

Biokonservierung und Verbesserung der Weingesundheit

Maret du Toit, Melané Vivier, Pierre van Rensburg

Institute for Wine Biotechnology, Department of Viticulture and Oenology, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa

email: mdt@sun.ac.za or mav@sun.ac.za or pvr@sun.ac.za

Einleitung

Die Bedeutung von *Saccharomyces cerevisiae* in der Weinbereitung ist durchaus bekannt und bringt eine wachsende Nachfrage nach neuen und besseren Hefestämmen mit sich. Über die primäre Funktion als Katalysator der Konversion der Zucker in Alkohol ohne Entwicklung schlechter Gerüche, können die Starterkulturen von *Saccharomyces cerevisiae* genutzt werden, um dem Wein einen höheren Wert zu geben, wie zum Beispiel die Verbesserung der Gesundheit, indem die Produktion von Resveratrol angehoben und die Bildung von Ethyl-Carbomat verringert wird sowie mit einer größeren biologischen Kontrolle der Mikroorganismen durch die Verwendung von Hefen, die antimikrobielle Enzyme und/oder Peptide produzieren (Pretorius and Bauer, 2002; Pretorius, 2003; Pretorius *et al.*, 2003).

Die in der önologischen Industrie verwendeten, chemischen Konservierungsmittel, wie Schwefeldioxyd, Sorbinsäure, Benzoesäure, sind in ihrer ungetrennten Form sehr viel wirksamer, was bei niedrigem pH vorherrscht. Die übertriebene Verwendung von Schwefeldioxyd und anderen chemischen Konservierungsmitteln in alkoholischen Getränken, um der Entwicklung unerwünschter Mikroorganismen vorzubeugen, bringt Risiken für die Gesundheit mit sich und kann auf die Qualität des Weins Einfluss nehmen. Daher suchen die Wissenschaftler nach alternativen Wirkstoffen, die neutral sind und die die Nachfragen des Konsumenten nach „sauberen und grünen“ Produkten befriedigen können. Die Bereiche größten Interesses umfassen die antimikrobiellen Peptide oder von Milchsäurebakterien produzierte Bacteriocine oder das bakterienauflösende Enzym, das Lysozym. Eine andere Strategie ist die Verwendung von antimikrobiellen Metaboliten, wie das Wasserstoffsuperoxid, um die Veränderungen zu entfernen (Du Toit and Pretorius, 2000; Malherbe *et al.*, 2003; Pretorius *et al.*, 2003).

Das Prinzip des französischen Paradox ist, dass der gemäßigte Weinkonsum günstig auf die Gesundheit wirken kann, indem dadurch zum Beispiel das Risiko von mit zu fettreicher Ernährung verbundenen Herzkrankheiten reduziert wird (Bisson *et al.*, 2002). Dies hat die Bedeutung unterstrichen, sowohl gesündere Weine zu erhalten, indem unerwünschte Verbindungen wie das Ethyl-Carbomat, die biogenen Amine, ausgeschlossen und hohe Ethanolniveaus reduziert werden, als auch die Niveaus der für die Gesundheit nützlichen Verbindungen zu Erhöhen, wie das der Antioxidationsmittel.

Die wichtigsten im Wein gefundenen Schutzverbindungen umschließen die phenolischen Verbindungen, das Resveratrol, die Salizylsäure und die Flavonoide (Armstrong *et al.*, 2001). Stilbene sind sekundäre Pflanzenprodukte, die über den Weg Phenilalanin/Polymalonat produziert werden. Das Stilben Resveratrol ist ein Stressmetabolit, produziert von *Vitis vinifera* aufgrund einer Pilzinfektion, einer Wunde oder UV-Strahlung. Das Resveratrol wird auf bestimmte Weise in den Schalen produziert; im Fruchtfleisch sind nur Spuren präsent (Vivier and Pretorius, 2000, 2002). Rotweine enthalten eine höhere Konzentration an Resveratrol als Weißweine, aufgrund des Kontakts des Weins mit der Schale während der Fermentation. Über diese Anti-Pilzeigenschaft hinaus wurde festgestellt, dass das Resveratrol eine chemisch-präventive Wirkung in Bezug auf Krebs hat und das Risiko von Herzkrankheiten senkt. Es wirkt antioxidierend und antimutagen und führt zu spezifischen Enzymen, die krebserregende Substanzen assimilieren (Armstrong *et al.*, 2001).

