

## Vorkommen, Nachweis und Bestimmung von 2- und 3-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure und 2-Hydroxyglutarsäure im Wein

von

G. WÜRDIG, H.-A. SCHLOTTER und G. BEDESSEM

Bei papierchromatographischen Untersuchungen von Wein fiel uns auf, daß im Verlauf der alkoholischen Gärung nicht nur Bernstein- und Citramalsäure sowie geringe Mengen Zitronensäure, sondern auch noch andere Säuren in z. T. recht beträchtlichen Mengen gebildet werden. Diese Säuren verhalten sich bei der Papierchromatographie in verschiedenen Laufmitteln — so auch in dem zum Nachweis eines bakteriellen Säureabbaus häufig verwendeten Laufmittel von TANNER und RENTSCHLER (1) — ähnlich wie die Milchsäure. Vor allem bei Weinen, in denen nur die als Gärungsnebenprodukt gebildete Milchsäure enthalten ist, können sich deshalb Unstimmigkeiten zwischen dem halbquantitativ durch Vergleich der Fleckengröße im Papierchromatogramm ermittelten Milchsäuregehalt und den colorimetrisch bestimmten Werten ergeben. Die vorliegende Mitteilung befaßt sich mit der papierchromatographischen Trennung und Identifizierung einiger dieser Substanzen sowie mit Versuchen zu deren quantitativen Bestimmung.

### Versuchsergebnisse

Qualitative papierchromatographische Untersuchungen:

#### a) 2-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure (2-MDHBS)

Für die Versuche zur Trennung der in der Einleitung erwähnten milchsäureähnlichen Substanzen von der Milchsäure gingen wir zuerst von den bei einer säulenchromatographischen Vortrennung gewonnenen milchsäurehaltigen Fraktionen aus (2). Dazu wurden die sauer reagierenden Weininhaltsstoffe von 3 Liter Wein an einer  $5 \times 50$  cm messenden Anionenaustauscher-Säule mit Amberlite IRA — 400 in der Formiatform fixiert und mit Ameisensäure von 0,1—3,4 n steigender Konzentration eluiert.

Gleich zu Beginn erschien die Milchsäure zusammen mit anderen Monocarbonsäuren, darunter einer solchen, die in dem von TANNER und RENTSCHLER (1) angegebenen Laufmittel den gleichen Rf-Wert wie die Milchsäure besitzt, jedoch im Gegensatz zu dieser nach der Perjodatbehandlung mit 2-Thiobarbitursäure (TBS) eine blaßrote Anfärbung ergab. Bei der Reaktion mit TBS handelt es sich um ein von WARREN (3) nach Angaben von WEISSBACH und HURWITZ (4) entwickeltes Verfahren zum spezifischen Nachweis von Desoxyzuckern sowie von 2-Keto-3-Desoxyhexon- und -hexarsäuren. Aus diesen entstehen beim Besprühen mit Perjodatlösung Malondialdehyd bzw. Formylpyruvat, die beide nach Entfernung des Überschusses von Perjodat durch Äthylenglykol mit TBS-Lösung auf dem Papier eine leuchtend rote, im UV orange-rot fluoreszierende Anfärbung ergeben. Die zufällig bei Untersuchungen über das Vorkommen von Keto-desoxy-Zuckern im Wein entdeckte blaßrote Anfärbung des Milchsäurefleckes zeigte jedoch keine Fluoreszenz. Es ergab sich, daß diese Art der Reaktion typisch ist für Pyruvat. Bei der gesuchten Säure mußte es

sich demnach um eine 2-Methyl-2,3-dihydroxycarbonsäure handeln, und zwar aufgrund des Verhaltens bei der Elution mit Ameisensäure um eine Monocarbonsäure. Von verschiedenen zur Sichtbarmachung des 2. Spaltproduktes verwendeten Sprühreagenzien war die Reaktion nach RIMINI positiv, die bei Anwesenheit von Acetaldehyd eine blaue Färbung ergibt (5). Unter der Voraussetzung, daß beide Spaltprodukte von der gleichen gesuchten Säure stammen, wäre diese demnach als 2-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure, auch Dimethylglycerinsäure genannt, identifiziert.

Zur Sicherstellung dieses Befundes haben wir die fragliche Substanz auf papierchromatographischem Wege gereinigt und isoliert. Dazu wurden einige ml Wein über einen Anionenaustauscher in der Formiatform gegeben und nach dem Waschen die fixierten Bestandteile mit 6*n* Ameisensäure eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand in  $\frac{1}{3}$  der ursprünglichen Menge an Wasser gelöst. Nach zahlreichen Versuchen fanden wir 2 Laufmittel (Nr. I und II), die eine Abtrennung der Milchsäure von der gesuchten Säure ermöglichten. Aus mehreren Chromatogrammen wurden nach Anfärbung der Randstreifen die entsprechenden Zonen ausgeschnitten, mit Wasser eluiert und das Eluat auf wenige ml eingeeengt. Diese Lösung A ergab in Laufmittel I nur einen einzigen Fleck, im alkalischen Laufmittel III jedoch 2 Flecken, von denen nur der obere die TBS- und die RIMINI-Reaktion zeigte.

Wir haben dann zum Vergleich 2-MDHBS synthetisiert. Diese existiert in 2, der Threo- und Erythro-Konfiguration entsprechenden Formen, die auf folgende Weise erhalten wurden. Ausgangsprodukt war die Tiglinsäure, die zuerst mit Perameisensäure oxydiert wurde, wobei ausschließlich diejenige Säure entstehen sollte, in der die beiden OH-Gruppen die Threo-Konfiguration besitzen, 2. mit Osmiumtetroxid als spezifische Darstellungsmethode für Erythro-Verbindungen und schließlich mit  $\text{KMnO}_4$ , wobei neben der Erythro-Form meistens auch etwas von der Threo-Form gebildet wird. Schließlich wurde 2-MDHBS auch durch Cyanhydrinsynthese aus Acetoin gewonnen, durch die beide Formen etwa in gleicher Menge entstehen.

Die links- und rechtsdrehenden Formen der Threo- und der Erythro-Verbindungen sowie die bei den Synthesen entstehenden D,L-Gemische zeigen teilweise stark unterschiedliche Schmelzpunkte: D,L-2-Methyl-2,3-threo-dihydroxybuttersäure Fp 110—111° C. [(+) Fp 99—100° C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ : + 2°] D,L-2-Methyl-2,3-erythro-dihydroxybuttersäure Fp 87,5—88,5° C [(+) Fp 64—66° C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ : + 4°; (—) Fp 63—65° C.  $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ : — 3°].

Schmelz- und Mischschmelzpunkte würden demnach eine weitgehende Identifizierung ermöglichen. Leider konnte aus Lösung A kein kristallines Produkt erhalten werden. Auch von den synthetisch gewonnenen Präparaten kristallisierte nur das durch Perameisensäure-Oxydation erhaltene Produkt. Die beiden Formen der 2-MDHBS lassen sich aber papierchromatographisch gut mit den Laufmitteln I und II trennen.

