

## Über Inhaltsstoffe von Mosten und Weinen

### IV. Modellgärversuche zur Untersuchung der Fuselölbildung und gaschromatographische Analyse von Fuselölalkoholen<sup>1)</sup>

von

F. DRAWERT und A. RAPP

Höhere Alkohole, zusammenfassend als Fuselöle bezeichnet, kommen zwar schon in sehr geringen Mengen in reifenden Früchten vor — nachgewiesen u. a. durch gaschromatographische Analyse von Aromakonzentraten aus Äpfeln, Birnen (1) und Trauben (2) —, die Hauptmenge der in alkoholischen Getränken vorhandenen Fuselöle entsteht jedoch durch Hefegärung, wie der umfangreichen Literatur zu entnehmen ist, auf deren Wiedergabe hier verzichtet wird, zumal erschöpfende Übersichten abgefaßt worden sind (3, 4, 5).

In durchschnittlichen Mengen von 100 bis 600 mg/l Wein tragen die Fuselöle nicht nur wesentlich zum Geschmack und Bukett eines Weines bei, sondern auch zur unterschiedlichen Bekömmlichkeit. Dabei ist in Betracht zu ziehen, daß die in den Fuselölen des Weines mengenmäßig überwiegenden Fuselöl-Alkohole 2-Methylpropanol (1) (iso-Butanol) und „Gärungsamylalkohol“ mit den Hauptkomponenten 3-Methylbutanol (1) (iso-Amylalkohol) und 2-Methylbutanol (1) [D(-)-Amylalkohol] pharmakologisch wirksam sind (3). Diese Wirkungen sollten allerdings im Zusammenhang mit den anderen Weininhaltsstoffen beurteilt werden und in Anbetracht der relativ geringen Konzentrationen der Fuselöle ist unseres Erachtens weniger mit einer akuten als vielmehr mit einer chronischen Wirkung zu rechnen.

Fuselöle sind qualitätsbestimmende Inhaltsstoffe des Weines. Ihre Entstehung hängt sowohl hinsichtlich der Menge als auch der Art von der stofflichen Zusammensetzung des Traubenmostes ab, der den Hefen als Substrat dient; ferner von den Hefen und dem Gärverlauf. Hinsichtlich der substratabhängigen Bildung der Fuselöl-Alkohole wurde vor allem durch die Untersuchungen von F. EHRICH (3, 4, 5) bekannt, daß u. a. iso-Butanol, iso-Amylalkohol und D-Amylalkohol aus den Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin durch Desaminierung, Decarboxylierung und Reduktion entstehen. Wie YAMADA u. Mitarb. (6) nachgewiesen haben, entstehen höhere Alkohole aber auch aus anderen Aminosäuren, und nach Untersuchungen von THOUKIS (7) auch aus Glucose, womit die Annahme der Bildung von Fuselölen aus Zuckern durch GENEVOIS und LAFON (8) bestätigt wurde.

Im Verlauf biochemisch-physiologischer Untersuchungen an Traubenbeeren zeigte sich nun durch quantitative, automatisierte und damit gut reproduzierbare Bestimmung von Aminosäuren an Ionenaustauschern, daß in reifenden Beeren die Konzentrationen der freien Aminosäuren zunächst fortlaufend ansteigen, um später Plateauwerte zu erreichen, die sowohl hinsichtlich der Menge aller Aminosäuren als auch bezüglich der Termine, zu denen die Aminosäure-Plateaus erreicht werden, sortentypisch sind (9). Die frühreife Neuzucht des Geilweilerhofes Aris (Sbl. 2-19-58) zum Beispiel erreichte während der Reifungsperiode des Jahres 1962 Mitte Oktober

<sup>1)</sup> III. Mitt. Anwendung der Dünnschicht- und Säulen-Chromatographie zur Trennung der Anthocyane, Vitis 4, 42—48 (1963).

den Plateauwert von rd. 4200 mg/l, 1963 ebenfalls Mitte Oktober 4700 mg/l (mg Gesamtaminosäuren/l Saft einer Durchschnittsprobe). Die von uns aufgefundenen Mengen an freien Aminosäuren bei den Neuzuchten Sbl. 2-19-58, FS. 4-201-39 und B-4-6 sowie bei Riesling Klon 90 liegen damit wesentlich höher als die von LAFON-LAFOURCADE und GUMBERTEAU (10) in den Rebsorten Cépage Merlot und Cépage Cabernet-Sauvignon papierchromatographisch und mikrobiologisch bestimmten Mengen. Dasselbe trifft für den Gesamtstickstoff zu. Dazu ist allerdings zu bemerken, daß wir früher papierchromatographisch ebenfalls wesentlich niedrigere Aminosäurewerte erhalten hatten.

