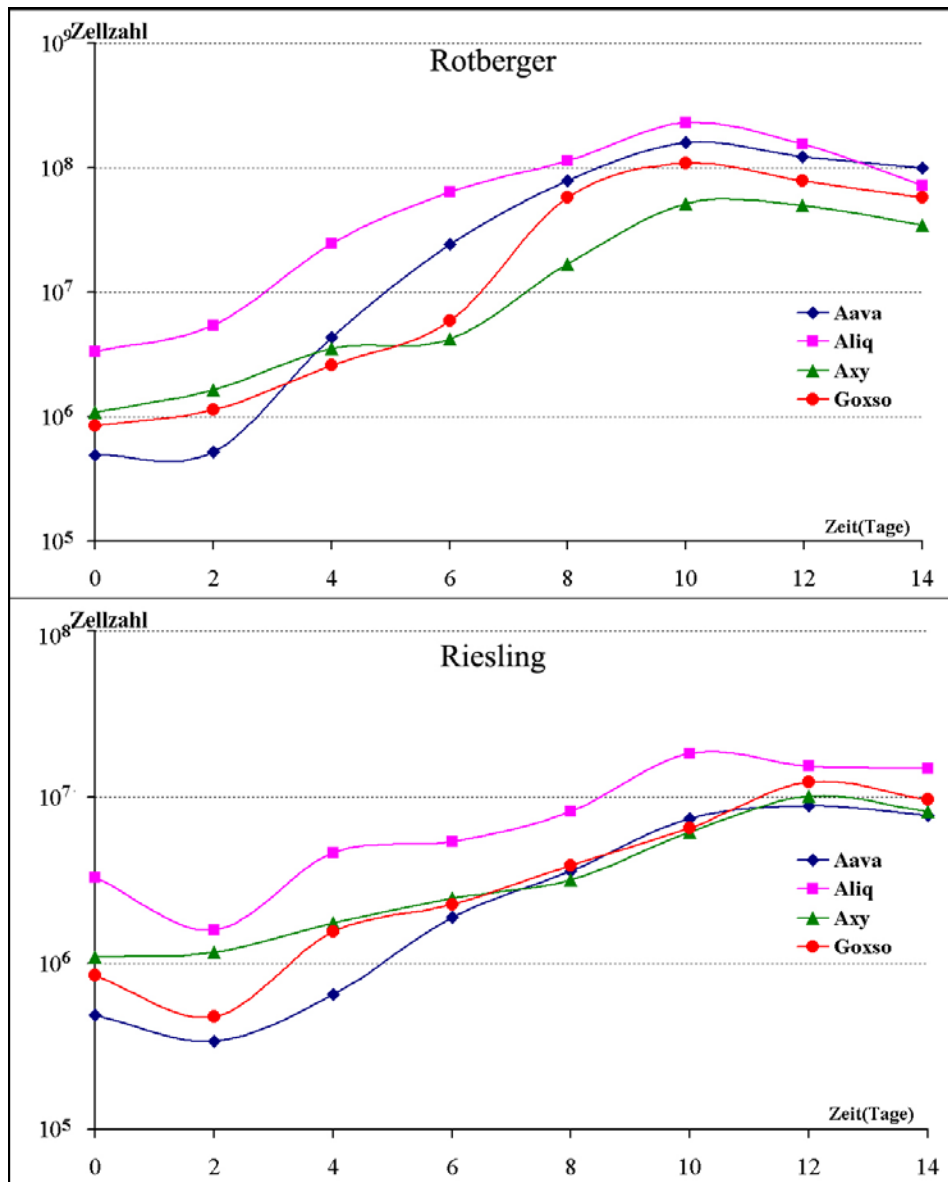


Abb. 26: Wachstum der Essigsäurebakterien in den Traubenmosten

Die Zunahme der Zellzahl bei allen Stämmen hat erst ab den zweiten Tag begonnen. Den ersten Tag benötigen die Bakterien zur Adaptation an das neue Medium, da sie direkt von festen Agarmedien abgekratzt wurden. Es kam noch dazu, dass der pH-Wert des Agarmediums höher war, als das der verwendeten Moste. Obwohl die meisten Stämme bei pH 3,7 noch wachsen, liegen die optimalen pH-Werte der Essigsäurebakterien zwischen pH 5 – 6 (De Ley et al. 1984).

Während der Wachstumsphase verändert sich auch die pH-Werten. Die Veränderungen der pH-Werte in den Mosten in 15 Tagen werden in Abb. 27 graphisch dargestellt. In 15

Tagen sind die pH-Werte von 3,4 bei Rotmost bzw. 3,1 bei Rieslingmost auf 2,9 gesunken.

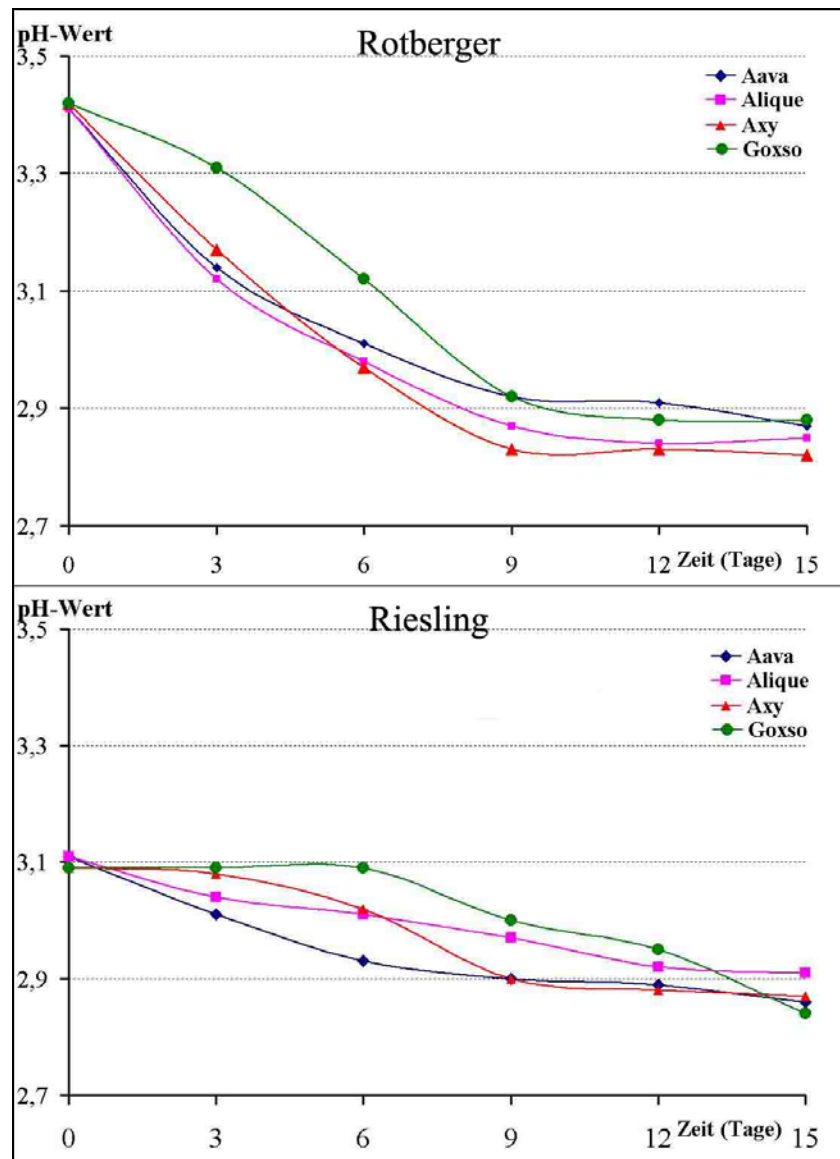


Abb. 27: Die Veränderungen der Most pH-Werte nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien während der 15 tägigen Untersuchungszeit

Diese Veränderungen wurden durch die Veränderungen der Zusammensetzung der Medien verursacht, wie z. B. durch die Umsetzung von Glucose zu Gluconsäure und weiter zu den möglichen Ketogluconsäuren. Über diese Oxidationsprodukte wird im weiteren Kapitel diskutiert.

5.3. Wachstum der Essigsäurebakterien in Weinen

Im Gegensatz zu den Mosten wuchsen die Essigsäurebakterienstämme in den Weinen sehr langsam. Hier macht sich das Fehlen des Zuckers, dem Hauptsubstrat der Essigsäurebakterien, deutlich bemerkbar. In der ersten Woche war die Population sogar von 10^6 cfu bis auf 10^3 cfu zurückgegangen. Sowie in der Darstellung des Wachstum der ausgewählten Essigsäurebakterien in Abb. 28, wurde in den ersten 2 Wochen kein Wachstum der Essigsäurebakterien in Rieslingweinen festgestellt. Erst nach der zweiten Woche gab es ein leichtes Wachstum der Population. Als Beispiel wird das Wachstum der Essigsäurebakterien in Rieslingwein in den ersten 2 Wochen dargestellt.

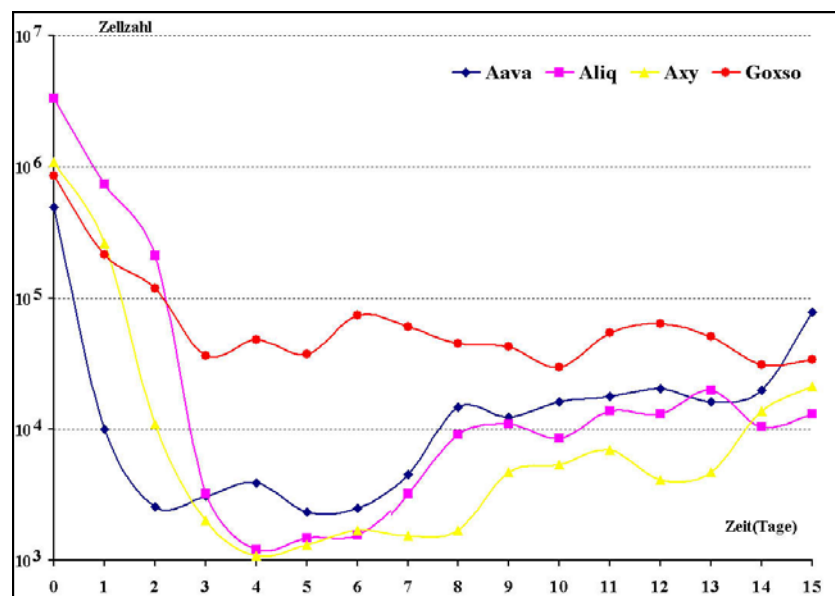


Abb. 28: Die Wachstumskurve von Essigsäurebakterien in Rieslingwein

5.4. Essigsäurebildung in den Weinen

Der Name Essigsäurebakterien wurde für die Bakterien dieser Gruppe wegen ihrer Fähigkeit Ethanol zu Essigsäure zu oxidieren gegeben. Essigsäure kann als Zwischen- oder Endprodukt gebildet werden. Die ausgeschiedene Essigsäure kann, wie auch vorhandene Milchsäure, wieder in den Stoffwechsel einbezogen und über den Tricarbonsäurezyklus abgebaut werden. Bei vielen Vertretern sind die Enzyme des oxidativen Pentosephosphatweges vertreten (Drews 1983).

Untersuchungen zur Essigsäurebildung ausgewählter Stämme wurde in Rieslingweinen und einem Rotwein-Sortengemisch, jeweils mit 12% (v/v) Alkoholgehalt, durchgeführt.

Wie in Abb. 29 gezeigt wird, bilden alle ausgewählten Stämme Essigsäure. Unterschiede gab es lediglich bei den gebildeten Mengen.

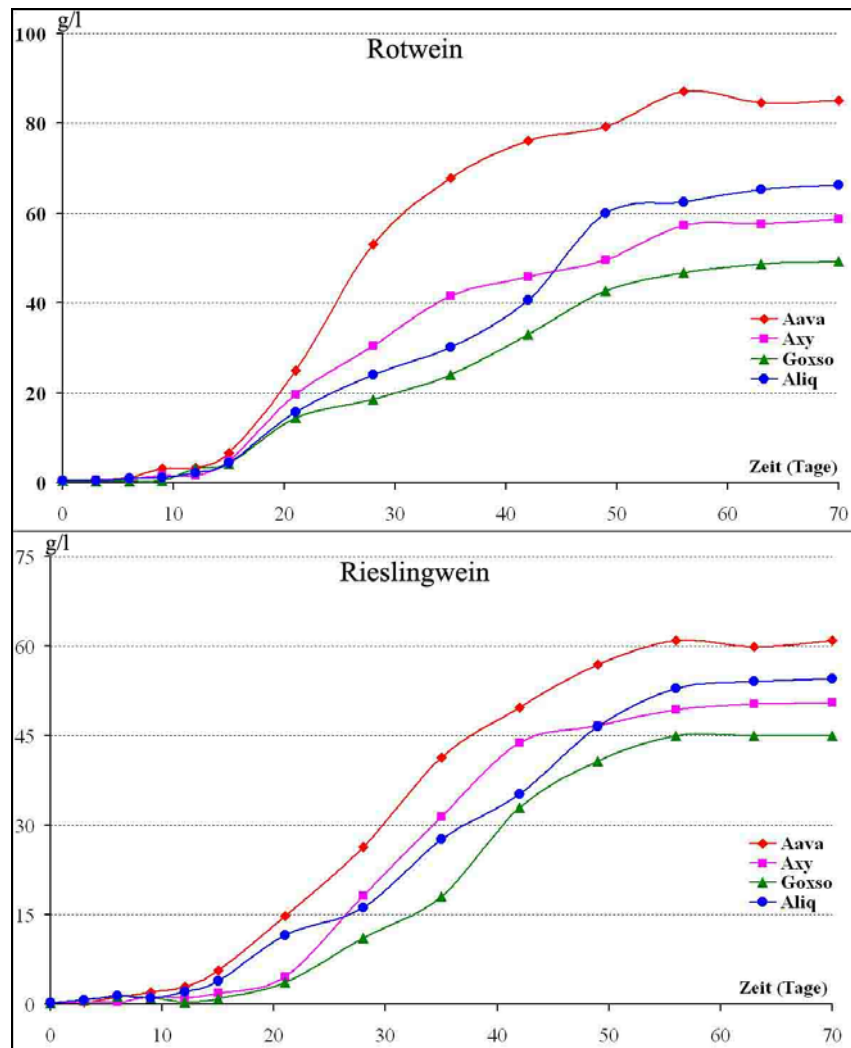


Abb. 29: Die Bildung von Essigsäure durch verschiedene Essigsäurebakterien in Rotwein und Rieslingwein

Die Bildung von Essigsäure in den Weinen verlief langsam. In den ersten 2 Wochen wurde nur wenige Essigsäure gebildet. Die Bildung der Essigsäure ist von der Population der Essigsäurebakterien abhängig, wie in den ersten 2 Wochen zu bemerken. Die Produktion der Essigsäure begann erst ab der zweiten Woche. Unterschiedliche Stämme zeigten auch unterschiedliche Leistungen der Essigsäurebildung. Mit 85 g/l in 70 Tagen bildete *A. aceti* in Rotwein die größte Menge Essigsäure, in Rieslingwein bildete es bis 60,9 g/l. Unterschiede gib es zwischen Rieslingwein und Rotwein bei der Bildung von Essigsäure. In Rotweinen bildeten Essigsäurebakterien mehr Essigsäure als in den Rieslingweinen, obwohl die Ausgangsweine gleiche Ethanolkonzentrationen hatten.

VI. Zuckersäurestoffwechsel der Essigsäurebakterien

Der Stoffwechsel von Glucose und Fructose ist bei jedem Bakterienstamm unterschiedlich. Alle untersuchten Stämme oxidieren Glucose und Fructose mit unterschiedlichen Leistungen zu Zuckersäuren. In synthetischen Medien wurden Gluconsäure, 2-Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure von allen untersuchten Stämmen aus Glucose, wie auch aus Fructose gebildet.

