

## Radio-gaschromatographische Untersuchung der Stoffwechselleistungen von Hefen (*Saccharomyces* und *Schizosaccharomyces*) in der Bildung von Aromastoffen<sup>1)</sup>

VON

F. DRAWERT, A. RAPP UND H. ULLEMEYER

Wie wir vor kurzem anhand einer eingehenden Bestandsaufnahme der Aromastoffe von Weinen, Traubenmosten und Modellgärversuchen nachgewiesen haben (1), entsteht ein wesentlicher Teil der mehreren hundert Einzelkomponenten des Gesamtaromas eines Weines während der Hefegärung. Die besondere Bedeutung des Hefestoffwechsels für die Bildung von Aromastoffen wurde deutlich, als wir mit Hilfe standardisierter Extraktionen zu ihrer Anreicherung und leistungsfähiger gaschromatographischer Methoden zur Trennung und zum Nachweis die in Traubenbeeren, Traubenmosten, Weinen und Modellgärversuchen vorhandenen Aromakomponenten miteinander verglichen (1). Dabei zeigte sich u. a., daß die Hauptmenge der für einen Wein bedeutsamen Bukettstoffe während der Hefegärung entsteht; neben mengenmäßig hervortretenden Verbindungen wie Äthanol und Glycerin (g/l), iso-Butanol und iso-Amylalkohole (Fuselöle; mg/l) werden zahlreiche Verbindungen wie Alkohole, Aldehyde, Ketone, Ester ( $\mu\text{g/l}$ ) neu gebildet.

Modellgärversuche, über die wir in Kürze zusammenfassend berichten, haben uns ferner gezeigt, daß definiert zum Gärsubstrat zugesetzte Stickstoff-Verbindungen (Aminosäuren und Ammoniumsalze) bei sonst gleicher Zusammensetzung der Nährlösung und vergleichbaren experimentellen Bedingungen den Hefestoffwechsel in der Bildung von Gärungsprodukten nachhaltig beeinflussen. Diese Wirkung erstreckt sich sowohl auf Haupt- als auch auf Nebenprodukte der alkoholischen Gärung. Im Falle der mengenmäßig unterschiedlichen Bildung von Butanolen und Pentanolen (2), Äpfelsäure (3) und Weinsäure (4) konnte der Einfluß verschiedener N-Quellen differenziert werden. Bei den Äpfelsäureversuchen zeigten sich auch die Beziehungen zwischen N-Quellen und Arteigenschaften verschiedener Hefen bei der Äpfelsäurebildung (3).

Unsere Beobachtung, wonach bei vergleichbaren Zucker- aber verschiedenen Aminosäuregehalten von Gärsubstraten unterschiedliche Mengen an Aromastoffen gebildet werden, ist nun im Falle des Weines erklärbar. Traubenbeeren weisen nämlich bei ähnlichen Zuckergehalten in Abhängigkeit von Sorte, Reifungsbedingungen und Reifegrad eine ganz verschiedene Zusammensetzung an freien Aminosäuren auf (5).

Wir konnten aus unseren Versuchen in Übereinstimmung mit der umfangreichen und weitverstreuten Hefeliteratur, die erst durch neuere Zusammenfassungen erschlossen worden ist (6—9), folgern, daß Kohlenhydrate als wichtigste Nährstoff-

<sup>1)</sup> Nach Vorträgen von F. DRAWERT im Kolloquium für Organische Chemie und Biochemie der Univ. Mainz am 2. 7. 1964, bei der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Landesgruppe Rhein-Main in Frankfurt am 14. 12. 1965, im Organisch-Chemischen Kolloquium der TH Karlsruhe am 26. 2. 1966, bei der 25. Arbeitstagung des Arbeitskreises Südwest-Deutschland der Fachgruppe Lebensmittelchemie und gerichtliche Chemie am 29. 4. 1966 in Freiburg/Br. und anlässlich des 46. Deutschen Weinbaukongresses am 7. 9. 1966 in Stuttgart.

und Energiequelle der Hefen das Kohlenstoffgerüst für die Hauptprodukte der alkoholischen Gärung, ein gewisses Reservoir an Metaboliten und Energie zur Verfügung stellen. Für die Bildung der zahlreichen Gärungsnebenprodukte, die eigentlichen Aromastoffe, sollten indessen die im Gärsubstrat vorhandenen Stickstoff-Verbindungen von besonderer Bedeutung sein. Von den Aminosäuren, die aus theoretischer Sicht als Aroma-Vorläufer (Precursor) anzusehen sind, konnte angenommen werden, daß sie, je nach dem Mechanismus ihrer Aufnahme aus dem Nährsubstrat in die Hefezelle, Metabolite in unterschiedlichen Mengen mit verschiedenen Strukturen in den Hefestoffwechsel einbringen. Diese können mit den Metaboliten des Kohlenhydratstoffwechsels zu Nebenprodukten der alkoholischen Gärung reagieren oder zu Gliedern der Hauptwege des Stoffwechsels werden. Nachdem uns die Modellgärversuche die vermutete „biochemische Wertigkeit“ der N-Verbindungen bezüglich der Bildung von Gärungsnebenprodukten anhand quantitativer Maßzahlen bestätigt hatten, prüften wir mit  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen die Stoffwechselbeziehungen zwischen C- und N-Verbindungen. Diese Untersuchungen sollten insbesondere die Frage klären, inwieweit die Haupt- und Nebenwege der alkoholischen Gärung ineinandergreifen und in welchem Ausmaß die einzelnen Stoffwechselprodukte sowohl aus dem Kohlenstoffgerüst von Zuckern und Säuren als auch dem der Aminosäuren gebildet werden.

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der Versuche mit  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen hinsichtlich der Entstehung flüchtiger Verbindungen dargestellt und deren mögliche Bildungswege ausführlich anhand der einschlägigen Literatur diskutiert.

### Beschreibung der Methoden und Versuche

#### Gärversuche mit radioaktiv markierten Verbindungen

1. Nährlösung und zugesetzte  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen: Pro Versuch wurden 500 bzw. 250 ml steril filtrierter Traubenmost der Rebsorte Riesling 90 (Geilweilerhof) mit 0,2 bzw. 0,1 mC der zu prüfenden, nachfolgend aufgeführten radioaktiven Verbindung versetzt und mit 0,2 bzw. 0,1 ml einer Hefesuspension beimpft:

Traubenmost ml	mC	$^{14}\text{C}$ -Verbindung	Hefe
500	0,2	DL-Weinsäure(-1,4- $^{14}\text{C}$ ) <sup>1)</sup>	S. c. H <sub>2</sub>
500	0,2	L-Glutaminsäure (U) <sup>2)</sup>	S. c. H <sub>2</sub>
500	0,2	L-Prolin (U) <sup>3)</sup>	S. c. H <sub>2</sub>
500	0,2	L-Asparaginsäure (U) <sup>4)</sup>	S. c. H <sub>2</sub>
500	0,2	D-Glucose (U) <sup>5)</sup>	S. c. H <sub>2</sub>
500	—	Blindprobe	S. c. H <sub>2</sub>
250	0,1	DL-Äpfelsäure(-3- $^{14}\text{C}$ ) <sup>6)</sup>	S. c. H <sub>2</sub>
250	0,1	DL-Äpfelsäure(-3- $^{14}\text{C}$ ) <sup>6)</sup>	Schiz. p.

<sup>1)</sup> DL-Tartaric acid-1,4- $^{14}\text{C}$ : CFA 165\*; 2—5 mC/mMol.

<sup>2)</sup> L-Glutamic acid (U): CFB 10\*; 5—10 mC/mMol.

<sup>3)</sup> L-Proline: CFB 17\*; 5—10 mC/mMol.

<sup>4)</sup> L-Aspartic acid (U): CFB 9\*; 5—10 mC/mMol.

<sup>5)</sup> D-Glucose (U): CFB 2\*; 2—4 mC/mMol.

<sup>6)</sup> DL-Malic acid-3- $^{14}\text{C}$ : Lot 880231 Calbiochem; 6,8 mC/mMol.

\* Radiochemical Centre, Amersham, England.

## Analysendaten des Traubenmostes

202 g/l Gesamt-Zucker (87,5<sup>o</sup> Oechsle)  
 10,8<sup>1/100</sup> Gesamt-Säure (berechnet als Weinsäure)  
 pH 3,2  
 Ernte am 6. 11. 1963

## Aminosäuren in mg/l

His	52,6	Gly	3
Lys	3,0	Ala	82,8
Arg	595,0	Val	50,3
NH <sub>3</sub>	96,0	Met	41,7
Asp	93,0	iLeu	131,1
Thr	162,0	Leu	175,6
Ser	348,0	Tyr	10,8
Glu	225,0	Phe	221,0
Pro	201,0		

2. Hefen: Zur Beimpfung wurden die Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* Stamm H<sub>2</sub> (S. c. H<sub>2</sub>; Weinhefe) und *Schizosaccharomyces pombe* var. *acidodevoratus*<sup>2)</sup> (Schiz. p.) verwendet. Die Hefe-Impfsuspensionen wurden durch Abschwemmen von 8 Tage alten Schrägagarkulturen (Hefeextrakt-Peptonagar) mit physiologischer Kochsalzlösung und nephelometrischer Einstellung auf etwa gleiche Zelldichte hergestellt. Von diesen werden 0,2 bzw. 0,1 ml zur Beimpfung verwendet.

3. Gärbedingungen: Die Gärung erfolgte in 500 ml-Enghals-Erlenmeyerkolben bei 25° C (Wasserbad-Thermostat). Gärdauer 20 Tage. Während der Gärung blieben die Versuchsansätze gasdicht mit Waschflaschen zur Absorption des Gärungs-CO<sub>2</sub> (150 ml 50%ige KOH) verbunden. Um eine Entbindung leichtflüchtiger, in KOH nicht absorbierbarer <sup>14</sup>C-Verbindungen zu verhindern, ist den Gaswaschflaschen ein Aktivkohlefilter nachgeschaltet. Die Kulturen wurden 1- bis 2mal täglich umgeschüttelt.

4. Aufarbeitung: Die Hefen wurden durch Zentrifugieren abgetrennt und nach dreimaligem Waschen mit dest. Wasser im Vakuumexsikkator über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Zur Bestimmung der Radioaktivität der Hefen verbrannten wir Proben nach unserer Kolbenverbrennungsmethode und bestimmten die Aktivität des <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> mit Hilfe einer speziellen Apparatur (10). Die Zentrifugate trennten wir durch schonende Vakuum-Destillation im Rotationsverdampfer (Badtemperatur 40° C) in die Fraktionen Destillate und Destillationsrückstände auf. Die Gesamtaktivität der Destillationsrückstände wird wie bei den Hefen ermittelt. Die Untersuchung der Fraktionen Destillate erfolgte radio-gaschromatographisch.

## Radio-Gaschromatographie

Die Methoden und Geräte sind von uns in mehreren Veröffentlichungen genau beschrieben worden (10–13).