Für die durch Perameisensäure-Oxydation erhaltene höherschmelzende Threo-Verbindung wurden Rf-Werte von 0,56 bzw. 0,31 gefunden, für die durch Osmiumtetroxid-Oxydation gewonnene Erythro-Form 0,45 bzw. 0,26 (s. Tab. 1). In den beiden anderen Präparaten waren beide Substanzen enthalten, in dem  $\text{KMnO}_4$ -Oxydationsprodukt jedoch mehr von der Erythro-Verbindung. Die aus dem Wein isolierte Säure in Lösung A zeigte in allen geprüften Laufmitteln den gleichen Rf-Wert wie die Threo-Form. Auch das Verhalten gegenüber den Sprühmitteln war identisch. Die gesuchte Säure ist demnach 2-Methyl-2,3-threo-dihydroxybuttersäure, die aufgrund ihres Schmelzpunktes (16) als Anglycerinsäure zu bezeichnen ist. Dem-

Tabelle 1  
Rf-Werte

	in Laufmittel Nr.			
	I	II	III	IV
Weinsäure	0,04	0,02	0,08	0,36
Äpfelsäure	0,19	0,08	0,13	0,58
Milchsäure	0,75	0,54	0,60	0,79
Bernsteinsäure	0,65	0,43	0,16	0,78
Citramalsäure	0,39	0,18	0,22	0,68
2-Hydroxyglutarsäure	0,30	0,11	0,17	0,71
2-Hydroxyglutarsäurelacton	0,57	0,22	—	0,76
3-Methyl-2,3-dihydroxy- buttersäure	0,55	0,33	0,61	0,76
2-Methyl-2,3-dihydroxy- buttersäure (threo); Anglycerinsäure	0,56	0,31	0,54	0,76
2-Methyl-2,3-dihydroxy- buttersäure (erythro); Tiglycerinsäure	0,45	0,26	—	0,75
2-Methyl-2,3-dihydroxy- buttersäure (aus Wein)	0,57	0,31	0,55	0,76

zufolge müßte die Erythro-Verbindung Tiglycerinsäure genannt werden. Noch ungeklärt ist, ob die Anglycerinsäure in der rechtsdrehenden oder der linksdrehenden Form vorkommt.

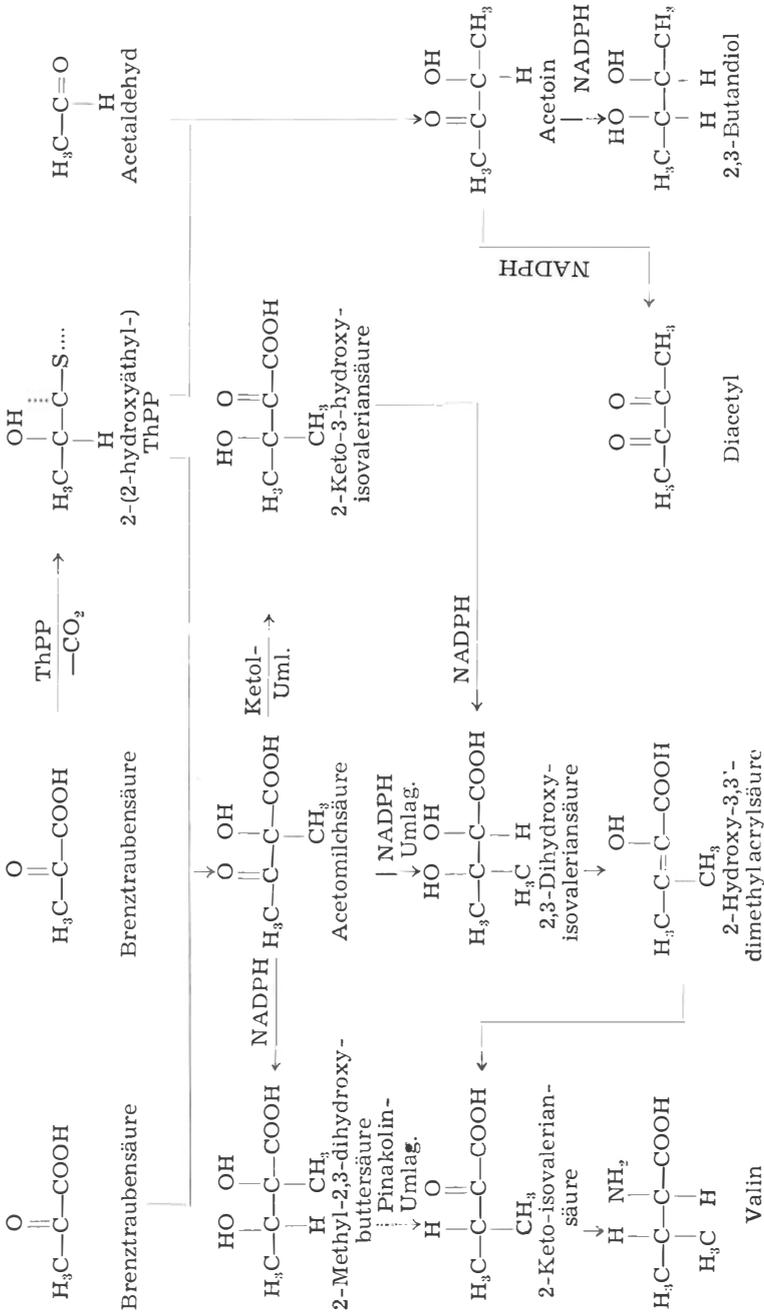
#### b) 3-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure (3-MDHBS)

Da zwischen der 2- und der 3-MDHBS, die auch 2,3-Dihydroxyisovaleriansäure genannt wird, im Stoffwechsel, wie später noch erläutert werden wird, enge Beziehungen bestehen (vgl. Abb. 1), haben wir geprüft, ob auch diese im Wein vorkommt. Im Gegensatz zu 2-MDHBS besitzt 3-MDHBS nur ein asymmetrisches Kohlenstoffatom. Die D,L-Form haben wir ausgehend von der 3,3-Dimethylacrylsäure durch Oxydation mit Perameisensäure dargestellt. Diese Säure läßt sich in den beiden sauren Laufmitteln nicht von 2-MDHBS, in dem alkalischen Laufmittel Nr. III jedoch gut von 2-MDHBS trennen. 2-MDHBS zeigt bei Anwendung dieses Laufmittels einen Rf-Wert von 0,54 und 3-MDHBS einen solchen von 0,61 (siehe Tab. 1). Die bei der chromatographischen Auftrennung der Lösung A in dem Lösungsmittel III beobachtete Säure hatte einen Rf-Wert von 0,19 und war also mit 3-MDHBS nicht identisch. Es wurden dann Lösung A und andere 2-MDHBS enthaltende Eluate aus mit den Laufmitteln I und II erhaltenen Papierchromatogrammen in steigenden Mengen mit dem Laufmittel III chromatographiert. In keinem Falle jedoch ergab sich ein Hinweis für das Vorkommen von 3-MDHBS. Wenn diese Säure im Wein vorhanden ist, dann nur in Mengen, die weit weniger als den zehnten Teil der gefundenen 2-MDHBS-Mengen betragen.

#### c) 2-Hydroxyglutarsäure (HGS)

Wie oben schon erwähnt, fanden wir in 2-MDHBS-haltigen Eluaten aus Papierchromatogrammen, wenn die Vortrennung mit dem sauren Laufmittel I vorgenom-

Abb. 1: 2- und 3-Methyl-dihydroxybuttersäure als Metaboliten der Valinsynthese [zusammengestellt nach STRASSMANN et al. (6)].



men wurde, bei der Auftrennung mit dem alkalischen Laufmittel III eine Säure mit dem Rf-Wert 0,19. Wir haben diese aus mehreren solchen Chromatogrammen eluiert und nach dem Eindampfen erneut in Laufmittel I chromatographiert, wobei 2 Säuren nachzuweisen waren. Die obere mit dem Rf-Wert wie 2-MDHBS, die untere, die nur halb so weit lief, mit dem Rf-Wert entsprechend dem einer Säure, die bei der erwähnten Säuretrennung mit Ameisensäure steigender Konzentration zusammen mit Citramalsäure und Äpfelsäure eluiert wurde. Dies und der Befund, daß jede dieser beiden Säuren — getrennt eluiert — nach dem Eindampfen wieder die vorerwähnten 2 Flecken in sauren Laufmitteln und nur einen in dem alkalischen Laufmittel ergab, deuteten darauf hin, daß es sich hierbei um eine Dicarbonsäure und deren Lacton handelte. Diesen Beobachtungen entsprechend verhält sich 4-Pyrrolidon-2-carbonsäure, auch Pyroglutaminsäure genannt, die von SCHORMÜLLER und CLAUS (7) im Most sowie von CARLES *et al.* (8) im Wein nachgewiesen wurde und die als Lactam der Glutaminsäure mit dieser in einem pH- und temperaturabhängigen Gleichgewicht steht. Da jedoch keiner der beiden Flecken eine Ninhydrinreaktion ergab, kam nur noch HGS in Betracht. Der Nachweis erfolgte durch Rf-Wert-Vergleich in den Laufmitteln I, II und III, sowie nach Elution durch Oxydation in wässriger Lösung mittels Kaliumchlorat und Vanadinpentoxid zu 2-Ketoglutarinsäure gemäß den Angaben von DE LEY und DOUDOROFF (9). Die gebildete 2-Ketoglutarinsäure wurde papierchromatographisch nachgewiesen (2).

