

Die Bildung von Acetoin und Diacetyl durch die Bakterien des biologischen Säureabbaus.

von

F. RADLER

Seitdem der — meist nach der Gärung erfolgende — biologische Säureabbau im Wein als bakterieller Vorgang bekannt ist, wird von der Praxis gelegentlich die Frage diskutiert, ob die Bakterien neben dem Abbau der Äpfelsäure zu Milchsäure und CO_2 auch den Geschmack beeinflussen. Äpfelsäure und Milchsäure sind, abgesehen von der unterschiedlichen Acidität, geschmacklich kaum zu unterscheiden. Es ist daher von WINDISCH (1906) verneint worden, daß beim biologischen Säureabbau der Wein geschmacklich verändert wird.

Der Abbau der Äpfelsäure ergibt keinen Energiegewinn für die Bakterien des biologischen Säureabbaus (SCHANDERL 1943, SCHMIDT 1959). Als Stoffwechselendprodukte des Energiestoffwechsels dieser Bakterien konnten Milchsäure, Äthylalkohol und Kohlensäure nachgewiesen werden (RADLER 1958c). Es ist jedoch möglich, daß neben diesen Stoffen, auch von den Äpfelsäure-abbauenden Bakterien im Wein Verbindungen gebildet werden, die geschmacklich wirksam sind. Dies ist vor allem deshalb zu vermuten, da zwischen den Bakterien des biologischen Säureabbaus und Bakterien, die Weinkrankheiten verursachen können, sehr enge Beziehungen bestehen.

Die Äpfelsäure-abbauenden Bakterien gehören den Gattungen *Leuconostoc* (evt. *Pediococcus*) und *Lactobacillus* an. Sie stehen somit in systematischer Hinsicht Mikroorganismen nahe, die bei der Säuerung von Milch und Rahm eine wesentliche Rolle spielen und das sogenannte „Butteraroma“ bewirken (VAN NIEL und Mitarb. 1929, SCHMALFUSS und BARTHMEYER 1929), dessen wesentlicher Bestandteil Diacetyl bereits in Konzentrationen von 1 : 1 000 000 geschmacklich wirksam ist. Es kann leicht durch Oxydation aus dem nahe verwandten, in geschmacklicher Hinsicht kaum wirksamen Acetoin entstehen. Der Mechanismus der Entstehung dieser Verbindung ist u. a. von KLUYVER (1931), GREEN und Mitarb. (1941, 1942), DOLIN und GUNSALUS (1951), ROWATT (1951), JUNI (1952), HAPPOLD und SPENCER (1952) eingehend bearbeitet worden. Die Acetoinbildung erfolgt überwiegend aus Kohlenhydrat und verläuft über Brenztraubensäure, die quantitativ zu 1 Mol Kohlensäure und $\frac{1}{2}$ Mol Acetoin umgesetzt wird. Zwischenprodukt ist α -Acetolactat, das je 1 Mol Kohlensäure und Acetoin ergibt (MOAT und LICHSTEIN 1953). BUSSE und KANDLER (1961) wiesen mit ^{14}C -markiertem Zucker bei *Leuconostoc citrovorum* den Weg der Acetoinbildung über Brenztraubensäure und α -Acetolactat nach.

Der Gehalt von Acetoin und Diacetyl in Weinen und die Wirkung von schwefliger Säure und Ascorbinsäure auf die Bildung dieser Stoffe durch

Hefen ist kürzlich von KIELHÖFER und WÜRDIG (1960, dort auch weitere Literaturangaben) untersucht worden. — Die folgenden Untersuchungen lassen erkennen, daß von den Bakterien des biologischen Säureabbaus, Acetoin und Diacetyl gebildet werden und daß Weine, in denen der bakterielle Äpfelsäureabbau erfolgt ist, einen erhöhten Gehalt an Diacetyl bzw. Acetoin aufweisen. Daraus folgt, daß der Gehalt geschmacklich wirksamer Stoffe im Wein von säureabbauenden Bakterien verändert werden kann. Von VAUGHN und TCHELISTCHEFF (1957) ist die Vermutung ausgesprochen worden, daß Acetoin und Diacetyl im Zusammenhang mit dem Sauerkrautgeschmack von Wein stehen können, und in Orangensaftkonzentraten werden diese Stoffe als Indikator für mikrobiellen Verderb angesehen (HILL und Mitarb. 1954).