Bedingungen für die Radiogramme: Trennsäule (Edelstahlrohr vom Innendurchmesser 6 mm) 3,2 m Sebacinsäure-di-(2-äthylhexyl)-ester auf Kieselgur (säuregewaschen; 65–80 mesh) (20 + 80); 75° C; 65 ml H<sub>2</sub>/min.

Weitere gaschromatographische Verfahren und Extraktionsmethoden zur Anreicherung von Aromastoffen aus der Fraktion Destillat wurden vor kurzem genau beschrieben (1).

<sup>2)</sup> Nach H. H. DITTRICH, dem wir für die Überlassung der Hefe zu danken haben.

## Ergebnisse

Aus Tabelle 1 ist die prozentuale Verteilung der Radioaktivität über verschiedene Fraktionen zu ersehen. Ihr ist zu entnehmen, daß im Nährmedium Traubenmost — im Gegensatz zu synthetischen Medien mit nur einer Stickstoffquelle (abgesehen von den relativ geringen Mengen Histidin, Methionin, Tryptophan im BasalmEDIUM) — Prolin nicht in flüchtige Verbindungen umgesetzt wird. Dieser Befund stimmt mit unseren Untersuchungsergebnissen von Faßgärversuchen überein, bei denen sich zeigte, daß das Prolin des Traubenmostes von den Hefen kaum verwertet wird (14), solange andere, besser verwertbare N-Verbindungen vorhanden sind. Auch Weinsäure wird unter diesen Voraussetzungen nicht in nennenswerter Menge als Kohlenstoffquelle von den Hefen in Anspruch genommen.

Von besonderem Interesse waren nun die Fraktionen Destillate, die radio-gaschromatographisch (10–13) weiter untersucht wurden. Mit Hilfe der Differenzmethode (10–13) konnte relativ einfach zwischen  $^{14}\text{C}$ -Äthanol und den übrigen flüchtigen  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen unterschieden werden (Tabelle 2).

Zur weiteren Aufschlüsselung der übrigen flüchtigen  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen, die im Vergleich zu Äthanol nur in relativ geringer Menge vorliegen, mußten diese aus den Destillaten durch Extraktion mit Pentan/Methylenchlorid (2/1) (1) angereichert wer-

Tabelle 1  
Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in Gärversuchen mit Traubenmost

$^{14}\text{C}$ -Verbindung	Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in				$\text{CO}_2$
	Hefen	Hefen	Destillat	Destillations-rückstände	
L-Glutaminsäure (U) <sup>1)</sup>	S. c. $\text{H}_2$ <sup>2)</sup>	22,2	0,5	69,0	8,3
L-Asparaginsäure (U)	S. c. $\text{H}_2$	24,9	17,9	29,3	27,9
L-Prolin (U)	S. c. $\text{H}_2$	4,8	—	95,0	0,2
D-Glucose (U)	S. c. $\text{H}_2$	1,3	64,3	5,5	28,9
DL-Weinsäure (1.4— $^{14}\text{C}$ )	S. c. $\text{H}_2$	0,2	—	99,1	0,7
DL-Äpfelsäure (-3- $^{14}\text{C}$ )	S. c. $\text{H}_2$	2,6	2,6	94,6	0,2
DL-Äpfelsäure (-3- $^{14}\text{C}$ )	Schizo. p. <sup>3)</sup>	1,3	38,8	60,3	0,1

<sup>1)</sup> Alle C-Atome markiert (uniformly labelled).

<sup>2)</sup> S. c.  $\text{H}_2$ : *Saccharomyces cerevisiae* Stamm  $\text{H}_2$ .

<sup>3)</sup> Schizo. p: *Schizosaccharomyces pombe* var. *acidodevoratus* (nach einem Vorschlag von H. H. DITTRICH).

Tabelle 2  
Prozentualer Anteil des Äthanolis an der Gesamtaktivität der Destillate

$^{14}\text{C}$ -Verbindungen	Äthanol %	Rest %
Glucose	95	5
Glutaminsäure	53	47
Asparaginsäure	60	40
Äpfelsäure (S. c. $\text{H}_2$ )	34	66
Äpfelsäure (Schizo. p.)	93	7

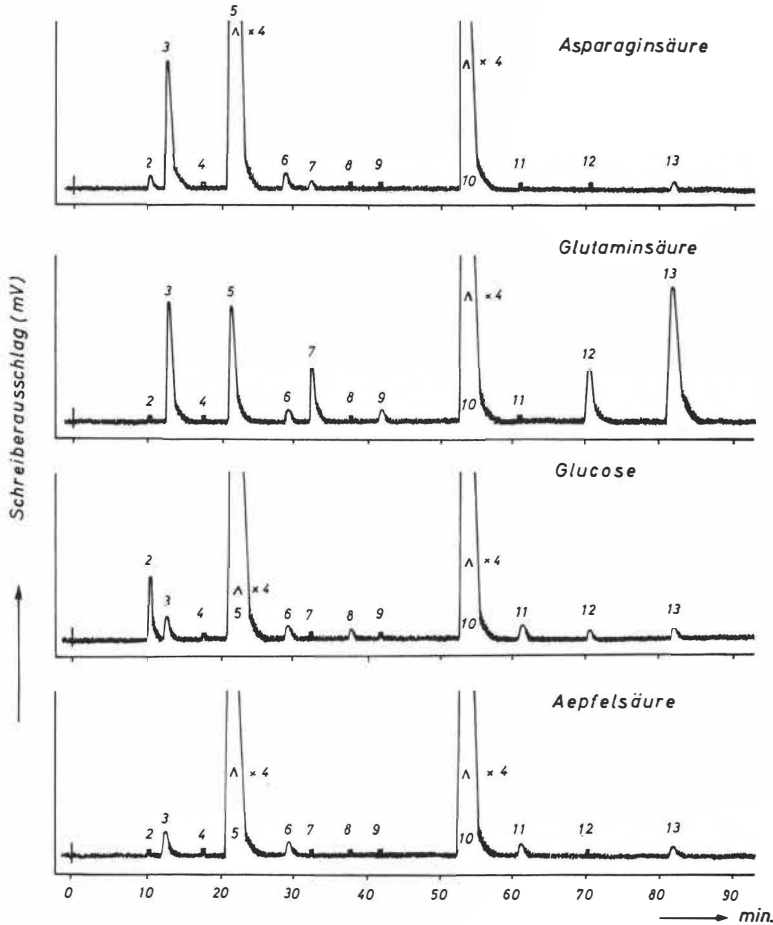


Abb. 1: Radiogramme von Extrakten aus Destillaten von Gäransätzen (vgl. Tabelle 1). Nr. 2—13 siehe Tabelle 3. Trennsäule vgl. Beschreibung der Versuche.

den. Die Extrakte wurden ebenfalls radio-gaschromatographisch untersucht, wobei in den Radiogrammen (Abb. 1) schon rein visuell die unterschiedliche Entstehung der Gärungsprodukte aus den verschiedenen  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen sichtbar wird; insbesondere ist die Tatsache hervorzuheben, daß iso-Butanol und Gärungsamylalkohol sowohl aus Glucose und Äpfelsäure, als auch aus Asparaginsäure und Glutaminsäure gebildet werden. Die prozentuale Verteilung aller  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen in den Destillaten wird in Tabelle 3 angegeben.

Wie aus Abb. 1 und Tabelle 3 zu ersehen ist, vermag schon die typische Weinhefe *Saccharomyces cerevisiae* Stamm  $\text{H}_2$  (Versuchshefe) Äpfelsäure als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Wie bekannt, ist diese Fähigkeit bei der sog. Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* var. *acidodevoratus* besonders ausgeprägt, wobei — wie bei den Zuckern als C-Quelle — hauptsächlich Äthanol und  $\text{CO}_2$  gebildet werden. Aus dem Radiogramm in Abb. 2 und der Tabelle 4 ist zu ersehen, daß darüber hinaus, wenn auch nur in geringerem Umfang als bei der normalen Weinhefe *Sacch. cerevisiae* Stamm  $\text{H}_2$  auch eine Reihe von Gärungsnebenprodukten entstehen.

Tabelle 3

Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in Destillaten aus Gäransätzen  
(vgl. Abb. 1; Hefe: *Saccharomyces cerevisiae* Stamm H.)

	Glucose	Eingesetzte <sup>14</sup> C-Verbindungen		Äpfel- säure
		Glutamin- säure	Asparagin- säure	
Äthanol	95	53	60	34
2 Essigsäureäthylester	0,52	0,25	0,60	0,12
3 Propanol (1)	0,10	1,50	3,80	1,30
4 Butanol (2)	(+)	+	+	0,06
5 iso-Butanol <sup>1)</sup>	1,50	0,95	19,60	31,70
6 Butanol (1)	0,10	0,20	0,40	0,52
7 *	(+)	0,45	0,20	0,10
8 Pentanol (2)	0,10	0,05	(+)	+
9 *	0,07	0,45	(+)	+
10 Gärungsamylalkohol <sup>2)</sup>	2,35	40,00	14,80	30,35
11 *	0,15	+	(+)	0,65
12 Pentanol (1)	0,07	0,45	0,10	0,03
13 Essigsäure-iso-amylester	0,10	1,40	0,15	0,45

\* Noch nicht sicher identifiziert.

<sup>1)</sup> 2-Methyl-propanol (1).

<sup>2)</sup> 3-Methyl-butanol (1) + 2-Methyl-butanol (1). + < 0,01%: (±) fraglich. 2—13 identisch mit den Peak-Nummern der Radiogramme in Abb. 1.

Tabelle 4

Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in den Destillaten aus den Gärversuchen  
mit DL-Äpfelsäure-3-<sup>14</sup>C (vgl. Abb. 2)

	S. c. H <sub>2</sub>	Schizo. p.
Äthanol	34	93
2 Essigsäureäthylester	0,12	0,04
3 Propanol (1)	1,30	0,02
4 Butanol (2)	0,06	+
5 iso-Butanol <sup>1)</sup>	31,70	0,70
6 Butanol (1)	0,52	0,01
7 *	0,10	—
8 Pentanol (2)	+	+
9 *	+	+
10 Gärungsamylalkohol <sup>2)</sup>	30,35	4,48
11 *	0,65	+
12 Pentanol (1)	0,06	0,03
13 Essigsäure-iso-amylester	0,45	0,07

\* Noch nicht sicher identifiziert.

<sup>1)</sup> 2-Methyl-propanol (1).

<sup>2)</sup> 3-Methyl-butanol (1) + 2-Methyl-butanol (1). + < 0,01%. 2—13 identisch mit den Peak-Nummern der Radiogramme in Abb. 2.

