

Review

Thiaminpyrophosphat – ein natürlich vorkommendes Iminium-Salz. Seine Bedeutung für die mikrobiellen Prozesse bei der Weinbereitung und die Aromabildung im Wein

Thiamine Diphosphate – A Natural Iminium Salt. Its Role in Microbiological Processes During Wine Preparation and on the Aroma of Wine

Nikolaus Müller

Silvanerweg 9, D-55595 Wallhausen, Germany

Reprint requests to Dr. Nikolaus Müller. E-mail: nik.mueller@t-online.de. Fax: +49 (0)6706 902612

Z. Naturforsch. **2014**, *69b*, 489 – 500 / DOI: 10.5560/ZNB.2014-4052

Received March 2, 2014

Iminium salt structures are widespread in nature and play an important role in biochemical processes. Among these thiamine diphosphate (ThPP, Vitamine B₁) is one of the best known examples. It serves as a cofactor in a variety of different enzymes that are found in all forms of life. During fermentation for the production of alcoholic beverages, ThPP is of great importance not only for the key step (decarboxylation of pyruvate), but also for the formation of secondary metabolites which highly influence the aroma of wine. Thus, enzymatic degradation of amino acids in yeasts *via* the Ehrlich pathway delivers higher alcohols, fatty acids and esters. In malolactic fermentation, ThPP-dependant enzymes (ligases) form new C–C bonds to synthesize the highly aroma-active substance diacetyl. This article summarizes the influence of ThPP on the sensorically important substances during wine making processes.

Key words: Thiamine Diphosphate, Wine Aroma, Alcoholic Fermentation, Yeast

Einleitung

Iminiumsalz-Strukturen sind in der Natur weit verbreitet und spielen bei vielen biochemischen Prozessen eine bedeutende Rolle. Prominentestes Beispiel ist wohl das Thiaminpyrophosphat (ThPP, Vitamin B₁, Abb. 1), das als Cofaktor in vielen, oft sehr unterschiedlichen enzymatischen Prozessen in praktisch allen Lebensformen gefunden wird. Auch bei den in der Weinbereitung eingesetzten Mikroorganismen (Hefen und Milchsäurebakterien) spielt es eine entscheidende Rolle. Dabei ist nicht nur einer der Schlüsselschritte der alkoholischen Gärung, die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd, von enormer Bedeutung. Auch bei der Bildung einer Vielzahl von Substanzen, die entscheidenden Einfluss auf das Weinaroma haben, sind Thiaminpyrophosphat-abhängige Enzyme beteiligt. Hierzu gehören der enzymatische Abbau einiger Aminosäuren, der über den sogenannten Ehrlich-Weg zu höheren Alkoholen, Aldehyden und Carbonsäuren führt, und die auf

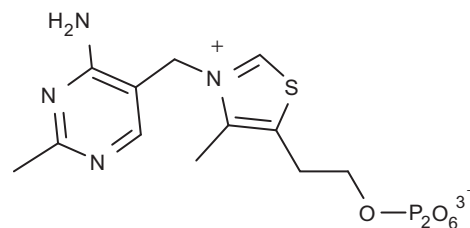


Abbildung 1. Strukturformel von Thiaminpyrophosphat.

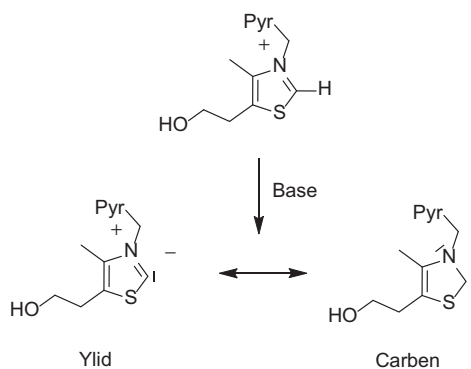
Ligasen zurückzuführenden enzymatisch katalysierten Acyloinkondensationen. Weitere Bedeutung kommt ThPP als Cofaktor bei der heterofermentativen Milchsäuregärung zu, mit all ihren negativen Einflüssen auf das Aroma des Weins.

Thiamin – Biosynthese, chemische und physikalische Eigenschaften

Die Entdeckung von Thiaminpyrophosphat (Vitamin B₁, Aneurin) geht auf das Jahr 1910 zurück.

Schon vorher wurde erkannt, dass ein Mangel zu schweren Erkrankungen („Beri-Beri-Krankheit“) führt. Der ersten Isolierung aus Reis folgte im Jahre 1936 die Strukturaufklärung durch Williams. Seine Rolle bei der Stabilisierung von Acylresten wurde 1958 von Breslow vorgeschlagen [1]. Viele Mikroorganismen, Fungi und Pflanzen synthetisieren Thiamin, nicht aber Vertebraten, für die es ein essentieller Nahrungsfaktor ist [2]. Der Kofaktor Thiamin besteht aus einem 4-Amino-2-methylpyrimidin-Ring, der in 5-Position über eine Methylengruppe mit dem Stickstoffatom eines 5-Ethylendiphosphat-4-methyl-thiazolium-Rings verknüpft ist (Abb. 1). Die Biosynthese in *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt für die Thiazol-Untereinheit aus 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat, Glycin und Cystein, für den Pyrimidinrest aus Xylulose und Formiat [3].

Entscheidend für die Wirkung des Thiamins ist das acide Proton in der 2-Stellung des Thiazolrings. Durch die basenkatalysierte Deprotonierung entsteht eine Spezies, für die man die mesomeren Grenzformeln eines 1,2-Ylids und eines Carbens formulieren kann (Schema 1). Dabei unterstreichen die Versuche in der Organokatalyse mit Thiamin-ähnlichen Verbindungen den Ylid-Charakter, während der Carben-Charakter die Ligandeneigenschaften bedingt. Gegen das Vorliegen einer ausgeprägten Carben-Struktur spricht auch, dass die für Carben-Zwischenstufen typischen Insertationsreaktionen nicht zu beobachten sind [4]. Thiamin gilt inzwischen sowohl in der Welt der enzymatischen, asymmetrischen Synthese („Ylid-Charakter“) als auch als Modell für Liganden in der homogenen Katalyse („Carben-Charakter“) als natürliches Vorbild [5].



Schema 1. Ylid-Carben-Mesomerie.