Strategien zur Bionierversierung

Antimikrobielle Peptide oder Bacteriocine

Die Bacteriocine wie das Nisin, das Pediocin und das Leucocin wurden unter experimentellen Weinherstellungsbedingungen verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese Verbindungen dazu in der Lage sind, das Wachstum von mit Wein verbundenen Milchsäurebakterien (LAB) zu unterdrücken (Du Toit, 2002). Es wurde festgestellt, dass das Pediocin im Wein stabil ist, was es geeignet für die Weinherstellung macht. Die Weinparameter, die zur Bestimmung ihres Einflusses auf die Aktivität der antimikrobiellen Substanzen bewertet werden, umfassen die Niveaus von Ethanol und SO_2 und den pH-Wert. Der pH-Wert hatte die ausgeprägteste Wirkung auf die Verringerung der Aktivität (gemessen mit arbiträrer Einheit), mit einem schnelleren Fall der Aktivität bei einem pH von 3.0. Es wurden verschiedene Kombinationen von Nisin, Pediocin und Leucocin gegenüber *Leuconostoc mesenteroides* DIIIM:I getestet. Die wirksamsten Kombinationen waren jene mit einer Zellenzahl von 10^2 und 10^4 cfu/ml, während eine Zellenzahl von 10^6 und 10^8 cfu/ml nur leicht von den Bacteriocinen beeinflusst wurden. Die drei Bacteriocine zusammen waren in diesen Proben am effektivsten (Abbildung 1).

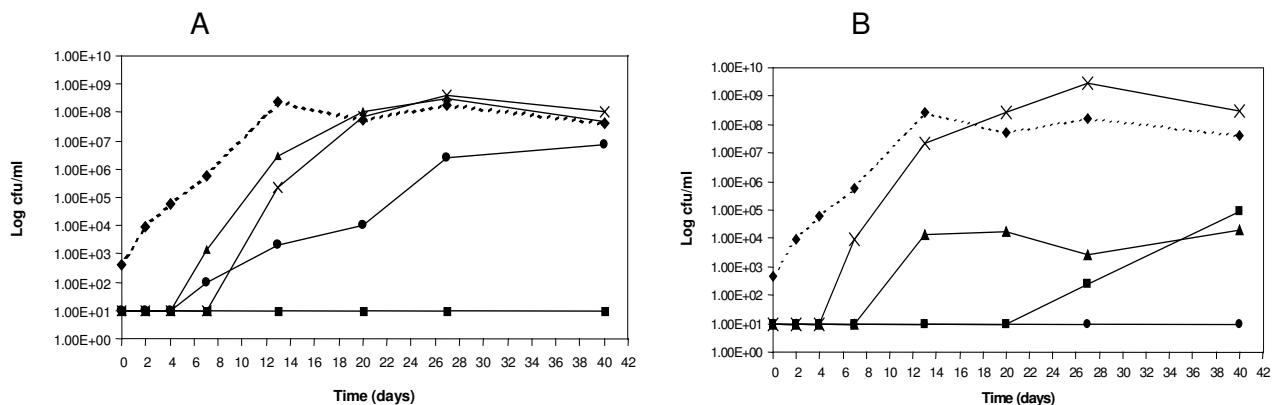


Abbildung 1: (A) Anwachsen der Zellenzahl der Milchsäurebakterien DIIIM:I bei einer Ausgangskonzentration von 10^4 cfu/ml, mit 100 arbiträren Einheiten/ml von Nisin, Pediocin und Leucocin in unterschiedlichen Kombinationen. (■) Nisin-Pediocin-Leucocin; (▲) Nisin-Leucocin; (x) Nisin-Pediocin; (●) Leucocin-Pediocin; (◆) Kontrolle. (B) Anwachsen der Zellenzahl von Milchsäurebakterien DIIIM:I bei einer Ausgangskonzentration von 10^4 cfu/ml, mit 1 000 arbiträren Einheiten/ml von Nisin, Pediocin und Leucocin in unterschiedlichen Kombinationen. (●) Nisin-Pediocin-Leucocin; (■) Nisin-Leucocin; (▲) Nisin-Pediocin; (x) Leucocin-Pediocin; ◆ Kontrolle (Du Toit, 2002).