In Anbetracht der beträchtlichen Mengen von freien Aminosäuren im Most aus reifen Traubenbeeren schien es uns notwendig zu sein, zunächst definierte Gärversuche unter Zusatz bestimmter Stickstoffverbindungen durchzuführen, um einerseits eine Information über die „Wertigkeit“ von N-Verbindungen gegenüber einem Hefestamm zu erhalten, der als repräsentativ für Weinhefen gelten kann und andererseits unter Verwendung leistungsfähiger analytischer Methoden, wie Gaschromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und enzymatische Analyse, eine Auskunft über die unter definierten Bedingungen anfallenden Stoffwechselprodukte zu bekommen.

### Beschreibung der Versuche

#### Gäransätze

In 850 ml bidestilliertem Wasser wurden 100 g Glucose und 1,5 g der jeweils zu prüfenden N-Verbindung (Tabelle 1) gelöst. Die steril filtrierte Lösungen (Seitz-Schichtenfilter) sind sodann mit jeweils 85 ml einer sterilen 10fach konz. Nährlösung nach WICKERHAM (11) versetzt und anschließend mit 0,5 ml einer Hefesuspension inkubiert worden (Aufschwemmen einer ca. 1 Woche alten Schrägagarkultur von *Saccharomyces cerevisiae* Stamm H<sub>2</sub> in einigen ml physiologischer NaCl-Lösung). Die Gäransätze verbleiben 21 bis 24 Tage bei 25° (Brutschrank; gelegentliches Aufschütteln). Alle Ansätze werden gleichzeitig begonnen und abgebrochen.

#### Aufarbeitung der Gäransätze

Zunächst erfolgt das Abtrennen der Hefen durch Zentrifugieren (3000 U/min). Nach dreimaligem Waschen mit Wasser durch Aufschlämmen und Zentrifugieren trocknen im Vakuumexsikkator über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei Raumtemperatur und Bestimmung der Trockengewichte.

Die blanken Überstände nach Zentrifugieren werden mit den Waschwässern vereinigt und definierte Volumina (etwa die Hälfte) im Rotationsverdampfer bei guter Kühlung der Vorlage bis zur Sirupkonsistenz eingengt.

#### Gaschromatographische Analysen der Destillate

Zur gaschromatographischen Analyse der Destillate wurde ein Siemens-Universal-Gaschromatograph<sup>2)</sup> in der vor kurzem ausführlich beschriebenen Spezialausführung I verwendet. Dieses Gerät besteht aus zwei geräumigen senkrecht stehenden Luft-Thermostaten, deren Temperatur unabhängig voneinander sehr genau geregelt werden kann. Damit besteht die Möglichkeit, zwei oder mehrere Trennsäulen im jeweiligen Temperaturoptimum in Reihe oder parallel zu betreiben, womit auch komplexe Stoffgemische gut aufgetrennt und analysiert werden können (Mehrstufentechnik) (12).

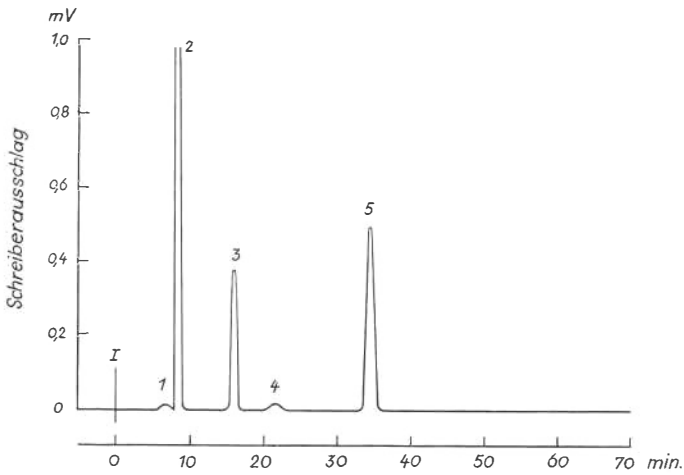


Abb. 1: Gaschromatogramm nach Direktinjektionen eines Destillates

1 = Methanol; 2 = Äthanol; 3 = 2-Methyl-propanol (1) (iso-Butanol);  
4 = Butanol (1); 5 = „Gärungsamylalkohol“ [iso-Amylalkohol + D(-)-Amylalkohol].

