

Über die Bildung von Äthanol und einigen Aromastoffen bei Modellgärversuchen in Abhängigkeit von der Aminosäurenkonzentration

von

A. RAPP und H. FRANCK

In früheren Arbeiten mit Modellgärversuchen konnten wir nachweisen, daß die einzelnen Stickstoffverbindungen (Aminosäuren und Ammoniumsalze) den Hefestoffwechsel bzw. die Bildung von Gärungsprodukten nachhaltig beeinflussen. Diese Wirkung erstreckt sich sowohl auf Haupt- als auch auf Nebenprodukte der alkoholischen Gärung. Den Einfluß verschiedener N-Quellen konnten wir hinsichtlich der mengenmäßig unterschiedlichen Bildung von Äthanol und Glycerin (RAPP 1965), Butanolen und Pentanolen (RAPP 1965, DRAWERT und RAPP 1964) sowie Äpfelsäure (RAPP 1965, DRAWERT, RAPP und ULRICH 1965 a) und Weinsäure (DRAWERT, RAPP und ULRICH 1965 b) nachweisen. Weiterhin konnten wir zeigen, daß die einzelnen Aminosäuren während der alkoholischen Gärung nicht nur einen Einfluß auf die Bildung der Fuselöle ausüben, sondern auch für den Aufbau von Alkoholen und Estern verwertet werden. So fanden wir u. a., daß sowohl Äthanol als auch eine Reihe flüchtiger Aromastoffe aus dem Kohlenstoffgerüst der Asparaginsäure und Glutaminsäure gebildet werden (RAPP 1965, DRAWERT, RAPP und ULLEMEYER 1967).

Mit der Bildung höherer Alkohole während der alkoholischen Gärung beschäftigen sich zahlreiche Autoren, auf deren vollzählige Nennung hier verzichtet wird, zumal erschöpfende Übersichten abgefaßt sind (REIFF *et al.* 1960 und 1962, COOK 1958, RUHLAND 1960). Über die Bildung von Propanol-1 aus α -Aminobuttersäure berichteten INGRAHAM und GUYMON (1960), GUYMON *et al.* (1961 a) und KUNKEE *et al.* (1966). Mit Tracer-Experimenten konnten INGRAHAM *et al.* (1961) zeigen, daß n-Butanol aus α -Keto-n-valeriansäure gebildet wird. YOSHIZAWA (1964, 1965) hat in zahlreichen Arbeiten die Bildung der höheren Alkohole untersucht, so u. a. die Bildung von i-Butanol aus α -Acetomilchsäure, von i-Butanol und i-Amylalkohol aus Brenztraubensäure und α -Keto-i-valeriansäure. Weiterhin berichtete er über den Einfluß von pH, Gärtemperatur, Belüftung und zwei Casaminsäurekonzentrationen (5 g/l und 0,5 g/l) auf die Bildung von i-Butanol und i-Amylalkohol (YOSHIZAWA 1966). ÄYRÄPÄÄ (1965) untersuchte in synthetischen Nährmedien die Bildung von 2-Methylbutanol-1 und 3-Methylbutanol-1. In komplexen Aminosäurengemischen fand er keinen Zusammenhang zwischen dem Verhältnis beider Alkohole und dem von Leucin und i-Leucin. SUOMALAINEN und KAHANPAA (1963) beschäftigten sich mit dem Einfluß der Aminosäuren auf die Alkohole mit verzweigten Ketten. WATSON und HOUGH (1966) untersuchten den Einfluß der Hefekonzentration auf die Fuselölbildung; GUYMON *et al.* (1961 b) stellten eine Erhöhung derselben nach Belüftung fest. OUGH *et al.* (1966) fanden, daß bei der Vergärung von Traubensäften die i-Butanolbildung praktisch nicht und die der beiden i-Amylalkohole nur geringfügig von der Gärtemperatur beeinflußt wird. RANKINE (1967) beschäftigte sich mit der Bildung von Propanol, i-Butanol und Gärungsamylalkohol bei der Vergärung von Traubmosten mit 11 verschiedenen Hefestämmen und bestimmte die Geschmacksschwellenwerte dieser Fuselöle. Dieser Wert liegt für i-Amylalkohol bei etwa 300 ppm, für i-Butanol und Propanol über 500 ppm.

Bei der Auslese von Rebenneuzüchtungen ist die Kenntnis des für die Äthanol- und Fuselölbildung erforderlichen Stickstoffbedarfs von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir deshalb, bei sonst gleicher Zusammensetzung der Nährlösung, den Einfluß unterschiedlicher Aminosäurenkonzentrationen auf die Bildung von Äthanol, Essigsäure-äthylester, Propanol-1, 2-Methyl-propanol-1 und Gärungsamylalkohol (3-Methyl-butanol-1 und 2-Methyl-butanol-1). Über die Auswirkung dieser Versuchsbedingungen auf die Entstehung weiterer, in sehr geringen Konzentrationen auftretender Aromastoffe werden wir in Bälde berichten.