Die kommerzielle Verwendung dieser Bacteriocine oder anderer Enzyme ist momentan nicht geeignet. Unsere Strategie besteht aus einer genetischen Verbesserung von *S. cerevisiae*, die als Starterkultur bei der Weinherstellung verwendet werden, um diese nützlichen Verbindungen während der Fermentation zu produzieren. Die Gentechnik wird verwendet, um Überträger zu bilden und die genetischen Elemente, die die antimikrobiellen Peptide Pediocin PA-1 von *Pediococcus acidilactici* und Leucocin B-TA11a von *Leuc. Carnosum* kodifizieren, auf einen Laborstamm von *S. cerevisiae* zu übertragen und so bakterienauflösende Hefen zu kreieren.

Die Strukturgene *ped A* und *IcaB* werden in Vektoren geklont, die das Promotergen des dehydrierten Alkohols der Hefe (*ADH1_{PT}*) und das Zeichen der Absonderung des Faktors α des Verbindungsspheromons der Hefe (*MF α 1_S*). Die veränderten Hefen wurden analysiert und man hat erkannt, dass sich biologisch aktive antimikrobielle Peptide absonderten, obgleich es gelang, niedrige Mengen an rekombinierten Peptiden aufrechtzuerhalten (Abbildung 2) (Schoeman *et al.*, 1999).

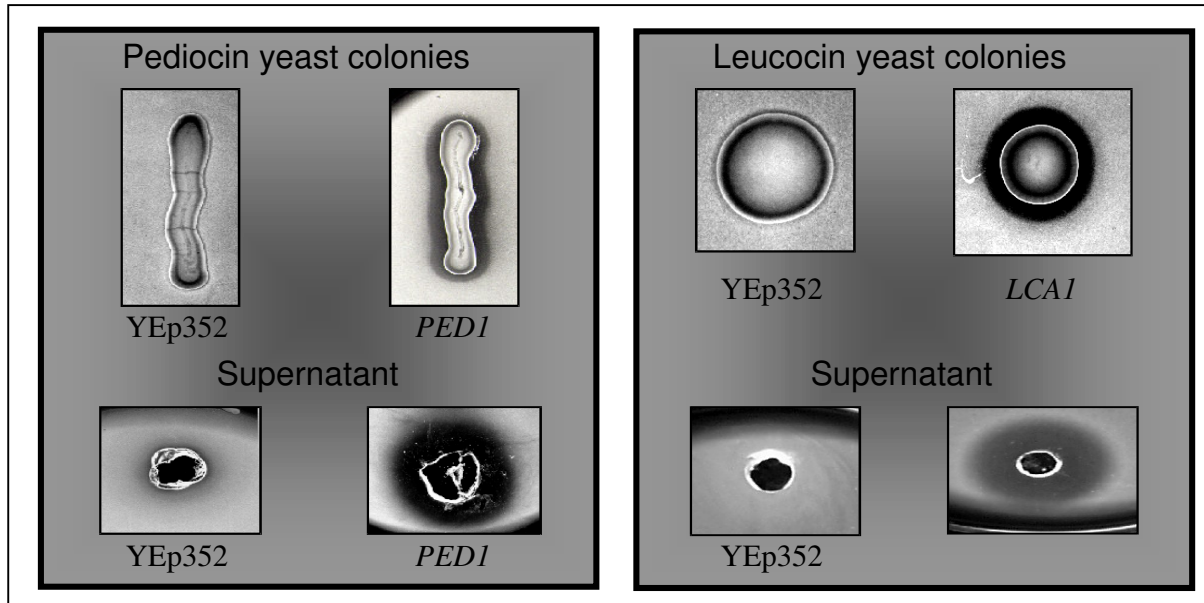


Abbildung 2: Studie der Aktivität von Pediocin und Leucocin in Hefekolonien und Supernatant mit freien Zellen transformierter Hefen mit Komplexen, die die Struktur Gene für das Pediocin (*ped A*) und das Leucocin (*IcaB*) enthalten. Das YEp 352 ist der Kontrollvektor, der keine Gene für die Bacteriocine enthält.