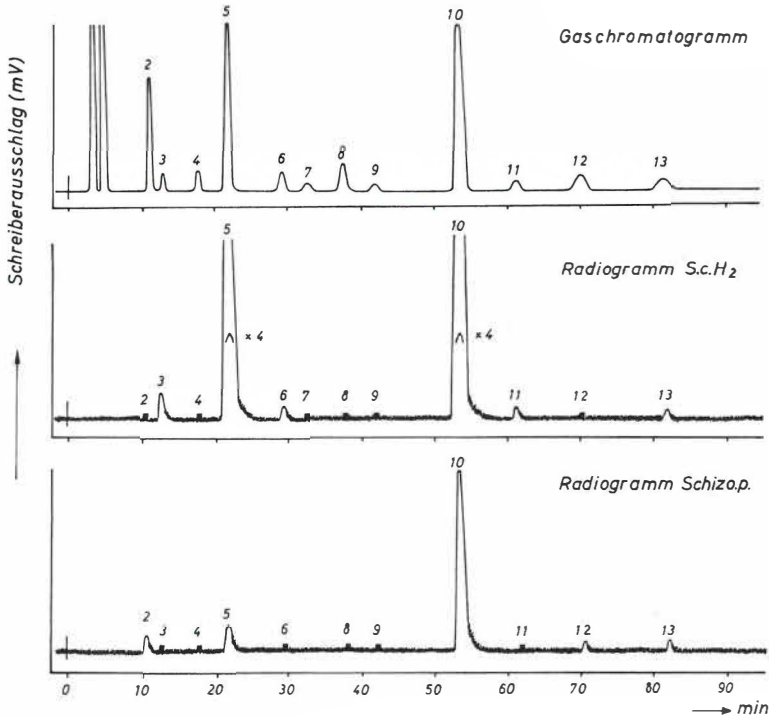


Abb. 2: Radiogramme von Extrakten aus Destillaten von Gäransätzen im Vergleich zu einem Test-Gaschromatogramm. Nr. 2—13 wie Tabelle 4. S. c. H<sub>2</sub>: *Saccharomyces cerevisiae* Stamm H<sub>2</sub>. Schiz. p.: *Schizosaccharomyces pombe*. Trennsäule vgl. Beschreibung der Versuche.

Die in den Tabellen 3 und 4 zum Ausdruck gebrachte hohe Genauigkeit der Messung kommt dadurch zustande, daß die gaschromatographisch getrennten Komponenten nach Verlassen des Gaschromatographen in einem unmittelbar anschließenden Umwandlungssystem (chemischer Reaktor) in chemisch gleiche Verbindungen (CH<sub>4</sub>) umgewandelt werden, so daß unabhängig von Menge und Struktur jede Verbindung mit gleicher Impulsausbeute gemessen wird.

Die vom Strahlungsdetektor festgestellten Impulse können über entsprechende Verstärkereinheiten in Verbindung mit Zeit- und Zählseinheiten sowohl einem Ratemeter und sodann einem Schreiber als auch von einer Zählseinheit direkt einem Zählbetragzeitdrucker übermittelt werden.

Im ersteren Fall erhält man ein Radiogramm (Abb. 1 und 2), dessen Banden gegenüber dem Gaschromatogramm zeitlich versetzt sind. Mit bekannten Hilfsmaßnahmen läßt sich ein Synchronlauf der Schreiber erreichen. Die Auswertung der Banden der Radiogramme erfolgt grundsätzlich gleichartig wie die der Gaschromatogramme. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die gemessene Radioaktivität eines bestimmten Radiogrammbereiches gleich 100% zu setzen und einzelne Peaks prozentual auszudrücken. Ein Radiogramm hat zwar einen visuellen Informationswert, indessen ist die Auswertung der Meßergebnisse direkt über einen Drucker genauer und einfacher. Beide Verfahren sind nebeneinander zu betreiben.



Im zweiten Fall übernimmt das Druckersystem nach Abfragen des Zählteils in vorwählbaren Zeitintervallen die dort angesammelten Informationen und gibt sie praktisch ohne Totzeit in Form von Zahlenwerten wieder. Da die Ausspülzeiten der einzelnen Komponenten aus dem gaschromatographischen System durch die Detektorinformation bekannt sind, kann die Meßzeit so vorgewählt werden, daß ein Peak in kleine Meßintervalle zerlegt wird. Dadurch entsteht eine peakanaloge Zahlenverteilung, wobei die Zahlen zur Ermittlung der Gesamtaktivität summiert und um den Wert des Nulleffektes korrigiert werden. Gegenüber den Radiogrammen können nach dieser Methode noch sehr geringe, im Radiogramm nicht mehr sichtbare, Aktivitätspeaks erfaßt werden. In Abb. 1 und 2 sind die so erfaßten Aktivitäten mit ■ kenntlich gemacht.

Um bei den Gärversuchen eine zutreffende prozentuale Angabe der Aktivitätsverteilung innerhalb der Destillate zu machen, wurde folgendermaßen verfahren: Der Hauptteil der gebildeten flüchtigen  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen besteht z. B. bei Glucose aus Äthanol. Dessen Aktivitätsanteil an den flüchtigen Verbindungen wird mit der Differenzmethode zu 95% ermittelt. Die restlichen 5% enthalten die im Extrakt vorhandenen übrigen flüchtigen  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen, deren Aktivitäten während einer Analysenzeit von 85 min nacheinander bestimmt werden. Die gefundene, um den Nulleffekt dieser Zeit korrigierte Impulszahl wird dann gleich 5% gesetzt und anteilig verrechnet.

### Diskussion

Die richtende Wirkung von Stickstoffverbindungen auf die Bildung von Gärungsprodukten konnte von uns in zahlreichen Beispielen sichergestellt werden (vgl. 2, 3, 4). Nun ist die Frage zu diskutieren, in welcher Weise Hefen verschiedene anorganische und organische N-Verbindungen assimilieren.

Unter den anorganischen N-Quellen haben sich Ammoniak und Ammonsalze für praktisch alle Hefen bewährt. WICKERHAM (15) konnte zeigen, daß in Gegenwart einer vollwertigen Wuchsstoffquelle Ammoniumsulfat als alleinige N-Quelle ausreicht. Nach Untersuchungen von PIRSCHLE (16), SCHWARTZ und KAUTZMANN (17) und LAMPIN und CESAR (18) existiert ein gradueller Unterschied in der Eignung verschiedener Ammonsalze; Salze der organischen Säuren scheinen im allgemeinen als N-Quelle geeigneter zu sein als die Salze der anorganischen Säuren. Unter den organischen Verbindungen kommt den Aminosäuren als N-Quelle ein besonderes Interesse zu, da sie in natürlichen Substraten in unterschiedlicher Menge vorkommen. SCHULTZ und POMPER (19) führten u. a. bei 40 Arten und Stämmen der Gattung *Saccharomyces* Versuche mit 19 verschiedenen Aminosäuren als alleiniger N-Quelle durch und fanden, daß beträchtliche Unterschiede im assimilatorischen Wert der Aminosäuren bei verschiedenen Arten und selbst Stämmen bestehen. Diese können auf Verschiedenheiten in der Enzymausstattung der Hefen bzw. auf unterschiedliche Desaminierbarkeit der Aminosäuren zurückgeführt werden. Aus diesen Untersuchungen und denen anderer Autoren wie MITCHEL und WILLIAMS (20), BARTON-WRIGHT (21, 22), MÖTHES (23), NIELSEN (24), THORNE (25–28), SPERBER (29) und KATING (30, 31) geht hervor, daß allgemein für Hefen, insbesondere für *Saccharomyces*-Arten folgende abnehmende Rangordnung der Aminosäuren hinsichtlich Verwertbarkeit zutrifft: Asp, Asp-NH<sub>2</sub>, Glu, Glu-NH<sub>2</sub>, Arg, Leu, Val, Ala, Pro, Ser, Phe, Orn, Met, iLeu, Tyr, Try, Gly, His, Lys, Cys, Thr. Nach Hefezuwachs beurteilt – eine der gebräuchlichsten Methoden zur Bestimmung der Verwertbarkeit von N-Quellen – stimmen unsere Befunde mit dieser Einordnung im Prinzip überein. Es ist dabei zu berücksichtigen,



daß, wie erwähnt, Unterschiede von Hefestamm zu Hefestamm vorkommen. Zur Beurteilung der Verwertbarkeit von N-Quellen sind die Befunde von HARTELIUS (32, 33) zu beachten, nach denen schlecht oder schwer assimilierbare Aminosäuren als alleinige N-Quellen im Gemisch mit anderen N-Verbindungen verwertbar werden. Sog. Würzen, die als komplexe Aminosäuren-Gemische zu werten sind, zeigen in der Regel die beste Hefevermehrung (34). Dasselbe trifft für das Substrat Traubenmost zu. Der hohe Stickstoffnährwert von komplexen Aminosäurengemischen (Würze, Traubenmost) ist einerseits auf die Mannigfaltigkeit der einzelnen Komponenten zurückzuführen, andererseits aber auch auf die unterschiedliche Form der Aufnahme von N-Verbindungen aus Gemischen. THORNE (25—28, 35—43) führte den Begriff der „intakten Assimilation“ der Aminosäuren durch Hefen ein. Diese Art der Aufnahme hat vor allem in komplexen Nährsubstraten Bedeutung, wo ihr Anteil von THORNE auf bis zu 80% geschätzt wird. Die Aminosäuren sollen etwa in dem gleichen Verhältnis verschwinden, in dem sie im Hefeprotein auftauchen. In Aminosäurengemischen nimmt THORNE ferner den Anteil der EHRlich-Reaktion (Desaminierung) zu 15% und den des Stickland-Mechanismus (Oxydoreduktion unter Abspaltung von  $\text{NH}_3$ ) zu 5% an. Der Wert von sog. Würzen als Nährsubstrat ist vor allem darin zu sehen, daß durch die intakte Assimilation von Aminosäuren ein kohlenhydrat-sparender Effekt auftritt. Die Aminosäuren können nach Untersuchungen von SPERBER (29), MOTHES (23) und KATING (30) mit ihrem Gerüst als C-Quelle fungieren. Wir gelangen aufgrund unserer Befunde zu der Auffassung, daß uniforme N-Quellen, insbesondere anorganische Ammonsalze, zwar den Gesamt-N-Bedarf decken können, jedoch einen kohlenhydratverschwendenden Effekt aufweisen, dadurch bedingt, daß die fehlenden Aminosäuren mit Hilfe des C-Gerüsts besonders der Kohlenhydrate aufgebaut werden müssen. Diese Annahme wird u. a. durch Gegenüberstellung der in Modellgärversuchen gebildeten Äthanolmengen und durch die Gärversuche mit  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen fundiert. Wie wir in Modellgärversuchen gezeigt haben (2), vermag Hefe unabhängig vom N-Angebot die dort angegebenen Aminosäuren zu synthetisieren. Sie wird dies je nach Beschaffenheit der N-Quelle auf verschiedenen Wegen tun. Das grundsätzlich gleichartige Synthesevermögen der Weinhefe S. c. H<sub>2</sub> (vgl. Abb. 1) ist auch aus Tabelle 5 zu ersehen, in der die prozentuale Verteilung freier Aminosäuren in den Hefezellen zweier Extremversuche dargestellt ist. Spalte 2 zeigt, daß aus Ammoniumsulfat alle untersuchten Aminosäuren gebildet werden. Mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als N-Quelle tritt ein Konzentrationsschwerpunkt bei  $\text{NH}_3$  auf; auch Serin ist gegenüber dem Versuch mit Traubenmost (komplexe N-Quelle) leicht erhöht. Ein auffälliger Unterschied zwischen den beiden Versuchen (Ammoniumsulfat-Traubenmost) besteht in der Konzentrationsdifferenz beim Prolin. Die unterschiedlichen Schwerpunkte in der Konzentration freier Aminosäuren bei beiden Versuchen weisen auf den unterschiedlichen Bildungsmechanismus der Aminosäuren hin und damit auf einen abgestuften Stoffwechsel, was sich wiederum in der Bildung der Gärungsprodukte zu erkennen gibt (2). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß TAYLOR (44) die freien Aminosäuren der Hefezellen als „Pool“ wertet, der zur Eiweißsynthese dienen kann und die adaptive Bildung von Enzymen beeinflusst. Die Auffassungen und Befunde von TAYLOR wurden von ROINE (45) bestätigt. Nach CHANTRENNE (46) kann die Synthese eines Eiweißmoleküls auch dadurch untersucht werden, daß man die Bildung adaptiver Enzyme verfolgt. Die vergleichbare Größenordnung der Verteilung der Aminosäuren in den beiden Versuchen (Tabelle 5) weist ferner darauf hin, daß, abgesehen von der N-Quelle, die Kulturbedingungen beider Versuche vergleichbar sind. Die von uns in den Weinhefen gefundenen freien Aminosäuren (Methoden vgl. 5, 111) stimmen in Art und Menge mit den Befunden anderer Autoren gut überein. KRAUT (47) fand Tyr (2,5—3,4%),

