

Über die Bildung von organischen Säuren durch Weinhefen

I. Quantitative Beziehungen zwischen Stickstoffquelle, Hefestamm und L-Äpfelsäurebildung in Modellgärversuchen

von

F. DRAWERT, A. RAPP*) und W. ULRICH

Wie wir vor kurzem berichtet haben, bilden Weinhefen in dicarbonsäurefreien Nährmedien Äpfelsäure, Weinsäure und Bernsteinsäure (1). Das Ausmaß der Säurebildung hängt u. a. von der Art der Stickstoffquelle und dem Hefestamm ab.

Nachdem sich im Verlauf biochemisch-physiologischer Untersuchungen an Traubenbeeren durch quantitative Chromatographie an Ionenaustauschern gezeigt hatte, daß im Most aus reifen Traubenbeeren beträchtliche Konzentrationen freier Aminosäuren vorliegen (zum Teil > 5000 mg/l) (2), führten wir Modellgärversuche zur Untersuchung der Fuselölbildung durch (3). Dabei stellte sich heraus, daß bei sonst gleichen Bedingungen eine Variation der zugesetzten N-Quelle von unterschiedlicher „Wertigkeit“ gegenüber Hefewachstum und Fuselölbildung ist. Bei der Aufarbeitung dieser Versuche, die säurefrei angesetzt worden waren, konnten wir aber auch durch Papierchromatographie in allen Ansätzen Weinsäure und teilweise Äpfelsäure nachweisen. Diese Befunde gaben Veranlassung zur Fortführung der Modellversuche. In einer ersten Mitteilung wird nun über die Bildung von Äpfelsäure bei Variation der N-Quelle und der Hefen berichtet.

Beschreibung der Versuche

Nährlösung: Zu 850 ml bidestilliertem Wasser werden 100 g Glucose, 1,5 g der jeweils zu prüfenden N-Verbindung (Tabelle 1) und 85 ml 10fach konzentriertes, steriles Basalmedium nach L. J. WICKERHAM (4) (dieses ohne Glucose und N-Zusatz) zugegeben.

Hefen: *Saccharomyces cerevisiae*, Stämme H 2 (H 2) und 4 d (4 d) (Weinhefen), Sylvaner-Hefe**), Ju 7-2 (jugoslawische Weinhefe), Geisenheim 18 (G 18, Kaltgärhefe 1949). Zur Gewinnung der Hefe-Impfsuspension wurden 8 Tage alte Schrägagarkulturen (Hefeextrakt-Peptonagar) mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und nephelometrisch auf etwa gleiche Zelldichte eingestellt. Von diesen Suspensionen sind jeweils 0,5 ml zur Beimpfung verwandt worden.

Gärbedingungen: Kulturgefäße (1 l-Enghals-Stehkolben mit Wattestopfen). Inkubation bei 25° C im Brutschrank. Gärdauer 20—25 Tage. Tägliches Umschütteln. Mit Kaltgärhefe G 18 wurde in zwei getrennten Ansätzen bei 25 und 5° C vergoren.

Aufarbeitung: Abtrennung der Hefen durch Zentrifugieren (3000 U/min). Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser werden die Hefen im Vakuumexsikkator bei Zimmertemperatur über P₂O₅ getrocknet und anschließend die Trok-

*) Auszug aus der vorgesehenen Dissertation.

**) Hefegemisch aus gärendem Sylvaner-Most, Ernte 1962, 4000-Liter-Faß, Geilweilerhof.

Tabelle 1

Einfluß von Stickstoffverbindungen auf die Bildung von L-Äpfelsäure

Nr.	Zugesetzte N-Verbindungen	L-Äpfelsäure mg/l*)
1	DL-Leucin	10
2	Ammonsulfat	16
3	Ammontartrat	18
4	Ammonnitrat	19
5	L-Glutamin	21
6	DL-Methionin	0,75 g
	+ Ammonsulfat	0,75 g
7	L-Cystein	48
8	Ammonacetat	62
9	L-Asparaginsäure	161
10	L-Glutaminsäure	168
11	DL-Valin	263
12	DL-Prolin	0,75 g
	+ L-Glutaminsäure	0,75 g
13	L-Tryptophan	321
14	DL-Isoleucin	327
15	DL-Prolin	565
16	DL-Methionin	835
17	DL-Methionin	0,75 g
	+ DL-Prolin	0,75 g
18	DL-Methionin	1680
19	DL-Methionin	925
	+ DL-Prolin	1110