Mit diesen Ergebnisse wurde ein Versuch gemacht, um die Möglichkeit der Produktion eines bakterientötenden Hefestammes zu untersuchen. Es wurden schon charakterisierte Bacteriocine verwendet. Aber um größere Freiheit beim Handeln zu haben, mussten wir auch neue bacteriocinkodifizierende Gene verwenden. Dafür bewerteten wir, ob die Bacteriocine von den vom Wein isolierten Milchsäurebakterien produziert wurden. Es wurde ein Screening von 170 Milchsäurebakterien, isoliert aus den Trauben und der Fermentation von Pinotage, Merlot und Cabernet Sauvignon in der Region Western Cape gemacht, um die antimikrobielle Aktivität zu bewerten. Von der Gesamtheit der isolierten Milchsäurebakterien zeigten 25 eine Aktivität gegenüber den auf *Lactobacillus e Pediococcus* sensiblen Hefestämmen. Zwei wurden für eine weitere Charakterisierung bzgl. Ihrer Stabilität bei der Produktion von Bacteriocinen und ihrer konstanten und hohen Aktivität gegen einen Indikatororganismus, *Lactobacillus plantarum* LMG 13556, ausgewählt. Die beiden Hefestämmen, die Bacteriocine produzieren werden als *Lactobacillus paracasei* #77 und *Lactobacillus brevis* #81.1. identifiziert. Die Bacteriocine inaktiviert von der Proteinase K, von der α -chymotrypsin und dem Lysozym, aber nicht von der Catalase. Die Bacteriocine waren gegenüber der Hitze stabil und zeigten eine höhere Aktivität bei einem pH zwischen 3 und 7. Die höchste Produktion an Bacteriocinen zeigte sich nach 16 Stunden Wachstum bei 30°C. Die ausgewählten Milchsäurebakterien hatten beide eine bakterienhemmende Wirkung. Die Studie zeigt, dass die in den südafrikanischen Rebsorten und der Weinherstellung gefundenen Milchsäurebakterien antimikrobielle Substanzen produzieren, die andere natürlicherweise im Wein vorkommende Milchsäurebakterien hemmen Morgan, 2003).

Antimikrobielle Enzyme

Das Lysozym ist ein Enzym mit antibakterieller Eigenschaft. Es wird als Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie verwendet. Es ist nicht toxisch und gilt als sicher (GRAS = generally recognized as safe). Das Lysozym ist eine 1,4- β -N-Acetylmuramidase, die die β -1,4-glycosidische Bindungen zerstört, die in der Peptidoglycane-Schicht der Zellwand vorhanden sind. Das Lysozym hat sowohl eine muramidaseische als auch eine „chitinolytic“ Wirkung (Fugelsang, 1997). Die antimikrobielle Wirkung des Lysozyms ist folglich auf die

Gram-positiven Bakterien begrenzt. Das Lysozym hat keine Wirkung auf die Hefen, wird nicht vom Alkohol beeinflusst und ist beim Wein-pH in der Phase der Weinbereitung aktiv (Fugelsang, 1997). Seine Wirkung wird jedoch von der Reaktion mit den Tanninen, den Pigmenten und dem Bentonit beeinflusst. Das Lysozym kann bei der Weinbereitung zur Hemmung und Kontrolle der malolaktischen Gärung verwendet werden und für die mikrobielle Stabilisierung nach der malolaktischen Gärung (Gerbaux *et al.*, 1997). Das OIV hat jüngst das Hinzufügen des Lysozyms bei der Weinbereitung gebilligt, aber die ökonomischen Folgen seiner Verwendung sind ein einschränkender Faktor.

