

Untersuchungen zur Bildung von 2-Aminoacetophenon im Wein und Entstehung der ‚Untypischen Alterungsnote‘ (UTA)

Investigation on the formation of 2-aminoacetophenone in wine and the
development of an ‘untypical aging-off flavour’ (UTA)

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

aus dem Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
- Abteilung Lebensmittelchemie -
der Universität Hamburg



vorgelegt von



Katrin Hoenicke

aus Osterholz-Scharmbeck

Hamburg 2002

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis September 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie – Abteilung für Lebensmittelchemie – angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernward Bisping

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 20.12.2002

Meinen Eltern

DANKSAGUNGEN

Für die vielseitige Unterstützung, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit zuteil wurde, bedanke ich mich ganz herzlich. Mein Dank gilt insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. B. Bisping für die Übernahme des Koreferates.

Ganz besonders danke ich Dr. Thomas Simat für die wissenschaftliche Betreuung und die hervorragende Zusammenarbeit.

Ole Borchert, Kai Grüning, Sandra Meixner und Stefan Girndt für ihr Engagement und ihrer großartige Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Tryptophan“ für die gute und kollegiale Zusammenarbeit.

Den Mitarbeitern der Bayerischen Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau in Würzburg, insbesondere Herrn Dr. M. Geßner, Herrn H. J. Köhler, Herrn Dr. A. Schwab, Herrn Dr. A. Schmitt, Frau E. Schindler und Herrn Dr. R. Miltenberger für die Bereitstellung der Most- und Weinproben sowie für ihre Unterstützung bei der Durchführung von Gärversuchen.

Herrn Dr. N. Christoph (Bayerisches Landessamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Würzburg) für die konstruktive Zusammenarbeit und die Durchführung der AAP-Analytik.

Dem Fränkischen Weinbauring und dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. für die finanzielle Unterstützung

Ein ganz besonderer Dank gilt Kai Endler, der mich während meiner gesamten Promotionszeit unterstützt hat und immer an mich geglaubt hat.

Herzlichster Dank gebührt meinen Eltern für ihre jahrelange großartige Unterstützung.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAP	2-Aminoacetophenon
ABTS	2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat
APDB	4-(2-Aminophenyl)-2,4-dioxobutansäure
DAP	Diammoniumphosphat
DiOxIAA	(3-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydroindol)-3-essigsäure
DMPD	<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -phenylenediamindihydrochlorid
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin- <i>N</i> -oxid
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazin
EPR	Elektronenparamagnetische Resonanz
FAP	<i>N</i> -Formylaminoacetophenon
FAPOP	3-(2-Formylaminophenyl)-3-oxopropionsäure
GAP	General Amino acid Permease
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IAA	Indol-3-essigsäure
IAA-HSO ₃	(2-Sulfoindol)-3-essigsäure
IAld	Indol-3-aldehyd
ILA	Indol-3-milchsäure
Kyn	Kynurenin
LDL	Low Density Lipoprotein
MS	Mass Selective
MTHCC	1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NFK	<i>N</i> -Formylkynurenin
OxIAA	(2-Oxo-2,3-dihydroindol)-3-essigsäure

TAS	Total Antioxidative Status
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidative Capacity
TOH	Tryptophol
TRAP	Total Radical Trapping Antioxidant Parameter
Trp	Tryptophan
UTA	„Untypische Alterungsnote“
UV	Ultra Violett
XOD	Xanthinoxidase

VERWENDETE GEFAHRSTOFFE

ABTS		R: 36/37/38; S: 26-36
Acetonitril	T, F	R: 11-23/24/25; S: 16-27-45
Äpfelsäure	Xn	22-37/38-41; S: 26-36
Ameisensäure, 98-100%	C	R: 35; S: 23.2-26-45
2-Aminoacetophenon	Xn	R: 20/21/22-36/37/38; S: 26-36
Ammoniak, 25%	C, N	R: 34-50; S: 26-36/37/39-45-61
<i>di</i> -Ammoniumphosphat	Xi	R: 36/37/38; S: 26-36
Anthranilsäure	Xn	R: 22-36/37/38; S: 26-36
<i>N</i> -Bromsuccinimid	Xn	R: 22-36/37/38; S: 26-36
<i>t</i> -Butanol	F, Xn	R: 11-20; S: 59-16
Calciumchlorid	Xi	R: 36; S: 22-24
Chloroform	Xn	R: 22-38-40-48/20/22; S: 36/37
Chloroform-d ₁	Xn	R: 22-38-40-48/20/22; S: 36/37
Diethylether	F ⁺	R: 12, 19; S: 9-16-29-33
Diethyloxalat	Xn	R: 20/21/22; S: 26-36
Dimethylformamid	T	R: 61-E20/21-36; S: 53-45
Dimethylsulfoxid	Xi	R: 36/38; S: 26
Dimethylsulfoxid-d ₆	Xi	R: 36/38; S: 26
Eisen(II)-sulfat	Xn	R: 22; S: 24/25
Essigsäure, 100%	C	R: 10-35; S: 23.2-26-45
Ethanol, 96%	F	R: 11; S: 7-16
Ethylacetat	F	R: 11; S: 16-23.2-29-33
Kaliumhydroxid	C	R: 35; S: 26-37/39-45
Kaliumphosphat	Xi	R: 36/38

Kaliumpyrosulfit	Xn	R: 20/21/22-36/37/38; S: 26-36
Kaliumsuperoxid	O, C	R: 8-35; S: 8-27-36/37/39-45
Kynuramin	Xi	S: 22-24/25
Kynurenin	Xi	S: 22-24/25
Kynurensäure	Xi	R: 36/37/38; S: 26-36
Methanol	F, T	R: 11-23/25; S: 27-16-24
Natrimdodecylsulfat	Xn	R: 22-36/38
Natriumethylat	F, C	R: 11-14-34; S: 8-16-26-43-45
Natriumhydrogencarbonat	Xi	R: 36; S: 22-26
Natriumhydroxid	C	R: 35; S: 26-37/39-45
<i>o</i> -Nitroacetophenon	Xn	R: 20/21/22; S: 36
Phosphorsäure, 85%	C	R: 34; S: 26-36/37/39-45
Palladium (10%)-Kohle	F, Xi	R: 11-36/37/38; S: 16-33-26-7/9
Salzsäure, 37%	C	R: 34-37; S: 26-36/37/39-45
Skatol		R: 36/37/38; S: 26-36
Tetrahydrofuran	F, Xi	R: 11-19-36/37; S: 16-29-33
Toluol	F, Xn	R: 11-20; S: 16-25-29-33
Triethylamin	F, Xi	11-36/37; 16-26-29
Trifluoressigsäure	C	R:20-35; S: 9-26-27-28.1-45
Tryptophan		S: 22-24/25
Wasserstoffperoxid, 30%	C	R: 34; S: 3-26-36/37/39-45
Wasserstoff	F ⁺	R: 12; S: 9-16-33
Weinsäure	Xi	R: 36; S: 24/25

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Die ‚Untypische Alterungsnote‘	1
1.2	Mögliche Bildungswege von 2-Aminoacetophenon	4
1.3	Metabolismus von Tryptophan.....	5
1.3.1	<i>Biotischer Mechanismus: Bildung von AAP durch Saccharomyces spp. während der alkoholischen Gärung.....</i>	<i>8</i>
1.3.2	<i>Abiotischer Mechanismus: Bildung von AAP nach der alkoholischen Gärung</i>	<i>8</i>
1.4	Bedeutung des Tryptophan-Metaboliten Kynurenin.....	9
1.5	Bedeutung des Pflanzenhormons Indoleessigsäure	10
1.6	Rolle von Antioxidantien	11
1.7	Identifizierung von Tryptophan und Tryptophan-Metaboliten in Mosten und Weinen und Messung der antioxidativen Kapazität.....	12
1.7.1	<i>Techniken zur Identifizierung von Tryptophan und Tryptophan-Metaboliten....</i>	<i>12</i>
1.7.2	<i>Techniken zur Messung der antioxidativen Kapazität</i>	<i>13</i>
2	PROBLEMSTELLUNG	14
2.1	Aufklärung des Bildungsmechanismus von 2-Aminoacetophenon	14
2.2	Validierung verschiedener Testverfahren zur Beurteilung des UTA-Potentials von Mosten und Weinen.....	15
2.3	Untersuchung des Einflusses verschiedener weinbaulicher und kellerwirtschaftlicher Maßnahmen	15

3 PUBLIKATIONEN.....	16
3.1 Bildungsmechanismus von 2-Aminoacetophenon	16
3.1.1 <i>Off-Flavor Compounds in Wine and other Food Products Formed by Enzymatical, Physical, and Chemical Degradation of Tryptophan and its Metabolites.....</i>	<i>16</i>
3.1.2 <i>‘Untypical Aging Off-Flavor’ in Wine: Synthesis of Potential Degradation Compounds of Indole-3-acetic Acid and Kynurenine and their Evaluation as Precursors of 2-Aminoacetophenone</i>	<i>27</i>
3.1.3 <i>‘Untypical aging off-flavor’ in wine: formation of 2-aminoacetophenone and evaluation of its influencing factors.....</i>	<i>34</i>
3.2 Identifizierung von Tryptophan und Tryptophan-Metaboliten	43
3.2.1 <i>Determination of Tryptophan and Tryptophan Metabolites in Grape Must and Wine</i>	<i>43</i>
3.2.2 <i>Determination of Free and Conjugated Indole-3-Acetic Acid, Tryptophan, and Tryptophan Metabolites in Grape Must and Wine</i>	<i>50</i>
3.3 Einfluss weinbaulicher und kellerwirtschaftlicher Maßnahmen	58
3.3.1 <i>Indolessigsäure in Mosten und Weinen – Bedeutung hinsichtlich der Ausbildung einer „Untypischen Alterungsnote“ (UTA) in Wein.....</i>	<i>58</i>
3.3.2 <i>Metabolism of Tryptophan and Indole-3-acetic Acid Formation During Vinification.....</i>	<i>66</i>
3.3.3 <i>Mögliche Ursachen der Entstehung einer „Untypischen Alterungsnote“ (UTA) im Wein</i>	<i>75</i>

4	DISKUSSION	80
4.1	Aufklärung des Bildungsmechanismus von 2-Aminoacetophenon	80
4.1.1	<i>Synthese und Identifizierung möglicher Intermediärprodukte</i>	<i>80</i>
4.1.2	<i>Untersuchungen zur fermentativen Bildung von 2-Aminoacetophenon</i>	<i>82</i>
4.1.3	<i>Untersuchungen zur physikalisch-chemischen Bildung von 2-Aminoaceto- phenon.....</i>	<i>83</i>
4.2	Testverfahren zur Beurteilung des UTA-Potentials von Mosten und Weinen.....	85
4.2.1	<i>Identifizierung von Tryptophan und Tryptophan-Metaboliten</i>	<i>85</i>
4.2.2	<i>Verfahren zur Messung der antioxidativen Kapazität von Weinen</i>	<i>87</i>
4.3	Einfluss weinbaulicher und kellerwirtschaftlicher Maßnahmen hinsichtlich der Entstehung einer UTA.....	89
4.3.1	<i>Einfluss weinbaulicher Maßnahmen</i>	<i>90</i>
4.3.2	<i>Einfluss kellerwirtschaftlicher Maßnahmen</i>	<i>95</i>
4.4	Fazit: Ursachen der Entstehung einer UTA.....	101
5	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	104
6	LITERATUR.....	109
7	ANHANG	120
7.1	Publikationen und Vorträge.....	120
7.2	Lebenslauf	124

1 EINLEITUNG

1.1 Die ‚Untypische Alterungsnote‘

Im Verlauf der normalen Weinlagerung tritt eine natürliche Reife und Alterung ein, welche das Aroma positiv verändern kann. In Abhängigkeit von den Weinhaltstoffen und den Lagerbedingungen laufen diese Prozesse unterschiedlich schnell ab. Bei der ‚Untypischen Alterungsnote‘ (UTA) handelt es sich dagegen um eine negative Veränderung des Weinbuketts, die im Gegensatz zur typischen Alterung teilweise schon im Jungweinstadium, meist jedoch innerhalb eines Jahres nach Gärabschluss auftritt. Diese negative Veränderung wurde in Deutschland vermehrt ab dem Jahrgang 1988 bei Weißweinen (*Vitis vinifera*) beobachtet und führte in den darauffolgenden Jahren bei den amtlichen Qualitätsweinprüfungen in allen deutschen Weinanbaugebieten zunehmend zu Beanstandungen. So wurden 1994 in Franken und Baden etwa 21% der beanstandeten Weißweine aufgrund einer UTA abgelehnt (CHRISTOPH et al., 1995). 1999 lag die Ablehnungsquote in Unterfranken sogar bei 37.5% (Quelle: Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayerns, Würzburg, Germany). Sensorisch wird die UTA mit Begriffen wie ‚nasser Lappen‘, ‚Naphthalinnote‘, ‚Hybridton‘, ‚Bohnerwachs‘, ‚Fuselalkohol‘ oder ‚Blütenaroma‘ beschrieben. Besonders häufig tritt sie in Jahren mit hoher Sonneneinstrahlung und geringen Niederschlägen auf, so dass insbesondere ein Trockenstress der Reben als Ursache für die Entstehung einer UTA angenommen wird (CHRISTOPH et al., 1995). Auch aus anderen weinbautreibenden Ländern, wie Italien, Frankreich, Ungarn und Griechenland, wurde von ähnlichen Fehlparfums in Weißweinen berichtet (RAPP und VERSINI, 1995).

In einem Wein mit extremer UTA wurde von RAPP et al. (1993) die Aromakomponente 2-Aminoacetophenon (AAP) identifiziert. Während ihre Schwellenkonzentration zur geruchlichen und geschmacklichen Wahrnehmung in wässrigen Lösungen bei 0.2 µg/L liegt, trägt die Aromafülle eines Weines zu einer größeren Variationsbreite und Erhöhung des Schwellenwertes auf 0.5-1.5 µg/L bei (CHRISTOPH et al., 1995). Durch Dotierungen von AAP zu UTA-unauffälligen Weinen konnten CHRISTOPH et al. (1995) zeigen, dass AAP als eine wesentliche, die UTA verursachende Substanz angesehen werden kann. Zwischen ihrem Gehalt und der Intensität einer UTA stellten sie eine hochsignifikante Korrelation fest. Da sich jedoch der für eine UTA typische Geruchs- und Geschmackseindruck erst durch das Zusammenwirken von AAP mit anderen

Weininhaltsstoffen ausbildet, ist noch nicht endgültig geklärt, ob neben AAP auch andere aromawirksame Verbindungen zur Ausbildung des Fehl aromas beitragen. Dotierungen von Weißweinen mit aromaaktiven Substanzen wie Indol oder Guajakol zeigten keine UTA-typischen sensorischen Merkmale (GEBNER et al., 1995).

Die wertbestimmenden Inhaltsstoffe eines Weines und deren Zusammensetzung werden von verschiedenen biologischen und physikalisch-chemischen Faktoren beeinflusst (Abb. 1). Im Zusammenhang mit dem Auftreten der UTA werden sowohl weinbauliche als auch kellerwirtschaftliche und mikrobiologische Einflüsse diskutiert.

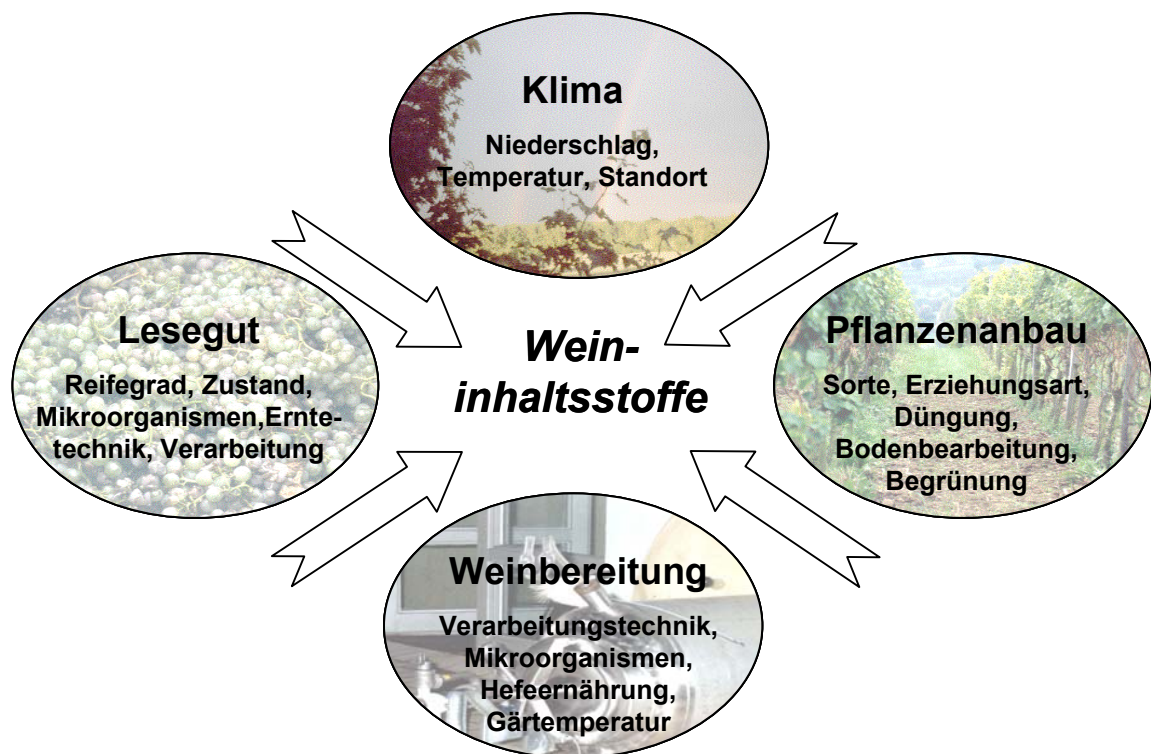


Abb. 1: Einflussfaktoren für die Inhaltsstoffe eines Weines und die Ausbildung des Weinaromas

Nachdem 1987 und 1988 die zu diesem Zeitpunkt noch mit dem Begriff ‚Naphtalinton‘ bezeichnete Fehlnote erstmals im größeren Umfang in Weinen auftrat, wurden zunächst Pestizide als Verursacher angenommen. Der Zusatz bestimmter Pflanzenschutzmittel zum Most führte zwar zu ähnlichen Fehlnoten im Wein, jedoch zeigten im Anschluss durchgeführte Feldversuche, in denen verschiedene üblicherweise im Weinbau verwendete Pestizide in höheren Dosen appliziert wurden, keinen Einfluss (SCHWAB et al., 1996).

Als Ursache für das Auftreten einer UTA gelten heutzutage Stresssituationen im Weinbau infolge von Wassermangel, mangelndem Stickstoffangebot und hoher Ertragsbelastung. Breitgestreute sensorische Untersuchungen ließen erkennen, dass eine UTA, in Abhängigkeit von den klimatischen Verhältnissen eines Jahres, vor allem in trocken-gestressten Anlagen mit hohen Erträgen, flachgründigen Böden und bei frühen Lesen auftritt (KÖHLER et al., 1995; RAPP und VERSINI, 1995; LÖHNERTZ, 1996; SCHWAB et al., 1996). Nach SCHWAB et al. (1999) führt insbesondere die Kombination aus früher Lese und hohem Ertrag zur Ausbildung einer UTA.

Zur Verringerung des UTA-Potentials von Weinen sind nach SCHWAB et al. (1996) verschiedene präventive Maßnahmen wie Qualitätsanschnitt, Ausdünnungen und Entblätterungen der Reben sinnvoll. Zudem sind langfristige Verbesserungen der Wasserspeicherkapazität des Bodens durch Humuszufuhr, gezielte Bodenlockerungen, die biologische Stabilisierung des Porenvolumens durch zeitliche Begrünungen sowie die Beseitigung von Wasserkonkurrenten (Dauerbegrünungen) zweckmäßig.

Die kellerwirtschaftlichen Möglichkeiten zur Reduzierung einer UTA sind nach KÖHLER et al. (1996) sehr begrenzt. Den Autoren zufolge haben weder eine Mostoxidation, Enzymbehandlungen bei Mosten, Klär- und Filtrationsverfahren noch ein Zusatz des Hefenährsalzes Diammoniumphosphat (DAP) einen nennenswerten Einfluss. Lediglich eine kontrollierte Vergärung bei niedrigen Temperaturen wirkt der Ausbildung einer UTA entgegen. Durch die Verwendung bestimmter Trockenreinzuchthefen, welche verstärkt fruchtige Aromen bilden, kann das Auftreten einer UTA zwar verzögert, aber nicht vollständig verhindert werden. Von einem möglichen Einfluss der Hefen berichten auch HÜHN et al. (1996). Den Autoren zufolge kann durch bestimmte Hefen der Spontanflora (*Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*) vermehrt AAP gebildet werden.

Bei Rotweinen wurde bisher noch keine UTA festgestellt. Vergleichbares trifft auch für Weißweine aus Pressmost zu (letzte 10% der Kelterung). Solche Weine zeichnen sich allerdings durch nicht akzeptable, rebsortenuntypische Aromen aus, bei denen Gerbstoffnoten im Vordergrund stehen. Der Grund für das Ausbleiben einer UTA in Weinen aus Pressmost und in Rotweinen kann in dem deutlich erhöhten Gehalt an phenolischen Substanzen gesehen werden. So konnten GEBNER et al. (1999) zeigen, dass durch Zusatz von Trester oder antioxidativ wirksamen Substanzen (Ascorbinsäure, Kaffeesäure) zu UTA-gefährdeten Weinen, die Ausbildung des Fehleromas unterbunden werden kann.

1.2 Mögliche Bildungswege von 2-Aminoacetophenon

Über die Vorstufen und genauen Reaktionswege der AAP-Bildung im Wein liegen bislang keine gesicherten Ergebnisse vor. In der Traube liegt die native AAP-Konzentration in der Regel unterhalb von 0.2 µg/L (RAPP et al., 1995). Lediglich in den Beeren der Amerikanerrebe *V. labruscana* und ihren interspezifischen Kreuzungen wurde AAP als Bestandteil des für diese Weine typischen hybridartigen Aromas in Konzentrationen von 0.3 µg/L nachgewiesen (ACREE et al., 1990). Bei Weinen von *V. vinifera* Rebsorten ist nach RAPP und VERSINI (1995) ein AAP-Grundgehalt von 0.02-0.3 µg/L vorhanden.

Die Veränderungen, die stattfinden müssen, um aus den Trauben einen trinkfertigen Wein zu erhalten, sind sehr komplex. Dabei laufen sowohl biotische (durch Mikroorganismen) als auch abiotische (durch physikalisch-chemische Einflüsse) Umsetzungen ab. Abiotische Faktoren spielen hauptsächlich für die Aromenbildung und -veränderung während der Verarbeitung und Lagerung eine Rolle. Als die bedeutendste und folgenschwerste Phase der Weinbereitung kann die Gärung angesehen werden. Sie ist ein relativ gut bekannter Stoffwechselprozess, an dem viele Mikroorganismen, vor allem aber Hefen beteiligt sind. Der hierbei wichtigste Vorgang ist der Abbau von Zuckern zu Alkohol und Kohlendioxid. Daneben laufen eine Vielzahl weiterer Stoffwechselvorgänge ab. So können während der Gärung, die kein jeweils gleichverlaufender Prozess ist, je nach Bedingungen unterschiedlichste Mengen verschiedener Verbindungen gebildet werden.

AAP selbst wurde außer im Wein auch als Fehlaroma verursachende Komponente in anderen Lebensmitteln wie Kondensmilch, Käse, Milchkasein und Milchpulver sowie in Mais-Knabbergebäcken (Tortilla-Chips) und in Bier nachgewiesen (ARNOLD und LINDSAY, 1969; PALAMAND und GRIGSBY, 1974; WALKER und MANNING, 1976; BUTTERY und LING, 1995).

Im Stoffwechsel von Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren und Menschen wird die Bildung von AAP aus der Aminosäure Tryptophan (Trp) diskutiert (MANN, 1967; KOCHEN et al., 1975; COX und PARKER, 1979; LUCKNER, 1990). MANN (1967) beschreibt einen Abbau des Trp durch verschiedene *Pseudomonas*-Arten über *N*-Formylkynurenin (NFK) und *N*-Formylaminoacetophenon (FAP) zu AAP. KOCHEN et al. (1975), die AAP im Harn von Patienten mit der Stoffwechselkrankheit Phenylketonurie nachweisen konnten, postulieren ebenfalls einen enzymatischen Abbau des Trp über NFK und Kynurenin (Kyn) zu AAP. FRYDMAN et al. (1971) beschreiben eine enzymatische Bildung von AAP aus Abbau

produkten des Trp. Aus Weizenkeimlingen sowie aus der Leber und dem Gehirn von Ratten extrahierten sie eine Gruppe von Enzymen, sogenannte Pyrroloxygenasen, die sowohl 3-Methylindol (Skatol) als auch Indol-3-essigsäure (IAA) zu FAP und AAP umsetzen. Die Biosynthese von AAP aus Kyn beschreiben KASEDA et al. (1973), wobei Kyn zunächst enzymatisch zu Kynuramin decarboxyliert und anschließend nicht-enzymatisch zu AAP umgesetzt wird.

1.3 Metabolismus von Tryptophan

Aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur und der bekannten Stoffwechselwege wird Trp als primäre Vorstufe bei der Bildung von AAP diskutiert. RAPP et al. (1995) stellten in verschiedenen Gärversuchen fest, dass bei Zugabe von Trp als einziger Stickstoffquelle die höchsten AAP-Mengen gebildet werden.

Die für Mensch und Tier essentielle Aminosäure Trp zählt aufgrund ihres komplexen Metabolismus und der Vielfalt und Bedeutung ihrer Abbauprodukte zu den wichtigsten Aminosäuren. Sie entsteht in der Pflanze biosynthetisch aus dem Glucose-Stoffwechsel über Chorisminsäure und Anthranilsäure. Im menschlichen Organismus wird Trp überwiegend über Kyn zu Kohlendioxid und Ammoniak abgebaut, wobei wichtige Stoffwechselprodukte wie Kynurensäure, Chinolensäure und Niacin gebildet werden. Ein weiterer wichtiger Stoffwechselweg ist die Bildung von IAA in Mikroorganismen und Pflanzen (GORDON, 1954; KUTÁČEK und KEFELI, 1970; CLARK, 1974; GIBSON et al., 1972; MONTEIRO et al., 1988; MARTENS und FRANKENBERGER, 1993).

Untersuchungen von KRADOLFER et al. (1982) und SHIN et al. (1991 a, b) zum Trp-Metabolismus in *Saccharomyces* zeigten, dass Trp mit Umsetzungsraten von bis zu 70 mol-% hauptsächlich über den sogenannten ‚Ehrlich-Abbauweg‘ zu Tryptophol (Indol-3-ethanol, TOH) katabolisiert wird. Bei diesem von EHRLICH (1912) beschriebenen Stoffwechselweg wird Trp zunächst unter Bildung von Indol-3-pyruvat oxidativ transaminiert. Aus Indol-3-pyruvat wird nach Decarboxylierung und anschließender Reduktion TOH über Indol-3-acetaldehyd als Zwischenprodukt gebildet (siehe Abb. 2). In geringen Mengen können dabei nach SHIN et al. (1991 b) auch IAA und als Nebenprodukt Indol-3-aldehyd (IAld) entstehen. Ein wesentlich geringerer Anteil des Trp (etwa 1-2%) wird über Kyn zur Kynurensäure abgebaut, während 2–4% des Trp nach Abspaltung von

Alanin der regulierten Bildung von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) dienen (SHIN et al., 1991 b).

Im Zusammenhang mit UTA werden sowohl Kyn als auch IAA als direkte Vorstufen von AAP diskutiert. Den bezüglich der Bildung von Kyn und IAA relevanten Ausschnitt des insgesamt sehr komplexen Trp-Metabolismus zeigt Abb. 2.

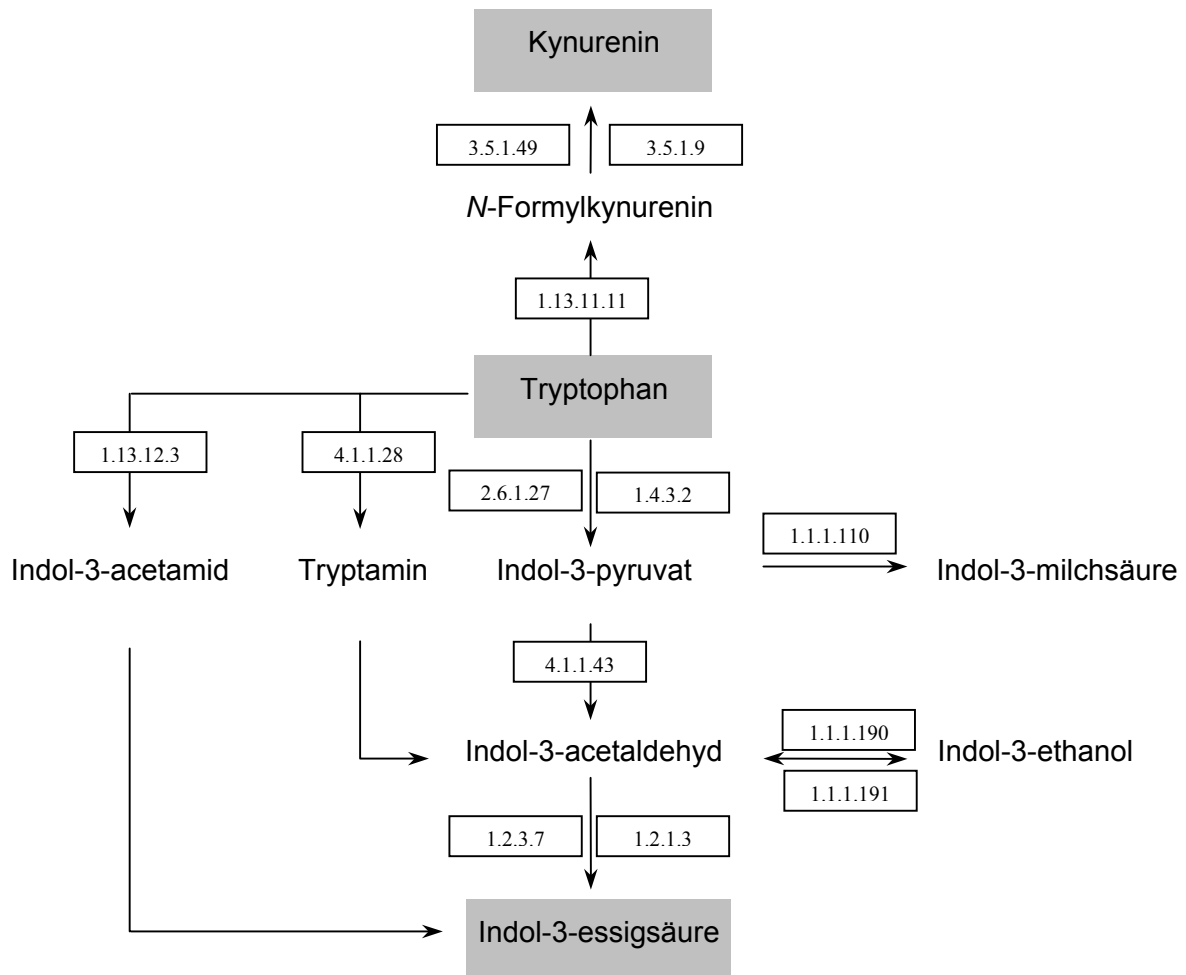


Abb. 2: Metabolismus von Trp und Bildung der potentiellen AAP-Precursoren Kyn und IAA

Hinsichtlich der Bildung von AAP aus den Trp-Metaboliten Kyn und IAA werden neben einer *biotischen* Bildung durch die Hefen auch *abiotische Mechanismen* in Betracht gezogen. In Abb. 3 sind die möglichen Bildungswege von AAP und die dabei potentiell auftretenden Zwischenprodukte dargestellt.

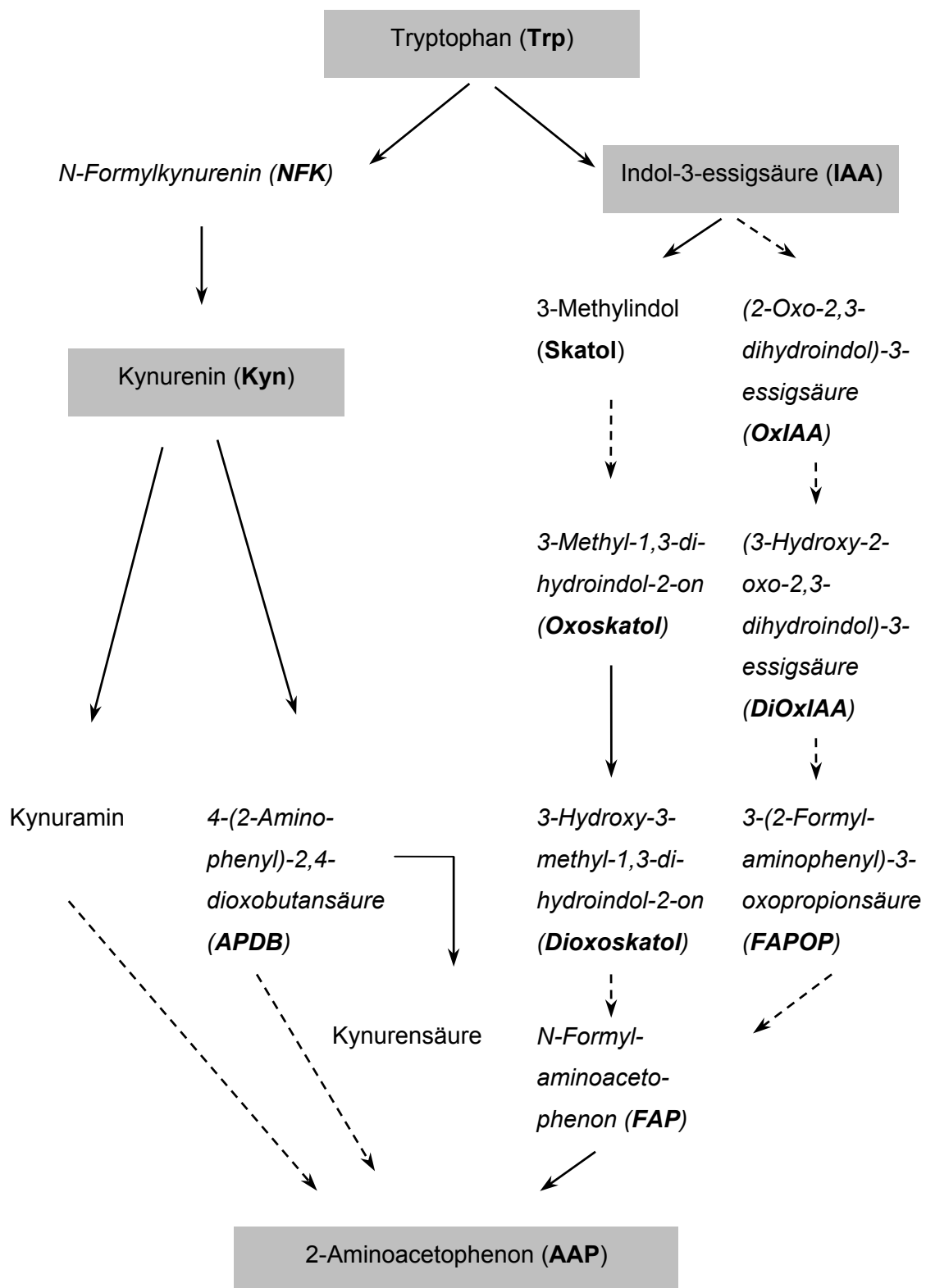


Abb. 3 : Mögliche Bildungswege von AAP und dabei auftretende Zwischenprodukte.

(Durchgezogene Pfeile: in der Literatur beschriebene Reaktionen; gestrichelte Pfeile: zu überprüfende Abbaureaktionen; kursiv: nicht kommerziell erhältliche Substanzen.)

1.3.1 Biotischer Mechanismus: Bildung von AAP durch *Saccharomyces* spp. während der alkoholischen Gärung

Untersuchungen von YONAHARA et al. (1975) und SHIN et al. (1991 a) zum Metabolismus von Kyn in *Saccharomyces* zeigten, dass dieses hauptsächlich nach Transaminierung zur Kynurensäure umgesetzt wird. Als Vorstufe der Kynurensäure wird von MAKINO et al. (1954) die Substanz 4-(2-Aminophenyl)-2,4-dioxobutansäure (APDB) diskutiert, die aufgrund ihrer Struktur als ein möglicher Precursor von AAP betrachtet werden kann (siehe Abb. 3). DOLLMANN et al. (1996) konnten in Modellversuchen mit *S. cerevisiae* eine Bildung von AAP aus Kyn nachweisen. Von GEBNER et al. (1996) durchgeführte Modellvergärungen von Mosten unter Zusatz von Trp oder Kyn mit *S. cerevisiae* zeigten dagegen nur sehr geringe Umsetzungsraten dieser Substanzen zum AAP (<0.002 mol-%). Die Autoren weisen vielmehr dem Trp-Metaboliten IAA eine Schlüsselrolle in der Entstehung von AAP zu.

1.3.2 Abiotischer Mechanismus: Bildung von AAP nach der alkoholischen Gärung

CHRISTOPH et al. (1998) untersuchten den Einfluss von Temperatur und schwefliger Säure auf die Bildung von AAP in ethanolischen Modelllösungen und im Wein. Sie konnten zeigen, dass durch Einwirkung von schwefliger Säure auf ethanolische Lösungen mit IAA und auf mit IAA dotierte Weine eine Bildung von AAP möglich ist. Neben AAP wiesen sie FAP und Skatol als weitere Abbauprodukte nach. Geringe Mengen an AAP analysierten sie auch nach Umsetzung von Indol-3-milchsäure (ILA), Indol-3-pyruvat und IAA-ethylester mit schwefliger Säure, wobei aber IAA mit Umsetzungsraten von bis zu 20 mol-% (in der ethanolischen Modelllösung) bzw. 3 mol-% (im Wein) das höchste AAP-Bildungspotential aufwies. Als Mechanismus postulieren sie eine Kooxidation von IAA und Sulfit, wobei der Pyrrolring der IAA, initiiert durch Superoxid- und Hydroxylradikale, die bei der Oxidation von Sulfit zu Sulfat entstehen, oxidativ gespalten wird. Den Autoren zufolge kann ein Abbau der IAA entweder nach Decarboxylierung über Skatol und anschließende Oxidation des Pyrrolringes oder nach Oxidation des Pyrrolringes über (2-Oxo-2,3-dihydroindol)-3-essigsäure (OxIAA) und anschließende Decarboxylierung erfolgen (siehe Abb. 3).