Material und Methoden

Gäransätze

400 g D-Glucose und 150 ml 10fach konzentriertes Basalmedium (dieses ohne Glucose und N-Zusatz) nach WICKERHAM (1951) wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Zur Erreichung der gewünschten Aminosäurenkonzentration wurden 250 bzw. 500 ml dieser doppelt konzentrierten Nährlösung mit einer konzentrierten Aminosäurenlösung und bidestilliertem Wasser auf 500 bzw. 1000 ml aufgefüllt. Nach dem Sterilisieren wurde diese Lösung mit 0,5 ml einer Hefesuspension (Aufschwemmung von 1 Woche alten Hefekulturen mit steriler physiologischer NaCl-Lösung) von *Saccharomyces cerevisiae* Stamm H₂ versetzt. Die Gäransätze verblieben 3—4 Wochen bei 25° C. — Zur Untersuchung der Äthanol- und Fuselölbildung im Laufe der alkoholischen Gärung wurden von einigen Gäransätzen in Abständen von 1—2 Tagen unter sterilen Bedingungen 5 ml-Proben entnommen. — Nach Beendigung der Gärung wurden die Proben zentrifugiert, die Hefe 3mal mit destilliertem Wasser gewaschen und zur Bestimmung des Trockengewichtes gefriergetrocknet. Die zentrifugierten Lösungen wurden gaschromatographisch untersucht.

In Tabelle 1 ist die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Versuchsansätze dargestellt. Von den Versuchen 1 bis 4 wurden im Verlauf der Gärung mehrmals Proben entnommen und sowohl die gebildeten flüchtigen Komponenten als auch die noch vorhandenen Aminosäuren bestimmt.

Gaschromatographische Analyse

Die Analysen wurden mit einem Siemens-Universalgaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor durchgeführt. Zur quantitativen Bestimmung des gebildeten Äthanol wurden 3 μ l der Lösung direkt auf die Trennsäule gegeben (3,2 m, 20% Sebacinsäure-di-(2-äthylhexyl)-ester auf Kieselgur; 100° C; 100 ml Wasserstoff reinst/min, davon 30 ml/min zum Flammenionisationsdetektor). Von jeder Probe wurden 5 Äthanolbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung des Äthanolpeaks erfolgte mit einem Digital-Auswertegerät (Fa. Siemens) zur automatischen Peakhöhen- und Peakflächenbestimmung. Zur quantitativen Ermittlung von Essigsäure-äthylester, Propanol-1, 2-Methyl-propanol-1 und Gärungsamylalkohol (3-Methyl-butanol-1 und 2-Methyl-butanol-1 wurden auf der benutzten Trennsäule nicht getrennt und als eine Komponente bestimmt) wurden 20 μ l der Trennsäule direkt zugeführt (3,2 m, 17% Carbowax 1500 auf Chromosorb G NAW; 90° C; 100 ml Wasserstoff reinst/min, davon 25 ml/min zum FID). Der relative Fehler bei der Äthanolbestimmung beträgt $\pm 3\%$, bei der Bestimmung der übrigen Fuselöle ± 4 bis 5%.

Ergebnisse und Diskussion

Aus Tabelle 2 ist die Abnahme der Aminosäuren in Nährlösungen während der alkoholischen Gärung ersichtlich. Dabei zeigt sich, daß bereits 3 Tage nach der In-

Tabelle 1
Aminosäurezusammensetzung der Nährlösungen in mg/l

Aminosäure	Versuch Nr.				Versuch Nr.						Versuch Nr.			Versuch Nr.		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Arginin	26	52	156	260	17	50	83	166	131	827	83	83	83	50	50	50
Asparaginsäure	11	22	66	110	4	12	20	40	80	200	20	20	20	12	12	12
Threonin	11	22	66	110	4	12	20	40	80	200	20	20	20	12	12	12
Serin	24	48	144	240	15	45	75	150	300	750	75	75	75	45	45	45
Glutaminsäure	15	30	90	150	8	24	40	80	160	400	40	540	1040	24	524	1024
Prolin	16	32	96	160	8	24	40	80	160	400	40	40	40	24	24	24
Alanin	11	22	66	110	8	24	40	80	160	400	40	40	40	24	24	24
Valin	3	6	18	30	1	3	5	10	20	50	5	5	5	3	3	3
Leucin	3	6	18	30	1	3	5	10	20	50	5	5	5	3	3	3
Isoleucin	111	23	69	115	3	7	13	25	50	125	13	13	13	7	7	7
Tyrosin	1	2	6	10	<1	<1	1	2	4	10	1	1	1	<1	<1	<1
Phenylalanin	9	18	54	90	4	12	20	40	80	200	20	20	20	12	12	12
Gesamt-Aminosäure	141	283	849	1415	72	216	362	723	1445	3612	362	862	1362	216	716	1216
entspricht mg N/l	22	44	131	219	12	36	60	121	242	603	60	108	135	36	84	131