Aus diesem Grund wurde wie bereits gesagt, der Weg der genetischen Verbesserung von *S. cerevisiae* gewählt, um das Gen des Lysozyms auszudrücken. Das Gen, das das Lysozym (*HEL1*) des Hühnereiweißes kodifiziert, wird in einen Vektor integriert, der das Promotorgen und das Endgen der Phosphoglyceratkinase 1 enthält (*PGK 1*) und in einen Laborstamm von *S. cerevisiae* übertragen. Die veränderten Hefen können bestimmte LAB-Stämme hemmen (Pretorius, 2003; Pretorius *et al.*, 2003).

Antimikrobielle Metabolite

Die Glukoseoxydase (GOX) von *Aspergillus niger*, die einen GRAS-Status hat, hat eine beachtenswerte industrielle Bedeutung. Die GOX assimiliert die Glukose zu Glukonsäure, die auch einen GRAS-Status hat. Die aus der von GOX katalysierten Reaktion hervorgehende Verbindung ist hydrogenperoxid (H_2O_2) (De Vuyst and Vandamme 1994; Geisen 1999). H_2O_2 ist wirksam gegen die Bakterien Gram-positiv und Gram-negativ.

Man führte eine Studie durch, um das GOX-Gen in *S. cerevisiae* auszudrücken und um die Fähigkeit der veränderten, gox-produzierenden Hefe zu bewerten, das Wachstum von Säure- und Milchsäurebakterien unter Vinifikationsbedingungen zu unterbinden. Das Strukturgen der Glukoseoxydase von *A. niger* (*gox*) wurde an das Absonderungszeichen des Faktors α des Pheromons der Verbindung der Hefe geschmolzen (*MF α 1_S*) und unter die Kontrolle des konstitutiven Gens *PGK1_P* and *PGK1_T* gestellt. Dieser Genkomplex (genannt *GOX1*) wird in einen Integrationsvektor der Hefe eingefügt (*YIp5*) und in einen Laborstamm von *S. cerevisiae* übertragen (Malherbe *et al.*, 2003; Pretorius, 2003).

Die neukombinierte Hefe, die *GOX1* ausdrückte, war in der Lage, das Wachstum von LAB und von Säure- und Milchsäurebakterien zu hemmen (Abbildung 3). Man beobachtete unterschiedliche Hemmungsgrade von LAB. Die antibakterielle Wirkung wird dem Hydrogenperoxid angerechnet, das Endprodukt der enzymatischen GOX-Reaktion und nicht dem GOX-Enzym (Malherbe *et al.*, 2003).

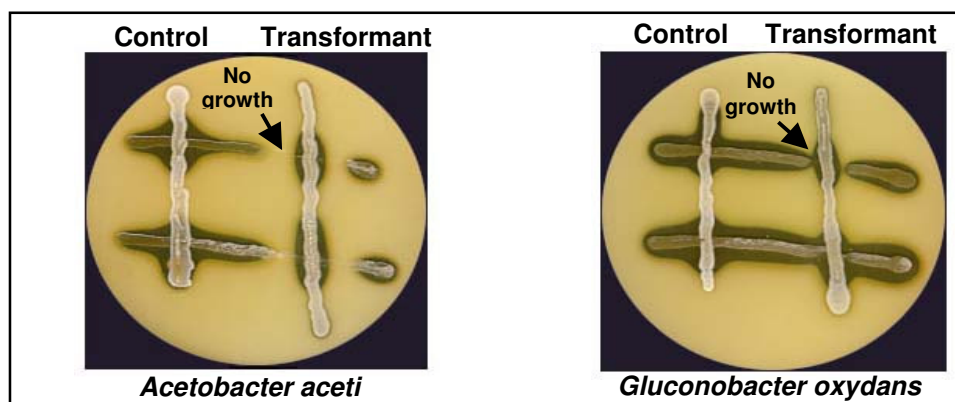


Abbildung 3: Versuche von antibakterieller Wirkung, die die Hemmung der Säurebakterien durch die gox-produzierende Hefe zeigen. Die Hefestämme werden vertikal aufgestrichen. Der Kontrollstamm von *S. cerevisiae* befindet sich links und der mit *GOX1* veränderte Stamm von *S. cerevisiae* auf der rechten Seite der Agarplatte. Man kann gehemmte Zonen um die Transformaten erkennen, wo man keinerlei Wachstum beobachtet (Malherbe *et al.*, 2003).