Das Vorliegen von Superoxid- und Hydroxylradikalen im Wein beschreiben VIVAS et al. (1997). Sie stellten zudem fest, dass schweflige Säure in der üblicherweise im Wein

vorhandenen Konzentration ein relativ unwirksamer Radikalfänger ist. GEBNER et al. (1999) konnten zeigen, dass durch Zusatz von Ascorbinsäure zum Wein vor der Schwefelung eine Bildung von AAP unterdrückt werden kann. Den Autoren zufolge wirkt Ascorbinsäure als Radikalfänger bzw. leicht oxidierbare Substanz und verhindert so die Kooxidation von IAA und die Bildung von AAP.

Die Schwefelung ist ein önologisches Verfahren, dass seit jeher zur Stabilisierung des Weines angewendet wird. Früher erfolgte sie durch Verbrennen von Schwefel in den Behältern vor dem Einfüllen des Weines (sogenanntes Einbrennen der Fässer). Heutzutage verwendet man exakter dosierbare Tabletten aus Kaliumdisulfit oder flüssiges Schwefeldioxid in Druckbehältern mit Dosiervorrichtung. Aufgrund ihrer vielseitigen Wirkung ist ein Verzicht auf die Anwendung von schwefliger Säure bei der Weinbereitung ohne deutliche Qualitätseinbußen nicht zu realisieren (KETTERN, 1991). Neben der Bindung von Sauerstoff durch Oxidation des Sulfits zum Sulfat und der Senkung des Redox-Potentials (reduktiver Ausbau) dient die Schwefelung der Inaktivierung von Enzymen, insbesondere der Oxygenasen, und der Unterdrückung von Mikroorganismen. Damit bietet sie einen Schutz vor Weinkrankheiten, reguliert die Gärung und den bakteriellen Säureabbau und dient der mikrobiologischen Stabilisierung des fertigen Weines. Neben schwefliger Säure ist zur Weinstabilisierung auch ein Zusatz von L-Ascorbinsäure (bis zu 150 mg/L) zugelassen. Als Reduktionsmittel bindet es ebenfalls Sauerstoff und schützt so den Wein vor nicht-enzymatischer Oxidation. Im Gegensatz zur schwefligen Säure besitzt L-Ascorbinsäure jedoch keine oxigenasehemmende oder antimikrobielle Wirkung.

1.4 Bedeutung des Tryptophan-Metaboliten Kynurenin

Kyn (Kynurenin von griechisch kyon = Hund und lateinisch urina = Urin) bzw. 2-Amino-4-(2-aminophenyl)-4-oxobuttersäure wird als Stoffwechselprodukt des Trp vom Organismus im Harn ausgeschieden. Es kann nach Hydroxylierung zum 3-Hydroxykynurenin über 3-Hydroxyanthranilsäure und weitere Schritte dem Abbau durch den Citronensäurezyklus zugeführt oder aber bei der Biosynthese von NAD verwertet werden. Daneben können als Ausscheidungsprodukte Kynurensäure, Xanthurensäure und Anthranilsäure gebildet werden.

Von dem Vorkommen von Kyn im Most berichten DOLLMANN et al. (1997). Demnach liegt Kyn im Most in Konzentrationen von bis zu 94 µg/L vor.

Nach SHIN et al. (1991 a) wird Kyn im Vergleich zum Trp nur langsam von der Hefe in die Zelle aufgenommen und dort anschließend rasch katabolisiert, so dass ein nur sehr geringer intrazellulärer Pool an Kyn vorliegt. Dabei wird es hauptsächlich zur Kynurensäure abgebaut. Als weiterer wichtiger Stoffwechselweg kann die Bildung von Nicotinamid gesehen werden.

1.5 Bedeutung des Pflanzenhormons Indolessigsäure

IAA, auch Heteroauxin oder Auxin (von griechisch auxin = wachsen; Wuchsstoff) genannt, gehört neben Abscisinsäure, Ethylen, den Cytokinin und Gibberellinen zu den natürlichen Wachstumsregulatoren der Pflanze. Diese sogenannten Phytohormone kontrollieren entscheidende Wachstums- und Entwicklungsprozesse bei Pflanzen. Sie werden von der Pflanze selbst synthetisiert und können nach dem Transport von ihrem Bildungsort zum Wirkort bereits in sehr geringen Konzentrationen spezifische Reaktionen auslösen. So bewirkt IAA ein ausgeprägtes Streckungswachstum, stimuliert die Wurzel- und Blütenbildung, die Tätigkeit des Kambiums und beeinflusst die Fruchtreife sowie zahlreiche Entwicklungsvorgänge in der Pflanze. Über das Vorkommen von IAA in Reben und ihre Bedeutung hinsichtlich Wachstum und Entwicklung berichten zahlreiche Publikationen (POOL und POWELL, 1975; PALMA und JACKSON, 1989; JAWANDA et al., 1974).

Der Pflanzenwuchsstoff IAA kann in der Pflanze enzymatisch aus Trp gebildet werden. Die Bildung erfolgt nach REINECKE und BANDURSKI (1987) hauptsächlich über Indol-3-pyruvat und Indol-3-acetaldehyd (siehe 1.3, Abb. 2). Daneben spielt aber auch die Bildung über Tryptamin eine wichtige Rolle. Die Synthese von IAA aus Trp über Indolacetamid in *Streptomyces spp.* beschreiben MANULIS et al. (1994). WRIGHT et al. (1991) konnten im Mais mit Hilfe von radioaktiv markierten Substanzen auch die Bildung von IAA aus Indol über einen Trp unabhängigen Stoffwechselweg nachweisen.

Die Konzentration an IAA in der Pflanze liegt je nach Gewebeart zwischen <3 und 500 µg/kg. Während IAA in der Frucht meist nur in Spuren vorhanden ist, kann ihre Konzentration in vegetativen Geweben, vor allem im Samen, auf bis zu 1 mg/kg ansteigen (BANDURSKI und SCHULZE, 1977). Wachstumsfördernde Eigenschaften besitzt lediglich

die freie IAA, deren Konzentration in der Pflanze sehr gering ist. Hauptsächlich liegt IAA gebunden in Speichergeweben als Ester, z.B. in Form von IAA-*myo*-inositol und IAA-*myo*-inositol-Glykosiden oder als Säureamid, z.B. in Form von IAA-aspartat vor (COHEN und BANDURSKI, 1982; BANDURSKI et al., 1986; REINECKE und BANDURSKI, 1987).

1.6 Rolle von Antioxidantien

Eine Bildung von AAP kann durch Reaktion von IAA mit schwefliger Säure erfolgen, wobei als Mechanismus nach CHRISTOPH et al. (1998) eine radikalische Oxidation der IAA durch gleichzeitig gebildete Sauerstoffradikale angenommen wird (siehe 1.3.2). GEBNER et al. (1999) konnten zeigen, dass eine Umsetzung von IAA zu AAP durch Antioxidantien mit radikalfangenden Eigenschaften verhindert bzw. verzögert wird. In Trauben und im Wein kommen zahlreiche Substanzen vor, die sich vom Phenol ableiten und allgemein als Pflanzenphenole oder als Polyphenole bezeichnet werden. Diese Verbindungen enthalten phenolische Hydroxygruppen, die für die radikalfangenden Eigenschaften dieser Substanzen verantwortlich sind. Der Gehalt an Polyphenolen im Wein hängt im wesentlichen vom nativen Gehalt an Polyphenolen in den Trauben, der Weinbereitungstechnik sowie einer Vielzahl von chemischen Reaktionen während der Lagerung des Weines ab.

Die im Weißwein vorkommenden Polyphenole lassen sich nach MACHEIX et al. (1991) in vier Gruppen einteilen: Die Gruppe der Phenolcarbonsäuren (Gallussäure, Coutarsäure, Caftarsäure, Fertarsäure, etc.), der Flavanoide (Flavonole und Flavone), der Flavanole sowie der Flavanole und Tannine ((+)-Catechin, (-)-Epicatechin, (+)-Gallocatechin, (-)-Epigallocatechin, Procyanidine, polymere Formen der kondensierten Tannine, etc.). Resveratrol und Anthocyane haben im Vergleich zum Rotwein im Weißwein eine nur sehr geringe Bedeutung.

Tannine (von französisch *tanin* = Gerbstoff) werden unter anderem auch in der Bier- und Weinklärung (Weinschönung) verwendet. Es handelt sich hierbei um Polyphenole sehr vielfältiger Zusammensetzung, die aufgrund ihrer Abstammung von Gallussäure häufig auch als Gallotannine bezeichnet werden und Gemische von Stoffen vom Typ der Pentadigalloylglucose darstellen. Ihre chemische Zusammensetzung ist je nach Herkunft sehr unterschiedlich. Sie wirken adstringierend und fällen Schwermetalle.

Die Fähigkeit, Radikale und andere aggressive Sauerstoffformen abzufangen, die auch als antioxidative Kapazität bezeichnet wird, ist von Substanz zu Substanz unterschiedlich. Sie ist außerdem von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise dem pH-Wert und der Art der Radikale abhängig.

1.7 Identifizierung von Tryptophan und Tryptophan-Metaboliten in Mosten und Weinen und Messung der antioxidativen Kapazität

1.7.1 Techniken zur Identifizierung von Tryptophan und Tryptophan-Metaboliten

Für die Identifizierung von Trp und Trp-Metaboliten werden eine Reihe verschiedener analytischer Techniken angewandt. Flüchtige Abbauprodukte wie Indol und andere flüchtige Indolverbindungen können im Wein mit Hilfe der Gaschromatographie direkt analysiert werden (CHRISTOPH et al., 1996). Eine Quantifizierung von Trp und nichtflüchtigen Trp-Derivaten ist dagegen nur nach vorhergehender Derivatisierung möglich, wobei sowohl Methylierungen (BADENOCH-JONES et al., 1982) als auch Silylierungen (KISLIN und KEFELI, 1981) üblich sind. Nachteilig ist die nur sehr geringe Selektivität dieser Technik, da neben Trp auch alle anderen Aminosäuren erfasst werden.

In der Regel erfolgt die Bestimmung von Trp und Trp-Metaboliten mit Hilfe der HPLC, die sich in der Spurenanalytik als eine schnelle und praktikable Methode bewährt hat (YOUNG und LAU, 1979; LEBHUHN und HARTMANN, 1993). Da Trp und die meisten Trp-Abbauprodukte UV-aktiv sind oder fluoreszieren, ist eine einfache und selektive Detektion unter Einsatz eines UV- und/oder Fluoreszenz-Detektors möglich. SIMAT et al. (1996) beschreiben eine simultane Bestimmung von insgesamt 19 Trp-Metaboliten, inklusive Kyn und IAA, mittels kombinierter UV- und Fluoreszenzdetektion.

Zur Bestimmung der Gesamtkonzentration an IAA in Mosten und Weinen muss zunächst eine Freisetzung dieser aus ihren Bindungen erfolgen, da IAA in pflanzlichen Geweben hauptsächlich gebunden als Ester oder Säureamid vorliegt. Die Freisetzung der IAA aus ihren Bindungen erfolgt in der Regel durch alkalische Hydrolyse (BANDURSKI und SCHULZE, 1977; BIALEK und COHEN, 1989; RIOV und BANGERTH, 1992; SITBON et al., 1993; ILIC et al., 1996). Nach BANDURSKI und SCHULZE (1977) wird estergebundene IAA als diejenige IAA definiert, die nach einstündiger Hydrolyse in 1 molarer Natronlauge bei Raumtemperatur freigesetzt wird, während für die Freisetzung von säureamidisch

gebundener IAA eine dreistündige Hydrolyse in 7 molarer Natronlauge bei 110 °C unter Stickstoffatmosphäre erforderlich ist. Eine saure Hydrolyse, die in der Regel zur Freisetzung von Aminosäuren aus Peptiden und Proteinen angewandt wird, ist wie auch beim Trp aufgrund der Instabilität des Indolringes nicht möglich. Auch die neben einer alkalischen Hydrolyse weit verbreitete Technik der enzymatischen Hydrolyse (DEVRIES et al., 1980; GARCIA und BAXTER, 1992; VAN WICKERN et al., 1997) ist bei IAA-Konjugaten aufgrund deren Stabilität gegenüber üblichen, kommerziell erhältlichen Enzymen nicht möglich (COHEN und BANDURSKI, 1982).

1.7.2 Techniken zur Messung der antioxidativen Kapazität

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Methoden zur Messung der antioxidativen Kapazität *in vitro* publiziert, die sich vor allem in der Radikalerzeugung und der Detektion sowie durch ihre Anwendung in hydrophilen und lipophilen Medien unterscheiden (MARCO, 1968; FRANKEL et al., 1992; MILLER et al., 1993; POPOV et al., 1994; GHISELLI et al., 1995). Das Ergebnis der antioxidativen Kapazität hängt dabei signifikant von der Art des verwendeten Testsystems ab (BÖHM et al., 2001).

Eine für Wein häufig angewandte Methode ist der sogenannte TEAC-Test (Trolox Equivalent of Antioxidative Capacity) nach MILLER et al. (1993). Bei dieser Methode wird die Fähigkeit von Antioxidantien gemessen, relativ zu Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-carboxylsäure) Radikalkationen abzufangen, die zuvor durch Reaktion von 2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat (ABTS) mit Wasserstoffperoxid und Metmyoglobin erzeugt werden. Von Bedeutung sind weiterhin die DPPH-Methode (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazin) nach BRAND-WILLIAMS et al. (1995), die DMPD-Methode (*N,N*-Dimethyl-*p*-phenylenediamin-dihydrochlorid) nach FOGLIANO et al. (1999) und der TRAP-Test (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) nach GHISELLI et al. (1995). Diese Methoden beruhen auf einem ähnlichen Prinzip wie der TEAC-Test und messen unspezifisch die Fähigkeit, freie Radikale abzufangen.

Die Messung der Fähigkeit von Antioxidantien, eine Peroxidation zu inhibieren, kann nach der Methode von FRANKEL et al. (1992) mittels LDL-Oxidation (Low Density Lipoprotein) erfolgen. Die Fähigkeit von Antioxidantien, speziell Hydroxylradikale abzufangen, kann Hilfe der Desoxyribose-Methode nach ARUOMA (1994) oder mittels EPR-Spektroskopie

mit 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-*N*-oxid (DMPO) als Spinfalle (SHI et al., 1991) untersucht werden.

Zur Messung der Fähigkeit, speziell Superoxidradikale abzufangen, findet man in der Literatur Methoden, die sich insbesondere in der Art der Radikalerzeugung unterscheiden. Diese kann beispielsweise enzymatisch durch Umsetzung von Xanthin mit Xanthinoxidase (OKAMURA et al., 1993) oder photochemisch durch optische Anregung einer photosensiblen Substanz mit UV-Licht (POPOV et al., 1994) erfolgen.

2 PROBLEMSTELLUNG

2.1 Aufklärung des Bildungsmechanismus von 2-Aminoacetophenon

Trotz zahlreicher Studien und statistischer Erhebungen sind die genauen Ursachen der Entstehung einer UTA bis heute nicht bekannt. Verschiedene weinbauliche und kellerwirtschaftliche Versuche, die im großen Umfang an verschiedenen Forschungseinrichtungen durchgeführt wurden, führten bisher nicht zum Ziel, die Bildung einer UTA im Wein grundsätzlich zu verhindern. Die verschiedenen Untersuchungen zur Entstehung von AAP im Wein sind teilweise widersprüchlich und lassen keinen Schluss über den genauen Bildungsmechanismus zu. Daher sollen in dieser Arbeit die Precursoren von AAP verifiziert und die beim Abbau auftretenden Zwischenprodukte identifiziert werden. Es soll untersucht werden, ob die Bildung von AAP biotisch, d.h. durch fermentative Prozesse und/oder abiotisch durch die Schwefelung des Weines nach Abschluss der Gärung erfolgt.

Vor diesem Hintergrund sollen folgend Aufgaben bearbeitet werden:

- Synthese möglicher, kommerziell nicht erhältlicher AAP-Precursoren in einer Reinheit, die ihren Einsatz als Referenzsubstanzen ermöglichen.
- Entwicklung einer Methode zur Identifizierung und Quantifizierung potentieller Precursoren.
- Untersuchung der Bildung von AAP aus Kyn bzw. IAA in verschiedenen Modellmedien (Fermentationsmedium, Modellwein mit SO₂-Zusatz).

2.2 Validierung verschiedener Testverfahren zur Beurteilung des UTA-Potentials von Mosten und Weinen

Unter Berücksichtigung des Bildungsweges von AAP soll ein geeignetes Testverfahren entwickelt werden, welches eine Beurteilung des UTA-Potentials von Weinen zulässt. Mit Hilfe dieses Verfahrens soll geprüft werden, ob generell durch die Bestimmung eines oder mehrerer Parameter im Most oder Wein eine UTA-Vorhersage möglich ist.

Begleitend zu verschiedenen weinbaulichen und kellerwirtschaftlichen Versuchen, die an der Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau in Veitshöchheim durchgeführt wurden, sollen folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- Validierung eines Analysenverfahrens zur Bestimmung von Trp und Trp-Metaboliten, insbesondere der freien und gebundenen IAA in Mosten und den daraus hergestellten Weinen.
- Validierung eines Analysenverfahrens zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität.

2.3 Untersuchung des Einflusses verschiedener weinbaulicher und kellerwirtschaftlicher Maßnahmen

Abschließend soll untersucht werden, inwieweit durch verschiedene kellerwirtschaftliche und/oder weinbauliche Maßnahmen eine UTA weitgehend unterdrückt werden kann. Vor diesem Hintergrund sollen folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- Untersuchung des Einflusses verschiedener weinbaulicher Maßnahmen auf den Gehalt an Precursoren im Most und Wein und auf die antioxidative Kapazität.
- Untersuchung des Einflusses verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf die Konzentration an Trp und Trp-Metaboliten in verschiedenen Stadien der Gärung; Verfolgung des Abbaus bzw. der Bildung von IAA und anderen Trp-Metaboliten im Verlauf der Gärung.

3 PUBLIKATIONEN

3.1 Bildungsmechanismus von 2-Aminoacetophenon

3.1.1

OFF-FLAVOR COMPOUNDS IN WINE AND OTHER FOOD PRODUCTS FORMED BY ENZYMATICAL, PHYSICAL, AND CHEMICAL DEGRADATION OF TRYPTOPHAN AND ITS METABOLITES

N. Christoph¹, M. Geßner², T. J. Simat³, and K. Hoenicke³

¹Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern
Luitpoldstr. 1, D-97082 Würzburg
Tel: 0049-931 41993167
Fax: 0049-931 41993210

²Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau D-97209
Veitshöchheim

³Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
Universität Hamburg, Grindelallee 117
D-20146 Hamburg

ABSTRACT

Tryptophan (TRP) and its metabolites are considered as potential precursors of 2-aminoacetophenone (AAP) in different food products causing different off-flavors. AAP is also responsible for the "untypical aging flavor (UTA)" in wine, developing a floor polish-like flavor in white wines within a few months of storage. In this study the formation of AAP was elucidated by GC-MS analysis of volatile components in model systems, grape musts and wines, spiked with TRP and different TRP metabolites like indole-3-acetic acid (IAA) and sulfite. In sulfurized wines and model solutions which were stored at different temperatures (20 °C, 45 °C) formylaminoacetophenone (FAP) and AAP were formed mainly from IAA with formation rates up to 20 mole%. Minor formation rates of AAP (<1 mole%) were found in sulfurized solutions of TRP, indole-3-lactic acid, and indole-3-pyruvic acid. The results showed that the formation of AAP in wine can be referred to an oxidative degradation of IAA by superoxide- and hydroxyl-radicals, which can be formed in wine after the sulfuration by cooxidation of sulfite to sulfate. After decarboxylation, pyrrole oxidation, and ring cleavage, FAP was the main volatile compound of the non-enzymatic degradation of IAA by sulfite which was quantitatively hydrolyzed to AAP. The formation of AAP and FAP was significantly lower in white wines than in ethanolic solutions spiked with IAA. However AAP formation rates of up to 5 mole% were still enough

for an UTA. Due to the fact that the AAP- and UTA-formation by cooxidation of sulfite and IAA was completely blocked in red wines, it could be deduced that polyphenolic compounds, typical for red wines, have a scavenger effect on the radical oxidation of sulfite. Possibilities for an inhibition of the IAA degradation during winemaking to avoid the UTA in white wines by addition of radical scavengers like grape marc or ascorbic acid are discussed.

1. OFF-FLAVOR: DEFINITION AND CHARACTERISTICS

The term "off-flavor" may be defined as "a flavor that is not natural or up to standard owing to deterioration or contamination" (Nijssen, 1991). The unpleasant odor quality of an off-flavor is mostly caused by only one, sometimes several volatile compounds with very low odor threshold values and the typical unpleasant odor taint of the spoiled food product. Such compounds are called "character impact compounds", since they are mainly responsible for the characteristics of an off-flavor. It is also possible that off-flavors are the result of a serious disturbance of balance of the various compounds constituting the flavor of a food product. Off-flavors sometimes may render a food inedible, but at least they reduce its organoleptic quality and consequently its economic value. An off-flavor can be formed during production of the food, during its storage or by external contaminants.

2. FORMATION OF VOLATILE COMPOUNDS FROM TRP

TRP is known as a precursor of different important nonvolatile as well as volatile compounds. Figure 1 shows a summary of some enzymatic pathways of the degradation of TRP and TRP-metabolites to form stable volatile compounds.

TRP can directly be degraded by tryptophanase to indole (12) or by special microorganisms to skatole (8) as shown by Claus, Weiler, and Herzog (1994). The enzymatic degradation of TRP mostly proceeds via formylkynurenine (9) and kynurenine (10) to anthranilic acid (11). For the biosynthesis of IAA (7), TRP is converted to indole-3-pyruvic acid (3) which is subsequently decarboxylated to indole-3-acetaldehyde (5). Either an oxidase or a dehydrogenase oxidizes indolacetaldehyde (5) to IAA (7). Indole-3-lactic acid (4) can also be formed via indole-3-pyruvate (3). Frydman, Tomaro, and Frydman (1971a and b) isolated the enzyme pyrroloxygenase from wheat germ and from rat liver which efficiently oxidized skatole and IAA to give formylaminoacetophenone (FAP), which was subsequently hydrolyzed to AAP (2). Especially indole, skatole, esters of anthranilic acid, and AAP are known as intensive and unpleasant odor compounds. On the contrary indol-3-ethanol (6) which is mainly formed during alcoholic fermentation from TRP does not reveal unpleasant odor notes. However it has to be taken into account that TRP and TRP-metabolites can also be degraded by non-enzymatic reactions. Such mechanisms may also play a role for the formation of off-flavors in food products.

AAP may cause off-flavors in products from milk, like stored dried lactic casein (Walker and Manning, 1976) or concentrated sterilized milk (Arnold and Lindsay, 1969) and in products from corn, like Tortilla or Taco chips (Buttery and Ling, 1995). Relative high AAP-concentrations of 3 to 5 µg/L in beers with a stale off-flavor (Palamand and Grigsby, 1974) can be referred to enzymatic as well as non-enzymatic degradations of

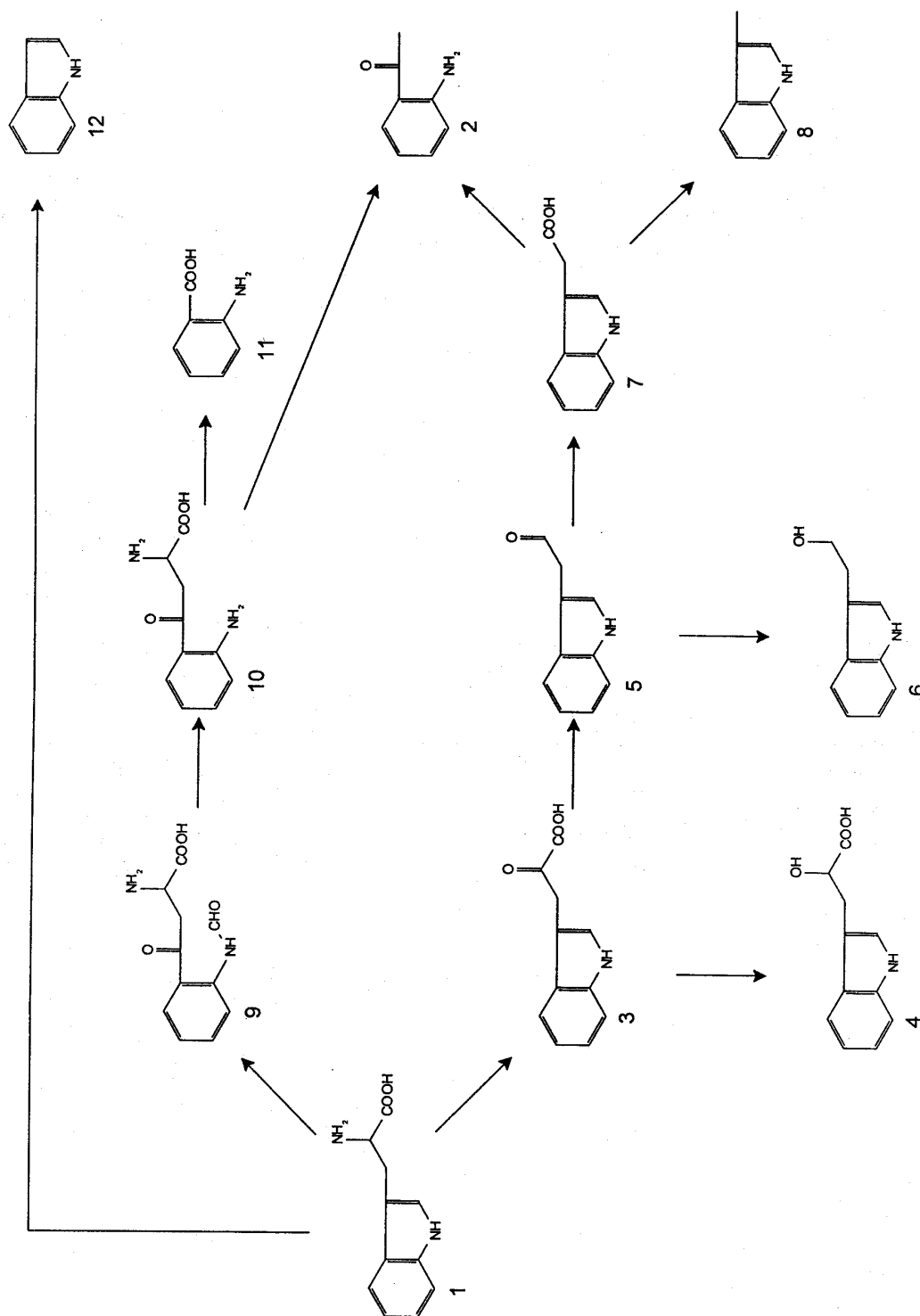


Figure 1. Tryptophan metabolism and degradation: different pathways to form stable volatile compounds.

IAA in malt during the brewing process. The so-called "foxy" taint of wines which is only known in grape musts and wines from hybrid cultivars of grapes from species *Vitis Labruscana* or Concord is caused by methyl anthranilate and AAP which are formed in the berries in the final ripening period (Shure and Acree, 1994).

There have been intensive investigations on the elucidation of the enzymatical pathways of the degradation of TRP in human and animal organisms and by microorganisms. Studies by Kochen, Byrd, Bühner, and Bührlin (1975) showed that the TRP-metabolism in untreated phenylketonuric patients is characterized by an oxidative degradation of TRP via the kynurenine pathway; as a stable volatile cleavage product AAP was identified by mass spectrometry. Claus *et al.* (1994) could show that skatole, which is formed from TRP by specialized microbes in the colon of boars, may cause an off-flavor in pork meat. By microbial activities indole and skatole also may be formed during ripening of cheese, as shown by Kemmer, Dehnhard, and Claus (1997).

3. UNTYPICAL AGING OFF-FLAVOR (UTA) IN WINE: AAP-FORMATION BY NON-ENZYMATICAL DEGRADATION OF IAA

Wine is a good example for the formation of different off-flavors from different precursors due to different winemaking technologies, influences of different microorganisms, grape varieties, regional and climatic influences, and storage conditions. The UTA was described for the first time 1989 in white wines which showed odor taints like "floor polish, washing soap, old wood cabinet, naphthalin, sweet flowers from orange and acacia, or wet dog fur". The UTA can be formed in the bottle or in the wine cask within few months in contrast to the typical aging of a wine which is a slow oxidation and change of specific aroma compounds during several years of storage. Due to the fact that AAP was identified as the character impact compound of the UTA by Rapp, Versini, and Ullemeyer (1993), the precursor consequently had to be located in the TRP-metabolism. Concentrations of more than 1 µg/L AAP are responsible for an UTA (Christoph, Bauer-Christoph, Geßner, and Köhler, 1995). For some years, about 20% of the rejected white wines in the vintage wine certification of different wine growing regions of Germany exhibited the UTA which consequently caused losses of a high economic value.

Studies on the formation of AAP and the UTA in wines from different grape varieties, degree of ripening (quality), and climatic conditions by Köhler, Christoph, Bauer-Christoph, and Geßner (1995), by Rapp and Versini (1995) and by Schwab, Peternel, Köhler, and Heigel (1996) have shown that there are significant correlations between the appearance of high AAP concentrations and wines from grapes which were put under stress by insufficient water or nitrogen supply, as well as wines produced from high yield vintages or early grape vintages providing poor quality.

Nevertheless it was not possible to detect single specific parameters which were exclusively responsible for the formation of high AAP-concentrations in wine. Therefore it was necessary to identify the precursors and to elucidate the mechanisms of AAP-formation in such wines in order to find oenological or technological possibilities for a prevention or at least a reduction of the AAP-formation during or after winemaking.

3.1. Methods for the Investigations on the Formation of AAP in Wines with UTA

In order to identify the mechanisms of the AAP formation, it was necessary to simulate the winemaking process by model fermentations and reactions with different pre-

cursors. TRP and TRP-metabolites were added to different musts and wines before and after fermentation. In addition, model solutions of 10 vol% ethanol (pH 4.5 by addition of 5.5 g/L KH_2PO_4) were spiked with different concentrations of TRP, IAA (Sigma, for cell-cultures) and deuterated IAA (IAA_{d_5} , Cambridge Isotope Laboratories), indole-3-lactic acid, L-kynurenine, N-formylkynurenine, indole-3-pyruvate, indole-3-acetaldehyde, and esters of IAA with amino acids or peptides. Corresponding to the winemaking in the wine cellar, the samples were filtrated and sulfurized after fermentation with solutions of sulfur dioxide, different sulfites, or potassium bisulfite. Samples were stored at 6°, 20°, and 50°C excluding light. After organoleptic tests the samples were continuously extracted with 1,1,1-trichlorotrifluormethane or diethylether for 8 hours. The solvent was evaporated at 30°C on a vigreux column and collected for recycling. The resulting extracts were analyzed on a GC-MS System (Fisons 8,000 GC coupled with a CE-Instruments mass detector MD 800, EI-MS, 70 eV), equipped with a J&W DB-WAX column (60 m, 0.15 μm i.d., 160°C with 5°C/min to 210°C). Mass spectra obtained were compared with those of the Wiley-library of mass spectra and of standards of commercial available AAP (Aldrich). FAP and N-formylkynurenine were synthesized by formylation of AAP and kynurenine with a mixture of formic acid and acetic acid anhydride. The identity of the compounds was checked by NMR and the purity by RP-HPLC with 98% for N-formylkynurenine and 99% for FAP (Christoph, Bauer-Christoph, Geßner, Köhler, Simat, and Hoenicke, 1998). The concentrations of AAP and FAP were determined using internal standard method with ethylvanillin which was added before extraction of the samples.

3.2. Mechanism of AAP Formation in Wines from IAA

By GC-MS and sensory analysis of wines with UTA it could be shown that high AAP concentrations are formed after the fermentation of grape musts spiked with IAA (Christoph, Bauer-Christoph, Geßner and Köhler, 1996; Geßner, Köhler, Christoph, and Bauer-Christoph, 1996). IAA is a natural occurring plant growing hormone, which is known to be also present in wine (Jawanda, Singh, and Pal, 1974). Since it is known that IAA is a very instable compound, easily degraded by enzymatic as well as nonenzymatic processes, it was also necessary to check for non-enzymatical mechanisms, possibly producing AAP from IAA or other TRP-metabolites during the storage of wine. Sulfite is the only component which is used in winemaking and which is added to wine after fermentation in order to create distinct levels of free sulfur dioxide in the wine. It is added as a solution of sulfur dioxide or as bisulfite at concentrations of 50–100 mg/L in order to stabilize the wine, to protect against microorganisms and to create reductive conditions.

Since AAP is known as a degradation product of oxidative processes, it was first assumed that sulfite is not responsible for an oxidative degradation of IAA, TRP or TRP-metabolites. However the first experiments with model solutions of high concentrations of IAA in 10 vol% ethanol, treated with potassium bisulfite, showed a typical UTA- and AAP-like odor after their storage of 14 days at room temperature. The degradation of IAA by sulfite was accelerated by higher temperatures whereas there was no IAA-degradation without sulfite even at elevated temperatures. FAP was identified as the main degradation product (88%), followed by 3-methyl-indole (skatole) with 5%, a compound with an unknown structure (5%) and AAP with 1.3% (Table 1). Using deuterated IAA (IAA_{d_5}) the compounds FAP_{d_5} (95%) and AAP_{d_4} (5%) were identified (Christoph *et al.*, 1998). FAP has similar odor qualities as AAP but a significantly higher odor threshold.

Table 1. GC-MS analysis of volatile components in extracts of model solutions with 10 vol% ethanol (pH 4.5) and 100 mg/L of potassiumbisulfite, spiked with 20 mg/L IAA and 0.3 mg/L deuterated IAA_{d5} after storage for 2 weeks at room temperature. Percentage composition calculated via normalization of peak areas of volatile components of the total ion chromatogram.

Volatile compounds formed from IAA and IAA _{d5}	Mass fragments m/e (Intensity % base peak)	Area % compound
IAA	130 (100); 175 (85); 77 (31); 103 (25)	
structure not identified	145 (100); 90 (55); 117 (25); 63 (19)	5
AAP	120 (100); 135 (39); 92 (37); 65 (25)	1.3
skatole	130 (100); 131 (61); 103 (8)	5
FAP	120 (100); 135 (57); 92 (33); 43 (23); 65 (19); 163 (13)	88
IAA _{d5}	135 (100); 134 (74); 180 (36); 179 (23)	
AAP _{d4}	124 (100); 139 (61); 96 (52); 69 (34)	5
FAP _{d5}	125 (100); 140 (61.5); 98 (42); 124 (25); 69 (23); 168 (16)	95

Table 2 shows the determination of the formation rates of AAP and FAP coming from IAA, TRP, and different TRP-metabolites in sulfurized ethanolic solutions which have been stored at 45°C for 4 days. These storage conditions were used in order to simulate the formation of a storage of wine at room temperature for several months. Maximum formation rates (up to 22 mole%) of AAP and FAP were found in solutions with IAA as the possible precursor. Minor formation rates of AAP (<1 mole%) were found in the solutions with TRP, indole-3-lactic acid as well as indole-3-pyruvic acid. Testing kynurenine, N-formylkynurenine, and the ethylester of IAA as possible presursors, no significant AAP-formation was determined. FAP was almost quantitatively hydrolyzed to AAP without sulfite during the storage at 45°C. This explains the fact that the concentration of FAP in wine is usually below 0.5 µg/L or significantly lower than that of AAP.

Discussing the mechanism of the AAP-formation in wine by degradation of IAA,

Table 2. Investigations on the formation of AAP and FAP by degradation of different TRP metabolites, spiked to sulfurized ethanolic model solutions (10 vol%; pH 4.5; 100 mg SO₂/L) and storage at 45°C for 4 days and for further 4 weeks at 20°C. Formation rates of AAP and FAP calculated as mole% of the precursors added.

Metabolites	Addition mg/L	AAP µg/L	FAP µg/L	Formation rate mole% of additive
TRP	50	0.9	0.2	0.002
Tryptophol	20	<0.1	<0.1	<0.001
Tryptamin	20	<0.1	<0.1	<0.001
Kynurenine	0.15	<0.1	<0.1	<0.001
N-Formylkynurenine	0.1	<0.1	<0.1	<0.001
Indole-3-pyruvate	7	7	6	0.3
Indole-3-lactic acid	20	20	130	0.95
Indole-3-acetaldehyde	0.1	<0.1	<0.1	<0.001
IAA	0.1	10	8	22
IAA-ethylester	20	9.5	8.6	0.1
IAA-alanine	0.26	<0.1	<0.1	<0.001
IAA-phenylalanine	0.13	<0.1	<0.1	<0.001
FAP	0.07	60	10	>90*

*AAP-formation rate (no addition of potassium pyrosulfite).

it could be deduced that the formation of AAP was only caused by sulfite. This hypothesis corresponds to the investigations of Horng and Yang (1975), who showed that IAA is rapidly destroyed simultaneously with the oxidation of sulfite to sulfate. Superoxide (O_2^-), hydroxyl (OH^-), and sulfite (SO_3^-)-radicals may be generated from residual oxygen by reaction (oxidation) with sulfite (Abel, 1951; Hayon, Treinin, and Wolfe, 1972; Yang, 1984). These radicals are responsible for the propagation of a sulfite-oxygen chain reaction leading to a cooxidation of plant constituents like IAA. Yang (1984) showed that the formation of radicals from sulfite employ also a destruction of further plant constituents like chlorophyll, β -carotinoids, and lipids or may cause membrane damages in plant tissues. The formation of the superoxide- and hydroxyl-radical in wines by access of oxygen was also discussed by Vivas, Saint-Cricq de Gaulejac, and Glories (1997). They showed that at usual oenological concentrations sulfite does not have a scavenger effect on these radicals.

Figure 2 shows the possible pathways and the intermediate compounds of the radical cooxidation of IAA by superoxide to form AAP. The degradation may start from a decarboxylation of IAA (7) to skatole (8), followed by a pyrrole-oxidation via oxo-skatole (14) and hydroxy-oxo-skatole (15). By cleavage of the pyrrole ring FAP (13) is formed and spontaneously hydrolyzed to AAP (2). Thus it is also possible that the decarboxylation is performed after the pyrrole-oxidation; IAA is oxidized to 2-oxo- (16) and 3-hydroxy-2-oxo-3-dihydroindol-3-yl acetic acid (17). Pyrrole ring cleavage leads to 3-(2-formylamino)-phenyl-3-oxo-propionic acid (18), which is decarboxylated to FAP (13). On account to the identification of skatole and a compound with a molecular weight of 145 (Table 1) the degradation of IAA probably starts with a decarboxylation to form skatole. However further investigations are necessary to verify the pathways and intermediate compounds of IAA degradation in wine.