Tabelle 2
Aminosäurezusammensetzung der Nährlösungen in mg/l im Verlaufe von Modellgärversuchen

Aminosäure	Versuch Nr. 1					Versuch Nr. 2					Versuch Nr. 3					Versuch Nr. 4				
	Tage nach Inkubation					Tage nach Inkubation					Tage nach Inkubation					Tage nach Inkubation				
	0	3	7	11	14	0	3	7	11	14	0	3	7	11	14	0	3	7	11	14
Arginin	26	3	<1	<1	—	52	4	2	<1	<1	156	38	<1	2	4	260	108	77	80	64
Asparaginsäure	11	<1	<1	<1	—	22	2	<1	<1	<1	66	<1	<1	2	<1	110	13	2	3	2
Threonin	11	<1	<1	<1	—	22	2	<1	<1	<1	66	2	2	2	<1	110	22	2	3	2
Serin	24	<1	<1	<1	—	48	2	<1	<1	<1	144	4	2	2	1	240	53	10	8	5
Glutaminsäure	15	<1	<1	<1	—	30	<1	<1	<1	<1	90	2	1	<1	1	150	45	2	4	2
Prolin	16	11	4	<1	—	32	40	10	6	2	96	98	100	100	90	160	155	150	150	145
Alanin	11	2	<1	<1	—	22	3	2	<1	<1	65	33	21	22	20	110	60	39	45	40
Valin	3	<1	<1	<1	—	6	<1	<1	<1	<1	18	1	<1	<1	<1	30	8	1	<1	<1
Leucin	3	<1	<1	<1	—	6	<1	<1	<1	<1	18	<1	<1	<1	<1	30	3	<1	<1	<1
Isoleucin	11	<1	<1	<1	—	23	<1	<1	<1	<1	69	<1	<1	<1	<1	115	11	<1	<1	<1
Tyrosin	1	<1	<1	<1	—	2	<1	<1	<1	<1	6	1	<1	<1	<1	10	4	2	1	<1
Phenylalanin	9	<1	<1	<1	—	18	<1	<1	<1	<1	54	1	<1	<1	<1	90	17	<1	2	<1
Gesamt- aminosäure	141	16	4	+	—	283	53	14	6	2	849	180	126	130	116	1415	484	285	296	260

Tabelle 3
 Bildung von flüchtigen Komponenten in Modellgärversuchen mit unterschiedlicher Aminosäurenkonzentration
 während des Gärverlaufs

Gärungsprodukte	Versuch Nr. 1				Versuch Nr. 2				Versuch Nr. 3				Versuch Nr. 4			
	Anfangs-Aminosäuren-Konzentration: 141 mg/l				Anfangs-Aminosäuren-Konzentration: 283 mg/l				Anfangs-Aminosäuren-Konzentration: 849 mg/l				Anfangs-Aminosäuren-Konzentration: 1415 mg/l			
	Tage nach Inkubation				Tage nach Inkubation				Tage nach Inkubation				Tage nach Inkubation			
	3	9	11	14	3	9	11	14	3	9	11	14	3	9	11	14
Äthanol (g/l)	4,5	13,0	20,2	26,2	7,5	30,6	35,9	40,3	15,0	53,7	61,2	65,9	16,1	67,7	72,6	75,6
Essigsäure- äthylester (mg/l)	5	8	5	9	7	8	12	14	20	20	24	27	32	23	27	30
Propanol-1 (mg/l)	2	3	2	2	2	3	4	6	11	13	13	14	16	16	17	18
i-Butanol ¹⁾ (mg/l)	7	14	8	12	11	15	19	25	38	45	52	56	51	59	66	69
Gärungsamyl- alkohol (mg/l) ²⁾	43	89	68	87	67	87	107	133	106	128	142	159	135	144	159	168

¹⁾ 2-Methyl-propanol-1.

²⁾ 2-Methyl-butanol-1 + 3-Methyl-butanol-1.

Tabelle 4
 Bildung von flüchtigen Komponenten in Modellgärversuchen mit unterschiedlicher Aminosäurenkonzentration

	Versuch Nr.						Versuch Nr.			Versuch Nr.		
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Anfangs-Aminosäuren- Konzentration (mg/l)	72	216	362	723	1445	3612	362	862	1362	216	716	1216
entspricht N (mg/l)	12	36	60	121	242	603	60	108	135	36	84	131
Äthanol (g/l)	14,7	41,5	53,7	74,6	72,0	76,5	59,4	62,0	74,6	39,2	61,2	75,9
Essigsäure-äthylester (mg/l)	3	7	9	14	10	11	17	18	14	6	10	26
Propanol-1 (mg/l)	1	3	5	8	17	16	6	7	9	3	5	9
i-Butanol ¹⁾ (mg/l)	7	24	37	50	81	98	39	42	41	19	41	55
Gärungsamylalkohol ²⁾ (mg/l)	53	130	142	162	151	137	152	127	135	104	123	155

¹⁾ 2-Methyl-propanol-1.