Tabelle 5  
 Prozentuale Zusammensetzung der freien Aminosäuren  
 in den Hefen aus den Gäransätzen mit Traubenmost  
 und Ammoniumsulfat als N-Quelle

Aminosäuren	Traubenmost*	Nährlösung**
His	4,0	3,0
Lys	3,8	1,7
Arg	7,1	5,6
NH <sub>3</sub>	21,4	45,4
Asp	+	3,7
Thr	+	1,3
Ser	5,2	10,4
Glu	2,6	+
Pro	28,7	3,9
Gly	3,1	+
Ala	19,5	14,5
Val	1,0	2,1
Met	+	1,1
i-Leu	+	1,5
Leu	3,6	3,2
Tyr	+	+
Phe	+	2,4

\* Riesling 90.

\*\* N-Quelle: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hefe S. c. H<sub>2</sub>.

LÜERS (48) Leu, ROINE (49) 12,8–13,4% Aminosäuren-N vom Gesamt-N der Hefen, DECKER (50) 10–20% Aminosäuren-N, SCHORMÜLLER (51) 10–21% freies His vom Gesamt-His sowie Met und Cys-SH (52), LJANGDAHL und SANDEGREN (53) Ala,  $\gamma$ -Aminobuttersäure, Arg, Asp, Cys-SH, Glu, Gly, His, iLeu, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val (Bierhefe).

Ergänzend zu den Aminosäuren-Befunden wird in Tabelle 6 die Abnahme der Aminosäuren im Substrat Traubenmost und damit die Aufnahme der einzelnen, im komplexen Gemisch vorliegenden Aminosäuren unter den experimentellen Voraussetzungen dargestellt. Ferner die Abgabe von Aminosäuren im Ammoniumsulfat-Versuch an das Medium, wobei nicht zu entscheiden ist, ob die Aminosäuren durch Autolyse von Hefezellen oder von der intakten Zelle abgegeben worden sind.

Zur Beurteilung der Bildung von flüchtigen Stoffwechselprodukten sind zunächst die verschiedenen Möglichkeiten der Assimilation von N-Verbindungen zu betrachten:

Die „intakte Assimilation“,  
 die Aufnahme über den EHRlich-Mechanismus,  
 die Aufnahme unter Beteiligung des SRICKLAND-Mechanismus,  
 weitere mögliche Reaktionen im Zusammenhang mit der Assimilation von N-Verbindungen.

Die „intakte Assimilation“

Diese Aufnahmeart findet nach den Ansichten von THORNE (25–28, 35–43) und BARTON-WRIGHT (21, 22, 54) vor allem bei komplexen N-Quellen statt; sie übt einen kohlenhydratsparenden Effekt aus. WINDISCH, KOLBACH und SCHILD (55) haben festgestellt, daß

Tabelle 6

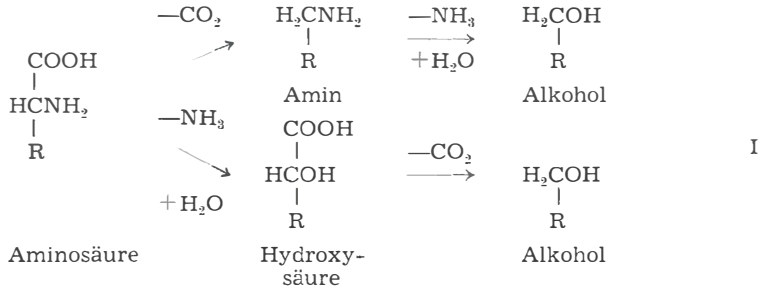
Abnahme und Zunahme von Aminosäuren in der Kulturflüssigkeit von Modellgärversuchen während der Gärung (S. c. H<sub>2</sub>)

Aminosäuren mg/l	Traubenmost Riesling 90		Nährlösung (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
	vor Gärung	nach Gärung	vor Gärung	nach Gärung
His	34,0	1,8	—	+
Lys	2,9	13,2	—	+
Arg	608,0	76,0	—	+++
NH <sub>3</sub>	39,8	1,1	—	+
Asp	75,8	9,3	—	+
Thr	79,6	3,5	—	+
Ser	188,0	11,0	—	+
Glu	106,0	6,9	—	++
Pro	122,1	253,3	—	+
Gly	5,2	9,8	—	+
Ala	56,3	17,3	—	+
Val	24,4	2,6	—	+
Met	13,8	8,2	—	—
i-Leu	46,5	5,1	—	—
Leu	55,0	19,9	—	+
Tyr	9,0	10,9	—	—
Phe	61,0	10,4	—	—
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	—	1500,0	400,0
	1527,4	460,3	1500,0	400,0

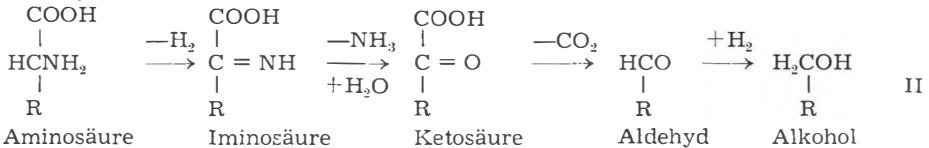
47% des aus Würze aufgenommenen Stickstoffs von den Aminosäuren stammen und 11,7% vom Ammoniak; demnach sollte der Aminosäurenstickstoff schneller aufgenommen werden als der Ammoniakstickstoff. Nach THORNE (56) werden gleiche Mengen Ammoniakstickstoff pro Zeiteinheit aufgenommen; der Aminosäurenstickstoff dagegen zu Beginn des Versuchs fünfmal schneller und später langsamer als der Ammoniakstickstoff. Hieraus wurde der Beweis abgeleitet, daß der EHRLICH-Mechanismus in diesem Falle nicht der einzige und wichtigste Mechanismus bei der Assimilation der Aminosäuren ist, denn nach EHRLICH müßte der Ammoniakstickstoff in jedem Fall schneller als der Aminosäurenstickstoff aufgenommen werden. THORNE folgert (35), daß die Hefe aus Aminosäuren-Gemischen Aminosäuren ohne Desaminierung aufnimmt. Auch WHITE und MUNNS (57) sowie TAYLOR (58) gelangen zu ähnlichen Feststellungen. TAYLOR deshalb, weil die Konzentration der freien Aminosäuren Arg, Glu, His, Tyr, Orn in der Hefezelle derjenigen der Kulturlösung proportional ist. Beweise für die intakte Aufnahme werden von HALVORSON, SPIEGELMAN und HINMAN (59, 60) durch den Nachweis der Aufnahme von Tryptazan ( $\alpha$ -Amino- $\beta$ -3-Indazolpropionsäure) — ein Tryptophan-Analoges mit hemmender Wirkung auf die Eiweißsynthese — sowie von LÜERS, STRICKER und SCHILD (61) durch Versuche mit Try und Tyr erbracht, die zum Teil aus dem Kulturmedium verschwinden, ohne daß sich die entsprechenden Alkohole bilden. Sehr schlüssig wird die intakte Aufnahme von Aminosäuren von EHRENSVÄRD (62) mit <sup>13</sup>C-Aminosäuren und von SANDEGREN, GUTHENBERG und ENEBO (63) mit <sup>14</sup>C-Aminosäuren nachgewiesen. Erst bei Verarmung eines ursprünglich komplexen Gemisches an bestimmten Aminosäuren oder im extremen Fall der einzigen N-Quelle werden die Hefen genötigt sein, ihre volle Synthesekapazität einzusetzen, um durch Synthese von N-Verbindungen ihren Bestand zu sichern.

## Der EHRLICH-Mechanismus

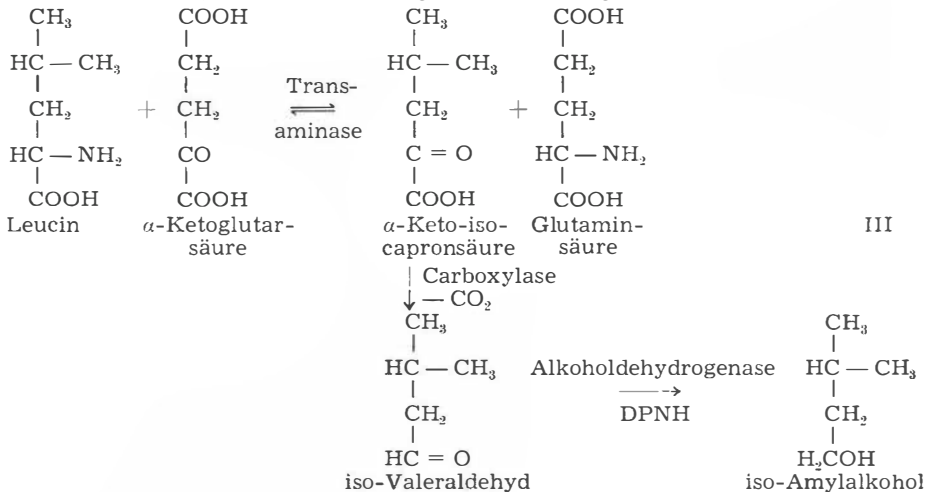
F. EHRLICH führte ausgedehnte Gärversuche mit Aminosäuren durch und fand, daß weder Hefepreßsaft noch abgetötete Hefen in der Lage waren, Fuselöl zu bilden (64). Er folgerte daraus, daß die Fuselölbildung eng mit einem funktionstüchtigen Eiweißstoffwechsel der Hefezellen verknüpft ist und bezeichnet die Fuselölbildung als „alkoholische Gärung der Aminosäuren“. EHRLICH wies ferner nach, daß lebende Hefen nur dann zur Bildung von Fuselölalkoholen befähigt sind, wenn im Substrat vergärbare Zucker vorliegt (65). So konnte er den unmittelbaren Übergang von Valin in iso-Butanol (2-Methylpropanol-1), Leucin in iso-Amylalkohol (3-Methylbutanol-1), iso-Leucin in D-Amylalkohol (2-Methylbutanol-1) und ferner von Tyrosin in Tyrosol, Tryptophan in Tryptophol und Phenylalanin in Phenyläthylalkohol (66—69) nachweisen. EHRLICH hatte die Vorstellung, daß entweder erst zum Amin decarboxyliert wird und dann unter Anlagerung von  $H_2O$  und Desaminierung der entsprechende Alkohol entsteht oder erst unter  $H_2O$ -Aufnahme zur Hydroxysäure desaminiert und dann erst decarboxyliert wird (70, 71):