3.3. Parameters Influencing the Formation Rate of AAP in Wine

Discussing the formation of AAP in wine by degradation of IAA, it is necessary to know the concentrations of IAA in grapes, grape musts, and wines. Although IAA is a widely spread plant growing hormone, there have been no systematic studies on the concentrations of IAA in wines. Hoenicke (1997) determined IAA in grapes, grape musts, and wines with a special HPLC method. Concentrations less than $10\mu\text{g/L}$ were found in grapes and grape musts whereas up to $50\mu\text{g/L}$ were found after their fermentation in wines. Since most of the IAA produced in plants is accumulated as conjugated IAA, it is necessary to develop analytical techniques for the determination of conjugated IAA in grapes and to check the mechanisms of release of conjugated IAA during winemaking. Table 3 shows the results of the determination of the formation rates of AAP and FAP by degradation of IAA with sulfite in model systems of ethanolic solutions and fermented grape musts spiked with different concentrations of IAA.

The formation rates of AAP and FAP are significantly higher in ethanolic solutions than in wines from white grapes, where only formation rates of less than 5 mole% have been determined. In wines which were not sulfurized as well as in red wines no formation of AAP higher than $0.1\mu\text{g/L}$ could be detected. A formation rate of 6.1 mole% AAP ($0.3\mu\text{g/L}$) and FAP ($0.2\mu\text{g/L}$) was determined in a sulfurized ethanolic solution containing $10\mu\text{g/L}$ IAA after storage at room temperature (25°C) for 4 weeks. After storage of further 5 months at room temperature the formation rate increased to 20.7 mole%. The degradation of $50\mu\text{g/L}$ IAA within 4 weeks at room temperature resulted in a formation of $2.9\mu\text{g/L}$ AAP and $2.8\mu\text{g/L}$ FAP (13.7 mole%). After storage

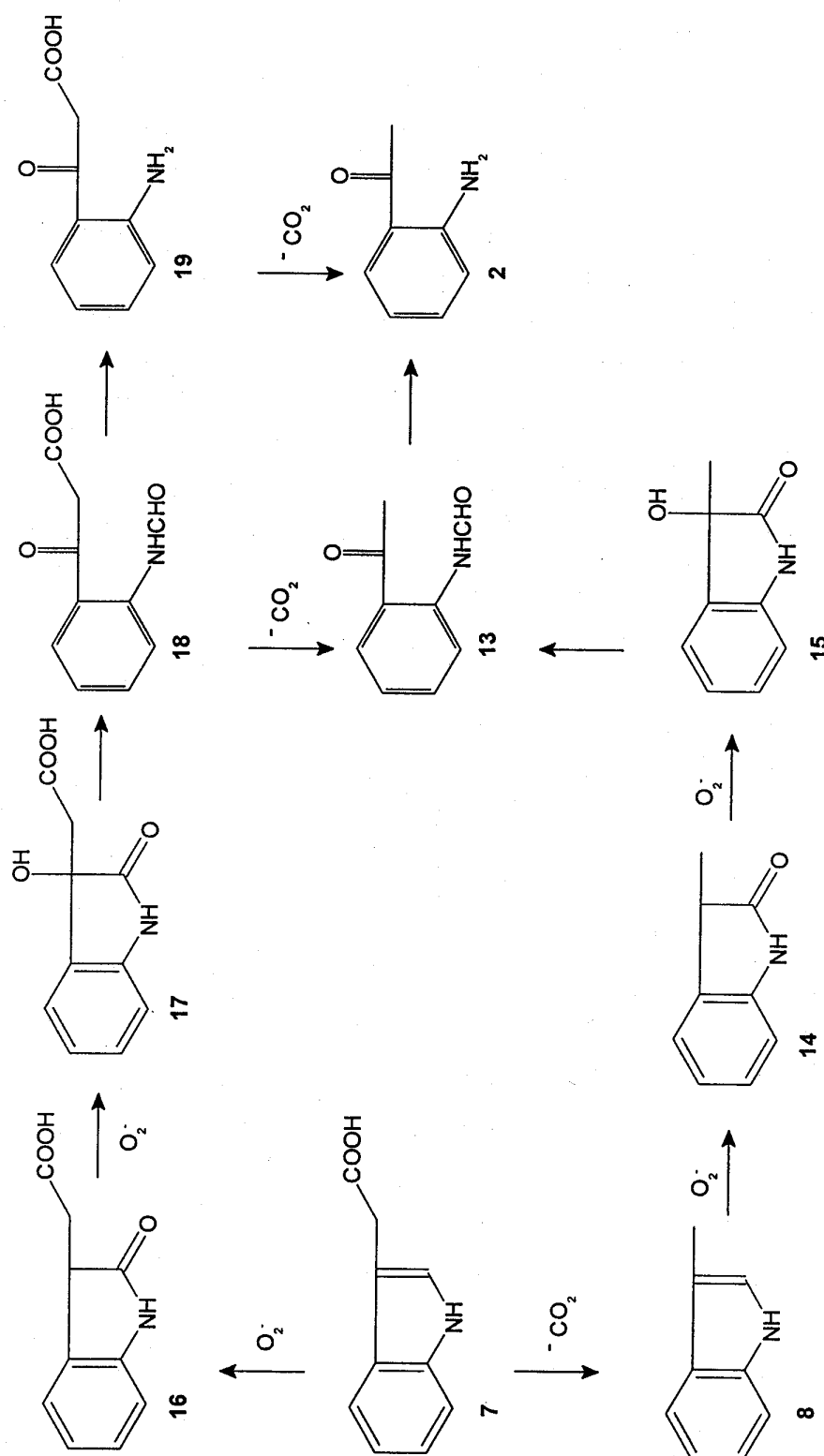


Figure 2. Possible degradation pathways and intermediate products of the non-enzymatic oxidation of IAA and the formation of FAP and AAP in wine, initiated by free superoxide- and hydroxyl-radicals, formed during cooxidation of sulfite.

Table 3. Formation of AAP and FAP in model solutions of 10 vol% ethanol and in different wines from grape musts, spiked with different concentrations of IAA. Sulfuration with potassium bisulfite (100 mg SO₂/L) and different storage conditions. Formation rates of AAP and FAP calculated as mole% of added IAA.

Model system	Addition IAA µg/L	Storage °C	Storage time	AAP µg/L	FAP µg/L	Formation rate mole% IAA
10% vol Ethanol						
IAA-1a	10	25	4 weeks	0.3	0.2	6.1
IAA-1b	10	25	6 months	1.4	0.2	20.7
IAA-2	20	45	4 days	2.1	0.1	14.4
IAA-3	50	25	4 weeks	2.9	2.8	13.7
IAA-4	60	45	4 days	5.2	4	21.2
IAA-5	100	25	4 weeks	10	8	21.6
WINES						
A	2,000	45*	4 days	<0.1	<0.1	<0.1
A	2,000	25	3 months	2.4	0.3	0.1
A	2,000	25	6 months	4.4	0.5	0.3
A	2,000	45	4 days	17	0.2	1.1
B	400	25	3 months	1.5	0.15	0.5
B	400	45	4 days	7.7	0.3	2.6
C	50	45	4 days	1.4	0.2	4.1
C	50	25	4 weeks	0.3	<0.1	0.8
C	60**	25	4 months	0.4	<0.1	—
C	60**	45	4 days	1.7	<0.1	2.8
D (red wine)	2,000	45	4 days	<0.1	<0.1	0.1

*without sulfuration; **original IAA-concentrations.

of a solution containing 60 µg/L IAA at 45°C during 4 days, 21.2 mole% AAP and FAP were formed.

Wines from grape musts which were spiked with IAA prior to fermentation showed significantly lower and non-uniform formation rates of AAP and FAP between 0.2 and 4 mole% AAP and FAP, calculated from IAA amount. The formation rate of AAP increased with storage time and storage temperature also in wines, corresponding to the observations in ethanolic solutions. In a fermented grape must which had been spiked with IAA in a natural concentration range of 50 µg/L IAA, an AAP-amount of 1.4 µg/L was determined after storage at 45°C for 4 days; in a white wine with 60 µg/L free IAA, the AAP-concentration increased by storage at 45°C from 0.4 to 1.7 µg/L. In any case, AAP-concentrations higher than the odor threshold values were formed by degradation of IAA-concentrations in the range of 50 µg/L.

The fact that red wines spiked with IAA before fermentation do not show any significant formation of AAP, corresponds with the observation that the UTA has not yet been detected in red wines. It can be deduced that special constituents of red wines, which are not or less available in white wines, are responsible for an inhibition of the cooxidation of sulfite and IAA. Polyphenolic compounds for example are important constituents which are typical for red wines and are available only in small amounts in white wines. As shown by Geßner, Köhler, Christoph, Bauer-Christoph, Miltenberger, and Schmitt (1995), there are significant correlations ($r = -0.62$) between the total amount of polyphenolic compounds and the formation of an UTA; the UTA- and AAP-formation was also reduced in wines from musts with higher amounts of polyphenolic compounds due to intensive squeezing of the grapes. Polyphenols are known for their key role in radical-scavenging since they have antioxidative effects. Vivas *et al.* (1997) showed that different

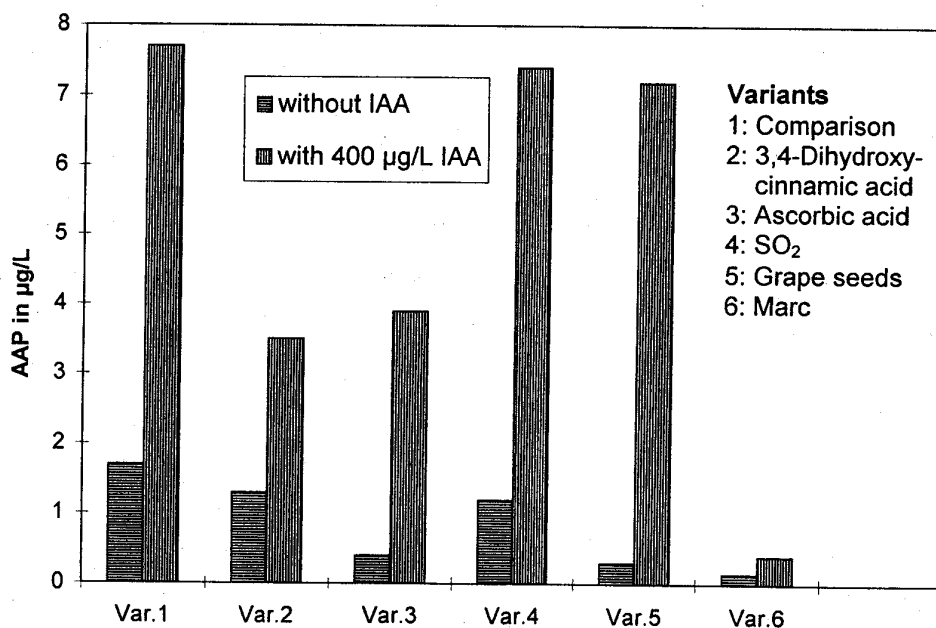


Figure 3. Formation of AAP in wines from grape musts (Müller-Thurgau, 1997) spiked with and without IAA and different additives. Determination of AAP after sulfuration and storage (100 h, 50 °C).

tannins, e.g. castalagin, procyanidins B2 and B4, (+)-catechin, and gallic acid have significant antiradical effects; in red wines in particular procyanidins have a scavenger effect on free superoxide radicals.

The investigations with model systems (Fig. 3) showed that the AAP-formation from IAA was reduced if phenolic compounds were added before fermentation. Grape must was spiked with 400 µg/L IAA and fermented after addition of 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid), ascorbic acid, sulfur dioxide, grape seeds, or marc. The variants with caffeic acid, ascorbic acid, and grape marc showed a significant decrease of the AAP-formation which can be referred to minor cooxidation of IAA by scavenging of free radicals. Therefore the enhancement of the polyphenol concentration in white wines may be a method to scavenge radicals and to inhibit the formation of AAP after sulfuration. However mash fermentations of white grapes or intensive squeezing of the grapes are no practicable methods since such procedures would cause other detrimental effects on the wine quality. Table 3 shows that L-ascorbic acid, which is a legal additive for wines, has also radical scavenger effects and may reduce the AAP formation in wine. Latest studies by Geßner, Christoph, and Simat (1998) and Geßner, Köhler and Christoph (1998) have shown that an addition of ascorbic acid after fermentation (before or after the sulfuration) may completely inhibit the AAP- and UTA-formation in white wines.

REFERENCES

- Abel, E., 1951, Zur Theorie der Oxidation von Sulfit zu Sulfat durch Sauerstoff, *Monatsh. Chem.* **82**:815–834.
 Arnold, R. and Lindsay, R.C., 1969, Quantitative determination of N-methyl ketones and o-aminoacetophenone in sterilized concentrated milk, *J. of Dairy Science*, **52**:1097–1100.
 Buttery, R.G. and Ling, L.C., 1995, Volatile flavor components of corn tortillas and related products, *J. Agric. Food Chem.* **43**:1878–1882.
 Claus, R., Weiler, U., and Herzog, A., 1994, Physiological aspects of androstenone and skatole formation in the boar. A review with experimental data, *Meat Science*, **38**:289–305.

- Christoph, N., Bauer-Christoph, C., Geßner, M., and Köhler, H.J., 1995, Die "Untypische Alterungsnote im Wein", Teil I: Untersuchungen zum Auftreten und zur sensorischen Charakterisierung der "Untypischen Alterungsnote", *Rebe & Wein* 48:350–356.
- Christoph, N., Bauer-Christoph, C., Geßner, M., and Köhler, H.J., 1996, Die "Untypische Alterungsnote im Wein", Teil VI: Untersuchungen zur Bildung von o-Aminoacetophenon aus Produkten des Tryptophan-Stoffwechsels vor der alkoholischen Gärung, *Rebe & Wein* 49:246–250.
- Christoph, N., Bauer-Christoph, C., Geßner, M., Köhler, H.J., Simat, T.J., and Hoenicke, K., 1998, Formation of 2-aminoacetophenone and formylaminoacetophenone in wine by reaction of sulfurous acid with indole-3-acetic acid, *Vitic. Enol. Sci.* 53:82–89.
- Frydman, R.B., Tomaro, M.L., and Frydman, B., 1971a, Pyrrolooxxygenases: the biosynthesis of 2-aminoacetophenone, *FEBS-LETTERS* 17:273–276.
- Frydman, R.B., Tomaro, M.L., and Frydman, B., 1971b, Pyrrolooxxygenases: a new type of target enzyme, *FEBS-LETTERS* 17:305–308.
- Geßner, M., Köhler, H.J., Christoph, N., Bauer-Christoph, C., Miltenberger, R., and Schmitt, A., 1995, Die "Untypische Alterungsnote im Wein", Teil II: Beschreibende Verkostung von UTA-Weinen; Beziehungen zwischen Sensorik und chemisch-physikalischen Analysenwerten, *Rebe & Wein* 48:388–393.
- Geßner, M., Köhler, H.J., Christoph, N., and Bauer-Christoph, C., 1996, Die "Untypische Alterungsnote im Wein", Teil VII: Untersuchungen zur Bildung von o-Aminoacetophenon aus Produkten des Tryptophan-Stoffwechsels bei der alkoholischen Gärung, *Rebe & Wein* 49:251–255.
- Geßner, M., Christoph, N., and Simat, T., 1998, Neue Erkenntnisse zur Bildung von Alterungsnoten in Wein, 5. Intern. Symp: Innovationen in der Kellerwirtschaft, 11. 5.1998, Stuttgart.
- Geßner, M., Köhler, H.J., and Christoph, N., 1998, UTA im Wein, Möglichkeiten zur Vermeidung der Untypischen Alterungsnote, *Der Deutsche Weinbau* 18:18–21.
- Hayon, E., Treinin, A., and Wolfe, J., 1972, Electronic spectra, phytochemistry and autoxidation mechanism of the sulfite-bisulfite pyrosulfite system. The SO_2^- , SO_3^- and SO_3 -radicals, *J. Chem. Soc.* 94:47–57.
- Hoenicke, K., 1997, Bestimmung von Tryptophan-Metaboliten als potentielle Marker der Bildung einer untypischen Alterungsnote (UTA) in Wein, *Dissertation submitted for a diploma*, University of Hamburg, Dep. of food chemistry.
- Horng, A.J. and Yang, S.F., 1975, Aerobic oxidation of indole-3-acetic acid with bisulfite, *Phytochemistry* 14:1425–1428.
- Jawanda, J.S., Singh, R., and Pal, R.N., 1974, Effect on growth regulators on floral bud, drop, fruit characters and quality of Thompson seedless grape, *Vitis* 13:215–221.
- Kemmer, H., Dehnhard, M., and Claus, R., 1997, Screening of indoles in cheese, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 205:433–436.
- Kochen, W., Byrd, D.J., Buehner, R., and Buehrlein, E., 1975, Tryptophan metabolism in untreated phenylketonuric patients, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 13:1–12.
- Köhler, H.J., Christoph, N., Geßner, M., and Bauer-Christoph, C., 1995, Die "Untypische Alterungsnote im Wein", Teil III: Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der untypischen Alterungsnote und dem Reifestadium der Trauben (Lesetermin), *Rebe & Wein* 48:424–430.
- Nijssen, B., 1991, Off-Flavors, in: *Volatile compounds in foods and beverages* (Maarse, H., ed.) 1st ed., pp. 689–735, Marcel Dekker, Inc. New York.
- Palamand, S.R. and Grigsby, J.H., 1974, Stale flavors in beer. Identification of o-aminoacetophenone and ethyl nicotinate in beer, *Brewers' Digest*. 49:58–59.
- Rapp, A., Versini, G., and Ullemeyer, H., 1993, 2-Aminoacetophenon: Verursachende Komponente der "Untypischen Alterungsnote" ("Naphthalinton", "Hybridton") bei Wein, *Vitis* 32:61–62.
- Rapp, A. and Versini, G., 1995, Fehlaroma: Die untypische Alterungsnote, *Der Deutsche Weinbau* 18:18–22.
- Schwab, A., Petermel, M., Köhler, H.J., and Heigel, K.P., 1996, Die "Untypische Alterungsnote im Wein", Teil IV: Einflüsse weinbaulicher Maßnahmen, *Rebe & Wein* 49:181–187.
- Shure, K.B. and Acree, T.E., 1994, Changes in the odor-active compounds in vitis labruscana cv. concord during growth and development, *J. Agric. Food Chem.* 42:350–353.
- Vivas, N., Saint Cric de Gaudeljac, N., and Glories, Y., 1997, Influence de SO_2 et de l'acide ascorbique sur l'activité antiradicalaire des tanins, mesurée sur l'anion superoxyde. Application aux vins rouges, *Vitis* 36:91–96.
- Walker, N.J. and Manning, D.J., 1976, Components of the musty off-flavour of stored dried lactic casein, *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 11:1–9.
- Yang, S. and Saleh, M., 1973, Destruction of indole-3-acetic acid during the aerobic oxidation of sulfite, *Phytochemistry* 12:1463–1466.
- Yang, S., 1984, Reactions of oxidation intermediates of sulfite species with some cellular components of plants, *Food Chem.* 15:113–124.

3.1.2

JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**"Untypical Aging Off-Flavor" in Wine: Synthesis of Potential Degradation Compounds of Indole-3-acetic Acid and Kynurenine and Their Evaluation as Precursors of 2-Aminoacetophenone**KATRIN HOENICKE,[†] OLE BORCHERT,[‡] KAI GRÜNING,[‡] AND THOMAS J. SIMAT^{*,‡}

Institute of Biochemistry and Food Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, D 20146 Hamburg, Germany, and Institute of Food Chemistry, Technical University of Dresden, Bergstrasse 66, D 01062 Dresden, Germany

Kynurenine (1) and indole-3-acetic acid (2) are considered as potential precursors of 2-aminoacetophenone (3), which is regarded to be the aroma impact compound causing an "untypical aging off-flavor" (UTA) in *Vitis vinifera* wines. The mechanism of the formation of 3 was studied using model fermentation and model sulfuration media spiked with 1 or 2 as potential precursors. Possible degradation products such as kynurenamine (4) and kynurenic acid (5), or skatole (6), 2-oxoskatole (7), 2-formamidoacetophenone (8), 2-oxindole-3-acetic acid (9), and 3-(2-formylaminophenyl)-3-oxopropionic acid (10) were evaluated by HPLC–UV of the fermentation and sulfuration media and comparison with synthesized 7, 8, 9, and 10. The synthesis of the possible precursor 4-(2-aminophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid (11), a proposed metabolite of 1 failed because a spontaneous cyclization yields 5 and *N*-oxo-kynurenic acid (12), but not 11. It could be shown that the formation of 3 is triggered by an oxidative degradation of 2 after sulfuration with potassium bisulfite via the intermediates 10 and 8. However, no formation of 3 occurred during sulfuration of a model wine spiked with 1 or during fermentation of a model must spiked with 1 or 2.

KEYWORDS: 2-Aminoacetophenone; indole-3-acetic acid; kynurenine; synthesis; model fermentation; sulfuration; HPLC analysis; untypical aging off-flavor (UTA); *Vitis vinifera*

INTRODUCTION

2-Aminoacetophenone (3) is known as the aroma impact compound being responsible for an "untypical aging off-flavor" (UTA) in *Vitis vinifera* wines (1). The off-flavor can be formed in the bottle or in the wine cask within a few months after fermentation. UTA is described by aroma descriptors such as furniture polish, wet wool, mothball, fusel alcohol, or acacia blossom combined with a loss of the typical bouquet of the grape variety. Depending on the wine, the off-flavor can be realized sensorially at 0.5–1.5 µg/L of 3 (2–4). Investigations on the time course of the formation of 3 during vinification revealed that its concentration is below the odor threshold in the berry, in the must, and in the wine directly after fermentation, and its significant formation occurred during storage of the sulfurized wines (5–7).

Compound 3 also causes off-flavors in products from milk such as stored dried lactic casein (8) or concentrated sterilized milk (9), as well as in products from corn (tortilla or taco chips

(10)), and in beer (11). The biosynthesis of 3 is generally connected with the tryptophan metabolism (12, 13). Several investigations have been done on the elucidation of the formation of 3 from tryptophan and its metabolites in human or animal organisms and by microorganisms. In wine especially, the tryptophan metabolites kynurenine (1) and indole-3-acetic acid (2) are discussed as potential precursors of 3 (Figure 1A and B). Studies by Kochen et al. (14) showed that the formation of 3 in untreated phenylketonuric patients is characterized by an enzymatic degradation of tryptophan via *N*-formylkynurenine and 1. Kaseda et al. (15) discussed the synthesis of 3 from 1 in rat liver via an enzymatic decarboxylation yielding kynurenamine (4), which is nonenzymatically converted to 3. Investigations of Yonaha et al. (16) and Shin et al. (17) on the metabolism of 1 in yeast showed that 1 is mainly metabolized by kynurenine transaminase to kynurenic acid (5). 4-(2-Aminophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid (11) has been postulated as a precursor of 5 in this metabolic route (18). Considering the similarity of 11 to 3, 11 can be supposed as a potential precursor of 3 (Figure 1A). The existence of a group of oxygenases in plants and animals which oxidizes the pyrrole ring of both 2 and skatole (6) yielding 2-formamidoacetophenone (8) and 3 was reported by Frydman et al. (19).

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +49 351 463 31475. Fax: +49 351 463 34138. E-mail: thomas.simat@chemie.tu-dresden.de.

[†] University of Hamburg.

[‡] Technical University of Dresden.

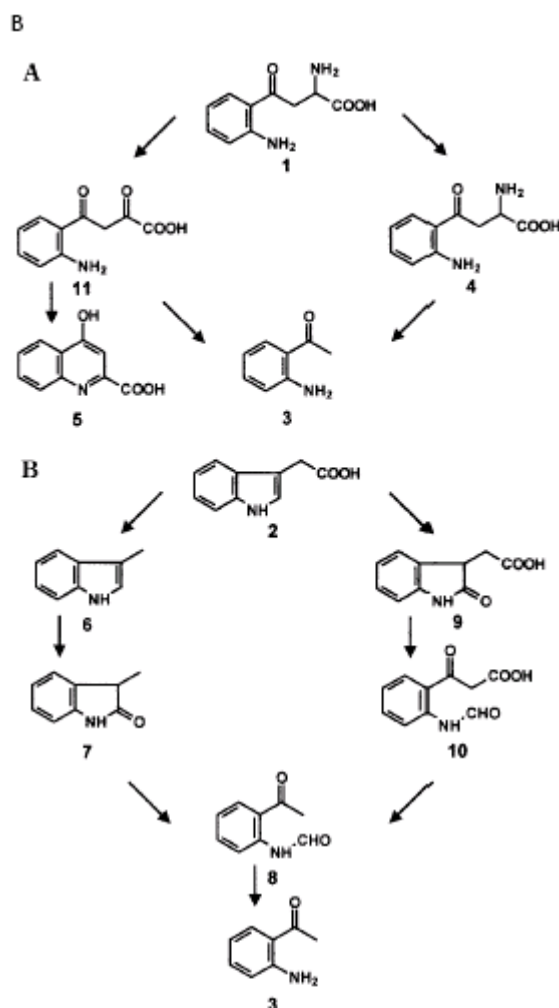


Figure 1. (A) Possible pathways of 2-aminoacetophenone formation from kynurenine (1, kynurenine; 3, 2-aminoacetophenone; 4, kynurenamine; 5, kynurenic acid; 11, 4-(2-aminophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid). (B) Possible pathways of 2-aminoacetophenone formation from indole-3-acetic acid (2, indole-3-acetic acid; 3, 2-aminoacetophenone; 6, skatole; 7, 2-oxoskatole; 8, 2-formamidoacetophenone; 9, 2-oxindole-3-acetic acid; 10, 3-(2-formylamino)-phenyl-3-oxopropionic acid).

In wine, besides an enzymatic formation of **3** by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation (6, 20, 21), a nonenzymatic mechanism was discussed. Christoph et al. (22) reported a formation of **3** by reaction of **2** with sulfite. They identified **6** and **8** as degradation products and postulated two possible degradation pathways: a decarboxylation occurs either prior to pyrrole ring oxidation yielding **6** and 2-oxoskatole (**7**) or after pyrrole ring oxidation yielding 2-oxindole-3-acetic acid (**9**) and 3-(2-formylamino)-phenyl-3-oxopropionic acid (**10**).

The aim of this study was to investigate possible pathways of the formation of **3** proceeding from the tryptophan metabolites **1** and **2** by analysis of their degradation compounds using different model fermentation and model sulfuration systems. We report the synthesis of potential degradation compounds and discuss the role of the identified substances as a precursor of **3**.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. 2-Aminoacetophenone, indole-3-acetic acid, kynurenamine, kynurenic acid, kynurenine, and indole-3-aldehyde were obtained

Hoenicke et al.

from Sigma (Deisenhofen, Germany), and skatole was from Merck (Darmstadt, Germany). *Saccharomyces cerevisiae* (Uvaferm CM 99/TH16) was provided by the Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau (Veitshöchheim, Germany).

Synthesis of Intermediate Compounds. *General.* The structures of the synthesized intermediate compounds were confirmed by ^1H - and ^{13}C -NMR, MS, and IR spectroscopy, as well as by melting-point (mp) determination and elementary analysis. The purities of the synthesized compounds were determined by HPLC–UV at 260 nm. ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded on a Bruker AMX 400 instrument (Karlsruhe, Germany) at 400 and 100.67 MHz, respectively, using deuterated solvents and tetramethylsilane as internal standard. Electron impact (EI) or fast atomic bombardment (FAB) mass spectra were obtained on a Varian 311 A instrument (Darmstadt, Germany) at 70 eV. IR spectra were measured using a Perkin-Elmer FT-IR 1720X spectrometer (Überlingen, Germany). Uncorrected mp determinations were made using an Olympus BH-2 polarization microscope (Hamburg, Germany).

Synthesis of N-oxo-Kynurenic Acid (12). Compound **12** was synthesized according to Makino et al. (18) in three steps via 4-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid ethyl ester and 4-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid. 4-(2-Nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid ethyl ester was prepared by dissolving 5 g of o-nitroacetophenone (30 mmol) and 4.4 g of diethyl oxalate (30 mmol) in 6 g of ethanol (99%) and then stirred for 1 h. After being left in the refrigerator overnight at -18°C , the crystalline deposit was filtered, washed with diethyl ether, and subsequently dissolved in ice water. The solution was filtered and acidified with acetic acid. The acidified solution was centrifuged, and the crystalline deposit was dried and recrystallized from ethanol (99%) yielding 2.8 g of 4-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid ethyl ester (10 mmol, 34%). 4-(2-Nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid was then prepared by dissolving 2.4 g 4-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid ethyl ester (8 mmol) in 20 mL of 1 M sodium hydroxide. The solution was stirred for 30 min at room temperature, filtered, and acidified with hydrochloric acid (10%). This solution was centrifuged and the deposit was lyophilized yielding 1.12 g of 4-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid (4.8 mmol, 60%). **12** was obtained after treatment of 0.95 g of 4-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid (4 mmol) in 10 mL of ethanol (99%) with 100 μL of triethylamine and hydrogenation with a palladium-katalysator (250 mg, 10% on carbon) by stirring the solution for 1 h at -35°C under hydrogen. The mixture was filtered, and the deposit was dissolved in ethanol (99%) and filtered again. Both filtrates were combined and the solvent was removed. The crystalline deposit was recrystallized from ethanol (99%). After the crystalline deposit was lyophilized, 0.16 g of **12** was yielded (0.8 mmol, 20%).

4-(2-Nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid ethyl ester. $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_6$, $M = 265.2$. Bright yellow crystals, mp $88\text{--}89^\circ\text{C}$. Purity 96%. ^1H NMR: $\delta = 8.04$ (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-10), 7.75 (1H, dd, $J = 7.6$ and 8.1 Hz, H-8), 7.68 (1H, dd, $J = 7.6$ and 8.1 Hz, H-9), 7.60 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-7), 6.65 (1H, s, H-3), 4.38 (2H, q, H-11), 1.39 (3H, t, H-12) ppm. ^{13}C NMR: $\delta = 193.7$ (C-1), 165.8 (C-2), 161.5 (C-4), 133.5 (C-9), 131.9 (C-8), 128.8 (C-10), 124.7 (C-7), 102.1 (C-3) 62.9 (C-11), 14.1 (C-12) ppm. MS (EI): $m/z = 266$ [$M + \text{H}$] $^+$ (0.3), 192 (28), 150 (100), 131 (10), 104 (14), 76 (26), 57 (12), 51 (18). MS (FAB): $m/z = 266$ [$M + \text{H}$] $^+$ (100). IR (KBr): 3102, 2998, 1729, 1639, 1573, 1524, 1475, 1418, 1368, 1348, 1313, 1256, 1112, 1054, 1017 cm^{-1} . Elementary analysis: C = 54.1% (54.3%), H = 4.1% (4.2%), N = 5.1% (5.3%).

4-(2-Nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid. $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_6$, $M = 237.2$. Bright yellow crystals, mp $157\text{--}158^\circ\text{C}$. Purity 99%. ^1H NMR: $\delta = 8.09$ (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-10), 7.83 (1H, dd, $J = 7.6$ and 8.1 Hz, H-8), 7.74 (1H, dd, $J = 7.6$ and 8.1 Hz, H-9), 7.68 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-7), 6.37 (1H, s, H-3) ppm. ^{13}C NMR: $\delta = 203.5$ (C-1), 164.1 (C-2), 147.3 (C-4), 134.5 (C-9), 132.0 (C-8), 129.2 (C-10), 124.6 (C-7), 102.2 (C-3) ppm. MS (EI): $m/z = 238$ [$M + \text{H}$] $^+$ (0.3), 192 (27), 177 (3), 150 (100), 147 (54), 134 (18), 104 (18), 90 (15), 77 (20), 76 (47), 69 (12), 63 (14), 51 (32). MS (FAB): $m/z = 238$ [$M + \text{H}$] $^+$ (100). IR (KBr): 3084, 2894, 1734, 1628, 1599, 1538, 1444, 1410, 1377, 1274, 1243, 1131, 1035 cm^{-1} . Elementary analysis: C = 49.9% (50.6%), H = 2.9% (3.0%), N = 5.7% (5.9%).

Potential Source of Untypical Aging Off-Flavor in Wine

C

12. $C_{12}H_7NO_4$. M = 205.2. Bright yellow crystals, mp 200–202 °C. Purity 95%. 1H NMR: δ = 8.52 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-8), 8.31 (1H, d, J = 7.1 Hz, H-5), 8.07 (1H, dd, J = 7.1 and 8.7 Hz, H-7), 7.86 (1H, dd, J = 7.1 and 7.1 Hz, H-6), 7.53 (1H, s, H-3) ppm. ^{13}C NMR: δ = 161.9 (C-9), 159.8 (C-4), 138.0 (C-2), 136.2 (C-8a), 133.5 (C-7), 129.0 (C-6), 123.5 (C-5), 122.8 (C-4a), 118.1 (C-8), 104.2 (C-3) ppm. MS (EI): m/z = 206 [M + H] $^+$ (0.1), 161 (57), 160 (26), 146 (11), 145 (100), 144 (9), 117 (60), 116 (48), 104 (28), 103 (10), 90 (36), 89 (44), 77 (33), 76 (36), 75 (10), 64 (16), 63 (28), 59 (12), 51 (16), 50 (26). MS (FAB): m/z = 206 [M + H] $^+$ (100). IR (KBr): 3105, 1696, 1603, 1532, 1450, 1381, 1301, 1275, 1241, 1202, 1159, 1115 cm^{-1} . Elementary analysis: C = 57.7% (58.5%), H = 3.6% (3.4%), N = 6.7% (6.8%).

Synthesis of 2-Oxoskatole (7). Compound 7 was prepared according to Savige and Fontana (23) by treating an ice-cooled solution of 5.0 g of 6 (38.1 mmol) in 25 mL of glacial acetic acid dropwise with a mixture of 4.5 mL of dimethyl sulfoxide and 12.5 mL of concentrated hydrochloric acid (37%). After the solution was stirred for 1 h at room temperature the pH was adjusted to 3 with ammonia (25%) under ice-cooling. Subsequently, 30 mL of ethyl acetate was added, and the organic layer was washed to neutral pH. The solvent was evaporated to dryness and the residue was purified by column chromatography on silica gel 60 (70–230 mesh). 1.5 g of 7 (10.2 mmol, 27%) was obtained using ethyl acetate as eluent. C_9H_7NO . M = 147.2. Bright yellow crystals, mp 121 °C. Purity 98%. 1H NMR: δ = 7.22 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-4), 7.21 (1H, dd, J = 7.1 and 7.6 Hz, H-6), 7.03 (1H, dd, J = 7.1 and 7.6 Hz, H-5), 6.90 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-7), 3.44 (1H, q, J = 7.6 Hz, H-3), 1.50 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-8a) ppm. ^{13}C NMR: δ = 181.2 (C-2), 141.1 (C-7a), 131.3 (C-3a), 127.9 (C-6), 123.8 (C-4), 122.4 (C-5), 109.7 (C-7), 41.0 (C-3), 15.2 (C-8) ppm. MS (EI): m/z = 147 [M + H] $^+$ (100), 132 (24), 128 (8), 119 (73), 104 (13), 47 (13). IR (KBr): 3197, 2972, 1714, 1678, 1621, 1473, 1402, 1378, 1337, 1232 cm^{-1} . Elementary analysis: C = 73.1% (73.5%), H = 6.0% (6.2%), N = 9.2% (9.5%).

Synthesis of 2-Formamidoacetophenone (8). According to Filstriter and Jumbam (24), a mixture of 1.0 g of 3 (7.4 mmol), 1.4 mL of acetic anhydride, and 2.2 mL of formic acid was stirred for 30 min under ice-cooling. After 2 h, 30 mL of diethyl ether and 15 mL of saturated sodium hydrogen carbonate solution were added. The aqueous layer was extracted twice with diethyl ether, and the organic phase was dried over sodium sulfate. After evaporation, the residue was recrystallized from ethanol yielding 0.95 g of 8 (5.8 mmol, 78%). $C_9H_9NO_2$. M = 163.2. Colorless crystals, mp 78–79 °C. Purity 99%. 1H NMR: δ = 11.59 (1H, bs, –NH), 8.71 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-3), 8.43 (1H, s, –CHO), 7.90 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-6), 7.51 (1H, t, J = 7.5 and 7.9 Hz, H-5), 7.17 (1H, t, J = 7.5 and 7.6 Hz, H-4), 2.60 (3H, s, –CH $_3$). MS (EI): m/z = 163 [M + H] $^+$ (34), 148 (14), 135 (65), 120 (100), 92 (41), 65 (34). IR (KBr): 3253, 1685, 1647, 1604, 1579, 1516, 1454, 1406, 1390, 1361, 1309, 1254, 1211 cm^{-1} . Elementary analysis: C = 66.2% (66.3%), H = 5.6% (5.6%), N = 8.6% (8.6%).

Synthesis of 2-Oxindole-3-acetic acid (9). Compound 9 was synthesized according to Lawson and Witkop (25) by treating 5.0 g of 2 (28.5 mmol) in 250 mL of acetic acid (50%) with 9.2 g of *N*-bromosuccinimide (57 mmol) in 25 mL of glacial acetic acid. The mixture was stirred for 1 h at room temperature. A palladium-katalysator (500 mg, 10% on carbon) was added, and the solution was stirred for further 17 h under hydrogen, filtered, and the solvent was removed. The residue was poured into water, extracted with ethyl acetate, and dried with sodium sulfate. The solvent was removed, and the crystalline deposit was recrystallized from a mixture of toluol/diethyl ether (50:50, v:v) yielding 2.9 g of 9 (15.2 mmol, 52%). $C_{10}H_7NO_3$. M = 191.2. Bright yellow crystals, mp 142 °C. Purity 98%. 1H NMR: δ = 7.21 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-4), 7.15 (1H, dd, J = 7.6 and 7.6 Hz, H-6), 6.90 (1H, dd, J = 7.6 and 7.6 Hz, H-5), 6.80 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-7), 3.62 (1H, dd, H-3), 2.89 (1H, dd, H-8 β), 2.69 (1H, dd, J = 17.3 Hz, H-8a) ppm. ^{13}C NMR: δ = 184.3 (C-9), 178.3 (C-2), 133.1 (C-6), 129.3 (C-4), 127.0 (C-5), 114.9 (C-7), 47.6 (C-3), 40.1 (C-8) ppm. MS (EI): m/z = 191 [M + H] $^+$ (20), 145 (100), 117 (64), 99 (19), 90 (38), 78 (51), 69 (9), 63 (14), 56 (23), 51 (21). IR (KBr): 3250, 1735, 1684, 1621, 1487, 1472, 1408, 1341, 1266, 1214, 1155, 1105, 1020 cm^{-1} .

Table 1. Detection Limits ($\mu g/L$) of 1–10 Using the Respective HPLC Conditions Described under HPLC Analysis (1, Kynurenine; 2, Indole-3-acetic Acid; 3, 2-Aminoacetophenone; 4, Kynurenamine; 5, Kynurenic Acid; 6, Skatole; 7, 2-Oxoskatole; 8, 2-Formamidoacetophenone; 9, 2-Oxindole-3-acetic Acid; 10, 3-(2-Formylaminophenyl)-3-oxopropionic Acid)

	UV _{280nm}	UV _{250nm}
1	10	
2		73
3	5	48
4	12	
5	8	
6		47
7		47
8		26
9		103
10		104

Elementary analysis: C = 62.2% (62.8%), H = 4.8% (4.7%), N = 7.2% (7.3%).