Die Verbesserung der Weingesundheit

Steigern der Mengen an Antioxidantien im Wein

Das Ziel dieser Pilotstudie war es zu verstehen, ob es möglich ist, önologische Hefen zu produzieren die in der Lage sind, Resveratrol während der Fermentation von Rot- und Weißweinen zu produzieren. Um dieses Ergebnis zu erhalten, war es nötig, den Weg des Phenylpropanol in der Hefe zu verändern, um p-coumaroyl-CoA zu produzieren, eine der erforderlichen Substrate für die Synthese des Resveratrols (Abbildung 4). Das andere Substrat, das Malonyl-CoA, ist schon in den Hefen vorhanden und an der Biosynthese der Fettsäuren beteiligt. Wir hypothetisieren, dass die Produktion von p-coumaroyl-CoA erreicht werden kann, indem man die Gene *4CL216* (Coenzym A Ligase) und Resveratrol Synthase in Laborstämmen von *S. cerevisiae* kloniert und ausdrückt (Becker *et al.*, 2003). Die Hefe ist in der Lage, die p-Cumarin-Säure, eine im Most vorkommende Substanz, zu assimilieren. Man erhielt veränderte Hefen, die beide eingefügten Gene ausdrückten und für die Produktion von Resveratrol getestet wurden, unter Hinzufügen der notwendigen Vorläufer für die Resveratrolproduktion. Die erhaltenen Ergebnisse haben gezeigt, dass die neu kombinierten Hefen in der Lage waren, Resveratrol zu produzieren. Behandlungen mit β -Glucosidase organischer Extrakte neu kombinierter Hefen haben zum Verschwinden des Resveratrols geführt. Dies ist die Rekonstruktion des biochemischen Wegs in einem heterologen Gastgeber für die Resveratrolproduktion.

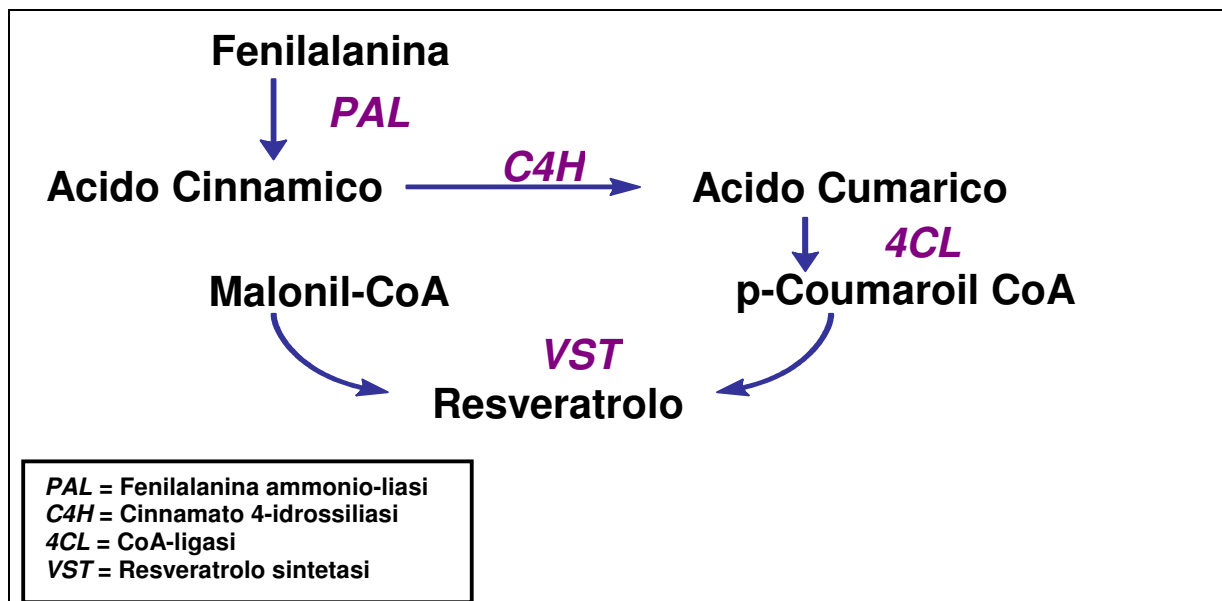


Abbildung 4: Die Biosynthese des Resveratrols vom Phenylalanin.

