IVES Technical Reviews
rebe & wein

https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2023.7725

Die Steuerung des intrazellulären Redoxgleichgewichts ist entscheidend für die Produktion von Aromastoffen durch Weinhefen

James D. Duncan[1], Anne Ortiz-Julien[2], Mathabatha E. Setati[1], Benoit Divol[1]

[1] South African Grape and Wine Research Institute, Department of Viticulture and Oenology, Stellenbosch University,
[2] Lallemand SAS

Hefen verleihen Wein, durch die Produktion von Ethanol und einer Vielzahl anderer Metabolite, seinen einzigartigen organoleptischen Fingerabdruck. Die komplex miteinander verzweigten Stoffwechselwege, die für die Herstellung dieser Aromastoffe verantwortlich sind, hängen weitgehend von enzymatischen Redoxreaktionen ab, die die Cofaktoren NAD(H) und NADP(H) nutzen. Diese hier vorgestellte Studie befasst sich mit dem Redox-Cofaktor-Gleichgewicht und Management zweier genetisch verwandter Hefestämme während der alkoholischen Gärung und der Produktion von önologisch relevanten Metaboliten.

Die Kinetik der alkoholischen Gärung

Zwei genetisch verwandte *Saccharomyces cerevisiae* Stämme wurden verwendet: EC1118™ und IONYSwf™[1]. Die Studie zur Fermentationskinetik wurde in einem synthetischen Traubensaftmedium, welches zur Hälfte aus Glukose und zur Hälfte aus Fruktose bestand und 230 g/L Zucker enthielt, durchgeführt (Abbildung 1). Laut Hersteller produziert IONYSwf™ große Mengen an organischer Säure und Glyzerin und geringe Mengen an Ethanol und Essigsäure[2]. Zunächst wurden die Zeitpunkte identifiziert, die den wichtigsten Stadien der alkoholischen Gärung entsprechen. Dabei handelt es sich um: den Beginn der exponentiellen Wachstumsphase der Hefe, die Mitte der exponentiellen Phase, den Eintritt in die stationäre Phase (wenn die Gärung zu einem Drittel abgeschlossen ist), zwei Drittel der Gärung sind abgeschlossen, und das Ende der Gärung (die Zuckerkonzentration liegt unter 5 g/L). Beide Hefestämme lieferten typische Fermentationsprofile und erreichten das Gärungsende. IONYSwf™ fermentierte allerdings langsamer als EC1118™ und brauchte 120 Stunden, um die Gärung abzuschließen, im Vergleich zu 110 Stunden für EC1118™.

Die Dynamik der intrazellulären NAD(H)-Konzentration während der Gärung

Die intrazellulären Konzentrationen der Redox-Cofaktoren NAD^+, NADH, $NADP^+$ und NADPH wurden zu den oben genannten Zeitpunkten überprüft. Die Konzentrationen und das Verhältnis von $NADP^+$ und NADPH waren im Zeitverlauf relativ stabil (Daten nicht gezeigt), während die Konzentrationen und das Verhältnis von NAD^+ und NADH erheblich variierten (Abbildung 2). Genauer gesagt war die Gesamtkonzentration von NAD(H) (d. h. die Summe aus [NAD^+] und [NADH]) nur bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase stabil, danach nahm sie bei beiden Stämmen drastisch ab, allerdings auf unterschiedliche Weise. Bei EC1118™ nahmen sowohl die NAD(H)-Konzentration als auch das NAD^+/NADH-Verhältnis früher ab als bei IONYSwf™. Letzterer hielt im Vergleich zu EC1118™ eine höhere Konzentration an NAD^+ nach der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aufrecht.