Synthesis of 3-(2-Formylaminophenyl)-3-Oxopropionic Acid (10). 10 was prepared according to Schöpf et al. (26) by suspending 5.2 g of 2 (29.7 mmol) in 100 mL of tetrahydrofuran and 3 mL of methanol. The solution was aerated with oxygen (containing 2 vol-% ozone) for 3 h at –78 °C. After warming up to 0 °C, a palladium-katalysator (500 mg, 10% on carbon) was added. The solution was stirred for 2 h under hydrogen, filtered, and the solvent was removed. The residue was washed with ethyl acetate, and the precipitate was isolated and recrystallized twice from methanol yielding 2.0 g of 10 (9.7 mmol, 33%). $C_{10}H_9NO_4$. M = 207.2. Colorless crystals, mp 237 °C. Purity 98%. MS (FAB): m/z = 208 [M + H] $^+$ (15), 154 (100), 136 (73). A characterization by 1H - and ^{13}C -NMR failed because of the instability of 10. IR (KBr): 3340, 1734, 1673, 1584, 1519, 1453, 1407, 1326, 1302, 1205, 1151 cm^{-1} . Elementary analysis: C = 58.5% (58.0%), H = 4.3% (4.4%), N = 6.8% (6.8%).

Model Fermentation Medium. A must-like model solution consisting of glucose (95 g/L), fructose (95 g/L), ethanol (5 g/L), malic acid (3.5 g/L), tartaric acid (3 g/L), $MgSO_4 \cdot H_2O$ (1.65 g/L), K_2HPO_4 (1.5 g/L), $CaCl_2 \cdot H_2O$ (0.5 g/L), and diammoniumphosphate (1 g/L), adjusted to pH 3.5 with 1 M sodium hydroxide, was spiked with 100 mg/L 1 or 2, respectively. The fermentations were carried out in 1-L flasks, and incubated on a shaker (100 U min^{-1}) at room temperature after inoculation with 20 g/mL *S. cerevisiae*. Samples were taken at different intervals during fermentation over a period of four weeks. For HPLC analysis samples were filtered through a 0.2 μm microfilter (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany).

Sulfuration of Model Wines. A wine-like model solution consisting of ethanol (10 vol%), tartaric acid (5 g/L), and malic acid (5 g/L), adjusted to pH 3.3 with 1 M sodium hydroxide, was spiked with 200 mg/L of 1, 2, or other potential precursors and sulfurized with 100 mg/L potassium bisulfite. The solutions were stored at room temperature, or at 45 °C to simulate storage at room temperature for several months. Samples were taken in different intervals over a period of three weeks.

HPLC Analysis. Determination of 1 and its Relevant Degradation Products 3–5 (HPLC–UV_{240nm}). The HPLC–UV_{240nm} system consisted of a Merck 655A-12 liquid chromatograph, a Merck L-5000 LC controller, a Merck T-6300 column thermostat, and a LDC/Milton Roy SpectroMonitor D variable wavelength detector (Milton Roy, Hasselroth, Germany), set at 240 nm. Signals were acquired and calculated using ChromStar software (SCPA, Stuhl, Germany). Chromatographic separations were carried out on a Nucleosil 120-3 C $_{18}$ column (250 mm $\times$ 4 mm) (CS, Langerwehe, Germany) equipped with a precolumn (20 mm $\times$ 4 mm) using a binary gradient (solvent A, 0.1% trifluoroacetic acid in bidistilled water; solvent B, methanol). The following gradient was used: 0 min, 5% B; 25 min, 40% B. The column was washed for 2 min with 40% B after each run and equilibrated for 8 min at the starting conditions. The flow rate was set to 0.8 mL/min, the injection volume was 20 μL , and the temperature of the column thermostat was 35 °C. Detection limits are given in Table 1.

D

Hoenicke et al.

Determination of 2 and Relevant Degradation Products 3, 6–10 (HPLC–UV_{260nm}). The HPLC–UV_{260nm} system consisted of a TSP AS 100 autosampler with integrated thermostat (Thermo Separation Products, Egelsbach, Germany), a Merck L 6200 A pump, and a Merck L 4250 UV–Vis detector, set at 260 nm. Signals were acquired and calculated using the ChromStar software. Chromatographic separations were carried out on a Nucleosil 120-3 C₁₈ column (250 mm × 4 mm) equipped with a precolumn (20 mm × 4 mm) using a ternary gradient (solvent A, 0.1% trifluoroacetic acid in bidistilled water; solvent B, methanol; solvent C, acetonitrile). The following gradient was used: 0 min, 7% B, 11% C; 30 min, 7% B, 11% C; 40 min, 7% B, 50% C. The column was washed for 10 min with 7% B, 50% C after each run and equilibrated for 8 min at the starting conditions. The flow rate was set to 0.8 mL/min, the injection volume was 20 µL, and the temperature of the column thermostat was 31 °C. Detection limits are given in Table 1.

HPLC–UV/MS. The HPLC–UV/MS analysis was performed on a HP 1100 series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a HP 1100 variable UV detector set at 260 nm, and a HP 1100 mass selective detector equipped with an electrospray ionization (ESI) source. MS parameters were the following: positive or negative mode, respectively; drying gas flow, 10.0 L/min; drying gas temperature, 350 °C; nebulizer pressure, 60 psig; capillary voltage, 3500 V; and fragmentation voltage, 30 V. Chromatographic separations were carried out on a Nucleosil column 120-3 C₁₈ (250 mm × 4 mm) equipped with a precolumn (20 mm × 4 mm) using a binary gradient (solvent A, ammoniumformate in bidistilled water, 5 mM, pH 3; solvent B, acetonitrile). The following gradient was used: 0 min, 5% B; 50 min, 50% B; 52 min, 5% B. The column was equilibrated for 8 min at the starting conditions. The flow rate was set to 1 mL/min, the injection volume was 50 µL, and the temperature of the column thermostat was 35 °C. System control, data acquisition, and processing were performed with the Agilent Technologies LC/MSD ChemStation, Rev. A.08.03.

Preparative HPLC. The preparative HPLC system consisted of a Merck NovaPrep 200 pump fitted with a 5-mL sample loop, and a Merck L-7400 UV detector, set at 260 nm. Separations were carried out on a Merck Lichrospher 100-7 C₁₈ preparative column (250 mm × 25 mm). The mobile phase was water/acetonitrile (99:1). The flow rate was 4 mL/min.

RESULTS AND DISCUSSION

The desired compounds were obtained in sufficient amounts by using previously published methods of synthesis, which were varied and optimized in order to yield reference substances in a high purity (>95%). With these compounds it was possible to establish two different HPLC methods for the separation of 1 or 2 and their respective relevant degradation products giving high resolution of all substances of interest (Figure 2A and B).

The synthesis of 11 according to the method of Makino et al. (18) in three steps via 4-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid ethyl ester and 4-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid failed. During hydrogenation of 4-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid only 5 and 12 were obtained. By varying the hydrogenation parameters only the yield of 12 could be changed, but 11 was not obtained. These findings are in accordance with the results reported by Musajo et al. (27), indicating that there is a spontaneous cyclization before a complete hydrogenation (Figure 3). Compound 3 was not detectable in any of the synthesis batches, indicating that a formation of 3 from 1 via 11 is very improbable.

Evaluation of 1 as a Potential Precursor. *Fermentative Formation of 3 from 1 by S. cerevisiae.* To investigate a fermentative formation of 3 from 1 a model must solution spiked with 1 was fermented with *S. cerevisiae*, and the degradation of 1 was monitored by HPLC–UV_{260nm}. Only the formation of 5 could be detected during fermentation. After four weeks 35% of 1 was consumed by the yeast and 2 mol% was metabolized to 5. A formation of 3 could not be detected (<0.008 mol%).

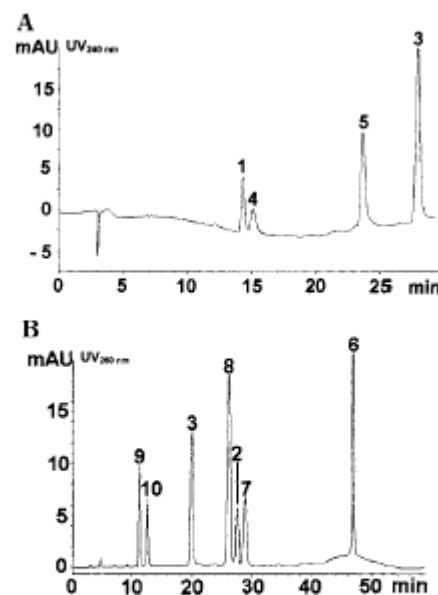


Figure 2. (A) HPLC–UV_{260nm} chromatogram obtained from a standard mixture of kynurenine (1), 2-aminoacetophenone (3), kynurenamine (4), and kynurenic acid (5). (B) HPLC–UV_{260nm} chromatogram obtained from a standard mixture of indole-3-acetic acid (2), 2-aminoacetophenone (3), skatole (6), 2-oxoskatole (7), 2-formamidoacetophenone (8), 2-oxindole-3-acetic acid (9), and 3-(2-formylaminophenyl)-3-oxopropionic acid (10).

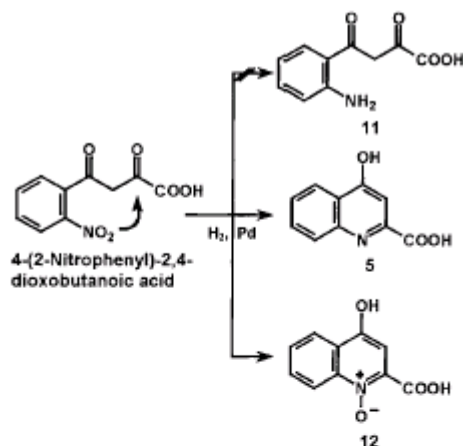


Figure 3. Formation of kynurenic acid (5) and *N*-oxo-kynurenic acid (12) by hydrogenation of 4-(2-nitrophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid.

These findings confirm earlier studies by other authors on the metabolism of 1 in yeast, who describe its significant metabolism to 5 by kynurenine transaminase (16, 17). However, Dollmann et al. (21) reported a possible formation of 3 by *S. cerevisiae*. After fermentation of a model must spiked with 80 mg/L of 1 they detected up to 55 µg/L of 3 in the wine, which complies with a conversion of 0.1 mol%. Our investigations excluded a relevant formation of 3 from 1 during fermentation. This finding is in accordance with results of Gessner et al. (6). The authors analyzed only 0.4 µg/L of 3 after fermentation of a must spiked with 25 mg/L of 1 and fermented with *S. cerevisiae*. This complies with a conversion of only 0.002 mol%.

Nonfermentative Formation of 3 from 1 by Sulfuration. A wine-like model solution was spiked with 1 and sulfurized, and

Potential Source of Untypical Aging Off-Flavor in Wine

E

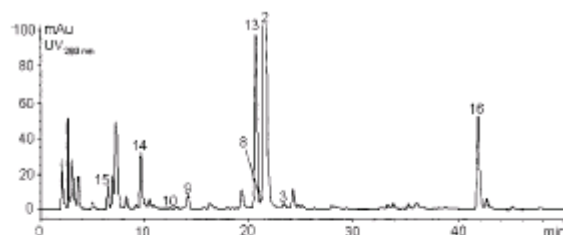


Figure 4. HPLC–UV/MS chromatogram obtained from a model wine solution spiked with **2** directly after sulfuration (**2**, indole-3-acetic acid; **3**, 2-aminocetophenone; **8**, 2-formamidoacetophenone; **9**, 2-oxindole-3-acetic acid; **10**, 3-(2-formylaminophenyl)-3-oxopropionic acid; **13**, indole-3-aldehyde; **14**, (2-sulfoindole)-3-acetic acid; **15**, 2,3-dioxindole-3-acetic acid; **16**, 2-(3-indolylmethyl)-indole-3-acetic acid). Quantification of **8** was possible only by evaluation of its MS signal.

the degradation of **1** was monitored using HPLC–UV_{240nm}. Only the formation of **5** could be detected in this model system, too. After three weeks storage at 45 °C 20% of **1** had disappeared, but a formation of **3** was not detectable (<0.004 mol%). This finding is in accordance with results of Christoph et al. (22). They analyzed a conversion of <0.001 mol% by degradation of **1** added to a sulfurized ethanolic model solution. Because a formation of **3** from **1** could be observed neither by *S. cerevisiae* during fermentation nor by reaction with sulfite, **1** can be excluded as a likely precursor. Rather, our findings showed that a formation of **5** occurred both by fermentation and sulfuration of **1**.

Evaluation of **2 as a Potential Precursor. Fermentative Formation of **3** from **2** by *S. cerevisiae*.** To investigate a fermentative formation of **3** from **2** a model must solution spiked with **2** was fermented with *S. cerevisiae*, and the degradation of **2** was monitored by HPLC–UV_{260nm}. In the model fermentation medium the formation of **9** could be detected. Furthermore, indole-3-aldehyde (**13**) was identified by comparison of its retention time and mass spectrum with the corresponding commercially available reference substance. After fermentation 46% of **2** was metabolized by the yeast or degraded by biotic and abiotic processes yielding 15 mol% of **9** and 3 mol% of **13**, but not **3** (<0.06 mol%).

Hühn et al. (7) detected a formation of about 45 µg/L of **3** directly after fermentation of a synthetic must medium with *S. cerevisiae* which was spiked with 100 mg/L of **2**. This complies with a conversion of 0.06 mol%. Gessner et al. (6) reported a conversion rate of 0.08 mol% after fermentation of a real must with *S. cerevisiae* to which 50 mg/L of **2** was added.

Regarding a natural pool of **2** in grape musts of 150 µg/L (28) a conversion of 0.08 mol% to **3** during fermentation will lead to only 0.09 µg/L of **3**, which is far below its odor threshold of about 0.5–1.5 µg/L. Therefore, a metabolism of **2** to **3** by *S. cerevisiae* during fermentation seems to have a relatively low importance concerning the formation of UTA.

Nonfermentative Formation of **3 from **2** by Sulfuration.** A wine-like model solution spiked with **2** was sulfurized, and the degradation of **2** was monitored by HPLC–UV_{260nm} as well as by HPLC–UV/MS. Directly after sulfuration a large number of degradation products could be identified using HPLC–UV/MS (Figure 4). The oxidation products **9** and **13** were formed in this model system too. Moreover, traces of the degradation compounds **8** and **10** as well as **3** could be detected. The sulfuration product of **2** (2-sulfoindole)-3-acetic acid (**14**), 2,3-dioxindole-3-acetic acid (**15**), and 2-(3-indolylmethyl)-indole-3-acetic acid (**16**) were further identified by their respective mass

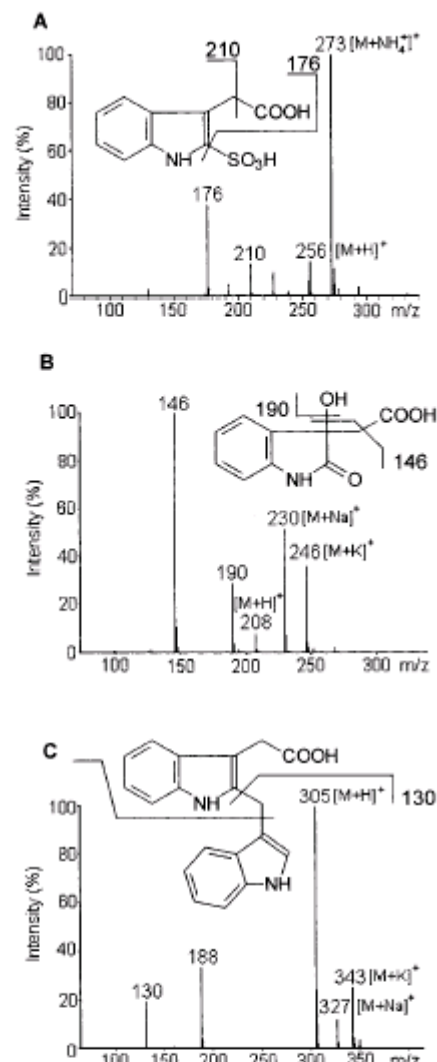


Figure 5. Mass spectra of the identified degradation products. A, (2-sulfoindole)-3-acetic acid (**14**); B, 2,3-dioxindole-3-acetic acid (**15**); C, 2-(3-indolylmethyl)-indole-3-acetic acid (**16**).

spectra (Figure 5). After three weeks of storage at room temperature, nearly 50% of **2** had disappeared while 7 mol% of **14**, 6 mol% of **13**, 6 mol% of **15**, 2 mol% of **9**, and 1 mol% of **3** were formed (quantities of the not-synthesized substances **14** and **15** were estimated according to the UV response of **2** or **9** as equivalents). Figure 6 shows the amounts of **2** and its degradation products detected by HPLC–UV/MS directly after sulfuration, after 1 day, and after 3 weeks, respectively. Nearly 60 mol% of degraded **2** could be identified. Forty mol% of degraded **2** was broken down into compounds not identified or not UV-active. The degradation of **2** and the formation of its degradation compounds occurred early after sulfuration, while in the later phase only a significant formation of **14** and **15** could be observed. Compounds **6** and **7** were not detected during the whole period of investigation (<0.06 mol%). In a blind test without addition of potassium bisulfite only **9** and **13** but no **3** (<0.03 mol%) were formed. According to other authors (29, 30) the formation of **9** and **13** from **2** already occurs under the influence of atmospheric oxygen.

F

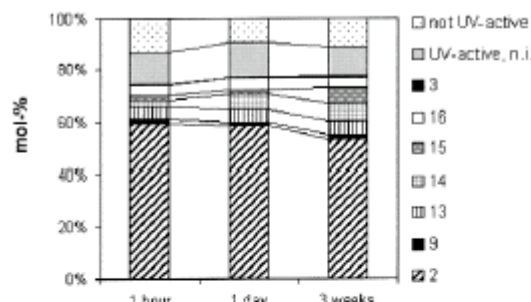


Figure 6. Amounts (mol%) of indole-3-acetic acid (2) and its degradation products detected directly after sulfuration, after 1 day, and after 3 weeks, respectively (3, 2-aminoacetophenone; 9, 2-oxindole-3-acetic acid; 13, indole-3-aldehyde; 14, (2-sulfoindole)-3-acetic acid; 15, 2,3-dioxindole-3-acetic acid; 16, 2-(3-indolylmethyl)-indole-3-acetic acid; n.i., not identified. Amounts of 3: 0.3 mol% (1 h); 0.4 mol% (1 day); 0.9 mol% (3 weeks).

The degradation compounds of 2 were also tested for their ability to form 3. The potential precursors 14 and 15 were isolated by preparative HPLC. For this, 0.5 g of 2 was added to 500 mL of a wine-like model solution and sulfurized with 2.5 g of potassium bisulfite. The reaction mixture was kept at room temperature for 12 days. The solvent was concentrated to 50 mL by lyophilization. Purified fractions of 14 and 15 were obtained after preparative HPLC. One hundred mg/L of the identified degradation compounds 8, 9, 10, 13, 14, or 15, respectively, were added to a wine-like model solution and sulfurized, and their degradation was monitored by HPLC–UV/MS. Of those, only 8 and 10 could be elucidated as precursors of 3. No formation of 3 occurred in the sulfurized model wine solutions spiked with 9, 13, 14, or 15. In the model wine spiked with 10 the formation of both 8 and 3 could be observed. These findings indicate that the formation of 3 from 2 occurs after a pyrrole ring cleavage of 2 yielding 10, which is further decarboxylated giving 8 and subsequently 3. However, an oxidation of the pyrrole ring yielding 9 or 15 did not lead to the formation of 3 under wine-like conditions. Therefore, the degradation pathway of 2 via 9 and 10 proposed by Christoph et al. (22) and shown in Figure 1B was not confirmed.

The oxidative degradation of 2 in the presence of sulfite and traces of oxidizing compounds was described by Horng and Yang (31). According to the authors superoxide, hydroxyl, and sulfite radicals, which were generated by the oxidation of sulfite to sulfate with residual oxygen, led to the formation of 14 and 15. Since 14 and 15 were proven to not be precursors of 3 under wine-like conditions the reported mechanism is not likely to be relevant in the formation of 3.

In a previous experiment (32) we proved that superoxide radicals are mandatory for the formation of 3. On the contrary, 9 or 15 were formed by reaction of 2 with hydroxyl radicals or both hydroxyl and superoxide radicals, respectively. Taking this into account, as well as the results of the *in vitro* oxidations of the synthesized compounds, the mechanism shown in Figure 7 can be assumed for the formation of 3 in wine from 2 after sulfuration. In accordance with other authors (31, 33, 34) the first step of the oxidative degradation of 2 is a one-electron oxidation at the 3-position of the indole ring in which both superoxide and hydroxyl radicals may function as a one-electron oxidant yielding the cation radical. By reaction of the radical cation with a superoxide radical 3-hydroperoxyindolenine-3-acetic acid can be formed (31, 33). An intramolecular nucleophilic addition of the hydroperoxide to the indolenine double bond followed by a ring opening yields 10. As was shown in

Hoenicke et al.

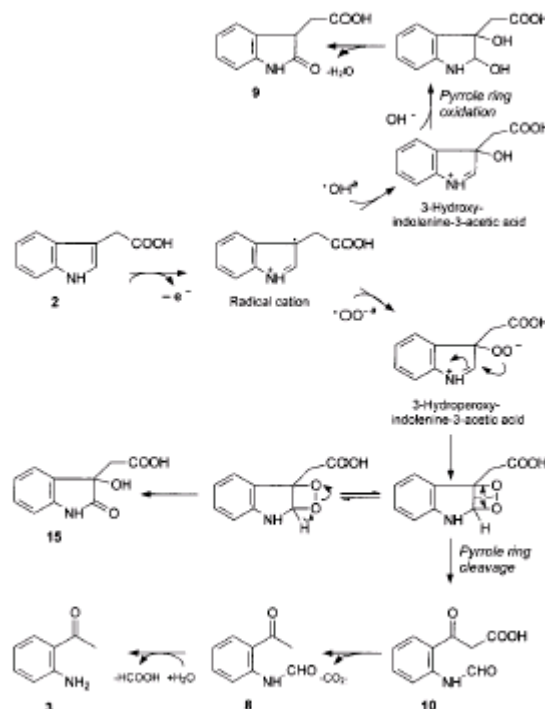


Figure 7. Proposed formation of 2-aminoacetophenone in wine triggered by an oxidative degradation of indole-3-acetic acid after sulfuration with potassium bisulfite (2, indole-3-acetic acid; 3, 2-aminoacetophenone; 8, 2-formamidoacetophenone; 9, 2-oxindole-3-acetic acid; 10, 3-(2-formylaminophenyl)-3-oxopropionic acid; 15, 2,3-dioxindole-3-acetic acid). Superscript a (*) designates a pathway investigated in ref. 32.

our experiments 10 is spontaneously decarboxylated giving 8 and subsequently 3. However, we could not detect the formation of the postulated intermediates such as 3-hydroperoxyindolenine-3-acetic acid. Therefore, the mechanism presented in Figure 7 is a plausible hypothesis.

In conclusion, in model fermentations no formation of 3 was detected from either 1 or 2. Considering both precursors were spiked 1000 times the amount naturally occurring, a fermentative pathway from both precursors to 3 seems to be unlikely. On the other hand, the formation of 3 was detected in a model wine spiked with 2 after sulfuration, but not in a model wine spiked with 1. The experiments with 2 as a possible precursor of 3 in wine-like model systems revealed an oxidative pathway from 2 via 10 and 8 to 3. We conclude that a formation of 3 in wine is most likely to occur after sulfuration, which is indispensable for white wine making. However, these experiments do not rule out that other factors might also contribute to the formation of 3 in wine, e.g., the amounts of transition metals and antioxidants, the altered metabolism by the yeast due to the nutrient composition of the corresponding must, and other influences which are still unknown. Because 3 is an impact compound contributing to the off-flavor of UTA the described oxidative pathway from 2 to 3 might be more or less important for UTA formation in wine. A prevention of UTA by addition of ascorbic acid prior to sulfuration as reported by Gessner et al. (35) might give evidence for this hypothesis. Nevertheless, UTA description varies significantly from one winegrowing area to another, indicating that other aroma compounds besides 3 may play an important role which cannot be explained by the mechanisms described in this study.

LITERATURE CITED

- (1) Rapp, A.; Versini, G.; Ullemeyer, H. 2-Aminoacetophenone: Verursachende Komponente der "Untypischen Alterungsnote" ("Naphthalinton", "Hybridon") bei Wein. *Vitis* 1993, 32, 61–62.
- (2) Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Gessner, M.; Köhler, H. J. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil I: Untersuchungen zum Auftreten und zur sensorischen Charakterisierung der "Untypischen Alterungsnote". *Rebe Wein* 1995, 48, 350–356.
- (3) Gessner, M.; Köhler, H. J.; Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Miltenberger, R.; Schmitt, A. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil II: Beschreibende Verkostung von UTA-Weinen; Beziehungen zwischen Sensorik und chemisch-physikalischen Analysenwerten. *Rebe Wein* 1995, 48, 388–394.
- (4) Fischer, U.; Sponholz, R. Die sensorische Beschreibung der Untypischen Alterungsnote. *Dtsch. Weinbau* 2000, 3, 16–21.
- (5) Christoph, N.; Gessner, M.; Simat, T. J.; Hoenicke, K. Off-Flavor Compounds in Wine and other Food Products Formed by Enzymatical, Physical, and Chemical Degradation of Tryptophan and its Metabolites. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999, 467, 659–669.
- (6) Gessner, M.; Köhler, H. J.; Christoph, N.; Bauer-Christoph, C. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil VII: Untersuchungen zur Bildung von *o*-Aminoacetophenon aus Produkten des Tryptophan-Stoffwechsels bei der alkoholischen Gärung. *Rebe Wein* 1996, 49, 251–255.
- (7) Höhn, T.; Sponholz, W. R.; Grossmann, M. Freisetzung unerwünschter Aromastoffe aus Pflanzenhormonen bei der alkoholischen Gärung. *Vitic. Enol. Sci.* 1999, 54, 105–113.
- (8) Walker, N. J.; Manning, D. J. Components of the musty off-flavour of stored dried lactic casein. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 1976, 11, 1–9.
- (9) Arnold, R. G.; Lindsay, R. C. Quantitative Determination of *N*-Methyl ketones and *o*-Aminoacetophenone in Sterilized Concentrated Milk. *J. Dairy Sci.* 1969, 7, 1097–1100.
- (10) Buttery, R. G.; Ling, L. C. Volatile flavor components of corn tortillas and related products. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 1878–1882.
- (11) Palamand, S. R.; Grigsby, J. H. Stale flavors in beer. Identification of *o*-aminoacetophenone and ethyl nicotinate in beer. *Brew. Dig.* 1974, 49, 58–60.
- (12) Mann, S. Besonderheiten im Tryptophanstoffwechsel von *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Hyg. Bacteriol.* 1967, 151, 474–491.
- (13) Cox, C. D.; Parker, J. Use of 2-Aminoacetophenone production in Identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 1979, 9, 479–484.
- (14) Kochen, W.; Byrd, D. J.; Böhner, R.; Böhrlen, E. Tryptophan-Stoffwechseluntersuchungen bei unbehandelten Phenylketonurikern. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 1975, 13, 1–12.
- (15) Kaseda, H.; Noguchi, T.; Kido, R. Biosynthetic routes to 2-aminoacetophenone and 2-amino-3-hydroxyacetophenone. *J. Biochem.* 1973, 74, 127–133.
- (16) Yonaha, K.; Morigouchi, M.; Hirasawa, T.; Yamamoto, T.; Soda, K. Occurrence of Kynurenine Aminotransferase in Extracts of Yeast. *Bull. Inst. Chem. Res.* 1975, 53, 315–318.
- (17) Shin, M.; Sano, K.; Umezawa, C. Metabolism of Tryptophan to Niacin in *Saccharomyces uvarum*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1991, 68, 41–51.
- (18) Makino, K.; Satoh, K.; Nishi, K. Synthesis of some Biological Intermediates of the Tryptophan Metabolism. *Kanamoto Med. J.* 1954, 6, 122–127.
- (19) Frydman, R. B.; Tomaro, M. L.; Frydman, B. Pyrroloxigenases: Biosynthesis of 2-Aminoacetophenone. *FEBS Lett.* 1971, 17, 273–276.
- (20) Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Gessner, M.; Köhler, H. J. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil VI: Untersuchungen zur Bildung von *o*-Aminoacetophenon aus Produkten des Tryptophan-Stoffwechsels vor der alkoholischen Gärung. *Rebe Wein* 1996, 49, 246–250.
- (21) Dollmann, B.; Wichmann, D.; Schmitt, A.; Köhler, H. J.; Schreier, P. Formation of the "untypical aging off-flavour" in wine: Generation of 2-aminoacetophenone in model studies with *Saccharomyces cerevisiae*. *Vitic. Enol. Sci.* 1996, 51, 122–125.
- (22) Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Gessner, M.; Köhler, H. J.; Simat, T. J.; Hoenicke, K. Bildung von 2-Aminoacetophenon und Formylaminoacetophenon im Wein durch Einwirkung von schwefliger Säure auf Indol-3-essigsäure. *Vitic. Enol. Sci.* 1998, 53, 79–86.
- (23) Savage, W. E.; Fontana, A. New Procedure for Oxidation of 3-Substituted Indoles to Oxindoles: Modification of Tryptophan Residues in Peptides and Proteins. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976, 332, 599–600.
- (24) Firsiroti, A.; Jumbam, D. N. Titanium-Induced Synthesis of Furans, Benzofurans, and Indoles. *Tetrahedron* 1992, 48, 5991–6010.
- (25) Lawson, W. B.; Witkop, B. A Simple Method for the Preparation of Oxindoleacetic and Propionic Acids from the Parent Indoles. *J. Org. Chem.* 1960, 26, 263–264.
- (26) Schöpf, C.; Koepke, G.; Kowald, B.; Schlöde, F.; Wunderlich, D. Darstellung und Eigenschaften der *o*-Formamino- und der *o*-Aminobenzoylessigsäure, zweier zellmöglicher Abbauprodukte des Tryptophans und Heteroauxins. *Chem. Ber.* 1956, 12, 2877–2887.
- (27) Musajo, L.; Spada, A.; Bulgarelli, E. Sintesi del l'acido *o*-nitrobenzoylpiruvico e sua riduzione catalitica. *Gazz. Chim. Ital.* 1950, 80, 161–170.
- (28) Hoenicke, K.; Christoph, N.; Simat, T. J.; Steinhart, H. The untypical aging off-flavor (UTA) in wine. Formation and possible preventions. *Czech. J. Food Sci.* 2000, 18, 52–54.
- (29) Bandurski, R. S.; Schulze, A.; Reinicke, D. M. Biosynthetic and metabolic aspects of auxins. In *Plant Growth Substances* 1985; Bopp, M., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1986; pp 83–91.
- (30) Maki, Y.; Oyabu, I.; Ohara, S.; Sako, M.; Kitade, Y.; Hirota, K. Photooxidative Decarboxylation of Indole-3-acetic Acid by Pyrimido[5,4-g]pteridine *N*-Oxide as a Biomimetic Reaction. *Chem. Pharm. Bull.* 1989, 12, 3239–3242.
- (31) Hong, A. J.; Yang, S. F. Aerobic Oxidation of Indole-3-acetic Acid with Bisulfite. *Phytochemistry* 1975, 14, 1425–1428.
- (32) Hoenicke, K.; Simat, T. J.; Steinhart, H.; Christoph, N.; Gessner, M.; Köhler, H. J. 'Untypical aging off-flavor' in wine: Formation of 2-aminoacetophenone and evaluation of its influencing factors. *Anal. Chim. Acta* 2002, 458, 29–37.
- (33) Hinman, R. L.; Lang, J. Peroxidase-catalyzed Oxidation of Indole-3-acetic Acid. *Biochemistry* 1965, 4, 144–158.
- (34) Balogh-Hergovich, É.; Speier, G. Ring cleavage and ring expansion of indoles by superoxide ion. *Tetrahedron Lett.* 1982, 23, 4473–4476.
- (35) Gessner, M.; Köhler, H. J.; Christoph, N. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil VIII: Auswirkung von Inhaltsstoffen und Antioxidantien auf die Bildung von *o*-Aminoacetophenon. *Rebe Wein* 1999, 52, 264–267.

Received for review December 17, 2001. Revised manuscript received April 24, 2002. Accepted April 24, 2002. This research project was supported by the Fränkischer Weinbauverband, the FEI (Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e.V., Bonn), the AIF, and the Ministry of Economics and Technology. AIF project 11770 N.

JF011672R

3.1.3



Analytica Chimica Acta 458 (2002) 29–37

ANALYTICA
CHIMICA
ACTA

www.elsevier.com/locate/aca

‘Untypical aging off-flavor’ in wine: formation of 2-aminoacetophenone and evaluation of its influencing factors

Katrin Hoenicke^a, Thomas J. Simat^{a,*}, Hans Steinhart^a, Norbert Christoph^b,
Martin Geßner^c, Hans-Jürgen Köhler^c

^a Institute of Biochemistry and Food Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, D-20146 Hamburg, Germany

^b Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern, Ludolphstr. 1, D-97082 Würzburg, Germany

^c Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Herrstr. 8, D-97209 Veitshöchheim, Germany

Received 20 June 2001; accepted 6 November 2001

Abstract

2-Aminoacetophenone (AAP) is known as the character impact compound responsible for the so called untypical ‘aging off-flavor’ (UTA) in *Vitis vinifera* wines. The formation of AAP is caused by an oxidative degradation of the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA), triggered by sulfuration after fermentation. Using different radical generating systems (hydroxyl and/or superoxide radical generating systems) it could be shown especially that superoxide radicals are responsible for the formation of AAP. Hereby, a pyrrole ring cleavage of IAA yields 3-(2-formylaminophenyl)-3-oxo-propionic acid (FAPOP), *N*-formyl-2-aminoacetophenone (FAP), and AAP. Analysis of 32 grape musts and their corresponding wines revealed that wines with a higher superoxide radical scavenger activity are less prone to UTA formation. However, UTA is not correlated with the IAA content of the must or wine. Differences in the release of IAA during fermentation of musts derived from early and late harvested grapes indicate a correlation between the ripeness of the processed grapes, the IAA content at the time of sulfuration, and the UTA formation. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Untypical aging off-flavor (UTA); Wine; 2-Aminoacetophenone; Indole-3-acetic acid; Superoxide radical; Radical scavengers

1. Introduction

Since 1989, there has been an increase in the incidence of white wines with an atypical change of the bouquet characterized by odor taints like naphthalene, floor polish, wet wool, fusel alcohol or acacia blossom. This off-flavor was called ‘untypical aging off-flavor’ (UTA) since it developed within a few months after fermentation and sulfuration in the young wine,

in contrast to the typical aging of a wine. In some years, about 20% of the rejected white wines in the vintage wine certification of different wine growing regions in Germany were connected with UTA, which consequently caused high losses of economic value [1]. In 1993, 2-aminoacetophenone (AAP) was identified as the character impact compound with an odor threshold of about $1 \mu\text{g l}^{-1}$ in the wine [2]. Studies on the occurrence of UTA in wines have revealed a significant correlation between the AAP concentration, the UTA intensity and wines from grapes which were grown under stress caused by insufficient water or nitrogen supply, as well as wines produced from high yield or early grape vintages [2–6]. Investigations

* Corresponding author. Tel.: +49-40-42838-4359;

fax: +49-40-42838-4342.

E-mail address: thomas_simat@public.uni-hamburg.de (T.J. Simat).

on the mechanism of AAP formation during vitification have shown that oxidative degradation of indole-3-acetic acid (IAA), a phytohormone naturally occurring in grapes [7], led to a significant formation of *N*-formyl-2-aminoacetophenone (FAP) and AAP [8]. This oxidative degradation was initiated by hydroxyl or superoxide radicals, which are generated by an aerobic oxidation of sulfite during storage of the sulfurized wines [9–11]. No significant formation of AAP was observed for the ester or amide conjugated IAA, indicating that only unbound IAA is susceptible to this degradation.

UTA has not yet been detected in red wines, and red wines spiked with IAA before fermentation did not show any significant formation of AAP [8]. Therefore, it can be deduced that special constituents of red wines, which are not or are less available in white wines, can prevent the oxidative degradation of IAA to AAP. Studies by Geßner et al. [12] have shown that AAP formation from IAA was reduced if phenolic components were added to the must before fermentation. An addition of ascorbic acid to the white wine before or directly after sulfuration inhibited the formation of AAP and UTA too.

The aim of this study was to elucidate the mechanism of AAP formation and to evaluate its influencing factors in order to find enological possibilities for prevention or at least reduction of the AAP formation which causes UTA.

2. Experimental

2.1. Materials

Thirty-two grape musts and their corresponding wines (*Vitis vinifera* cv. Kerner, vintages 1996–1999) were provided by the Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau (Veitshöchheim, Germany). The vines were cultivated under different viticultural growing conditions simulating different stress situations (crop load, soil treatment, time of harvest). Fermentations of grape musts, derived from the same vines (*V. vinifera* cv. Müller-Thurgau) and processed from grapes of an early grape harvest and a late grape harvest, were conducted in 2.5 l flasks at 12–14 °C after inoculation with 10 g (h l)^{-1} Uvaferm CM (*Saccharomyces cerevisiae*).

2.2. Chemicals

AAP, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), IAA, indole-3-carbaldehyde (ICA) and indole-3-propionic acid (IPA) were obtained from Sigma (Deisenhofen, Germany). 1,6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and myoglobin (from horse heart) were purchased from Fluka (Neu-Ulm, Germany). 18-Crown-6-ether, nitroblue tetrazolium chloride (NBT), sodium dodecylsulfate (SDS), potassium superoxide (KO_2), 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic acid (Tiron), xanthine (XA) and xanthine oxidase (XOD) were from Merck (Darmstadt, Germany). FAP was synthesized as described by Simat et al. [13], and 3-(2-formylaminophenyl)-3-oxo-propionic acid (FAPOP), 2,3-dioxindoleacetic acid (DiOxIAA) and 2-oxindoleacetic acid (OxIAA) were synthesized as described by Hoenicke et al. [14]. Metmyoglobin ($70 \mu\text{M}$) was prepared directly before analysis as described by Miller et al. [15]. All other chemicals used were of analytical purity.

2.3. Free radicals generating systems

For the generation of hydroxyl and superoxide radicals, Fenton's reagent was used [16]. Ten milliliters of 5 mM phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) containing 0.05 mM IAA was gassed for 3 min with nitrogen, subsequently mixed with $100 \mu\text{l}$ of FeSO_4 (0.1 M), $100 \mu\text{l}$ of Na-EDTA (0.1 M), and $25 \mu\text{l}$ of hydrogen peroxide (1 M) and stirred for 10 min under nitrogen. For the specific generation of hydroxyl radicals, $10 \mu\text{l}$ of Tiron (0.05 M) was added to 10 ml of PBS containing 0.05 mM IAA. The solution was gassed for 3 min with nitrogen and subsequently mixed with FeSO_4 , Na-EDTA and hydrogen peroxide as described. The solutions were stored for 7 days at room temperature. In parallel, 10 ml of PBS containing 0.05 mM IAA was stored at room temperature as a control.