HGS geht beim Erwärmen in saurer Lösung in das entsprechende Lacton über (HGSL) und zwar zu etwa 30%, das im alkalischen Bereich wieder vollständig hydrolisiert wird. In vielen sauren Laufmitteln läuft HGSL zusammen mit 2-MDHBS und z. T. auch Milchsäure, während HGS zwischen Citramalsäure und Äpfelsäure zu finden ist.

### Quantitative Untersuchungen

#### a) Bestimmung der 2-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure im Wein

##### 1. colorimetrisch nach Oxydation mit Cer-IV-Sulfat

Die anfangs erwähnten Unstimmigkeiten zwischen der papierchromatographischen und der colorimetrischen Bestimmung der Milchsäure führten in Verbindung mit den Ergebnissen der papierchromatographischen Untersuchungen zu der Vermutung, daß 2-HGS oder 2-MDHBS nach dem Verfahren von REBELEIN (10) eine gleiche oder ähnliche Färbung liefern wie Milchsäure. Die Nachprüfung ergab, daß dies bei 2-MDHBS der Fall ist. Diese wird durch das bei dieser Methode verwendete Cer-IV-Sulfat über Acetoin zu Acetaldehyd oxydiert, wobei auch geringe Mengen Diacetyl entstehen. Aus einem Mol 2-MDHBS entsteht dabei etwa 1 Mol Acetaldehyd. Dieser wird dann mit Piperidin und Nitroprussidnatrium versetzt, wobei eine blaue Färbung entsteht, die bei 570 nm gemessen wird. Das Farbmaximum wird jedoch im Gegensatz zu Milchsäure, bei der die Farbreaktion schon nach 10 min beendet ist, durch die langsamere verlaufende Oxydation erst nach 50 min dauernder Einwirkung des Oxydationsmittels erreicht. Der molare Extinktionskoeffizient von 2-MDHBS ist deshalb mit dem Piperidin-Nitroprussidnatrium-Reagenz unter den Bedingungen des Verfahrens von REBELEIN nur etwa halb so groß wie der von Milchsäure, d. h., daß 1 g/l 2-MDHBS etwa 0,3 g/l Milchsäure vortäuscht. Da im Wein, wie später noch gezeigt wird, bisher nicht mehr als 200 mg/l 2-MDHBS gefunden wurden, spielt die hierdurch bedingte Beeinflussung der Milchsäurebestimmung keine Rolle. Wir haben dann versucht, aus der Extinktionsdifferenz zwischen dem nach 10 min erreichten Farbmaximum der Milchsäure und dem 50 min-Wert für

2-MDHBS deren Konzentration zu berechnen, was jedoch keinen Erfolg brachte. Die Oxydation mit Cer-IV-Sulfat verläuft nicht immer stöchiometrisch.

## 2. Colorimetrisch nach Oxydation mit Perjodsäure

Perjodsäure spaltet 2-MDHBS, wie bereits erwähnt, in Acetaldehyd und Brenztraubensäure. Durch Bestimmung des Acetaldehydgehaltes vor und nach der Perjodatbehandlung des Weines ließe sich demnach der 2-MDHBS-Gehalt bestimmen, wenn nicht im Wein andere Substanzen enthalten wären, die unter diesen Bedingungen ebenfalls Acetaldehyd abspalten, z. B. 2,3-Butandiol. Auch der bei der Perjodatspaltung von Zuckern und Hexonsäuren entstehende Formaldehyd stört. Die Methode erwies sich jedoch dann als brauchbar, wenn die MDHBS zuvor papierchromatographisch abgetrennt wurde. Dazu wurden die sauren Bestandteile des Weines über einen Anionenaustauscher 1 : 10 konzentriert, papierchromatographisch mit Laufmittel I getrennt und aus den durch Ansprühen der Randstreifen lokalisierten Flecken 2-MDHBS wie üblich eluiert. Zur Bestimmung des in den so gewonnenen Eluaten nach Perjodatzusatz gebildeten Acetaldehyds wurde die Mikro-Diffusionsmethode von THEN und RADLER (11) angewendet, mit der noch 1  $\mu\text{g}$  Acetaldehyd pro Ansatz exakt erfaßt werden. Die 2-MDHBS-haltige Probelösung wird dazu in einer Conway-Schale mit Perjodatlösung versetzt und der entstehende Acetaldehyd in einer im Zentralgefäß befindlichen Lösung von 3-Methyl-2-Benzothiazolonhydrazon-hydrochlorid absorbiert. Der gebildete Farbstoff wird in  $\text{FeCl}_3$ -haltigem Aceton aufgenommen und bei 630 nm colorimetriert.

Ausgehend von den molaren Extinktionskoeffizienten ( $E = 70,8 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$  bei 630 nm gegen Reagenzienleerwert gemessen, berechnet nach der von THEN und RADLER angegebenen Eichkurve für 100%ige Erfassung bei 2stündiger Diffusionszeit) ergab sich, daß die Spaltung von 2-MDHBS in reinen Lösungen stöchiometrisch verläuft, und der entstehende Aldehyd vollständig erfaßt wird ( $E = 69,2 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$  für ein 2-MDHBS-Präparat mit einem Gehalt von 98,5%). 2-MDHBS läßt sich also nach diesem Verfahren mit der gleichen Genauigkeit bestimmen wie Acetaldehyd und kann demnach als Standard zur Aufstellung der Eichkurve dienen

Ebensogut wie in reinen Lösungen läßt sich 2-MDHBS auf diese Weise auch in Eluaten aus Papierchromatogrammen bestimmen. Die Genauigkeit wird hierbei von den Fehlern und Verlusten bei der Aufarbeitung der Proben im Verlaufe der chromatographischen Trennung bestimmt. Einige der nach dieser Methode erhaltenen Werte für den Gehalt an 2-MDHBS im Wein sind in Tab. 2 den Werten, die sich mittels des nachfolgend beschriebenen Verfahrens ergaben, gegenübergestellt. Für die beiden Bestimmungen wurde das gleiche Eluat benutzt.

## 3. Enzymatisch nach Oxydation mit Perjodat

Die Bestimmung von 2-MDHBS ist auch auf dem Wege über die bei der Perjodatspaltung entstehende Brenztraubensäure möglich. Hierfür eignet sich besonders die in der Praxis erprobte enzymatische Methode. Aber auch hierbei geht es nicht ohne papierchromatographische Vortrennung. Die direkte Ermittlung des 2-MDHBS-Gehaltes aus der Differenz des Brenztraubensäuregehaltes vor und nach der Perjodatbehandlung des Weines scheidet an den großen Mengen von Glyoxylsäure, die bei der Perjodatspaltung der Weinsäure entstehen. Durch die bei der Bestimmung der Brenztraubensäure benutzte Lactatdehydrogenase wird Glyoxylsäure fast ebenso schnell umgesetzt wie Brenztraubensäure.