NEUBAUER und FROMHERZ (72) führten die EHRLICHschen Versuche weiter und konnten nachweisen, daß Aminosäuren in entsprechende Ketosäuren umgewandelt werden. Daraus folgerten sie einen modifizierten Mechanismus:

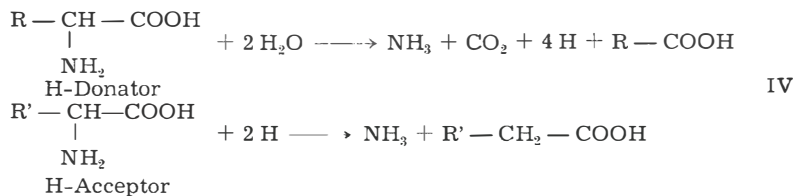


Dieser Mechanismus wurde durch NEUBERG und HILDESHEIMER (73) insofern bestätigt, als sie in Hefen Carboxylase fanden, die den Übergang Ketosäure-Aldehyd ermöglicht. SENTHESHANMUGANATHAN (74) kommt schließlich nach Experimenten mit zellfreien Extrakten aus *Saccharomyces cerevisiae* zu folgender Vorstellung:



## Der STICKLAND-Mechanismus

STICKLAND (75, 76) fand, daß *Clostridium sporogenes* zur Deckung des Energiebedarfes Dismutationsreaktionen zwischen Aminosäuren benutzt:



Als Donatoren können dienen: Ala, Ser, Val, Leu, Asp, Glu, Cys-SH, Phe, His. Als Acceptoren: Gly, Orn, Arg, Pro, Oxy-Pro, Try. THORNE (38, 39) wies nach, daß Hefen zwar die Stickland-Reaktion durchführen, jedoch nicht zur Energiegewinnung, sondern zur Stickstoffversorgung.

Überblickt man die Ergebnisse von Modellgärversuchen unter Einsatz einer einzigen N-Quelle (2), so sieht man, daß im Falle des Valin, Leucin und iso-Leucin die nach dem EHRLICH-Mechanismus zu erwartenden Alkohole bevorzugt gebildet werden. Daneben entstehen in diesen Gärversuchen aber auch andere Fuselölkohole sowie weitere flüchtige Verbindungen (1). Wie die weiteren Modellgärversuche zeigen, werden aber die nach dem EHRLICH-Mechanismus zu erwartenden Alkohole auch aus anderen Aminosäuren gebildet (1, 2) und schließlich sogar aus den Ansätzen mit Ammonsalzen oder aus C-Quellen, wie die Versuche mit  $^{14}\text{C}$ -Glucose und  $^{14}\text{C}$ -Äpfelsäure beweisen (Tabelle 3 und Abb. 1).

In Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -Glucose verhält sich die Menge des entstandenen  $^{14}\text{C}$ -iso-Butanols zu der des  $^{14}\text{C}$ -Gärungsamylalkohols wie 1 : 1,5 (Tabelle 3). Ähnliche Verhältniszahlen findet man bei Ammoniumtartrat, L-Glutamin, DL-Methionin + DL-Prolin und L-Tryptophan (2). Dies bedeutet im Vergleich zu den anderen Verhältniszahlen, daß diese N-Quellen kaum eine richtende Wirkung auf die Bildung der genannten Alkohole ausüben und im übrigen hier der Bildungsweg der Alkohole mit dem im  $^{14}\text{C}$ -Glucoseversuch vergleichbar sein kann. Weicht bei den einzelnen N-Quellen das Verhältnis der Alkohole nach beiden Seiten von 1 : 1,5 ab, so bedeutet dies, daß die N-Quelle eine richtende Wirkung ausübt bzw. unmittelbar mit ihrem Kohlenstoffgerüst in die Alkoholbildung eingeht. Zahlenverhältnisse, die größer sind als 1 : 1,5 weisen auf die bevorzugte Bildung von Gärungsamylalkohol hin, z. B. bei L-Glu, DL-Leu,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , L-Glu + D-Weinsäure + D-Äpfelsäure, DL-iLeu, L-Cys-SH und DL-Met (2). Auf einige dieser Befunde ist im Zusammenhang mit den  $^{14}\text{C}$ -Versuchen noch einzugehen. Bei Zahlenverhältnissen kleiner als 1 : 1,5 ist die Bildung von iso-Butanol bevorzugt, z. B. bei DL-Asp, DL-Val,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und  $\text{NH}_4$ -acetat. Diese Feststellung gilt in dem getroffenen Umfang allerdings nur, wenn die mit dem gleichen Hefestamm gewonnenen Ergebnisse untereinander verglichen werden. In Ergänzung zu den dargestellten Befunden war es noch von Interesse, die Wirkung einer bevorzugt nach dem EHRLICH-Mechanismus in den Hefestoffwechsel eingehenden N-Quelle (Valin) und vergleichsweise dazu die eines Ammonsalzes auf die Bildung der obengenannten Fuselölkohole bei verschiedenen Hefen und unterschiedlicher Gärtemperatur zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß im Falle des Valins (unveröffentlicht) bei allen untersuchten Hefen und bei verschiedenen Gärtemperaturen, selbst bei stark voneinander verschiedenen Vermehrungsarten der Hefen, der EHRLICH-Mechanismus vorherrscht. Demgegenüber tritt mit Ammoniumacetat als N-Quelle die Individualität einzelner Hefen deutlich und auch der Unterschied in der Gärtemperatur relativ stark hervor. Demnach ist es nicht zulässig

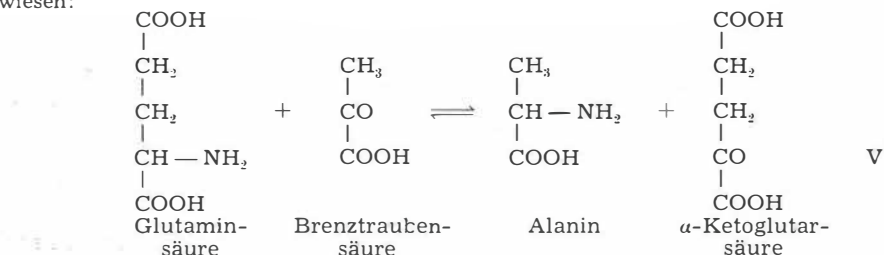
grundsätzlich die Gültigkeit eines Aufnahme- oder Umwandlungsmechanismus vorauszusetzen. Es ist durchaus möglich, daß auch im Falle der einzigen N-Quelle diese etwa zunächst „intakt“ aufgenommen und vielleicht sogar sekundär nach Art des EHRLICH-Mechanismus desaminiert wird, tertiär dann aber als Ketosäure völlig anders weiterreagiert. Demnach sind noch weitere, theoretisch mögliche Reaktionsfolgen und Reaktionsmöglichkeiten zu diskutieren. Schließlich sind auch Literaturangaben vorhanden, nach denen nicht nur die natürlichen L-Formen der Aminosäuren aufgenommen und verwertet werden, sondern auch die D-Formen. Nach NIELSEN (24) werden z. B. L- und D-Asparaginsäure und Glutaminsäure verwertet. EHRENSVÄRD (62) weist mit  $^{13}\text{C}$ -Alanin ebenfalls nach, daß beide optische Antipoden aufgenommen werden. Auch die Versuche von SUOMALAINEN und KAHANPÄÄ (77) mit DL-4- $^{14}\text{C}$ -Valin bei Bäckerhefe zeigen, daß nach 5 Tagen mehr als 50% des markierten DL-Valins gegenüber etwa 65% von L- $^{14}\text{C}$ -Leucin und von L- $^{14}\text{C}$ -iso-Leucin aufgenommen worden sind.

Ein Vergleich der gaschromatographisch untersuchten flüchtigen Gärungsprodukte zeigt (vgl. 1), daß die Unterschiede bei den einzelnen Modellgärversuchen mit verschiedenen N-Quellen im wesentlichen quantitativer und nur vereinzelt qualitativer Art sind. Bezieht man in diese Ergebnisse noch die weiteren, bisher von uns in Modellgärversuchen gefundenen flüchtigen Stoffwechselprodukte mit ein (1), deren Zahl mit Sicherheit noch weit größer ist, so erkennt man, daß die reichhaltige Enzymausstattung der Hefen, die den Zellen eine aerobe wie anaerobe Lebensweise ermöglicht, offenbar sehr viele Reaktionen so miteinander verknüpft, daß die hier zur Diskussion stehenden Verbindungen aus vielen, der Klassifikation nach stark voneinander verschiedenen Verbindungen entstehen können. Die bekannte enge Verbindung zwischen den Wegen des Intermediärstoffwechsels der Hefezelle macht es auch verständlich, daß die in Modellgärversuchen gefundenen Stoffe (1) prinzipiell und bis zum gewissen Grade unabhängig von der Art der N-Quelle gebildet werden. Auch die graduellen Unterschiede in der Syntheseleistung finden damit eine plausible Erklärung.

Ganz ähnlich dürften die Verhältnisse auch bei den flüchtigen Aromastoffen des Traubenmostes und des Weines liegen. Auch hier zeigt eine genauere Vergleichsanalyse in erster Linie nur quantitative Unterschiede. Es muß daher im Falle der Rebe das Ziel weiterer, verfeinerter Arbeiten sein, in Anbetracht der genetischen Verwandtschaft bestimmter Sorten, die evtl. vorhandenen prinzipiellen Unterschiede aufzufinden und zur Charakterisierung auszunutzen.