For the specific generation of superoxide radicals, 1 ml of PBS containing 5 mM IAA was mixed with 9 ml of KO_2 (0.1 M) in dimethyl sulfoxide (DMSO) containing 18-crown-6-ether (0.3 M). The mixture was stored on a shaker (100 U min^{-1}) at room temperature. For control, 1 ml of PBS containing 5 mM IAA was mixed with 9 ml of DMSO.

All investigations were carried out in duplicate. The resulting solutions were directly used for liquid chromatographic (LC) analysis.

2.4. LC analysis of IAA degradation compounds

The degradation of IAA in the presence of specific radicals was monitored by LC–mass spectrometry (MS) (HP 1100 Series HPLC system equipped with a variable wavelength UV detector, set at 260 nm; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). MS parameters were the following: atmospheric pressure (AP)-ESI positive mode; drying gas flow, 12 l min⁻¹; drying gas temperature, 350 °C; nebulizer pressure, 60 psi; capillary voltage, 4000 V; fragmentor voltage, 50 V; selected ion monitoring (SIM) ion (m/z): 4.5 min, 146, 190, 208; 10 min, 136, 146, 162, 190, 192, 208, 230, 246; 15 min, 118, 136, 146, 163, 164, 174, 184, 202. Chromatographic separations were carried out on a Nucleosil 120-3 C₁₈ (250 mm × 4 mm) column equipped with a Nucleosil 120-3 C₁₈ (20 mm × 4 mm) precolumn using a binary gradient (solvent A: 5 mM ammonium formate in bidistilled water, pH 3; solvent B: acetonitrile). The following gradient was used: 0 min, 5% B; 15 min, 40% B; 30 min, 80% B; 35 min, 80% B; 45 min, 5% B. The flow rate was set to 1 ml min⁻¹, the injection volume was 50 µl, and the temperature of the column thermostat was 35 °C. System control, data acquisition and processing were performed with the Agilent Technologies LC/MSD ChemStation, Rev. A.08.03.

2.5. Measurement of antioxidative capacity

2.5.1. Total antioxidative status

The total antioxidative status (TAS) was measured according to Miller et al. [15]. Assays were performed at 37 °C using a Perkin-Elmer Lambda 2 UV–VIS spectrophotometer (Überlingen, Germany) with a thermostated cell holder. Six-hundred microliters of ABTS (500 µM), 70 µl of metmyoglobin (70 µM), 20 µl of sample and 1 ml of PBS were pipetted into a cuvette. After mixing, 300 µl of hydrogen peroxide (0.5 mM) were added and the development of the green ABTS radical cation was measured at 600 nm for 3 min. The presence of radical scavengers led to a temporary inhibition of ABTS radical cation formation. The resulting lag phase was used to calibrate the

TAS by comparison with the lag-phase time of Trolox standards. The results were expressed in mmol l⁻¹ Trolox equivalent antioxidative capacity (TEAC).

2.5.2. Superoxide scavenger activity

The superoxide scavenger activity (SOSA) levels of the wine samples were determined using two different methods. According to Okamura et al. [17], the superoxide radicals were generated by an enzymatic reaction. A 100 µl sample was mixed with 1 ml of XOD (0.049 U ml⁻¹) and 1 ml of a reaction mixture containing XA (0.4 mM) and NBT (0.24 mM) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0). The solution was incubated for 20 min at 37 °C. After adding 2 ml of SDS (69 mM), the absorbance was measured by a Perkin-Elmer Lambda 2 UV–VIS spectrophotometer at 560 nm. The SOSA of the samples was determined by comparison with the absorbance values of gallic acid standards and expressed in terms of mg l⁻¹ gallic acid equivalent (GAE).

In a second assay, superoxide radicals were generated by a photochemical system [18]. The SOSA was measured using a test kit for measurement of the water soluble antioxidative capacity (AC), manufactured by the Forschungsinstitut für Antioxidative Therapie (Berlin, Germany). The superoxide radicals were generated by UV-A irradiation of a photosensitizer containing solution (luminol). The presence of superoxide radical scavengers led to a temporary inhibition of photochemiluminescence (PCL). The resulting lag phase was used to calibrate the SOSA by comparison with the lag-phase time of gallic acid. For the detection of the radicals, a photochemiluminometer (Photochem[®], Analytik Jena AG, Jena, Germany) was used, and data acquisition and processing were performed with PoplabTM software, version 2.1 (Analytik Jena AG). The SOSA of the samples were expressed in terms of mg l⁻¹ GAE.

2.6. Determination of free and conjugated IAA

Free and conjugated IAA were determined as described by Hoenicke et al. [19,20]. Free IAA was analyzed after solid-phase extraction (SPE) using an anion exchange material (SAX) (Merck LiChrolut[®]; 500 mg, 3 ml). For the determination of both free and conjugated IAA, alkaline hydrolysis (5 M NaOH, 5 h at 120 °C in a vacuum) was

carried out. After neutralization using phosphoric acid (85%), the hydrolyzed samples were applied to a C_{18}/OH SPE (Varian Bond Elut, Darmstadt, Germany; 500 mg, 10 ml) to remove inorganic salts. Subsequently, IAA was extracted using SAX SPE (Merck LiChrolut®; 500 mg, 3 ml). The solutions were directly subjected to LC analysis. Chromatographic separations were carried out on a Nucleosil 120-3 C_{18} (250 mm $\times$ 4 mm) column equipped with a Nucleosil 120-3 C_{18} (20 mm $\times$ 4 mm) precolumn (CS, Langerwehe, Germany) using a binary gradient (solvent A: 0.1% TFA in bidistilled water, solvent B: acetonitrile). The following gradient was used: 0 min, 5% B; 15 min, 30% B; 20 min, 50% B; 22 min, 5% B; 30 min, 5% B. The flow rate was set to 1 ml min⁻¹, the injection volume was 20 μ l, and the temperature of the column thermostat was 35 °C. Quantitative determination of IAA was performed on a Merck F 1080 programmable fluorescence detector (excitation 270 nm, emission 360 nm) and calculated using IPA as the internal standard. System control, data acquisition and processing were performed with Kroma system 2000 software, version 1.8 (Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn, Germany).

2.7. UTA intensity analysis

Sensory testing of the examined wines including the evaluation of UTA intensity was performed by a trained sensory panel of 10 persons. The UTA evaluation scale ranged from 0 (no UTA) to 3 (strong UTA).

2.8. Statistical analysis

To study the influence of the applied viticultural growing conditions, multifactorial analysis of variance (ANOVA) was carried out by SPSS for Windows, release 9.0.1 (SPSS Inc., Germany).

3. Results and discussion

3.1. Mechanism of AAP formation

In order to find the factors which probably influence the formation of UTA, the radical mechanism of AAP formation from IAA had to be elucidated. LC–MS analysis of model systems spiked with IAA showed

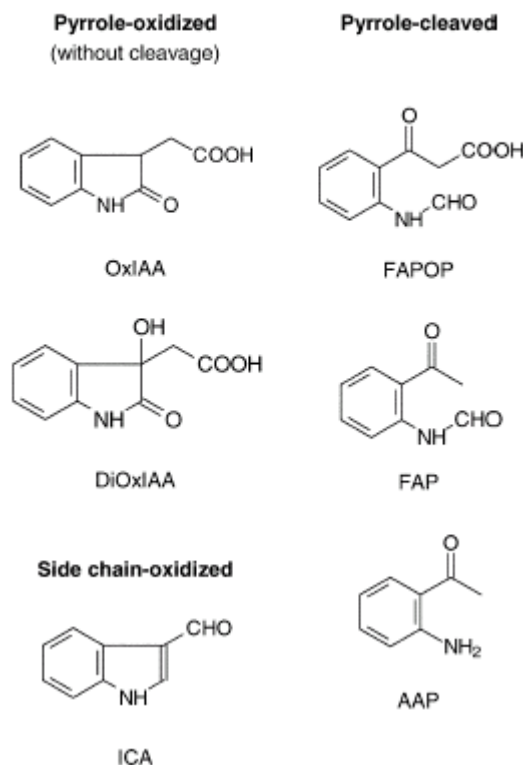


Fig. 1. Chemical structures and classification of examined IAA degradation compounds (OxIAA, DiOxIAA, ICA, FAPOP, FAP, and AAP).

that high AAP concentrations are only formed after generation of superoxide radicals. Forty percent of the added IAA was degraded after 7 days in the Fenton system containing superoxide and hydroxyl radicals. Besides pyrrole-oxidation derived products, like OxIAA or DiOxIAA, and side chain-oxidation derived products, like ICA, the pyrrole-cleavage derived products FAPOP, FAP, and AAP were identified (Fig. 1). The addition of the superoxide radical scavenger Tiron prior to reaction with Fenton's reagent led to loss of only 10 % IAA. Neither the formation of FAPOP nor the formation of FAP and AAP could be detected. Only OxIAA was identified in this system containing exclusively hydroxyl radicals.

In the system containing exclusively superoxide radicals, IAA was already degraded after 1 day. AAP was identified as the main degradation compound (32 mol%) formed by the reaction of IAA with KO_2 .

Besides AAP, 0.2 mol% FAP was detected. Neither the formation of pyrrole-oxidized products (without cleavage of the pyrrole ring) nor the formation of side chain-oxidized products was observed.

These findings indicate that superoxide radicals must be available for the degradation of IAA yielding AAP. According to Hinman and Lang [21], the first step in the oxidation of IAA with a wide variety of oxidizing agents is a one-electron oxidation at the 3-position of the indole ring. In the next stage of oxidation, two paths are possible (Fig. 2). Combination with a superoxide radical leads to the formation of 3-hydroperoxyindolenine-3-acetic acid. The rearrangement of the hydroperoxide with an addition to the indolenine double bond and a concomitant ring opening yields FAPOP, which is

spontaneously decarboxylated giving FAP and subsequently, AAP. The combination of the radical cation with a hydroxyl radical leads to the formation of 3-hydroxyindolenine-3-acetic acid, and a nucleophilic addition of a hydroxyl anion followed by dehydration yields OxIAA.

In the Fenton system, the formation of both pyrrole-oxidized and pyrrole-cleaved products is possible due to the presence of superoxide and hydroxyl radicals. The exclusion of superoxide radicals by the addition of Tiron leads only to the formation of pyrrole-oxidized products. The specific generation of superoxide radicals in the KO_2 system leads to the formation of pyrrole-cleaved products, indicating that superoxide radicals are required for the type of reaction leading to the formation of AAP which causes UTA.

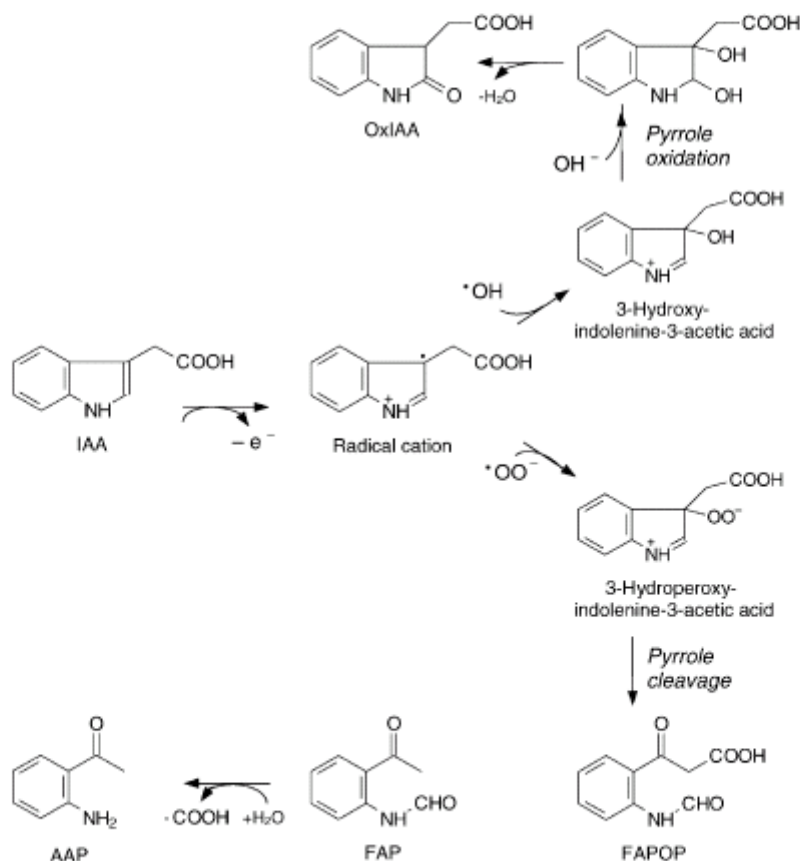


Fig. 2. Proposed mechanism of AAP or OxIAA formation from IAA initiated by an oxidizing agent (e.g. hydroxyl radicals) and superoxide ($\cdot\text{OO}^-$) or hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) radicals, respectively.

3.2. AC of wines and its correlation with UTA

Since AAP is formed by a pyrrole ring cleavage of IAA which requires superoxide radicals, antioxidants—especially superoxide radical scavengers in the wine—should be able to inhibit or at least decrease the AAP formation which causes UTA. Therefore, the AC was measured to investigate a correlation with UTA. However, measurement of the AC in the must was not possible due to active polyphenol oxidases. Measurement of the dependence on the time between sampling and measurement during the oxidation of the polyphenolic must constituents led to irreproducible AC values.

In this study, two different measurements of the AC have been applied. The TAS describes a general ability to scavenge free radicals, unspecific towards the reacting radical species, while SOSA describes specifically the ability to scavenge superoxide radicals. With respect to the formation of AAP, this method should be more suitable for investigating the impact of the AC on the development of UTA.

The TAS of the examined wines varied between 0.1 and 0.5 mM TEAC. With regard to the ability of wine constituents to scavenge superoxide radicals, the determined values were different and depended on the applied technique. Using the enzymatic method according to Okamura et al. [17], SOSA ranged from 26 to 216 mg l⁻¹ GAE. Using the PCL method according to Popov et al. [18], the obtained SOSA values were lower and had a smaller range (17–89 mg l⁻¹ GAE). Nevertheless, the values received by both methods were significantly correlated ($\alpha < 0.01$). The higher SOSA values obtained by the enzymatic method may be due to wine constituents, like tannins, that exhibit an inhibitory effect on XOD, resulting in less formation of superoxide radicals [22].

Investigations on the influences of different viticultural growing conditions on the AC revealed significantly higher TAS and SOSA values in wines made of late harvested grapes ($\alpha < 0.01$). The TAS was further influenced by the year (climate) and the soil treatment. Significantly higher TAS ($\alpha < 0.05$) were determined in wines made from grapes from a permanent green cover crop than in wines from an open tillage. Significant influences of the year and the soil treatment on the SOSA were determined to investigate

their dependence on the superoxide generating system. While SOSA values obtained by the enzymatic method were dependent on the vintage of the wine ($\alpha < 0.01$), SOSA values obtained by the PCL method were influenced by the soil treatment. A permanent green cover crop led to significantly higher SOSA values ($\alpha < 0.01$).

Sensory testing of the examined wines indicated that the development of UTA was avoided by a late grape vintage, while the residual applied measures (soil treatment, vine prune) had no significant effect on the UTA intensity. Both, TAS and SOSA showed a negative correlation with the UTA intensity (Fig. 3) indicating that a high AC of a wine can reduce the risk of UTA formation. The highest correlation was determined between the UTA intensity of a wine and its SOSA value, obtained by the enzymatic method ($r = -0.616$). Considering that UTA intensities < 1 can be estimated as no UTA, it seems that SOSA values of more than 120 mg l⁻¹ GAE (enzymatic method) or 60 mg l⁻¹ GAE (PCL method) in the examined wines inhibit UTA formation. However, wines with lower SOSA values did not automatically show a UTA, although, it has to be noted that the AC was determined after storage of the wines. Depending on the vintage of the examined wine, they had been stored for between 1 and 4 years before measurement.

3.3. IAA in musts and wines and its correlation with UTA

3.3.1. Determination of free and conjugated IAA in musts and wines

Since IAA is regarded as being the most important precursor of AAP, the determination of its concentration in must and wine was necessary to investigate a correlation with UTA.

In the examined grape musts, only traces of free IAA ($< 3 \mu\text{g l}^{-1}$) have been determined, indicating a strong physiological regulation of this phytohormone. Conjugated IAA was measured in these musts in the range of < 12 to $120 \mu\text{g l}^{-1}$ (median of $64 \mu\text{g l}^{-1}$). In the corresponding wines, reasonable amounts of free IAA (< 3 to $90 \mu\text{g l}^{-1}$) and decreased amounts of conjugated IAA ($< 40 \mu\text{g l}^{-1}$) were determined, indicating either a neosynthesis by the yeast or a hydrolysis of conjugated IAA during fermentation. However, the amount of total IAA (free and conjugated) in the

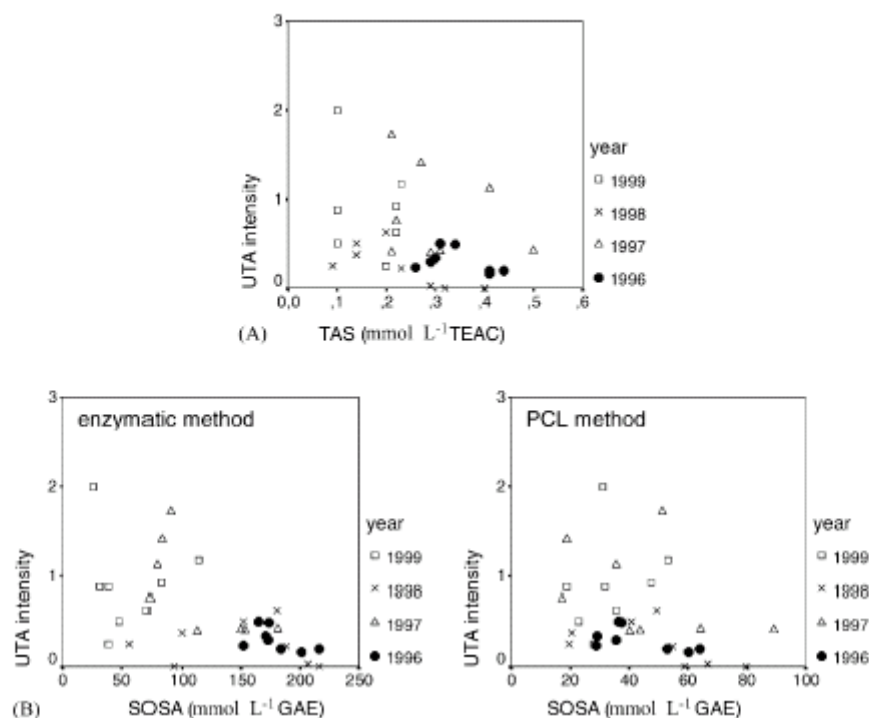


Fig. 3. Correlation of the UTA intensity with (A) the TAS of the wine; (B) the SOSA of the wine (obtained by enzymatic and photochemical generation of superoxide radicals, respectively).

wines was nearly comparable to the amount of total IAA in the musts.

Investigations on the influences of different viticultural growing conditions on the amount of IAA revealed significantly higher concentrations of total IAA in musts or free and conjugated IAA in wines

made of late harvested grapes ($\alpha < 0.01$). The IAA concentrations were further influenced by the climatic conditions of the vintage and the soil treatment. The effect of the soil treatment on the amount of IAA in the must varied and depended on the climate of the year. In damp years, a permanent cover crop led

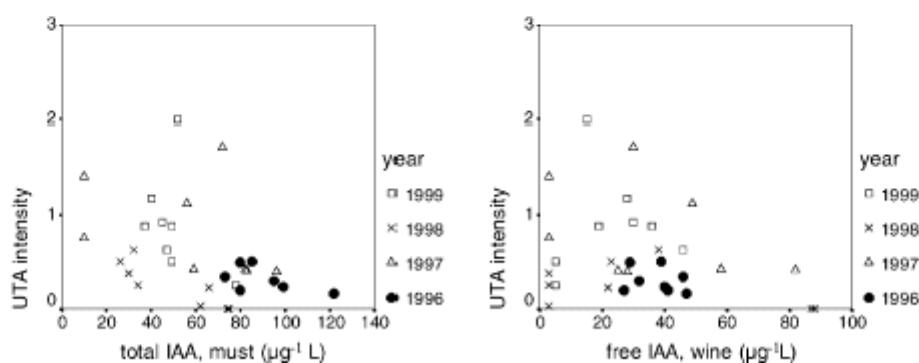


Fig. 4. Correlation of the UTA intensity with total IAA in must and free IAA in wine, respectively.

to significantly higher amounts than an open tillage, while in dry years, higher amounts were detected in musts derived from the open tilled soils. However, neither the total amount of IAA in the must nor the free IAA content in the wine showed a positive correlation with the UTA intensity (Fig. 4). There was even a tendency of increasing UTA intensity with lower amounts of total IAA in musts and free IAA in wines, respectively. Consequently, the appearance of UTA seems not to be caused by a higher amount of the precursor IAA in the must or wine.

3.3.2. Impact of fermentation and storage on the amount of IAA

Following the hypothesis that AAP formation takes place after fermentation, sulfuration and a brief storage of the wine, the free IAA content prior to sulfuration should be decisive for the amount of AAP formed during storage. Therefore, the influence of yeast metabolism on the amount of IAA during fermentation in dependence on the stage of maturity of the processed grapes had to be elucidated.

During fermentation of a must processed from early harvested grapes, total IAA increased significantly at the beginning of fermentation, indicating a neosynthesis of IAA by the yeast. This neosynthesis was revealed in a significant increase in the free IAA content, which reached a maximum in the middle of fermentation and subsequently decreased to the end of fermentation. Concurrently conjugated IAA decreased, which might be traced back to a hydrolysis by the yeast enzymes (Fig. 5A). An addition of 1 g l^{-1} diammonium phosphate (DAP) to the must caused a speed-up of the fermentation but did not affect the amount of free IAA synthesized by the yeast compared to that without DAP addition. However, conjugated IAA was hydrolyzed more slowly and not to the same extent (Fig. 5B).

The amounts of free and conjugated IAA determined during fermentation of a must processed from late harvested grapes are shown in Fig. 5C. Although this must had a much higher content of conjugated IAA than the must made from early harvested grapes, the amount of both free and conjugated IAA was significantly lower at the moment of sulfuration.

These findings indicate that yeast metabolism has a greater influence on the amount of IAA at the moment of sulfuration than the total IAA content of the must.

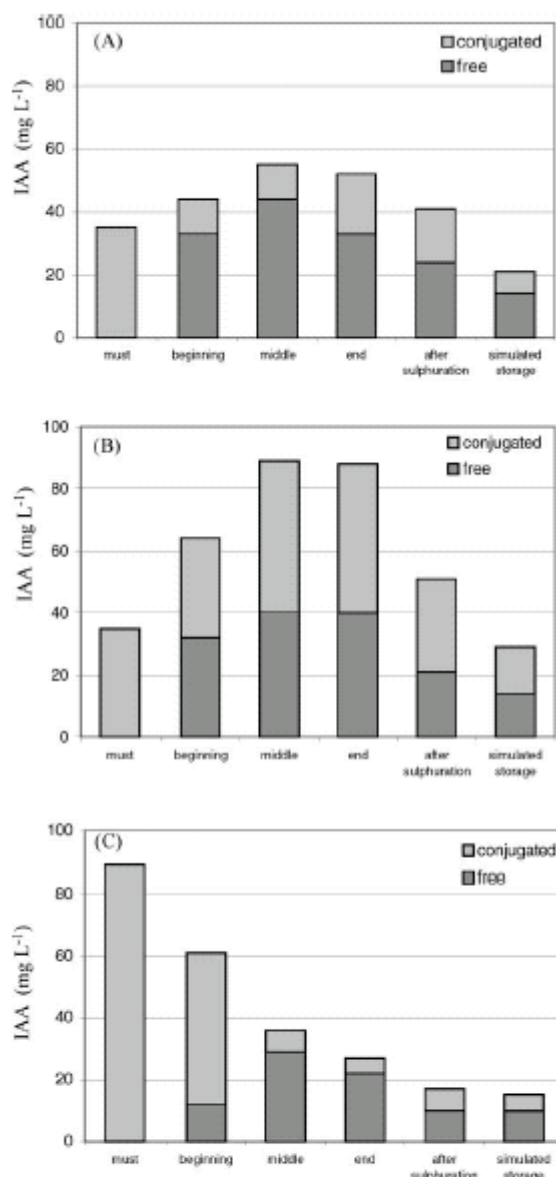


Fig. 5. Course of free and conjugated IAA during fermentation and simulated storage (7 days, 45°C) (A) of a must derived from early harvested grapes; (B) by addition of 1 g l^{-1} DAP to the must; (C) of a must derived from late harvested grapes.

After sulfuration and a simulated aging (storage for 7 days at 45°C), the concentration of free IAA in the wine processed from early harvested grapes decreased, probably as a result of oxidation, while IAA in the

wine from late harvested grapes was relatively stable. The evaluation of the UTA intensity showed that the wine produced from early harvested grapes exhibited UTA (UTA intensity of 2), while the wine produced from the late harvested grapes did not. The addition of DAP did not effect the UTA intensity.

Consequently, the ripeness of the harvested grapes plays an important part in the formation of the AAP precursor IAA and presumably in the occurrence of UTA. Neither the amount of IAA in the must nor the amount of IAA in the stored wine depict or correlate with the amount of free IAA at the moment of sulfuration.

4. Conclusion

AAP, the aroma impact substance of UTA, can be formed by a pyrrole ring cleavage of IAA which requires superoxide radicals. Superoxide radicals are generated by an aerobic oxidation of sulfite during storage of the sulfurized wines. Antioxidants, especially superoxide radical scavengers in the wine, can reduce the tendency to UTA formation. Their amounts depend on the ripeness of the harvested grapes. However, not every wine with a low capacity of antioxidants exhibited UTA.

The amount of the precursor IAA at the time of sulfuration can be considered as a result of yeast metabolism. Late harvested grapes lead to a lower level of free IAA throughout the course of fermentation than early harvested grapes from the same vineyard.

These findings correlate with the observation that early harvested grapes are predisposed to develop UTA. Consequently, a late grape harvest seems to be the best way to avoid UTA.

Acknowledgements

We thank the Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau (Veitshöchheim, Germany) for providing

the samples, the Analytik Jena AG (Jena, Germany) for providing the photochemiluminometer, and the members of the UTA investigation group (Geisenheim, Germany) for cooperation and discussion. This research project was financially supported by the Fränkische Weinbauring, the FEI, the AIF and the Ministry of Economics and Technology (AIF-Project No. 11770 N).

References

- [1] N. Christoph, C. Bauer-Christoph, M. Geßner, H.J. Köhler, *Rebe Wein* 48 (1995) 350.
- [2] A. Rapp, G. Versini, H. Ullemeyer, *Vitis* 32 (1993) 61.
- [3] N. Christoph, C. Bauer-Christoph, M. Geßner, H.J. Köhler, *Rebe Wein* 48 (1995) 424.
- [4] A. Schwab, M. Peternel, H.J. Köhler, K.P. Heigel, *Rebe Wein* 49 (1996) 181.
- [5] A. Rapp, G. Versini, G. Der Deutsche Weinbau 18 (1995) 18.
- [6] A. Schwab, N. Christoph, H.J. Köhler, M. Geßner, T.J. Simat, *Vitic. Enol. Sci.* 54 (1999) 114.
- [7] H. Duering, *Experientia* 33 (1977) 1666.
- [8] N. Christoph, C. Bauer-Christoph, M. Geßner, H.J. Köhler, T.J. Simat, K. Hoenicke, *Vitic. Enol. Sci.* 53 (1998) 79.
- [9] A.J. Horng, S.F. Yang, *Phytochemistry* 14 (1975) 1425.
- [10] S. Yang, *Food Chem.* 14 (1984) 1425.
- [11] N. Vivas, N. Saint-Cricq De Gaulejac, Y. Glories, *Vitis* 36 (1997) 91.
- [12] M. Geßner, H.J. Köhler, N. Christoph, *Rebe Wein* 51 (1999) 264.
- [13] T.J. Simat, K. Meyer, H. Steinhart, *J. Chromatogr. A* 661 (1994) 93.
- [14] K. Hoenicke, O. Borchert, K. Grüning, T.J. Simat, H. Steinhart, *J. Agric. Food Chem.*, in press.
- [15] N.J. Miller, C. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, *Clin. Sci.* 84 (1993) 407.
- [16] H.J.H. Fenton, *J. Chem. Soc.* 65 (1894) 899.
- [17] H. Okamura, A. Mimura, Y. Yakou, M. Niwano, Y. Takahara, *Photochemistry* 23 (1993) 557.
- [18] I. Popov, A. Blumstein, G. Lewin, *Arzneim. Forsch., Drug Res.* 44 (1994) 602.
- [19] K. Hoenicke, T.J. Simat, H. Steinhart, N. Christoph, H.J. Köhler, A. Schwab, *Adv. Exp. Med. Biol.* 467 (1999) 671.
- [20] K. Hoenicke, T.J. Simat, H. Steinhart, H.J. Köhler, A. Schwab, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5494.
- [21] R.L. Hinman, J. Lang, *Biochemistry* 4 (1965) 144.
- [22] T. Hatano, T. Yasuhara, R. Yoshihara, I. Agata, T. Noro, T. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990) 1224.

3.2 Identifizierung von Tryptophan und Tryptophanmetaboliten

3.2.1

DETERMINATION OF TRYPTOPHAN AND TRYPTOPHAN METABOLITES IN GRAPE MUST AND WINE

K. Hoenicke¹, T. J. Simat¹, H. Steinhart¹, N. Christoph², H. J. Köhler³, and A. Schwab³

¹Universität Hamburg
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
Grindelallee 117, D-20146 Hamburg
Tel: +49-40 41234354
Fax: 49-40 41234342

e-mail: katrin_hoenicke@public.uni-hamburg.de

²Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayerns
Luitpoldstr. 1, D-97082 Würzburg

³Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau
Residenzplatz 3, D-97070 Würzburg

ABSTRACT

Tryptophan (Trp) and its metabolites, especially indole-3-acetic acid (IAA), are considered as potential precursors of 2-aminoacetophenone (AAP), an aroma compound which causes the "untypical aging off-flavor" (UTA) in *Vitis vinifera* white wines. In this study RP-HPLC with fluorescence detection was used for the qualitative and quantitative analysis of Trp and Trp-metabolites in 39 grapes, 22 grape musts and 16 wines, to which different viticultural conditions (ripeness, pruning, strip of leaves, soil condition) have been applied. A sensitive and selective determination was achieved after solid phase extraction using an anion exchange material. Only traces of Trp-metabolites could be determined in the examined grapes and grape musts, but their amounts increased significantly during fermentation, whereas the amount of Trp decreased. Different viticultural measures, besides the time of grape harvest, showed no significant influences on the amount of Trp and Trp-metabolites.

1. INTRODUCTION

Tryptophan (Trp) and its metabolites, especially indole-3-acetic acid (IAA), are considered to be potential precursors of 2-aminoacetophenone (AAP) (Christoph, Bauer-Christoph, Geßner, and Köhler, 1996) an aroma compound which was identified

as being responsible for the so called “untypical aging off-flavor” (UTA) in *Vitis vinifera* white wines (Rapp, Versini, and Ullemeyer, 1993). Wines with this off-flavor are characterized by odor taints like naphthalin, floor-polish, washing-soap or acacia-blossom (Geßner, Köhler, Christoph, Bauer-Christoph, Miltenberger, and Schmitt, 1995). As the main causes of the formation of a UTA, particularly dry-stress for the vines because of low rainfall and intensive solar radiation as well as nutrient deficiency, high yield vintage or early vintage were discussed (Schwab, Peternel, Köhler, and Heigel, 1996). In order to create an analytical test for the potency of must to evolve UTA, information was required about the amounts of AAP-precursors in grapes, grape musts and wines.

The purpose of these investigations was the development of a method to determine Trp and several Trp-metabolites like tryptophol (TOH), N-formylkynurenine (NFK), anthranilic acid (AA), indole-3-lactic acid (ILA) and IAA as well as the condensation product of Trp and acetaldehyde 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-carboline-3-carboxylic acid (MTHCC) in grapes, grape musts and wines. With this method the influence of different viticultural measures on the amount of Trp-metabolites, which could contribute to a formation of AAP, was to be investigated.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Chemicals

Analytical grade AA, IAA, ILA, indole-3-propionic acid (IPA), TOH and tryptophan-butylester (Trp-but) were obtained from Sigma (Deisenhofen, Germany). L-Trp was donated by Degussa (Hanau, Germany). NFK and MTHCC were synthesized as described by Simat, Meyer, and Steinhart (1994).

All other chemicals used were of analytical purity.

2.2. Samples

The samples were provided by the Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Würzburg, where the vines were cultivated (vintage 1996) under different oenological parameters which simulated different stress-situations (see Table 1).

Grapes: 39 *Vitis vinifera* cv. *Kerner* grapes of different ripeness were immediately frozen at -18°C . After thawing, they were extracted by a juice extractor (Krups, Vita compact) and centrifuged (centrifuge, Sigma 3 K 12) at 4000 g for 5 min.

Grape musts: 22 must samples of *Vitis vinifera* cv. *Kerner* and *Müller-Thurgau* taken from the usual winemaking process (Willmes pneumatic press) were immediately frozen at -18°C . After thawing, aliquots were used for analysis after centrifugation at 4000 g for 5 min.

Table 1. Cultivating conditions on the vines: Oenological parameters.

Product	Type of vine	Soil treatment	Strip of leaves	Vine prune	Time of grape harvest
• Grape	• Kerner	• Open fillage	• No leaf	• 10 canes	• 03.09.
• Must	• Müller-Thurgau	• Foil-covering	• plucking	• 20 canes	• 19.09.
• Wine		• Permanent cover	• Leaf plucking		• 02.10.
					• 23.10.

Wines: 16 wine samples of *Vitis vinifera* cv. *Kerner* and *Müller-Thurgau*, which have been extended from some of the above-mentioned must samples, were stored at 2–4 °C before analyzing.

2.3. Sample Preparation

Two internal standards (IS), Trp-but (non-anionic IS) and IPA (anionic IS), were added to 1 mL of the pretreated extracted grape juices, grape musts or wines. To separate the non-anionic compounds from the acidic compounds, an anion-exchange clean-up was performed as follows: The samples were applied to a LiChrolut® SAX (strong anion exchange) solid phase extraction (SPE) column (3 mL, 500 mg; Merck, Darmstadt, Germany) which had been conditioned with 3 mL methanol followed by 3 mL of 2 M acetic acid (containing 5% acetonitrile) and washed with water to neutral pH. Subsequently, Trp and the non-anionic Trp-metabolites were eluted with 3 mL 5% aqueous acetonitrile. After washing the SPE column with 10 mL of 5% acetonitrile, the anionic Trp-metabolites were eluted with 3 mL 2 M acetic acid (containing 5% acetonitrile).

Both eluates (non-anionic, anionic eluates) were directly used for HPLC analysis.

2.4. HPLC analysis

The HPLC apparatus consisted of a Merck L-6200 pump and a F-1080 programmable fluorescence detector. Signals were acquired and calculated by Chromstar software, version 4.05 (SCPA, Stuh-Brinkum, Germany).

All HPLC analyses were conducted using chromatographic conditions described in Table 2. Acetonitrile (gradient grade) and trifluoroacetic acid (TFA) (Uvasol) were purchased from Merck. Deionized water was purified by a Heraeus-Destamat Bi 18E bidistillator (Kleinostheim, Germany).

For the detection and determination limits (signal-to-noise ratio of 3:1 or 6:1) as well as the retention times of Trp and the examined Trp-metabolites see Table 3.

Table 2. HPLC conditions.

Stationary phase:	Nucleosil 120–3 C ₁₈ , 250 * 4 mm, precolumn 20 * 2 mm		
Mobile phase:	A—0.1 % TFA in bidistilled water		
	B—Acetonitrile		
Gradient:	min	A (%)	B (%)
	0	95	5
	15	60	40
	25	60	40
	27	95	5
	35	95	5
Flow: 1 mL/min	Temperature: 35 °C		Injection volume: 20 µL
Detection:	Fluorescence program:		
	min	Ex (nm)	Em (nm)
	0	255	435
	10	270	360
	35	270	360

Table 3. Detection limits ($\mu\text{g/L}$), determination limits ($\mu\text{g/L}$) and retention times (RT) of Trp and Trp-metabolites.

Fraction	Substance	Detection limit ($\mu\text{g/L}$)	Determination limit ($\mu\text{g/L}$)	RT (min)
Non-anionic	N-Formylkynurenine ¹	240	480	8.6
	Tryptophan ²	12	24	11.2
	1,2,3,4-Tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid ²	2	4	13.2
	Tryptophol ²	2	4	15.4
Anionic	Anthranilic acid ¹	11	22	9.1
	Indole-3-lactic acid ²	4	8	13.5
	Indole-3-acetic acid ²	3	6	15.1

¹Fluorescence $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 255/435 \text{ nm}$.²Fluorescence $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 270/360 \text{ nm}$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Determination of Trp and Trp-Metabolites

The detection of Trp and six further Trp-metabolites was achieved by a combination of SPE and HPLC analysis. The use of SPE with an anion exchange material allows a fractionation in non-anionic and anionic substances, which have similar retention times (see Table 3) under the chromatographic conditions carried out. The developed method facilitated a sensitive and selective quantitative determination of Trp and Trp-metabolites, which were said to be potential precursors of AAP (Christoph *et al.*, 1996; Dollmann, Wichmann, Schmitt, Köhler, and Schreier, 1996) in extracted grapes and grape musts as well as in wines.

In the examined grapes and grape musts amounts of 9–105 mg/L for Trp and 0.2–4.2 mg/L for MTHCC in dependence on the ripeness of the harvested grapes were determined, while TOH, NFK, AA, ILA and IAA were detected only in traces. The ranges and the medians of the amounts of Trp and the different Trp-metabolites studied in the extracted grapes and grape musts are presented in Table 4.

The amount of Trp (1.7–44.5 mg/L) was significantly ($p < 0.05$) lower in the examined wines than in the grapes or grape musts (Mann-Whitney-U-Test). However, the amounts of most Trp-metabolites increased during fermentation: For MTHCC 3.7–17.2 mg/L, for TOH 0.5–2.8 mg/L, for NFK <240–830 $\mu\text{g/L}$, for ILA 65–289 $\mu\text{g/L}$ and for IAA 30–45 $\mu\text{g/L}$ were detected in the wine samples under study. For AA no significant difference could be found prior to and after fermentation. For the ranges and the medians of the amounts of Trp and the examined Trp-metabolites see Table 4.

