

2 Grundlagen und Kenntnisstand

2.1 Weinreben

Die Weinrebe ist aus botanischer Sicht eine hochrankende Schlingpflanze, die als Wildrebe in lichten Wäldern wächst und große Ausmaße erlangen kann. Sie gehört zur Familie der Weinrebengewächse (*Vitaceae*), welche etwa 800 verschiedene Arten umfasst, die überwiegend als Kletterpflanzen oder Lianen, seltener in Form von Sträuchern oder Bäumen mit sukkulenten Stämmen, auftreten. Die Klettersträucher sind meist sommergrün und besitzen verzweigte oder unverzweigte Ranken (HILLEBRAND, 1978).

Fossile Funde zeigen, dass Reben schon seit etwa 80 Millionen Jahren existieren. Die Echte Weinrebe (*ssp. vinifera*), die auf die Wildrebe *Vitis silvestris* zurückzuführen ist, wird vermutlich seit etwa 5000 Jahren kultiviert (VOGT, 1977). Aufgrund von Mutation, Selektion und Kreuzung gibt es zahlreiche Sorten, von denen aber nur wenige angebaut werden (AICHELE und SCHWEGLER, 2000).

Mit ihren Früchten als Quelle von Wein ist *Vitis vinifera ssp. vinifera* einer der bekanntesten und wirtschaftlich bedeutendsten Vertreter der Weinrebengewächse. Die 5-12 cm breiten Blätter sind fünfblappig, grob gezähnt und befinden sich gegenständig an den Trieben. Die Sprossen sind sympodial angeordnet. Die Blüten der Weinrebe bestehen aus einem kurzen Kelch mit fünf Kronblättern und wachsen in geschlossenen Blütenständen, den sogenannten Rispen. Nach der Blütezeit im Juni bilden die oberständigen Fruchtknoten saftige gelbgrüne oder blauviolette Beeren aus, die hartschalige Samen enthalten und im September oder Oktober reif werden (AICHELE und SCHWEGLER, 2000, HECKER, 1985, HILLEBRAND, 1978). Abbildung 2.1 stellt einen einjährigen Weinrebetrieb dar.



Abbildung 2.1: Einjähriger Weinrebetrieb (©Rainer Sturm/pixelio.de)

Weinreben können 200-300 Jahre alt werden und entwickeln dabei dicke Stämme. Sie wachsen auf fast allen Böden in gemäßigtem Klima (Jahresdurchschnittstemperatur von 9 °C) (HILLEBRAND, 1978). Die besten Bedingungen herrschen in den warm-gemäßigten Zonen, wie z.B. in Kalifornien, in Südafrika oder im Mittelmeerraum. In feucht-warmen Klimazonen treten vermehrt Pilzkrankheiten auf, wogegen in trockenen Klimazonen die Entwicklung tierischer Schädlinge begünstigt ist (VOGT, 1977).

Die Früchte der Weinrebe werden als frische Tafeltrauben oder getrocknet als Rosinen verspeist. Sie können auch zu Traubensaft oder fermentativ zu alkoholischen Getränken wie Wein und Schaumwein (Keltertrauben) oder weiter zu Essig verarbeitet werden. Aus den Kernen wird Traubenkernöl und aus den Beerenhülsen sowie dem Tester wird durch eine ethanolische Extraktion der Lebensmittelzusatzstoff E 163 gewonnen. E 163 setzt sich aus den Pflanzenfarbstoffen der Traube, den Anthocyanen (Polyphenole) zusammen und wird zum Färben von Lebensmitteln verwendet.

2.2 Stilbene

Stilbene gehören zu der Klasse der nichtflavonoiden Polyphenole. Unter der Bezeichnung „Polyphenole“ werden Verbindungen zusammengefasst, die zwei oder mehr aromatische Hydroxylgruppen im Molekül besitzen. Es handelt sich um unterschiedliche Substanzklassen, deren Übersicht in Abbildung 2.2 dargestellt ist. Polyphenole werden zu den sekundären Pflanzenstoffen gezählt. Sie tragen in vielen Obst und Gemüsesorten als bioaktive Substanzen zum Geschmack und zur Farbgebung bei (FRAGA, 2010).