Glucose wird von Essigsäurebakterien direkt zu Gluconsäure oxidiert. Mit spezifischen NADP-abhängigen Dehydrogenasen entstehen durch weitere Oxidation die 2- bzw. die 5-Ketogluconsäure. Die enzymatische Bildung der 2,5-Diketogluconsäure erfolgt dann aus der 2-Ketogluconsäure (Sponholz 1990).

Qualitativ können mittels Dünnschichtchromatographie die unterschiedlichen Leistungen der Zuckerverwertung durch die Essigsäurebakterien, wie in der Abb. 30 dargestellt, beobachtet werden.

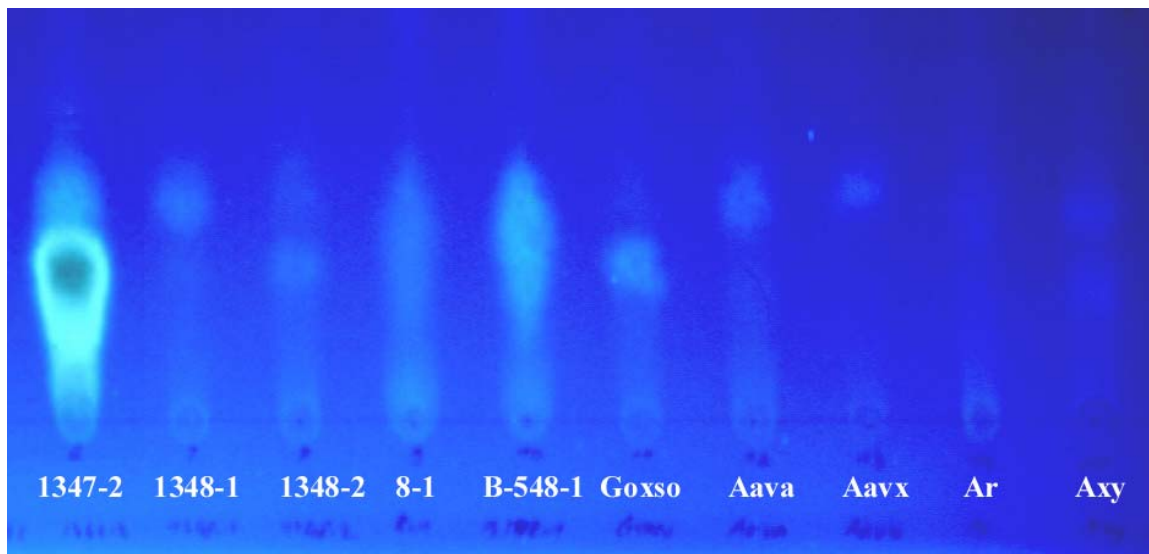


Abb. 30: Dünnschichtchromatogramm von Zuckersäuren, die durch verschiedene Essigsäurebakterienstämme in synthetischen Medien gebildet wurden

Außer 2- und 5-Ketogluconsäure bildeten die *A. liquefaciens* Stämme (1347-2 und 1348-1) auch 2,5-Diketogluconsäure aus Glucose, aber nur Stamm 1347-2 kann 2,5-Diketogluconsäure aus Fructose bilden. *A. liquefaciens* 1348-1 bildete bis zu 3600 mg/l 2,5-Diketogluconsäure. Dagegen bildete *A. liquefaciens* 1347-2 nur bis zu 1500 mg/l 2,5-Diketogluconsäure. Nur *A. liquefaciens* 1347-2 war fähig 2,5-di-Ketogluconsäure aus

Fructose zu bilden. Es wurden bis zu 400 mg/l analysiert. *A. aceti* var. *aceti* bildete viel 2-Ketogluconsäure (bis zu 3400 mg/l), nur geringe Menge 5-Ketogluconsäure (um 150 mg/l) und keine 2,5-di-Ketogluconsäure.

Die Bildung von Zuckersäuren aus Glucose oder Fructose im synthetischen Medium wird in Abbildung 32 dargestellt.

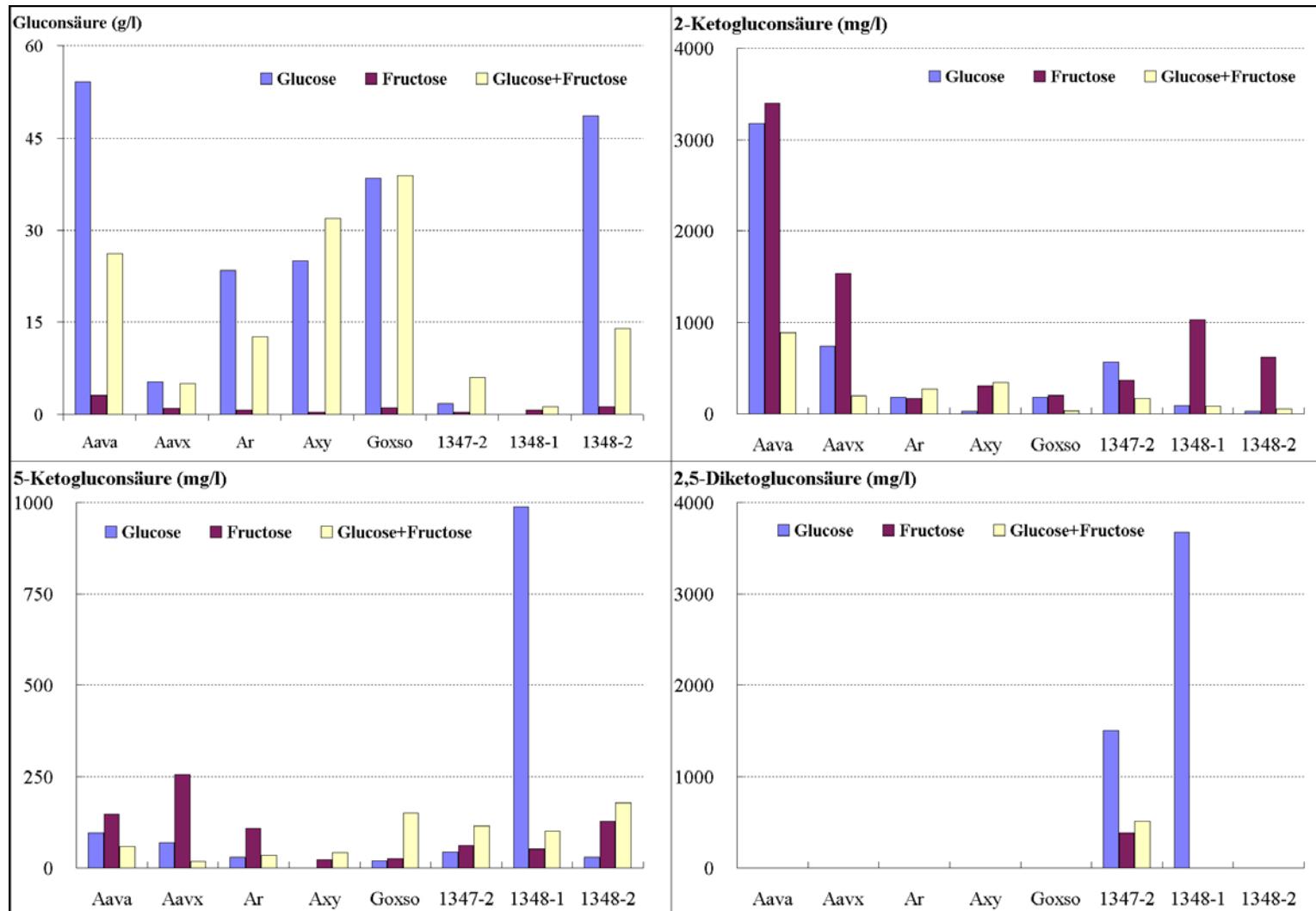


Abb. 31 : Die Bildung von Zuckersäuren in synthetischen Medien 30 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien aus Glucose, Fructose und einem Glucose/Fructose 1/1.

6.1 Gluconsäure

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wuchsen die Essigsäurebakterien gezielt auf Glucosemedien. Die Medien mit 100 g/l Glucose waren mit und ohne Zusatz von CaCO_3 .

Wie bei den vorherigen Untersuchungen war die Bildung der Gluconsäure zwischen den Stämmen sehr unterschiedlich. Gluconsäure wurde meist in sehr großen Mengen aus Glucose erzeugt; so bildeten *A. xylinum* sowie *G. oxydans* var. *suboxydans* mehr als 50 g/l Gluconsäure und *A. liquefaciens* bis 20,4 g/l in 30 Tagen in den Medien, die ohne CaCO_3 zugesetzt wurde.

In den mit CaCO_3 zugestzten Medien wurden dagegen weniger Gluconsäure synthetisiert. Die gebildete Gluconsäure wurden gleich zu Gluconsäure Calciumsalz umgewandelt, das in Wasser unlöslich ist. Die Unterschiede des Gluconsäureertrags in den beiden Medien wird in Abb. 32 graphisch dargestellt.

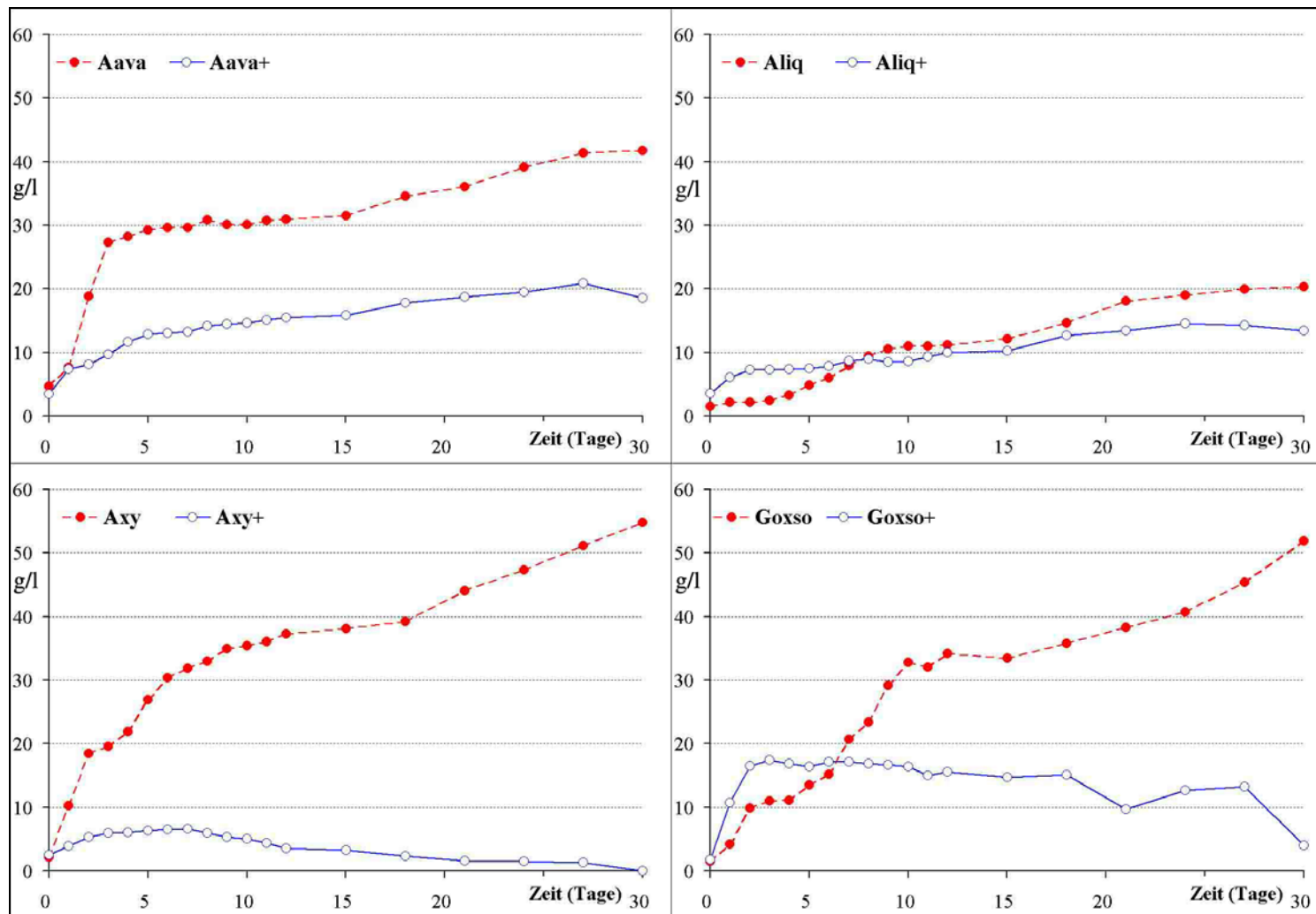


Abb. 32: Gluconsäurekonzentrationen in synthetischen Medien mit bzw. ohne CaCO₃-Zusatz 30 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien

Bei weiteren Versuchen mit Traubenbeeren wurden ähnliche Situation resultiert. Die Unterschiede der Gluconsäurekonzentration waren ab dem dritten Tag zu bemerken. Die höchste Gluconsäurekonzentration wurde von *G. oxydans* var. *suboxydans* bei 11,5 g/l nach 12 Tage der Beimpfung bei den Beren der Sorte Rotberger erzielt. Die Gluconsäurebildung in den Traubenbeeren während 15 Tage Beimpfung der Traubenbeeren mit Essigsäurebakterien wird graphisch in Abb. 33 dargestellt.

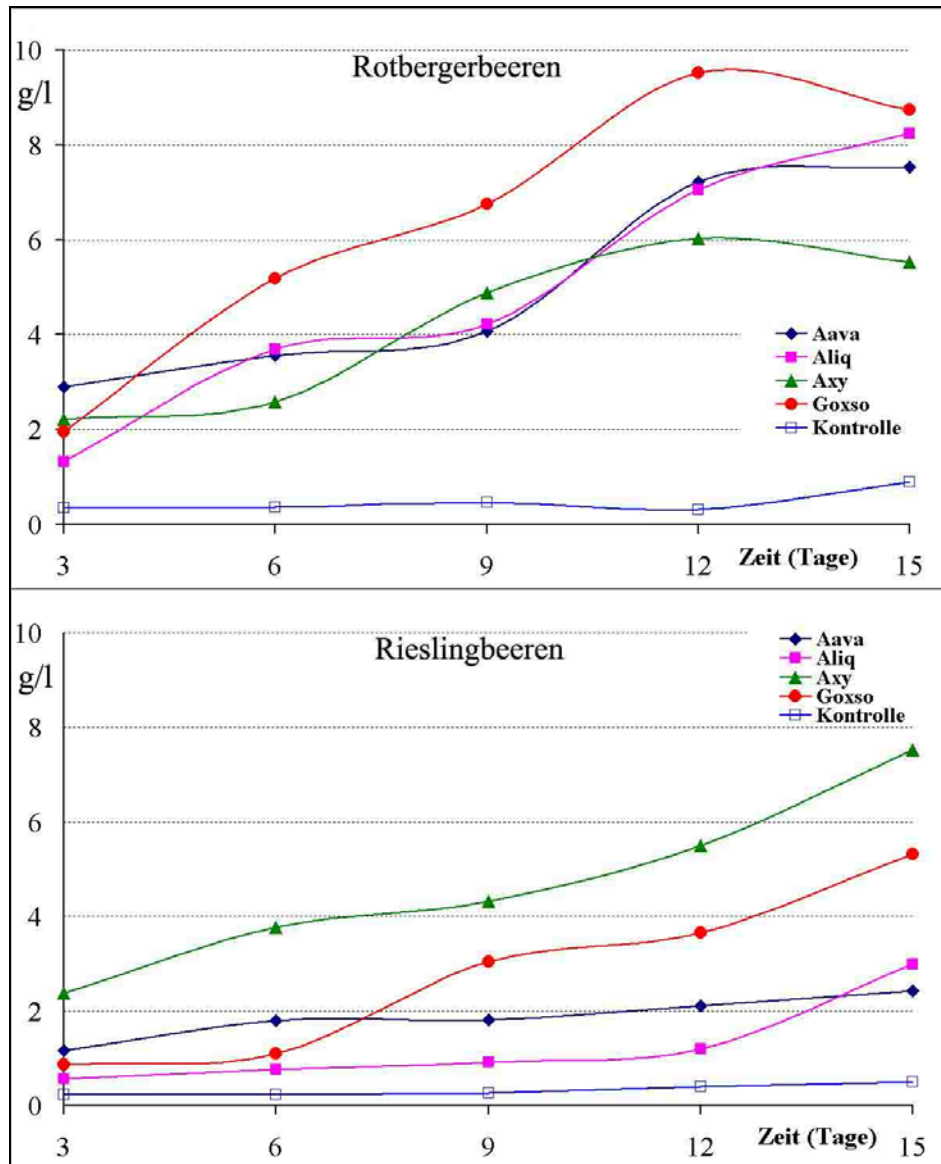


Abb. 33: Gluconsäurekonzentrationen in Traubenbeeren der Sorte Rotberger und Riesling nach Beimpfung mit Essigsäurebakterien im Laufe von 15 Tagen

Die Bildung der Gluconsäure in den Traubenbeeren war langsamer als in den synthetischen Medien. Dies könnte sowohl von den Festigkeit der Medien als auch durch den pH-Wert

beeinflusst werden sein.