²⁾ 2-Methyl-butanol-1 + 3-Methyl-butanol-1.

kubation ein beachtlicher Teil der Aminosäuren von den Hefen verbraucht ist (in Versuch 4 wurden 931 mg Aminosäuren und 669 mg Aminosäuren in Versuch 3 aufgenommen). Nach 7 Tagen ist die Aminosäureaufnahme weitgehend abgeschlossen, wie aus Versuch 3 und 4 deutlich zu sehen ist. In den Versuchen mit höherem Aminosäureangebot (4 und 3) werden alle Aminosäuren außer Prolin gut verwertet. Nur in Gäransätzen mit geringem Gesamtaminosäuregehalt (Versuch 1 und 2) wird auch Prolin in den Stoffwechsel der Hefen einbezogen. Dies stimmt mit unseren früheren Befunden überein, daß Prolin, wenn es als einzige N-Quelle gegeben wird, von den Hefen gut (RAPP 1965), im Gemisch mit einem reichhaltigen Aminosäureangebot jedoch nicht verwertet wird (RAPP 1965, DRAWERT, RAPP und ULLEMEYER 1967). Ebenso fand OUGH (1968), daß der Prolingehalt bei der alkoholischen Gärung konstant bleibt. BERGNER und HALLER (1969) konnten sogar eine Prolinbildung bei der Vergärung von Traubensäften nachweisen. Diese Einbeziehung des Prolins in den Hefestoffwechsel bewirkt eine Veränderung der Gärungsprodukte. So fanden wir in Modellgärversuchen mit Prolin als einziger N-Quelle eine gesteigerte Ausbeute an Äpfelsäure (RAPP 1965, DRAWERT, RAPP und ULRICH 1965 a) sowie, verglichen mit i-Butanol, eine bevorzugte Entstehung von Gärungsamylalkohol (RAPP 1965, DRAWERT und RAPP 1964). Welche Auswirkungen ein zu geringes Aminosäureangebot bei sonst gleicher Zusammensetzung des Gärsubstrates auf die Bildung von Äthanol und einigen flüchtigen Komponenten hat, geht aus den Tabellen 3 und 4 hervor.

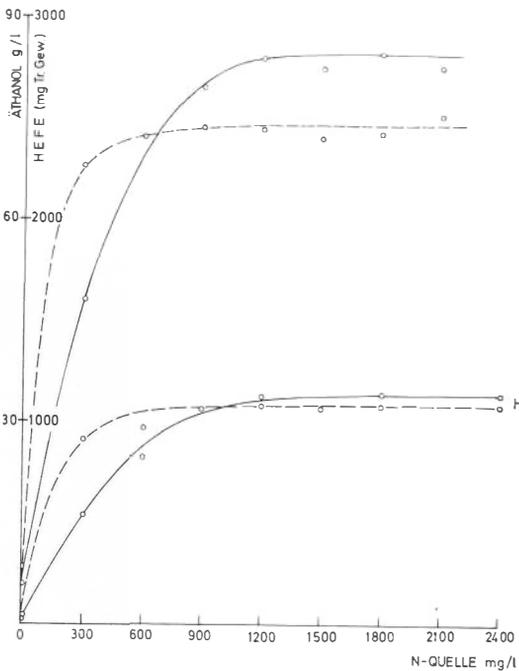


Abb. 1: Hefezuwachs und Äthanolbildung in Abhängigkeit von der Konzentration der N-Quelle.

- = L-Glutaminsäure als N-Quelle.
- - - = L-Arginin als N-Quelle.
- Ä = Äthanol.
- H = Hefe.

Die Menge der Gärungsprodukte Äthanol, Essigsäure-äthylester, Propanol-1, 2-Methylpropanol-1 und Gärungsamylalkohol (3-Methylbutanol-1 und 2-Methylbutanol-1) hängt von der Aminosäurenkonzentration ab (alle übrigen Komponenten des Gärmediums und die Gärbedingungen waren konstant). Dabei zeigte sich, daß (bei 200 g Glucose/l) die Äthanolwerte von einer N-Menge von 120–130 mg/l an weitgehend konstant bleiben (Äthanolwerte: 74,6–76,5 g/l bei 120–600 mg N/l). Daraus läßt sich für die optimale Äthanolbildung bei 200 g Glucose/l ein Mindest-N-Angebot von 120 mg/l ableiten; dies entspricht je nach Aminosäurezusammensetzung einer Gesamtaminosäurenkonzentration von mehr als 720 mg/l. Dieser Befund stimmt auch mit den Ergebnissen von Modellgärversuchen mit nur einer Aminosäure als N-Quelle überein.