Verstärker bei 1, 3, 4, 5:  $3 \cdot 10^{-11}$ ; bei 2:  $3 \cdot 10^{-8}$ .

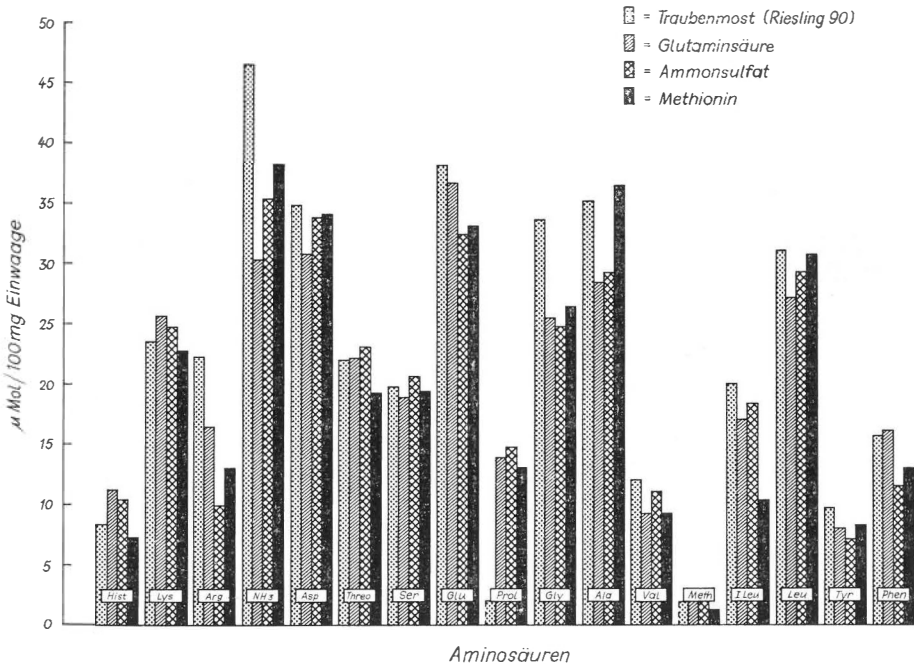


Abb. 2: Gesamt-Aminosäuren von Hefen aus Gäransätzen unter Zusatz verschiedener Stickstoffverbindungen im Vergleich zu einem Gäransatz mit Traubenmost.

Proben von 10 bis 20  $\mu$ l Destillat werden in die in Thermostat I befindliche Injektionsstelle eingespritzt. Trennsäule I (in Thermostat I; 115°) besteht aus einem Edelstahlrohr<sup>3)</sup> von 340 cm Länge gefüllt mit Carbowax 1550 auf Kieselgur<sup>4)</sup> (20 + 100), Trennsäule II (in Thermostat II; 75°) aus 240 cm Diäthyl-hexyl-sebacat auf Kieselgur (20 + 100) und dahintergeschaltet 80 cm Diäthyl-D-tartrat auf Kieselgur (20 + 100). Als Trägergas wurde Reinstwasserstoff verwendet (115 ml/min). Als Detektor diente in diesem Fall ein FID der Fa. Siemens (12, 13), der neben seiner Empfindlichkeit und Arbeitskonstanz den Vorteil hat, daß er mit Wasserstoff als Trägergas betrieben werden kann. Ein Fünftel der aufgetrennten Komponenten wird nach Strömungsteilung (1 : 5) dem FID zugeführt. Die Signale des FID gelangen über einen Elektrometer-Verstärker zu einem Kompensations-Schreiber (Kompensograph Siemens). Die quantitative Auswertung der Piks erfolgt durch Planimetrieren.

#### Analyse der Hefen auf Aminosäuren

Zur Ermittlung der Gesamtaminosäuren (frei und gebunden) wurden ca. 50 mg der getrockneten Hefen mit 4 ml Phenol und 6 ml 10n-HCl 24 h im Bombenrohr auf 105° erhitzt. Die Aufarbeitung der Hydrolysate und die Analyse der Aminosäuren wurde wie vor kurzem beschrieben (14) vorgenommen.