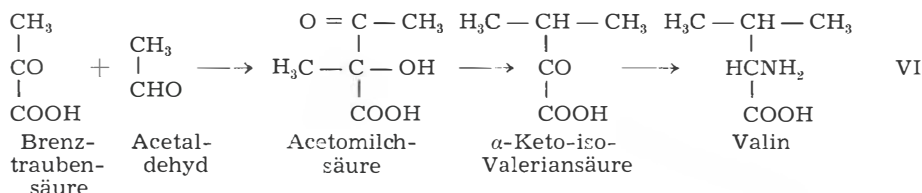
Weitere mögliche Reaktionen im Zusammenhang mit der Assimilation von N-Verbindungen

Die Modellgärversuche zeigen, daß die Hefen, mit denen experimentiert wurde, zur Synthese der untersuchten Aminosäuren aus verschiedenen N-Quellen befähigt sind. Man kann annehmen, daß die Umaminierung, deren Bedeutung allgemein bekannt ist, bei Hefen eine wichtige Rolle spielt. Für *Torula* hat ROINE (78—80) die Bildung von Alanin durch Umaminierung zwischen Brenztraubensäure und Glutaminsäure nachgewiesen:



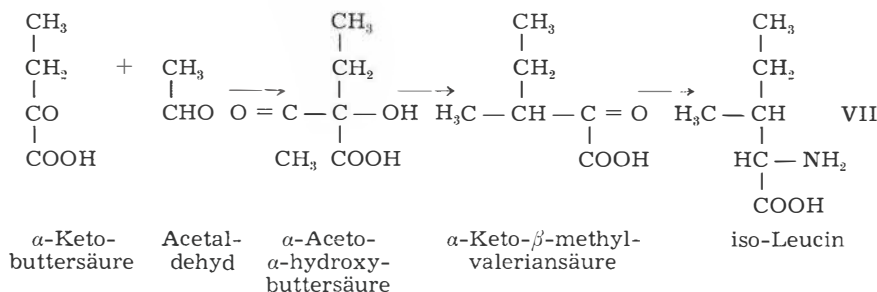


Auf weitere Umaminierungsmöglichkeiten bei *S. ellipsoideus* weisen ANTONIANI und CIOFFI (81) hin. Nach Untersuchungen von METZLER, IKAWA und SNELL (82) ist Pyridoxal-phosphat Coenzym der Umaminierung, wobei sich intermediär eine Schiffsche Base zwischen Aminosäure und Pyridoxal bilden soll. Nach THORNE (43) wird das Wachstum von *S. carlsbergensis* in einer mehrere Aminosäuren enthaltenden Nährlösung gehemmt, wenn ungenügende Mengen von Pyridoxal vorhanden sind. Neben der Umaminierung sind spezifische Synthesemechanismen verschiedener Aminosäuren bekannt. Die Kohlenstoffkette der Aminosäuren kann im intermediären Stoffwechsel der Zucker oder anderer Aminosäuren entstehen. LABBE, THOMAS, CHELDELIN, CHRISTENSEN und WANG (83) haben den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Kohlenstoff des Acetats und der Brenztraubensäure in Aminosäuren bei *S. cerevisiae* untersucht und festgestellt, daß je nach Position der markierten C-Atome die gebildeten Fette bzw. Aminosäuren mehr oder weniger aktiv sind. Demnach können Aminosäuren sowohl aus Brenztraubensäure als auch aus Essigsäure gebildet werden. Neben der Bildung von Äthanol als Endprodukt der alkoholischen Gärung wird, wie allgemein bekannt, in der Regel das Auftreten von Acetaldehyd und Essigsäure beobachtet. Diese vermitteln aber zusammen mit ihrer Vorstufe Brenztraubensäure eine Reihe von Synthesemöglichkeiten für Aminosäuren. Nach STRASSMANN, THOMAS und WEINHOUSE (84) soll Valin bei *Torula utilis* auf folgendem Wege gebildet werden:

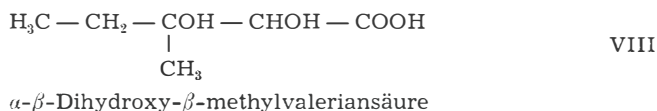


Die Autoren nehmen an, daß die primär entstehende Acetomilchsäure sodann einem intramolekularen Umbau nach Art der Pinakolin-Umlagerung unterliegt. Über eine Zwischenverbindung soll  $\alpha$ -Keto-iso-valeriansäure entstehen.

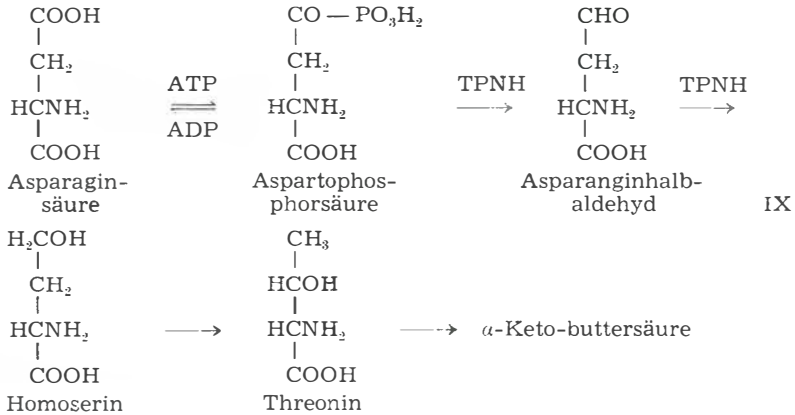
Iso-Leucin soll auf einem ähnlichen Wege (85) entstehen:



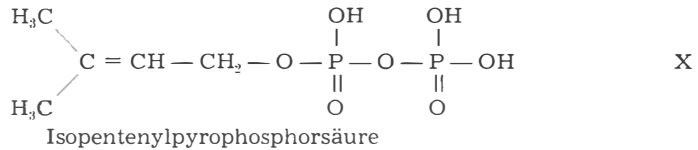
Mögliche Vorstufe des iso-Leucins könnte auch die  $\alpha$ - $\beta$ -Dihydroxy- $\beta$ -methyl-valeriansäure sein (86):



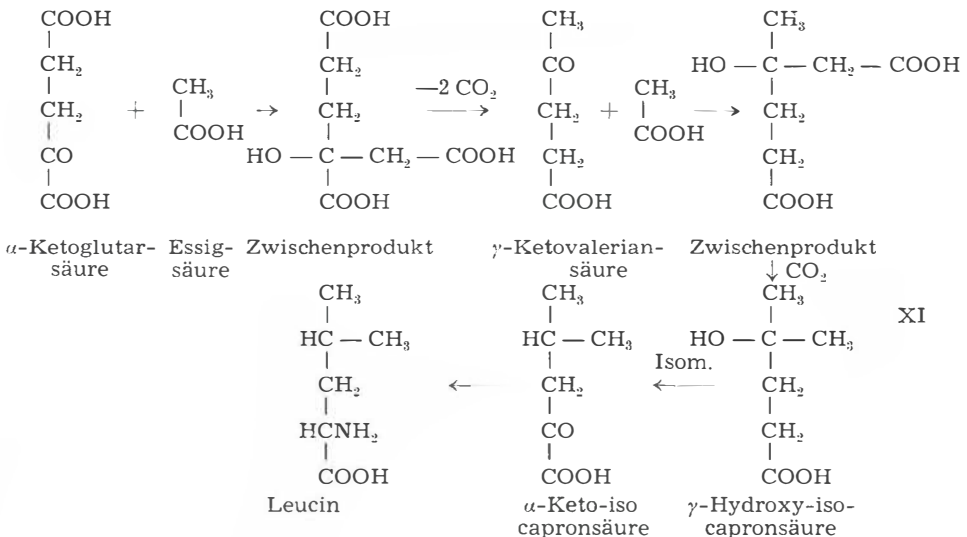
Die  $\alpha$ -Ketobuttersäure könnte aus Threonin gebildet werden und letzteres aus Asparaginsäure (87—90):



Auf die Bedeutung der Essigsäure als „wahres Intermediärprodukt“ im Verlauf der alkoholischen Gärung wird auch von GENEVOIS (91) hingewiesen, der aus Arbeiten seines Arbeitskreises ableitet, daß Essigsäure in Bernsteinsäure und Amylalkohol „außerhalb der Zelle“ übergeht. Als wichtiges Zwischenprodukt der Verarbeitung der Essigsäure betrachtet er die von LYNEN entdeckte Isopentenylpyrophosphorsäure und weist auf deren strukturelle Verwandtschaft mit iso-Amylalkohol hin:

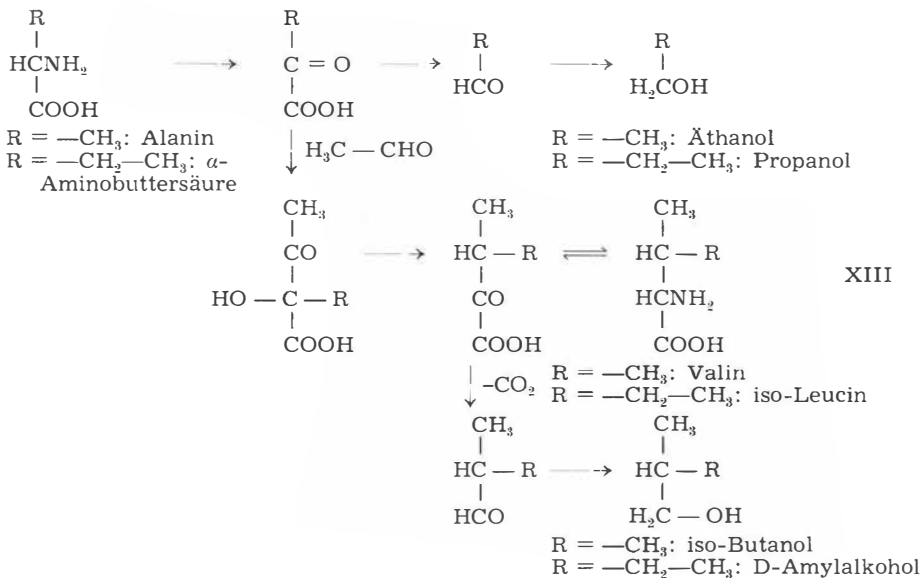
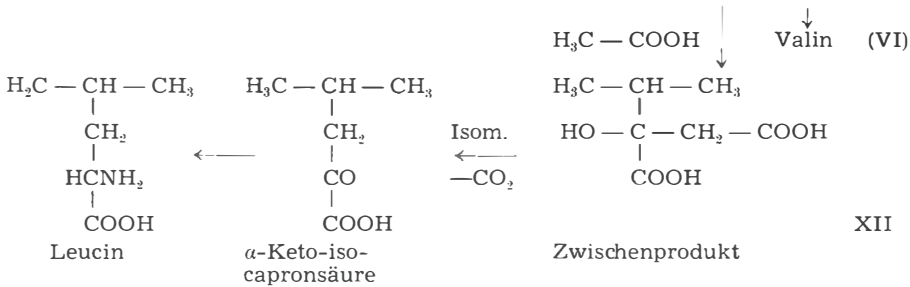


Die möglichen Mechanismen der Synthese von Aminosäuren durch Hefen bedürfen einer ausführlichen Diskussion, weil nach CROWELL, GUYMON und INGRAHAM (92) Mutanten von *S. cerevisiae*, die die Fähigkeit zur Bildung von Valin und iso-Leucin verloren haben, aus einem Angebot von 1- und 2-<sup>14</sup>C- $\alpha$ -Aminobuttersäure ausschließlich n-Propanol und n-Butanol bilden. Nach VII sollte normalerweise aus  $\alpha$ -Aminobuttersäure iso-Leucin und daraus D-Amylalkohol entstehen. Ähnliche Befunde ergaben sich bei einer Mutante, welche nicht mehr zur Bildung von Leucin befähigt ist (93). Im übrigen schlie-



ßen sich die Autoren der Auffassung von THOUKIS (94) an, der aus Versuchen mit <sup>14</sup>C-Verbindungen folgert, daß Fuselöle auch aus Kohlenstoffquellen entstehen. Sie erklären damit die Differenz zwischen den gebildeten Mengen an Fuselölkoholen und den im Most vorliegenden Aminosäuren. Die Versuche mit den Mangelmutanten von GUYMON und INGRAHAM sowie eigene Versuche weisen darauf hin, daß Brenztraubensäure, Acetaldehyd und Essigsäure als Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels nach den dargestellten Wegen Aminosäuren aufzubauen vermögen, aus denen bzw. deren unmittelbaren Vorstufen die Fuselölkohole entstehen. Im Falle der Glucose (Tab. 3) ist die relativ bevorzugte Bildung von iso-Butanol gemäß VI leicht verständlich. Dasselbe trifft für Gärungsamylalkohol nach VII und XI zu, denn REED, CHRISTENSEN, CHELDELIN und WANG (95) konnten mit <sup>14</sup>C-Essigsäure oder Brenztraubensäure bei Bäckerhefe die Entstehung von Leucin nachweisen. (Siehe Formel XI.)