Die Empfindlichkeit der enzymatischen Methode gleicht der der oben beschriebenen Mikro-Diffusionsmethode, so daß die Bestimmung direkt in den bei der pa-

Tabelle 2

Bestimmung von 2-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure in Modellösungen und im Wein nach Perjodat-Oxydation als Acetaldehyd durch Mikrodifffusion und als Brenztraubensäure auf enzymatischem Wege

Substrat	vorgelegt mg/l	gefunden	
		Mikrodifffusion mg/l	enzymatisch mg/l
Modell-Lösung	100	97,6	97,0
Modell-Lösung	100	98,4	98,9
Modell-Lösung <sup>1)</sup>	150	—	135
Modell-Lösung <sup>1)</sup>	150	—	137
Modell-Lösung <sup>2)</sup>	167	—	157
Modell-Lösung <sup>2)</sup>	167	—	157
Modell-Lösung <sup>3)</sup>	100	—	101
Wein <sup>4)</sup>	—	30	36
Wein <sup>4)</sup>	50	92	79

<sup>1)</sup> Vor der Bestimmung über Dowex 1 gegeben, mit 0,5 n HCOOH eluiert, eingedampft und auf das ursprüngliche Vol. aufgefüllt.

<sup>2)</sup> Aus dem Eluat eines Papierchromatogramms.

<sup>3)</sup> In Gegenwart von 100 mg/l 3-MDHBS.

<sup>4)</sup> Nach der Arbeitsvorschrift, Vortrennung über Anionenaustauscher und Papierchromatogramme.

pierchromatographischen Vortrennung erhaltenen Eluaten durchgeführt werden kann. Die Probelösung wird dazu mit Perjodatlösung versetzt. Nach halbstündiger Einwirkungszeit zerstört man den Überschuß an Perjodat mit Äthylenglycollösung und verdünnt der Konzentration entsprechend. Nach Zusatz eines geeigneten Puffers kann dann darin der Gehalt an Pyruvat bestimmt werden, entweder nach der vom Hersteller des Enzyms (12) empfohlenen Vorschrift oder nach den Angaben von BLOUIN (13). Die Spaltung von 2-MDHBS zu Pyruvat verläuft quantitativ. In reinen 2-MDHBS-Lösungen kann deren Gehalt danach mit der bei der einfachen enzymatischen Bestimmung üblichen Genauigkeit von 2—3% bestimmt werden (Abb. 2).

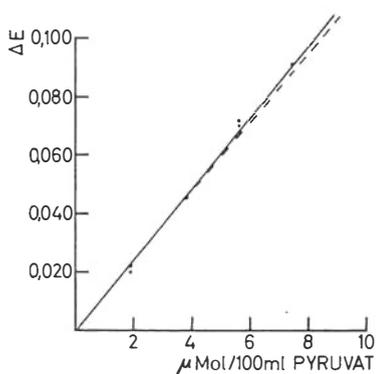


Abb. 2

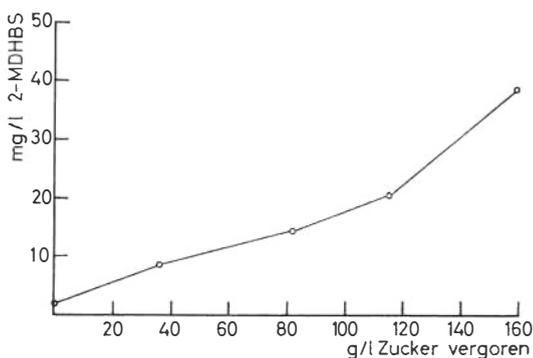


Abb. 3

Abb. 2: Eichkurve zur enzymatischen Bestimmung von 2-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure als Pyruvat nach Perjodatspaltung (--- berechnet aus dem molaren Extinktionskoeffizienten für NADH bei 366 nm).

Abb. 3: Bildung von 2-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure während der Gärung von Traubenmost.

Im Wein ist die Genauigkeit der enzymatischen 2-MDHBS-Bestimmung ebenso wie bei der colorimetrischen von den Verlusten bei der Aufarbeitung in der papierchromatographischen Vortrennung abhängig.

Die Bestimmung wird außer durch Substanzen, die eine Enzymhemmung verursachen, durch 2,3-Dihydroxycarbonsäuren wie z. B. Weinsäure, Schleimsäure und Uronsäuren, die bei der Perjodatspaltung Glyoxylsäure ergeben, gestört, jedoch nur dann, wenn sie in größeren Mengen vorhanden sind. Die papierchromatographisch im Wein nicht nachweisbare 3-MDHBS, aus der bei der Perjodatspaltung ebenfalls Glyoxylsäure entsteht, macht sich in dem möglichen Konzentrationsbereich um 100 mg/l dadurch bemerkbar, daß die Reaktion nach vollendetem Pyruvatumsatz nicht gänzlich zum Stillstand kommt, sondern erst nach etwa 10 min. Dies konnte jedoch bei der Untersuchung von Wein in keinem Falle beobachtet werden, wodurch der papierchromatographische Befund über die Abwesenheit von 3-MDHBS im Wein bestätigt wurde.

In Tab. 1 sind einige Ergebnisse von Versuchen zur Bestimmung von 2-MDHBS als Acetaldehyd und Pyruvat in Modelllösung und im Wein zusammengestellt. Wie daraus zu ersehen ist, wird 2-MDHBS in reinen Lösungen sowohl enzymatisch wie auch durch Mikro-Diffusion quantitativ erfaßt. Es ist hierbei zu berücksichtigen, daß das Präparat selbst nur einen Gehalt von etwa 98,5% aufweist. Bei der Aufarbeitung der Proben über Ionenaustauscher und Papierchromatographie treten jedoch Verluste auf, die man mit etwa 10% ansetzen kann. Unter diesem Vorbehalt sind die unkorrigierten Angaben in Tab. 3 zu betrachten, in der die 2-MDHBS-Gehalte von 11 Weinen zusammengestellt sind, wiederum sowohl enzymatisch und durch Mikro-Diffusion bestimmt. Die Wertepaare stimmen im großen und ganzen befriedigend überein. Der Gehalt der untersuchten Weine schwankt zwischen 33 und 144 mg/l, eine Beziehung zum Alkoholgehalt ist hieraus nicht erkennbar, obwohl, wie Abb. 3 zeigt, 2-MDHBS während der Gärung gebildet wird und mit zunehmendem Alkoholgehalt ansteigt, besonders jedoch im letzten Drittel der Gärung. Dieser Be-

Tabelle 3

Bestimmung von 2-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure in verschiedenen Weinen auf enzymatischem Wege und durch Mikrodiffusion

Wein Nr	Bezeichnung	Alkohol	2-MDHBS	2-MDHBS	2-MDHBS
		g/l	enzymatisch mg/l	Mikrodiffusion mg/l	⊙ mg/l
1	1962 Riesling	53,2	43	48	45
2	1963 Riesling	55,6	77	56	67
3	1964 Riesling	66,9	59	58	58
4	1966 Auxerrois	70,7	43	43	43
5	1967 Riesling	74,0	67	64	65
6	1967 Riesling	—	144	—	144
7	1967 Riesling	—	36	36	33
8	1967 Müller-Thurgau	75,9	69	59	64
9	Riesling Südafrika	85,8	104	107	105
10	Rotwein Algerien	101,6	71	80	76
11	1959 Trockenbeeren-Auslese	—	51	49	50
Mittelwert					68

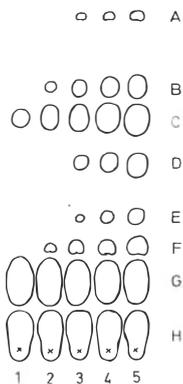


Abb. 4

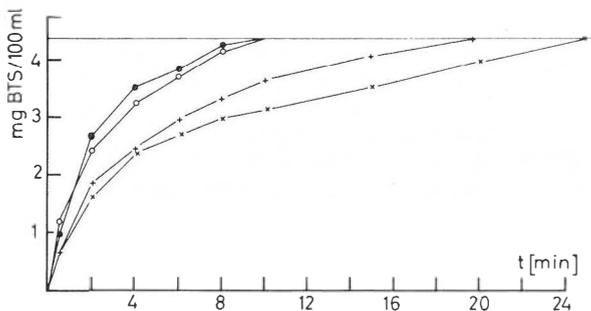


Abb. 5

Abb. 4: Papierchromatographische Trennung von Säuren, die während der Gärung von Traubenmost entstehen, mit Laufmittel I auf MN 261. 1) Traubenmost 2) 22%, 3) 51% und 4) 99% vergoren.