#### Glycerin-Analyse der Zentrifugate

Sie erfolgte wie für Moste und Weine beschrieben (15) enzymatisch.

### Ergebnisse

Die „Wertigkeit“ verschiedener N-Verbindungen für Wachstum und Stoffwechsel des unter den beschriebenen Bedingungen gehaltenen Hefestammes wird aus Tabelle 1 ersichtlich, in der die zugesetzten N-Verbindungen nach Hefezuwachs angeordnet worden sind. Asparaginsäure und Glutaminsäure werden gut, Prolin nur mäßig verwertet, was in guter Übereinstimmung zu Versuchen in großen Gebinden steht, in denen die Aminosäurenverwertung nach Einsetzen der Spontangärung fortlaufend untersucht und festgestellt wurde, daß Prolin nicht oder nur geringfügig von den Hefen aufgenommen wird. Wie auch bei der Beurteilung der Qualität von Branntweinen (16) konnte durch Direktinjektion von Proben der Destillate aus den Gäransätzen die wesentlichsten Fuselölalkohole Butanol(1), 2-Methyl-propanol(1) (iso-Butanol) und Gärungsamylalkohol [2-Methyl-butanol(1) + 3-Methyl-butanol(1)] relativ einfach und quantitativ bestimmt werden. Die Art der erhaltenen Chromatogramme ist aus Abbildung 1 zu ersehen. Die Befunde von F. EHRlich für Valin, Leucin und Isoleucin kommen auch hier in den gaschromatographisch gefundenen Werten für iso-Butanol und Gärungsamylalkohol zum Ausdruck. Bei Isoleucin zeigt sich zusätzlich noch ein leicht erhöhter Gehalt an Butanol (1), was auch für Glutaminsäure zutrifft. Beim Glutamin-Ansatz sind vergleichsweise wenig Fuselöl-Alkohole vorhanden. Methionin allein bringt weniger iso-Butanol als Methionin + Prolin. Bemerkenswert ist auch der geringe Fuselölgehalt des Asparaginsäure-Ansatzes. Dasselbe trifft für das offenbar relativ gut verwertbare Ammonsulfat zu.

Erstaunlich ist die Bildung von Weinsäure in allen Versuchsansätzen, die weinsäurefrei angesetzt worden waren und die teilweise festgestellte Entstehung von

<sup>3)</sup> Edelstahlrohre der Fa. Schoeller-Werke, Hellenthal/Eifel, von 0,6 cm Innen- und 0,8 cm Außendurchmesser.

<sup>4)</sup> Kieselgur säuregewaschen, 60—80 mesh.

Tabelle 1  
Verwertung und Umsatz von N-Verbindungen durch definierte Gäransätze

Nr.	Zugesetzte N-Verbindung	I	II	III	IV	III	V	VI
		Hefezuwachs Trocken- gewicht g	Butanol (1)* g/l	2-Methyl- propanol (1)* (iso-Butanol) g/l	Gärungsamyl- alkohol** g/l	IV	Weinsäure	Äpfelsäure
1	D-Ammon-tartrat	1,50	0,015	0,041	0,061	1 : 1,5	+	-
2	DL-Asparaginsäure	1,50	< 0,010	0,051	0,052	1 : 1	+	-
3	L-Glutamin	1,42	< 0,010	0,020	0,032	1 : 1,6	+	+
4	L-Glutaminsäure	1,15	0,022	0,020	0,068	1 : 3,4	+	-
5	DL-Leucin	1,07	< 0,010	0,017	0,430	1 : 25,3	+	-
6	Ammonsulfat	1,04	< 0,010	0,010	0,023	1 : 2,3	+	-
7	DL-Valin	0,93	< 0,010	0,260	0,077	1 : 0,3	+	-
8	L-Glutaminsäure 1,5 g + Weinsäure 8,0 g + Äpfelsäure 8,0 g	0,89	0,026	0,017	0,062	1 : 3,6	+	+
9	Ammonnitrat	0,39	< 0,010	0,021	0,026	1 : 1,2	+	-
10	DL-Isoleucin	0,78	0,023	0,093	0,435	1 : 4,7	+	(+)
11	Ammonacetat	0,75	< 0,010	0,080	0,093	1 : 1,2	+	-
12	DL-Methionin 0,75 g + DL-Prolin 0,75 g	0,74	< 0,010	0,208	0,283	1 : 1,4	+	+
13	L-Cystein	0,73	< 0,010	0,010	0,049	1 : 4,9	+	+
14	DL-Methionin	0,59	< 0,010	0,070	0,128	1 : 1,8	+	+
15	L-Tryptophan	0,48	< 0,010	0,058	0,089	1 : 1,5	+	-

\*) Alkohole in g/l bezogen auf 1 g Hefezuwachs (Trockengewicht).

