MÖGLICHKEITEN DER GENTECHNOLOGIE FÜR DEN NAHRUNGSMITTELBEREICH

Ulf Stahl

Abteilung Mikrobiologie der Technischen Universität und des Institutes für Gärungsgewerbe und Biotechnologien in Berlin

Die meisten bei der Lebensmittel- und Genußmittelherstellung verwendeten Enzyme stammen aus Mikroorganismen. Handelt es sich bei der zu katalysierenden Umsetzung um eine Ein- oder Wenigschrittreaktion, wird das Enzym bzw. Enzymgemisch dem umzusetzenden Rohprodukt zugemischt. Alternativ zu dieser Einweg-Strategie bietet sich eine Enzym- Trägerfixierung an. Sind bei der angestrebten Umsetzung mehrere enzymkatalysierte Schritte nötig, so sind diese Vielschrittumsetzungen in der Zelle als Reaktionsraum am besten durchführbar, da ja die Zelle nichts anderes als eine Trägermatrix darstellt, an der eine Vielzahl von Enzymen fixiert sind. Abhängig vom Endprodukt kann es vorteilhaft sein, auch Zellen an Träger zu fixieren, nicht nur, um einen Prozeß kontinuierlich zu gestalten, sondern auch um die Zellen einfacher aus dem Produkt abtrennen zu können.

Um einen Mikroorganismus, der ein gewünschtes Enzym bildet bzw. eine bestimmte Umsetzung durchführen kann, zu erhalten, wird man üblicherweise entsprechende Mikroorganismen aus der Natur bzw. aus Stammsammlungen aufspüren. Durch Optimierung der Substratzusammensetzung und des Kulturverfahrens läßt sich die von Natur aus vorhandene Produktbildungskapazität weiter erhöhen. Bedenkt man jedoch, daß sämtliche Stoffwechselleistungen eines Organismuses im Gleichgewicht stehen und es somit für ein Naturisolat unsinnig wäre, einzelne Komponenten in Übermaß zu produzieren, wird deutlich, daß man bei der ausschließlichen Optimierung von externen Faktoren nur mittelmäße Produktivitäten erwarten wird können. Eine integrierte Optimierung muß daher auch eine Optimierung des Organismus selbst miteinschließen, was sich nur durch eine Änderung seiner Erbinformation bewerkstelligen läßt. In Kombination mit der Optimierung der externen Faktoren, wird sich nicht nur eine Erhöhung der Produktmenge erzielen lassen, sondern auch eine Aquirierung von völlig neuen Eigenschaften bzw. Fähigkeiten. Dieses Ziel läßt sich durch zwei Vorgangsweisen, nämlich Mutation und Rekombination, am günstigsten in Kombination, erreichen:

Während bei der Mutation die Erbinformation spontan geändert wird, so daß eine schon vorhandene Eigenschaft abgeschwächt, verändert oder verbessert wird, werden durch Rekombination Eigenschaften aus unterschiedlichen Organismen miteinander kombiniert, so daß es nicht nur zu einer Verbesserung einer schon vorhandenen Eigenschaft kommt, sondern sich auch völlig neue Leistungen etablieren lassen.

Bibliothek der GBF

In jedem Fall muß jedoch, wie bei der Mutation, eine Selektion angeschlossen werden, um die meist als seltenes Ereignis auftretenen Mutanten/Rekombinanten aus der Vielzahl von nicht veränderten Zellen herauszufinden.