Die etwa gleichgerichtete Bildung von iso-Butanol und Gärungsamylalkohol beim Glucoseversuch (Tab. 3) wird besonders gut durch die Befunde von STRASSMANN, LOCKE, THOMAS und WEINHOUSE (96) erklärt, die als gemeinsames Ausgangsprodukt für Valin und Leucin Brenztraubensäure und Acetaldehyd gemäß XII annehmen. Die Untersuchung von YOSHIZAWA (97) ergänzen diese Befunde (XIII):



Der besonders hohe Anteil von Gärungsamylalkohol im Glutaminsäureversuch wird gemäß XI erklärbar.

Im Asparaginsäureversuch wird die bevorzugte Bildung von Gärungsamylalkohol durch Übergang von Asp in  $\alpha$ -Ketobuttersäure nach IX und weiter nach VII verständlich, diejenige von iso-Butanol kann über Oxalessigsäure, Phospho-enol-brenztraubensäure und weiter nach VI zum Valin erklärt werden. Der beachtliche Anteil von n-Propanol im Asparaginsäureversuch weist auf eine Bevorzugung des Weges Asparaginsäure, Threonin,  $\alpha$ -Ketobuttersäure nach IX und weiter zu n-Propanol gemäß XIII hin. Dieses Ergebnis wird ferner durch die Arbeit von KEPNER, CASTOR und DINSMOOR (98) bestätigt, die annehmen, das *S. cerevisiae* aus  $\alpha$ -Ketobuttersäure über  $\alpha$ -Aminobuttersäure n-Propanol bildet.

Die Aminosäurenversuche (Tabelle 1) zeigen ferner, daß die Versuchshefe das C-Gerüst der Aminosäuren als C-Quelle zu nutzen vermag, wie dies besonders unter aeroben Verhältnissen bei *S. pastorianus* und *S. cerevisiae* durch Arbeiten von SCHULTZ, McMANUS und POMPER (99) und WHITE und MUNNS (100) bekannt geworden ist. *Torula utilis* wächst z. B. gut auf einem Nährboden, der nur Glycin oder Lysin enthält (101, 102). Insbesondere EHRENSVÄRD (62) konnte mit  $^{13}\text{C}$ -Alanin und Glycin nachweisen, daß der Aminosäuren-Kohlenstoff verwertet wird. Ähnliche Vorstellungen diskutieren HOUGH und STEVENS (103, 104) bei der Untersuchung der Fuselölbildung in Bieren. Ein Beweis für die unmittelbare Nutzung des C-Gerüsts von Glutaminsäure und Asparaginsäure als C-Quelle ohne Inanspruchnahme des EHRlich-Mechanismus ergibt sich aus den Befunden der Tabelle 3. 53% der gebildeten flüchtigen Verbindungen bestehen hier im Glutaminsäureversuch aus Äthanol; im Asparaginsäureversuch sind es 60%. Dabei ist noch hervorzuheben, daß bei Glu nur 0,5% der eingesetzten Radioaktivität im Destillat erscheinen, bei Asp 17,9% (Tabelle 1). Auch bei den Modellgärversuchen entstand aus Asp ein relativ hoher Äthanolwert.

Der Äpfelsäure-Befund in Tabelle 1, durch den nachgewiesen wird, daß „normale“ Weinhefe (*S. c. H<sub>2</sub>*) 2,6% der eingesetzten  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in flüchtige Verbindungen umzuwandeln vermag, bestätigt die schon lange geäußerte Vermutung der Verwertbarkeit von Äpfelsäure durch Weinhefen. Hiermit wird vor allem die Hypothese von PEYNAUD (105) gestützt, wonach alle Hefen der Gattung *Saccharomyces* in der Lage sein sollten, 10–25% der vorhandenen Äpfelsäure über eine „echte alkoholische Gärung“ und die Intermediärstufen Oxalessigsäure und Acetaldehyd in Äthanol umzuwandeln. Wie der Tabelle 4 ferner zu entnehmen ist, entstehen mit Äpfelsäure und *S. c. H<sub>2</sub>* aber nur 34% Äthanol und immerhin 30,4% Gärungsamylalkohol und 31,7% iso-Butanol (Fraktion Destillat). Unterstellt man, daß ein Übergang von Äpfelsäure über Oxalessigsäure, Phospho-enol-brenztraubensäure in Brenztraubensäure bzw. Acetaldehyd im Hefestoffwechsel möglich ist, dann findet man über Reaktion VI den Anschluß an die Valin- und damit an die iso-Butanol-Bildung und über Reaktion XII den Anschluß an die Leucin-Bildung.

In diesem Zusammenhang war die Verwertung der Äpfelsäure durch Hefen der Gattung *Schizosaccharomyces* von Interesse. Neuerdings haben diese in ihren Eigenschaften schon lange bekannten Hefen wegen ihrer „säureabbauenden“ Wirkung Bedeutung bekommen. In einer Reihe von neueren Arbeiten werden verschiedene Arten und Stämme bezüglich ihrer Stoffwechselleistungen gegenüber Äpfelsäure untersucht. Übereinstimmend bringen DITTRICH (106, 107), PEYNAUD, DOMERO, BOIDRON, LAFON-LAFOURCADE und GUIMBERTEAU (108), PEYNAUD und SUDRAUD (109) und MAYER und TEMPERLI (110) zum Ausdruck, daß diese Hefen aus Äpfelsäure bevorzugt Äthanol und  $\text{CO}_2$  bilden. Der Weg der Äthanol-Bildung soll über Oxalessigsäure-Brenztraubensäure und Acetaldehyd verlaufen.

Wie aus der Gegenüberstellung der  $^{14}\text{C}$ -Äpfelsäureversuche (Tabelle 4) zu ersehen ist, vermag die Hefe *Schizosaccharomyces pombe* var. *acidodevoratus* 38,3% der eingesetzten  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in flüchtige Verbindungen überzuführen, gegenüber 2,6%

bei S. c. H<sub>2</sub>. Davon sind 93% Äthanol, gegenüber 34% bei S. c. H<sub>2</sub>. Es fällt besonders auf, daß bei der Eingliederung von Äpfelsäure als C-Quelle in diese Hefe ein hoher Anteil Äthanol und im Vergleich zu S. c. H<sub>2</sub> nur relativ wenig Gärungsnebenprodukte, insbesondere Fuselölalkohole entstehen. Diese an sich wünschenswerte Eigenschaft bringt aber auch zum Ausdruck, daß *Schizosaccharomyces* über einen vom *Saccharomyces* stark verschiedenen Stoffwechsel verfügt, womit auch die teilweise erschwerten Wachstumsbedingungen in Traubenmosten bzw. die Bildung eines andersartigen Gärbuketts erklärbar werden.

### Zusammenfassung

Vergleichende Untersuchungen der Aromastoffe von Trauben, Traubenmosten, Weinen und Modellgärversuchen mit Hilfe leistungsfähiger Trenn- und Nachweismethoden (Gaschromatographie) hatten den Nachweis der besonderen Leistung der Hefegärung in der Bildung zahlreicher und mengenmäßig hervortretender Aromakomponenten erbracht. Quantitativ durchgeführte und ausgewertete Modellgärversuche weisen darauf hin, daß Kohlenhydrate als wichtigste Nährstoffquelle der Hefen das Kohlenstoffgerüst für die Hauptprodukte der alkoholischen Gärung, ein gewisses Reservoir an Metaboliten und Energie zur Verfügung stellen. Dabei trat die Bedeutung von N-Verbindungen für die Leistung von Hefen in der Bildung von sog. Gärungsnebenprodukten, den eigentlichen Aromastoffen, deutlich hervor. Ammoniumsalze und Aminosäuren vermögen den Hefestoffwechsel in der Bildung von Aromastoffen stark zu beeinflussen; sie gehen – wie Modellgärversuche mit Nährmedien unter konstanten Bedingungen gezeigt haben – bezüglich der Bildung von Gärungsnebenprodukten mit einer definierbaren „biochemischen Wertigkeit“ in die Stoffwechsel der Hefen ein.

Speziell ausgearbeitete radio-gaschromatographische Methoden erlaubten, die quantitativen Untersuchungen mit <sup>14</sup>C-Verbindungen fortzusetzen. Dabei ergeben sich Maßzahlen, die zur Klärung der Frage beitragen, inwieweit Haupt- und Nebenwege der alkoholischen Gärung ineinandergreifen und in welchem Ausmaß Gärungsnebenprodukte sowohl aus dem Kohlenstoffgerüst von Zuckern und Säuren als auch aus dem der Aminosäuren gebildet werden. Die Ergebnisse werden anhand der Literatur eingehend diskutiert.

Die Beeren verschiedener Reben enthalten in Abhängigkeit von Sorte und Reife – die Reife wird durch zahlreiche Außenfaktoren beeinflusst – oft bei vergleichbaren Zucker- und Säuregehalten eine stark unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung. In Anbetracht der Bedeutung der N-Verbindungen eines Traubenmostes für die Bildung von Aromastoffen während der Hefegärung unterscheiden wir zwischen der „Zuckerreife“ und der „physiologischen Reife“ der Traubenbeeren. Letztere ist besonders bei Keltertrauben durch eine optimale Ausbildung der Inhaltsstoffe gekennzeichnet, die den Hefestoffwechsel im Sinne eines physiologisch günstigen Aromas zu beeinflussen vermögen. Damit sind die dargestellten Ergebnisse von Belang für die Auswahl von Reben-Neuzuchten, die für die Weinbereitung besonders geeignet sind.

Wir danken Herrn Prof Dr. Dr. h. c. B. HUSFELD für die stete Förderung unserer Arbeiten, die mit Unterstützung des Bundesministeriums für wissenschaftliche Forschung durchgeführt worden sind.