Die Eigenschaften von Thiamin als Überträger von Acylgruppen in enzymatischen Reaktionen hat seit der Formulierung der aktiven Zwischenstufe durch Breslow unzählige Chemiker inspiriert, dieses in der asymmetrischen Synthese von chiralen Verbindungen, vorwiegend bei Acyloinkondensationen [6] und asymmetrischen Stetter-Reaktionen, einzusetzen. Die Reaktion ist auch deshalb von größtem präparativem Interesse, weil eine Reaktivitätsumpolung des Carbonylkohlenstoffs stattfindet und so neue Synthesewege eingeschlagen werden können. Die erste praktische industrielle Anwendung einer von Thiamin abhängigen Enzymreaktion wurde schon in den zwanziger Jahren des vorigen Jahrhunderts mit der Herstellung einer Vorstufe bei der Ephedrin-Synthese demonstriert [7] (s. Schema 10). Unzählige Publikationen und Übersichtsartikel sind bisher zu dieser Thematik erschienen [5, 8, 9].

Die Rolle der Weinhefen bei der alkoholischen Gärung

Einer der Schlüsselschritte bei der alkoholischen Gärung von Traubenmost ist die Decarboxylierung von Phosphoenolpyruvat zu Acetaldehyd, gefolgt von dessen Hydrierung zu Ethanol. Weinhefen, allen voran *Saccharomyces cerevisiae*, sind stark abhängig von einer ausreichenden Thiaminpyrophosphat-Versorgung und reagieren in Form von Gärstörungs bis hin zu den gefürchteten Gärstopps. Die Thiamin-Gehalte betragen im Most 150–450, in Weißweinen 2–58 und in Rotweinen 103–245 $\mu\text{g L}^{-1}$ [10]. Die Hefen können zwar das benötigte Vitamin B₁ *de novo* synthetisieren, da aber eine Thiamin-Unterversorgung fast immer mit einem Stickstoff- und Aminosäure-Mangel einhergeht, wirken sich Thiamin-Gaben vor oder während der Gärung vorteilhaft auf deren Verlauf aus. Nach der EU-Verordnung und damit nach den Weingesetzen der EU-Mitgliedsländer ist die Zugabe von 60 mg h L^{-1} , meist in Kombination mit anderen Stickstoffquellen (Diammoniumhydrogenphosphat, Diammoniumsulfat), erlaubt. Durch Thiamin-Unterversorgung hervorgerufene Gärstörungen machen sich nicht nur durch den negativen Zeitfaktor störend bemerkbar, sondern sie können auch einen gravierenden Einfluss auf die Bildung von Fehlparfums haben. Der metabolische Stau von Phosphoenolpyruvat und anderen 2-Ketocarbonsäuren führt zu „Ausweichreaktionen“ und zur Bildung von

unerwünschten Nebenprodukten, die oft schon in kleinsten Mengen zu Fehlparamen Anlass geben und somit die Weinqualität negativ beeinflussen.

Diese wichtige Funktion der Senkung des Pyruvat- und 2-Ketoglutaratgehalts in gärenden Mosten und Weinen spielt auch bei deren Stabilisierung durch „Schwefelung“ (Zugabe von Schwefeldioxid) eine wichtige Rolle [11]. Brenztrauben- und 2-Ketoglutarat bilden mit dem im Gleichgewicht mit SO_2 vorhandenen Bisulfit Additionsprodukte („gebundener Schwefel“), die die Konzentration des mikrobiozid wirkenden freien SO_2 herabsetzen. Da die Bildung dieser Bisulfit-Additionsprodukte reversibel ist, kann es später auf der Flasche zu SO_2 -Freisetzungen kommen, die ab einer bestimmten Konzentrationsschwelle (60 mg L^{-1}) als unangenehm empfunden werden. Wir haben es also hier mit einem indirekten Effekt des Thiamins auf das Weinparoma zu tun.

Einfluss der Hefen auf die Aromabildung

Die Aromen im Wein werden unter anderem nach ihrer Entstehung eingeteilt. Dabei unterscheidet man in *Primärparomen*, die bereits in der Traube vorhanden und schon vor der Gärung wahrnehmbar sind. Sekundärparomen bilden sich durch mikrobiologische Prozesse, allen voran die alkoholische Gärung durch Hefen, aber auch beim biologischen Säureabbau durch Milchsäurebakterien („malolaktische Gärung“). Unter *Tertiärparomen* werden schließlich solche zusammengefasst, die bei der Reifung und Lagerung des Weins entstehen [12].

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und verwandte Arten verwandeln Traubenmost in Wein. Sie haben einen entscheidenden Einfluss auf das sensorische Profil eines Weins und damit auf dessen Qualität. Nahezu jeder sensorische Aspekt wird durch die Hefeaktivität beeinflusst: Aroma, Geruch, Farbe, Klarheit, Mundgefühl, Adstringenz. Damit ist die Hefe auch verantwortlich für manche Weinfehler wie z. B. flüchtige Schwefelverbindungen, höhere Alkohole und Aldehyde. Insgesamt sind die einzelnen Einflüsse sehr komplex, und ihr Verständnis hat erst in jüngster Zeit durch die Entwicklung der Analytik und gentechnischer Methoden einen enormen Aufschwung erfahren [13].

Aromastoffe werden als definierte chemische Verbindungen durch bestimmte Stoffwechselforgänge

gebildet. Diese Stoffwechselforgänge werden wie in allen lebenden Organismen durch Enzyme katalysiert. Deren spezifische, für die Aktivität verantwortliche Proteinstruktur ist genetisch in Form bestimmter DNA-Sequenzen festgelegt. Eine Identifizierung dieser Sequenzen und deren Manipulation erlauben damit einen gezielten Eingriff in das Geschehen der Aromabildung und deren Kontrolle.

Das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* ist inzwischen vollständig aufgeklärt. Auch die genetischen Unterschiede zwischen verschiedenen Weinhefen sind bekannt und werden für die unterschiedliche Aromabildung verantwortlich gemacht. Die gezielte Ausschaltung eines Gens, das ein Aroma bildendes Enzym kodiert, führt zur Nichtausbildung dieses Aromanteils. Umgekehrt kann durch eine „Verstärkung“ (Überexpression) dieses Gens ein Enzym und mit ihm die Bildung eines bestimmten Aromastoffs forciert werden. Zur Zeit sind solche gentechnologischen Eingriffe sowohl auf der Verbraucher- als auch auf Produzentenseite undenkbar. Für das Verständnis der Aromen bildenden Stoffwechselforgänge wird dadurch aber ein enormer Erkenntnisgewinn erzielt. In diesen Komplex der Bedeutung der Hefen für die Aromabildung spielt auch die Frage „Spontangärung oder Reinzuchthefer“ hinein. Es sollte klar sein, dass die während der Gärung zur Dominanz kommende Hefe einen erheblichen Einfluss auf die Sensorik des späteren Weins hat. Bei der Spontangärung kommen die im Weinberg und (viel wahrscheinlicher) die im Keller vorhandenen Hefen zumindest im Anfangsstadium der Gärung zum Zuge. Dies impliziert die Vergärung mit einer Vielzahl variabler Hefestämme, deren Eigenschaften und zahlenmäßige Zusammensetzung in der Praxis unbekannt sind. Das heißt aber auch, dass das sensorische Ergebnis nicht vorhersehbar ist. Bei Einsatz von Reinzuchthefer haben diese von Beginn an die Dominanz mit einem vorhersehbaren Ergebnis. Das mag zu einer gewissen Eintönigkeit führen, bewahrt den Betriebsinhaber aber vor einem wirtschaftlichen Desaster [14].