Schlussfolgerungen

Trotz der Befürchtungen einiger Konsumentengruppen über genetisch veränderte Produkte und Organismen, ist es unzweifelhaft, dass die geschaffenen Hefestämme die önologische Industrie unterstützen können, um den Bedürfnissen der Konsumenten entgegenzukommen. In diesen letzten zehn Jahren wurden viele Fortschritte in der Verbesserung der önologischen Hefen gemacht. Jedoch wurden bis heute keine neukombinierten Hefen auf kommerzieller Ebene verwendet. Die Forschung über die genetische Verbesserung der Hefen kann dem önologischen Sektor die Möglichkeit geben, das Verhältnis Qualität/Preis des Weins zu verbessern.

Danksagungen

Besonderen Dank an Lallemand für die Einladung, diese Forschungsarbeit des Institute for Wine Biotechnology beim technischen Treffen zu präsentieren und auch für die finanzielle Unterstützung, um bei diesem Meeting exzellent organisiert einzuschreiten und für die Besuche der kalifornischen önologischen Industrie. Die präsentierte Untersuchung wurde finanziert von Winetech, THRIP und NRF.

Bibliographie

- ARMSTRONG GO, LAMBRECHTS MG, MANSBvnb VELT EPG, VAN VELDEN DP, and PRETORIUS IS (2001). Wine and health. *S. Afr. J. Sci.* 97, 279-282.
- BECKER, JVW, ARMSTRONG GO, VAN DER MERWE MJ, LAMBRECHTS MG, VIVIER MA, and PRETORIUS IS (2003). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Research* (In press).
- BISSON LF, WATERHOUSE AL, EBELER SE, WALKER MA, and LAPSLEY JT (2002). The present and future of the international wine industry. *Nature* 418, 696-699.
- DE VUYST L and VANDAMME EJ (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst L, Vandamme EJ (eds) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Academic and Professional, New York, pp 99-103.
- DU TOIT C (2002). The evaluation of bacteriocins and enzymes for biopreservation of wine. MSc Thesis, Stellenbosch University.
- DU TOIT M, and PRETORIUS IS (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 74-96.
- FUGELSANG KC (1997). *Wine Microbiology*. New York: Chapman and Hill.
- GEISEN R (1999). Inhibition of food-related pathogenic bacteria by god-transformed *Penicillium nalgiovense* strains. *J. Food Protect.* 62, 940-943.
- GERBAUX V, VILLA A, MONAMY C, and BERTRAND A (1997). Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 49-54.
- MALHERBE DF, DU TOIT M, CORDERO OTERO RR, VAN RENSBURG P, and PRETORIUS IS (2003). Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene (*GOX1*) in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential application in wine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 502-511.
- MORGAN J (2003) Screening, isolation and characterisation of antimicrobial/antifungal peptides produced by lactic acid bacteria isolated from wine. MSc Thesis, Stellenbosch University.
- PRETORIUS IS (2003). The genetic analysis and tailoring of wine yeasts. *Topics in Current Genetics*, vol. 2. *Functional Genetics of Industrial Yeasts*, de Winde (Ed.). Springer-Verlag, Berlin.
- PRETORIUS IS, and BAUER FF (2002). Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotech.* 20, 426-432.
- PRETORIUS, IS, DU TOIT M, and VAN RENSBURG P (2003). Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 3-10.
- SCHOEMAN H, VIVIER MA, DU TOIT M, DICKS LMT, and PRETORIUS IS (1999). The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 647-656.
- VIVIER MA, and PRETORIUS IS (2000). Genetic improvement of grapevine: tailoring grape varieties for the third millennium – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 5-26.
- VIVIER MA, and PRETORIUS IS (2002). Genetically tailored grapevines for the wine industry. *Trends Biotech.* 20, 472-478.