*) Bezogen auf 1 g Hefezuwachs (Trockengewicht); Nr. 1—17 *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm H₂, Nr. 18 und 19 Sylvaner-Hefe; wenn nicht anders angegeben Zusatz von 1,5 g N-Verbindung.

kengewichte ermittelt. Die blanken Überstände nach dem ersten Zentrifugieren (Waschwässer verworfen) wurden zur Chromatographie direkt auf Chromatographiepapier S & S 2043 b aufgetropft (zum Teil mehrfach) und mit dem Fließmittel Butanol/Ameisensäure/Wasser (1024/200/90) absteigend chromatographiert (Besprühen mit Bromphenolblau bzw. Acridin).

Die Bestimmung der L-Äpfelsäure erfolgte enzymatisch aus dem Zentrifugat.

Ergebnisse

Die unterschiedliche Wirkung von N-Quellen auf die Bildung von L-Äpfelsäure bei sonst gleichen Bedingungen wird aus Tabelle 1 ersichtlich, in der die zugesetzten N-Verbindungen in der Reihenfolge ihres Einflusses auf die L-Äpfelsäurebildung angeordnet worden sind. Von vergleichsweise geringer Auswirkung sind die Ammonsalze und Leucin. Glutamin wirkt achtmal geringer als Glutaminsäure. Während Methionin allein oder im Gemisch mit Prolin hohe Äpfelsäurewerte bedingt, entfaltet es im Gemisch mit Ammonsulfat eine 36fach geringere Wirkung. Auch Pro-

Tabelle 2
Einfluß von Stickstoffverbindungen und Hefen auf die
L-Äpfelsäurebildung

Zugesetzte N-Verbindung	L-Äpfelsäure (mg/l) bei verschiedenen Hefen				
	H 2	4 d	Ju 7-2	G 18	G 18*)
Ammonacetat	42	210	10	30	17
DL-Valin	177	142	230	104	33

*) Gärtemperatur +5° C, sonst +25° C.

lin erfährt durch Zusatz der schwächer wirkenden Glutaminsäure eine Depression der Äpfelsäurebildung. Beachtlich ist der Einfluß von Methionin und erstaunlich die Wirkung des Gemisches von Methionin und Prolin. Aus Tabelle 1 wird ferner ersichtlich, daß der starke Einfluß der Aminosäuren Prolin und Methionin sowohl bei einem definierbaren Hefestamm (H 2) als auch bei Sylvaner-Hefe, die zweifellos ein Hefegemisch darstellt, in vergleichbarer Größenordnung vorhanden ist.

Der Einfluß des Hefestammes auf die L-Äpfelsäurebildung wird in Tabelle 2 dargestellt. Bei Ammonacetat als N-Quelle bildet nur 4 d eine vergleichsweise größere Menge an L-Äpfelsäure. Die Kaltgärhefe G 18 bildet mit Ammonacetat bei 25 bzw. 5° etwa gleiche Äpfelsäuremengen, mit Valin bei 25° dreimal mehr als bei 5°. Aus Tabelle 2 wird im Vergleich zu Tabelle 1 ein Unterschied hinsichtlich der absolut entstandenen Äpfelsäuremenge bei Ammonacetat und Valin ersichtlich. Die in Tabelle 2 enthaltenen Versuche wurden zu einem späteren Zeitpunkt lediglich mit dem einen Unterschied zu den früheren Versuchen (Tabelle 1) durchgeführt, daß hier das Basalmedium vor Zugabe in anderer Konzentration aufbewahrt worden war. Trotz unterschiedlicher absoluter Mengen ist in beiden Fällen das Verhältnis der gebildeten Äpfelsäure 1 : 4,2 (Valin : Ammonacetat).