Übersicht: Thiamin-abhängige Enzyme

Thiamin-abhängige Enzyme katalysieren die verschiedensten biochemischen Umwandlungen. Die meisten dieser Enzyme sind Ligasen (Enzymklasse 2) und Lyasen (Enzymklasse 4), aber auch Oxido-

reduktasen (Enzymklasse 1) und viel seltener Hydratasen (Enzymklasse 3) sind zu finden. Ihre „Verwandtschaftsverhältnisse“ wurden durch Vergleich ähnlicher Domänen untersucht [15]. Diese unterschiedlichen Funktionen, die Thiamin in Enzymen ausübt (C–C-Bindungsknüpfung und -spaltung, C–N-, C–O- oder C–S-Bindungsbildung) erfordern eine Substraterkennung, die nur von der Art der Proteinumgebung in der Nähe des aktiven Zentrums geleistet werden kann. Die Substratspezifität von verschiedenen Decarboxylasen gegenüber verschiedenen 2-Ketocarbonsäuren wurde anhand ihrer Enzymkinetiken (Bestimmung der k_m -Werte) untersucht [16].

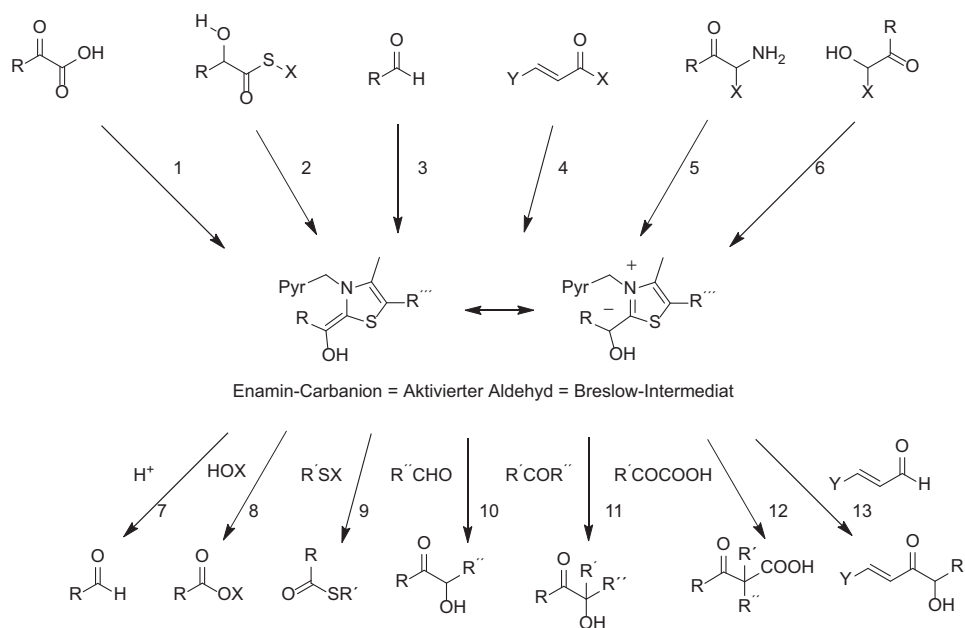
Man sollte sich aber darüber im Klaren sein, dass die Zuteilung Thiamin-abhängiger Enzyme zu verschiedenen Enzymklassen allein auf Basis der Endprodukte erfolgt. Sehr häufig sind Bindungsspaltung (Lyaseaktivität) und Bindungsknüpfung (Ligaseaktivität) miteinander gekoppelt wie in den unten beschriebenen Acyloinkondensationen. Der Kernschritt bei allen enzymatischen Reaktionen mit Thiamin als Cofaktor ist immer die Addition des nach Deprotonierung gebildeten Ylids/Carbens an Carbonylverbindungen unter Bildung einer Mesomerie-stabilisierten Zwischenstufe (Enamin = Carban-

ion = aktivierter Aldehyd = Breslow-Intermediat). Erst die Weiterreaktion, z.B. die Freisetzung eines Aldehyds, die oxidative Kopplung an Coenzym A, oder die Addition der Zwischenstufe an andere Carbonylkomponenten, entscheidet über die Zuordnung. Diese Zusammenhänge sind in Schema 2 dargestellt. Unter der Strukturformel finden sich die Substrate 1–6 der Thiamin-abhängigen Enzymreaktionen, unter der Formel des daraus gebildeten Enamins/Carbanions/Breslow-Intermediats die Weiterreaktionen 7–13.

In Tabelle 1 findet sich eine Übersicht über die Enzyme, die als Cofaktor Thiaminpyrophosphat benötigen, wobei dem besonderen Aspekt der Wirkung auf das Weinaroma Rechnung getragen wurde. Die Tabelle wurde mit Hilfe der Datenbank BRENDA-The Comprehensive Enzyme Information System erstellt [17, 18].

Die Rolle von Decarboxylasen bei der Aromenbildung

Struktur und Aufbau des Enzymkomplexes für die Decarboxylierung von 2-Ketocarbonsäuren sind genauestens untersucht. Das Schlüsselenzym Pyruvatdecarboxylase besteht aus vier Untereinheiten.



Schema 2. Übersicht Thiaminpyrophosphat-katalysierter Reaktionen (nach Lit. [15]).

Tabelle 1. Beispiele für Thiamin-abhängige Enzyme.