In früheren Veröffentlichungen wurden die NAD(H)-Konzentration und das NAD^+/NADH-Verhältnis häufig während der gesamten Fermentationsphase als stabil beschrieben[3] [4]. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen jedoch, dass diese Annahmen entweder falsch oder nur teilweise richtig sind. Das Problem ist, dass diese früheren Studien größtenteils auf Modellen basieren, die in Fed-Batch-Systemen etabliert wurden. Unter diesen Bedingungen nehmen Hefen einen aeroben Stoffwechsel an, was bei *S. cerevisiae* selten vorkommt und einem starken Crabtree-Effekt unterliegt. Bei dieser Hefeart führt schon eine

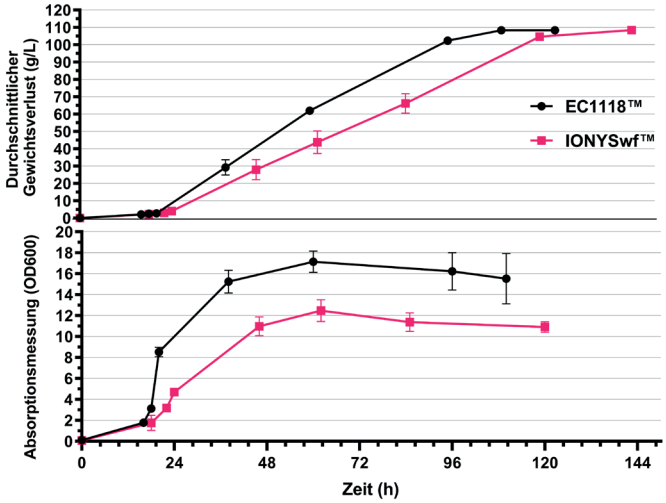


ABBILDUNG 1. Die Fermentationskinetik und das Wachstum der Hefestämme EC1118™ und IONYSwf™ in synthetischem Traubensaft mit einer Zuckerkonzentration von 230 g/L.

Zuckerkonzentrationen von nur 150 mg/L zu einer Verlagerung des Stoffwechsels von aerober Atmung zur Fermentation, unabhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff[5]. Die hier präsentierten Daten deuten darauf hin, dass Hefen mit zunehmender Annäherung an die stationäre Phase NAD(H) wieder in das ursprüngliche Substrat Nikotinamid umwandeln. Nach Erreichen der stationären Phase scheinen Hefen darüber hinaus, in Abhängigkeit vom jeweiligen Stamm, mehr oder weniger große Schwierigkeiten zu haben, das Gleichgewicht zwischen den beiden NAD-Formen (d. h. NAD^+ und NADH) aufrecht zu erhalten. Dies wirft neues Licht auf das stammspezifische,

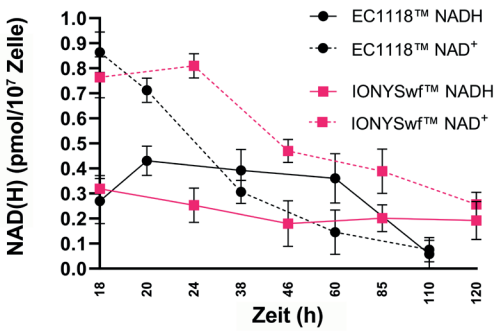


ABBILDUNG 2. Dargestellt sind die Variationen der intrazellulären Konzentrationen an NAD^+ und NADH der Stämme EC1118™ und IONYSwf™ während der Fermentation.

Dieses Werk steht unter der Lizenz Creative Commons Namensnennung 4.0 International.

TABELLE 1. Die Metabolitkonzentrationen und die Biomasse am Ende der alkoholischen Gärung sind aufgelistet. Die Experimente wurden unter Verwendung der Hefestämme EC1118™ und IONYSwf™ in synthetischem Traubensaft unter vollständig anaeroben Bedingungen durchgeführt.