In den Traubenbeeren der Sorte Rotberger wurde in Allgemeinen mehr Gluconsäure durch die Essigsäurebakterien gebildet als in den Rieslingtrauben. Am 12. Tag der Beimpfung zeigten alle Essigsäurebakterienstämme außer *A. liquefaciens* bei den roten Trauben die höchsten Gluconsäureproduktion. Dagegen stiegen die Gluconsäurekonzentration in den Rieslingtrauben bis zum 15. Tag noch weiter an. In diesem Fall könnte auch der Einfluss des pH-Wertes mitbeteiligt sein. Die pH-Werte in den Beeren der Sorte Riesling waren niedriger als in den Sorte Rotberger.

6.2 2-Ketogluconsäure

Vom Reaktionsmechanismus ist wurde 2-Ketogluconsäure ein weiteres Oxidationsprodukt von Glucose. Bevor 2-Ketogluconsäure gebildet wird, wurde die Glucose zuerst zu Gluconsäure oxidiert (siehe Abb. 10). Die Konzentration von 2-Ketogluconsäure in den Medien hängt von der produzierten Gluconsäurekonzentration ab.

Die unterschiedlichen Essigsäurebakterienstämme produzieren auch unterschiedliche Menge an 2-Ketogluconsäure. Die Stämme *A. xylinum* produzierte bis zu 24,5 g/l 2-Ketogluconsäure in den synthetischen Medien in 30 Tagen, dagegen produzierten *A. aceti* var. *aceti* und *A. liquefaciens* jeweils nur etwa 5 g/l.

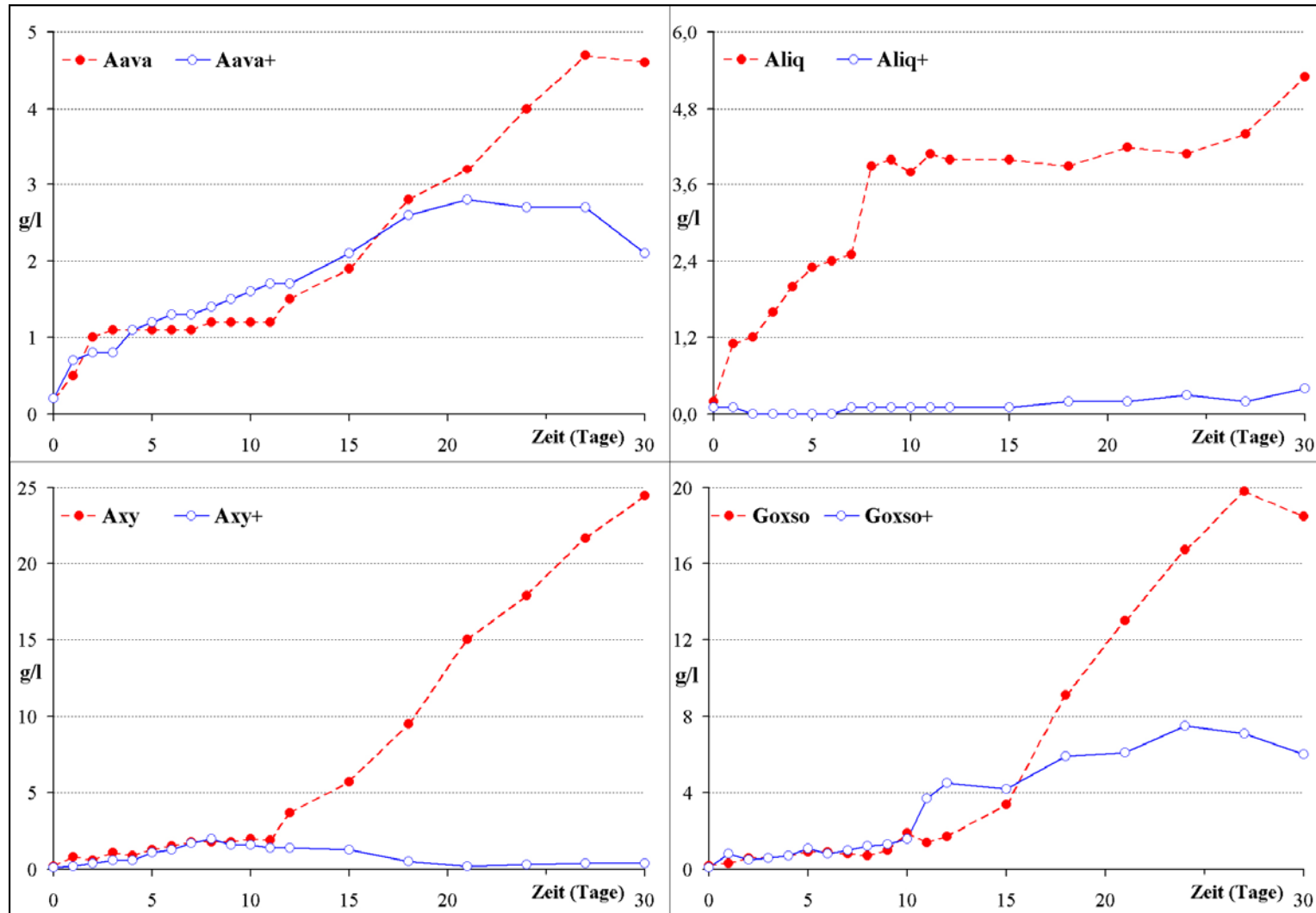


Abb. 34: 2-Ketogluconsäurekonzentrationen in synthetischen Medien mit bzw. ohne CaCO₃ –Zusatz 30 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien

In Gegensatz zur Gluconsäure ist die Produktion von 2-Ketogluconsäure in den Traubenbeeren 15 Tage nach der Beimpfung mit den Essigsäurebakterien noch weiter angestiegen. Die Bildung der 2-Ketogluconsäure in den Traubenbeeren während der 15 Tagen wird in Abb. 35 graphisch dargestellt.

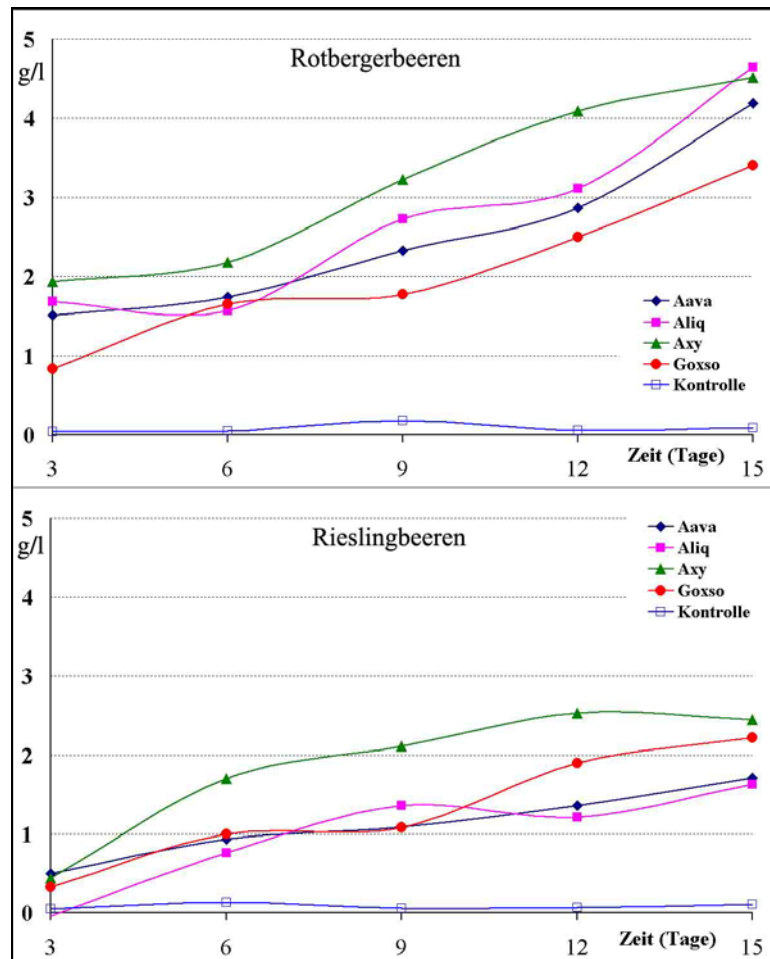


Abb. 35: 2-Ketogluconsäurekonzentrationen in Traubenbeeren der Sorte Rotberger und Riesling während 15tägiger Bebrütung mit Essigsäurebakterien

Anders als in den synthetischen Medien waren die Unterschiede der Gluconsäureproduktion in den Traubenbeeren nicht so groß, aber trotzdem produzierte die Essigsäurebakterien Stamm *A. xylinum* wie in den synthetischen Medien mehr 2-Ketogluconsäure als die anderen Stämme. Allgemein stieg die Produktion der 2-Ketogluconsäure bei allen Stämmen bis zum 15ten Tag an.

6.3 5-Ketogluconsäure

Wie 2-Ketogluconsäure ist die 5-Ketogluconsäure ebenfalls ein weiteres Oxidationsprodukt von Glucose und Gluconsäure (siehe Abb. 10). Aus Glucose her kann direkt keine 5-Ketogluconsäure produziert werden. Alle untersuchten Essigsäurebakterienstämme produzierten 5-Ketogluconsäure mit unterschiedlichen Leistungen. In den synthetischen Medien (Abb. 36) produzierten z.B. *A. aceti* var. *aceti* bis zu 9 g/l 5-Ketogluconsäure. *A. aceti* var. *aceti* produzierte in den synthetischen Medien mehr 5-Ketogluconsäure als 2-Ketogluconsäure.

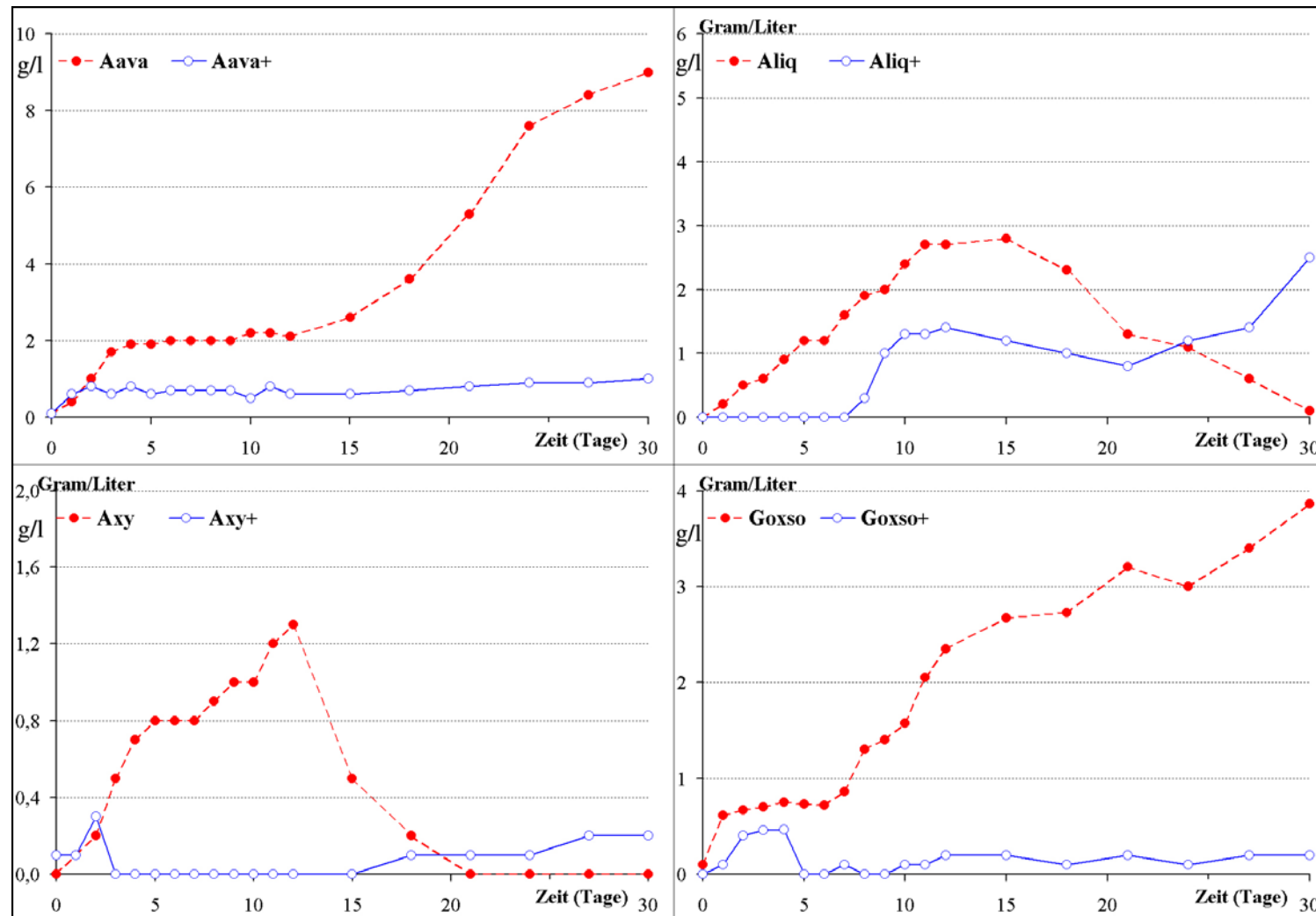


Abb. 36: 5-Ketogluconsäurekonzentrationen in synthetischen Medien mit bzw. ohne CaCO_3 -Zusatz 30 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien

Ähnlich wie mit der 2-Ketogluconsäureproduktion stiegen noch die 5-Ketogluconsäureproduktion in den Traubenbeeren bis zum 15ten Tag nach Beimpfung mit den Essigsäurebakterien an. Lediglich bei *G. oxydans* var. *suboxydans* in den Rotbergerbeeren und bei *A. liquefaciens* in den Rieslingbeeren, nahm sie nach 12 Tage nach der Beimpfung leicht ab.

Die Bildung von 5-Ketogluconsäure in den Traubenbeeren der untersuchten Essigsäurebakterienstämme werden in der Abb. 37 graphisch dargestellt.