## Literaturverzeichnis

1. DRAWERT, F. und A. RAPP: *Vitis* 5, 351 (1966).
2. — — und — — : *Vitis* 4, 262 (1964).
3. — — , — — und W. ULRICH: *Vitis* 5, 20 (1965).
4. — — , — — und — — : *Vitis* 5, 199 (1965).
5. — — , — — und — — : *Vitis* 4, 49 (1963).
6. REIFF, F., R. KAUTZMANN, H. LÜERS und M. LINDEMANN: *Die Hefen* Bd. I und II. Verl. H. Carl, Nürnberg 1960 und 1962.
7. COOK, A. H.: *The Chemistry and Biologie of Yeasts*. Acad. Press, New York, 1958.
8. KUDRJAWZEW, W. I.: *Die Systematik der Hefen*. Akademie-Verlag, Berlin, 1963.
9. RUHLAND, W.: *Hdb. d. Pflanzenphysiol.* Bd. 12/1, *Pflanzenatmung einschließlich Gärungen und Säurestoffwechsel*. Springer-Verlag, Heidelberg, 1960.
10. DRAWERT, F., A. RAPP, A. ZIEGLER, O. BACHMANN und H. STEFFAN: *Chemie-Ing.-Techn.* 35, 853 (1963).
11. — — : *Gas Chromatography* 1962, S. 347. BUTTERWORTH, London 1962.
12. — — und O. BACHMANN: *Angew. Chem.* 75, 717 (1963).
13. — — , A. RAPP und H. ULLEMEYER: *Chemiker-Ztg./Chem. Apparatur* 88, 379 (1964).
14. — — und Mitarb.: unveröffentlicht.
15. WICKERHAM, L. J.: *J. Bacteriol.* 52, 293 (1964).
16. PIRSCHLE, K.: *Biochem. Z.* 218, 412 (1930).
17. SCHWARZ, W. und R. KAUTZMANN: *Arch. Microbiol.* 2, 537 (1931).
18. LAMPIN, S. und R. CESAR: *C. R. Acad. Sci. France* 226, 951 (1948).
19. SCHULTZ, A. S. und S. POMPER: *Arch. Biochem.* 19, 184 (1948).
20. MITCHEL, H. K. und R. J. WILLIAMS: *Biochem. J.* 34, 1532 (1940).
21. BARTON-WRIGHT, E. C.: *Europ. Brewery Convent.* 1, 19 (1949).
22. — — : *Wallerstein Lab. Commun.* 15, 115 (1952).
23. MOTHES, K.: *Planta* 42, 64 (1953).
24. NIELSEN, N.: *Erg. Biol.* 19, 375 (1943).
25. THORNE, R. S. W.: *J. Inst. Brewing* 45, 13 (1939).
26. — — : *J. Inst. Brewing* 47, 255 (1941).
27. — — : *J. Inst. Brewing* 39, 597, 608 (1933).
28. — — : *J. Inst. Brewing* 51, 114 (1945).
29. SPERBER, E.: *Arkiv Kemi, Min. Geol.* 21 A, 1 (1945).
30. KATING, H.: *Arch. Microbiol.* 22, 235 (1955).
31. — — : *Arch. Microbiol.* 22, 368 (1955).
32. HARTELIUS, V.: *Biochem. Z.* 299, 317 (1938).
33. — — : *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.* 22, 303 (1939).
34. BARTON-WRIGHT, E. C. und R. S. W. THORNE: *J. Inst. Brewing* 55, 383 (1949).
35. THORNE, R. S. W.: *J. Inst. Brewing* 55, 201 (1949).
36. — — : *Nature* 164, 369 (1949).
37. — — : *Wallerstein Lab. Commun.* 13, 319 (1950).
38. — — : *J. Inst. Brewing* 50, 186 (1944).
39. — — : *J. Inst. Brewing* 52, 15 (1946).
40. — — : *J. Inst. Brewing* 51, 6 (1945).
41. — — : *J. Inst. Brewing* 52, 5 (1946).
42. — — : *Wallerstein Lab. Commun.* 9, 97 (1946).
43. — — : *J. Inst. Brewing* 55, 18 (1949).
44. TAYLOR, E.: *J. gen. Microbiol.* 1, 86 (1947).
45. ROINE, P.: *Diss. Univ. Helsinki* 1947.
46. CHANTRENNE, H.: *Nature* 177, 579 (1956).
47. KRAUT, H.: *Biochem. Z.* 297, 297 (1938).
48. LÜERS, H.: *Die wissenschaftlichen Grundlagen von Mälzerei und Brauerei*, S. 537. Verl. H. Carl, Nürnberg, 1950.
49. ROINE, P.: *Suom. Kem.* 19 B, 37 (1946).
50. DECKER, P.: *Angew. Chem.* 60, 2 (1948).
51. SCHORMÜLLER, J.: *Pharmazie* 6, 237 (1951).
52. — — und H. BALLSCHMIETER: *Brauwiss.* 4, 117, 166 (1951).
53. LJANGDAHL, L. und E. SANDEGREN: *Acta chem. scand.* 4, 1150 (1950).
54. BARTON-WRIGHT, E. C.: *J. Inst. Brewing* 57, 415 (1951).
55. WINDISCH, W., P. KOLBACH und E. SCHILD: *Wschr. Brauerei* 1931, 193.
56. THORNE, R. S. W.: *J. Inst. Brewing* 47, 225 (1941).
57. WHITE, J. und D. MUNNS: *Nature* 165, 111 (1950).



58. TAYLOR, E.: J. gen. Microbiol. 3, 211 (1949).
59. HALVORSON, H., S. SPIEGELMAN und R. HINMAN: Arch. Biochem. Biophysics 55, 512 (1955).
60. — — und — — : J. Bacteriol. 64, 207 (1952).
61. LÜERS, H., F. STRICKER und E. SCHILD: Wschr. Brauerei 1938, 43.
62. EHRENSVÄRD, A.: Cold. Spring-Harbor Symposia Quant. Biol. 13, 81 (1948).
63. SANDEGREN, E., H. GUTHENBERG und L. ENEBO: Brauwissenschaft 8, 96 (1955).
64. EHRLICH, F.: Ber. dtsh. chem. Ges. 39, 4072 (1906).
65. — — : Ber. dtsh. chem. Ges. 40, 1027 (1907).
66. — — : Ber. dtsh. chem. Ges. 44, 139 (1911).
67. — — : Ber. dtsh. chem. Ges. 45, 883 (1912).
68. — — : Z. angew. Chem. 26, 518 (1913).
69. — — : Z. angew. Chem. 26, 603 (1913).
70. MÜLLER, A. und F. EHRLICH: Z. Ver. dtsh. Zuckerindustr. 55, 539 (1905).
71. EHRLICH, F. und P. PISTSCHIMUKA: Ber. dtsh. chem. Ges. 45, 1006 (1912).
72. NEUBAUER, O. und K. FROMHERZ: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 70, 326 (1911).
73. NEUBERG, C. und A. HILDESHEIMER: Biochem. Z. 31, 170 (1911).
74. SENTHESHANMUGANATHAN, S.: Biochem. J. 74, 568 (1960).
75. STICKLAND, L.: Biochem. J. 28, 1746 (1934).
76. — — : Biochem. J. 29, 889 (1935).
77. SUOMALAINEN, H. und H. KAHANPÄÄ: J. Inst. Brewing 69, 473 (1963).
78. ROINE, P.: Suom. Kem. 19 b, 40 (1946).
79. — — : Suom. Kem. 19 b, 73 (1946).
80. — — : Suom. Kem. 19 b, 113 (1946).
81. ANTONIANI, C. und P. CIOFFI: Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 25, 7 (1949).
82. METZLER, D., M. IKAWA und E. SNELL: J. Amer. Chem. Soc. 76, 648 (1954).
83. LABBE, R., R. THOMAS, V. CHELDELIN, B. CHRISTENSEN und C. WANG: J. biol. Chem. 197, 655 (1952).
84. STRASSMAN, M., A. THOMAS und S. WEINHOUSE: J. Amer. Chem. Soc. 77, 1261 (1955).
85. — — , — — , A. LOCKE und S. WEINHOUSE: J. Amer. Chem. Soc. 76, 4241 (1954).
86. ADELBERG, E.: J. Amer. Chem. Soc. 76, 4241 (1954).
87. EHRENSVÄRD, G., L. REIO, E. SALUSTE und R. STJERNHOLM: J. biol. Chem. 189, 93 (1951).
88. BLACK, S. und N. WRIGHT: J. biol. Chem. 213, 27 (1955).
89. — — und — — : J. biol. Chem. 213, 51 (1955).
90. — — und N. GRAY: J. Amer. Chem. Soc. 75, 2271 (1953).
91. GENEVOIS, L.: Brauwiss. 14, 52 (1961).
92. CROWELL, A. E., J. F. GUYMON und J. L. INGRAHAM: Amer. J. Enol. Viticult. 12, 111 (1961).
93. INGRAHAM, J. L. und J. F. GUYMON: Arch. Biochem. Biophysics 88, 157 (1960).
94. THOUKIS, G.: Amer. J. Enol. Viticult. 9, 161 (1958).
95. REED, D., B. CHRISTENSEN, V. CHELDELIN und C. WANG: J. Amer. Chem. Soc. 76, 5574 (1954).
96. STRASSMAN, M., L. LOCKE, A. THOMAS und S. WEINHOUSE: Science 121, 303 (1955).
97. YOSHIZAWA, K.: Agric. Biol. Chem. (Tokyo) 28, 279 (1964).
98. KEPNER, R., J. CASTOR und A. D. WEBB: Arch. Biochem. Biophysics 51, 88 (1954).
99. SCHULTZ, A., D. K. McMANUS und S. POMPER: Arch. Biochem. 22, 412 (1949).
100. WHITE, J. und D. J. MUNNS: J. Inst. Brewing 54, 261 (1950).
101. SCHULTZ, A. S. und S. POMPER: Arch. Biochem. Biophysics 19, 184 (1948).
102. CARLO, F. D., A. SCHULTZ und R. FISCHER: Arch. Biochem. Biophysics 27, 29 (1950).
103. HOUGH, J. S. und R. STEVENS: J. Inst. Brewing 67, 329 (1961).
104. — — und — — : J. Inst. Brewing 67, 488 (1961).
105. PEYNAUD, E.: Ann. Falsificat. Fraudes 31, 332 (1938).
106. DITTRICH, H. H.: Wein-Wiss. 18, 392 (1963).
107. — — : Wein-Wiss. 18, 406 (1963).
108. PEYNAUD, E., S. DOMERQ, A. M. BOIRON, S. LAFON-LAFOURCADE und G. GUMBERTEAU: Arch. Microbiol. 48, 150 (1964).
109. PEYNAUD, E. und P. SUDRAUD: Ann. Technol. Agric. 13, 309 (1964).
110. MAYER, K. und A. TEMPERLI: Arch. Microbiol. 46, 321 (1963).
111. DRAWERT, F. und K.-H. REUTHER: Angew. Chem. 75, 169 (1963).

Eingegangen am 24. 2. 1967

Priv.-Doz. Dr. F. DRAWERT und Dr. A. RAPP  
BFA f. Rebenzüchtung  
Geilweilerhof, Abt. Biochemie und Physiologie,  
6741 Siebeldingen, Landau/Pfalz