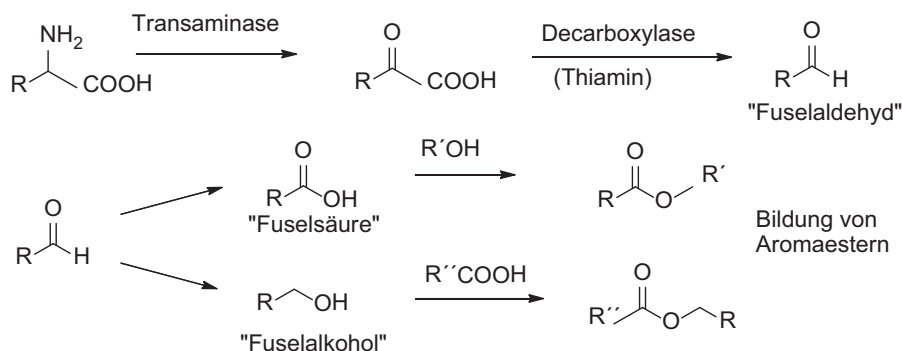
Enzym	Enzym-Nr.	Substrat/Stoffwechsel-Endprodukt	Auswirkung auf das Weinaroma
Pyruvatdehydrogenase	1.2.4.1	Pyruvat → Acetyl-CoA	Vorstufe zu Thioacetaten
2-Oxoglutaratdehydrogenase	1.2.4.2	Ketoglutarat → Succinaldehyd	SO ₂ -Verbrauch
Transketolase	2.2.1.1	Heterofermentative Milchsäuregärung	Essig-, Milchsäure-, Mannitstich
Acetolactatsynthase	2.2.1.6	„aktiver Acetaldehyd“ + Pyruvat (biologischer Säureabbau)	Diacetyl (buttrig) Acetoin, Butandiol
Verschiedene Ligasen	2.2.1.x	Threonin-, Ketoglutarat-Stoffwechsel	Sotolon, Soleron
Pyruvatdecarboxylase	4.1.1.1	Alkoholische Gärung	vielfältig
Benzoylformiat-DC	4.1.1.7	Mandelsäure-Metabolismus	Bittermandelton
Phenylpyruvat-DC	4.1.1.43	Phenylalanin-Metabolismus	2-Phenylethanol
Verzweigt-kettige 2-Ketosäure-decarboxylase	4.1.1.72	Aminosäureabbau → Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, „Ehrlich Pathway“	„Fuselöle“ und deren Ester (Isoamylacetat), Schwefelmetabolite
Indoyl-3-pyruvat-DC	4.1.1.74	Tryptophan-Stoffwechsel	Indoyl-3-essigsäure, <i>o</i> -Aminoacetophenon, untypischer Alterston
Benzaldehydlyase	4.1.2.38	Acetoinkondensation	verschiedene Acetoin
Acetohydroxysäuresynthase	4.1.3.18	Biosynthese verzweigt-kettiger Aminosäuren, Acetolactat	Aromaauswirkungen wie bei 4.1.1.72

Für die Bildung dieses Komplexes werden zweiwertige Magnesiumionen benötigt. Die Aminosäuresequenz ist aufgeklärt, und besonders im aktiven Zentrum wird ihre Rolle voll verstanden. Interessanterweise hat Thiamin(-pyrophosphat) auch ohne die Proteinumgebung noch Aktivität in Lösung. Ja selbst beim Reduzieren der Struktur auf einfachste Moleküle mit 1,3-Thiazoliumstruktur bleibt eine gewisse Decarboxylierungsaktivität erhalten, die allerdings um den Faktor 10^{-6} geringer ist [19]. Solche Studien haben wesentlich zur Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen beigetragen und die Rolle des Pyrimidinbausteins im Thiamin aufgeklärt. Die Pyruvatdecarboxylase selbst besitzt keine ausgeprägte Substratspezifität. Neben Pyruvat können auch andere 2-Ketocarbonsäuren unter CO₂-Abspaltung zu den entsprechenden Aldehyden umgesetzt werden [16]. Dies bedeutet, dass die Anwesenheit von aus dem Aminosäurestoffwechsel stammenden 2-Ketocarbonsäuren genügt, um über eine Decarboxylierung mit anschließender Reduktion zum Alkohol Fuselöle und höhere Fettsäuren in den Wein gelangen zu lassen. Die Rolle des Thiamins als Coenzym im Pyruvat-Decarboxylase-Komplex bei der Umwand-

lung von Acetaldehyd in Acetyl-CoA im Zusammenspiel mit Biotin legt nahe, dass Thiole unter Bildung von aromaaktiven Thioestern reagieren können (Schema 2, Reaktion 9). Im chemischen Labor konnte in einer Modellreaktion diese Thiolesterbildung nachgestellt werden [20].

Aromastoffe aus dem Aminosäurestoffwechsel

Aminosäuren werden in den verschiedensten Organismen nach dem sogenannten Ehrlich Pathway verstoffwechselt (Schema 3). Dabei wird in einem ersten Schritt durch Transaminierung eine 2-Ketocarbonsäure gebildet. Diese wird nun in einem weiteren Schritt durch Thiamin-abhängige Decarboxylasen in den um ein Kohlenstoffatom ärmeren Aldehyd übergeführt. Je nach Redox-Zustand der Zelle erfolgt eine Oxydation zur Carbonsäure (durch Liponsäure vermittelt), oder es kann eine Reduktion zum entsprechenden Alkohol erfolgen. Diesem Abbauweg unterliegen verzweigt-kettige (Leucin, Isoleucin [21], Valin [22]), aromatische (Phenylalanin [23, 24], Tyrosin [25], Tryptophan [26]) und schwefelhaltige Aminosäuren (Methionin [27], eventuell Cystein).



Schema 3. Bildung von Aromastoffen nach dem Ehrlich-Abbau.

Die Abbauprodukte sind bedeutende Aromabestandteile des Mostes und Weins. Aus Valin entsteht so Isobutanol, aus Leucin Isoamylalkohol oder aus Isoleucin 2-Methylbutanol. Bei diesen Alkoholen handelt es sich um „Fuselöle“, die einen negativen Beitrag zum Wein Aroma liefern. Diese Alkohole können wiederum mit Carbonsäuren verestern, die eher für angenehme Aromen stehen. So bildet sich aus Isoamylalkohol und Essigsäure das Isoamylacetat, dem die Attribute Banane/Eisbonbon zugeordnet werden. Auch hier wird ab einer bestimmten Konzentration die Grenze von angenehm zu fehlerhaft überschritten. Bei einem genaueren Blick auf die Fraktion der flüchtigen Komponenten bei einer Weinanalyse findet man tatsächlich die durch den Ehrlich-Abbau gebildeten Alkohole und Säuren in Form ihrer Ester untereinander oder die Fuselsäuren vorwiegend als Ethylester und die Fuselalkohole mit den am häufigsten im Wein vorkommenden Säuren (Essig-, Milch-, Bernstein-, Äpfel- und Weinsäure) verestert vor [28].