	EC1118™	IONYSwf™
Restzucker (g/L)	0,37 ± 0,03 [a]	2,42 ± 1,93 [a]
Biomasse (g/L)	4,56 ± 0,05 [a]	4,43 ± 0,02 [a]
Ethanol (g/L)	104,34 ± 1,97 [a]	100,57 ± 1,49 [b]
CO_2 (g/L)	108,27 ± 0,13 [a]	107,93 ± 0,07 [a]
Glyzerin (g/L)	6,78 ± 0,01 [b]	9,83 ± 0,11 [a]
Succinylsäure (g/L)	0,46 ± 0,03 [b]	0,92 ± 0,03 [a]
Essigsäure (g/L)	0,66 ± 0,02 [a]	0,45 ± 0,01 [b]
Gesamtmenge der wichtigsten Begleitalkohole* (g/L)	0,24 ± 0,00 [b]	0,32 ± 0,00 [a]
Gesamtmenge der wichtigsten Acetatester** (mg/L)	1,32 ± 0,1 [b]	4,75 ± 0,3 [a]

* Butan-1-ol, Propan-1-ol, 2-Methylpropan-1-ol, 3-Methylbutan-1-ol und 2-Phenylethanol;
** 3-Methylbutylacetat und 2-Phenylethylacetat.

intrazelluläre Redox-Cofaktor-Management von *S. cerevisiae*. In der Tat deuten diese Unterschiede im Ungleichgewicht des NAD⁺/NADH-Verhältnisses auf Unterschiede in der Metabolitproduktion hin. Dies kann letztendlich je nach Hefestamm zu Variationen im Geschmacksprofil eines Weins führen.

Die Produktion der wichtigsten Metabolite

Um die Verbindung zwischen dem Redoxmanagement und stammspezifischen Stoffwechselprofilen weiter zu untersuchen, wurden zunächst die wichtigsten Stoffwechselprodukte der Stämme EC1118™ und IONYSwf™ am Ende der Fermentation quantifiziert (Tabelle 1). Die Hauptstoffwechselwege und Endprodukte von önologischer Relevanz sind in Abbildung 3 skizziert. Eine Analyse der Stoffwechselflüsse der beiden Stämme zeigt deutlich, dass IONYSwf™ weniger Ethanol und Essigsäure produziert, jedoch mehr Succinylsäure, Begleitalkohole und Acetatester. Diese Ergebnisse werden durch frühere Studien bestätigt[2]. Die Kenntnis des intrazellulären Redoxstatus von IONYSwf™ im Vergleich zu EC1118™ ermöglicht ein besseres Verständnis der Stoffwechselaktivitäten.

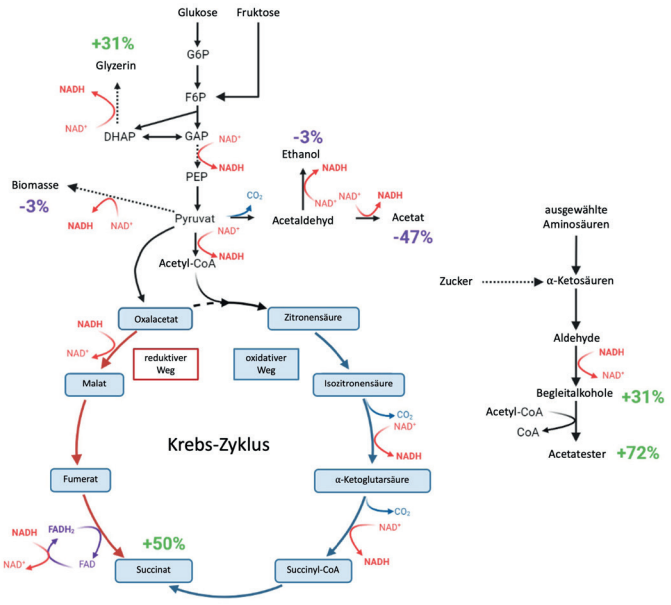


ABBILDUNG 3. Vereinfachte Darstellung der Stoffwechselwege, die zur Bildung der wichtigsten Endprodukte von önologischem Interesse führen. Die Reaktionen mit Redox-Cofaktoren sind in Rot dargestellt. Die Prozentangaben neben den Namen der Endprodukte deuten auf eine Zunahme (grün) oder eine Abnahme (violett) in IONYSwf™ im Vergleich zu EC1118™ hin. Gepunktete Pfeile kennzeichnen Stoffwechselwege, die aus mehreren, nicht dargestellten Schritten bestehen.
Abkürzungen: G6P: Glukose-6-Phosphat, F6P: Fruktose-6-Phosphat, GAP: Glyzeraldehyd-3-Phosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat.