In Abb. 1 sind Hefezuwachs und Äthanolbildung in Beziehung zur Arginin- und Glutaminsäurekonzentration dargestellt. Wie aus dem Kurvenverlauf hervorgeht, wirken sich zunehmende Dosen der Aminosäuren nur bis zu einem bestimmten Grenzwert gärungsfördernd aus; eine weitergehende Anhebung der Aminosäurekonzentration hat keinen steigenden Einfluß. Die Grenzkonzentration beträgt — bei 200 g Glucose/l — im Argininversuch 500 mg Aminosäure/l (als Argininmonohydrochlorid eingesetzt), im Falle der Glutaminsäure 1200 mg/l. Beiden Aminosäurekonzentrationen entspricht ein Angebot von 120—130 mg N/l.

Die Bildung der höheren Alkohole (Propanol-1, i-Butanol und Gärungsamylalkohol) während der alkoholischen Gärung wird von der Aminosäurekonzentration unterschiedlich beeinflusst. Wie aus den Tabellen 3 und 4 hervorgeht, nehmen zwar alle Alkohole mit steigender Aminosäurekonzentration zu, aber das Verhältnis der einzelnen Alkohole ändert sich. Während sich der Anteil an i-Butanol und Propapnol-1 (bezogen auf 75 g Äthanol/l) mit wachsender N-Konzentration erhöht, nimmt der Gärungsamylalkohol ab (Tabelle 5). Der Gehalt an Essigsäure-äthylester nimmt mit steigender Aminosäurekonzentration im allgemeinen zu (Tabellen 3 und 4); bezogen auf 75 g Äthanol/l scheint sich eine fallende Tendenz anzudeuten.

Die quantitative Abhängigkeit der einzelnen Alkohole von der Aminosäure- bzw. N-Konzentration wird aus den Verhältniszahlen der Tabelle 6 besonders klar

Tabelle 5

Bildung von flüchtigen Komponenten in Modellgärversuchen mit unterschiedlicher Aminosäurekonzentration (Werte bezogen auf 75 g Äthanol/l)

Versuch Nr.	Anfangskonzentration (mg/l)		Gärungsprodukte (mg/l)			
	Aminosäuren	entspricht N	Essigsäure- äthylester	Propanol-1	i-Butanol ¹⁾	Gärungsamyl- alkohol ²⁾
5	72	12	15	5	36	270
6	216	36	13	5	43	235
7	366	60	13	7	52	198
8	723	121	14	8	50	163
9	1445	242	10	18	84	157
10	3612	603	11	16	96	134

¹⁾ 2-Methyl-propanol-1.

²⁾ 2-Methyl-butanol-1 + 3-Methyl-butanol-1.

Tabelle 6
 Bildung von flüchtigen Komponenten in Modellgärversuchen mit unterschiedlicher Aminosäurenkonzentration

	Versuch Nr.				Versuch Nr.						Versuch Nr.			Versuch Nr.		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Anfangs-N-Gehalt mg/l	22	44	131	219	12	36	60	121	242	603	60	108	135	36	84	131
Gärungsamylalkohol i-Butanol = A/B	7,3	5,3	2,8	2,4	7,6	5,4	3,8	3,2	1,9	1,4	3,9	3,0	3,3	5,5	3,0	2,8
Gärungsamylalkohol Propanol-1 = A/P	43,5	22,1	11,4	9,3	53,0	43,3	28,4	20,3	8,9	8,6	25,3	18,1	15,0	34,7	24,6	17,2
Äthanol Propanol-1 $\times 10^{-3} = \ddot{A}/P$	13,1	6,7	4,7	4,2	14,7	13,8	10,7	9,3	4,2	4,8	9,9	8,8	8,3	13,1	12,4	8,4
Äthanol i-Butanol $\times 10^{-2} = \ddot{A}/B$	21,7	16,1	11,7	10,8	21,0	17,3	14,5	14,9	8,9	7,8	15,2	14,8	18,2	20,6	14,9	13,8
Äthanol Gärungsamylalkohol $\times 10^{-2} = \ddot{A}/A$	3,0	3,0	4,1	4,5	2,8	3,2	3,8	4,6	4,8	5,6	3,9	4,9	5,5	3,8	5,0	4,9