A = unbekannt; B = Milchsäure; C = Bernsteinsäure; D = Anglycerinsäure (2-Methyl-threo-2,3-dihydroxybuttersäure), Hydroxyglutarsäurelacton; E = Citramalsäure; F = Hydroxyglutarsäure; G = Äpfelsäure; H = Weinsäure.

Abb. 5: Geschwindigkeit der Perjodat-Spaltung von 2-Methyl-threo- und erythro-2,3-dihydroxybuttersäure

- aus Wein isoliert
- threo-Form (Perameisensäure)
- +  $\frac{1}{3}$  threo +  $\frac{2}{3}$  erythro ( $\text{KMnO}_4$ )
- × erythro-Form ( $\text{OsO}_4$ )

fund war reproduzierbar. Bei diesem Versuch wurde ein Traubenmost mit Reinzuchthefer angesetzt, und die Gärung durch Filtration unterbrochen, nachdem 22, 51, 72 und 99% des vorhandenen Zuckers vergoren worden waren.

Abb. 4 zeigt ein Chromatogramm, das die Zunahme von 2-MDHBS und anderen Säuren während der Gärung veranschaulicht. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß der mit D bezeichnete Fleck zu  $\frac{2}{3}$  aus 2-MDHBS und zu  $\frac{1}{3}$  aus HGSL besteht, wie die Auftrennung mit Laufmittel III ergab.

Wie oben schon erwähnt, besitzt die im Wein vorkommende 2-MDHBS die Threo-Konfiguration. Dieser papierchromatographisch erhaltene Befund konnte noch auf andere Weise sichergestellt werden, ohne daß es notwendig wurde, die 2-MDHBS in Substanz zu isolieren. Wir sind dabei davon ausgegangen, daß die Perjodat-Spaltung von 1,2-Diolen verschieden schnell verläuft, je nachdem, ob diese Threo- oder Erythro-Konfiguration besitzen, wobei häufig die Erythro-Form schneller gespalten wird als die Threo-Form. Wir haben dazu durch mehrfache enzymatische Bestimmungen Lösungen von synthetisch dargestellter Threo- und Erythro-2-MDHBS sowie von dem durch  $\text{KMnO}_4$ -Oxydation erhaltenen Präparat und von der aus Wein durch papierchromatographische Trennung und Elution isolierten 2-MDHBS auf genau den gleichen Gehalt von 6,73 mg 2-MDHBS entsprechend 4,42 mg Pyruvat pro 100 ml eingestellt. Gleiche Mengen dieser Lösungen wurden zuerst mit 0,001 m  $\text{NaJO}_4$  versetzt und dann nach bestimmten Zeitabständen zur Unterbrechung der Reaktion mit 0,001 m Äthylenglykollösung. Danach erfolgte die enzymatische Bestimmung der gebildeten Brenztraubensäure. Die Ergebnisse zeigt Abb. 5. Daraus ist zu ersehen, daß die Erythro-Form wesentlich langsamer gespalten wird als die Threo-Form und die aus Wein isolierte 2-MDHBS. Damit ist der papierchromatographische Befund, daß im Wein vorkommende 2-MDHBS in der

Threo-Konfiguration vorliegt, bestätigt. Die Spaltungsgeschwindigkeit des durch  $\text{KMnO}_4$ -Oxydation gewonnenen Präparates liegt dazwischen und zwar entsprechend der papierchromatographisch ermittelten Zusammensetzung von 1 Teil der Threo- und 2 Teilen der Erythro-Verbindung näher der der zuletzt genannten.

b) Bestimmung von 3-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure (2,3-Dihydroxyisovaleriansäure)

Ein sehr empfindliches Verfahren zur Bestimmung von 3-MDHBS wurde von CASTINO (14) beschrieben. Bei diesem ursprünglich zur Bestimmung von Citramalsäure (15) entwickelten Verfahren wird die Substanz mit Vanadat zu Aceton oxydiert und dieses nach Abtrennung durch Destillation mit Salicylaldehyd kondensiert und colorimetriert. Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens liegt im gleichen Bereich wie die beiden vorstehend beschriebenen Verfahren zur Bestimmung von 2-MDHBS, so daß beide Säuren im gleichen Eluat analysiert werden können. Obwohl 3-MDHBS weder papierchromatographisch noch anderweitig im Wein gefunden werden konnte, wobei noch 5 mg/l hätten nachweisbar sein müssen, ergaben die quantitativen Bestimmungen 40—110 mg/l. Wir vermuten, daß es sich hierbei um verschleppte Citramalsäure handelt.

c) Bestimmung der 2-Hydroxyglutarsäure

Die Bemühungen, ein brauchbares Verfahren zur Bestimmung von 2-HGS zu finden, waren bisher vergeblich. Wir haben versucht, bei der Oxydation zu 2-Ketoglutarsäure nach DE LEY und DOUDOROFF (9) eine quantitative Umsetzung zu erreichen und haben damit im Wein auch reproduzierbare Ergebnisse erhalten in der Größenordnung der papierchromatographisch abgeschätzten Mengen (ca. 100—200 mg/l). In Modell-Lösungen mit zugesetzter HGS versagte jedoch das Verfahren aus unbekanntem Gründen. Die enzymatische Bestimmung der gebildeten 2-Ketoglutarsäure verlief einwandfrei.

### Diskussion

Im Laufe der vorstehend beschriebenen Untersuchung wurde uns eine Arbeit von CARLES (16) bekannt, in der dieser über das Vorkommen von 2-MDHBS im Wein berichtet. CARLES nennt diese Säure ihrer Menge und Bedeutung entsprechend — allerdings ohne zahlenmäßige Begründung — zusammen mit Citramalsäure unmittelbar nach Milchsäure, Weinsäure und Bernsteinsäure und erwähnt, daß 2-MDHBS ebenso wie Citramalsäure (17, 18) während der Gärung gebildet wird.

Die Frage der Konfiguration blieb jedoch offen, ebenso wie bei den Untersuchungen von WHITING und COGGINS (19), die 2-MDHBS neben 3-MDHBS und den beiden Äthylhomologen bereits 1960 in Apfelwein fanden, in einer Menge von 54 mg/l, entsprechend etwa dem in Tab. 3 angeführten Durchschnittswert unserer Untersuchungen. 2-MDHBS wurde auch in *Veratrum viride* (20) gefunden, und zwar die linksdrehende Erythro-Form und die rechtsdrehende Threo-Form verestert in verschiedenen blutdrucksenkenden Alkaloiden.

2-MDHBS entsteht aus Acetomilchsäure durch Reduktion und ist formal nach dem in Abb. 1 dargestellten Schema als Metabolit der Biosynthese von Valin anzusehen, indem daraus nach Art einer Pinakolinumlagerung 2-Keto-isovaleriansäure als Valinvorstufe entsteht. STRASSMANN *et al.* (6) konnten jedoch nachweisen, daß weder Anglycerin- noch Tiglycerinsäure bei der Valinsynthese als Substrate in Frage kommen. Sicher dagegen ist die metabolische Funktion von 3-MDHBS, die über 2-Hydroxy-3,3'-dimethylacrylsäure in 2-Keto-isovaleriansäure überführt wird. Noch nicht aufgeklärt ist, ob 3-MDHBS aus Acetomilchsäure 2stufig durch Ketolumlagerung über die 2-Keto-3-hydroxy-isovaleriansäure und anschließende Reduktion, oder 1stufig durch gleichzeitige Reduktion und Umlagerung entsteht.