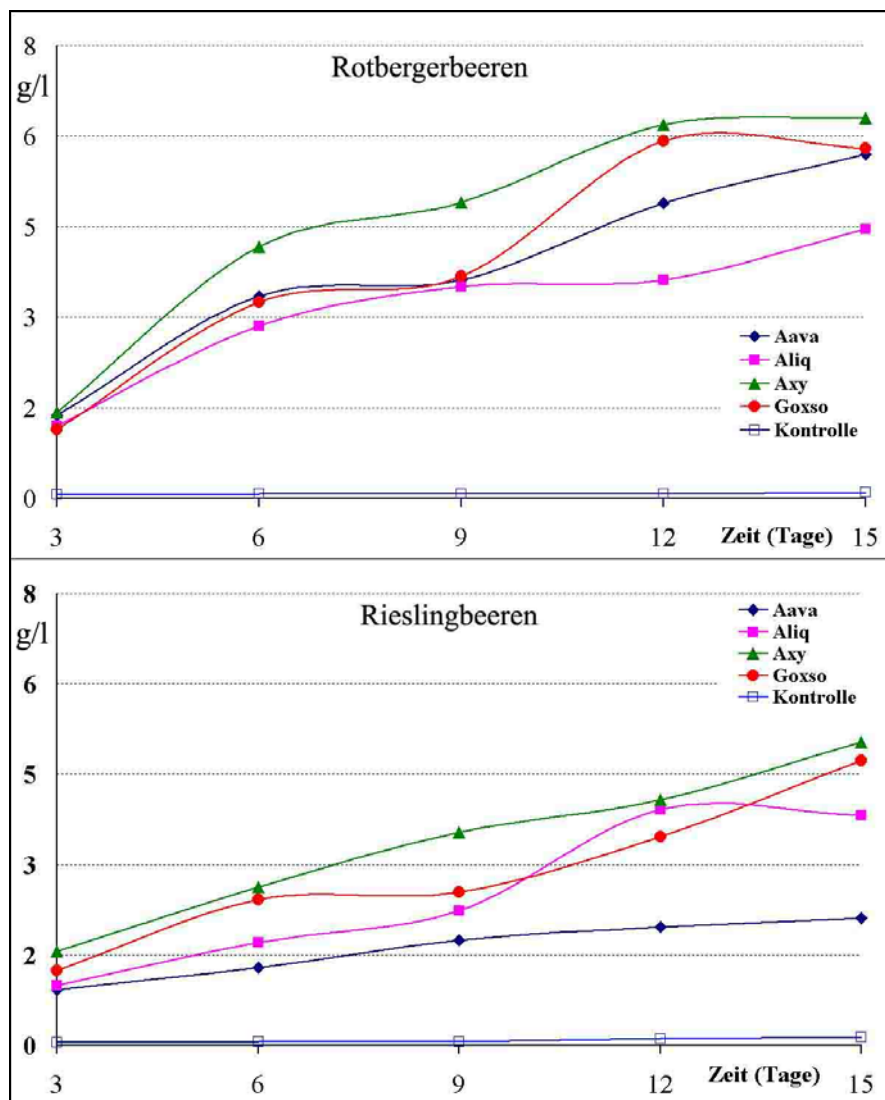


Abb. 37: 5-Ketogluconsäurekonzentrationen in Traubenbeeren der Sorte Rotberger und Riesling während 15tägiger Bebrütung mit Essigsäurebakterien

6.4 2,5-Diketogluconsäure

Auch 2,5-Diketogluconsäure wurde in den Traubenbeeren, Mosten und Weinen gebildet. Wie in den synthetischen Medien wurde in den Traubenbeeren, Mosten und Weinen 2,5-Diketogluconsäure nur von *A. liquefaciens* gebildet. Bei der ersten Untersuchung wurde nach 15 Tagen durch *A. liquefaciens* 186 mg/l 2,5-Diketogluconsäure in dem daraus gepressten roten Most bzw. 293 mg/l in dem weißen aus Traubenbeeren gebildet (Tabelle 6). In den synthetischen Medien wurde bis 3600 mg/l 2,5-Diketogluconsäure durch *A. liquefaciens* produziert (Abb. 31).

Um den Einfluss der Gluconsäurekonzentration auf die weiteren Oxidationsprodukten der Gluconsäure zu untersuchen, wurden synthetische Medien mit verschiedenen Glucose- und Gluconsäurekonzentration eingesetzt. Die Ergebnisse werden in der Abb. 38 dargestellt.

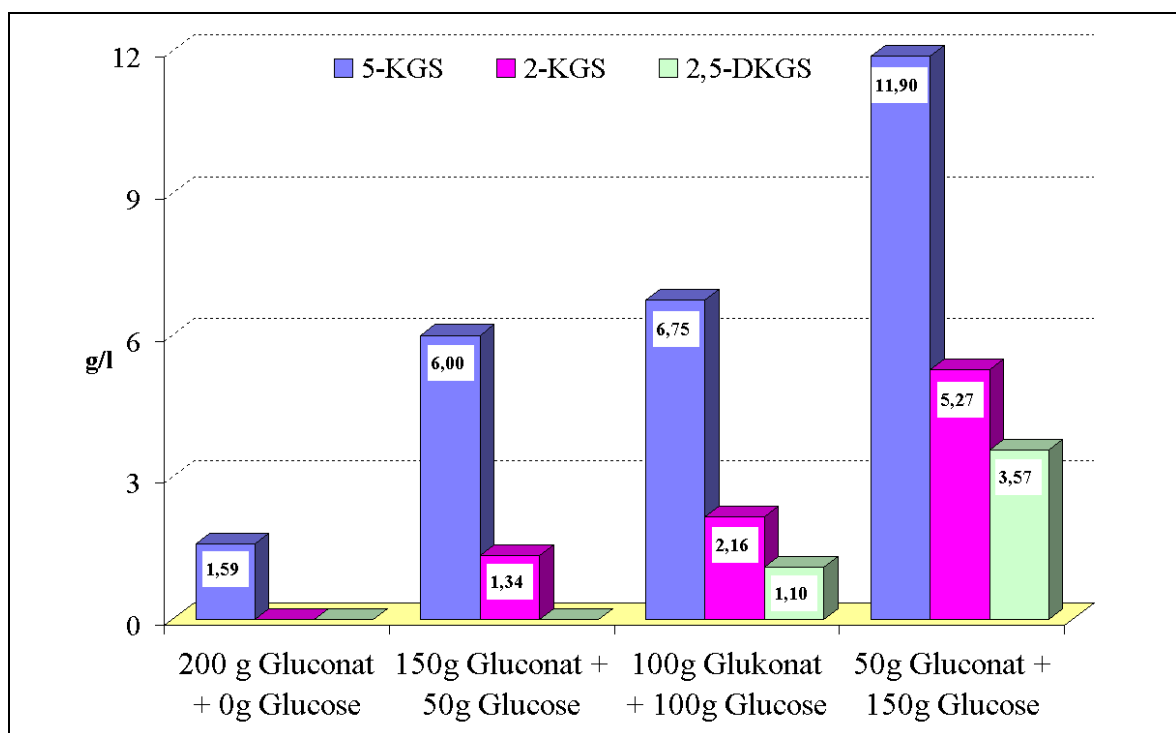


Abb. 38 : Die Bildung von Ketogluconsäuren durch *A. liquefaciens* in synthetischen Medien mit Zusatz verschiedener Konzentrationen von Gluconsäure nach 7 Tagen

Bei fehlen von Zucker als Energielieferant wird nur wenig Gluconat zu 5-Ketogluconsäure umgesetzt. Mit steigendem Glucosegehalt nimmt der 5-Ketogluconsäuregehalt zu. Erst bei sehr hohen Zuckerkonzentrationen werden auch 2-Ketogluconsäure und anschließend aus diesem auch 2,5-Diketogluconsäure gebildet.

6.5 Zusammenhänge zwischen den Ketogluconsäuren

Das Wachstum der Essigsäurebakterien auf den Traubenbeeren drückt sich durch dessen Zuckersäureproduktion aus. Die Bildung größerer Mengen Gluconsäure, 2-Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure stammt nur aus der Glucoseoxidation durch Essigsäurebakterien. Obwohl Schimmelpilze, wie *Botrytis cinerea* Gluconsäure produzieren können, jedoch keine Ketogluconsäuren. Die Kontamination mit Schimmelpilzen war in den Proben nur sehr gering.

Die Abhängigkeit des Gehaltes von 2-Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure vom Gluconsäuregehalt in den Traubenbeeren wird in der Abb. 39 graphisch dargestellt.

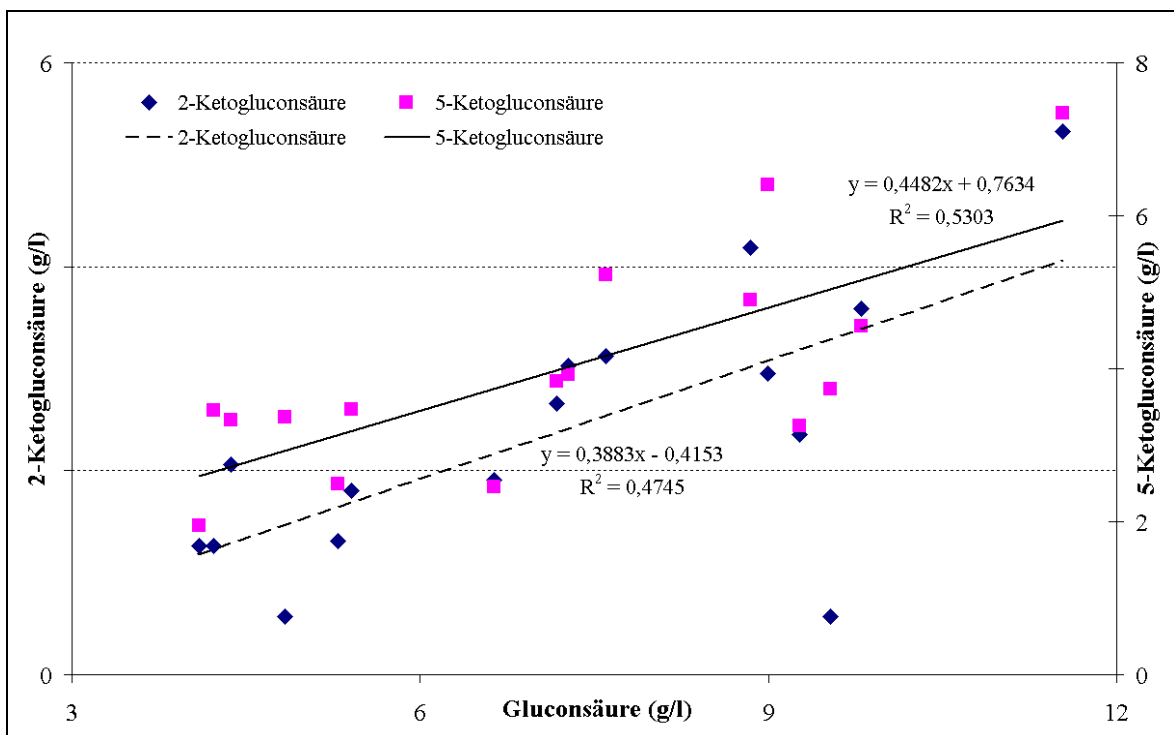


Abb. 39 : Die Abhängigkeit des Gehaltes von 2-Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure vom Gluconsäuregehalt in den Traubenbeeren nach 15tägiger Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien

Graphisch dargestellt zeigt sich, dass sich in den Traubenbeeren nach Beimpfung mit Essigsäurebakterien eine Abhängigkeit des Gehaltes von 2-Ketogluconsäuren bzw. 5-Ketogluconsäure vom Gluconsäuregehalt ergibt. Mit $R^2 = 0,4745$ für 2-Ketogluconsäure

bzw. $R^2 = 0,5303$ für 5-Ketogluconsäure für die lineare Darstellung sind sehr hohe Korrelationen gegeben.

Mit den Ergebnissen konnte es festgestellt werden, dass Essigsäurebakterien die 2- und 5-Ketogluconsäure in Trauben produzieren können. Wenn die Bedingungen dafür gut sind, produzieren sie sogar sehr hohe Konzentrationen.

VII. Untersuchung über Zuckersäurestoffwechselprodukte in Weinen

Erhöhte Gluconsäuregehalte bis zu 3 g/l in tunesischen Rosé- und Rotweinen geben Anlass, die Herkunft der Gluconsäure und der Ketogluconsäuren in diesen zu untersuchen. Es wird behauptet, dass diese hohen Gluconsäurewerte nicht auf eine natürliche Bildung durch Essigsäurebakterien zurückgeführt werden können und dass eine Bildung durch *Botrytis cinerea* wegen des fehlenden Glycerins auszuschließen ist. Folglich kann die hohe Gluconsäuremenge nur durch eine Zugabe von Gluconsäure zur Säuerung erfolgt sein.

Die Ergebnisse der Untersuchung über die Zusammensetzung der Zuckersäuren in tunesischen Rose- und Rotweinen werden in Abb. 40 abgebildet.

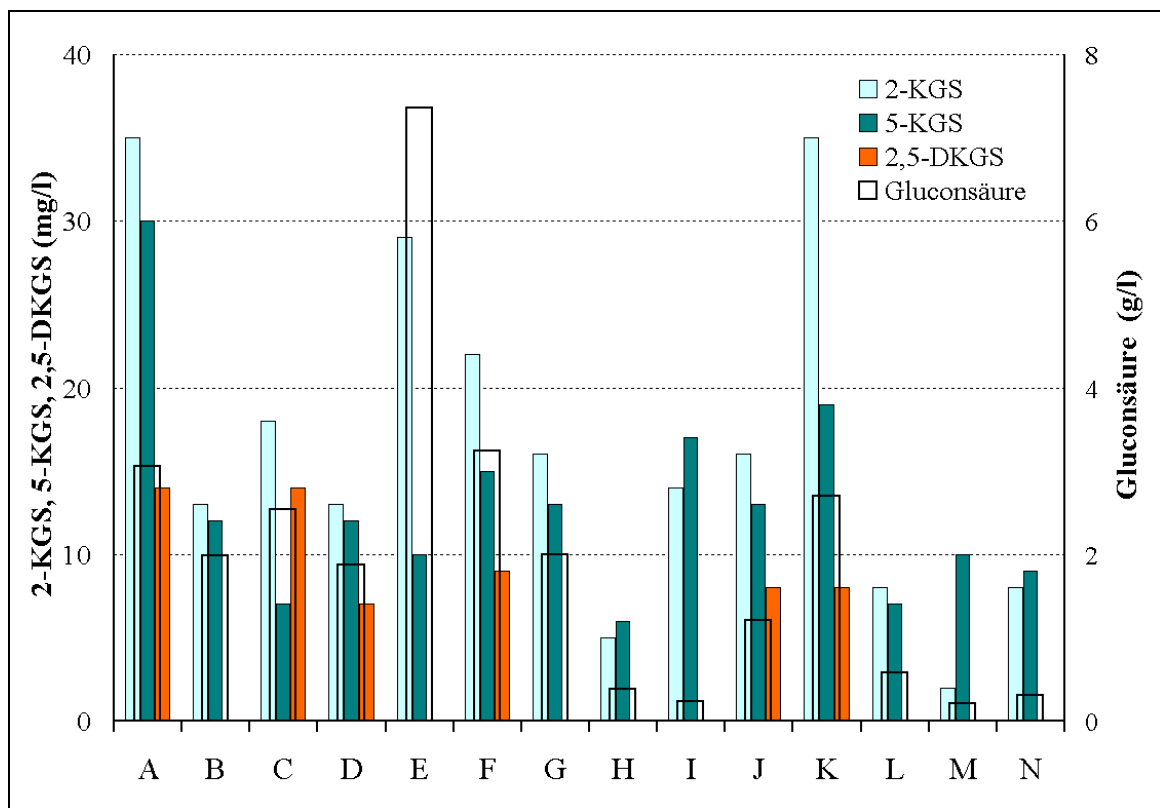


Abb. 40: Zuckersäurezusammensetzung der in tunesischen Rose- und Rotweinen
 A. Edler von Mornag 1990; B. Chateau de Mornag 1990; C. 50483 rosé ;
 D. 50487 rot; E. Edler von Mornag, Konzentrat; F. Edler von Mornag 1990 rosé
 G. Chateau de Mornag 1990 rot; H. Chateau de Hammamet 1979; I. Hauté
 Mornag 1979; J. Chateau de Mornag 1983 Rosé; K. Sidi Saad 1990 süß; L.
 Château de Mornag 1983; M. Domaine de Charme Mornag 1983; N. Edler von
 Mornag 1983

Die Analysenwerte der untersuchten Weine zeigen, dass alle 1990er Weine sehr hohe Gehalte an Gluconsäure aufweisen. Auch Wein J (1983) weist 1,2 g/l auf. Die älteren

Weine von 1979 und 1983 zeigen dagegen deutlich geringere Werte. In allen Weinen sind 2-Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure, in manchen auch 2,5-Diketogluconsäure vorhanden. Diese Substanzen sind alle Stoffwechselprodukte von Essigsäurebakterien aus Zucker. Dabei entstehen die Ketogluconsäuren durch bakterielle Oxidation von Gluconsäure. Glucuronsäure wird ebenfalls von Essigsäurebakterien gebildet, während Galakturonsäure durch die Freisetzung aus dem Pektin der Trauben erfolgt (Sponholz und Dittrich 1985).