Beim Beitrag dieser Ester-Komponenten zum Aroma eines Weins muss beachtet werden, dass sich die Zusammensetzung ständig (zum Beispiel bei der Lagerung) ändert. Da die Ester sich unter enzymatischen Bedingungen (Esterasen) bilden, stellt sich oft erst im fertigen Wein das chemische Gleichgewicht ein [29]. In der klassischen Beschreibung besteht der letzte Schritt des Ehrlich-Abbaus in der Reduktion des Aldehyds zum „Fuselalkohol“. In Wirklichkeit hängt aber die Balance zwischen der Oxidation und Reduktion des Aldehyds stark von den Kultivierungsbedingungen ab. Unter aeroben, Glucoselimitierten Bedingungen mit bestimmten Aminosäuren als einzigen Stickstoffquellen werden fast ausschließ-

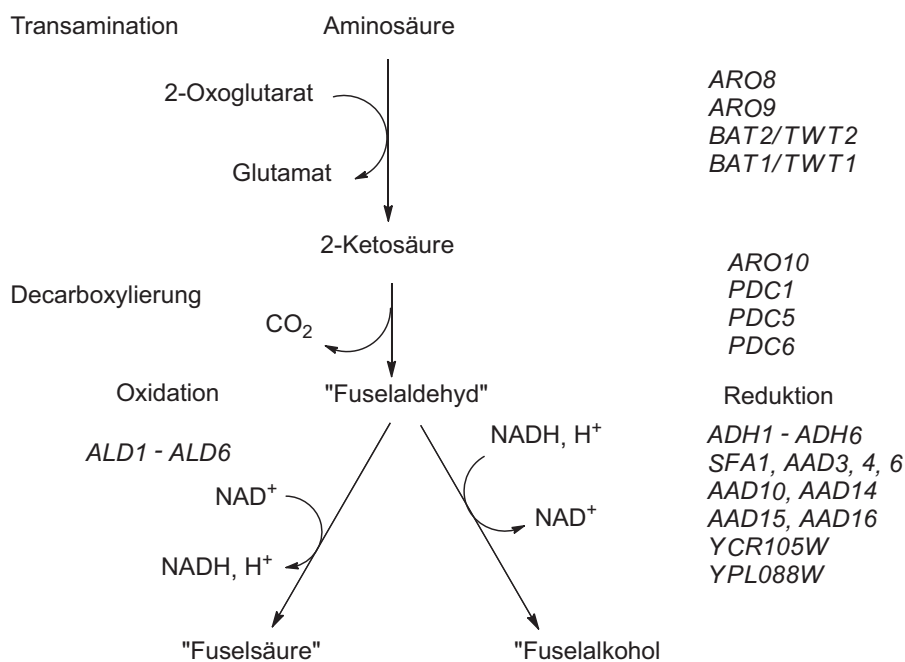
lich die Fuselsäuren erhalten. Unter komplett anaeroben Bedingungen bildet sich ausschließlich der „Fuselalkohol“ [30]. So liefert die anaerobe Vergärung von Glucose mit Phenylalanin als einziger Stickstoffquelle fast ausschließlich 2-Phenylethanol [31]. Somit ist der Redoxstatus der Zelle entscheidend für die Art des Produkts und dessen Einfluss auf das Aroma.

In den letzten Jahren sind große Anstrengungen unternommen worden, um ein besseres Verständnis der Gene zu erhalten, die bei diesem Abbau involviert sind. In Schema 4 ist der Ehrlich-Abbauweg der oben erwähnten Aminosäuren schematisch zusammen gefasst. Die Gene, die für die Codierung der entsprechenden Enzyme stehen, sind ebenfalls aufgeführt. Der Thiamin-abhängige Decarboxylierungsschritt des Ehrlich-Abbaus wurde ursprünglich mit nur einem Enzym, der Pyruvatdecarboxylase in Verbindung gebracht. Bei der vollständigen Entschlüsselung des Genoms von *Saccharomyces cerevisiae* zeigte sich jedoch, dass nicht weniger als fünf verschiedene Gene (*PDC 1*, *PDC 5*, *PDC 6*, *ARO 10*, *THI 5*) identifiziert werden konnten, die ähnliche Sequenzen aufwiesen, wie die Thiamin-abhängigen Decarboxylase-Gene. Drei dieser Gene (*PDC 1*, *PDC 5*, und *PDC 6*) kodieren die Pyruvatdecarboxylasen, während die anderen beiden alternativen Gene für Decarboxylasen des Ehrlich-Abbaus der 2-Ketosäuren mit anderen Strukturen stehen.

Produkte aus dem Aminosäureabbau spielen als Naturstoffe eine wichtige Rolle. Die auf dem Ehrlich-Abbau aus Tryptophan gebildete 3-Indolylessigsäure ist als Phytohormon (Auxin) bei Wachstumsvorgängen in Pflanzen unentbehrlich. Durch den weiteren Abbau bis zum 2-Aminoacetophenon erhalten

Tabelle 2. Produkte des Ehrlich-Abbaus verschiedener Aminosäuren.

Aminosäure	2-Ketosäure	Fuselaldehyd	Fuselalkohol	Fuselsäure	Lit.
Leucin	2-Ketoisocapron-säure	Isoamylaldehyd	Isoamylalkohol	Isovaleriansäure	[21]
Valin	2-Ketovaleriansäure	Isobutyraldehyd	Isobutanol	Isobuttersäure	[22]
Isoleucin	2-Keto-3-methyl-valeriansäure	2-Methylbutanal	Amylalkohol	2-Methylisobuttersäure	[21]
Phenylalanin	Phenylpyruvat	2-Phenylacet-aldehyd	2-Phenyl-ethanol	Phenylessig-säure	[23, 24]
Tyrosin	(4-Hydroxyphenyl)-pyruvat	2-(4-Hydroxy-phenyl)-acet-aldehyd	Tyrosinol	(4-Hydroxy-phenyl)-essig-säure	[25]
Tryptophan	(3-Indolyl)-pyruvat	3-(Indolyl)-acetaldehyd	Tryptophol	(3-Indolyl)-essigsäure (Auxin)	[26]
Methionin	2-Keto-4-methyl-thiobuttersäure	Methional	Methionol	3-(Methylthio)-propionsäure	[27]