Beispielsweise führt eine erhöhte Glyzerinproduktion direkt zu einer geringeren (obwohl unter den experimentellen Bedingungen begrenzten) Ethanolproduktion, da dadurch die Zuckerverfügbarkeit verringert wird. Aus Redox-Sicht zwingt die Steigerung der Glyzerinproduktion die Hefe dazu, mehr Verbindungen zu produzieren, die es ihr ermöglichen, NAD^+ aus NADH zu regenerieren. Dazu gehören Succinylsäure und wichtige Aromastoffe wie Begleitalkohole und Acetatester. Dies erklärt vermutlich die höhere NAD^+-Konzentration während der Fermentation.

Fazit

Diese Studie wirft neues Licht auf das intrazelluläre Redoxmanagement in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Es zeigte sich, dass nach der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase die Konzentration an NAD(H) mit der Zeit abnahm, was mit der Abnahme der alkoholischen Fermentationsrate korrelierte. Ursächlich ist eine geringere Verfügbarkeit von Cofaktoren zur Unterstützung des enzymatischen Zuckerabbaus. Zusätzlich zeigte diese Studie einen klaren stammspezifischen Zusammenhang zwischen der Produktion von Primärmetaboliten und Redox-Cofaktoren. Beispielsweise führt die charakteristisch hohe Glyzerinproduktion des Stammes IONYSwf™ zu einem metabolischen Schneeballeffekt: unter Bedingungen, die zu einer erhöhten Glyzerinproduktion führen, wird die Synthese von Ethanol vermutlich gedrosselt, während die Produktion gewünschter Nebenprodukte, wie von Succinylsäure und von Gäraromen, verstärkt wird. Zukünftige Studien sollten sich um ein besseres Verständnis der Dynamik von Produktion und Abbau von NAD(H) unter verschiedenen Umweltbedingungen und dessen Zusammenhang mit der Produktion önologisch relevanter Stoffwechselprodukte bemühen. ■

Förderung: *Die Autoren danken der Universität Stellenbosch und der National Research Foundation of South Africa (UID: 145290) für die Finanzierung des Doktorandenstipendiums von J. D. Duncan, sowie Lallemand Oenology und Winetech für die gemeinsame Unterstützung des Forschungsprojekts.*

Basiert auf dem wissenschaftlichen Artikel "Redox cofactor metabolism in Saccharomyces cerevisiae and its impact on the production of alcoholic fermentation end-products" (Food Research International, 2023)

1 Tilloy, V., Ortiz-Julien, A., & Dequin, S. (2014). Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast Saccharomyces cerevisiae under hyperosmotic conditions. Applied and Environmental Microbiology, 80(8), 2623–2632. https://doi.org/10.1128/AEM.03710-13

2 IONYSwf™ technical sheet. www.lallemandwine.com

3 Bakker, B. M., Overkamp, K. M., Van Maris, A. J., Kötter, P., Luttik, M. A., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews, 25*(1), 15–37. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00039-5

4 Richard, P., Teusink, B., Westerhoff, H. V., & van Dam, K. (1993). Around the growth phase transition S. cerevisiae's make-up favours sustained oscillations of intracellular metabolites. FEBS Letters, 318(1), 80–82. https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81332-T

5 Verduyn, C., Zomerdijk, T. P., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1984). Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. Applied Microbiology and Biotechnology, 19(3), 181–185. https://doi.org/10.1007/BF00256451