Die Bildung von Gluconsäure durch Schimmelpilze ist bei diesen Weinen eher unwahrscheinlich. Neben einer Bildung von Gluconsäure müsste eine Glycerinbildung stattgefunden haben. Holbach und Woller (1976, 1977, zitiert in Würdig und Woller 1989) berichten über hohe Glycerinwerte im Zusammenhang mit Gluconsäurewerten in mit *Botrytis* befallenem Traubengut.

Aus dem Glycerinfaktor lässt sich dieser hohe Gehalt nicht ableiten und nicht berechnen. Das Vorhandensein von Dihydroxyaceton in allen Proben lässt jedoch auf einen Glyceringehalt schon in den Mosten schließen, da auch im Konzentrat bereits Glycerin analysiert wurde, muss zumindest eine Angärung durch Hefen, womöglich schon auf den Trauben, erfolgt sein. *Botrytis cinerea* dürfte unter den trockenen klimatischen Bedingungen in Tunesien nicht vorkommen.

Andere Infektionen mit Schimmelpilzen hätten einen dumpfen, muffigen Geruch der Weine zur Folge. Bei Rotweinen ist dafür Sorge zu tragen, keine stark von Schimmelpilzen infizierten Trauben zu ernten, da mit einem Ausfall des roten Farbstoffes durch die Wirkung der Polyphenoloxidase Laccase, zu rechnen ist.

Es ist daher anzunehmen, dass *Gluconobacter oxydans*, der auf Trauben, vor allem wenn sie verletzt sind, in hohen Mengen vorkommen kann, für die Bildung von Gluconsäure verantwortlich ist. Versuche mit Mosten belegen, dass Stämme von *Gluconobacter oxydans* in der Lage sind, in kurzer Zeit hohe Mengen Gluconsäure aus Glucose zu bilden.

Bei einigen Bakterienarten wird 2-Ketogluconsäure zu 2,5-Diketogluconsäure weiter oxidiert. Diese Oxidationen von Gluconsäure zu 2-Keto- und 2,5-Diketogluconsäure laufen aber erst dann in größerem Maß ab, wenn Glucose kaum noch zur Verfügung steht. Die Oxidationsprodukte von Gluconsäure eignen sich daher zum Nachweis, ob Gluconsäure

ein natürliches Produkt von Essigsäurebakterien ist. Dies besonders deshalb, da *Botrytis cinerea* weder 5-, und 2-Ketogluconsäure noch 2,5-Diketogluconsäure zu bilden vermag (Sponholz und Dittrich 1985).

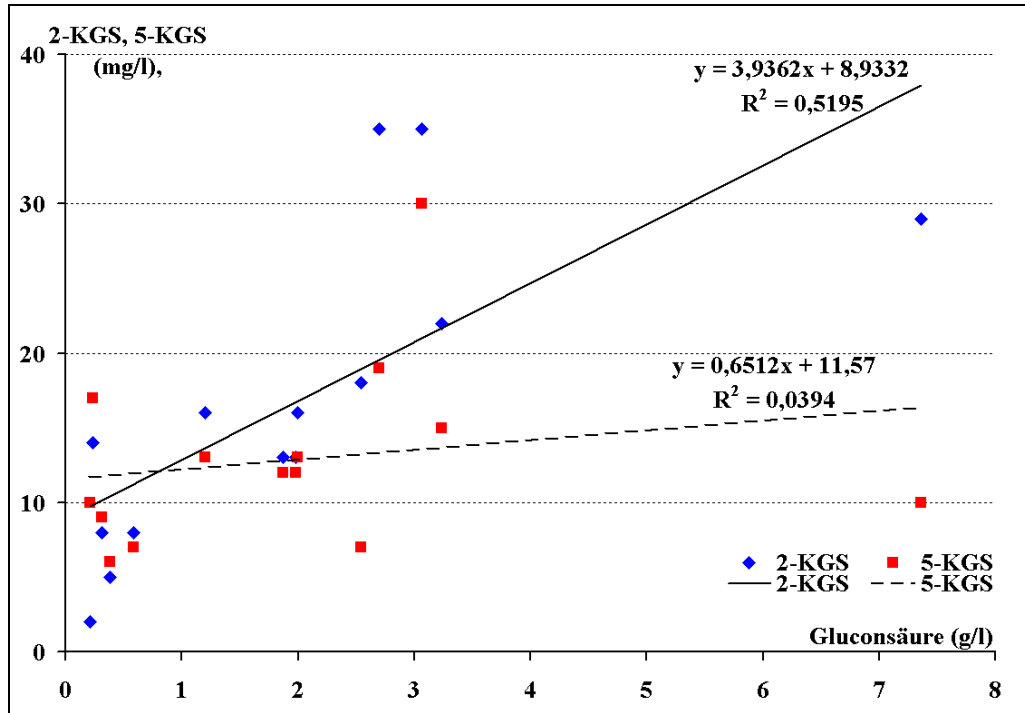


Abb. 41: Die Abhängigkeit des Gehaltes von 2-Ketogluconsäure und 5-Ketogluconsäure vom Gluconsäuregehalt

Graphisch dargestellt zeigt sich, dass sich in den untersuchten Weinen eine Abhängigkeit des Gehaltes von 2-Ketogluconsäuren vom Gluconsäuregehalt ergibt. Mit $R^2 = 0,5195$ für die lineare Darstellung ist eine für biologische Proben sehr hohe Korrelation gegeben (Abb. 41). Betrachtet man die Abhängigkeit der 2,5-Diketogluconsäure von der Gluconsäure, so stellt man fest dass bei allen Proben mit 2,5-Diketogluconsäure noch eine gute Korrelation zur Gluconsäure mit $R^2 = 0,2259$ gegeben ist, obwohl Gluconsäure nicht die direkte Vorstufe ist (Abb. 42). Bei der direkten Vorstufe 2-Ketogluconsäure wird die Korrelation für die 2,5-Diketogluconsäure mit $R^2 = 0,1038$ nur scheinbar schlechter.

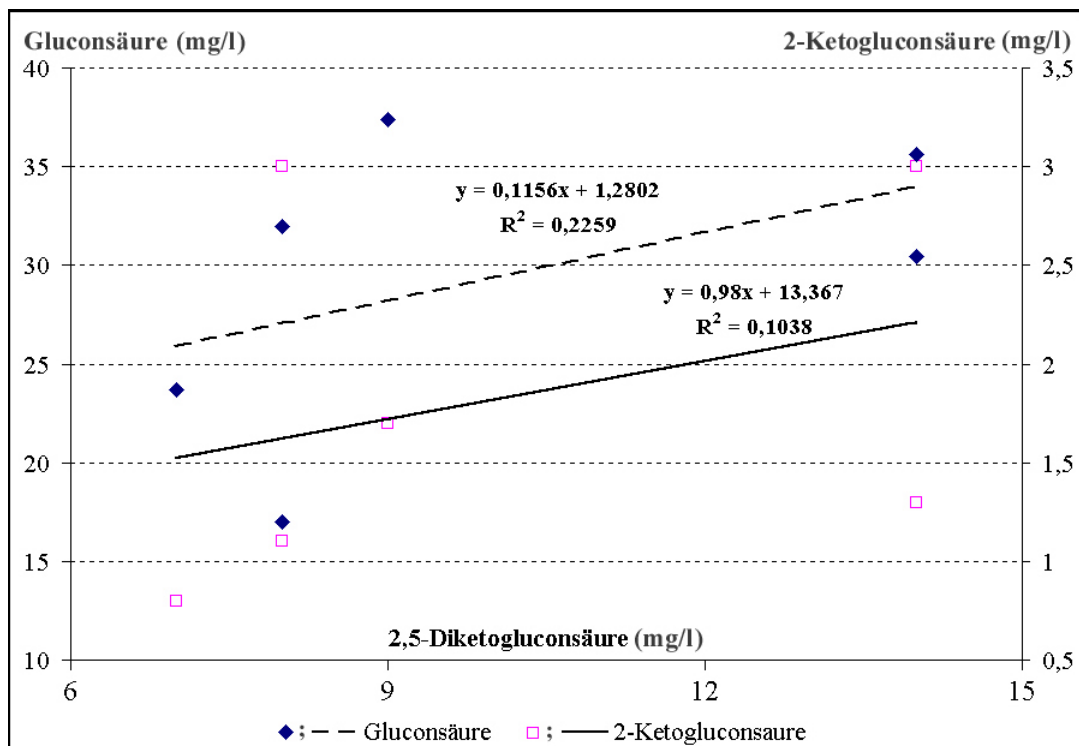


Abb. 42: Die Abhängigkeiten des 2,5-Diketogluconsäure Gehaltes von den Konzentrationen der Gluconsäure und der 2-Ketogluconsäure.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Gluconsäure durch Essigsäurebakterien gebildet wurde, da die Folgeprodukte 2-Ketogluconsäure und 2,5-Diketogluconsäure mit der Gluconsäure hoch korrelieren und ebenfalls die 2,5-Diketogluconsäure mit der 2-Ketogluconsäure. Die Bildung dieser Substanzen durch Essigsäurebakterien ist hiermit eindeutig belegt. Eine andere Herkunft in Mosten und Weinen ist nicht bekannt (Sponholz und Dittrich 1985).

Wenn in den Mosten oder auf den Trauben kein Ethanol vorhanden ist, wird in keinem Falle Essigsäure von Essigsäurebakterien gebildet. Unter heißen Bedingungen kann von Hefen auf Trauben gebildetes Ethanol verdunsten. Je nach Bakterienart und -stamm bilden *Gluconobacter* und *Acetobacter* aus Gluconsäure durch Oxidation 2-Keto- und 5-Ketogluconsäure. Dabei ist zu beachten, dass 5-Ketogluconsäure auch Zwischenprodukt der Weinsäuresynthese bei Trauben ist und somit für eine Beurteilung weniger aussagekräftig.

Essigsäure kann nicht nur von Essigsäurebakterien gebildet werden, sondern ebenso von heterofermentativen Milchsäurebakterien aus Zuckern (Sponholz et al. 1982). Dabei entsteht auch D-Lactat. Auch Hefen bilden während der Gärung Essigsäure.

Dihydroxyaceton ist das Oxidationsprodukt von Glycerin durch Essigsäurebakterien, es wird von Hefen wieder zu Glycerin reduziert (Sponholz et al. 1982). Die Gehalte von Essigsäure, Glycerin und Essigsäure werden in Abb. 43 graphisch dargestellt.

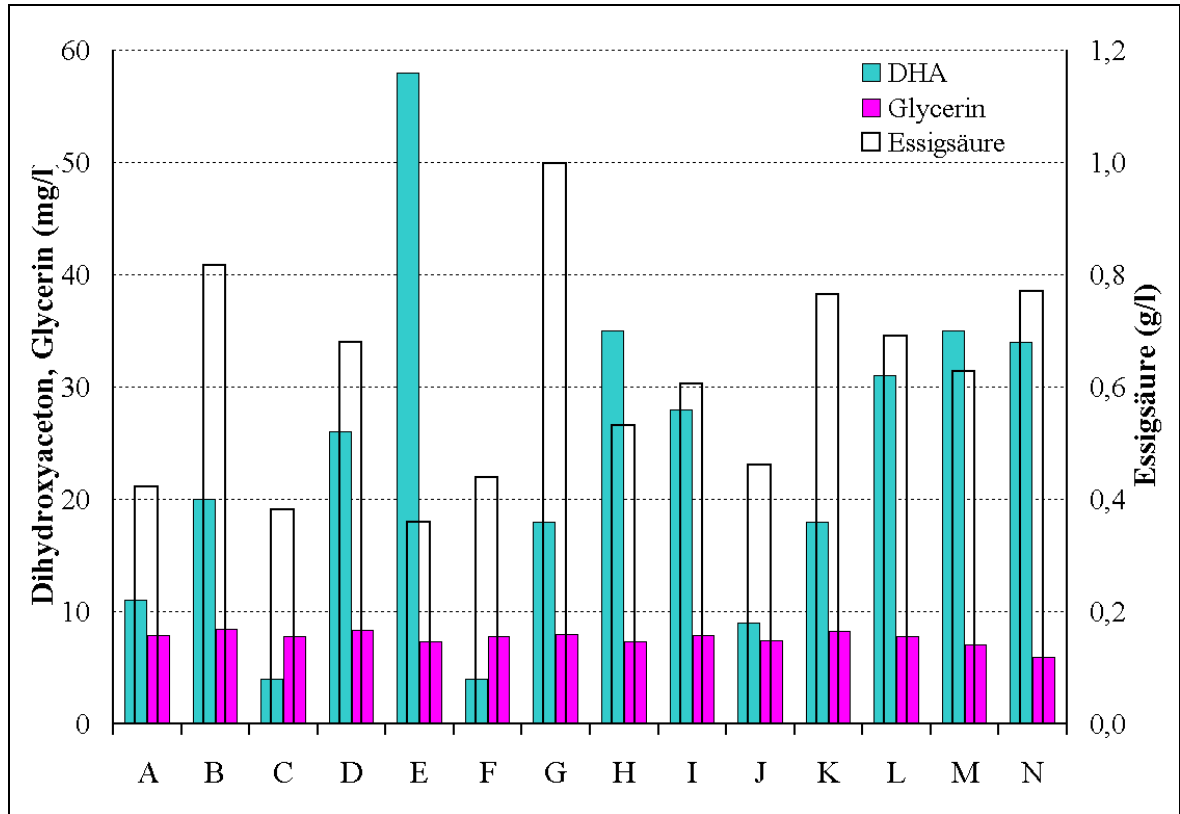


Abb. 43: Dihydroxyaceton-, Glycerin und Essigsäurekonzentrationen in tunesischen Rose- und Rotweinen

A. Edler von Mornag 1990; B. Chateau de Mornag 1990; C. 50483 rosé ;
 D. 50487 rot; E. Edler von Mornag, Konzentrat; F. Edler von Mornag 1990 rosé
 G. Chateau de Mornag 1990 rot; H. Chateau de Hammamet 1979 ; I. Hauté
 Mornag 1979; J. Chateau de Mornag 1983 Rosé ; K. Sidi Saad 1990 süß ; L.
 Château de Mornag 1983; M. Domaine de Charme Mornag 1983; N. Edler von
 Mornag 1983

Die Essigsäure ist mit der Gluconsäure mit $R^2 = 0,1759$ deutlich negativ korreliert. Eine ähnliche Korrelation von $R^2 = 0,0873$ besteht zur 2-Ketogluconsäure (Abb. 43).