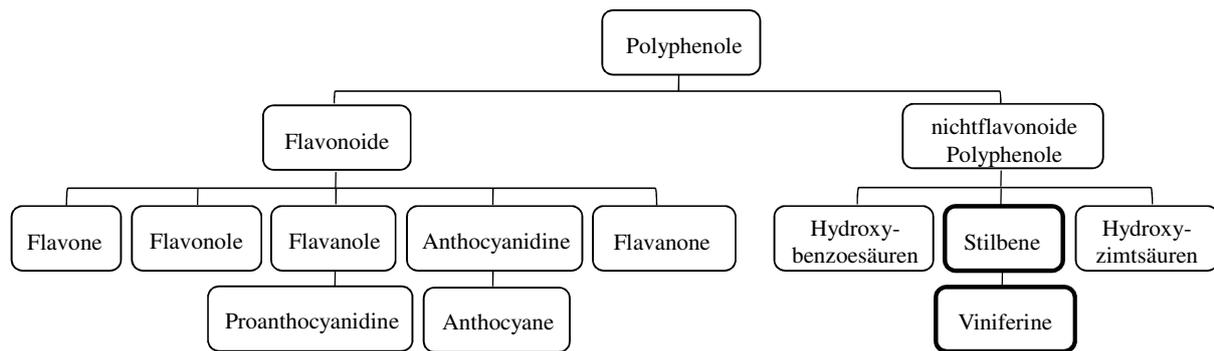


Abbildung 2.2: Übersicht über polyphenolische Substanzklassen (nach IRITI und FAORO, 2009)

Stilbene sind sauerstoff-, temperatur- und lichtempfindliche Verbindungen. Ihr Grundgerüst besteht aus einem C-14-Körper, welcher sich aus zwei Phenylringen, die durch eine Ethylenbrücke verbunden sind, zusammensetzt. In Pflanzen kommen Stilbene neben freien Hydroxyverbindungen auch als Methylester (Pterostilbene) oder in glycosilierter Form vor. Das bekannteste und meist erforschte Stilben ist das Resveratrol (3,4',5-Trihydroxystilben). Es kann in zwei isomeren Formen (*trans*- und *cis*-konfiguriert) sowie als Aglycon oder β -glucosiliertes Piceid (3,4',5-Trihydroxystilben-3- β -D-glucosid) vorliegen (HART, 1981). In Abbildung 2.3 werden die chemischen Strukturen verschiedener Stilbene vorgestellt. Die Isomere des Resveratrols sind in Form des *trans*-Resveratrols (**1**), *cis*-Resveratrols (**2**) und des *trans*-Piceids (**3**) abgebildet. Ein bekanntes Resveratrol-Derivat ist das 3,3',4',5-Tetrahydroxystilben Piceatannol (**4**), welches eine zusätzliche Hydroxygruppe trägt. Stilbene werden des Weiteren als oligomere Verbindungen, den sogenannten Viniferinen, in Pflanzen nachgewiesen. Sie entstehen durch oxidative Kopplung des Monomers Resveratrol und auch weiteren Stilbenoligomeren (vergl. Abschnitt 2.4). Beispiele für bekannte Resveratrol-Dimere (**5**, **6**, **7**, **8**, **9**), Trimere (**10**, **11**) und Tetramere (**12**, **14**) sind ebenfalls in Abbildung 2.3 zu finden. Bei den größten, bis heute strukturell vollständig aufgeklärten Oligomeren handelt es sich um Resveratrol-Octamere wie z.B. das Vatriaphenol A (**13**). Dieses Stilben wurde jedoch nicht aus *Vitis vinifera*, sondern aus der Rinde von *Vateria indica*, einer Dipterocarpaceae isoliert (ITO et al., 2001). Ein detaillierter Überblick über Stilbenoligomere wurde von CICHEWICZ und KOUZI (2002) sowie von YOSHIAKI und MASATAKE (2001) zusammengestellt.