Figure 1 shows the amounts of Trp and its metabolites prior to and after fermentation. As can be seen, TOH was the most abundant product as a result of its synthesis by the yeast during alcoholic fermentation (factor 1600 in relation to its amount in grapes or grape musts), followed by IAA (factor 18), MTHCC (factor 12), NFK (factor 9) and ILA (factor 3). These results were in agreement with previous studies of Shin, Shinguu, Sano and Umezawa (1991), who investigated the metabolism of Trp by *Saccharomyces uvarum*. They were able to show that Trp was mainly metabolized via indole-3-pyruvic acid to TOH and a small amount of IAA, while the metabolism via NFK and kynurenine was of much smaller extent.

Consequently it can be assumed that the potential precursors of AAP were formed

Determination of Tryptophan and Tryptophan Metabolites in Grape Must and Wine

675

Table 4. Ranges (r) and medians ($\bar{x}$) of the amounts of Trp and Trp-metabolites in different grapes, grape musts and wines analyzed by HPLC-FL.

Product	n	NFK (mg/L)		Trp (mg/L)		MTHCC (mg/L)		TOH (mg/L)		AA (μ g/L)		ILA (μ g/L)		IAA (μ g/L)	
		r	$\bar{x}$	r	$\bar{x}$	r	$\bar{x}$	r	$\bar{x}$	r	$\bar{x}$	r	$\bar{x}$	r	$\bar{x}$
Grapes	39	<n.d.	<n.d.	1.6–105.4	29.8	0.2–0.4	1.8	<n.d.–0.03	<n.d.	<n.d.–25	<n.d.	<n.d.–68	9	<n.d.–20	<n.d.
Grape musts	22	<n.d.	<n.d.	28.2–79.6	45.5	0.3–4.2	1.4	<n.d.–0.01	0.02	<n.d.–42	<DL	<n.d.–104	22	<n.d.–6	<n.d.
Wines	16	<n.d.–0.8	0.5	1.7–44.5	18.1	3.7–17.2	11.9	0.5–2.8	1.7	<n.d.–23	<DL	65–289	173	30–45	37

<n.d.: Below detection limit.

<DL: Detectable, but below determination limit.

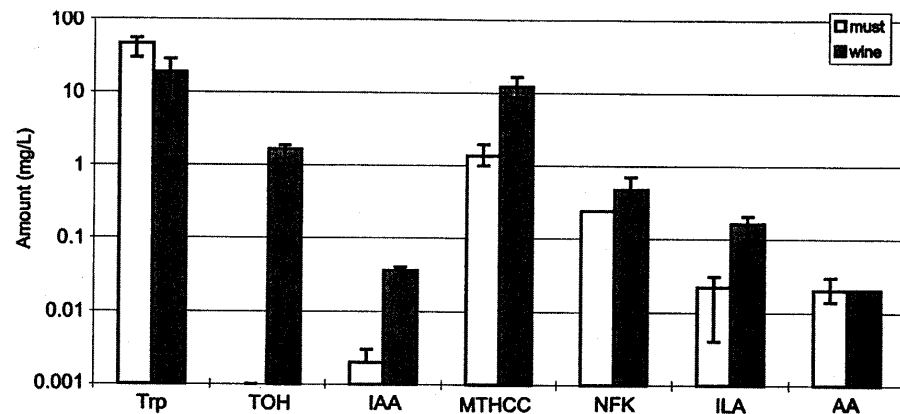


Figure 1. Amounts of Trp and its metabolites prior to and after fermentation (median, lower / upper quartile).

during fermentation. A significant correlation ($p < 0.05$) between the quantity of Trp in must and IAA in wine, which has been extended from the corresponding must, could be shown.

As described by Bandurski and Schulze (1977) plant tissues contained most of their IAA as derivatives, either esterified or as a peptide. However, no studies have been published about the amount of conjugated IAA in musts. So it has not been clarified if IAA is only formed by metabolism of Trp by *Saccharomyces* during fermentation or additionally released from conjugated IAA.

3.2. Influences of oenological parameters

In order to study the influences of the individual oenological parameters on the amounts of Trp and its metabolites in the examined grape musts and wines, multifactorial analysis of variance (ANOVA) was carried out (SPSS, version 6.1.3). The results are given in Table 5. In most cases the influences were not statistically significant. In earlier studies (Schwab *et al.*, 1996) it was pointed out that different oenological parameters which cause stress for the vines increase the potential of a wine to express UTA. However in this study, no correlation could be observed between different oenological parameters

Table 5. Influences of different oenological parameters on the amounts of Trp and Trp-metabolites in grape must and wine (*significant ($p < 0.05$), **high significant ($p < 0.01$) influence).

Substance	Soil treatment must / wine	Strip of leaves must / wine	Vine prune must / wine	Veraison must / wine
N-Formylkynurenine	— / —	— / —	— / —	— / *
Tryptophan	— / —	* / **	— / —	** / *
1,2,3,4-Tetrahydro- β - carboline-3-carboxylic acid	* / —	— / —	— / —	** / **
Tryptophol	— / —	— / —	— / —	* / *
Anthranilic acid	— / —	— / —	— / —	* / —
Indole-3-lactic acid	— / —	— / —	— / —	** / **
Indole-3-acetic acid	— / —	— / *	— / —	— / —

and the amount of Trp-metabolites in grape musts and wines. Only the stage of maturity exhibited significant differences in the amounts of Trp and most of the Trp-metabolites at the 0.05 (*) or 0.01 (**) level: With the stage of maturity, the contents of Trp, MTHCC, TOH and ILA increased both in grape musts and in wines. However, this increase of potential precursors with the fruit ripening did not correlate with the appearance of a UTA, which was said to be higher in wines of grapes from early vintage (Schwab *et al.*, 1996).

4. CONCLUSION

The method presented allows a sensitive and selective analysis of Trp and its metabolites as non-volatile off-flavor precursors at low quantification limits. It offers the possibility to study the precursor-to-product relation in grape musts and the corresponding wines, though it must be said that in this study no correlation of the amounts of Trp-metabolites and the development of a UTA in wines could be calculated since none of the examined wines showed this off-flavor.

REFERENCES

- Bandurski, R. S. and Schulze, A., 1977, Concentration of Indole-3-acetic Acid and Its Derivatives in Plants, *Plant Physiol.* **60**:211–213.
- Christoph, N., Bauer-Christoph, C., Geßner, M., and Köhler, H. J., 1996, Die "Untypische Alterungsnote" in Wein, Teil VI: Untersuchungen zur Bildung von o-Aminoacetophenon aus Produkten des Tryptophan-Stoffwechsels vor der alkoholischen Gärung, *Rebe & Wein* **49**:246–250.
- Dollmann, B., Wichmann, D., Schmitt, A., Köhler, H. J., and Schreier, P., 1996, Formation of the "untypical aging off-flavor" in wine: Generation of 2-aminoacetophenone in model studies with *Saccharomyces cerevisiae*, *Viticult. Enol. Sci.* **51**:122–125.
- Gener, M., Köhler, H. J., Christoph, N., Bauer-Christoph, C., Miltenberger, R., and Schmitt, A., 1995, Die "Untypische Alterungsnote" in Wein, Teil II: Beschreibende Verkostung von UTA-Weinen; Beziehungen zwischen Sensorik und chemisch-physikalischen Analysenwerten, *Rebe & Wein* **11**:388–394.
- Rapp, A., Versini, G., and Ullemeyer, H., 1993, 2-Aminoacetophenon: Verursachende Komponente der "Untypischen Alterungsnote" ("Naphtalinton", "Hybridton") bei Wein, *Vitis* **32**:61.
- Schwab, A., Peternel, M., Köhler, H. J., and Heigel, K. P., 1996, Die "Untypische Alterungsnote" in Wein, Teil IV: Beeinflussung durch weinbauliche Maßnahmen, *Rebe & Wein* **6**:181–187.
- Shin, M., Shinguu, T., Sano, K., and Umezawa, C., 1991, Metabolic Fates of L-Tryptophan in *Saccharomyces uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*), *Chem. Pharm. Bull.*, **39**:1792–1795.
- Simat, T., Meyer, K., and Steinhart, H., 1994, Synthesis and analysis of oxidation and carbonyl condensation compounds of tryptophan, *J. Chromatogr. A*, **661**:93–99.

3.2.2

5494

J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5494–5501

Determination of Free and Conjugated Indole-3-Acetic Acid, Tryptophan, and Tryptophan Metabolites in Grape Must and Wine

Katrin Hoenicke,[†] Thomas J. Simat,^{*,†} Hans Steinhart,[‡] Hans J. Köhler,[‡] and Arnold Schwab[‡]

University of Hamburg, Institute of Biochemistry and Food Chemistry, Grindelallee 117,
D-20146 Hamburg, Germany, and Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau,
D-97209 Veitshöchheim, Germany

Tryptophan (Trp) and its metabolites, especially indole-3-acetic acid (IAA), are considered to be potential precursors of 2-aminoacetophenone (AAP), an aroma compound that causes an "untypical aging off-flavor" (UTA) in *Vitis vinifera* wines. In this study, RP-HPLC with fluorescence detection was used for the qualitative and quantitative analysis of Trp and Trp metabolites in grape musts and wines to which different viticultural measures had been applied (time of harvest, soil treatment, leaf plucking, vine prune). An alkaline hydrolysis was developed to release bound IAA and Trp. A sensitive and selective determination of different Trp metabolites was achieved after solid phase extraction using a strong anion exchange material. In the examined grape musts, more than 95% of the total IAA was bound either as ester conjugate or as amide conjugate. Free IAA and other Trp metabolites were below the detection limit ($<3 \mu\text{g/L}$) or could be determined only in traces. Their amounts increased significantly during fermentation, whereas the amount of Trp decreased. It could be shown that the different viticultural measures applied (except the vine prune) as well as the climatic conditions of the vintage exhibited significant influences on the amounts of Trp and Trp metabolites in grape musts or wines.

Keywords: Indole-3-acetic acid; tryptophan; alkaline hydrolysis; grape must; wine; *Vitis vinifera*; HPLC analysis; untypical aging off-flavor (UTA); viticultural measures

INTRODUCTION

Since 1988, an off-flavor in *Vitis vinifera* white wines, formed within a few months after fermentation, has been frequently reported (1–5). This off-flavor is described by aroma descriptors such as "acacia blossom", "furniture polish", "wet wool", "mothball", or "fusel alcohol", combined with a loss of the typical bouquet of the grape variety (2, 6, 7). The so-called "untypical aging off-flavor" (UTA) has been associated with the aroma compound 2-aminoacetophenone (AAP) (1), which has an odor threshold of $1 \mu\text{g/L}$ in the wine (8). Particularly dry-stress for the vines caused by low rainfall or intensive solar radiation and nutrient deficiencies are supposed as the main cause of UTA formation (3, 4, 9). Additionally, high yield and an early grape vintage seem to be related to the occurrence of UTA (10–14). The detailed mechanism of AAP formation in wine has not been elucidated to date. Tryptophan (Trp) and its metabolites, especially the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA), are considered to be potential precursors of AAP (15–18). Studies by Christoph et al. (19) have shown that AAP can be formed by an oxidative degradation of IAA, which is triggered by a sulfuration, a measure indispensable for white wine making.

Several investigations have been carried out regarding the amounts of Trp and IAA in different matrixes but only a few have dealt with the amount of IAA in

grape must or wine (20–22). However, to the best of the authors' knowledge, there are no papers regarding the amount of bound IAA in grape musts and wines, although in plants most of this growth hormone exists bound in its storage forms (ester conjugates of sugar moieties or amide conjugates of amino acids) (23).

It has been established that alkaline hydrolysis releases conjugated IAA in seeds of different cereals and legumes (24, 25), in plant tissues of *Arabidopsis* (26), in tomato fruits (27), and in tobacco leaves (28). In these studies, an alkaline hydrolysis was carried out in 7 M NaOH for 3 h at 110°C . Acidic hydrolysis is usually avoided because of the instability of the indole ring at low pH. At higher pH, the indole ring is relatively stable, but the phenomenon of an increase in the IAA level, which is probably due to an oxidative conversion of some other abundant indolic components, such as the precursor Trp itself, has been reported (25). Enzymatic hydrolysis of bound IAA is not effective since a wide range of commercial enzymes expected to cleave amide or ester linkages are inactive toward IAA conjugates (23).

In this paper, the amounts of Trp, IAA, and several other Trp metabolites such as tryptophol (TOH), *N*-formylkynurenine (NFK), anthranilic acid (AA), indole-3-lactic acid (ILA), and 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTHCC), the condensation product of Trp and acetaldehyde, are analyzed in different grape musts and wines. A method for the determination of bound IAA after alkaline hydrolysis in must and wine is reported that allows the determination of peptide bound Trp, too. The influences of yeast metabolism and different viticultural measures on the amounts of Trp and Trp metabolites are investigated,

* To whom correspondence should be addressed (telephone +49 40 42838 4359; fax +49 40 42838 4342; e-mail thomas_simat@public.uni-hamburg.de).

[†] University of Hamburg.

[‡] Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau.

Indole-3-Acetic Acid and Tryptophan in Must and Wine

J. Agric. Food Chem., Vol. 49, No. 11, 2001 5495

and the role of Trp and Trp metabolites as precursors of the aroma compound AAP, causing UTA, are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Analytical grade AA, IAA, ILA, TOH, and the internal standards (IS), 5-methoxy-tryptophan (5-MeO-Trp) and indole-3-propionic acid (IPA), respectively, were obtained from Sigma (Delsenhofen, Germany). *N*-(3-indolylacetyl)-DL-aspartic acid (IAA-Asp) was from Aldrich (Delsenhofen, Germany), and 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-kresol (BHT) was from Fluka (Delsenhofen, Germany). Trp was donated by Degussa (Hanau, Germany). H-Ala-Trp-Ala-OH (LWL) was purchased from Bachem Biochemica (Heidelberg, Germany). NFK and MTHCC were synthesized as described by Simat et al. (29). Acetonitrile (gradient grade), methanol (gradient grade), and trifluoroacetic acid (TFA) (Uvasol) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Deionized water was purified by a bidistillator (Heraeus-Destamat B1 18E, Kleinsthelfen, Germany). All other chemicals used were of analytical purity.

Materials. The grape musts and wines were provided by the Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau (Veltshöhdhelfen, Germany), where the vines were cultivated using different viticultural conditions (crop load, leaf plucking, soil treatment, time of harvest).

Grapes. Thirty-nine grape samples (*Vitis vinifera* cv. Kerner) of the vintage 1996, harvested at four degrees of ripening, were destemmed and immediately frozen at -18°C . After thawing the samples, the grapes were extracted by a commercially available juice extractor (Vita compact, Krups, Solingen, Germany). The resulting juices were centrifuged at 4000g for 5 min, and aliquots of the supernatant were used for analysis.

Grape Musts. Forty-eight must samples (*V. vinifera* cv. Kerner) of the vintages 1996–1999 were destemmed, crushed, and pressed in a spindle press. The resulting musts were immediately frozen at -18°C . After thawing and centrifugation of the samples at 4000 g for 5 min, aliquots of the supernatant were used for analysis.

Wines. Forty-eight wine samples were produced by the classical white wine vinification from the above-mentioned must samples. After addition of SO_2 (50–55 mg/L SO_2) to the samples, the wines were bottled in wide, rounded bottles (Bocksbeutel) and stored at $13\text{--}14^{\circ}\text{C}$ before analyzing.

Determination of Free Trp and Trp Metabolites. For the determination of free Trp and Trp metabolites, including AA, IAA, ILA, MTHCC, NFK, and TOH, 40 μL of IS solution (5-MeO-Trp, 500 mg/L; IPA, 5 mg/L) was added to 2 mL of grape juice, must, or wine. The samples were adjusted to neutral pH (pH 6–7) using 1 M NaOH. A strong anion exchange (SAX) solid-phase extraction (SPE) was performed according to Hoenicke et al. (21) to separate the nonanionic compounds from the acidic compounds. One milliliter of the pretreated samples were applied to a Merck LiChrolut SAX SPE cartridge (500 mg, 3 mL). Subsequently, Trp and the nonanionic Trp metabolites (IS = 5-MeO-Trp) were eluted with 4 mL of acetonitrile/water (5:95). The anionic Trp metabolites (IS = IPA) were eluted with 3 mL of 2 M acetic acid/acetonitrile (95:5). Both solutions were subjected to HPLC analysis. The determination was performed by IS calculation.

Experimental Design for Hydrolysis Optimization. For the release of ester and amide bound IAA, an alkaline hydrolysis was performed. Hydrolysis experiments were carried out under different conditions with 1 mL of must, spiked with 20 μL of IS solution (5-MeO-Trp, 500 mg/L; IPA, 5 mg/L) in 15 mL polypropylene vials (Wheaton Redi-PakStarLine, Zinsser, Frankfurt, Germany). The vials were transferred into a flat flange reaction vessel (155 $\times$ 75 mm, PTFE coated O-Ring, Schott, Mainz, Germany) that was evacuated (10 mbar) and purged three times with nitrogen. After the samples were aerated and cooled, the alkaline solutions were diluted with 5 mL of bidistilled water and acidified by addition of 700 μL of 85% phosphoric acid (pH 3–3.5).

The hydrolysis parameters were optimized using two different experimental designs. In the first phase, the effects of an antioxidant addition, the NaOH concentration, and the hydrolysis time were estimated in a full factorial design at two levels (2^{3-1}). Using this design, BHT (0, 0.005, and 0.01%) was added to the must, and NaOH concentrations in a wide range of molarity (3, 5, and 7 M) were tested at three different hydrolysis times (3, 5, and 7 h). The hydrolysis efficiency was estimated by analyzing the amount of IAA in the must after hydrolysis at 100°C .

In the second phase, the objective of the experiment was to obtain the optimum hydrolysis conditions (NaOH concentration, hydrolysis time, and temperature) by using the Box-Behnken design (30). On the basis of the results of the first experiment, narrower ranges of NaOH concentration (4, 5, and 6 M) and hydrolysis time (5, 6, and 7 h) were tested at three different temperatures (80, 100, and 120°C). The efficiency of the IAA release from its amide conjugate was estimated by analyzing the recovery of free IAA, added as IAA-Asp to the must before hydrolysis. For this, experiments were carried out with a must without and with addition of 150 $\mu\text{g/L}$ IAA-Asp (corresponds to 90 $\mu\text{g/L}$ IAA), respectively. Finally, the release of Trp from Trp peptides at the optimized hydrolysis condition was investigated by hydrolysis of LWL.

Determination of Free Plus Bound IAA and Trp. After hydrolysis and neutralization, the obtained solution was applied to a Varian Bond Elute C18/OH SPE cartridge (500 mg, 10 mL, Darmstadt, Germany) preconditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of 1 M acetic acid. Subsequently, the column was washed with 5 mL of bidistilled water and the elution was carried out with 5 mL of methanol/water (50:50). The eluate was neutralized with 1 M NaOH and applied to a Merck LiChrolut SAX cartridge (500 mg, 3 mL), which had been conditioned as mentioned above (21). Trp and 5-MeO-Trp (IS) were not retarded and were eluted directly into a 10-mL volumetric flask with 3 mL of bidistilled water. The volumetric flask was diluted to volume with bidistilled water and was directly used for HPLC analysis of Trp. After the SPE cartridge was washed with 10 mL of acetonitrile/water (5:95), IAA and IPA (IS) were eluted with 3 mL of 2 M acetic acid/acetonitrile (95:5). The eluate was directly used for HPLC analysis of IAA. The quantification of Trp and IAA was performed by IS calculation.

HPLC Analysis. The HPLC system consisted of a TSP AS 100 autosampler with integrated thermostat (Thermo Separation Products, Egelsbach, Germany), a Merck L 6200 A high-pressure gradient pump and a Merck F 1080 programmable fluorescence detector. System control, data acquisition, and processing were performed with Kroma system 2000 software, version 1.8 (Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn, Germany). Chromatographic separations were carried out on a Nucleosil 120-3 C18 (250 $\times$ 4 mm) column equipped with a Nucleosil 120-3 C18 (20 $\times$ 4 mm) precolumn (CS, Langerwehe, Germany) using a binary gradient (solvent A: 0.1% TFA in bidistilled water, solvent B: acetonitrile). The following gradient was used: 0 min, 5% B; 15 min, 30% B; 20 min, 50% B. The column was washed for 2 min with 50% B after each run and equilibrated for 8 min at the starting conditions. The flow rate was set to 1 mL/min, the injection volume was 20 μL , and the temperature of the column thermostat was 35°C . The fluorescence excitation was set to 255 nm and the emission to 435 nm for the detection of NFK or AA (retention times < 12 min). After 12 min, the excitation and emission were changed to 270 and 360 nm, respectively, for the detection of Trp, MTHCC, ILA, IAA, or TOH (retention times > 12 min).

Statistical Analysis. The experimental designs of the statistical experiment and their evaluations were performed using STATISTICA software, release 5.1 (StatSoft Inc., Hamburg, Germany). To determine the factors significantly affecting the hydrolysis of IAA, an analysis of variance (ANOVA) was carried out. For studying the influence of the individual viticultural measures on the amounts of Trp and its metabolites, an ANOVA was carried out with SPSS for Windows, release 9.0.1 (SPSS Inc., Germany).

5496 J. Agric. Food Chem., Vol. 49, No. 11, 2001

Hoenicke et al.

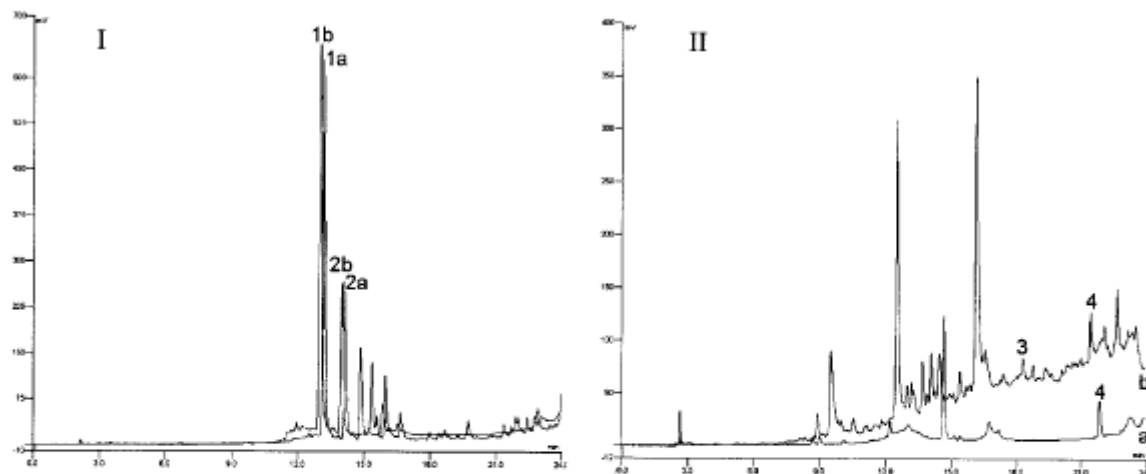


Figure 1. HPLC-FL chromatograms of a must before (a) and after hydrolysis (b), obtained from the Trp-eluate (I), and the IAA-eluate (II) after solid-phase extraction using a strong anion exchange material; Trp 1, 5-MeO-Trp (IS) 2, IAA 3, IPA (IS) 4.

RESULTS AND DISCUSSION

Alkaline Hydrolysis Optimization. In the first phase of the statistical experiment, the ANOVA effects for the three factors antioxidant addition, NaOH concentration, and hydrolysis time on the amount of IAA after hydrolysis were estimated. The molar value of the NaOH as well as the hydrolysis time significantly affected the amount of IAA, while an addition of the antioxidant BHT had no effect. However, using 7 M NaOH, usually applied for hydrolysis of conjugated IAA (24–28), the amount of IAA determined after hydrolysis was at the minimum both by hydrolysis of 3 and 7 h. This effect may be due to a spontaneous degradation of released IAA under the strong alkaline conditions. Using 3 M NaOH, the hydrolysis of amide bound IAA was found to be not complete after 3 h. On the other hand, too long hydrolysis times enhance the risk of an oxidative degradation of released IAA or an oxidative conversion of other indolic compounds to IAA.

The results of the first experiment showed that for hydrolysis of bound IAA the optimum range of the NaOH concentration was between 4 and 6 M with hydrolysis times of longer than 3 h. To achieve a maximum hydrolysis efficiency, a Box-Behnken design was constructed by hydrolysis of IAA-Asp based on the results of the first experiment using three different hydrolysis temperatures. The evaluation of the experimental design revealed that variations in the settings of the temperature and time significantly affected the recovery of IAA released from its amide during hydrolysis, while a variation of the NaOH concentration between 4 and 6 M exhibited no significant effect. The effect of hydrolysis time and temperature on the hydrolysis efficiency of amide bound IAA was not simple, due to many artifacts. Maximum hydrolysis efficiency was achieved using 5 M NaOH at 120 °C for 5 h. Using a hydrolysis temperature of 120 °C, a longer hydrolysis time had a negative effect on the recovery of IAA. However, at lower temperatures the hydrolysis time had no effect. The temperature exhibited a quadratic effect. At 100 °C, the recovery of IAA was found to be at the minimum. It was increased by setting the temperature at 80 °C and especially by setting the temperature at 120 °C.

Alkaline Hydrolysis Validation. Owing to the results of the experimental design, the alkaline hydrolysis was carried out in 5 M NaOH at 120 °C for 5 h. To verify the chosen hydrolysis conditions, IAA was determined after hydrolysis of musts spiked with 0, 50, 100, 150, and 200 µg/L IAA-Asp (corresponds to 0, 30, 60, 90, and 120 µg/L IAA) ($n = 3$). A recovery rate for released IAA of 91% with a coefficient of variation (CV) of 17.6% was considered to be adequate. Furthermore, hydrolysis of LWL revealed a complete release of Trp.

To verify the stabilities of free IAA and Trp during hydrolysis, a must was spiked with 30 µg/L IAA and 5 mg/L Trp ($n = 3$) prior to hydrolysis, and their recoveries were examined after hydrolysis. The method exhibited good results with recoveries of 87% for IAA (CV = 5.6%) and 105% for Trp (CV = 6.4%). The detection limits were 12 µg/L for free plus bound IAA and 50 µg/L for free plus bound Trp, respectively. For statistical control, the amount of free and bound IAA of one must was permanently determined during the ongoing investigations and monitored using a Shewhart control chart which plots center line (mean), warning and control limits (double and triple standard deviation). From the control chart, a CV of 9.2% could be read. The chromatograms of the obtained solutions (Trp-eluate, IAA-eluate) before and after hydrolysis of a must are shown in Figure 1.

Determination of IAA, Trp, and Trp Metabolites in Grape Must and Wine. The values of free and bound IAA and Trp determined in the different musts and wines of the vintages 1996–1999 are shown in Figure 2. Only traces of free IAA (<3 µg/L) could be determined in the examined grape musts, whereas the amount of bound IAA ranged from <12 to 120 µg/L. In the wines, the amount of free IAA varied between <3 and 90 µg/L, while the concentration of bound IAA decreased to around less than 40 µg/L. Trp was analyzed in significantly higher amounts. In dependence on the vintages, 2–80 mg/L of unbound Trp were determined in the grape musts, and <0.012–24 mg/L in the wines. The concentrations of conjugated Trp in the grape musts were nearly the same as in the wines, on average 4 and 4.6 mg/L, respectively. Consequently, in musts Trp existed chiefly unbound, whereas in wines (except for

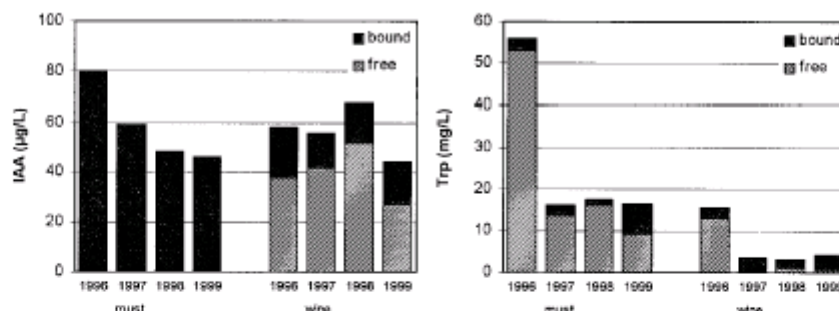


Figure 2. Free and bound IAA and Trp in grape musts and wines of 1996–1999 vintages (arithmetic means; $n = 12$).

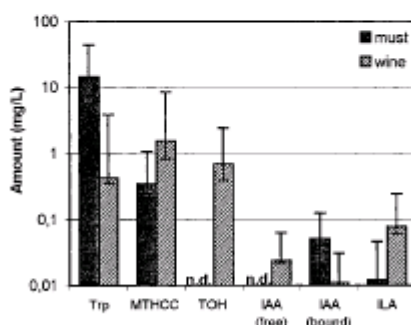


Figure 3. Trp and its metabolites prior to and after fermentation of the 1996–1999 vintages; nd: not detectable, TOH median <0.002 mg/L, IAA median <0.003 mg/L (medians, lower/upper quartiles; logarithmic scale; $n = 48$).

the vintage 1996) Trp was mainly conjugated. By way of contrast, in the musts the growth hormone IAA existed mainly bound in its storage forms. This conjugation of IAA to sugar moieties or amino acids can be attributed to an immobilization of the phytohormone in the plant, since free IAA is immediately utilizable in growth (23). The analyzed small range of the IAA content in the grape musts, as compared with that of Trp, indicates a regulation of the growth hormone by the plant. An ester hydrolysis of a must according to Bandurski and Schulze (24) in 1 M NaOH at room temperature for 1 h revealed that most of the IAA in the must was conjugated to amino acids; ester conjugates of sugar moieties amounted to about 20% of the total bound IAA.

The contents of Trp and Trp metabolites in the examined grape musts and wines are shown in Figure 3. In the grape musts in addition to Trp and conjugated IAA the Trp metabolite ILA was analyzed (<0.004 – 0.1 mg/L). Furthermore, MTHCC, the condensation product of Trp and acetaldehyde could be detected (<0.002 – 3.16 mg/L). TOH, NFK, and AA were not detectable (<0.002 , <0.24 , and <0.011 mg/L); however, the detection limit for NFK was relatively high. In the wines under study, partly higher amounts of Trp metabolites were analyzed. The amount of TOH ranged between <0.002 and 13.1 mg/L and for ILA <0.004 – 0.59 mg/L were detected. The amount of MTHCC in the wines was 0.13 – 24.6 mg/L. However, NFK and AA were not detectable under the chosen conditions (<0.24 and <0.011 mg/L, respectively).

Influence of Yeast Metabolism on Trp and Trp Metabolites. In all batches, the level of free Trp decreased during fermentation, while bound Trp was

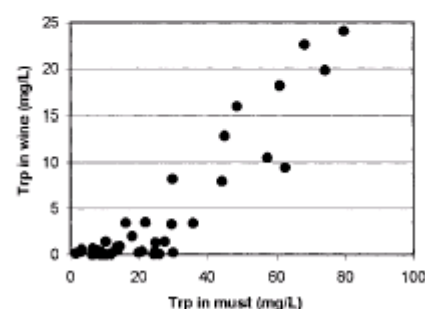


Figure 4. Correlation between the Trp concentration of a must and the Trp concentration of the corresponding wine ($n = 48$).

detected in the same or even in higher concentrations in the wines. This effect may be due to an autolysis of the yeast cells at the end of fermentation. The consumption of free Trp by the yeast was between 60 and 100%. This utilization of Trp by the yeast is in accordance with the results of Bergner and Haller (31), Polo and Laguno (32), and Sponholz (33). However, the utilization of Trp by the yeast depended on the amount of Trp in the must. If the Trp content of the must was low, nearly 100% was utilized. At Trp concentrations above a threshold of about 15 mg/L in the must, its utilization was between 65 and 100%, at an average of 85% (cf. Figure 4). Thus, it seems that a Trp minimum of 15 mg/L is required for yeast growth. This finding indicates the important role of Trp in yeast growth and development. However, Jones and Pierce (34) classified Trp as one of the last amino acid consumed by the yeast from wort, which was not utilized before depletion of the amino acids aspartate, asparagine, arginine, glutamate, glutamine, lysine, serine, and threonine. By way of contrast, in grape must Trp seems to be readily utilized as the preferred nitrogen source. This result corresponds with studies of Bisson (35). According to this author, in grape juice all amino acids appeared to be taken up at the early time of fermentation and especially amino acids originally present in low concentrations, such as Trp, were consumed prior to the onset of the growth phase.

In accordance with the results of Kradolfer et al. (36) and Shin et al. (37), TOH was identified as the main degradation product of Trp in *Saccharomyces*. Between the concentration of Trp in the must and TOH in the wine, a significant correlation ($\alpha < 0.01$) was observed, although the range of the TOH formation rate was very wide (cf. Figure 5). Between 0.04 and 57 mol-% (on average 12 mol-%) of the metabolized Trp was degraded

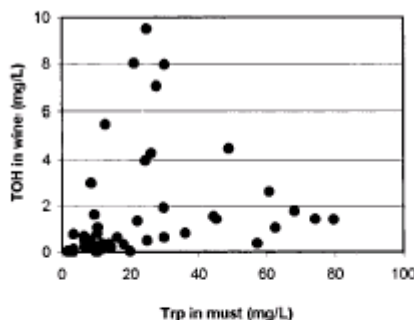


Figure 5. Correlation between the Trp concentration of a must and the TOH concentration of the corresponding wine ($n = 48$).

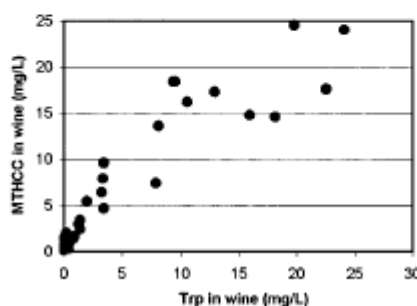


Figure 6. Correlation between the concentration of Trp and MTHCC in wine ($n = 48$).

to TOH. Since TOH was not detectable in musts before fermentation, it can be assumed as a marker for microbiological activity. The degradation pathway of Trp to TOH occurs through the "Ehrlich-pathway", which includes an oxidative transamination to indole-3-pyruvic acid, a decarboxylation to indole-3-acetaldehyde, and a hydrogenation to TOH (36–39). According to Shin et al. (37), IAA and as a byproduct indole-3-aldehyde were formed from indole-3-pyruvate, too, but to a much smaller extent. In this study, no significant correlation was observed between the concentration of Trp in the must and the concentration of IAA in the wine ($\alpha > 0.05$). Regarding the formation of IAA, it has to be clarified whether IAA is formed by the yeast metabolism from Trp and/or by a release from its conjugates, since about 70% of conjugated IAA was hydrolyzed during fermentation. Furthermore, the total amount of free plus conjugated IAA in the wine was mostly the same or even lower than the total amount of IAA in the must (cf. Figure 2).

The metabolic pathway of Trp to AA by *Candida lipolytica* was reported by Schindler and Záhner (40). However, in this study AA was not detectable (<0.011 mg/L). This finding is in accordance with studies of Shin et al. (41). After incubation of *Saccharomyces* with radiolabeled Trp in a broth medium, they found that only 2% of added Trp went through the kynureninase flux (alanine liberation) and they did not detect AA.

Besides AA, in the examined grape musts and wines NFK was not detectable (<0.24 mg/L). This may be due to its relatively high detection limit, since Dollmann et al. (20) detected up to 94 μ g/L of the deformylation product kynurenine in different musts using HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry detection (HPLC-ESI-MS-MS).

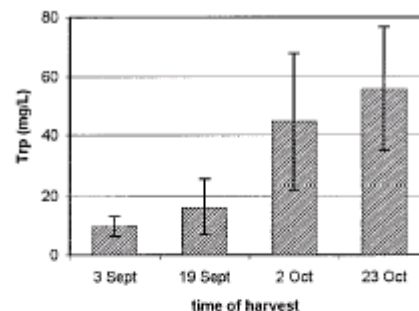


Figure 7. Trp content in grape juices, extracted from grapes harvested at four different times during grape ripeness (arithmetic means, standard deviations; $n = 39$).

Besides TOH, MTHCC was found as another abundant degradation product of Trp. Unlike TOH, MTHCC is not a typical fermentation product formed by yeast metabolism. MTHCC is formed by reaction of Trp with acetaldehyde, which is produced by the yeast during fermentation. Thus, the concentration of MTHCC in the wine was generally higher than in the corresponding must. A significant correlation ($\alpha < 0.01$) was found between the concentration of Trp and MTHCC in the wine (Figure 6). If the Trp content of the wine was low, only traces of MTHCC could be observed. With increasing Trp content, the amount of MTHCC increased as well. However, at high Trp concentrations the formation of MTHCC seems to reach a plateau. This may be due to the concentration of available acetaldehyde, which limited the formation of MTHCC.

Influences of Different Viticultural Measures on Trp and Trp Metabolites. To study the influences of different viticultural measures on the amounts of Trp and Trp metabolites in must and wine, an ANOVA was carried out. Except for the vine prune (10 or 20 buds/vine), the different applied measures partly exert significant influences ($\alpha < 0.01$) on the amounts of IAA and Trp in the musts or wines and on the amounts of the examined Trp metabolites formed during fermentation.

With the stage of maturity, the amounts of bound IAA and free and bound Trp in the grapes increased significantly ($\alpha < 0.01$). In the wines produced from late harvested grapes, significantly higher ($\alpha < 0.01$) amounts of Trp metabolites were analyzed. By analysis of 39 grape juices, extracted from grapes harvested at four different times during grape ripeness (3 Sept; 19 Sept; 2 Oct; 23 Oct) a significant increase ($\alpha < 0.01$) in the Trp content with advanced ripeness could be observed (Figure 7). This finding confirms the well-known fact that the nitrogen or amino acid contents of the grape musts and wines increase with the ripeness of the harvested grapes (10, 33, 42–45).

A reducing of the leaf area to 50% by leaf plucking resulted in significantly lower concentrations of bound IAA in the musts ($\alpha < 0.01$) (Figure 8). The amounts of free and bound Trp in the musts or the examined Trp metabolites in the wines decreased as well. According to Löhnertz et al. (45), a defoliation leads to a loss of amino acids stored in the leaves and partial movement to the berries during veraison. Moreover, a defoliation reduces the protection of the grapes against sun rays. The resulting higher temperatures in the grapes lead to a higher protein synthesis and therefore to lower amounts of free amino acids.

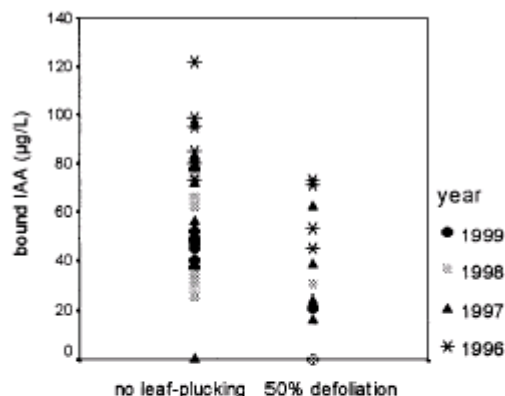


Figure 8. Influence of a leaf plucking on the amount of bound IAA in musts ($n = 48$).