Material und Methoden

Mikroorganismen: Vier aus Wein isolierte Stämme Äpfelsäure-abbauender Bakterien, die zu den Gattungen *Lactobacillus* (Stamm 2L) und *Leuconostoc* (Stamm 12a, 16a und 45b) gehören (RADLER 1958a).

Für die Überlassung von Weinhefestämmen bin ich Herrn Professor Dr. H. SCHANDERL, Geisenheim (Stamm Steinberg) und Herrn Dr. STÜHRK, Neustadt/Weinstr. (Stamm St. H.) zu Dank verpflichtet.

Die Herstellung und Zusammensetzung der Nährlösungen, Impfsuspensionen und Beimpfungen und der papierchromatographische Carbonsäurenachweis entsprechen früheren Angaben, sofern keine Änderungen beschrieben werden (RADLER 1958b, 1960).

Die untersuchten Weine und Moste stammten aus dem Versuchskeller des Forschungs-Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof und wurden entsprechend den gesetzlichen Vorschriften vergoren. Herrn Dr. GROHMANN, Chemisches Untersuchungsamt, Speyer, wird für die freundliche Überlassung von zwei Weinen mit extrem hohem Milchsäuregehalt und deren Analysenangaben verbindlichst gedankt.

Acetoin und Diacetyl wurden gemeinsam durch kolorimetrische Messung des Farbstoffgehaltes nach Reaktion mit α -Naphthol, NaOH und Kreatin bestimmt (NEISH 1952), da die getrennte Bestimmung von Acetoin und Diacetyl auch bei Serienbestimmungen einen zu großen Aufwand erfordert. Durch 20 min Sieden von 20 ml Wein mit 1 ml 5n Schwefelsäure, 4 ml 50 % FeCl_3 -Lösung, 5 ml 30 % FeSO_4 -Lösung (ohne zu destillieren) wurde Acetoin zu Diacetyl oxydiert (entsprechend HOREMAN 1947). Zur kolorimetrischen Bestimmung wurden 10 ml abdestilliert und entsprechend dem Diacetylgehalt verdünnt. Eine Abtrennung des Alkohols erwies sich als nicht erforderlich, da die Störung infolge der meist stärkeren Verdünnung nur gering war.

Ergebnisse und Diskussion

Acetylmethylcarbinol oder Acetoin ist ein verbreitetes bakterielles Stoffwechselprodukt. Seine Bildung dient zur systematischen Differenzierung innerhalb der *Coli-Aerogenes*-Gruppe. Mit Hilfe der Voges-Proskauer-Reak-

tion kann auch die Acetoinbildung der Bakterien des biologischen Säureabbaus in Reinkulturen oder Mischkulturen mit Weinhefen nachgewiesen werden. Acetoin wurde gemeinsam mit Diacetyl quantitativ bestimmt, siehe Tab. 1 und 2. Die getrennte Bestimmung von Diacetyl und Acetoin nach der von RIBEREAU und PEYNAUD (1959) für Wein modifizierten Methode nach HOOREMAN (1947, 1948) ergab, daß Diacetyl im Vergleich zu Acetoin nur in sehr geringen Mengen vorkommt, was in guter Übereinstimmung zu den Ergebnissen von KIELHÖFER und WÜRDIG (1960) steht. Weinhefen bilden in Reinkulturen auch Acetoin bzw. Diacetyl, jedoch in diesen Versuchen im Vergleich zu den Bakterien nur in geringen Mengen. Zitronensäure, die die Diacetylbildung bei Säureweckern fördern soll, scheint auf die Acetoin- und Diacetylbildung der Äpfelsäureabbauenden Bakterien keinen eindeutig nachweisbaren Einfluß auszuüben, siehe Tabelle 1.