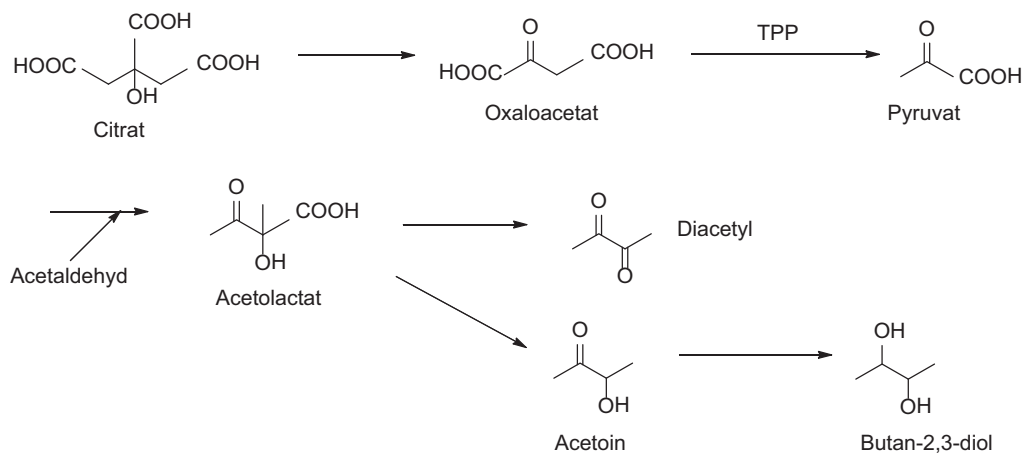
Schema 4. Ehrlich-Abbau von Aminosäuren: Gene, die die Enzyme kodieren, sind kursiv angegeben (nach Lit. [25]).

wir diese für den untypischen Alterston (UTA) des Weins verantwortliche Komponente [11]. Die Aminosäure Methionin gibt bei der Milchsäuregärung zur Produktion von flüchtigen Schwefelverbindungen Anlass. Neben den klassischen Aminosäureabbauprodukten Methionol, Methional und 3-(Methylmercapto)propionsäure (Tabelle 2) werden die Böckser verursachenden leichtflüchtigen

Schwefelverbindungen Methylmercaptan und dessen Oxidationsprodukt Dimethyldisulfid gebildet.

Fuselalkohole aus der Biosynthese pyruvatogener Aminosäuren

Es sei darauf hingewiesen, dass diese aromabildenden Zwischenprodukte nicht unbedingt aus



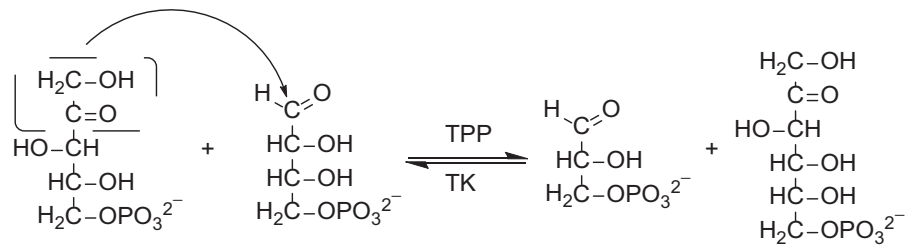
Schema 6. Citrat-Abbau in der malolaktischen Gärung.

zweite wichtige mikrobiologische Prozess bei der Weinbereitung und gleichzeitig einer der schwierigsten [33]. Er wird von Milchsäurebakterien der Gattungen *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* und *Leuconococcus* durchgeführt. Malolaktische Gärung ist definiert als die Umwandlung von Äpfelsäure in Milchsäure und Kohlendioxid. Neben der gewünschten „biologischen“ Entsäuerung (die zweibasische Äpfelsäure wird in die einbasische Milchsäure überführt) trägt sie zur mikrobiologischen Stabilität des Weins bei und führt auch zu einer Veränderung des Aromaprofils [34].

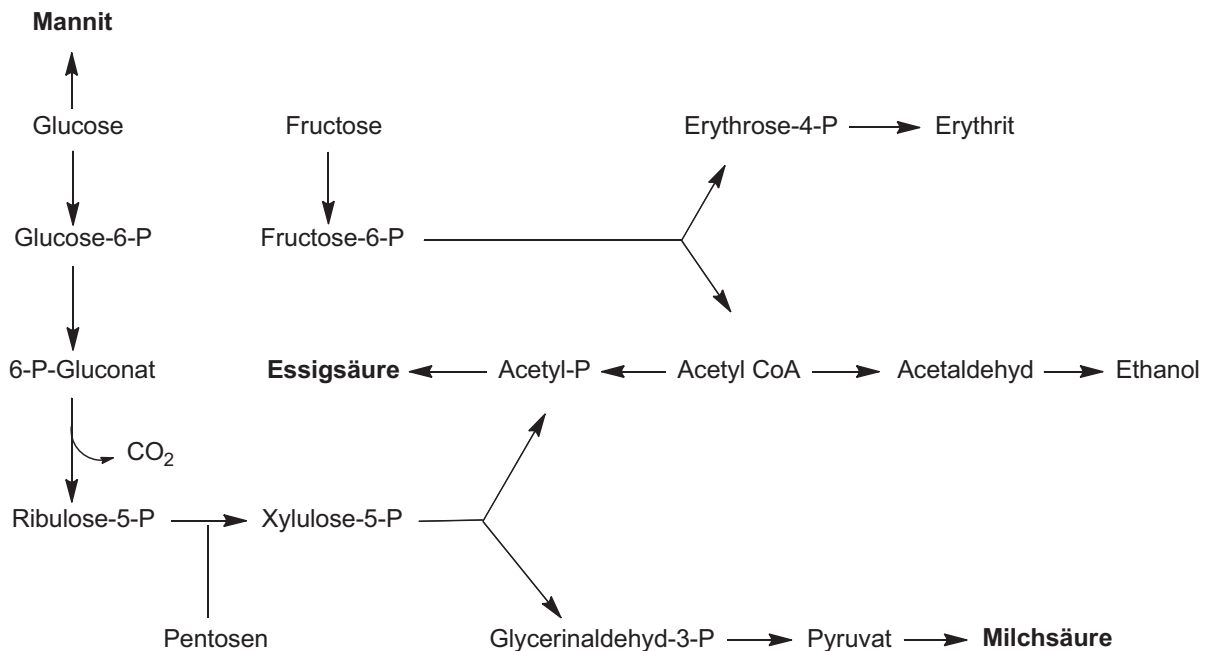
Milchsäurebakterien sind also auf zwei Wegen an der Aromaprofilbildung des Weins beteiligt: Durch heterofermentativen Glucoseabbau, vor allem bei Weinen, die noch Restzucker enthalten und meist in einem mikrobiellen Weinverderb enden, und durch biologischen Äpfelsäureabbau, wobei die metabolischen Nebenprodukte meist zu einem positiven Geruchs- und Geschmacksprofil des Weins beitragen. Bei der malolaktischen Gärung wird nicht nur Äpfelsäure sondern auch Zitronensäure metabolisiert. Als eines der wichtigsten Zwischenprodukte tritt dabei das Diacetyl auf, das als bedeutendster Aromastoff der malolaktischen Gärung angesehen wird. Wenn dessen Gehalt über der Wahrnehmungsschwelle (0,9 mg/L) liegt, werden dem Wein buttrige oder nussige Aromen zugeschrieben [35].