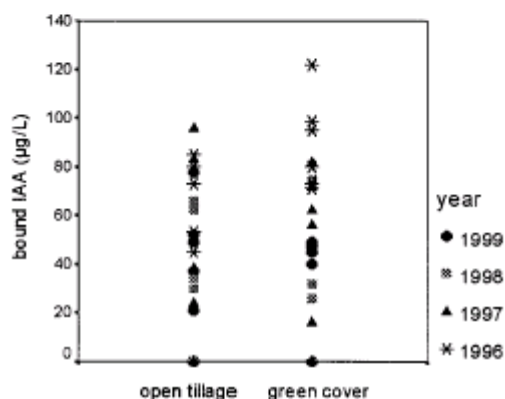


Figure 9. Influence of the soil treatment on the amount of bound IAA in musts ($n = 48$).

The effect of the soil treatment (open tillage, permanent green cover crop) varied and depended on the respective climatic conditions of the vintage. In the examined musts, only the Trp content was significantly affected ($\alpha < 0.01$). For IAA, there was a significant interaction ($\alpha < 0.05$) between the soil treatment and the vintage of the respective grapes (Figure 9). Especially in dry years, such as 1999, higher amounts of bound IAA or free and bound Trp were detected in the musts produced from vines from an open tillage. However, in the vintage 1996 (a relatively damp year), the open tillage led to significantly lower amounts of bound IAA or free and bound Trp. This interaction between the cultivation system and the climate may be due to the following factors: Besides the nitrogen and water competition by the plants, the permanent green cover crop leads to a lower water deposition in the deeper layers of the soil. Since the nitrification is lower in dry soils, the nitrate concentration in soils of a permanent green cover crop is usually small. Especially in dry years, these lower nitrogen conditions lead to a lower storage of nitrogen in the grapes (12, 45–47). However, in damp years with a high rainfall, the washing out of the water-soluble nitrate is higher in open tilled soils than in green covered soils. Therefore, in these years, the storage of nitrogen in the grapes is higher in vines cultivated by a permanent cover crop.

Since the climatic conditions of a year play an important part in the storage of nitrogen compounds in

the grapes (43, 44, 48), a significant influence ($\alpha < 0.01$) of the vintage on the amounts of IAA and Trp in the musts and the examined Trp metabolites in the wines was observed. Musts and wines of the 1996 vintage, a year with a relatively high and constant rainfall, contained significantly higher amounts of Trp than those of 1997–1999 (cf. Figure 2). In this damp year, the intake of nitrogen compounds from the soil in the grapes was increased and the protein synthesis was reduced. On the other hand, in the dry year 1999, the amount of free Trp in the must was low, but the fraction of bound Trp was high as compared with that of 1996–1998.

Relation between Trp and Trp Metabolites and the Occurrence of UTA. As the main causes of UTA formation, dryness, high yield, and an early grape vintage are under consideration (12, 14). However, if the nutritional supply for the vines is sufficient, a high crop load does not increase the potential of a wine to express UTA (3). Regarding different viticultural measures, it turned out that UTA-supporting measures led to comparatively lower amounts of the AAP-precursor IAA, Trp, or the examined Trp metabolites in musts and wines. For example, lower amounts of Trp, IAA, and other Trp metabolites were analyzed in musts and wines of a dry vintage as well as in musts and wines from an early grape vintage. However, the level of yield (10 or 20 buds/vine) did not significantly affect the amounts of Trp and Trp metabolites.

Therefore, it seems that the occurrence of UTA is related to a low content of nitrogen substances in the must or wine as discussed by Löhnertz (12) and Löhnertz et al. (45). Consequently, the appearance of UTA seems not to be directly caused by a higher amount of the precursor IAA in the must or wine but rather to be connected with a nitrogen deficiency of the harvested grapes. In this study, it could be shown that the Trp utilization during fermentation was nearly 100% if the Trp concentrations of the must were low. Therefore, it has to be investigated whether the metabolic fate of Trp in *Saccharomyces cerevisiae* is influenced by the nitrogen supply of the must. However, according to Köhler et al. (49), a legally permitted addition of 30 g/hL diammoniumphosphate has no significant effect on UTA formation.

Regarding the development of UTA, it was shown that the aroma impact substance AAP can be formed by an oxidative degradation of IAA after fermentation and sulfuration of the wine (19). Therefore, the metabolic synthesis of IAA by the yeast and the finally resulting IAA concentration in the wine before sulfuration have to be further researched.

In summary, it can be stated that the amounts of Trp and bound IAA in the must or the amounts of Trp metabolites in the wine are affected by the climatic conditions of the vintage and by different viticultural measures such as the time of harvest, the soil treatment, and leaf plucking. However, UTA-supporting measures led to comparatively lower amounts of Trp and the examined Trp metabolites in musts and wines. Therefore, the formation of UTA seems more likely to be related to a low content of nitrogen substances and not to a formation of higher amounts of IAA in the grapes.

ABBREVIATIONS USED

AA, anthranilic acid; AAP, 2-aminoacetophenone; ANOVA, multifactorial analysis of variance; BHT, 2,6-

5500 J. Agric. Food Chem., Vol. 49, No. 11, 2001

Hoenicke et al.

di-*tert*-butyl-*p*-kresol; IAA, indole-3-acetic acid; IAA-Asp, *N*-(3-indolylacetyl)-DL-aspartic acid; ILA, indole-3-lactic acid; IPA, indole-3-propionic acid; IS, internal standard; LWL, H-Ala-Trp-Ala-OH; 5-MeO-Trp, 5-methoxy-tryptophan; MTHCC, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid; NFK, *N*-formylkynurenine; SPE, solid-phase extraction; SAX, strong anion exchange; TFA, trifluoroacetic acid; Trp, tryptophan; TOH, tryptophol; UTA, untypical aging off-flavor.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Veitshöchheim, for providing the must and wine samples.

LITERATURE CITED

- (1) Rapp, A.; Verstini, G.; Ullemeyer, H. 2-Aminoacetophenone: Verursachende Komponente der "Untypischen Alterungsnote" ("Naphthalinton", "Hybridton") bei Wein. *Vitis* 1993, 32, 61–62.
- (2) Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Geßner, M.; Köhler, H. J. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil I: Untersuchungen zum Auftreten und zur sensorischen Charakterisierung der "Untypischen Alterungsnote". *Rebe Wein* 1995, 48, 350–356.
- (3) Rapp, A.; Verstini, G. Fehlaroma: Die untypische Weinalterung. *Dtsch. Weinbau* 1995, 18, 18–22.
- (4) Hühn, T.; Sponholz, W. R.; Gafner, J. Einflussfaktoren der vorzeitigen und untypischen Weinalterung. *Schweizer. Z. Obst Weinbau* 1997, 133, 636–638.
- (5) Eder, R. Mängel, Fehler und Krankheiten der Weine. Ursachen, Vermeidung und Behebung. Teil 10: Untypische Alterungsnote (UTA). *Winzer* 1998, 54, 13–14.
- (6) Geßner, M.; Köhler, H. J.; Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Miltenberger, R.; Schmitt, A. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil II: Beschreibende Verkostung von UTA-Weinen; Beziehungen zwischen Sensorik und chemisch-physikalischen Analysenwerten. *Rebe Wein* 1995, 48, 388–394.
- (7) Fischer, U.; Sponholz, R. Die sensorische Beschreibung der Untypischen Alterungsnote. *Dtsch. Weinbau* 2000, 3, 16–21.
- (8) Rapp, A. Den Geheimnissen der Alterung des Weines auf der Spur. *Winzer-Z.* 1995, 10, 32–35.
- (9) Müller, E.; Petermel, M.; Löhnertz, O. Aktuelle Forschungsergebnisse: Stickstoff und Qualität. *Dtsch. Weinbau* 1998, 7, 14–17.
- (10) Köhler, H. J.; Christoph, N.; Geßner, M.; Bauer-Christoph, C. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil III: Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der "Untypischen Alterungsnote" und dem Reifestadium der Trauben (Lesetermin). *Rebe Wein* 1995, 48, 424–430.
- (11) Wohlfahrt, P. Untypische Alterungsnote: Erfahrungen aus den vergangenen drei Jahren. *Badische Winzer* 1995, 20, 383–388.
- (12) Löhnertz, O. UTA und Rebenernährung. Streß macht alt. *Dtsch. Weinmagazin* 1996, 18, 18–23.
- (13) Schwab, A.; Petermel, M.; Köhler, H. J.; Helgel, K. P. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil IV: Beeinflussung durch weinbauliche Maßnahmen. *Rebe Wein* 1996, 49, 181–187.
- (14) Schwab, A.; Christoph, N.; Köhler, H. J.; Geßner, M.; Simat, T. J. Einfluss weinbaulicher Maßnahmen auf die Ausprägung der Untypischen Alterungsnote bei Weißweinen. Teil I: Einfluss des Lesezeitpunktes. *Vitic. Enol. Sci.* 1999, 54, 114–120.
- (15) Rapp, A.; Verstini, G.; Ullemeyer, H.; Engel, L. Nachweis und Bestimmung von 2-Aminoacetophenon in vergorenen Modellösungen. *Vitis* 1995, 34, 193–194.
- (16) Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Geßner, M.; Köhler, H. J. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil VI: Untersuchungen zur Bildung von *o*-Aminoacetophenon aus Produkten des Tryptophan-Stoffwechsels vor der alkoholischen Gärung. *Rebe Wein* 1996, 49, 246–250.
- (17) Dollmann, B.; Wichmann, D.; Schmitt, A.; Köhler, H. J.; Schreier, P. Formation of the "untypical aging off-flavour" in wine: Generation of 2-aminoacetophenone in model studies with *Saccharomyces cerevisiae*. *Vitic. Enol. Sci.* 1996, 51, 122–125.
- (18) Geßner, M.; Köhler, H. J.; Christoph, N.; Bauer-Christoph, C. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil VII: Untersuchungen zur Bildung von *o*-Aminoacetophenon aus Produkten des Tryptophan-Stoffwechsels bei der alkoholischen Gärung. *Rebe Wein* 1996, 49, 251–255.
- (19) Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Geßner, M.; Köhler, H. J.; Simat, T. J.; Hoenicke, K. Bildung von 2-Aminoacetophenon und Formylaminoacetophenon im Wein durch Einwirkung von schwefliger Säure auf Indol-3-essigsäure. *Vitic. Enol. Sci.* 1998, 53, 79–86.
- (20) Dollmann, B.; Richling, E.; Herderich, M.; Köhler, H. J.; Schmitt, A.; Schwab, A.; Schreier, P. High Performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS) for the quantification of L-kynurenine and indole-3-acetic acid in grape must by isotope dilution assay. *Vitis* 1997, 36, 97–101.
- (21) Hoenicke, K.; Simat, T. J.; Steinhart, H.; Christoph, N.; Köhler, H. J.; Schwab, A. Determination of tryptophan and tryptophan metabolites in grape musts and wine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999, 467, 671–677.
- (22) Mattivi, F.; Vrhovšek, U.; Verstini, G. Determination of indole-3-acetic acid, tryptophan and other indoles in must and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1999, 855, 227–235.
- (23) Cohen, J. D.; Bandurski, R. S. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1982, 33, 403–430.
- (24) Bandurski, R. S.; Schulze, A. Concentration of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants. *Plant Physiol.* 1977, 60, 211–213.
- (25) Blalek, K.; Cohen, J. D. Quantification of indoleacetic acid conjugates in bean seeds by direct tissue hydrolysis. *Plant Physiol.* 1989, 90, 398–400.
- (26) Ilic, N.; Normanly, J.; Cohen, J. D. Quantification of free plus conjugated indoleacetic acid in *Arabidopsis* requires correction for the nonenzymatic conversion of indolic nitriles. *Plant Physiol.* 1996, 111, 781–788.
- (27) Rlov, J.; Bangerth, F. Metabolism of auxin in tomato fruit tissue. *Plant Physiol.* 1992, 100, 1396–1402.
- (28) Sitbon, F.; Östlin, A.; Sundberg, B.; Olsson, O.; Sandberg, G. Conjugation of indole-3-acetic acid (IAA) in wild-type and IAA-overproducing transgenic tobacco plants, and identification of the main conjugates by fast atom bombardment liquid chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol.* 1993, 101, 313–320.
- (29) Simat, T. J.; Meyer, K.; Steinhart, H. Synthesis and analysis of oxidation and carbonyl condensation compounds of tryptophan. *J. Chromatogr. A* 1994, 661, 93–99.
- (30) Box, G. E. P.; Behnken, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 1960, 2, 455–475.
- (31) Bergner, K. G.; Haller, H. E. Das Verhalten der freien Aminosäuren von Weißwein im Verlauf der Gärung, bei Ausbau, Lagerung und Umgärung. *Mitt. Klosterneuburg* 1969, 19, 264–288.
- (32) Polo, M. C.; Llaguno, C. Changes in free amino acids during the alcoholic fermentation of grape juice by flower yeasts. II: Composition of wines and yeast cells. *Connaiss. Vigne Vin.* 1974, 8, 321–342.

Indole-3-Acetic Acid and Tryptophan in Must and Wine

J. Agric. Food Chem., Vol. 49, No. 11, 2001 5501

- (33) Sponholz, W. R. Nitrogen Compounds in Grapes, Must, and Wine. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, Rautz, J. M., Ed.; Seattle, WA, 18–19 June 1991; pp 67–77.
- (34) Jones, M.; Pierce, J. S. Adsorption of amino acids from wort by yeast. *J. Instit. Brew.* **1964**, *70*, 307–315.
- (35) Bisson, L. F. Influences of Nitrogen on Yeast and Fermentation of Grapes. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, Rautz, J. M., Ed.; Seattle, WA, 18–19 June 1991; pp 78–89.
- (36) Kradolfer, P.; Niederberger, P.; Hütter, R. Tryptophan degradation in *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of two aromatic aminotransferases. *Arch. Microbiol.* **1982**, *133*, 242–248.
- (37) Shin, M.; Shinguu, T.; Sano, K.; Umezawa, C. Metabolic Fates of L-Tryptophan in *Saccharomyces uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*). *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1792–1795.
- (38) Ehrlich, F. Über Tryptophol (β -Indolyläthylalkohol), ein neues Gärprodukt der Hefe aus Aminosäure. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1912**, *45*, 883.
- (39) Lingens, F.; Goebel, W.; Uesseler, H. Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren in *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Repression, Induktion und Aktivierung. *Eur. J. Biochem.* **1967**, *1*, 363–374.
- (40) Schindler F.; Zahner, H. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Tryptanthrin, ein von Tryptophan abzuleitendes Antibiotikum aus *Candida lipolytica*. *Arch. Microbiol.* **1971**, *79*, 187–203.
- (41) Shin, M.; Sano, K.; Umezawa, C. Metabolism of Tryptophan to Niacin in *Saccharomyces uvarum*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1991**, *37*, 269–283.
- (42) Klewer, W. M. Changes in the concentration of free amino acids in grape berries during maturation. *Am. J. Enol. Vitic.* **1968**, *19*, 166–174.
- (43) Schrader, U.; Lemperle, E.; Becker, N. J.; Bergner, K. G. Der Aminosäure-, Zucker-, Säure- und Mineralgehalt von Weinbeeren in Abhängigkeit vom Kleinklima des Standortes der Rebe. II. Mitteilung Aminosäuregehalt. *Vitic. Enol. Sci.* **1976**, *31*, 9–24.
- (44) Tusseau, D.; Benoit, C.; Valade, M. Amino acids contents during grape ripening. In *Actualités Oenologiques 89, Comptes Rendus de 4. Symposium International d'oenologie*; Ribereau-Gayon, P., Lonvaud, A., Eds.; Bordeaux, France, 15–17 Juin 1989; pp 20–24.
- (45) Löhnertz, O.; Prior, B.; Bleser, B.; Linsenmeyer, A. Einfluss von weinbaulichen Maßnahmen auf die Aminosäuregehalte in Trauben und Mosten der Sorte Riesling. In *Intervitis Interfructa. 5. Internationales Symposium: Innovationen in der Kellerwirtschaft. Mikroorganismen und Weinbereitung*, Stuttgart, Germany; 11–12 June 1998; pp 1–23.
- (46) Redl, H. Gärungsprobleme und Beeinträchtigungen der Weinqualität durch Weingartenbegrünung? *Winzer* **1999**, *55*, 6–11.
- (47) Schaller, K. Influence of different soil tillage systems on uptake of N, P, K, Mg, Ca, and organic N in berries during growth and development of the variety white Riesling. *Bull. de l'O.I.V.* **1999**, *72*, 602–629.
- (48) Flancy, D.; Poux, C. Notes sur la teneur en acides aminés du moût de raisin et du vin fonction de conditions de l'année. *Ann. Technol. Agric.* **1965**, *14*, 87–88.
- (49) Köhler, H. J.; Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Geßner, M.; Curschmann, K. Die "Untypische Alterungsnote" im Wein, Teil V: Einfluß kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf die Ausprägung der UTA. *Rebe Wein* **1996**, *49*, 213–218.

Received for review May 3, 2001. Revised manuscript received August 4, 2001. Accepted August 4, 2001. This research project was supported by the Weinbauamt Franken e.V. and the FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn), the AIF and the Ministry of Economics and Technology. AIF Project No. 11770 N.

JF010575V

3.3 Einfluss weinbaulicher und kellerwirtschaftlicher Maßnahmen

3.3.1

Indolessigsäure in Mosten und Weinen – Bedeutung hinsichtlich der Ausbildung einer „Untypischen Alterungsnote“ (UTA) in Wein

K. Hoenicke¹, T.J. Simat¹, H. Steinhart¹, M. Geßner², H.J. Köhler², A. Schwab², N. Christoph³

¹ Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Grindelallee 117, D-20146 Hamburg

² Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Herrnstr. 8, D-97209 Veitshöchheim

³ Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern, Luitpoldstr. 1, D-97082 Würzburg

Zusammenfassung

Indolessigsäure (IAA) gilt als Precursor von 2-Aminoacetophenon, das für die Ausbildung eines als „Untypischen Alterungsnote“ bezeichneten Fehlromas verantwortlich ist. Als Ursache gelten Stresssituationen im Weinbau durch Wasser- oder Nährstoffmangel gekoppelt an eine frühe Lese. Untersuchungen zum Einfluss verschiedener weinbaulicher Parameter zeigten, dass die Konzentration an gebundener IAA in den Trauben insbesondere von den klimatischen Verhältnissen eines Jahrgangs abhängig ist und während der Reifephase der Trauben zunimmt. Ungenügende Laubarbeiten oder eine Dauerbegrünung in feuchten Jahren führen zu höheren Gehalten an IAA. Untersuchungen zum Einfluss verschiedener kellerwirtschaftlicher Parameter zeigten einen Einfluss der Nährstoffversorgung des Mostes, des Hefestammes und der Gärtemperatur.

Indole acetic acid in musts and wines – importance as regards the formation of a „non-typical ageing note (UTA)“ in wine

Summary

Indole-3-acetic acid (IAA) is considered as a precursor of 2-aminoacetophenone (AAP), an aroma compound causing the so called “untypical aging off-flavor” (UTA) in white wine. Particularly dry-stress during cultivation caused by low rainfall and intensive solar radiation as well as nutrient deficiencies are assumed as main causes for UTA-formation. By investigating the influence of different vinicultural conditions on the amount of IAA in grape must and wine it could be shown that the amount of IAA is mainly influenced by the climatic condition of the year and increases during the ripeness of the grapes. Moreover, the soil treatment and a leaf plucking exhibit a significant influence. By investigating the influence of the cellar, it could be shown that the nutrient supply by the must, the yeast strain and the fermentation temperature exhibit a significant influence, too.

Acide indole-acétique dans les moût et les vins – importance par rapport au développement d’une „note atypique de maturation“ dans le vin

Résumé

L’acide indole-acétique (IAA) est reconnu comme étant le précurseur de l’acide 2-aminoacétophenone (AAP), responsable du développement d’une note atypique de maturation. La raison en est une situation de stress dans les vigne, beaucoup de soleil, peu de pluie, il en résulte un manque de matière nutritives responsable de l’apparition de la note atypique de maturation. Des recherches sur divers paramètres viticoles nous montrent que la concentration en IAA dans les raisins dépend essentiellement des conditions climatique de chaque millésime et qu’elle est augmentée en période de maturation. Un traitement foliaire insuffisant ainsi qu’un enherbement permanent dans des années plutôt humides sont également liés a des teneurs élevées en IAA. Des recherches en prenant en compte des paramètres œnologiques cette fois ci, montrent une influence importante de l’apport de matières nutritives au moût, des levures et de la température de fermentation.

Einleitung

Das in Pflanzen in freier und gebundener Form vorliegende Phytohormon Indoleessigsäure (IAA) gilt als Precursor der sensorisch hochwirksamen Substanz 2-Aminoacetophenon (AAP), die bereits in Konzentrationen von 1 µg/L zu einer sowohl olfaktorisch als auch gustatorisch wahrnehmbaren Bukettveränderung im Weißwein führt (RAPP et al., 1993; CHRISTOPH et al., 1995; GEßNER et al., 1995). Diese Veränderung wird sensorisch mit Begriffen wie „Akazienblüte“, „Hybridton“, „Naphtalinnote“, „Bohnerwachs“, „Fuselalkohol“ oder „nasse Wolle“ beschrieben (CHRISTOPH et al., 1995; GEßNER et al., 1995, FISCHER und SPONHOLZ, 2000). Die Ausbildung dieses als sogenannte „Untypische Alterungsnote“ (UTA) bezeichneten Fehleraromas erfolgt innerhalb weniger Monate nach Gärungsabschluss und Schwefelung des Weines. Als Ursache werden Stressfaktoren im Weinbau infolge Wasser- oder Nährstoffmangels verantwortlich gemacht. So tritt die UTA in Abhängigkeit von den klimatischen Verhältnissen eines Jahres insbesondere in trockengestressten Anlagen mit hohen Erträgen, flachgründigen Böden und bei frühen Lesen auf (KÖHLER et al., 1995; SCHWAB et al., 1996). Nach SCHWAB et al. (1999) führt insbesondere die Kombination aus früher Lese und hoher Ertragsbelastung zur Ausbildung einer UTA. Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von AAP ergaben, dass dieses durch Umsetzung von IAA mit Schwefliger Säure bzw. SO₂ bei der Schwefelung des Jungweines entstehen kann. Hierbei wird, initiiert durch Superoxid- und Hydroxylradikale, die bei der aeroben Oxidation von Sulfid zu Sulfat entstehen, der Pyrrolring der IAA oxidativ gespalten (CHRISTOPH et al., 1998).

Die kellerwirtschaftlichen Maßnahmen zur Verringerung der UTA sind begrenzt. Keinen nennenswerten Einfluss haben Mostoxidation, Enzymbehandlung bei Most, Zusatz von Hefenährsalz (Diammoniumphosphat) sowie Klär- und Filtrationsverfahren (KÖHLER et al., 1996). Lediglich eine kontrollierte Vergärung bei niedrigen Temperaturen wirkt der Ausbildung einer UTA entgegen. Auch durch Verwendung bestimmter Reinzuchthefen, welche verstärkt fruchtige Aromen bilden (Lalvin W, Lalvin E), kann das Auftreten der UTA verzögert aber nicht vollkommen verhindert werden (KÖHLER et al., 1996). HÜHN et al. (1996) berichten von einer möglichen AAP-Bildung durch die Hauptvertreter der Spontanflora *Kloeckera apiculata* und *Metschnikowia pulcherrima*.

Bei Rotweinen wurde bisher noch keine UTA festgestellt. Vergleichbares trifft auch für Weißweine aus Pressmost (letzte 10 % der Kelterung) zu. Der Grund hierfür kann mit dem deutlich erhöhten Gehalt an phenolischen Verbindungen erklärt werden, die eine antioxidative Wirkung besitzen. Auch durch einen Zusatz von antioxidativ wirksamen Substanzen wie Ascorbinsäure oder Kaffeesäure zu UTA-gefährdeten Weinen kann der Abbau der IAA zu AAP unterbunden werden (GEßNER et al., 1999).

Um zu überprüfen inwiefern der Precursor IAA durch verschiedene weinbauliche und kellerwirtschaftliche Maßnahmen beeinflusst wird, wurden im Rahmen eines Weinbauversuches der Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau (LWG) in Veitshöchheim Moste und Weine aus verschiedenen kultivierten Reben auf ihren Gehalt an freier und gebundener IAA untersucht. Weiterhin wurde durch Analyse von IAA in verschiedenen Stadien der Fermentation ausgewählter Moste die Bildung bzw. Freisetzung und der Abbau der IAA durch die Hefe unter dem Einfluss verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen betrachtet.

Einfluss weinbaulicher Maßnahmen

Untersuchungsmaterial

Um den Einfluss verschiedener weinbaulicher Faktoren wie Ertragsbelastung, frühe, vorzeitige Lese, ungenügende Laubarbeiten oder Trockenstress durch eine permanente Begrünung auf den Gehalt an IAA im Most bzw. Wein zu überprüfen, wurde an der LWG Veitshöchheim ein Versuch in einer 12-jährigen Rebanlage der Rebsorte Kerner auf der Unterlage SO 4 durchgeführt. Der mittelgründige Standort mit tonig-lehmigem Boden und einem Humusgehalt von 1,8 % ist Südwest-West exponiert bei einer Hangneigung von 10 %. Die randomisierte Blockanlage enthält Varianten mit den Prüffaktoren Anschnitt (10 Augen/Stock, 20 Augen/Stock), Lese (Lese bei Vollreife, 2 Wochen frühere Lese), Blattflächenreduzierung (Blattflächenreduzierung um 50 %, keine Laubarbeiten) und Bodenbewirtschaftung (offener Boden, begrünter Boden mit Frühjahr- und Spätsommeransaat verschiedener wasserzehrender Begrünungspflanzen). Der Weinausbau erfolgte standardisiert in 100 L Edelstahlgärtanks.

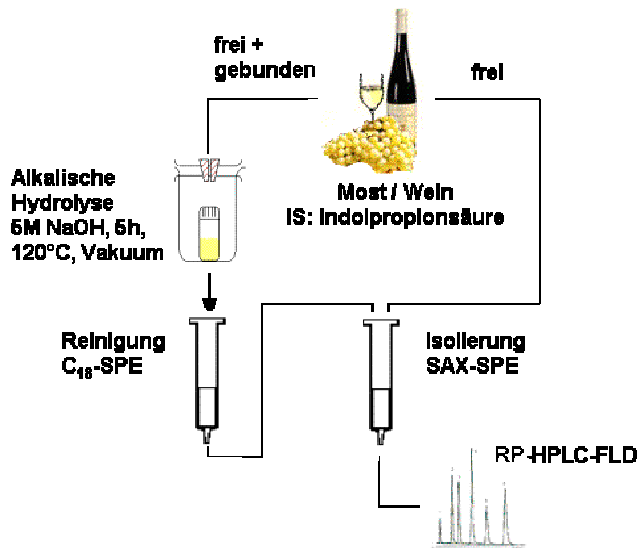


Abb. 1: Schema zur Bestimmung von freier und gebundener Indolpropionsäure in Mosten und Weinen

Insgesamt standen 56 Moste und die aus diesen Mosten hergestellten Weine der Jahrgänge 1996-1999 zur Verfügung.

IAA-Analytik

Die Bestimmung von freier und gebundener IAA in Mosten und Weinen erfolgte nach der Methode von HOENICKE et al. (2001). Ester- oder säureamidisch gebundene IAA wird durch alkalische Hydrolyse in Natronlauge, 5 mol/L in 5 Stunden bei 120 °C im Vakuum freigesetzt. Nach Neutralisation der Hydrolyselösung mittels Phosphorsäure, 85 % wird die Lösung mittels Festphasenextraktion an einer C18/OH-Phase gereinigt und IAA anschließend an einem stark basischen Anionenaustauscher (SAX) isoliert. Eine quantitative Bestimmung erfolgt mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion. Freie IAA wird direkt nach Isolierung durch Festphasenextraktion an einem Anionenaustauscher analysiert. Als interner Standard wird Indolpropionsäure verwendet, die dem Wein vor der Analyse zugesetzt wird (siehe Abb. 1).

AAP-Analytik und sensorische Bewertung

Zur Quantifizierung von AAP wurden die Weine nach Abstich, Schwefelung und Abfüllung und einer simulierten Alterung durch Wärmebehandlung (5 Tage bei 38 °C) mit dem internen Standard Ethylvanillin versetzt, 7 h kontinuierlich mit Trifluormethan (Freon) extrahiert und die Extrakte an einer Vigreux-Kolonne eingengt. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte gaschromatographisch mit massenselektiver Detektion nach der Methode von CHRISTOPH et al. (1995).

Für die sensorische Bewertung wurden die Weine von einem fachlich versierten Prüferpanel unter Verwendung einer 0-3 Punkte umfassenden Bewertungsskala (0 = keine UTA; 3 = starke UTA) sensorisch beurteilt.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Analysenergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software SPSS für Windows, Version 9.0.1 der Firma SPSS Inc. Zur Ermittlung des Einflusses unterschiedlicher weinbaulicher Parameter auf die Gehalte an freier und gebundener IAA in den untersuchten Mosten und Weinen wurde eine mehrfaktorielle ANOVA durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

In den untersuchten Mosten wurden in Abhängigkeit vom Jahrgang zwischen <12 µg/L und 135 µg/L gebundene IAA (in ihrer Speicherform als Ester- oder Säureamid) nachgewiesen. Freie IAA war in den Mosten nicht nachweisbar (< 3 µg/L). Ihre Bildung erfolgte im Verlauf der Fermentation. So wurden nach Gärung und Schwefelung in den Weinen bis zu 88 µg/L freie IAA nachgewiesen, während der Anteil an gebundener IAA auf weniger als 40 µg/L abnahm.

Bei den untersuchten Mosten und Weinen zeigte sich eine deutliche Jahrgangsdifferenzierung. Die Moste und Weine des Jahrgangs 1996, ein relativ gleichmäßig durchfeuchtetes Jahr mit geringer sensorischer UTA-Ausprägung (UTA-Bewertungen < 1), lieferten unter den vier Versuchsjahren die deutlich höchsten IAA-Werte, die des relativ trockenen Jahrgangs 1999 die geringsten.

Bis auf den Anschnitt zeigten alle durchgeführten weinbaulichen Maßnahmen einen signifikanten Einfluss auf den IAA-Gehalt der Moste und Weine. Bei spät gelesenen Trauben (Vollreife) wurden sowohl in den Mosten als auch in den Weinen hochsignifikant höhere IAA-Gehalte analysiert ($\alpha < 0.01$). Eine Entblätterung bewirkte dagegen eine hochsignifikante Abnahme der IAA-Gehalte ($\alpha < 0.01$). Bei der Bodenbearbeitung wurden dagegen unterschiedliche Effekte analysiert. Während in den Weinen eine Begrünung der Rebassen zu hochsignifikant höheren IAA-Gehalten führte ($\alpha < 0.01$), trat bei den Mosten eine hochsignifikante Wechselwirkung mit dem Jahrgang und dem Lesetermin auf ($\alpha < 0.01$). So führte 1996 (feuchtes Jahr) eine permanente Begrünung ebenfalls zu höheren IAA-Konzentrationen in den Trauben, während 1997 (trockenes

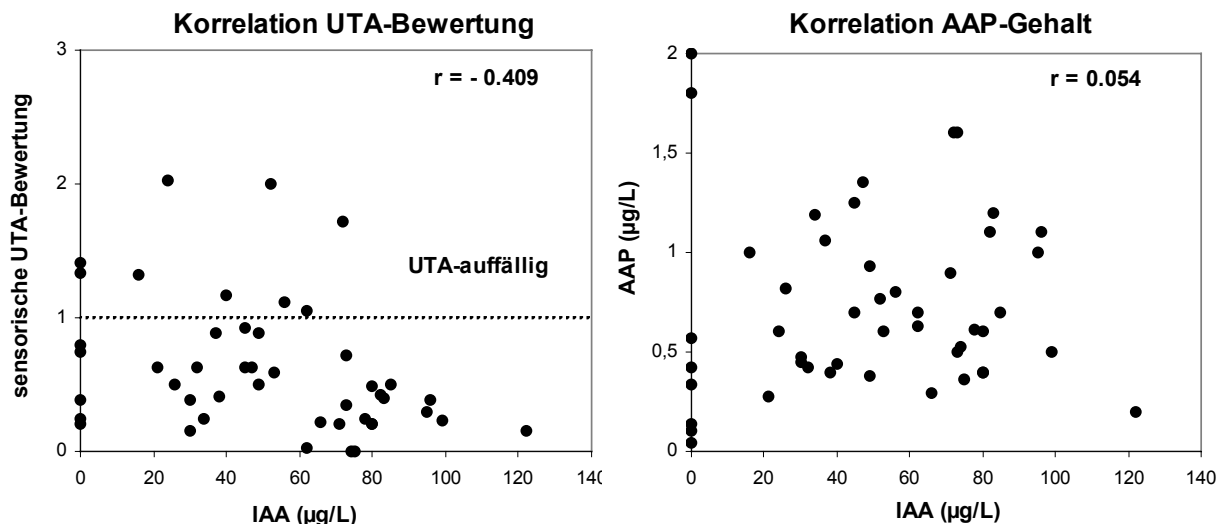


Abb. 2: Zusammenhang zwischen IAA-Gehalt des Mostes und der sensorischen UTA-Bewertung bzw. dem AAP-Gehalt des entsprechenden Weines

Jahr) lediglich bei der frühen Lese durch eine Begrünung höhere IAA-Gehalte ermittelt wurden. Bei der späten Lese sowie in den ebenfalls trockenen Jahren 1998 und 1999 wiesen die Moste aus der offenen Variante die höheren IAA-Gehalte auf.

In bisherigen Arbeiten wurde die These aufgestellt, dass in Stresssituationen durch Wassermangel eine verstärkte Produktion des Wachstumshormones IAA von der Pflanze erfolgt, so dass im Most und nach der Gärung im Wein höhere Mengen dieses Precursors vorliegen, der anschließend oxidativ zum AAP abgebaut werden kann. Diese Vermutung konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Zwischen dem IAA-Gehalt im Most bzw. Wein und dem AAP-Gehalt im Wein nach Warmlagerung konnte kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden ($\alpha > 0.05$). Dagegen wurde zwischen dem IAA-Gehalt im Most und der sensorischen UTA-Bewertung des Weines ein hochsignifikanter Zusammenhang ($\alpha < 0.01$) analysiert. Entgegen den bisherigen Annahmen scheinen jedoch Weine mit einer stärkeren UTA-Ausprägung geringere IAA-Konzentrationen im Most aufzuweisen (siehe Abb. 2).

Festgehalten werden kann, dass Maßnahmen, die zu einem Wasser- oder Nährstoffstress für die Rebe führen, nicht konsequent auch höhere IAA-Konzentrationen in der Traube zur Folge haben. Vielmehr wird dieser AAP-Precursor ähnlich von den endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst wie andere Mostinhaltsstoffe, i.e. Aminosäuren und

Polyphenole. So sind in trockenen Jahren bzw. bei ungenügender Traubenreife nicht nur geringere IAA-Gehalte sondern auch deutlich niedrigere Gehalte an Aminosäuren und phenolischen Verbindungen (welche durch ihre antioxidative Wirkung einen Abbau der IAA zum AAP verzögern bzw. inhibieren können) im Most bzw. Wein vorhanden (SCHWAB et al., 2001). Auch eine Blattflächenreduzierung bewirkt neben einer Verringerung der IAA-Gehalte geringere Aminosäure-, Mineralstoff- und Polyphenolgehalte (SCHWAB et al., 2001).

Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten negativen Korrelation ($r = -0.409$) zwischen dem IAA-Gehalt im Most und der UTA-Ausprägung des Weines kann die durch verschiedene weinbauliche Maßnahmen beeinflusste Menge an konjugierter IAA in der Traube nicht direkt für einen erhöhten AAP-Gehalt im Wein verantwortlich gemacht werden.

Einfluss kellerwirtschaftlicher Maßnahmen

Untersuchungsmaterial

Um den Einfluss verschiedener kellerwirtschaftlicher Faktoren wie Nährstoffversorgung des Mostes und Gärtemperatur sowie den Einfluss der Hefe auf den Gehalt an freier und gebundener IAA zu überprüfen, wurde an der LWG Veitshöchheim ein Gärversuch mit einem Most der Sorte Müller-Thurgau aus früher und später Lese durchgeführt. Hierzu wurden die Moste mit Trockenreinzuchthefen (Uvaferm CM, Lalvin E, Lalvin W) oder Hefen der Spontanflora (*Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*) entweder im Keller bei 14 °C oder im Labor bei 20–24 °C vergoren (eine Vergärung mit *Kloeckera apiculata* und *Metschnikowia pulcherrima* erfolgte lediglich bei 20–24 °C). Eine unterschiedliche Nährstoffversorgung des Mostes wurde durch einen Zusatz von Hefenährsalz (Diammoniumphosphat, DAP) bzw. durch Verwendung von Pressmost (letzte 10 % der Kelterung) oder Maische (20 Stunden Standzeit) erreicht.

Vom Ausgangsmost sowie den verschiedenen Ansätzen wurden zu Gärbeginn (Abnahme von 5 °Oe), zur Mitte der Gärung (bei 55–45 °Oe), während der abklingenden Gärung (bei 35–30 °Oe) und am Gärende nach dem Absitzen der Hefen Proben genommen. Die Weine

IAA-Analytik

Die Bestimmung von freier und gebundener IAA in Mosten und Weinen erfolgt nach der oben beschriebenen Methode.

Ergebnisse und Diskussion

Im Verlauf der Fermentation erfolgt bereits zu Gärbeginn eine Zunahme der Gehalte an freier und gebundener IAA in Summe, die nur auf eine Synthese von IAA durch die Hefe erklärt werden kann. Während die Konzentration an gebundener IAA durch enzymatische Hydrolyse während der Gärung kontinuierlich abnimmt, erfolgt eine signifikante Zunahme der Konzentration an freier IAA einerseits durch Freisetzung aus ihrer gebundenen Form, andererseits durch eine Bildung von der Hefe. Nach Erreichen eines Maximums, etwa zur Mitte der Gärung, nimmt die Konzentration an freier IAA zum Gärende und nach Schwefelung und Lagerung des Weines wieder ab.

Die verschiedenen kellerwirtschaftlichen Maßnahmen zeigten insbesondere Einfluss auf die Menge der durch die Hefe gebildeten IAA, d.h. auf die maximale Konzentration an freier IAA. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Maßnahmen waren allerdings nur bei der Vergärung von Most aus früher Lese feststellbar. Bei Vergärung von Most aus vollreif gelesenen Trauben lag die maximale IAA-Konzentration in allen Ansätzen zwischen 10 µg/L und 35 µg/L.