Bei einer im Rahmen eines Sexualzykluses oder einer Protoplastenfusion stattfindenen Rekombination, wird das Erbmaterial der Elternstämme in seiner Gesamtheit kombiniert, wodurch, abhängig vom Zufall, Nachkommen entstehen, bei denen die positiven bzw. negativen Eigenschaften überwiegen. Im Gegensatz zu solch einer in vivo- Rekombination, wo eine gezielte Kombination von Eigenschaften nicht möglich ist, gelingt es mit Hilfe einer in vitro- Rekombination, welche meist als Gentechnik bezeichnet wird, einzelne Gene, und damit Eigenschaften, zu kombinieren, um sie anschließend in einen geeigneten Wirt zu transferieren und dort zur Expression zu bringen. Hinzu kommt noch, daß bei der Protoplastenfusion, vor allem jedoch bei der Gentechnik, Erbinformationen aus nicht verwandten Organismen miteinander kombiniert werden können, wogegen bei der klassischen Kreuzungszüchtung ausschließlich innerhalb einer Art es zu Rekombinationsvorgängen kommt. Abhängig vom zu optimierenden Organismus (z. B. besitzt er einen Sexualzyklus bzw. die Fähigkeit zur Konjugation), vor allem jedoch von den zu kombinierenden Eigenschaften, wird unter den genannten Methoden auszuwählen sein, um möglichst effektiv und kostengünstig Mikroorganismen mit verbesserten Eigenschaften zu erstellen (1). Im folgenden sollen aus dem Brauereibereich exemplarisch zwei Beispiele der Stammoptimierung aus dem Forschungsinstitut für Mikrobiologie vorgestellt werden:

Kontaminationsschutz der Brauhefe gegenüber Wildhefen

Bedingt durch Virus-ähnliche Partikel, die sich im Zytoplasma von Hefen unterschiedlicher Art- und Gattungszugehörigkeit befinden, sind diese in der Lage, Toxine zu bilden (Killer-Stämme), die Artgenossen, die solche Virus-Partikel nicht besitzen, inaktivieren. Dieses Virus macht gleichzeitig die Hefezelle, die es trägt, immun gegen das eigene Toxin, so daß weder sie noch Artgenossen, die ebenfalls das gleiche Virus tragen, betroffen werden, sondern ausschließlich nur Zellen, die kein Virus besitzen. Da diese Partikel nicht infektiös sind, werden sie üblicherweise nur im Rahmen eines Sexualzykluses von Zelle zu Zelle übertragen.

Um Brauhefe möglichst umfassend gegen natürliche Kontaminanten zu schützen, wurde die Aktivität einer Reihe unterschiedlicher Killerstamm-Typen gegen immer wieder in der Brauerei zu findenen Wildhefen getestet, um einen Killer-Stamm mit einem für Brauhefe günstigen Aktivitätsspektrum aufzuspüren. Die Übertragung der "Killer"-Aktivität wird durch Protoplastenfusion vorgenommen, wobei allerdings Sorge getragen werden muß, daß nur die Zellen des Braustammes mit jenen des Virusstammes fusionieren, nicht jedoch die Zellkerne; eine Ver-

änderung der Braueigenschaften wäre die Folge. Durch geschickte genetische "Markierung" des Virusstammes (Einbringung der kar-Mutation, welche eine Kernfusion verhindert; mitochondrialkodierte Atmungskompetenz) gelingt es, nur solche Fusionsprodukte zu selektieren, die einerseits den Zellkern und die Mitochondrien der Brauhefe tragen, andererseits die Viruspartikel der "Killer"-Hefe (2). Brauversuche im kleinen Maßstab werden zeigen, ob derartige Viruspartikel-tragende Brauhefen die Technologie der Bierbereitung werden vereinfachen können, wie dies,vor allem bei französischen Weinhefen, schon derzeit der Fall ist.

Erstellung einer Diacetyl- freien Brauhefe

Während der Hauptgärung entsteht im Rahmen des Valin-/Isoleucin-Stoffwechsels als Zwischenprodukt α-Acetolactat, welches, vor allem am Ende der Hauptgärung, in so großen Mengen anfällt, daß es von der Hefezelle ausgeschieden wird. Abhängig von der Gärführung bzw. von dem in der Würze gelösten Sauerstoff, wird α-Acetolactat spontan durch oxidative Decarboxylierung in Diacetyl umgewandelt, welches frisch vergorenem Bier einen unangenehmen Geschmack verleiht. Während der Reifung bzw. Nachgärung wird von den verbliebenen Hefezellen Diacetyl wieder aufgenommen, um es mit Hilfe des Enzyms Diacetylreduktase zu Acetoin und weiter durch Acetoinreduktase zu Butandiol zu reduzieren (siehe Abb. in (5)). Der Geschmacksschwellenwert beider Substanzen ist im Gegensatz zu Diacetyl sehr hoch, so daß sie keinen Einfluß auf das Bieraroma haben. Unter der Voraussetzung, daß auch während der Nachgärung noch aktive und gärfähige Hefe vorhanden ist, wird der Diacetyl-Gehalt unter 0,1 mg/l gedrückt.