Die Acylgruppen-übertragenden Eigenschaften des Thiaminpyrophosphats werden also sowohl bei der heterofermentativen Milchsäuregärung (im Pentosephosphatzyclus) als auch in Nebenreaktionen der bei der malolaktischen Fermentation eingesetzten Milchsäurebakterien (siehe Diacetylbildung beim Zitronensäureabbau, Schema 6) genutzt. Bei der heterofermentativen Milchsäuregärung, bekannt als alternativer Stoffwechselweg beim Glucoseabbau, reagiert Thiaminpyrophosphat (TPP) als Coenzym einer Acyltransferase (Transketolase \rightarrow TK) mit Xylulose-5-phosphat (Schema 7). Das gebildete Addukt, eine an Thiamin gebundene C_2 -Einheit, wird auf einen „Viererrzucker“ (Erythrose-4-phosphat) unter Bildung von Fructose-6-phosphat übertragen. Diese C_2 -Einheit, die man in Analogie zum aktivierten Acetaldehyd auch als aktivierten Glykolaldehyd bezeichnen kann, spielt auch in anderen Transketolase-Reaktionen des Pentosephosphatcyclus eine wichtige Rolle. Der heterofermentative Zuckerabbau in Milchsäurebakterien hat die Bildung von weinschädlichen Stoffen zur Folge, allen voran Essigsäure.

Auch wenn es für die Bildung von Essigsäure andere Ursachen (Essigsäurebakterien, wilde Hefen) geben kann, ist die häufigste die durch Milchsäurebakterien verursachte. Überschreitet der Essigsäuregehalt (praktisch identisch mit flüchtiger Säure) bestimmte Werte ($1,08 \text{ g L}^{-1}$ bei Weißwein, $1,2 \text{ g L}^{-1}$



Schema 7. Die Rolle des Thiaminpyrophosphats im Pentosephosphatcyclus.

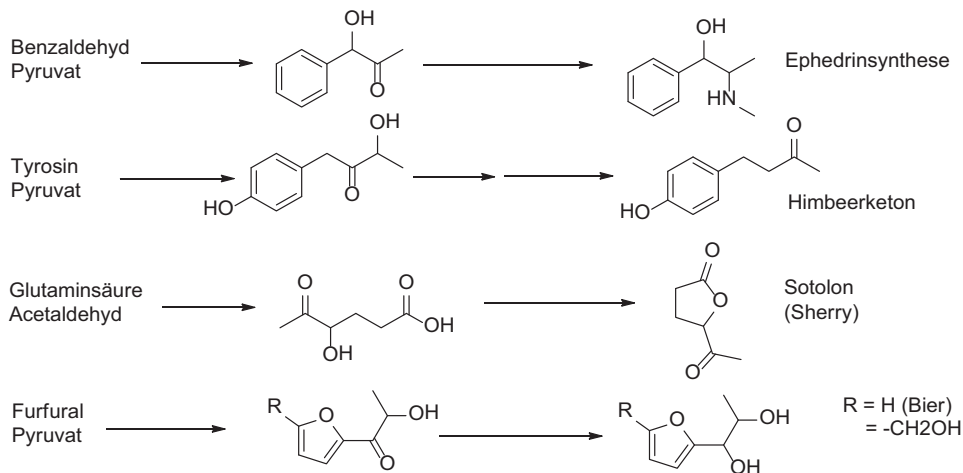


Schema 8. Heterofermentative Milchsäuregärung durch *Oenococcus oeni* in Jungwein und Most. Die zu Weinfehler führenden Produkte sind hervorgehoben (Quelle: Lit. [36]).

bei Rotwein), so darf der Wein nicht in Verkehr gebracht werden. Weine mit diesen Essigsäurekonzentrationen sind aber bereits ungenießbar. Eine zusätzliche Gefahr besteht auch noch durch die Bildung von Ethylacetat, das als Ursache eines weiteren Weinfehlers, des Lösungsmitteltons, verantwortlich ist. Die durch Essigsäure hervorgerufene Geschmacksbeeinflussung gehört zu den häufigsten und folgenschwersten Weinfehlern und ist nicht mehr zu beheben. Auch die bei der heterofermentativen Milchsäuregärung anfallenden Nebenprodukte Mannit und Milchsäure sind Ursache für die häufigen Weinfehler Mannit- bzw. Milchsäurestich (Schema 8) [36].

Thiaminpyrophosphat und Acyloinkondensationen

Wie schon weiter oben erwähnt, bestimmt das Schicksal des primären Additionsprodukts „aktiver Aldehyd“ die Gesamtaktivität des ThPP-abhängigen Enzyms. In Gegenwart eines zweiten Aldehyds oder anderer Carbonylkomponenten, oder bei Akkumulation von großen Produktmengen, kann eine C–C-Bindungsknüpfung (Carboligation) stattfinden. Diese Reaktion liefert chirale 2-Hydroxyketone, die als vielfältig verwendbare Synthesebausteine das breite Interesse an diesen enzymatischen Reaktionen begründeten. In der Tat gehört die enzymatische Synthese der



Schema 10. Durch Thiaminpyrophosphat katalysierte Acylolins-Kondensationen.

Ephedrinvorstufe *R*-Phenylacetylcarbinol (1-Phenyl-1-hydroxypropan-2-on) aus Benzaldehyd (Schema 10) zu den ersten industriell durchgeführten Biotransformationen [7].

Auch bei der Biosynthese von Aromavorstufen in Wein und anderen alkoholischen Getränken spielen Thiamin-abhängige Carboligasereaktionen eine nicht unerhebliche Rolle. Wir sind ihnen weiter oben schon begegnet, z.B. bei der Biosynthese von 2-Ketoisovalerat und 2-Ketoisocapronat als Vorstufen der Fuselalkohole Isobutanol und Isoamylalkohol oder bei der Bildung von Acetoin und Diacetyl während der Milchsäuregärung. In Riesling-Wein wurde ein weiteres Acylolinkondensationsprodukt bereits 1966 isoliert, aber nicht identifiziert. Dies gelang dann später Sakato aus Carignan-Wein, der ihm die Struktur des 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon zuordnete, eine Verbindung mit stark blumigem Geruch [37]. Beim Bier wurde 1-(2-Furyl)propan-1,2-diol als Fermentationsprodukt in Mengen bis zu 135 ppb nachgewiesen [38]. Es handelt sich dabei um das reduzierte Kondensationsprodukt aus aktivem Acetaldehyd und dem im Bier reichlich vorhandenen Furfural. Es bleibt zu klären, ob etwas Ähnliches in Weinen, die aus hoherhitzen Mosten hergestellt wurden, zu finden ist. Letztere bilden beim Erhitzen Spuren von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), das dann in analoger Weise zum 1-(5-Hydroxymethyl)-2-furyl-1,2-propandiol verstoffwechselt werden könnte. Weitere Aromastoffe, die über enzymatische Acylolinkon-

densationen gebildet werden, sind das im Sherry vorkommende Sotolon [39], das aus Glutaminsäure über Succinaldehyd gebildet wird, und das „Himbeerketon“ aus Tyrosin [23]. Schema 10 fasst einige der hier erwähnten Acylolins zusammen.