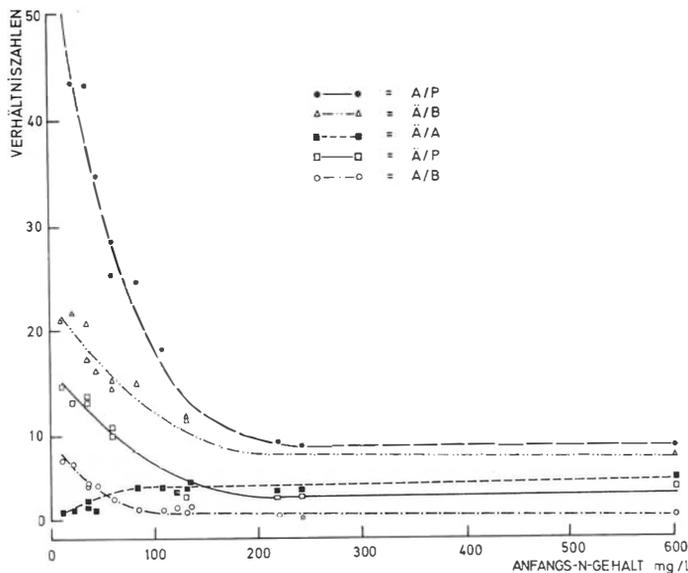


Abb. 2: Bildung von flüchtigen Komponenten in Modellgärversuchen mit unterschiedlicher Aminosäurenkonzentration.

$$\begin{aligned}
 A/P &= \text{Verhältnis} \frac{\text{Gärungsamylalkohol}}{\text{Propanol-1}} & \check{A}/B &= \text{Verhältnis} \frac{\check{A}\text{thanol}}{i\text{-Butanol}} \times 10^{-2} \\
 \check{A}/A &= \text{Verhältnis} \frac{\check{A}\text{thanol}}{\text{Gärungsamylalkohol}} \times 10^{-2} & \check{A}/P &= \text{Verhältnis} \frac{\check{A}\text{thanol}}{\text{Propanol-1}} \times 10^{-3} \\
 A/B &= \text{Verhältnis} \frac{\text{Gärungsamylalkohol}}{i\text{-Butanol}}
 \end{aligned}$$

ersichtlich. Sowohl der Wert $\frac{\check{A}\text{thanol}}{\text{Propanol-1}} \times 10^{-3}$ als auch $\frac{\check{A}\text{thanol}}{i\text{-Butanol}} \times 10^{-2}$ fällt mit zunehmender N-Konzentration ab, demgegenüber steigt die Relation

$$\frac{\check{A}\text{thanol}}{\text{Gärungsamylalkohol}} \times 10^{-2}.$$

Das bedeutet, daß bei hoher Aminosäurenkonzentration im Verhältnis zum Äthanol viel Propanol-1 und i-Butanol entstehen; die Bildung von Gärungsamylalkohol wird dagegen unterdrückt. Aus dem Verhältnis Gärungsamylalkohol/i-Butanol (A/B; Tabelle 6) ist zu ersehen, daß die Mengen der beiden Alkohole bei höherer Aminosäurenkonzentration nicht erheblich voneinander abweichen. Während z. B. bei einer N-Menge von 603 mg/l (entspricht einer Aminosäurenkonzentration von 3612 mg/l; Versuch 10) 1,4mal mehr Gärungsamylalkohol als i-Butanol gebildet wird, haben wir bei 12 mg N/l (72 mg Aminosäure/l; Versuch 5) 7,6mal mehr Gärungsamylalkohol als i-Butanol. Wie wir früher in Versuchen mit ¹⁴C-Glucose nachweisen konnten (RAPP 1965, DRAWERT, RAPP UND ULLEMAYER 1967), wird sowohl Gärungsamylalkohol als auch i-Butanol aus dem C-Gerüst der Glucose aufgebaut, und zwar in einem A/B-Verhältnis von 1,6. Davon ausgehend konnten wir den Einfluß einzelner Aminosäuren auf die Entstehung von Gärungsamyl-

alkohol und i-Butanol nachweisen. So fanden wir, daß die Bildung von Gärungsamylalkohol von Leucin, i-Leucin, Ammoniumsulfat, Prolin und Glutaminsäure beeinflusst wird. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, wird Prolin von den Hefen lediglich bei einer sehr geringen Aminosäurenkonzentration (Versuch 1 und 2) verwertet. In diesem Bereich ist der Einfluß des Prolins auf die Bildung des Gärungsamylalkohols jedoch deutlich ausgeprägt, wie aus dem erhöhten A/B-Wert hervorgeht. Das Verhältnis Gärungsamylalkohol : Propanol-1 (A/P-Verhältnis) zeigt, daß unter günstigen N-Bedingungen (Versuch 9 und 10) 8- bis 9mal mehr Gärungsamylalkohol als Propanol-1 gebildet wird und daß dieser Wert mit fallender Aminosäurenkonzentration stark ansteigt. Bei nur 12 mg N/l wird etwa 53mal mehr Gärungsamylalkohol als Propanol-1 gebildet. Die Abhängigkeit der Bildung der einzelnen Alkohole von der Aminosäure- bzw. N-Konzentration geht auch aus den Versuchen 11 bis 16 hervor. Hier wurde zu einer jeweils niedrigen Aminosäurenkonzentration (Versuch 11: 362 mg/l; Versuch 14: 216 mg/l) nur eine Aminosäure hinzugegeben und somit die N-Konzentration angehoben, was eine sofortige Erniedrigung des A/B-Verhältnisses (von 3,9 im Versuch 11 auf 3,3 im Versuch 13; von 5,5 bei Versuch 14 auf 2,8 bei Versuch 16) verursachte. Auch im Falle des A/P-Verhältnisses fanden wir die zu erwartende Erniedrigung.