Um den Reifungsprozeß zu beschleunigen und damit die Lagerzeit zu verkürzen, bietet sich zum einen an, durch Mutation die Synthese von α-Acetolactat einzuschränken (3), was jedoch dazu führt, daß die Hefe zumindest teilweise bedürftig für Valin, Isoleucin und Leucin werden würde, was wohl durch die Würzeinhaltsstoffe gedeckt werden kann. Allerdings reichert sich, neben Brenztraubensäure, auch α-Ketobutyrat an, was schließendlich zu Propanol führt; das fertige Getränk würde also nach Lösungsmittel schmecken. Da andererseits gezeigt werden konnt, daß durch Zusatz von α-Acetolactat-Decarboxylase zu gärender Würze die Bierreifung auf ca. 24 Stunden verkürzt werden kann (4), bietet es sich an, die Erbinformation für dieses Enzym durch in vitro-Rekombination in Hefe einzubringen. Da Hefe dieses Enzym nicht bildet und daher das entsprechende Gen nicht besitzt, wurde als Spenderorganismus das lebensmittelrechtlich unbedenkliche Milchsäurebakterium Streptococcus diacetylactis verwendet (5), welches seit langem bei der Reifung von Milchprodukten zum Einsatz gelangt.

Zur Isolation des α-Acetolactat-Decarboxylase-Gens wurde die gesamte Erbinformation aus S. diacetylactis isoliert, in Fragmente zerlegt (durch ein Restriktions-

enzyms) und mit Hilfe eines entsprechenden genetischen Vektors in den Zwischenwirt E. coli transferiert. Da E. coli Acetoin-negativ ist, α-Acetolactat-Decarboxylase also nicht besitzt, war es relativ einfach, aus den Transformanten einen Klon zu selektieren (mit Hilfe der Voges-Proskauer-Reaktion), der Acetoin-positiv ist. Diese Acetoin-Bildung wurde auch gaschromatographisch bestätigt (5). Nach Eingrenzung des α-Acetolactat-Decarboxylase-Gens auf dem zufälligerweise isolierten Fragment wird nun dieses aus S. diacetylactis stammende Gen mit einem hefespezifischen Promotor bzw. Terminator versehen, um es auch in Hefe funktionsfähig zu machen. Entsprechende Brauversuche werden zeigen, ob es tatsächlich möglich ist, mit Hilfe einer α-Acetolactat-Decarboxylase-tragenden Hefe den Diacetyl-Gehalt von Jungbier erheblich zu verringern.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es durch die Entwicklung der letzten Jahre möglich geworden ist, Mikroorganismen, nicht nur durch Mutation, sondern auch durch induzierte Rekombination, zu optimieren. Abhängig von dem Zielorganismus und der zu optimierenden Eigenschaft wird auszuwählen sein, welche der angesprochenden Rekombinationsmethoden zum Erfolg führt. Im Gegensatz zur in vivo-Rekombination hat die Gentechnik den Vorteil, daß einzelne Eigenschaften selektiv übertragen werden können, ohne die Rezipientenzelle in ihren natürlichen Merkmalen zu verändern.

(1) Esser, K. und U. Stahl: Hybridization. In: H. J. Rehm and G. Reed (eds.): Handbook of Biotechnology, Vol. 1, pp 305 - 329. Weinheim, Basel: Verlag Chemie (1981)

(2) Seki T., E.-H. Choi und D. Ryu: Construction of killer wine yeast strain. Appl. Env. Microbiol. 49 , 1211 - 1215 (1985)

(3) Holmberg, S. : Genetic improvement of brewers` yeast Trends in Biotechnol. 2, 98 - 102, (1984)

(4) Godtfredsen, S. E., A. Munk Rasmussen, M. Ottesen, P. Rafin und N. Peitersen: Occurrence of α-acetolactate decarboxylases among lactic acid bacteria and their utilization for maturation of beer Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, 23 - 28, (1984)

(5) Goelling ,D. und U. Stahl : Cloning and Expression of an α- Acetolactate Decarboxylase Gene from Streptococcus lactis subsp. diacetylactis in Escherichia coli Appl. Env. Microbiol. 54, 1889 - 1891, (1988)