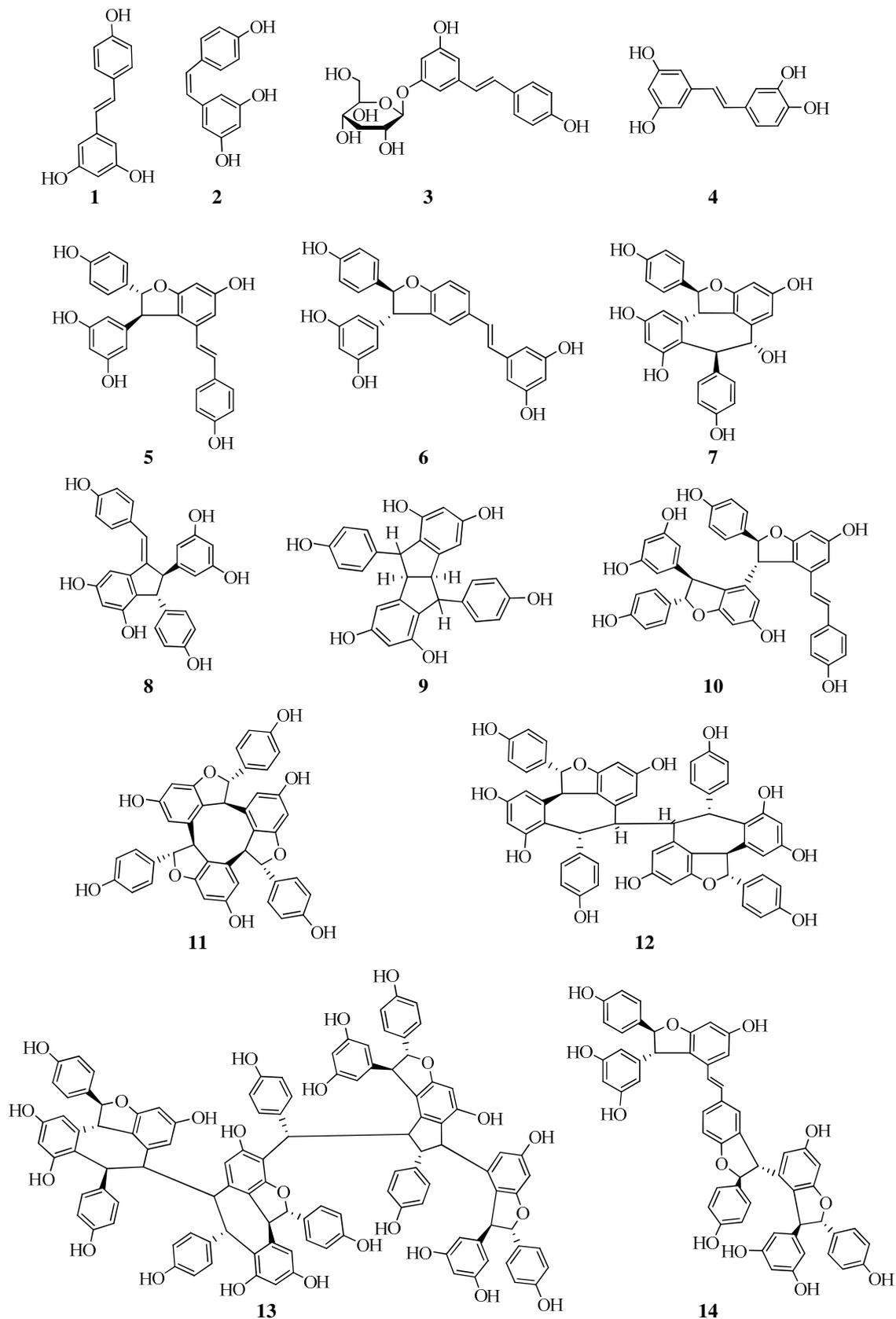


Abbildung 2.3: Chemische Strukturen von *trans*-Resveratrol (1), *cis*-Resveratrol (2), *trans*-Piceid (3), *trans*-Piceatannol (4), *trans*- ϵ -Viniferin (5), *trans*- δ -Viniferin (6), Ampelopsin A (7), Partenocissin A (8), Pallidol (9), Miyabenol C (10), α -Viniferin (11), Hopeaphenol (12), Vateriaphenol A (13), *r*-Viniferin (14)

SOTHEESWARAN und PASUPATHY (1993) verfassten eine einfache, dichotomische Klassifizierung, bei der Stilbenoligomere anhand eines Strukturmerkmals unterschieden werden. Zu der „Gruppe A“ gehören demnach Stilbene, die ein oder mehrere 2,3-Dihydrobenzofuransysteme enthalten, wie z.B. das Resveratrol-Dimer *trans-ε*-Viniferin (Abbildung 2.3, 5). Die „Gruppe B“ bilden alle Verbindungen ohne dieses Ringsystem (vergl. Abbildung 2.3, Pallidol 9). Des Weiteren kann die Einteilung auf die unterschiedliche Biogenese der Substanzen übertragen werden. Stilbenoligomere der Gruppe A werden ausnahmslos über das Intermediat *trans-ε*-Viniferin gebildet, während die Verbindungen der Gruppe B direkt aus Resveratrol-Einheiten ohne Bildung des Intermediates aufgebaut werden (ITO et al., 2005). In den folgenden Kapiteln wird die Substanzklasse der Stilbene näher erläutert.