Während die Äthanolbildung bei einer Aminosäurenkonzentration von 120—130 mg N/l an aufwärts (bei 200 g Glucose/l) einen Sättigungswert erreichte, war bei den übrigen Komponenten kein derartiges Verhalten festzustellen. Wie jedoch aus Tabelle 6 und Abb. 2 hervorgeht, nähert sich sowohl das A/B- und A/P-Verhältnis als auch das von Äthanol/Propanol, Äthanol/i-Butanol und Äthanol/Gärungsamylalkohol bei Aminosäurenkonzentrationen von über 200 mg N/l einem konstanten Wert. Aus Abb. 2 ist deutlich das unterschiedliche Verhältnis des Gärungsamylalkohols gegenüber i-Butanol und Propanol-1 zu sehen. Während, wie erwähnt (Tabelle 6), Propanol-1 und i-Butanol im Verhältnis zum Äthanol mit steigender Aminosäurenkonzentration zunehmen, wird bei niedriger Aminosäurenkonzentration im Verhältnis zum Äthanol mehr Gärungsamylalkohol gebildet als bei höherer. So wird z. B. bei 22 mg N/l (Versuch 1) 300mal mehr und bei 219 mg N/l 450mal mehr Äthanol als Gärungsamylalkohol gebildet.

Wie aus den Versuchen hervorgeht, läßt sich aus dem A/B- bzw. A/P-Verhältnis eine Aussage über die Aminosäurenkonzentration des Gärungsmediums machen. Wir werden demnächst berichten, inwieweit sich diese Befunde auf den Komplex Traubenmost-Wein übertragen lassen.

Aus Tabelle 3 läßt sich weiterhin auch die Geschwindigkeit der Bildung von Gärungsprodukten in Abhängigkeit vom Aminosäurenangebot erkennen. Während bei ausreichendem N-Angebot schon nach 3 Tagen etwa 80% des Gärungsamylalkohols gebildet sind, sind es bei mäßigem N-Angebot nach dieser Zeit ca. 50%. Demgegenüber liegen die Äthanolwerte nach 3 Tagen auch bei optimalem N-Angebot erst bei etwa 20% des Endwertes.

Zusammenfassung

In Modellgärversuchen verfolgten wir den Einfluß der Aminosäurenkonzentration auf die Bildung von Äthanol, Essigsäure-äthylester, Propanol-1, 2-Methylpropanol-1 und Gärungsamylalkohol (2-Methylbutanol-1 und 3-Methylbutanol-1).

Die Äthanolbildung erreichte bei einem N-Angebot (als einzelne Aminosäure oder auch als Aminosäurengemisch) von mehr als 120 mg N/l (bei 200 g Glucose/l) einen Sättigungswert von 74,6—76,5 g/l.

Bei der Bildung von höheren Alkoholen fanden wir eine unterschiedliche Abhängigkeit von der Aminosäurenkonzentration. Während der auf Äthanol bezogene i-Butanol- wie auch Propanol-1-Anteil mit fallender N-Menge geringer wurde, stieg der Gärungsamylalkohol-Anteil an.

Die anfängliche Aminosäurenkonzentration des Gärmediums spiegelt sich deutlich im Gärungsamylalkohol/i-Butanol- (A/B) und Gärungsamylalkohol/Propanol-1-Verhältnis (A/P) wieder. Bei einem N-Angebot von über 250 mg/l erreichte das A/B-Verhältnis Werte um 1,4, A/P um 8,6; bei N-Mangel stiegen die A/B-Werte bis 7,6 und die A/P-Werte bis 53,0 an.

Wir danken Herrn Prof. Dr. G. ALLEWELDT für die Unterstützung unserer Arbeiten sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Sachbeihilfen.