Schlussbetrachtungen und Ausblick

Die vielseitigen biochemischen Eigenschaften Thiamin-abhängiger Enzyme als Acylgruppen-übertragende Spezies spielen auch bei der Aromabildung im Wein und anderen alkoholischen Getränken eine wichtige Rolle. Die bei der Weinbereitung eingesetzten Mikroorganismen (Weinhefen und Milchsäurebakterien) weisen bei unterschiedlichen Arten unterschiedliche Enzym- und damit Genausstattungen auf, die allein schon bei der Wahl des eingesetzten Mikroorganismus eine Variation des Aromaprofils ermöglichen. Grundsätzlich sollte es dann auch möglich sein, durch gentechnische Veränderungen die Bildung von aromawirksamen Verbindungen zu steuern und Fehlparfums zu vermeiden. Wie der heftig geführte Glaubenskrieg um die Frage Spontangärung oder Reinzuchtheffen aber schon zeigt, sind wir von einer solchen Vorgehensweise noch weit entfernt, zumal Verbraucher, Erzeuger und Gesetzgeber eindeutig eine solche Entwicklung ablehnen. Es sollte aber schon ausreichen, durch Aufklärung der Genome Rüstzeug für die Auswahl der geeigneten Mikroorganismen bereit zu stellen.

- [1] R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3719–3726.
- [2] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, 7. dt. Auflage, Springer, Berlin, **2012**.
- [3] T. P. Begley, *Nat. Prod. Rep.* **1996**, 1777–185.
- [4] S. Mizuhara, R. Tamura, H. Arata, *Proc. Jpn. Acad.* **1951**, *27*, 302–308.
- [5] D. Enders, O. Niemeier, A. Henseler, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5606–5655.
- [6] K. Freko, M. Gruber-Khadjawi, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1248–1272.
- [7] G. Hildebrandt, W. Klavehn (Knoll AG), DE Patent 548459, **1930**.
- [8] D. Enders, T. Balensiefer, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 534–541.
- [9] T. Okano, *Heterocycl. Commun.* **2013**, *19*, 311–326.
- [10] J. Moreno, R. Peinado, *Enological Chemistry*, Elsevier, Oxford, **2012**, pp. 51.
- [11] E. Lemperle, *Weinfehler erkennen*, Eugen Ulmer, Stuttgart, **2007**, pp. 60–65.
- [12] M. Darting, *Sensorik – Für Praktiker und Geniesser*, Eugen Ulmer, Stuttgart, **2009**.
- [13] L. F. Bisson, J. E. Karpel, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2010**, 139–162.
- [14] V. Schneider, *Die Winzer-Zeitung*, **2005**, 34–37.
- [15] R. G. Duggleby, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 550–557.
- [16] F. H. Andrews, M. J. Mc Leish, *Bioorg. Chem.* **2012**, *43*, 26–36.
- [17] I. Schomburg, A. Chang, S. Placzek, C. Söhngen, M. Rother, M. Lang, C. Munaretto, S. Ulas, M. Stelzer, A. Grote, M. Scheer, D. Schomburg, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 764–772.
- [18] www.brenda-enzymes.org.
- [19] J. Crosby, G. E. Lienhard, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5707–5716.
- [20] Y. Kageyama, S. Murata, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3140–3147.
- [21] B. A. Smit, W. J. M. Engels, G. Smit, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *81*, 987–999.
- [22] S. Derrick, P. J. Large, *J. Gen. Microbiol.* **1993**, *139*, 2783–2792.
- [23] U. Richter, Dissertation, Universität Hannover, Hannover **1998**.
- [24] J. Garavaglia, S. H. Flores, T. M. Pizzolato, M. do Carmo Peralta, M. A. Z. Ayub, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *23*, 1273–1279.
- [25] L. A. Hazelwood, J.-M. Daran, A. J. A. van Maris, J. T. Pronk, J. R. Dickinson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2259–2266.
- [26] A. Schütz, R. Golbik, S. König, G. Hübner, K. Tittmann, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6164–6179.
- [27] A. Vallet, P. Lucas, A. Lonvaud-Funet, G. de Revel, *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104*, 1833–1840.
- [28] M. S. Pérez-Coello, M. A. González-Viñas, E. García-Romero, M. C. Díaz-Marato, M. D. Cabezudo, *Food Control* **2003**, *14*, 301–306.
- [29] D. D. Ramey, C. S. Ough, *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 928–934.
- [30] V. M. Boer, S. L. Thai, Z. Vuralhan, Y. Arifin, M. C. Walsh, M. D. W. Piper, J. H. de Winde, J. T. Pronk, J.-M. Daran, *FEMS Yeast Res.* **2007**, *7*, 604–620.
- [31] Z. Vuralhan, M. A. Moraes, S.-I. Tai, M. D. W. Piper, J. T. Pronk, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 4534–4541.
- [32] J. R. Dickinson, S. J. Harrison, M. J. E. Hewlins, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25751–25756.
- [33] J. C. Nielsen, M. Richelieu, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 740–745.
- [34] J. H. Swiegers, E. J. Bartowsky, P. A. Henschke, I. S. Pretorius, *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 139–173.
- [35] M. H. Laurent, T. Hendrick-Kling, T. E. Acrea, *Wein-Wiss.* **1994**, *49*, 3–10.
- [36] H. H. Dittrich, M. Großmann, *Mikrobiologie des Weines*, Eugen Ulmer, Stuttgart, **2010**, pp. 208–228.
- [37] K. H. Sakato, M. Hoekmann, R. E. Kepner, A. D. Webb, C. Müller, *Am. J. Enol. Vitic.* **1975**, *26*, 70–74.
- [38] N. Mochizuki, K. Kitabatake, *J. Ferment. Bioeng.* **1997**, *83*, 401–403.
- [39] M. Beigi, S. Loschonsky, P. Lehwald, V. Brecht, S. L. A. Andrade, F. J. Leeper, W. Hummel, M. Müller, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 252–256.