Diskussion

Die Bildung von Äpfelsäure durch den *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm H 2) stellten wir auch in Gärversuchen mit ¹⁴C-Asparaginsäure, ¹⁴C-Glutaminsäure und ¹⁴C-Glucose fest. Nach Aufarbeitung dieser Ansätze und Trennung in die Stoffgruppen Naturstoffe, Aminosäuren und organische Säuren wurden folgende prozentuale Anteile der Radioaktivität der Gesamt-Äpfelsäure an den Fraktionen der organischen Säuren gefunden:

¹⁴ C-Asparaginsäure	31,0%
¹⁴ C-Glutaminsäure	9,5%
¹⁴ C-Glucose	17,0%
¹⁴ C-Prolin	

Damit wurde der Beweis erbracht, daß Äpfelsäure u. a. aus Glucose entsteht. Offensichtlich kann aber auch das Kohlenstoff-Gerüst bestimmter Aminosäuren zur Äpfelsäurebildung übernommen werden.

Die Tatsache der Entstehung von Äpfelsäure in einigen der vorstehend beschriebenen Gäransätzen, denen nur anorganische N-Quellen zugesetzt worden waren (Ammonsulfat, Ammonnitrat), wird somit erklärbar. Äpfelsäure kann hier nur aus Glucose entstehen.

Im allgemeinen wird angenommen, daß nur die natürlichen L-Formen der Aminosäuren in den Hefestoffwechsel einbezogen werden. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, daß unter bestimmten Voraussetzungen auch der Stickstoff der D-Form verwertbar ist. Diese Annahme ist in weiteren Versuchen noch zu klären.

Erstaunlich ist der starke Einfluß von Prolin und Methionin auf die Äpfelsäurebildung. Wird Prolin als einzige N-Quelle gegeben, so kann, wie auch in früheren Versuchen gezeigt wurde (3), die Aminosäure von den Hefen verwertet werden. Im natürlichen Gemisch mit anderen Aminosäuren (Traubenmost) werden jene offensichtlich von den Hefen bevorzugt, denn nach Faßgärung fanden wir in verschiedenen Jahrgängen in den Weinen dieselben oder höhere Prolinkonzentrationen als im Ausgangsmost. Der Versuch mit ^{14}C -Prolin — durchgeführt mit dem Substrat Traubenmost — bestätigt diese Befunde. Die Diskussion der erstaunlich hohen Wirkung von Methionin bzw. des Gemisches Methionin-Prolin auf die Entstehung von Äpfelsäure soll einer späteren Arbeit vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung

Weinhefen bilden in dicarbonsäurefreien Nährmedien Äpfelsäure, Weinsäure und Bernsteinsäure. Eine genauere Analyse (enzymatisch) der L-Äpfelsäure in Modellgäransätzen zeigt, daß quantitative Beziehungen zwischen Stickstoffquelle, Hefestamm und L-Äpfelsäurebildung bestehen. Von besonders starkem Einfluß sind dabei die Aminosäuren Prolin und Methionin, insbesondere das Gemisch von beiden. Versuche mit ^{14}C -Glucose und ^{14}C -Aminosäuren weisen im Zusammenhang mit den beschriebenen Experimenten darauf hin, daß L-Äpfelsäure aus Glucose bzw. Aminosäuren gebildet werden kann.

Literaturverzeichnis

1. DRAWERT, F., A. RAPP und W. ULRICH: Bildung von Äpfelsäure, Weinsäure und Bernsteinsäure durch verschiedene Hefen. Naturwiss., im Druck.
2. — — : Biochemisch-physiologische Untersuchungen an Traubenbeeren. Vitis 4, 49—56 (1963).
3. — — und A. RAPP: Über Inhaltsstoffe von Mosten und Weinen IV. Modellgärversuche zur Untersuchung der Fuselölbildung und gaschromatographische Analyse von Fuselölkohlen. Vitis 4, 262—268 (1964).
4. WICKERHAM, L. J.: Taxonomy of yeasts. Techn. Bull. 1029, Dept. Agricult., Washington, D. C. (1951); vgl. F. REIFF, R. KAUTZMANN, H. LÜERS und M. LINDEMANN: Die Hefen 1, S. 131. Verl. Hans Carl, Nürnberg (1960).

Eingegangen am 10. 3. 1965

Dr. F. DRAWERT
Forschungs-Institut für Rebenzüchtung
Geilweilerhof
Siebeldingen, Landau/Pfalz