Tabelle 1

Acetoin (+ Diacetyl)-Bildung von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien nach etwa 10tägigem Wachstum bei 23° in synthetischem Medium

(RADLER 1958b).

	Acetoin + Diacetyl (mg je Liter)	
	nach Zitronensäurezusatz (5 mg/ml)	
Hefe	1,5	2,2
Hefe + Bakt.-Stamm 12a	2,5	12,2
Hefe + Bakt.-Stamm 16a	4,0	14,2
Hefe + Bakt.-Stamm 45b	15,5	17,5
Hefe + Bakt.-Stamm 2L	39,6	25,4

In sterilfiltriertem Traubenmost und in Tomatensaftlösung werden von den verschiedenen Bakterienstämmen sehr unterschiedliche Mengen Acetoin und Diacetyl gebildet (siehe Tabelle 2). Die Wirkung der Zusammensetzung des Mediums und der zeitliche Verlauf der Acetoin-Diacetylbildung sollen später eingehend untersucht werden. In dem dargestellten Versuch waren die Bakterien 10 Tage bei 24° kultiviert worden. Mit Ausnahme der Kulturen von Stamm 45b, mit nur unvollständigem Abbau, war in allen Fällen die Äpfelsäure des Traubenmostes restlos zu Milchsäure dekarboxyliert worden.

Tabelle 2

Bildung von Acetoin (+ Diacetyl) von Bakterien des biologischen
Säureabbaus (Reinkulturen)

	Acetoin + Diacetyl (mg je Liter)			
	Stamm 2L	Stamm 12a	Stamm 16a	Stamm 45b
Sterilfiltrierter Traubenmost:				
Sylvaner	35,0	0,3	0,3	0,3
Morio-Muskat	8,5	23,0	23,0	6,9
Tomatensaftlösung	40,0	6,9	6,3	3,7

Zum Nachweis eines Zusammenhangs zwischen Acetoin- bzw. Diacetylgehalt und bakteriellem Säureabbau wurde der Gehalt an Acetoin und Diacetyl in 142 Weißweinen verschiedener Rebensorten und Jahrgänge bestimmt, in denen der Säureabbau erfolgt oder ausgeblieben war. Einige Beispiele zeigt Tabelle 3.

In den untersuchten Weinen schwankte der Gehalt an Diacetyl und Acetoin zwischen 0,7 — 34,9 mg je Liter. Diacetyl und Acetoin kommen keinesfalls nur in den Weinen vor, in denen der biologische Säureabbau erfolgt ist. Dies beruht darauf, daß schon im Traubenmost geringe Mengen dieser Verbindung vorkommen, und daß diese Stoffe von der Hefe bei der Gärung gebildet werden können, vgl. RIBERAU-GAYON und Mitarb. (1955), KIELHÖFER und WÜRDIG (1960).