2.2.1 Biosynthese und Vorkommen von Stilbenen

Biosynthese von Stilbenen

Stilbenoide entstammen dem generellen Phenylpropanoid-Stoffwechsel. Alle höheren Pflanzen können die für die Biosynthese benötigten Vorstufen Malonyl-CoA und CoA-veresterte Zimtsäurederivate synthetisieren, jedoch nur wenige Pflanzenarten sind zur Bildung von Stilbenoiden fähig (CHONG et al., 2009).

Das Schlüsselenzym für die Biosynthese von Stilbenen ist die Stilbensynthase (STS), welche nicht kontinuierlich exprimiert, sondern überwiegend infolge des Abwehrmechanismus der Pflanze als Antwort auf Stressfaktoren gebildet wird. Sie benötigt die gleichen Prekursoren wie die Chalconsynthase (CHS), ein essentielles Enzym, das an der Biosynthese von Chalconen, einer Vorstufe der Flavonoide, beteiligt ist. Beide Enzyme gehören zur Familie der Polyketidsynthasen (PKS) und unterscheiden sich in ihren Sequenzen lediglich an 35 Aminosäure-Positionen. Während das Enzym CHS ubiquitär in Pflanzen vorkommt, sind nur wenige Pflanzen in der Lage, die STS zu exprimieren (GORHAM, 1995, SCHRÖDER et al., 1993, TROPF et al., 1994, JEANDET et al., 2002).

Die anfänglichen Schritte der Stilbenoid- und Flavonoid-Synthese (Abbildung 2.4) sind äquivalent. Aus einem CoA-veresterten Zimtsäurederivat wird durch eine Kondensationsreaktion mit drei Malonyl-CoA das lineare Tetraketid-Intermediat Styryl-3,5,7-triketoheptansäure gebildet.