Bei 3-MDHBS handelt es sich demnach um ein Zwischenprodukt, bei 2-MDHBS um ein Nebenprodukt des Hefestoffwechsels. Die Hefe produziert bekanntlich eine ganze Reihe solcher in sogenannten Stoffwechsel-Sackgassen sich anhäufender Nebenprodukte, zu denen auch Bernsteinsäure, Citramalsäure und Hydroxyglutarsäure zu rechnen sind, ebenso wie Acetoin und 2,3-Butandiol, die nach dem in Abb. 1 gezeigten Stoffwechselschema zu 2-MDHBS in nahen Beziehungen stehen. Es ist daher zu vermuten, daß 2-MDHBS in verstärktem Umfange unter solchen Gärungsbedingungen gebildet wird, die auch eine verstärkte 2,3-Butandiol- und Acetoinbildung zur Folge haben, also z. B. bei der aeroben Gärung (21). Möglicherweise führt auch eine Blockierung der Valinsynthese bei mutierten Hefestämmen zu einer Anreicherung von 2-MDHBS.

Wie unsere Versuche gezeigt haben, kommt von dieser im Wein nur die Threo-Form vor. In der Regel unterscheiden sich die Erythro- und die Threo-Verbindungen von Diolen u. a. auch durch die Spaltungsgeschwindigkeit mit Perjodat. Es läßt sich aber nicht vorhersagen, welche der beiden Formen schneller gespalten wird. Nur bei bestimmten Substanzgruppen, wie z. B. den cyclischen 1,2-Diolen bestehen solche Regeln. Die Übereinstimmung der Spaltungsgeschwindigkeit des durch Perameisensäure-Oxydation gewonnenen Präparates mit der aus dem Wein isolierten 2-MDHBS ist jedoch zusammen mit dem papierchromatographischen Befund als sicherer Beweis dafür anzusehen, daß diese die Threo-Konfiguration besitzt. Damit steht fest, daß es sich bei 2-MDHBS um einen normalen Bestandteil des Weines handelt. Weniger klar dagegen sind die Verhältnisse bei 3-MDHBS. CASTINO (14) fand davon im Wein 50—150 mg/l, WHITING und COGGINS (19) in Apfelwein nur 13 mg/l. CARLES (16) dagegen erwähnt die 3-MDHBS nicht. Auch wir konnten diese Säure, wie schon erwähnt, nicht finden. Auffällig ist, daß die Mengenangaben von CASTINO für 3-MDHBS ziemlich genau den von uns für 2-MDHBS gefundenen Werten entsprechen. Andererseits ist es nach dem von CASTINO benutzten Analyseverfahren ausgeschlossen, daß dieser 2-MDHBS miterfaßt hat. Es muß vorläufig offen bleiben, worauf diese widersprüchlichen Angaben zurückzuführen sind.

Zu ähnlichen Schlußfolgerungen wie bei der 2-MDHBS gelangt man auch bei der Beurteilung des Vorkommens von 2-HGS im Wein. Diese Säure wird ebenso wie 2-MDHBS und Citramalsäure — wie aus dem in Abb. 4 dargestellten Chromatogramm deutlich hervorgeht — während der Gärung gebildet. Über die Funktion der 2-HGS im Stoffwechsel ist nur bekannt, daß sie im Verlauf des Succinat-Glycincyclus — auch Shemin-Cyclus (22, daselbst S. 1061) genannt — aus 2-Ketoglutar-säuresemialdehyd entsteht, welcher ausgehend von dem aus dem Tricarbonsäurecyclus stammenden Succinyl-CoA über 2-Amino-3-Ketoadipinsäure aus 5-Amino-laevulinsäure, die gleichzeitig eine Vorstufe des Porphyrin-Ringes darstellt, gebildet wird. 2-HGS wird im Cyclus anschließend zu 2-Ketoglutar-säure weiteroxydiert. Es ist nicht bekannt, ob auch die während der Gärung gebildete 2-HGS auf diesem Wege entsteht. Vermutlich verläuft der letzte Reaktionsschritt in diesem Cyclus in umgekehrter Richtung.

In diesem Zusammenhang erhebt sich die Frage, ob es notwendig ist, für alle während der Gärung als Nebenprodukte gebildeten Hydroxyverbindungen die Existenz spezifischer Enzyme vorauszusetzen. Es ist durchaus denkbar, daß an einigen dieser Reaktionen auch weniger spezifische Dehydrogenasen beteiligt sind.

2-HGS wurde verschiedentlich in pflanzlichem Material nachgewiesen und von WHITING (19) in Mengen von etwa 70 mg/l einschließlich des Lactons auch im Apfelwein gefunden. Welcher Anteil der 2-HGS als Lacton vorliegt, wird von einem pH- und temperaturabhängigen Gleichgewicht bestimmt. Nach den bisherigen Erkennt-

nissen werden also im Verlauf der alkoholischen Gärung von Traubenmost folgende Hydroxy-Säuren als Nebenprodukte gebildet: Milchsäure, Bernsteinsäure, Anglycerinsäure, 2-Hydroxyglutarsäure, Citramalsäure, Zitronensäure und Äpfelsäure. Diese Säuren lassen sich mit den Laufmittelgemischen I und III gut voneinander trennen. Nur die Zitronensäure bleibt zusammen mit der Wein- und Äpfelsäure in der Nähe des Startfleckes zurück. Außerdem existiert mindestens noch eine als Gärungsnebenprodukt entstehende Hydroxysäure, die im Chromatogramm der Abb. 4 als Substanzfleck A über der Milchsäure erscheint und bei der es sich möglicherweise um eine Hydroxybuttersäure handelt. Die mittels Anionenaustauscher von den anderen Weinbestandteilen abgetrennte Säurefraktion jedes normalen Weines muß also nach der chromatographischen Trennung mit Laufmittel I ein ähnliches Bild wie in Abb. 4 ergeben. Die Bildung der oben genannten Hydroxysäuren geht auf Kosten des Alkohols. Sie müssen daher bei der Aufstellung von Bilanzgleichungen der alkoholischen Gärung, wie z. B. bei der von GENEVOIS (23) vorgeschlagenen Formel, berücksichtigt werden.

### Methoden

#### a. Papierchromatographie

Laufmittel I: Diisopropyläther, Ameisensäure, Wasser 90 : 70 : 3.

Laufmittel II: Diisopropyläther, Petroläther (Kp 60—80° C), Tetrachlorkohlenstoff, Ameisensäure, Wasser; 50 : 20 : 20 : 8 : 1.

Laufmittel III: n-Propanol, Ammoniak conc. 7 : 3.

Laufmittel IV: 1) n-Butanol, i-Butanol, n-Amylalkohol; 1 : 1 : 1. 2) Ameisensäure, Essigsäure, Wasser; 1 : 3 : 4. — 1) und 2) werden vor Gebrauch 1 : 2 gemischt (1).

Kammersättigung jeweils 1 Stunde.

Papier: Macherey & Nagel Nr. 261, aufsteigend.

Sprühmittel 1: Für Säuren allgemein

0,05 g Bromphenolblau gelöst in 100 ml Äthanol (96%) und mit 0,1 n NaOH auf pH 7—8 eingestellt.

Sprühmittel 2: Für 2-MDHBS

als Brenztraubensäure: Nach dem Trocknen zuerst mit 0,02 m  $\text{NaJO}_4$ -Lösung, 15—20 min, danach mit einem Gemisch aus Äthylenglycol, Aceton und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. 50 : 50 : 0,5 und nach weiteren 15 min mit einer Lösung von 5,2 g Natrium-2-thioarbiturat und 1,4 g NaOH in 100 ml Wasser besprühen und 5 min auf 100° C erhitzen. Formylbrenztraubensäure und Malondialdehyd aus 2-Keto-3-desoxyhexonsäuren und Desoxyzuckern geben leuchtend rote Flecken mit orange-roter Fluoreszenz im UV, Brenztraubensäure aus 2-MDHBS rosa-orangerote Flecken ohne Fluoreszenz.

als Acetaldehyd: Zuerst mit 2,5%iger  $\text{NaJO}_4$ -Lösung und 10 min danach mit einem Gemisch aus einer 7%igen wässrigen Natriumnitroprussid-Lösung mit piperazingesättigtem Äthanol und einer 1%igen methanolischen Äthylenglycol-Lösung (1 : 3 : 4) besprühen. Substanzen, welche nach Perjodatspaltung Acetaldehyd liefern, erscheinen als blaue Flecken.