Die eigenen Untersuchungen ergaben, daß Weine mit einem überdurchschnittlich hohen Gehalt an Acetoin und Diacetyl (ca. 20 mg/l) einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Molke- oder Sauerkrautgeschmack (sog. Milchsäurestich) aufweisen. Dieser Geschmack kann in leichten, wenig geschwefelten Weinen durch Zusatz von einigen Milligramm Diacetyl je Liter erzielt werden, nach VAUGHN und TSCHELISTCHEFF (1957), sogar auch durch Zusatz von techn. Acetoin. Wahrscheinlich bewirken diese Verbindungen in höheren Konzentrationen den Milchsäurestich. Es kann jedoch auch sein, daß der Sauerkrautgeschmack im Wein durch andere Substanzen hervorgerufen wird und Acetoin und Diacetyl lediglich einen Hinweis auf ein starkes Wachstum von Milchsäurebakterien geben. So wird von KIELHÖFER und WÜRDIG (1960) besonders darauf hingewiesen, daß die geschmackliche Wirkung von Acetoin im Vergleich zu dem nur in geringen Mengen vorkommenden Diacetyl gering ist. Durch einen sehr hohen Milchsäuregehalt im Wein wird der typische Molkegeschmack nicht hervorgerufen, wie Weine zeigten, die einen ungewöhnlich hohen Milchsäuregehalt hatten und keinerlei „Sauerkrautgeschmack“ aufwiesen, siehe Tabelle 3, Nr. 20, 21.

Da gezeigt werden konnte, daß Bakterien des biologischen Säureabbaus Acetoin (+Diacetyl) bilden, überrascht es nicht, daß Weine, in denen die Äpfel-

Tabelle 3
Säureabbau und Gehalt an Acetoin und Diacetyl in Weinen
verschiedener Rebensorten

Nr.	Rebensorte	Jahrgang	Milch- säure*)	Äpfel- säure	Acetoin + Diacetyl mg/Liter
1	Sylvaner Cand. 1-76	1956	+	-	2,6
2	" " "	1957	+	-	29,1
3	" " Maikammer	1957	+	+	26,4
4	" " Cand. 1-76	1958	+	-	1,05
5	" " "	1959	+	-	11,0
6	" " "	1959	(-)	+	3,7
7	Riesling Klon 90	1956	+	+	12,6
8	" " "	1957	(-)	+	3,0
9	" " "	1958	+	-	8,5
10	" " "	1958	(-)	+	3,5
11	" " "	1959	(-)	+	2,8
12	" " "	1959	(-)	+	1,4
13	Müller-Thurgau	1958	(-)	+	1,4
14	" " "	1959	(-)	+	1,7
15	Morio-Muskat	1956	+	(-)	5,6
16	" " "	1957	+	(-)	7,3
17	" " "	1958	+	-	19,8
18	" " "	1959	(-)	+	1,2
19	" " "	1959	(-)	+	0,7
20	Bocksbeutel	1957	6,9g/l	-	1,0
21	Hefewein	—	7,2g/l	-	0,7
22	FS. 4-201-39	1956	+	-	15,9
23	" " "	1957	(-)	+	2,6
24	" " "	1958	+	-	7,9
25	" " "	1959	(-)	+	1,8
26	Gf. 30n-8-127	1956	+	-	1,5
27	" " "	1957	(-)	+	14,2
28	" " "	1958	+	-	10,2
29	Gf. 30n-9-130	1956	+	-	0,9
30	" " "	1957	+	-	9,8
31	" " "	1959	+	-	4,8
32	Gf. 33-29-133	1956	+	-	1,5
33	" " "	1957	(+)	+	8,2
34	" " "	1958	+	-	3,0
35	" " "	1959	(-)	+	0,9
36	Sbl. 1-47-29	1956	+	-	4,0
37	" " "	1957	+	-	8,3
38	" " "	1958	+	-	8,3
39	" " "	1959	(-)	+	3,3
40	Sbl. 2-19-58	1956	(+)	+	3,6
41	" " "	1957	(-)	+	5,8
42	" " "	1958	+	-	7,3
43	" " "	1959	(-)	+	3,4
44	Sbl. 2-20-66	1957	(-)	+	4,3
45	" " "	1958	(-)	+	13,2
46	Sbl. 5-24-20	1956	(-)	+	4,0
47	" " "	1957	+	-	3,6
48	" " "	1958	+	-	8,3
49	" " "	1959	+	-	2,4
50	Sbl. 6-16-7	1956	+	-	11,9
51	" " "	1958	+	-	8,6
52	" " "	1959	(-)	+	3,3

säure nicht abgebaut wurde, einen statistisch gesicherten, geringeren Acetoin- und Diacetylgehalt aufweisen als Weine, in denen der biologische Säureabbau erfolgt war (Tabelle 4).