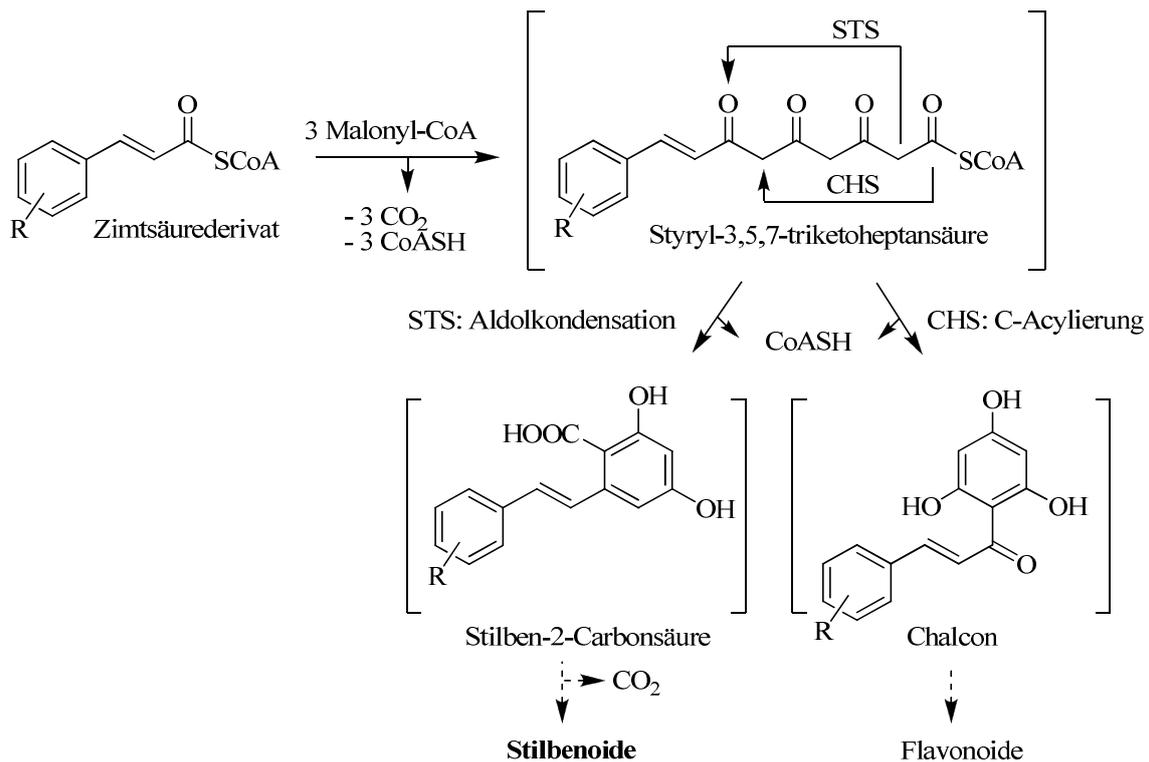


Abbildung 2.4: Schema des gemeinsamen Biosyntheseweges von Stilbenoiden und Flavonoiden (nach GORHAM, 1995 und TROPF et al., 1994)

Bei dem anschließenden intramolekularen Ringschluss des Intermediates trennen sich die beiden Biosynthesewege. Mittels STS katalysierter Aldolkondensation entsteht eine Stilben-2-Carbonsäure. Es folgt eine Abspaltung der endständigen Carboxyl-Gruppe in Form von Kohlendioxid, welches bei der Chalconsynthese-Reaktion nicht stattfindet. Durch die Decarboxylierung zum Stilbenoid entsteht ein C₆-C₂-C₆-Körper. Ein Phenylring der C₆-C₂-C₆-Grundstruktur stammt hierbei von dem Zimtsäurederivat, der andere Phenylring ist aus den drei Malonyl-CoA-Einheiten aufgebaut. Die CHS katalysiert hingegen eine C-Acylierung (Claisen-Kondensation), bei der ein Chalcon entsteht. Das Chalcon (C₆-C₃-C₆) wird zu dem Flavanon Naringenin konvertiert, welches eine Vorstufe für Flavone, Flavonole, Flavanole und Anthocyane ist (GORHAM, 1995, CHONG et al., 2009).

Die Aktivitäten der Enzyme STS und CHS werden abhängig von dem Entwicklungsstadium der Pflanze unterschiedlich reguliert. Während der Reifung nimmt die Stilbenakkumulation in den Trauben ab, während die Synthese von Anthocyanen zunimmt. Die rote Farbe der Trauben wird gebildet und gleichzeitig steigt aufgrund der geringeren Resveratrol-Konzentration die Empfindlichkeit gegenüber Grauschimmel an. Kommt es jedoch während der Erntezeit zu einer Grauschimmelfektion, wird die Synthese von

Resveratrol forciert, ohne die Farbentwicklung negativ zu beeinflussen (IRITI und FAORO, 2009, JEANDET et al., 1995b).

Aufgrund der Fähigkeit von Stilbenen, der Weinrebe Resistenzen gegen Krankheiten zu verleihen, gerät der STS-Gen-Transfer und somit die Herstellung von transgenen Pflanzen immer mehr in den Fokus des Interesses. Die Toleranzen der Pflanzen gegen pathogene Mikroorganismen sollen somit erhöht und die Qualität der gewonnenen Lebensmittel durch eine vermehrte Expression von bioaktiven Inhaltsstoffen gesteigert werden. Erste positive Ergebnisse von Stilbenexpression in neuen transgenen Pflanzen konnten bereits erzielt werden (JEANDET et al., 2002, THOMZIK et al., 1997, SCHRÖDER et al., 1993). So gelang es HAIN et al. (1993) erstmals, das aus Weinreben isolierte Stilbensynthase-Gen in die Tabakpflanze zu transferieren. Die Tabakpflanzen zeigten anschließend eine größere Resistenz gegen Infektionen von *Botrytis cinerea*.

Vorkommen von Stilbenen

Resveratrol und seine Derivate können von verschiedenen Pflanzenarten synthetisiert werden. Neben Weintrauben und Weinreben enthalten z.B. auch Erdnüsse, Pistazien, Kakaobohnen, Heidelbeeren, Cranberries, Maulbeeren, Jackfrüchte, Rhabarber, Hopfen, Eukalyptus sowie verschiedene Liliengewächse, Hülsenfrüchte, Kiefern und Süßgräser das Monomer Resveratrol und seine Derivate (AGGARWAL und SHISHODIA, 2006).