#### b. Präparate

1) D,L-2-Methyl-threo-2,3-dihydroxybuttersäure: 5 g Tiglinsäure werden in 35 ml 90%iger Ameisensäure gelöst und 6,5 ml 30%iges  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Vorsicht!) zugefügt. Nach 24stündigem Erwärmen auf 37° C wird 1 Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt und aus dem Reaktionsgemisch durch mehrmaliges Eindampfen im Vakuum die Ameisensäure entfernt. Der zurückbleibende Sirup wird bei 80° C über Phosphorpentoxid getrocknet, der Rückstand durch Erwärmen in 30 ml Äthylacetat gelöst und die Lösung auf —24° C abgekühlt. Der ausgeschiedene Kristallbrei wird abgesaugt und nochmals aus Äthylacetat und danach aus Äthyläther umkristallisiert. Ausbeute 3,0 g, Fp 108° C.

2) D,L-2-Methyl-threo- und erythro-2,3-dihydroxybuttersäure: 2,68 g Tiglinsäure gelöst in 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$  werden 2,12 g  $\text{KMnO}_4$  gelöst in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bei einer Temperatur von 0° C tropfenweise im Laufe 1 Stunde unter Rühren zugesetzt. Danach wird kurz zur Entfernung des nebenbei entstehenden Acetaldehyds und zur Koagulation des  $\text{MnO}_2$  erhitzt und filtriert. Das Filtrat wird nach Passieren einer Säule aus IR-120 ( $\text{H}^+$ ) bei 40° C zu einem Sirup eingedampft. — Keine Kristallisation.

- 3) D,L-2-Methyl-erythro-2,3-dihydroxybuttersäure: 0,2 g Osmiumtetroxid werden in 5 ml Äther gelöst und einer Lösung von 73,8 mg Tiglinsäure in 5 ml Äther zugesetzt. Nach 6 Stunden wird im Vakuum der Äther entfernt, 10 ml Dioxan zugesetzt und 5 Stunden  $H_2S$  eingeleitet. Nach Zusatz von Aktivkohle wird filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in  $H_2O$  gelöst, nochmals mit wenig Aktivkohle filtriert und zu Sirup eingedampft. — Keine Kristallisation.
- 4) D,L-3-Methyl-threo-2,3-dihydroxybuttersäure: Entsprechend der Vorschrift 1) ausgehend von 3,3'-Dimethylacrylsäure wird ein Sirup erhalten, der nicht kristallisiert. Durch Neutralisation mit KOH wird daraus das Kaliumsalz gewonnen und dieses aus alkoholischer Lösung durch mehrmaliges Umfällen mit Äther gereinigt.

### c. Quantitative Bestimmungen

#### 1) 2-MDHBS

Papierchromatographische Vortrennung: 50 ml Wein werden über eine Säule aus 50 ml Dowex  $1 \times 2$  ( $HCOO^-$ ) gegeben. Nach dem Waschen wird mit 500 ml 0,5 n Ameisensäure eluiert, das Eluat im Vakuum eingedampft und der Rückstand in 5 ml Wasser aufgenommen. Von dieser Lösung werden dann  $5 \times 10 \mu l$  mit einer geeichten Pipette in der Mitte eines Viertelbogens ( $28 \times 30$  cm Chromatographiepapier Macherey & Nagel Nr. 261) im Abstand von 2,5 cm links und rechts davon authentische 2-MDHBS aufgetragen. Chromatographiert wird mit Laufmittel I über Nacht. Nach dem Trocknen werden durch Besprühen der beiden äußeren Streifen des Chromatogrammes mit Bromphenolblau die 2-MDHBS-Flecken lokalisiert und anschließend ausgeschnitten. Je Bestimmung müssen 3 Chromatogramme angesetzt werden, so daß also  $150 \mu l$  des 1 : 10 konzentrierten Weines aufgetragen werden können. Die 3 Streifen werden zerschnitten und 10mal mit je 25 ml Wasser extrahiert. Das Eluat wird filtriert, im Vakuum eingedampft und der Rückstand auf 5 ml aufgefüllt.

Enzymatische Bestimmung: 1 ml dieses Eluates werden bei Zimmertemperatur mit 1 ml einer 0,01 m  $NaJO_4$ -Lösung versetzt. Nach 30 min werden 2 ml 0,01 m Äthylenglycollösung zugefügt und nach weiteren 30 min 4 ml  $H_2O$ . Zu 1,5 ml dieser Mischung werden dann in einer 1 cm-Cuvette 0,5 ml 2,2 m  $K_2HPO_4$ -Lösung und 0,05 ml 0,012 m NADH-Lösung gegeben. Nach sorgfältigem Mischen wird die Anfangsextinktion  $E_1$  gemessen. Danach werden 0,05 ml einer 0,75 mg pro ml Lactatdehydrogenase (LDH) enthaltenden Lösung aus dem Pyruvat-Test der Fa. Boehringer, Mannheim, zugesetzt und im Verlaufe der nächsten 10 min die Extinktionen registriert. Durch Extrapolation auf den Zeitpunkt der Enzymzugabe ergibt sich  $E_2$  und damit  $\Delta E$ . Dieser Wert, korrigiert um die durch den LDH-Zusatz bedingte Extinktionsänderung — normalerweise 2,5% von  $E_1$  — ergibt mit  $F = 1512$  multipliziert den Gehalt an 2-MDHBS in mg/l.  $F$  wird errechnet nach der Formel

$$\frac{V \cdot MG \cdot D \cdot A}{E \cdot v \cdot d \cdot B} = F$$

- ) Darin ist:  $V$  = Gesamtvolumen des Meßansatzes = 2,1;  $MG$  = Molekulargewicht = 134;  $D$  = Verdünnungsfaktor =  $\frac{2,00 \cdot 8 \cdot 5}{1,5 \cdot 0,15 \cdot 10} = 35,55$ ;  $A$  = Umrechnung von ml in l = 1000;

$E$  = Extinktionskoeffizient =  $3,3 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$  bei 366 nm;  $v$  = Probevolumen =  $V$  — NADH-Lösung, Enzymlösung = 2,0;  $d$  = Schichtdicke = 1;  $B$  = Umrechnung von  $\mu\text{g}$  in mg = 1000.

Bestimmung durch Mikro-Diffusion: 1 ml des bei der chromatographischen Vortrennung erhaltenen Eluates und 1 ml 0,01 m  $NaJO_4$ -Lösung werden auf einander gegenüberliegende Stellen in den äußeren Teil einer Conway-Schale pipettiert. In das Zentralgefäß werden 2 ml einer 0,1%igen wässrigen 3-Methyl-2-benzothiazolonhydratonhydrochloridlösung gegeben. Dann wird der Deckel aufgesetzt und die Probelösung mit der Perjodatlösung durch vorsichtiges Umschwenken gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei Zimmertemperatur wird die Schale 2 Stunden in einen auf  $30^\circ C$  vorgeheizten Brutschrank gestellt. Danach wird entsprechend der Vorschrift von THEN und RADLER verfahren.

#### 2) 3-MDHBS

In einem graduierten 50 ml Schüttelzylinder mit Schliff werden 2 ml des oben erwähnten Eluates gegeben und mit 8 ml  $H_2O$  verdünnt. Anschließend verfährt man weiter wie bei CASTINO (15) angegeben.