\*\*) Gärungsamylalkohol = 2-Methyl-butanol (1) + 3-Methyl-butanol (1).



**Literaturverzeichnis**

1. DRAWERT, F.: Über Aroma- und Duftstoffe; gaschromatographische Untersuchungen von Aromakonzentraten aus Äpfeln und Birnen. *Vitis* 3, 115—116 (1962).
2. — — u. Mitarb.: unveröffentlicht.
3. REIFF, F., R. KAUTZMANN, H. LÜERS und M. LINDEMANN: Die Hefen. I. Die Hefen in der Wissenschaft. Dasselbst insbesondere A. UHL: Ernährungsbedingungen der Hefen, 209—320; H. HOLZER u. Mitarb.: Kohlenhydratstoffwechsel, 673—721 und P. MANDEL und R. BIETH: Der Eiweißstoffwechsel der Hefe, 722—778. II. Technologie der Hefen. Dasselbst insbesondere P. BÖHRINGER: Weinhefe und Weinbereitung, 157—270. Verlag Hans Carl, Nürnberg 1960 u. 1962.
4. PFENNINGER, H.: Gaschromatographische Untersuchungen von Fuselölen aus verschiedenen Gärprodukten. Promotionsarbeit Nr. 3316, ETH Zürich (1963); vgl. *Z. Lebensmitt.-Unters. u. -Forschg.* 119, 401—415; 120, 100—126 (1963).
5. GENEVOIS, L.: Die Sekundärprodukte der alkoholischen Gärung. *Brauwiss.* 14, 52—55 (1961).
6. YAMADA, M. u. Mitarb.: *Agric. Biol. Chem.* 25, 326 (1961).
7. THOUKIS, G.: Ph. D. Thesis, Univ. Calif. (1958), vgl. *Amer. J. Viticult.* 9, 161 (1958).
8. GENEVOIS, L. und M. LAFON: *Chim. Industr.* 78, 323 (1957); *Bull. Soc. Chim.* 38, 89 (1956).
9. DRAWERT, F.: Biochemisch-physiologische Untersuchungen an Traubenbeeren. Das Verhalten der Aminosäuren während der Reifung und der Zucker nach Einfrieren der Beeren. *Vitis* 4, 49—56 (1963).
10. LAFON-LAFOURCADE, S. et G. GUIMBERTEAU: Evolution des aminoacides au cours de la maturation des raisins. *Vitis* 3, 130—135 (1962).
11. WICKERHAM, L. J.: *Taxonomy of yeasts*, Techn. Bull. 1029, Dept. Agricult., Washington D. C. (1951); vgl. *Zit.* 3, Bd. I. S. 131.
12. DRAWERT, F. und A. RAPP: Gaschromatographische Analyse komplexer Stoffgemische (Alkohole, Ester, Ketone, Terpene) unter Anwendung der Mehrstufentechnik. *Chemiker-Ztg. / Chem. Apparatur* 88, 267—270 (1964).
13. OSTER, H.: Der Flammenionisationsdetektor für den empfindlichen Nachweis von Kohlenwasserstoffen. *Siemens-Z.* 37, 481 (1963).
14. DRAWERT, F. und K.-H. REUTHER: Phenol als Inhibitor der Huminbildung bei der Proteinhydrolyse. *Angew. Chem.* 75, 169 (1963).
15. — — und G. KUPFER: Enzymatische Analysen. I. Mitt. Bestimmung von Glycerin in Weinen und Traubenmosten. *Z. Lebensmitt.-Unters. u. -Forschg.* 123, 211—217 (1963).
16. — — und A. RAPP: Gaschromatographische Beurteilung der Qualität von Branntweinen. *Z. Lebensmitt.-Unters. u. -Forschg.*, im Druck.

Eingegangen am 15. 7. 1964

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