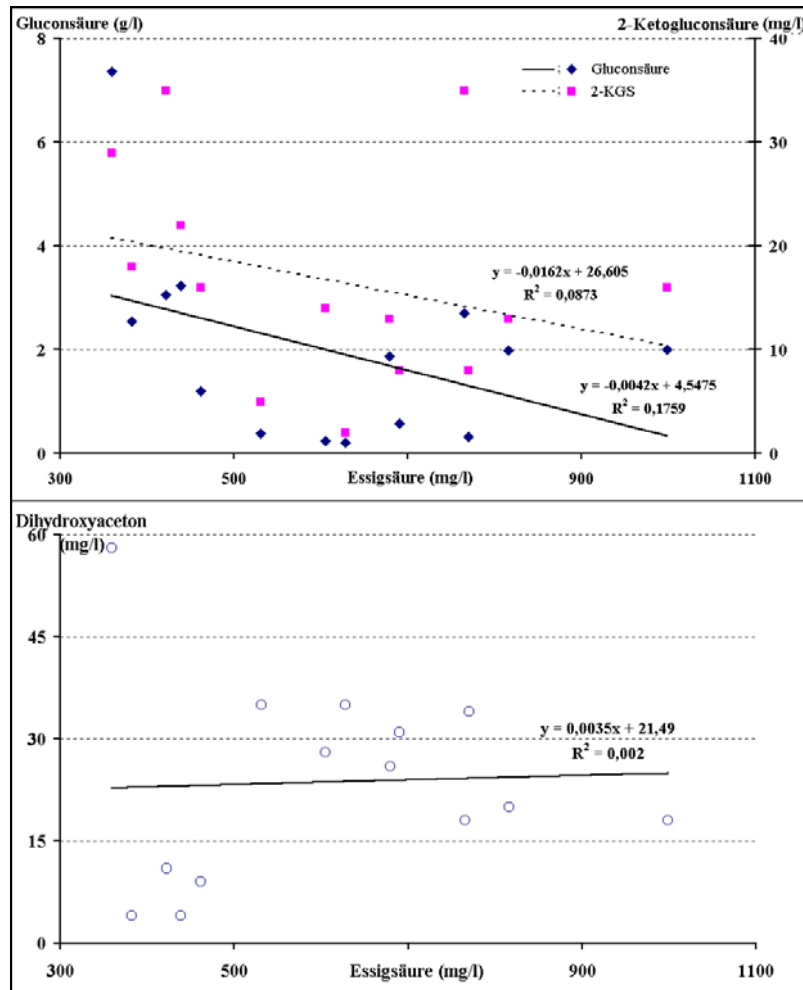


Abb. 44: Die Abhängigkeiten des Essigsäuregehaltes von Gluconsäure und 2-Ketogluconsäure und Essigsäure von Dihydroxyaceton.

Da keine Korrelation zwischen Essigsäure und Dihydroxyaceton besteht, obwohl Dihydroxyaceton durch Essigsäurebakterien aus Glycerin gebildet wird (Abb. 44), muss die Bildung der im Wein vorhandenen Essigsäure von anderen Mikroorganismen stammen. Da alle Weine einen biologischen Säureabbau durchgemacht haben, sollte eine Korrelation zwischen Essigsäure und Milchsäure bestehen und dabei mehr zwischen D-Milchsäure und Essigsäure, da beide von heterofermentativen Milchsäurebakterien in einem Stoffwechselweg aus Glucose gebildet werden. L-Milchsäure entstammt dagegen zum überwiegenden Teil dem Malatabbau.

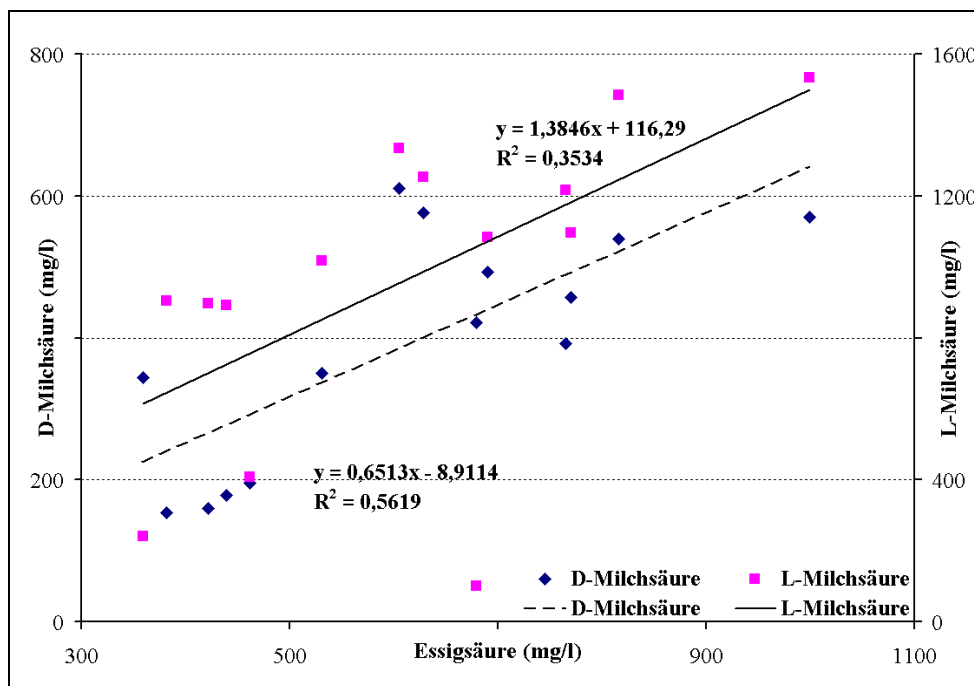


Abb. 45: Die Korrelation zwischen Essigsäure und D- und L-Milchsäure

Wie Abb. 45 zeigt, besteht zwischen D-Milchsäure und Essigsäure mit $R^2 = 0,5619$ eine hochsignifikante Korrelation. Diese gewinnt noch an Bedeutung, wenn man bedenkt dass bereits in Most Essigsäure vorhanden sein kann, und dass sowohl Hefen wie auch Essigsäurebakterien diese bilden können. Bei $R^2 = 0,5619$ kann dieser Einfluss nur gering gewesen sein. Auch die Korrelation zu L-Milchsäure mit $R = 0,3534$ ist unter den geschilderten Bedingungen als hoch anzusehen. Die Essigsäure in den Weinen wurde demnach in wesentlichen Teilen von den Milchsäurebakterien während des biologischen Säureabbaus aus dem Zucker gebildet.

Zwischen Gluconsäure und Dihydroxyaceton besteht keine Korrelation, obwohl beide Substanzen von Essigsäurebakterien gebildet werden. Dieser ist aber verständlich, wenn man bedenkt dass Dihydroxyaceton durch Essigsäurebakterien aus Glycerin gebildet wird aber dieses durch die Hefen während der alkoholischen Gärung wieder zu Glycerin reduziert wird.

Der Einfluss von Mikroorganismen auf den Trauben wird am Konzentrat sehr deutlich. Der Essigsäuregehalt beträgt bereits 359 mg/l und kann aber durch die Konzentrierung beeinflusst sein, da ein Teil der Essigsäure verdampft sein könnte aber das diese durch die Konzentration auch erhöht worden sein kann. 7,3 g/l Glycerin sprechen für eine Angärung

des Mostes, dieses kann teilweise bereits auf der Traube stattgefunden haben. Auch bereits vorhandene geringe Mengen L- und D-Milchsäure sprechen für einen bakteriellen Befall. 58 mg/l Dihydroxyaceton, 29 mg/l 2-Ketogluconsäure und die 7,3 g/l Gluconsäure sind Ausdruck für einen Befall mit Essigsäurebakterien auf den Trauben (Sponholz und Dittrich 1979, 1985).

Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen stammen die hohen Gluconsäurekonzentrationen in den Weinen und im Konzentrat von *Gluconobacter oxydans*. Dieses Bakterium ist auf Trauben häufig und auf verletzten Trauben sehr häufig. Es ist bei der dann hier zu erwartenden hohen Zellzahl in der Lage auf den Trauben aber auch in der Maische, besonders wenn nicht mit Reinzuchthefer angeimpft wurde, sehr schnell Glucose in Gluconsäure umzusetzen. Nur wenige Stunden Standzeit genügen, um unter ungünstigen Bedingungen ein Wachstum und damit den Stoffwechsel von Glucose zu Gluconsäure durchzuführen. Dieses ist besonders dann der Fall, wenn für den biologischen Säureabbau und zur Einsparung von SO₂ bei der Weinbereitung, auch bei mikrobiell hoch belastetem Lesegut, auf eine - wenn auch geringe- Maischeschwefelung verzichtet wird.

Die Herkunft der Gluconsäure in diesen Weinen aus dem Stoffwechsel von Essigsäurebakterien wird durch die hoch signifikanten Beziehungen zwischen Gluconsäure und 2-, und 2,5-Diketogluconsäure belegt. Da die in den Weinen vorhandene Essigsäure hochsignifikant während des biologischen Säureabbaus aus Zucker gebildet wurde, was durch die gleichzeitige Bildung von D-Milchsäure belegt wird, ist auch das vorhandene Dihydroxyaceton aus Mostglycerin entstanden. Das Vorhandensein von Glycerin auch in Mosten wird durch das Konzentrat bestätigt. Dieses zeigt alle relevanten mikrobiellen Stoffwechselprodukte, wie sie auch die Weine zeigen.

Nach allem vorher Gesagtem sind die hohen Gluconsäurewerte auf einen natürlichen Befall der Trauben und der Maische mit *Gluconobacter oxydans* zurückzuführen. Sie sind eine Folge eines ungünstigen Zusammentreffens verschiedener Parameter, die sich summieren und zu diesem Ergebnis führen.

1. Verletzung der Trauben im Weinberg durch meteorologische oder biologische Einflüsse.

2. Wachstum von Mikroorganismen auf den Verletzungsstellen. Hier werden hohe Zellzahlen von Hefen und Bakterien festgestellt.
3. Durch hohe Temperaturen verdunsten die flüchtigen Bestandteile, vor allem Ethanol, daher kommt es zu keinem Essigstich auf der Traube, wie er in feuchtwarmen Klimaten auftreten würde.
4. Lange Standzeiten der Maische, die Vergärung in offenen Behältern und vor allem eine Spontangärung ohne Maischeschwefelung geben den Essigsäurebakterien reichlich Zeit, Gluconsäure und ihre Folgeprodukte zu bilden.

VIII. Zusammenfassung

Es wurden Untersuchungen über die StoffwechsellLeistungen der im Most und Wein vorkommenden Essigsäurebakterien der Gattungen *Acetobacter* (13 Stämme) und *Gluconobacter* (2 Stämme) während der Weinbereitung durchgeführt. Die 15 Stämme der Essigsäurebakterien stammten aus der Sammlung des Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie Forschungsanstalt Geisenheim sowie aus der CCM (Czechoslovak Collection of Microorganisms).

Die StoffwechsellLeistungen, die unter Berücksichtigung des Zucker-Säure-Stoffwechsels beobachtet wurden, wurden bei Trauben der Sorten Riesling, Rotberger, Portugieser und Reichensteiner, den Mosten der Sorten Riesling, Portugieser und Rotberger und den Weißweinen der Sorten Riesling, Müller Thurgau und Rotwein eines Sortengemisches sowie Weiß- und Rotweinen verschiedener Jahrgänge aus Tunesischen Weinanbaugebieten durchgeführt.

Die Essigsäurebakterien wurden auf die Nährböden (Traubenbeeren, Moste und Weine) beimpft und nach festgelegten Zeiten geerntet und analysiert. Die Beimpfung der Traubenbeeren erfolgte durch Besprühen der intakten und angestochenen Beeren mit den Bakterienkulturen.

Im Verlauf der Arbeit wurden verschiedene Analyseverfahren angewandt. Dünnschichtchromatographie wurde für die qualitative Analyse der Zuckersäure eingesetzt. Die Ketozuckersäuren wurde durch Flüssigchromatographie sowie HPLC bestimmt. Außerdem auch für die Bestimmung organischer Säuren, Zucker und Alkohole. Ethanol wurden auch mit Titration nach der Methode von Rebelein bestimmt. Gluconsäure, Essigsäure, Glucose, Fructose, D- und L-Milchsäure sowie Dihydroxyaceton wurden enzymatisch spektrophotometrisch quantifiziert.

Der Vergleich der Ergebnisse von intakten und angestochenen Beeren zeigte, dass bei angestochenen Beeren ein schnelleres Wachstum der Essigsäurebakterien und damit auch höhere StoffwechsellLeistungen erfolgten.

Gluconsäure, 2-Ketogluconsäure, 5-Ketogluconsäure sowie 2,5-Diketogluconsäure können von verschiedenen Essigsäurebakterienstämmen produziert werden. Es scheint so, als ob die verschiedenen Arten der Essigsäurebakterien spezifische Muster der Gluconsäure

Oxidationsprodukte aufweisen. In synthetischen Medien produzierten Essigsäurebakterien große Menge Gluconsäure. Nach 30 Tage produzierten Essigsäurebakterien der Stämme *Acetobacter aceti* var. *aceti*, *A. liquefaciens* Stamm 1347-2, *A. xylinum* und *Gluconobacter oxydans* var. *suboxydans* im Glucosemedium jeweils mehr als 40 g/l Gluconsäure. 5-Ketogluconsäure wurden in allgemein mehr als 2-Ketogluconsäure produziert. Von allen beobachteten Stämmen produzierte nur *A. liquefaciens* 2,5-Diketogluconsäure. Sowohl in den roten- als auch in den weißen Traubenbeeren produzierten sie Gluconsäure und ihre Oxidationsprodukte. In 15 Tagen wurden bis 11,5 g/l Gluconsäure, 5,3 g/l 2-Ketogluconsäure und bis 9,8 g/l 5-Ketogluconsäure produziert.

Das Wachstum der Essigsäurebakterien in den Weinen verlief sehr langsam. In den Weinen wurden von den Essigsäurebakterien nur Essigsäure produziert. Die Produktion von Essigsäure war bei den unterschiedlichen Stämme sehr verschieden. *A. aceti* var. *aceti* produzierte die höchste Konzentration von Essigsäure sowohl bei Rotwein als auch bei Rieslingwein. *A. aceti* var. *aceti* produzierte bis 87 g/l in Rotwein und bis 61 g/l in Rieslingwein

Bei Untersuchungen fertiger Weine wurden außer Gluconsäure auch 2-Ketogluconsäure, 5-Ketogluconsäure und 2,5-Diketogluconsäure gefunden, die auf den Stoffwechsel der Essigsäurebakterien aus Glucose und Gluconsäure zurückgeführt werden müssen. In den untersuchten fertigen Weinen aus Tunesien wurde 0,2 – 7,4 g/l Gluconsäure, 2 – 35 mg 2-Ketogluconsäure, 6 – 30 mg/l 5-Ketogluconsäure und bis 14 mg 2,5-Diketogluconsäure analysiert. Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen stammen die hohen Gluconsäurekonzentrationen in den Weinen von *Gluconobacter oxydans*. Die Herkunft der Gluconsäure in diesen Weinen aus dem Stoffwechsel von Essigsäurebakterien wird durch die hochsignifikanten Beziehungen zwischen Gluconsäure und 2-Ketogluconsäure, sowie 2,5-Diketogluconsäure belegt.