Die absoluten Gehalte der Stilbene sind in den einzelnen Pflanzen sehr unterschiedlich. Die höchsten Konzentrationen von Resveratrol wurden in Weintrauben und den zugehörigen Produkten (siehe Abschnitt 2.2.4) sowie dem japanischen Knöterich (*Polygonum cuspidatum*) gefunden. In den Wurzeln von *Polygonum cuspidatum*, welche zur Zubereitung des in Asien verbreiteten „Itadori-Tees“ verwendet werden, wurden *trans*-Resveratrolgehalte von bis zu 523 mg/kg und *trans*-Piceidgehalte von bis zu 1655 mg/kg bestimmt. Geröstete Erdnüsse und Erdnussbutter enthielten bis zu 0,08 mg/kg und 0,5 mg/kg *trans*-Resveratrol (BURNS et al., 2002). *Trans*-Piceid wurde in Erdnussbutter in Konzentrationen von 0,2-4,0 mg/kg gefunden (IBERN-GOMEZ et al., 2000). Ähnliche Gehalte wie in Erdnüssen wurden mit ca. 0,5 mg *trans*-Resveratrol pro Kilogramm sowie zusätzlich etwa 1-2 mg *trans*-Piceid pro Kilogramm in Hopfen (CALLEMIEN et al., 2005) und auch in Schokolade (COUNET et al., 2006) detektiert. Des Weiteren konnten *trans*-Resveratrolgehalte von bis zu 1,6 mg/kg in Pistazien nachgewiesen werden (TOKUSOGLU et al., 2005). Die Gehalte von Preissel-, Blau- und Heidelbeeren lagen bei 0,03 mg/kg (WANG et al., 2002a, LYONS et al., 2003).

Einige wichtige Nutzpflanzen wie Kartoffeln, Reis, Mais, Roggen, Weizen oder Hafer sind nicht zur Biosynthese von Stilbenen fähig und enthalten folglich keine dieser Verbindungen. Bei üblicher westlicher Ernährungsweise, bei der der Konsum von Itadori-Tee nicht eingeschlossen ist, kann unter Berücksichtigung der maximalen Gehalte von Resveratrolderivaten in Weinen, Trauben, Erdnüssen sowie Blau- und Heidelbeeren von einer maximalen täglichen Zufuhr zwischen 2-10 mg ausgegangen werden (SOMOZA, 1999).

2.2.2 Funktion von Stilbenen in der Pflanze

Stilbenoide sind ein Bestandteil des Abwehrsystems der Pflanze und werden als Reaktion auf Stressfaktoren wie z.B. Pilzbefall, Verletzung durch Insekten oder starke UV-Einstrahlung synthetisiert. Sie gehören zu der Gruppe der Phytoalexine, bei denen es sich um antimikrobiell wirksame Verbindungen handelt, die die Ausbreitung und das Wachstum von mikrobiellen Infektionen hemmen. Die potente, antimikrobielle Wirkung des Monomers Resveratrol ist seit Jahren bekannt und bei einigen seiner oligomeren Derivate wie z.B. *trans- ϵ -Viniferin* und *α -Viniferin* konnten hohe Phytoalexinaktivitäten nachgewiesen werden (JEANDET et al., 1995a, LANGCAKE, 1981). Die einzelnen Phasen der Pflanzenabwehr sollen im Folgenden am Beispiel einer mikrobiellen Infektion beschrieben werden.

Bei einer mikrobiellen Infektion der Pflanze wird die Expression des Enzyms Stilbensynthase erhöht, wodurch es zu einer schnellen, lokalen Akkumulation von Resveratrol um den betroffenen Bereich kommt. Bereits nach 24 h ist die Höchstkonzentration von Resveratrol erreicht. Anschließend wird das Monomer von der Pflanze in verschiedenste Oligomere metabolisiert, welches ein mehrstufiger, oxidativer Prozess ist (vergl. Abschnitt 2.4). Die entstehenden Stilbenoligomere besitzen unterschiedlichste antimikrobielle Aktivitäten und sorgen somit für ein breites Wirkungsspektrum gegenüber einer Vielzahl von Mikroorganismen.

Ein weiterer möglicher Grund für die Oligomerisierung des Resveratrols in der Pflanze ist seine inhibierende Wirkung auf die Photosynthese. Somit kann die oxidative Metabolisierung des Monomers als Entgiftung angesehen werden. Die Konzentration des freien Resveratrols sinkt, wodurch eine Inhibierung der Photosynthese verhindert wird. Die Stilbenoligomere werden anschließend in Form von Vesikeln gespeichert, in deren Umgebung keine Photosynthese stattfindet (CICHEWICZ und KOUZI, 2002, SOLEAS et al., 1997).