Tabelle 4

Vergleich des Gehaltes an Acetoin (+ Diacetyl) in Weißweinen, in denen kein biologischer Säureabbau erfolgt war und Weißweinen mit bakteriellem Säureabbau

		Gehalt an Acetoin (+ Diacetyl) mg/Liter			
n		Mittel- werte	Extrem- werte	$\pm m$	P %
Weine ohne Säureabbau	41	4,3	0,7-15,8	$\pm 0,54$	< 0,02
Weine mit Säureabbau	101	9,3	0,9-34,9	$\pm 0,68$	

Es ist sehr wahrscheinlich, daß der unterschiedliche Gehalt an Acetoin (+ Diacetyl) auf die Stoffwechsellätigkeit der säureabbauenden Bakterien zurückzuführen ist. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß unter den Bedingungen, die den biologischen Säureabbau begünstigen, auch von den Hefen mehr Acetoin gebildet wird. Da beide Organismen Acetoin bilden und im Wein gemeinsam vorkommen, muß diese Möglichkeit erwogen werden, wenn es auch in der Auswirkung gleichgültig ist, ob Acetoin (+ Diacetyl) unter den Bedingungen, die den Säureabbau ermöglichen, von Hefen oder Bakterien gebildet wird.

Da es sich bei Acetoin und Diacetyl um Verbindungen handelt, die im Wein in geschmacklicher Hinsicht von Bedeutung sein können, folgt aus diesem Untersuchungsergebnis, daß Wein im Verlauf des biologischen Säureabbaus in seinem Geschmack beeinflußt werden kann, woraus aber nicht abgeleitet werden darf, daß damit eine geschmackliche Qualitätsverminderung verbunden ist. Der biologische Säureabbau bedingt keineswegs in allen Weinen einen erhöhten Gehalt an Acetoin und Diacetyl, siehe Tabelle 3, Weine Nr. 1, 4, 26, 29, 32. Es kann lediglich auf die Möglichkeit einer geschmacklichen Veränderung hingewiesen werden, die vielleicht in leichten Weinen deutlicher hervortreten kann. Diacetyl ist ein wichtiger Geschmacksgrundstoff; es gibt im Wein sicher optimal günstige Konzentrationen und in manchen Weinen (z. B. Rotweinen) dürfte der durch geringe Mengen von Diacetyl bewirkte Geruch und Geschmack erwünscht sein.

*) + = vorhanden, - = fehlt. Infolge der bei der Gärung entstehenden Bernsteinsäure mit fast gleichem Rf-Wert wie Milchsäure kann nicht entschieden werden, ob Milchsäure nur in geringen Mengen vorhanden ist oder fehlt

Zusammenfassung

1. Die Milchsäurebakterien, die im Wein eine Säureverminderung durch De-karboxylierung der Äpfelsäure bewirken können, bilden beim Wachstum in synthetischer Nährlösung oder Traubenmost Acetoin bzw. Diacetyl.
2. An Weißweinen verschiedener Rebensorten wurde festgestellt, daß Weine, in denen der bakterielle Säureabbau erfolgt ist, einen höheren Gehalt an diesen geschmacklich wirksamen Stoffen aufweisen, als Weine ohne Säureabbau.
3. Die vorstehenden Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, daß Wein durch den biologischen Säureabbau nicht nur eine Säureverminderung erfährt, sondern auch in der Zusammensetzung geschmacklich wirksamer Stoffe verändert werden kann.