IX. Summary

The occurrence and metabolic performances of acetic acid bacteria of 13 *Acetobacter* and 2 *Gluconobacter* strains during the wine making process was studied. The 15 strains of acetic acid-bacteria were from the collection of the Institute of Microbiology and Biochemistry of the State Research Institute Geisenheim as well as from the source of the CCM (Czechoslovak Collection of Microorganisms).

The metabolic performances under consideration of the sugar acid metabolism were observed in grapes of the varieties Riesling, Rotberger, Portugieser and Reichensteiner and in musts of the varieties Riesling, Portugieser and Rotberger. The white wines were from the varieties Riesling and Müller-Thurgau, the red wine of a variety-mixture, also used were white and red wines of different vintages from the Tunisian wine growing region.

The acetic acid bacteria were inoculated to grape-berries, musts and wines. After defined time intervals they were harvested and analyzed. The inoculation of the grape berries was performed by spraying the culture on the berries. The berries were tapped beforehand, to simulate the injury of berries by insects or mold attack.

A variety of different analytical techniques was employed in this study. Thin Layer Chromatography was put in for qualitative analysis of sugar-acids. The keto sugar acids were determined by Liquid Chromatography as well as HPLC, furthermore the HPLC was used for quantification of the organic acids, sugars and alcohols. Ethanol was measured also by titration by the method of Rebelein. The spectrophotometric enzymatic analysis was used for gluconic acid, acetic acid, glucose, fructose as well as dihydroxyacetone.

When comparing data from intact and tapped berries, a faster growth of the acetic acid-bacteria occurred on the tapped berries and resulted in a higher metabolic performance.

Gluconic acid, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid as well as 2,5-diketogluconic acid can be produced by different strains of acetic acid bacteria. It seems that all strains have the ability to produce a specific pattern of gluconic acid oxidation products. In synthetic media, acetic acid bacteria produce large quantities of gluconic acid. Acetic acid-bacteria of the strains *Acetobacter aceti* var. *aceti*, *A. liquefaciens* strains 1347-2, *A. xylinum* and *Gluconobacter oxydans* var. *suboxydans* produced in a 30 days period in glucose-medium, always more than 40 g/l gluconic acid. 5-ketogluconic acid was normally produced in

higher amounts than 2-ketogluconic acid. From all observed strains only *A. liquefaciens* was able to produce 2,5-diketogluconic acid from glucose and gluconic acid. In all grape-berries, in reds- as also whites the gluconic acid and its oxidation products were produced. In 15 days, acetic acid-bacteria produced 11.5 g/l of gluconic acid, 5.3 g/l of 2-ketogluconic acid and 9.8 g/l of 5-ketogluconic acid on grape berries.

The growth of acetic acid-bacteria in wines was very slow. In wines only acetic acid was produced. The amount of acetic acid production differed from strain to strain. *A. aceti* var. *aceti* produced the highest concentrations of acetic acid in red as well as in Riesling wines. *A. aceti* var. *aceti*. synthesized up to 87 g/l of acetic acid in red wine and up to 61 g/l in Riesling.

By examinations of the wines besides gluconic acid also 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid and 2,5-diketogluconic acid were detected. This can be attributed to the metabolism of glucose and gluconic acid by acetic acid-bacteria. In finished and rejected wines from Tunisia 0.2 – 7.4 g/l of gluconic acid, 2 – 35 mg/l of 2-ketogluconic acid, 6 – 30 mg/l 5-ketogluconic acid and up to 14 mg/l 2,5-diketogluconic acid were analyzed. The results of this examination showed that the high gluconic acid concentrations in those wines were caused by *Gluconobacter oxydans*. That the source of gluconic acid in these wines was from the metabolism of acetic acid-bacteria is proven by the highly significant relationships between gluconic acid, 2-ketogluconic acid as well as 2,5-diketogluconic acid.

Literaturverzeichnis :

- Asai, T. 1968. Acetic acid bacteria, Classification and biochemical activities. University of Tokyo Press. Tokyo
- Baumgart, J. 1990. Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag. Hamburg.
- Beschkov, V., S. Velizarov, L. Peeva. 1995. Some kinetic aspects and modelling of biotransformation of D-Glucose to keto-D-Gluconates. *Bioprocess Engineering* **6**: 301-305
- Boesch, C., J. Trcek, M. Sievers, M. Teuber. 1998. *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* **21**: 220 – 229
- Calull, M., R.M. Marcé, F. Borull. 1992. Determination of carboxylic acid, sugars, glycerol and ethanol in wine and grape must by ion-exchange high performance liquid chromatography with refractive index detection. *J. Chromatogr.* **590**: 215 – 222
- Dellweg, H. 1987. Biotechnologie, Grundlagen und Verfahren. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- De Ley, J. M. Gillis, J. Swings. 1984. Family VI. *Acetobacteraceae* Gillis and De Ley 1980. In: Krieg, N.R. and J.G. Holt (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology volume 1*. Williams & Willkins. Baltimore. London
- De Ley, J., A.J. Stouthamer. 1959. The mechanism and localization of hexonate metabolism in *Acetobacter suboxydans* and *Acetobacter melanogenum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **34**: 171 – 183
- Dittrich, H.H. 1987. *Handbuch der Getränke- Mikrobiologie des Weines*. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart
- Dittrich, H.H. 1989. Die Veränderungen der Beereninhaltsstoffe und der Weinqualität durch *Botrytis cinerea*; Übersichtsreferat. *Die Wein-Wissenschaft* **44**: 105 – 131
- Dittrich, H.H. 1991. Metabolic and technological factors affecting acetic acid production by yeasts during alcoholic fermentation. *Die Wein-Wissenschaft* **46**: 142 – 150
- Dittrich, H.H. 1993. Mikrobiologie des Weines und Schaumweines. In: Dittrich, H.H. (Hrsg.). *Mikrobiologie der Lebensmittel. Getränke*. Behr's Verlag. Hamburg
- Dittrich, H.H., W.R. Sponholz, W. Kast. 1974. Vergleichende Untersuchung von Mosten und Weinen aus gesunden und aus *Botrytis*-infizierten Traubenbeeren. I.

- Säurestoffwechsel, Zuckerstoffwechselprodukte, Leucoanthocyangehalte. *Vitis* **13**: 36 – 49
- Drews, G. 1983. Mikrobiologisches Praktikum. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- Drysdale, G.S., G.H. Fleet. 1988. Acetic acid bacteria in winemaking: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**: 143 – 154
- Eschenbruch, B., H.H. Dittrich. 1986. Stoffbildung von Essigbakterien in Bezug auf ihre Bedeutung für die Weinqualität. *Zentralbl. Mikrobiol.* **141**: 279 – 289
- Euzéby, J.P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: A folder available on the internet. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **47**: 590 – 592
- Fischer, K., H.P. Bipp, D. Bienek, A. Kettrup. 1995. Determination of monomeric sugar and carboxylic acid by ion-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A* **706**: 361 – 373
- Flückiger, J., L. Ettliger. 1977. Glucose metabolism in *Acetobacter aceti*. *Arch. Microbiol.* **114**: 183 – 187
- Franke, I.H., M. Fegan, C. Hayward, G. Leonar, E. Stackebrandt, I.S. Lindsay. 1999. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **49**: 1681–1693
- Gosselé, F., J. Swings, J. De Ley. 1980. A rapid, simple and simultaneous detection of 2-keto-, 5-keto- and 2,5-diketogluconic acids by thin-layer chromatography in culture media of acetic acid bacteria. *Zentralbl. Bakt. Hyg. I. Abt.* **1**: 178 – 181
- Herder. 1995. Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie. Hrsg.: Autoren kollektiv. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. Berlin. Oxford
- Jährg, A., W. Schade. 1993. Mikrobiologie der Gärungs- und Getränkeindustrie. CENA Verlag. Meckenheim
- Joris, K., E.J. Vandamme. 1993. Novel production and application aspect of bacterial cellulose. *Microbiology Europe.* May/June: 27 – 29
- Jucker, W., L. Ettliger. 1985. The inhibition of acetate oxidation by ethanol in *Acetobacter aceti*. *Arch. Mikrobiol.* **143**: 283 – 289
- Kleber, H.P., D. Schlee. 1988. Biochemie II. Gustav Fischer Verlag. Jena

- Kondo, T., T. Ikeda. 1999. An electrochemical method for the measurements of substrate-oxidizing activity of acetic acid bacteria using a carbon-paste electrode modified with immobilized bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 664 – 668
- Lambert B., K. Kersters, F. Gossele, J. Swings, J. De Ley J. 1981. *Gluconobacters* from honey bees. *Antonie Van Leeuwenhoek* 47:147-57
- Lisdiyanti, P., H. Kawasaki, T. Seki, Y. Yamada, T. Uchimura, K. Komagata. 2000. Systematic study of the genus *Acetobacter* with description of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **46**: 147 – 165
- Liu, C.H., W.H. Hsu, F.L. Lee, C.C. Liao. 1996. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, haipao and their interactions during haipao fermentation. *Food Microbiology* **13**: 407 – 415
- Olijve, W., J.J. Kok. 1979a. An Analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Arch. Microbiol.* **121**: 283 – 290
- Olijve, W., J.J. Kok. 1979b. An analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures. *Arch. Microbiol.* **121**: 291 - 297
- Passmore, S.M., J.G. Carr. 1975. The ecology of the acetic acid bacteria with particular reference to their cider manufacture. *Journal of Applied Bacteriology* **38**: 151 – 158
- Periadnadi. 1996. Versuche zur Trennung von Zuckersäure und andere organischen Säure auf OAHY Polymer Säule. Jahresbericht (Unveröffentlicht)
- Rebelein, H. 1973. Schnellverfahren zur Bestimmung des Alkohol-, Zucker-, und Gesamt-SO₂-Gehaltes (durch Destillation) in Wein und Fruchtsäften, sowie des Blutalkoholgehaltes. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **2**: 112 – 121
- Ross, P., R. MaGyer, M. Benziman. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews* **55**: 35 – 58
- Schwarzenbach, R. 1982. High performance liquid chromatography of Carboxylic Acids. *J. Chromatogr.* **251**: 339 – 358
- Schlegel, H.G. 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. New York
- Shinagawa E, K. Matsushita, O. Adachi, M. Ameyama. 1984. D-gluconate dehydrogenase, 2-keto-D-gluconate yielding, from *Gluconabacter dioxyaceticus*: Purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1517 – 1522

- Sievers, M., S. Sellmer, M. Teuber. 1992. *Acetobacter europaeus* sp. Nov., a main component of industrial vinegar fermenters in central europa. Syst. Appl. Microbiol. **15**: 386 – 392
- Sievers, M., M. Teuber. 1995. The microbiology and taxonomy of *Acetobacter europaeus* in commercial vinegar production. J. Appl. Bacteriol. **79**: 84 – 95
- Sinner, M., J. Puls. 1978. Non-corrosive dye reagent for detection of reducing sugars in borate-complex ion-exchange chromatography. J. Chromatogr. **156**: 197 – 204
- Sokollek, S.J., C. Hertel, W.P. Hammes. 1998. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. Int. J. Sys. Bacteriol. **48**: 935 – 940
- Sponholz, W.R. 1992. Spoilage by Microorganism. In: Fleet, G.H. (Hrsg.). Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers. Switzerland
- Sponholz, W.R. 1989. Der Traubenmost. In: Würdig und Woller. Chemie des Weines. Ulmer Verlag. Stuttgart
- Sponholz, W.R. 1990. Analytik von Galacturonsäure und anderen Ketozuckersäuren in Pflanzenmaterial. GIT Fachz. Lab **2**: 107 – 116
- Sponholz, W.R., H.H. Dittrich. 1979. Analytische Vergleiche von Mosten und Weinen aus gesunden und essigstichigen Traubenbeeren. Wein Wiss. **34**: 279 – 292
- Sponholz, W.R., H.H. Dittrich. 1984. Über das Vorkommen von Galacturon- und Glucuronsäure sowie 2- und 5-Oxo-Gluconsäure in Weinen, Sherries, Obst- und Dessertweinen. Vitis **23**: 214 – 224
- Sponholz, W.R., H.H. Dittrich. 1985. Über die Herkunft von Gluconsäure, 2- und 5- Oxo-Gluconsäure sowie Glucuron- und Galacturonsäure in Mosten und Weinen. Vitis **24**: 51 – 58
- Sponholz, W.R., H.H. Dittrich. 1986. Flüchtige Fettsäuren in Weine verschiedener Qualitätsstufen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **183**: 344 – 347
- Sponholz, W.R., H.H. Dittrich, A. Barth 1982. Über die Zusammensetzung essigstichiger Weine. Deutscher Lebensmittel Rundschau **78**: 423 – 428
- Sponholz, W.R., B. Wünsch. 1980. Enzymatische Bestimmung von Dihydroxyaceton in Gegenwart von Glycerin. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **171**: 178 – 197
- Swings, J. 1992. The Genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer (Hrsg.). The Prokaryotes. 2. Ausgabe: 2268 – 2286. Springer-Verlag. Berlin. New York

- Unger, K.K. 1989. Handbuch der HPLC. Teil 1: Leitfaden für Anfänger und Praktiker. GIT Verlag. Darmstadt.
- Weenk, G., W. Olijve, W. Harder. 1984. Ketogluconate formation by *Gluconobacter* species. Appl. Microbiol. Biotechnol. **20**: 400 – 405
- Yamada, Y. 2000. Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al. 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. **50**: 2225 – 2227
- Yamada, Y., K. Katsura, H. Kawasaki, Y. Widyastuti, S. Saono, T. Seki, T. Uchimura, K. Komagata. 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. **50**: 823 –829

Anhang

Tabelle A-1: Gluconsäure-, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäurekonzentrationen in Traubenbeeren (g/l) 15 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien

	Gluconsäure				2-Ketogluconsäure				5-Ketogluconsäure			
	Angestochene Beeren		Normale Beeren		Angestochene Beeren		Normale Beeren		Angestochene Beeren		Normale Beeren	
	Rot	Weiß	Rot	Weiß	Rot	Weiß	Rot	Weiß	Rot	Weiß	Rot	Weiß
Aava	7,6	8,8	5,3	4,2	3,1	4,2	1,3	1,3	5,2	4,9	2,5	3,5
Aliq	9,0	9,8	6,6	7,2	3,0	3,6	1,9	2,7	6,4	4,6	2,5	3,8
Axy	9,3	9,5	4,8	4,4	2,4	0,6	0,6	2,1	3,2	3,7	3,4	3,3
Goxso	7,3	11,5	4,1	5,4	3,0	5,3	1,3	1,8	3,9	7,3	1,9	3,5

Tabelle A-2: Zuckersäurekonzentrationen in synthetischen Medien nach 30 Tage Beimpfung mit Essigsäurebakterien

Nr.		Gluconsäure (g/l)			2-KGS (mg/l)			5-KGS (mg/l)			2,5-DKGS (mg/l)		
		G	F	G+F	G	F	G+F	G	F	G+F	G	F	G+F
1	Aava	54,2	3,1	26,1	3177,0	3400,0	889,0	96,0	147,4	57,7	n.n.	n.n.	n.n.
2	Aavx	5,3	0,9	5,0	738,0	1536,0	192,5	69,2	255,0	18,5	n.n.	n.n.	n.n.
3	Ar	23,4	0,7	12,6	184,2	166,4	273,5	29,1	108,7	34,3	n.n.	n.n.	n.n.
4	Axy	25,0	0,4	31,9	23,3	305,0	342,0	0,0	22,7	42,0	n.n.	n.n.	n.n.
5	Goxso	38,4	1,0	38,8	181,0	203,0	29,4	19,0	26,0	150,0	n.n.	n.n.	n.n.
6	1347-2	1,7	0,4	6,0	566,0	369,0	166,0	43,0	61,8	115,0	1500,0	385,0	512,0
7	1348-1	0,0	0,7	1,3	842,8	92,1	1029,0	988,4	52,3	100,0	3678,0	n.n.	n.n.
8	1348-2	48,6	1,3	14,0	29,0	623,5	53,0	29,0	128,6	178,0	n.n.	n.n.	n.n.