### Zusammenfassung

Die als Gärungsnebenprodukt im Wein auftretende 2-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure wurde von der sich papierchromatographisch ähnlich verhaltenden Milchsäure in geeigneten Laufmitteln abgetrennt und über die bei der Perjodat-oxydation in stöchiometrischer Menge erhaltenen Spaltprodukte Acetaldehyd und Brenztraubensäure identifiziert und quantitativ bestimmt. Untersuchungen zur Konfigurationsaufklärung ergaben, daß 2-MDHBS im Wein in der Anglycerinsäure genannten Threo-Form vorliegt.

2-MDHBS stört die Milchsäurebestimmung nach REBELEIN, jedoch scheint die dadurch bedingte Ungenauigkeit aufgrund der bisher gefundenen geringen Mengen unerheblich zu sein.

Die von anderen Autoren im Wein gefundene 3-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Als weiteres Gärungsnebenprodukt wurde 2-Hydroxyglutarsäure und deren Lacton isoliert.

Nach Fertigstellung des Manuskriptes erschienen 3 Arbeiten von MÖHLER und PIRES (24, 25, 26), in denen ebenfalls über das Vorkommen von Anglycerinsäure im Wein berichtet wird. Ausgehend von den Ergebnissen der kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen von LAYOLE *et al.* (27) wird die Anglycerinsäure darin als die in der Erythro-Konfiguration vorliegende 2-MDHBS bezeichnet. Nach eingehenden Überlegungen sind wir zu der Ansicht gelangt, daß durch den von LAYOLE erbrachten Identitätsbeweis unsere Befunde, die zu der gegenteiligen Identifizierung führten und die im wesentlichen auf der spezifischen Darstellung der Erythro-Verbindung aus Tiglinsäure durch OsO<sub>4</sub>-Oxydation beruhen, unberührt bleiben. Wir möchten daher bis zu einer erneuten Überprüfung die Identifizierung der Konfiguration insgesamt in Frage stellen.

Zur Bestimmung der Anglycerinsäure wurden von MÖHLER und PIRES die durch Chromatographie an einer Silikagelsäule von anderen Weinbestandteilen getrennten und gereinigten Substanzen mit Perjodat umgesetzt und danach jodometrisch titriert. Es wurden auf diese Weise 60—525 mg/l, im Mittel ca. 220 mg/l Anglycerinsäure im Wein festgestellt. Diese Werte liegen beträchtlich über den von uns gefundenen Mengen. Ob diese Differenzen analytisch oder substratbedingt sind, ist vorerst nicht bekannt. Ebenfalls nach Fertigstellung des Manuskriptes erschien eine Arbeit von CASTINO (28), in der über 2-MDHBS-Gehalte im Wein berichtet wird, die zwischen 52 und 144 mg/l (Mittelwert 92 mg/l) liegen und damit mit den von uns gefundenen Werten gut übereinstimmen.

### Literaturverzeichnis

1. TANNER, H. und RENTSCHLER, H., 1958: Ein für die Betriebspraxis geeignetes Verfahren zur Bestimmung des Äpfelsäure-Milchsäure-Verhältnisses von Weinen. Mitt. Klosterneuburg A 8, 113—120.
2. WÜRDIG, G. und SCHLOTTER, H. A., 1969: Isolierung und Nachweis SO<sub>2</sub>-bindender Stoffe im Wein. Wein-Wiss. 24, 67—82.
3. WARREN, L., 1960: Thiobarbituric acid spray reagent for deoxy sugars and sialic acids. Nature 186, 237.
4. WEISSBACH, A. and HURWITZ, J., 1959: The formation of 2-Keto-3-deoxy-heptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. J. Biol. Chem. 234, 705—709.
5. HAIS, I. M. and MACEK, K., 1963: Handbuch der Papierchromatographie. Bd. I, VEB G. Fischer-Verl. Jena, 1069 S., das. S. 912.
6. STRASSMANN, M., SHATTON, J. B. and WEINHOUSE, S., 1960: Conversion of  $\alpha$ -acetylactic acid to the valine precursor,  $\alpha,\beta$ -dihydroxyisovaleric acid. J. Biol. Chem. 235, 700—705.
7. SCHORMÜLLER, J. und CLAUS, W., 1967: Untersuchungen über das Vorkommen und die Entstehung der Schleimsäure in Traubenmosten und Weinen. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. 133, 65—72.
8. CARLES, J., LAMAZOU-BETBEDER, M. et PECH, R., 1958: Existe-t-il une fermentation citramalique dans le vin? C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 246, 2160.
9. LEY, J. DE and DOUDOROFF, M., 1957: The metabolism of D-galactose in *Pseudomonas saccharophila*. J. Biol. Chem. 227, 745—757.
10. REBELEIN, H., 1964: Kolorimetrische Bestimmung der Äpfelsäure in Verbindung mit der gleichzeitigen Bestimmung der Wein- und Milchsäure in Most und Wein. Dt. Lebensm.-Rundsch. 60, 140—144.

11. THEN, R. und RADLER, F., 1968: Zur Bestimmung von Acetaldehyd. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. 138, 163—169.
12. Firmenschrift Pyruvat-UV-Test C. F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim.
13. BLOUIN, J., 1966: Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins. Ann. Technol. Agric. (Paris) 15, 223—287, 359—401.
14. CASTINO, M., 1968: La presenza nei vini dell'acido 2,3-diidrossiisovalerianico. Riv. Viticolt. Enol. (Conegliano) 21, 177—188.
15. — — , 1967: Microdeterminazione colorimetrica dell'acido  $\alpha$ -metilmalico nei vini. Riv. Viticolt. Enol. (Conegliano) 20, 247—257.
16. CARLES, J., LAYOLE, J. et LATTES, A., 1966: Un nouvel acide organique du vin, l'acide diméthylglycérique. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 262, 2788—2799.
17. — — , TALIEU-ROUSSEAU, M. et MONTANT, CH, 1967: Contribution à l'étude des acides organiques de la fermentation. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 265, 1183—1186.
18. DIMOTAKI-KOURAKOU, V., 1962: Présence de l'acide  $\alpha$ -methylmalique dans les vins. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 254, 4030—4031.
19. WHITING, G. C. and COGGINS, R. A., 1960: Organic acid metabolism in cider and perry fermentations J. Sci. Food Agricult. 11, 337—344.
20. MYERS, G. S., MOROZOVITCH, P., GLEN, W. L., BARBER, R., PAPINEAU-COUTURE, G. and GRANT, G. A., 1955: Some new hypotensive ester alkaloids from *Veratrum viride*. J. Amer. Chem. Soc. 77, 3348—3353.
21. KIEHLHÖFER, E. und WÜRDIG, G., 1960: Die Bestimmung von Acetoin und Diacetyl im Wein und der Gehalt deutscher Weine an diesen Substanzen. Wein-Wiss. 15, 135—146.
22. FLASCHENTRÄGER, G. und LEHNARTZ, E., 1966: Physiologische Chemie. Bd. II, Teil 2. Springer-Verl. Berlin.
23. GENEVOIS, L., 1936: Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 18, 295.
24. MÖHLER, K. und PIRES, R., 1969 a: Verteilungschromatographie organischer Säuren. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. 139, 337—345.
25. — — und — — , 1969 b: Bestimmung von organischen Säuren in Wein durch Verteilungschromatographie. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. 140, 3—12.
26. — — und — — , 1969 c: Nachweis und Bestimmung von Anglicerinsäure (2-Methyl-2,3-dihydroxybuttersäure) in Wein. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. 140, 88—93.
27. LAYOLE, J., LATTES, A., WHITING, G. C. et CARLES, J., 1967: Détermination de la configuration de l'acide diméthyl-2,3-glycérique naturel. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 265, 1277—1279.
28. CASTINO, M., 1969: Gli acidi 2-metilmalico, 2,3-diidrossiisovalerianico e 2,3-diidrossi-2-metilbutirico nei vini. Riv. Viticolt. Enol. (Conegliano) 22, 197—207.

Eingegangen am 17. 6. 1969

Dr. G. WÜRDIG  
LLVA für Weinbau,  
Gartenbau und Landwirtschaft  
55 Trier