Literaturverzeichnis

- BUSSE, M. and O. KANDLER: Biosynthesis of acetoin by *Leuconostoc citrovorum*. *Nature* **189**, 774 — 775 (1961).
- DOLIN, M. J. and J. C. GUNSALES: Pyruvic acid metabolism. II. An acetoinforming enzyme system in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **62**, 199 — 214 (1951).
- GREEN, D. E., STUMPF, P. K. and K. ZARUDNAYA: Diacetylmutase. *J. biol. Chem.* **167**, 811 — 816 (1947).
- HAPPOLD, F. C. and C. P. SPENCER: The bacterial formation of acetylmethylcarbinol and 2 : 3 butylene glycol. *Biochim. Biophysica Acta* **8**, 18 — 29 (1952).
- HILL, E. C., F. W. WENZEL and A. BARRETO: Colorimetric method for microbiological spoilage in citrus juices. *Food. Technol.* **8**, 168 — 171 (1954).
- HOOREMAN, M.: Contribution à l'étude de la fermentation butandiolique. Thèse Paris 1948.
- JUNI, E.: Mechanisms of formation of acetoin by bacteria. *J. biol. Chem.* **195**, 715 — 726 (1952).
- — : Mechanisms of formation of acetoin by yeast and mammalian tissue. *J. biol. Chem.* **195**, 727 — 734 (1952).
- KIELHÖFER, E. und G. WÜRDIG: Die Bestimmung von Acetoin und Diacetyl im Wein und der Gehalt deutscher Weine an diesen Substanzen. *Wein-Wiss.* **15**, 135 — 146 (1960).
- KLUYVER, A. J.: The chemical activities of microorganisms. Univ. of London Press, London 1931.
- MOAT, A. G. and H. C. LICHSTEIN: Factors affecting the formation of acetylmethylcarbinol by *Lactobacillus arabinosus*. *J. Bacteriol.* **66**, 324 — 327 (1953).
- NEISH, A. C.: Analytical methods for bacterial fermentations. National Research Council of Canada. Saskatoon 1952.
- VAN NIEL, C. B., A. J. KLUYVER und H. G. DERNX: Über das Butteraroma. *Biochem. Z.* **210**, 234 — 251 (1929).
- RADLER, F.: Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein.. Isolierung und Charakterisierung von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **30**, 64 — 72 (1958a).
- — : Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. II. Der Nähr- und Wuchsstoffbedarf der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **32**, 1 — 15 (1958b).
- — : Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. III. Die Energiequelle der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **31**, 224 — 230 (1958c).
- — : Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. V. Über das Metabioseverhältnis zwischen Weinhefen und Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **37**, 267 — 277 (1960).
- RIBEREAU-GAYON, J. et E. PEYNAUD: Analyse et Controle des Vins. Paris und Liège 1958.
- — : Traité d'Oenologie. Paris et Liège 1960.
- ROWATT, E.: The metabolism of pyruvate by *Lactobacillus plantarum*. *Biochem. J.* **49**, 453 — 462 (1951).

- SCHANDERL, H.: Über den bakteriellen Säureabbau im Wein. Dtsch. Wein-Ztg. (Mainz) 28. Mai 1943.
- SCHMALFUSS, H. und H. BARTHMEYER: Diacetyl als Aromabestandteil von Lebens- und Genußmitteln. Biochem. Z. **216**, 330 (1929).
- SCHMIDT, H.-L.: Untersuchungen zur Biochemie des Abbaus von Äpfelsäure durch *Bacterium gracile* mit Hilfe ¹⁴C-markierter Säuren. Diss. Mainz 1959.
- VAUGHN, R. H. and TCHELISTCHEFF, A.: Studies on the malic acid fermentation of California table wines. I. An introduction to the problem. Amer. J. Enology **8**, 74—79 (1957).
- WINDISCH, K.: Die chemischen Vorgänge beim Werden des Weines. Stuttgart 1960.

eingegangen am 5. 6. 1962

Dr. F. RADLER,

Forschungs-Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof,
Siebeldingen über Landau/Pfalz

z. Z. C. S. I. R. O. Research Station
Merbein, Vic.
Australien