G : 100/l Glucose; F : 100 g/l Fructose; G+F : 50 g/l Glucose + 50 g/l Fructose

Tabelle A-3: Das Populationswachstum der Essigsäurebakterien in synthetischen Medien pH 4 und pH 5, Most und Wein 15 Tage nach der Beimpfung

Tage	pH-4 (x 10 ⁶)				pH-5 (x 10 ⁶)				Most (x 10 ⁵)				Wein (x 10 ⁵)			
	Aava	Aliq	Axy	Goxso	Aava	Aliq	Axy	Goxso	Aava	Aliq	Axy	Goxso	Aava	Aliq	Axy	Goxso
0	0,5	3,3	1,1	0,9	0,5	3,3	1,1	0,9	0,5	3,3	1,1	0,9	4,9	33,0	10,9	0,9
1	0,1	1,6	0,7	0,1	0,3	2,0	0,8	0,4	0,3	1,1	0,7	0,5	0,1	7,4	2,6	0,2
2	0,1	1,4	0,6	0,2	0,7	3,9	0,8	1,9	0,3	1,6	1,2	0,5	0,0	2,1	0,1	0,1
3	0,9	3,3	0,6	0,3	2,1	7,4	1,1	4,2	0,4	2,7	1,3	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0
4	5,2	7,4	1,0	2,5	10,2	11,4	2,0	15,0	0,7	4,6	1,8	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0
5	5,1	6,9	4,2	11,9	6,8	5,4	6,0	38,0	0,7	5,3	1,8	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0
6	3,0	3,9	2,9	7,9	3,0	3,7	3,5	16,7	1,9	5,4	2,5	2,3	0,0	0,0	0,0	0,1
7	1,0	1,4	1,5	5,8	1,8	2,2	1,2	11,0	2,4	6,2	2,6	3,6	0,0	0,0	0,0	0,1
8	0,3	0,3	0,9	6,1	1,2	2,4	0,6	9,9	3,6	8,2	3,2	3,9	0,1	0,1	0,0	0,0
9	0,2	0,2	0,4	4,0	1,1	1,8	0,4	6,4	6,1	10,6	4,4	5,4	0,1	0,1	0,0	0,0
10	0,2	0,1	0,2	3,0	0,7	0,8	0,2	5,1	7,4	18,4	6,2	6,5	0,2	0,1	0,1	0,0
11	0,1	0,1	0,2	2,4	0,6	0,4	0,2	5,0	8,9	19,0	8,8	10,2	0,2	0,1	0,1	0,1
12	0,1	0,1	0,1	1,1	0,4	0,1	0,1	3,2	8,9	15,4	10,1	12,3	0,2	0,1	0,0	0,1
13	0,1	0,0	0,1	0,7	0,2	0,1	0,1	2,3	8,5	16,6	11,4	10,3	0,2	0,2	0,0	0,1
14	0,1	0,0	0,0	0,5	0,2	0,1	0,0	1,9	7,8	14,8	8,2	9,7	0,2	0,1	0,1	0,0
15	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	2,2	7,5	9,5	8,3	8,7	0,8	0,1	0,2	0,0

Tabelle A-4: Gluconsäure-, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäure-Konzentration in synthetischen Medien nach 30 Tage nach Beimpfung mit *A. aceti* var. *aceti*

Tage	2-KGS		5-KGS		Gluconsäure	
	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃
0	0,2	0,2	0,1	0,1	4,7	3,4
1	0,5	0,7	0,4	0,6	7,7	7,4
2	1,0	0,8	1,0	0,8	18,8	8,1
3	1,1	0,8	1,7	0,6	27,3	9,7
4	1,1	1,1	1,9	0,8	28,3	11,7
5	1,1	1,2	1,9	0,6	29,3	12,9
6	1,1	1,3	2,0	0,7	29,6	13,0
7	1,1	1,3	2,0	0,7	29,6	13,2
8	1,2	1,4	2,0	0,7	30,8	14,2
9	1,2	1,5	2,0	0,7	30,1	14,4
10	1,2	1,6	2,2	0,5	30,1	14,7
11	1,2	1,7	2,2	0,8	30,7	15,1
12	1,5	1,7	2,1	0,6	31,0	15,5
15	1,9	2,1	2,6	0,6	31,5	15,8
18	2,8	2,6	3,6	0,7	34,5	17,8
21	3,2	2,8	5,3	0,8	36,1	18,8
24	4,0	2,7	7,6	0,9	39,1	19,4
27	4,7	2,7	8,4	0,9	41,4	20,9
30	4,6	2,1	9,0	1,0	41,7	18,5

Tabelle A-5: Gluconsäure-, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäure-Konzentration in synthetischen Medien nach 30 Tage nach Beimpfung mit *A. liquefaciens*

Tage	2-KGS		5-KGS		Gluconat	
	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃
0	0,2	0,1	0,0	0,0	1,5	3,6
1	1,1	0,1	0,2	0,0	2,1	6,0
2	1,2	0,0	0,5	0,0	2,2	7,3
3	1,6	0,0	0,6	0,0	2,4	7,3
4	2,0	0,0	0,9	0,0	3,3	7,3
5	2,3	0,0	1,2	0,0	4,9	7,4
6	2,4	0,0	1,2	0,0	6,0	7,9
7	2,5	0,1	1,6	0,0	7,9	8,7
8	3,9	0,1	1,9	0,3	9,4	9,0
9	4,0	0,1	2,0	1,0	10,5	8,5
10	3,8	0,1	2,4	1,3	11,0	8,5
11	4,1	0,1	2,7	1,3	11,0	9,3
12	4,0	0,1	2,7	1,4	11,2	9,9
15	4,0	0,1	2,8	1,2	12,2	10,3
18	3,9	0,2	2,3	1,0	14,7	12,7
21	4,2	0,2	1,3	0,8	18,1	13,4
24	4,1	0,3	1,1	1,2	19,0	14,5
27	4,4	0,2	0,6	1,4	20,0	14,2
30	5,3	0,4	0,1	2,5	20,4	13,4

Tabelle A-6: Gluconsäure-, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäure-Konzentration in synthetischen Medien nach 30 Tage nach Beimpfung mit *A. xylinum*

Tage	2-KGS		5-KGS		Gluconat	
	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃
0	0,2	0,1	0,0	0,1	2,1	2,5
1	0,8	0,2	0,1	0,1	10,3	3,9
2	0,6	0,4	0,2	0,3	18,4	5,3
3	1,1	0,6	0,5	0,0	19,5	6,0
4	0,9	0,6	0,7	0,0	21,9	6,0
5	1,3	1,1	0,8	0,0	26,9	6,4
6	1,5	1,3	0,8	0,0	30,3	6,5
7	1,8	1,7	0,8	0,0	31,9	6,6
8	1,8	2,0	0,9	0,0	33,0	6,0
9	1,8	1,6	1,0	0,0	34,9	5,3
10	2,0	1,6	1,0	0,0	35,4	5,0
11	1,9	1,4	1,2	0,0	36,1	4,4
12	3,7	1,4	1,3	0,0	37,2	3,5
15	5,7	1,3	0,5	0,0	38,1	3,3
18	9,5	0,5	0,2	0,1	39,2	2,3
21	15,0	0,2	0,0	0,1	44,0	1,6
24	17,9	0,3	0,0	0,1	47,3	1,5
27	21,7	0,4	0,0	0,2	51,1	1,3
30	24,5	0,4	0,0	0,2	54,8	0,0

Tabelle A-7: Gluconsäure-, 2-Ketogluconsäure- und 5-Ketogluconsäure-Konzentration in synthetischen Medien nach 30 Tage nach Beimpfung mit *G. oxydans* var. *suboxydans*

Tage	2-KGS		5-KGS		Gluconat	
	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃	ohne CaCO ₃	mit CaCO ₃
0	0,2	0,1	0,0	0,0	1,5	1,8
1	0,3	0,8	0,0	0,0	4,2	10,7
2	0,6	0,5	0,0	0,0	9,9	16,5
3	0,6	0,6	0,3	0,0	11,0	17,4
4	0,7	0,7	0,0	0,0	11,1	16,9
5	0,9	1,1	0,0	0,0	13,5	16,4
6	0,9	0,8	0,0	0,0	15,2	17,1
7	0,8	1,0	0,0	0,0	20,7	17,2
8	0,7	1,2	0,0	0,0	23,4	16,9
9	1,0	1,3	0,0	0,0	29,1	16,7
10	1,9	1,6	1,0	0,0	32,8	16,4
11	1,4	3,7	0,5	0,0	32,1	15,0
12	1,7	4,5	0,6	0,0	34,2	15,6
15	1,8	4,2	0,5	0,0	33,4	14,7
18	9,1	5,9	0,0	0,0	35,8	15,1
21	13,0	6,1	0,0	0,0	38,3	9,7
24	16,7	7,5	0,0	0,0	40,7	12,7
27	20,8	7,1	0,0	0,0	45,4	13,2
30	18,5	6,0	0,0	0,0	51,9	4,0

Tabelle A-8: Die Bildung von Essigsäure durch verschiedene Essigsäurebakterien in Rotwein und Rieslingwein

Tage	Aava-Rot	Axy-Rot	Goxso-Rot	Aliq-Rot	Aava-Weiss	Axy-Weiss	Goxso-Weiss	Aliq-Weiss
0	0,41	0,41	0,41	0,41	0,21	0,21	0,21	0,21
3	0,61	0,66	0,33	0,48	0,33	0,32	0,68	0,74
6	1,17	0,78	0,27	0,89	1,15	0,35	1,25	1,36
9	3,12	1,53	0,47	1,14	1,95	1,21	1,06	1,11
12	3,30	1,59	3,15	2,23	2,99	1,07	0,34	2,15
15	6,60	4,87	4,28	4,46	5,71	1,86	0,98	3,89
21	24,90	19,57	14,5	15,64	14,73	4,58	3,64	11,59
28	53,00	30,42	18,54	24,03	26,34	18,24	11,09	16,17
35	67,82	41,65	24,07	30,18	41,38	31,44	18,12	27,62
42	76,20	45,89	32,95	40,65	49,68	43,79	32,95	35,24
49	79,30	49,56	42,65	59,96	56,95	46,71	40,69	46,55
56	87,08	57,37	46,82	62,55	60,9	49,38	44,98	52,89
63	84,58	57,59	48,72	65,24	59,87	50,26	44,98	54,09
70	85,07	58,78	49,31	66,26	60,89	50,54	44,98	54,58

Tabelle A-9: Dihydroxyaceton (g/l) in synthetischen Medien

		Ohne Ethanol		Mit Ethanol	
		5	40	5	40
Nr.	Bakterien	A-1	A-2	B-1	B-2
1	Aava	0,280	0,542	0,086	0,000
2	Goxso	0,268	0,411	0,044	0,210
3	1347-2	0,110	0,542	0,136	0,131
4	1348-1	0,276	0,551	0,052	0,096
5	1348-2	0,273	0,560	0,227	0,284

Zusammensetzung von Medien :

- 25 g/l Glucose
- 25 g/l Fructose
- 10 g/l Glycerin
- 10 % (v/v) Ethanol
- 10 g/l Hefeekstrakt

A-1 = Glycerin ohne Ethanol, 5 Tage

A-2 = Glycerin ohne Ethanol, 40 Tage

B-1 = Glycerin + Ethanol, 5 Tage

B-2 = Glycerin + Ethanol, 40 Tage

Tabelle A-10 : Zusammensetzung der tunesischen Rose- und Rotweine

Nr.	Probe	Glucon- säure (g/l)	2-KGS (mg/l)	5-KGS (mg/l)	2,5- DKGS (mg/l)	Glucoron- säure (mg/l)	Galactu- ronsäure (mg/l)	Essig- säure (g/l)	DHA (mg/l)	Glycerin (g/l)	D-Lactat (g/l)	L-Lactat (g/l)
1	Edler von Mornag 1990	3,06	35	30	14	14	288	422	11	7,9	0,16	0,90
2	Chateau de Mornag 1990	1,98	13	12	0	0	324	816	20	8,4	0,54	1,49
3	50483 rosé	2,55	18	7	14	0	67	382	4	7,8	0,15	0,90
4	50487 rot	1,87	13	12	7	6	355	679	26	8,3	0,42	0,10
5	Edler von Mornag, Konzentrat	7,36	29	10	0	7	112	359	58	7,3	0,34	0,24
6	Edler von Mornag 1990 rosé	3,24	22	15	9	0	171	439	4	7,8	0,18	0,89
7	Chateau de Mornag 1990 rot	2,00	16	13	0	3	302	999	18	8,0	0,57	1,53
8	Chateau de Hammamet 1979	0,38	5	6	0	12	198	531	35	7,3	0,35	1,02
9	Hauté Mornag 1979	0,23	14	17	0	6	389	605	28	7,9	0,61	1,34
10	Chateau de Mornag 1983 Rosé	1,20	16	13	8	9	279	462	9	7,4	0,20	0,41
11	Sidi Saad 1990 süß	2,70	35	19	8	4	385	765	18	8,2	0,39	1,22
12	ChateaudMornag 1983	0,58	8	7	0	4	250	690	31	7,8	0,49	1,08
13	Domaine de Charme Mornag 1983	0,21	2	10	0	0	463	628	35	7,0	0,58	1,25
14	Edler von Mornag 1983	0,31	8	9	0	0	300	770	34	5,9	0,46	1,10

Lebenslauf

- Persönliche Daten : Periadnadi
Geboren am 25.07.1959 in Malampah Bonjol, Indonesien
- 1966 - 1968 : Grundschule in Malampah Bonjol
- 1969 - 1971 : Grundschule in Rumbai Pekanbaru
- 1972 - 1974 : Sekolah Menengah Pertama(Mittelschule)
in Rumbai Pekanbaru
- 1975 - 1977 : Sekolah Menengah Atas (Oberschule)
in Bukittinggi
- 1978 - 1985 : Studium Biologie an der Andalas-Universität Padang
- 1981 : Vordiplom Biologie (Sarjana Muda Biologi) in Fachrichtung
Mikrobiologie
- 1985 : Diplom Biologie (Sarjana Biologi) in Fachrichtung
Mikrobiologie
- Seit 1985 : Dozent an der Andalas-Universität Padang
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaft
- Seit 1991 : beschäftigt im Fachbereich Mikrobiologie und Biochemie
der Forschungsanstalt Geisenheim mit dem Ziel Promotion
- Seit 1992 : Doktorand an der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main, Fachbereich Biologie

Danksagung

Ich möchte am Ende dieser Arbeit all jenen, die zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben, ein herzliches Dankeschön sagen.

Herrn Prof. Dr. M. Brendel, Institut für Mikrobiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, möchte ich für die Durchführung des Promotionsverfahrens danken. Ich danke ihm insbesondere für die Betreuung und Begutachtung meiner vorliegenden Arbeit.

Einen besonders herzlichen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. W.-R. Sponholz, Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie der Forschungsanstalt Geisenheim, für die intensive Betreuung, Begutachtung, für seine allzeit gewährte Unterstützung, für die intensiven und konstruktiven Diskussionen und für die Hilfe bei allen auftretenden Problemen, aussprechen.

Herrn Prof. Dr. M. Großmann, Leiter des Fachgebietes Mikrobiologie und Biochemie der Forschungsanstalt Geisenheim, danke ich insbesondere für die verständliche Unterstützung und die Bereitstellung der Arbeitsräume und der Mittel zur Durchführung dieser Arbeit.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachgebietes Mikrobiologie und Biochemie der Forschungsanstalt Geisenheim möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und die angenehme gemeinsame Arbeitszeit bedanken.

Weiterer Dank gilt dem Fachgebiet Rebenzüchtung und Rebenveredlung für die Bereitstellung der Probematerialien.