Literaturverzeichnis

- ÄYRÄPÄÄ, T., 1965: Über die beiden Isomeren des Isoamylalkohols bei der Vergärung synthetischer Substrate. *Brauwissenschaft* 18, 161—165.
- BERGNER, K. H. und MALLER, H. E., 1969: Das Verhalten der freien Aminosäuren von Weißweinen im Verlauf der Gärung, bei Ausbau, Lagerung und Umgärung. *Mitt. Klosterneuburg* 19, 264.
- COOK, A. H., 1958: *The chemistry and biology of yeasts*. Acad. Press. New York.
- DRAWERT, F. und RAPP, A., 1964: Über Inhaltsstoffe von Mosten und Weinen. IV. Modellgärversuche zur Untersuchung der Fuselölbildung und gaschromatographische Analyse von Fuselalkoholen. *Vitis* 4, 262—268.
- — — — — und ULRICH, W., 1965 a: Über die Bildung von organischen Säuren durch Weinhefen. I. Quantitative Beziehungen zwischen Stickstoffquelle, Hefestamm und L-Äpfelsäure in Modellgärversuchen. *Vitis* 5, 20—23.
- — — — — und — — — — —, 1965 b: Über die Bildung von organischen Säuren durch Weinhefen. II. Quantitative Beziehungen zwischen Stickstoffquelle und Weinsäurebildung in Modellgärversuchen. *Vitis* 5, 199—200.
- — — — — und ULLEMEYER, H., 1967: Radiogaschromatographische Untersuchung der Stoffwechselleistungen von Hefen (*Saccharomyces* und *Schizosaccharomyces*) in der Bildung von Aromastoffen. *Vitis* 6, 177—197.
- GUYMON, J. F., INGRAHAM, J. L. and CROWELL, E. A., 1961 a: The formation of n-propyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 163—168.
- — — — — and — — — — —, 1961 b: Influence of aeration upon the fermentation of higher alcohols by yeasts. *Amer. J. Enol. Viticult.* 12, 60—66.
- INGRAHAM, J. L. and GUYMON, J. F., 1960: The formation of higher aliphatic alcohols by mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 88, 157—166.
- — — — — and CROWELL, E. A., 1961: The pathway of formation of n-butyl and n-amyl alcohols by a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 169—175.
- KUNKEE, R. E., GUYMON, J. F. and CROWELL, E. A., 1966: Formation of n-propyl alcohol by cell-free extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brewing* 72, 530—536.
- OUGH, C. S., 1968: Proline content of grapes and wines. *Vitis* 7, 321—331.
- — — — —, GUYMON, J. F. and CROWELL, E. A., 1966: Formation of higher alcohols during grape juice fermentation at various temperatures. *J. Food Sci.* 31, 620—625.
- RANKINE, B. C., 1967: Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste thresholds. *J. Sci. Food Agricult.* 18, 583—589.
- RAPP, A., 1965: Über Inhaltsstoffe von Traubenmosten und Weinen unter besonderer Berücksichtigung der flüchtigen Verbindungen und des stofflichen Geschehens während der Hefegärung. *Diss. Mainz*.
- REIFF, F., KANTZMANN, R., LÜERS, H. und LINDEMANN, M., 1960 und 1962: *Die Hefen I und II*. Verlag Hans Carl, Nürnberg.
- RUHLAND, W.: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. Bd. 12 (1), 1960: Pflanzenatmung einschließlich Gärungen und Säurestoffwechsel. Springer Verl. Heidelberg.
- SUOMALAINEN, H. and KAHANPAA, H., 1963: Formation of fusel alcohols from amino acids with branched chains. *J. Inst. Brewing* 69, 473—478.
- WATSON, T. G. and HOUGH, J. S., 1966: Studies on continuous fermentation. I. Effects of yeasts concentration. *J. Inst. Brewing* 72, 547—555.

- WICKERHAM, L. J., 1951: Taxonomy of yeasts. Techn. Bull. 1029, Dept. Agricult. Washington D. C.; vgl.: REIFF, F., KANTZMANN, R., LÜERS, H. und LINDEMANN, M., 1960: Die Hefen I, S. 131, Verlag Hans Carl, Nürnberg.
- YOSHIKAWA, K., 1964: The formation of higher alcohols in the fermentation of amino acids by yeasts. The formation of i-butanol from α -acetolactic acid by washed yeasts cells. Agricult. Biol. Chem. (Tokyo) 28, 279—285.
- — —, 1965: The formation of higher alcohols in the fermentation of amino acids by yeasts. The formation of i-butanol and i-amylalcohol from pyruvic acid by washed yeast cells. Agricult. Biol. Chem. (Tokyo) 29, 672—677.
- — —, 1966: On various factors affecting formation of i-butanol and i-amylalcohol during alcoholic fermentation. Agricult. Biol. Chem. (Tokyo) 30, 634—641.

Eingegangen am 17. 11. 1970

Dr. A. RAPP
BFA für Rebenzüchtung
Geilweilerhof
6741 Siebeldingen