Der Einfluss der Hefe auf die Bildung und den Abbau von freier IAA ist in Abb. 3a dargestellt. Während bei den drei *Saccharomyces* Reinzuchthefen keine signifikanten Unterschiede zu erkennen sind, zeigten die beiden Hefen der Spontanflora (*Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*) eine signifikant höhere Synthese des AAP-Precursors IAA. Lag die maximale Konzentration an freier IAA bei den drei *Saccharomyces* Hefen etwa zwischen 45 µg/L und 65 µg/L, so wurden in dem Ansatz mit *Metschnikowia pulcherrima* maximal 90 µg/L, in dem Ansatz mit *Kloeckera apiculata* sogar maximal 120 µg/L freie IAA analysiert.

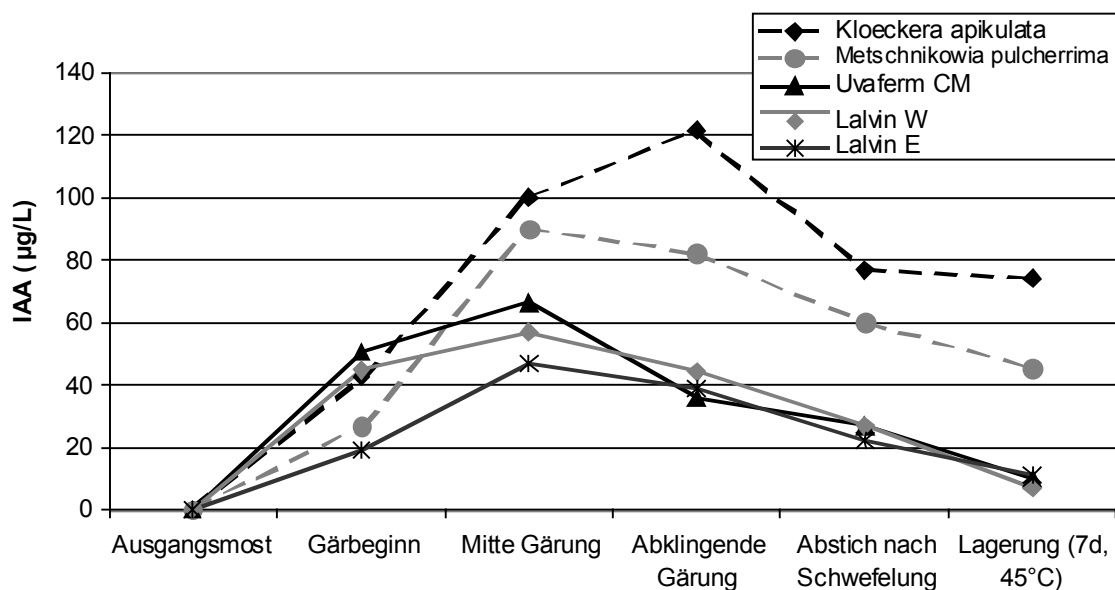


Abb. 3a: Einfluss der Hefe auf den Metabolismus von freier IAA im Verlauf der Fermentation (frühe Lese; Vergärung bei 20 - 24 °C)

Der Einfluss der Nährstoffversorgung und der Gärtemperatur wird in Abb. 3b verdeutlicht. Keinen Einfluss auf das Maß der IAA-Bildung zeigt ein Zusatz von Hefenährsalz oder die Verwendung von Pressmost. Bei einer Maischegärung wurden dagegen signifikant geringere Mengen an IAA gebildet. Eine Erhöhung der Gärtemperatur von 14 °C auf etwa 20–24 °C führte dagegen zu einer signifikant höheren IAA-Bildungsrate. Auch bei der Vergärung mit Lalvin W und Lalvin E wurde durch die Wahl einer geringeren Gärtemperatur eine verlangsamte und insgesamt geringe IAA-Bildung nachgewiesen (hier nicht dargestellt).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung verdeutlichen die Relevanz des Einflusses der Kellerwirtschaft auf den Precursor IAA. So wird die durch den Stoffwechsel der Hefe gebildete Menge an Precursor nicht nur durch

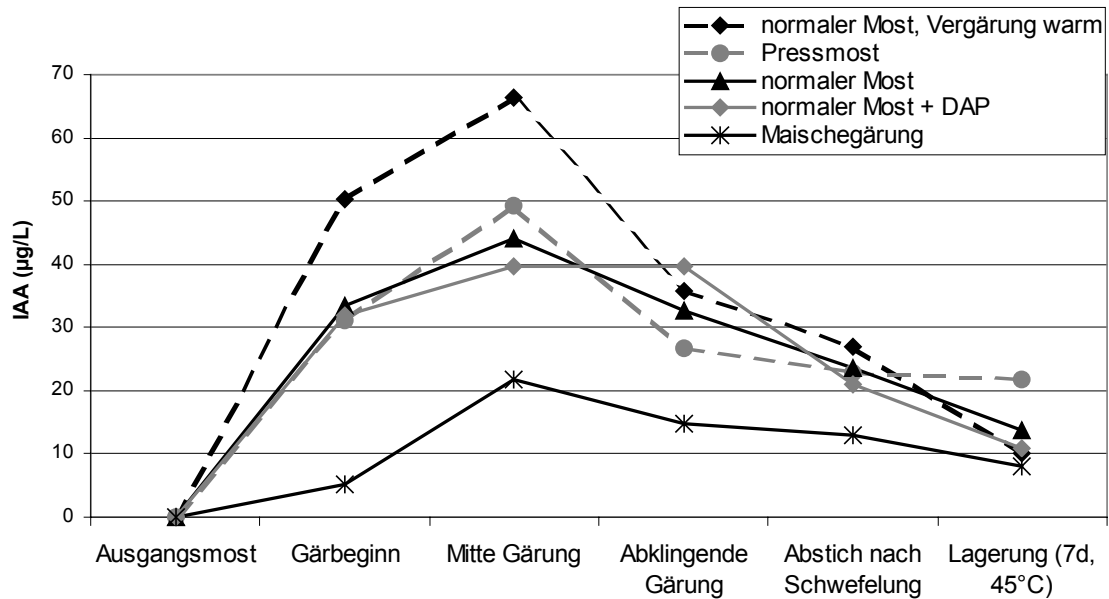


Abb. 3b: Einfluss verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf den Metabolismus von freier IAA im Verlauf der Fermentation (frühe Lese; Vergärung bei 14 °C (Ausnahme: Vergärung warm bei 20 – 24 °C) mit Uvaferm CM)

den Hefestamm sondern auch durch die Gärtemperatur beeinflusst. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von KÖHLER et al. (1996), nach denen eine kontrollierte Vergärung bei tiefen Temperaturen der Ausbildung einer UTA entgegenwirkt. Auch in diesem Versuch führte die Erhöhung der Gärtemperatur zu einer Verstärkung der UTA in dem mit Uvaferm CM vergorenen Most der frühen Lese, der bereits bei geringen Gärtemperaturen eine UTA aufwies. In den mit Lalvin W und Lalvin E vergorenen Mosten war weder bei hohen noch bei niedrigen Gärtemperaturen eine UTA feststellbar; bei den hier erhaltenen Weinen überwogen fruchtige Zitrusaromen.

Einen entscheidenden Einfluss scheint auch die Nährstoffversorgung des Mostes zu haben. So trat generell bei der späten Lese keine UTA auf. Die maximal vorhandene Menge an IAA war, wie bereits erwähnt, bei allen Ansätzen im Vergleich zur frühen Lese gering, obwohl die Ausgangskonzentration an IAA in den Mosten der späten Lese signifikant höher lag. Auch bei einer Maischegärung, wie sie normalerweise bei der Bereitung von Rotweinen durchgeführt wird, lag die maximale IAA-Konzentration ähnlich wie bei Verwendung von spät gelesenen Lesegut bei 22 µg/L. Eine UTA trat nicht auf, doch standen bittere gerbende Aromaeindrücke im Vordergrund. Anders sah es bei der Vergärung von Pressmost aus. Obwohl durch Verwendung der letzten Pressfraktion von früh gelesenen Most ähnlich wie bei der Maischegärung die Ausbildung einer UTA verhindert wurde, war hinsichtlich des IAA-Metabolismus kein signifikanter Unterschied zum „normalen Most“ erkennbar. Entgegen den allgemeinen Aussagen unterschied sich diese letzte Pressfraktion in seinen chemisch-physikalischen Eigenschaften (u.a. dem Gehalt an phenolischen Substanzen) aber auch nicht wesentlich vom „normalen Most“. Die in diesem Versuch gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass dem IAA-Metabolismus durch die Hefe eine entscheidende Rolle in der Ausbildung einer UTA zukommt. So wurden im Verlauf der Fermentation von Most aus später Lese und von Maische, welche sich unter anderem durch einen höheren Gehalte an Polyphenolen und hefeverwertbarem Stickstoff auszeichnet, insgesamt geringere Mengen an dem AAP-Precursor IAA gebildet. Demnach scheinen alle weinbaulichen Maßnahmen, die zu einer Erhöhung der wertgebenden Mostinhaltsstoffe und damit zu einer ausreichenden Nährstoffversorgung für die Hefen führen, die Ausbildung einer UTA verhindern zu können. Die verschiedenen Einflussfaktoren auf den Gehalt des AAP-Precursors IAA sind in Abb. 4 zusammengefasst.

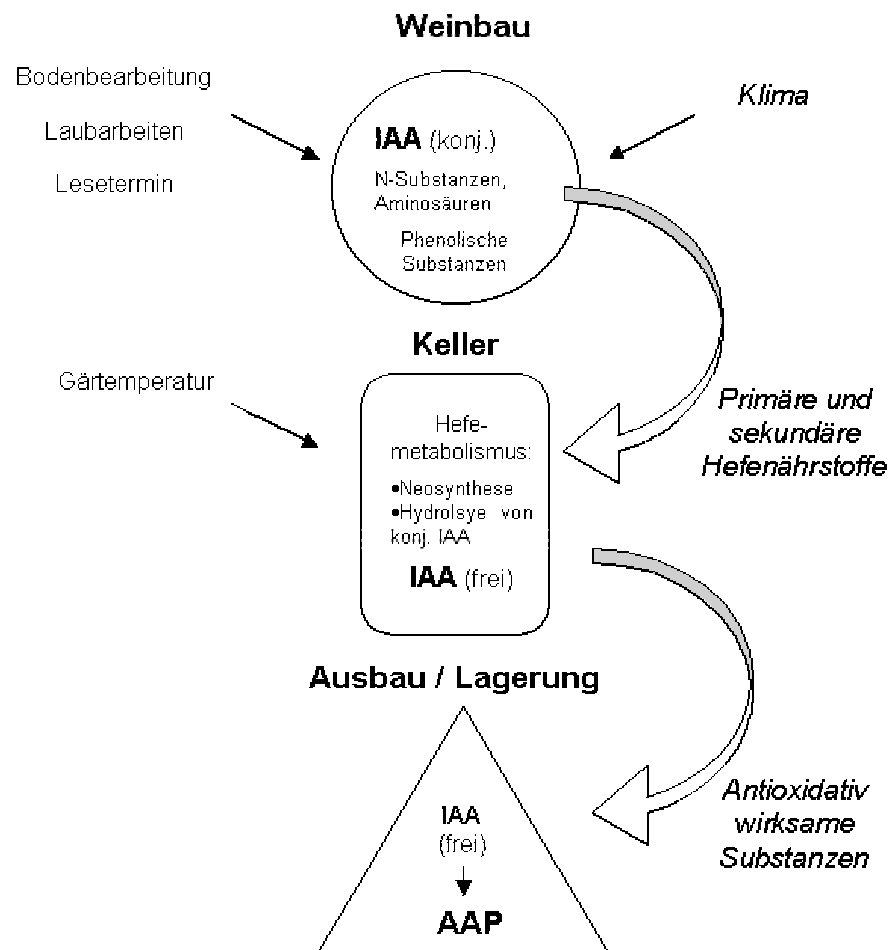


Abb. 4: Verschiedene endogene und exogene Einflussfaktoren auf den Gehalt des AAP-Precurs IAA

Literatur

- CHRISTOPH, N.; BAUER-CHRISTOPH, C.; GEßNER, M.; KÖHLER, H.J. (1995): Die „Untypische Alterungsnote im Wein“ Teil I: Untersuchungen zum Auftreten und zur sensorischen Charakterisierung der „Untypischen Alterungsnote“, *Rebe & Wein* 12, 424-430
- CHRISTOPH, N.; BAUER-CHRISTOPH, C.; GEßNER, M.; KÖHLER, H.J.; SIMAT, T.J.; HOENICKE, K. (1998): Bildung von 2-Aminoacetophenon und Formylaminoacetophenon im Wein durch Einwirkung von schwefliger Säure auf Indol-3-essigsäure, *Vitic. Enol. Sci.* 53, 79-86
- FISCHER, U.; SPONHOLZ, R. (2000): Die sensorische Beschreibung der Untypischen Alterungsnote, *Der Deutsche Weinbau* 3, 16-21
- GEßNER, M.; KÖHLER, H.J.; CHRISTOPH, N. (1999): Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein Teil VIII: Auswirkung von Inhaltsstoffen und Antioxidantien auf die Bildung von o-Aminoacetophenon, *Rebe & Wein* 8, 264-267
- GEßNER, M.; KÖHLER, H.J.; CHRISTOPH, N.; BAUER-CHRISTOPH, C.; MILTENBERGER, R.; SCHMITT, A. (1995): Die „Untypische Alterungsnote in Wein, Teil II: Beschreibende Verkostung von UTA-weinen; Beziehungen zwischen Sensorik und chemisch-physikalischen Analysenwerten, *Rebe & Wein* 11, 388-394
- HOENICKE, K.; SIMAT, T.J.; STEINHART, H. (2001): Determination of Free and Conjugated Indole-3-Acetic Acid, Tryptophan and Tryptophan Metabolites in Grape Must and Wine, in Vorbereitung
- HÜHN, T.; SPONHOLZ, W.R.; BOTTERO, S.; KALLINIKIDOU, E. (1996): The Influence of Yeast Strains on Hybrid Aroma, *Vitic. Enol. Sci.* 51, 159-168.

KÖHLER, H.J.; CHRISTOPH, N.; BAUER-CHRISTOPH, C.; GEßNER, M.; CURSCHMANN, K. (1996): Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein Teil V: Einfluß kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf die Ausprägung der UTA, Rebe & Wein 7, 213-218

KÖHLER, H.J.; CHRISTOPH, N.; GEßNER, M.; BAUER-CHRISTOPH, C. (1995): Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein Teil III: Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der „Untypischen Alterungsnote“ und dem Reifestadium der Trauben (Lesetermin), Rebe & Wein 12, 424-430

LÖHNERTZ, O.; PRIOR, B.; BLESER, M.; LINSSENMEIER, A. (1998): Einfluss von weinbaulichen Maßnahmen auf die Aminosäuregehalte in Trauben und Most der Sorte Riesling, in: 5. Internationales Symposium: Innovationen in der Kellerwirtschaft, Stuttgart

RAPP, A.; VERSINI, G.; ULLEMEYER, H. (1993): 2-Aminoacetophenon: Verursachende Komponente der „Untypischen Alterungsnote“ („Naphtalinton“, „Hybridton“) bei Wein, Vitis 32, 61-62

Schwab, A.; Peternel, M.; Köhler, J.; Heigel, K.P. (1996): Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein Teil IV: Beeinflussung durch weinbauliche Maßnahmen, Rebe & Wein 6, 181-187

SCHWAB, A.; CHRISTOPH, N.; KÖHLER, H.J.; GEßNER, M.; Simat, T.J. (1999): Einfluß weinbaulicher Maßnahmen auf die Ausprägung der Untypischen Alterungsnote bei Weißweinen. Teil I: Einfluß des Lesezeitpunktes, Vitic. Enol. Sci. 54, 114-120

SCHWAB, A.; CHRISTOPH, N.; HOENICKE, K.; KÖHLER, H.J.; GEßNER, M.; Simat, T.J. (2001): Einfluß weinbaulicher Maßnahmen auf die Ausprägung der Untypischen Alterungsnote bei Weißweinen. Teil II: Einfluß weiterer reifeverzögernder weinbaulicher Maßnahmen, Vitic. Enol. Sci., in Vorbereitung

Dieses Projekt wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung, Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMW/AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert. AiF-Projekt-Nr.: 11770 N.

3.3.2

Metabolism of Tryptophan and Indole-3-acetic Acid Formation During Vinification

Stoffwechsel des Tryptophans und die Bildung von Indolyl-3-essigsäure während der Weinbereitung
La métabolisme du tryptophane et la formation de l'acide-indol 3-acétique durant la vinification

Thomas J. Simat¹*, Katrin Hoenicke², Martin Geßner³, and Norbert Christoph⁴

¹ Technical University of Dresden, Institute of Food Chemistry, D-01062 Dresden

² University of Hamburg, Institute of Food Chemistry, Grindelallee 117, D-20146 Hamburg

³ Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau (LWG), Hermstr. 8, D-97209 Veitshöchheim

⁴ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Luitpoldstr. 1, D-97082 Würzburg

*Author to whom correspondence should be addressed

(tel: +49-351-463-31475; fax +49-351-463-34138.

Email: thomas.simat@chemie.tu-dresden.de)

This research project was supported by the Weinbauring Franken e. V. and FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn), the AIF and the Bundesministerium für Forschung und Technologie. AIF Project No. 11770 N.

Abstract

The tryptophan (Trp) metabolite indole-3-acetic acid (IAA) is considered to be a potential precursor of 2-aminoacetophenone, an aroma compound supposed to cause the "untypical aging off-flavour" (UTA) in wine. This report presents investigations on the metabolism of Trp and the formation of IAA and other Trp metabolites such as indole-3-ethanol (tryptophol), indole-3-lactic acid, and 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-carboline-3-carboxylic acid during fermentation. Influences of the ripeness of the fermented grapes as well as of different oenological techniques (e.g. nutrient supply, fermentation temperature, yeast strain) were evaluated. It could be shown that Trp is almost completely consumed by the yeast within the first phase of fermentation. IAA can be formed by the yeast both by hydrolysis of conjugated IAA from the must and by neosynthesis. The amount of IAA and other Trp metabolites formed during fermentation is influenced by both the ripeness of the used grapes and the oenological techniques applied. From these experiments it could be estimated that 50% of the total variation of the AAP content in wine may be explained by the amount of its precursor IAA prior to sulphuration.

Key Words: *Vitis vinifera*, vinification, yeast, tryptophan metabolism, untypical aging off-flavour (UTA), tryptophan, indole-3-acetic acid, tryptophol, indole-3-lactic acid, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-carboline-3-carboxylic acid

1 Introduction

Tryptophan (Trp) and its metabolites, especially the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA), are considered to be potential precursors of 2-aminoacetophenone (AAP), an aroma compound which is associated with the so called "untypical aging off-flavour" (UTA) in *Vitis vinifera* white wines (1-4). The off-flavour is described by aroma descriptors such as "acacia blossom", "naphthalene", "furniture polish", "wet wool" or "fusel alcohol". Depending on the intensity of the wine flavour, UTA can be realized sensorily at 0.5 – 1.5 µg/L AAP (5-7). Studies on the formation of UTA have revealed a significant correlation between UTA sensory, AAP-concentration, and wines from grapes which were grown under stress by insufficient water or nitrogen supply, as well as wines produced from high yielding or early harvested grapevines (2, 8, 9). Investigations on the mechanism of AAP formation have shown that AAP can be formed by an oxidative degradation of IAA, which is triggered by a sulphuration of the young wine. However, no significant formation of AAP was observed for the ester or amide conjugated IAA, indicating that only unbound IAA is susceptible to this oxidative degradation (10). Grape musts contain very low amounts of unbound IAA (< 3 µg/L) indicating a strong physiological regulation of this phytohormone (11). About 95% of total IAA were bound either as ester or amide conjugates (11, 12). The amount of unbound IAA increases significantly during fermentation, resulting in higher amounts of unbound IAA in the wine (< 3 – 90 µg/L) (11, 13).

In this paper, the metabolism of Trp and the formation of unbound IAA and other Trp metabolites was investigated during fermentation

of musts resulting from both early and late harvested grapes using different oenological techniques (e.g. nutrient supply, fermentation temperature, yeast strain). An examination was made of whether conjugated IAA can be hydrolysed by the yeast yielding unbound IAA and/or unbound IAA is synthesized by the yeast. Finally, an evaluation was made of whether the amount of unbound IAA prior to and after sulphuration correlates with the amount of AAP formed during storage of the corresponding wines.

2 Experimental

2.1 Musts used for fermentations

The grapes (*Vitis vinifera* cv. Müller Thurgau) were grown and vinified at the Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau (LWG, Veitshöchheim, Germany). The vines were cultivated under usual viticultural conditions (natural green cover crop, crop load 90 hL/ha) and harvested at two different stages (early harvest; late harvest). The free-run juice and a fraction extracted under gentle pressure (pressure extract) was obtained from the grapes. Fermentation of both juice fractions and fermentation of the crushed grapes (mash fermentation) was conducted. Basic chemical analyses were carried out by the LWG Veitshöchheim (Tab. 1).

	Early harvest (12 th Sept. 2000)			Late harvest (04 th Oct. 2000)		
	Free run juice	Pressure extract	Mesh (after 20h)	Free run juice	Pressure extract	Mesh (after 20h)
[°] Oe	75	77	73	75	75	77
Sugar (g/L)	170	177	166	180	178	183
Total acids (g/L)	8.9	7.5	8.5	6.4	6.6	6.6
pH	2.96	3.10	2.87	3.35	3.41	3.40
Conductivity (µS/cm)	2640	2730	2070	2860	3080	2490
Polyphenols mg gallic acid/L	215	234	246	293	333	387
total N (mg/L)	352	483	n.d.	462	630	n.d.

Tab. 1: Analytical parameters of the musts used for fermentation.

Tab. 1: Chemisch-analytische Charakterisierung der verwendeten Moste.

Tabl. 1: Paramètres analytiques des moûts utilisés pour les fermentations

2.2 Fermentations

Fermentations were performed in 2.5 L flasks. For inoculation three different commercial yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae* cv. Uvaferm CM, *Saccharomyces cerevisiae* cv. Lalvin W, *Saccharomyces cerevisiae* var. bayanus cv. Lalvin E) as well as two different wild yeast strains (*Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*) were used (10 g yeast/hL). For each experiment an initial volume of 2 L must or mash was used. Within mash fermentation the marc was removed at the end of fermentation.

For nutrient supplementation either diammoniumphosphate (DAP) or Fermaid® (Lallemand, France) were added to the must. DAP provides the yeast with ammonia as N-source and phosphate as phosphorous source and was supplemented in amounts of 1 g/L. Fermaid® is produced from inactive yeasts and other ingredients. It is to provide the yeast with nitrogen, vitamins, minerals and lipids (sterols, fatty acids) and was added in amounts of 0.4 g/L. Fermentations were carried out at two different temperatures, 12–14 °C and 22–24 °C, respectively. After fermentation samples were sulphurized with 120 mg/L potassium bisulphite and stored at 14 °C for 5 days. After that the yeast was separated from the young wine by filtration. Free sulphurdioxide was adjusted to 50 mg/L, and the wines were stored at 14 °C in the dark.

Samples for the determination of the extract ([°]Oe) were taken daily; all other parameters were only analysed at 8 different stages of fermentation: 1. must, 2. beginning fermentation, 3. turbulent fermentation, 4. middle of fermentation, 5. fading fermentation, 6. end of fermentation, 7. after sulphuration, 8. three months storage.

2.3 Chemicals

IAA, indole-3-ethanol (tryptophol, TOH), indole-3-lactic acid (ILA), and the internal standards 5-methoxy-tryptophan (5-MeO-Trp) and indole-3-propionic acid (IPA) were obtained from Sigma (Deisenhofen, Germany). Trp was donated by Degussa (Hanau, Germany). 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline-3-carboxylic acid (MTHCC) was synthesized as described by Simat et al. (14). Acetonitrile (gradient grade) and trifluoroacetic acid (Uvasol) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Deionized water was purified by a bidestillator (Heraeus-Deamat Bi 18E, Kleinstheim, Germany). All other chemicals used were of analytical-grade purity.

2.4 Analysis of free and conjugated Trp metabolites and AAP

Trp and its metabolites IAA, TOH, ILA, the carbonyl condensation compound MTHCC as well as conjugated Trp and conjugated IAA were analysed by RP-HPLC-Fl according to Hoenicke et al. (11). AAP was analysed after 10 months storage at 14 °C in the dark and a heat treatment of 72 h at 40 °C by GC-MS according to Christoph et al. (10).

3 Results and discussion

3.1 Influences on the time course of the fermentation of sugars

Although the musts of the early harvested grapes contain only about 76% of the nitrogen content and 50% of the Trp content (352 mg N/L, 8.5 mg unbound Trp/L) of those of the late harvested grapes (462 mg N/L, 17.4 mg unbound Trp/L), the time course of sugar fermentation is similar (Fig. 1).

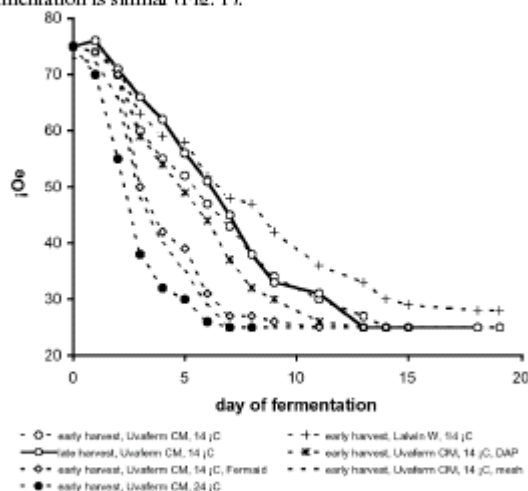


Fig. 1: Influences of graperipeness and different enological measures on the time course of the fermentation of sugars.

Fig. 1: Einfluss der Traubenreife und verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf die Vergärung von Zuckern.

Fig. 1: L'influence de la maturation de baies et des mesures œnologiques différentes sur la fermentation des osides

The initial fermentation velocity of the early harvested grapes seems to be slightly higher than that of the late harvested grapes. The fermentation velocity is highly dependent on the temperature (14 or 24 °C). A difference of 10 °C doubles the time of fermentation. The yeasts Lalvin E and Lalvin W tend to a slightly lower fermentation velocity than the Uvaferm CM yeast. The addition of nutritional supplements to the musts accelerated the fermentation: while the addition of Fermaid® exhibited a strong effect on the time course of sugar fermentation only a slight effect was observed for the addition of DAP (early > late harvest, data not shown). This indicates that components of Fermaid® (amino acids, vitamins, sterols, fatty acids) and to a lesser extent DAP (inorganic nitrogen and phosphate) are limiting factors in the fermentation of sugars. The mash fermentation revealed a similar effect on the fermentation velocity to that of the Fermaid® supplementation.

3.2 Tryptophan utilisation

Yeasts regulate their amino acid uptake by permeases (general amino acid permease (GAP) and specific permeases) in their plasma membrane. In the cells the amino acids may be incorporated in proteins, catabolized or stored/compartimentalized in vacuoles (15). The musts under investigation differ significantly in their Trp content with reference to the time of harvest (8.5 mg or 17.4 mg unbound Trp/L; see 3.1). During all fermentations using commercial yeast strains more than 95% of the initial amount of Trp disappeared, indicating its efficient utilisation for the production of biomass (structural proteins and functional enzymes). During the onset of fermentation 2–9 mg Trp/L/day are taken up by the yeasts. The Trp consumption is predominantly dependent on the fermentation temperature, which rules the growth of the microorganisms. Both yeasts Lalvin E and Lalvin W exhibit a slower Trp consumption than the Uvaferm CM yeast (Fig. 2a).

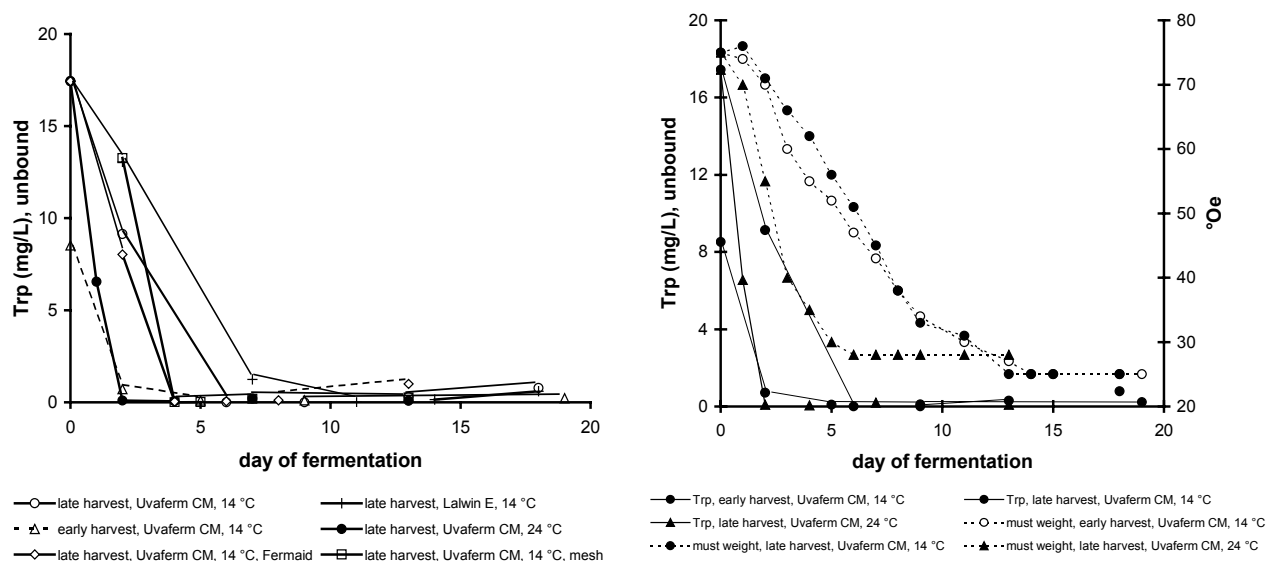


Fig. 2: Consumption of unbound Trp.

a) Influences of grape ripeness and different cellar measures, b) Time course of Trp depletion and fermentation of sugars.

Fig. 2: Aufnahme von Trp.

a) Einfluss der Traubenreife und verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen, b) Zeitlicher Verlauf von Trp-Abnahme und des Extraktgehaltes.

Fig. 2: Consommation de Trp.

a) L'influence de la maturation des baies et des mesures œnologiques différentes, b) La diminution du Trp au cours de la fermentation.

Jiranek et al. (16) determined the Trp demand of 8 different *S. cerevisiae* strains when all amino acids were in excess with 11-46 mg Trp/L in a medium containing 200 g/L glucose. In nitrogen limited media they found 50% depletion of the initial amount of Trp within 25 h, which is in the range of our results. A comparison of the consumption of Trp by the yeasts and the fermentation of sugars shows that Trp decrease and the connected formation of yeast biomass precedes the degradation of the carbohydrates. In the must of early harvested grapes with low content of Trp (8.5 mg/L) more than 95% of the initial Trp is taken up by the yeast before a notable loss of sugar is detectable. In the must of late harvested grapes with a high content of Trp (17.4 mg/L) more than 95% of the initial Trp is taken up by the yeast ahead of the turbulent phase of fermentation (Fig. 2b). In agreement Bisson (17) reported that amino acids present in low concentrations like Trp are generally utilised within the first °Brix drop. After ethanol treatment of the yeast cells in order to permeabilise the plasma membrane they found high values of amino acids released in the early fermentation, while at mid-fermentation amino acids could not be extracted due to low cellular levels, which indicates the utilisation of free amino acids for the production of biomass in this stage of fermentation. In contrast to DAP supplementation the addition of Fermaid® to the musts accelerated the Trp consumption, indicating again that a growth limiting factor in the musts is constituent of Fermaid® but is not ammonium nor phosphate. This effect seems to be stronger than the known ammonium ion inhibition of GAP expression (15). Also mash fermentation of the grapes under investigation led to a faster Trp consumption (mg Trp/day). Ancin et al. (18) stated that chemical properties of the fermentation medium may influence the uptake and metabolism of nitrogen compounds: particularly, grape tissue particles stimulate the fermentation by providing nutritional factors like N-substances, lipids and trace metals.

'Growth Factors' of yeasts may include vitamins, purines and pyrimidines, amino acids, fatty acids, sterols (in particular ergosterol) and other compounds. In particular biotin and pantothenic acid are known growth factors of *S. cerevisiae* (15). Bisson (19) investigated gene expression of yeasts in nitrogen limited cultures. She found these N-deficient cultures to exhibit a higher expression of genes involved in the expression of biotin and of genes that are involved in the degradation of cellular compounds containing nitrogen, so that these can be reutilised in

the syntheses of other N-containing compounds. At the end of fermentation the Trp content of the fermentation medium increased again, especially in those of late harvested grapes. Monteiro and Bisson (20) also reported the liberation of amino acids in the last stage of fermentation, presumably due to release from yeast cells. At the end of fermentation free amino acids were once again available for release, probably as a consequence of protein turnover.

3.3 Formation of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid

MTHCC is a stable product of the condensation reaction between Trp and acetaldehyde. Irrespective of the time of harvest low amounts of MTHCC (0.2 mg/L) were found in the musts prior to fermentation. Additional MTHCC is formed in the beginning of the fermentation parallel to the consumption of Trp and then remains stable even after 3 months storage of the wine (Fig. 3). Depending on the conditions of fermentation 1–10 mol-% of the initial amount of free Trp react with acetaldehyde to yield MTHCC and are no longer utilizable by the yeast. The longer Trp is available in the fermentation broth, the more MTHCC is formed: e.g. more MTHCC is formed during the relatively slower fermentation of the yeasts Lalvin E and Lalvin W, and during the fermentation of the musts of late harvested grapes (high Trp content) (Fig. 3b).

3.4 Deamination of tryptophan

Formation of tryptophol, indole-3-lactic acid, and indole-3-acetic acid

The deamination of amino acids, which is a common pathway in yeasts, utilizes the α -amino group as common nitrogen source in order to synthesize the N-substances which are required for growth (17). Thereby Trp is metabolized via indole-3-pyruvate (oxidative deamination) yielding ILA, and via indole-3-acetaldehyde (decarboxylation) yielding TOH (reduction) or IAA (oxidation) (21, 22) (Fig. 4).

3.4.1 Tryptophol

No TOH (<10 μ g/L) was detected in the musts prior to fermentation. TOH was released into the must by the yeasts later in the fermentation well after Trp utilisation (Fig. 5). In the low Trp containing musts of early harvested grapes the TOH formation

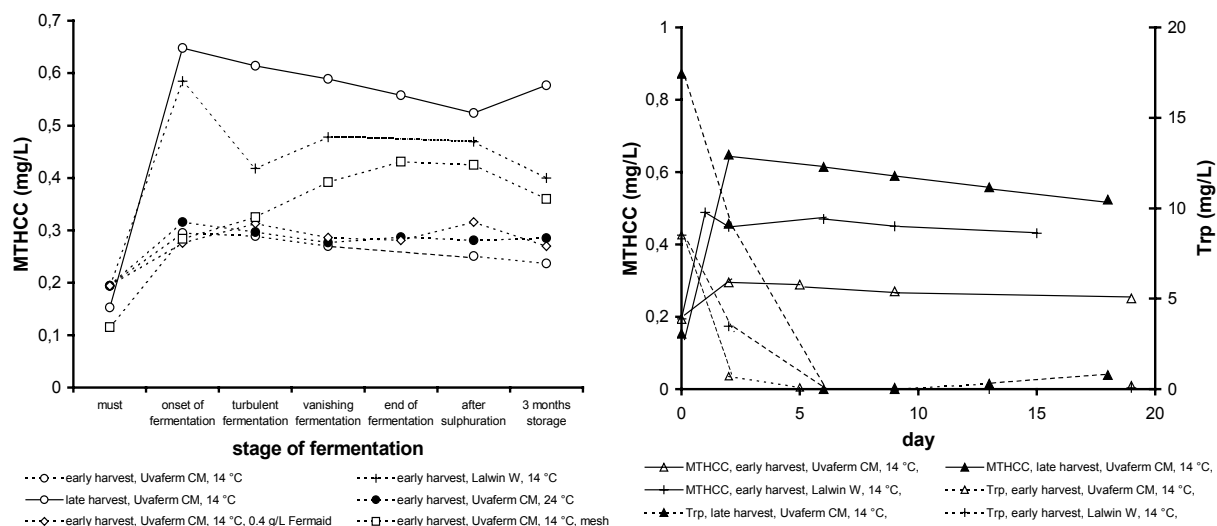


Fig. 3: Formation of MTHCC from Trp.

a) Influences of grape ripeness and different cellar measures, b) Time course of Trp depletion and MTHCC formation during fermentation, and consumption of Trp.

Fig. 3: Bildung von MTHCC aus Trp.

a) Einfluss der Traubenreife und verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen, b) Zeitlicher Verlauf von Trp-Abnahme und MTHCC-Bildung während der Gärung.

Fig. 3: La formation de MTHCC du Trp.

a) L'influence de la maturation des baies et des mesures œnologiques différentes, b) La diminution du Trp et la formation de MTHCC au cours de la fermentation.

occurred earlier than in the Trp rich musts, despite the lower concentration of the precursor Trp. All fermentation batches of the Trp rich musts (late harvested grapes) showed a noticeable release of TOH measured after sulphuration in the young wine.

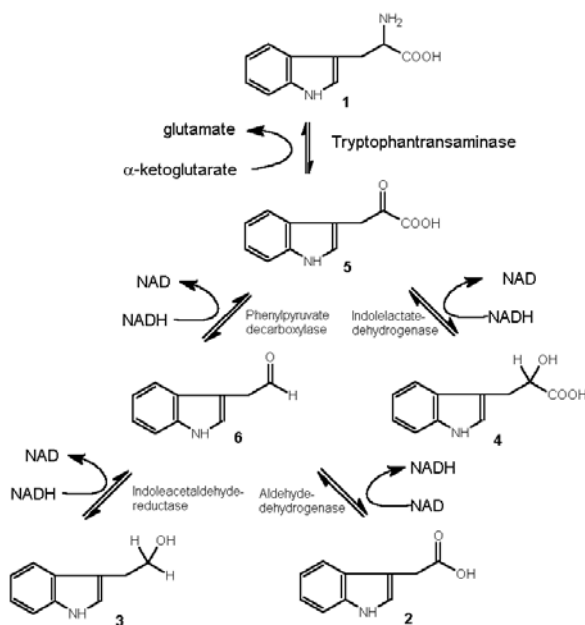


Fig. 4: Deamination pathway of Trp. 1 Trp, 2 IAA, 3 TOH, 4 ILA, 5 indole-3-pyruvate, 6 indole-3-acetaldehyde.

Fig. 4: Desaminierung und weiterer Metabolismus von Trp. 1 Trp, 2 IAA, 3 TOH, 4 ILA, 5 Indol-3-pyruvat, 6 Indole-3-acetaldehyd.

Fig. 4: Désamination et la métabolisme suivante du Trp. 1 Trp, 2 IAA, 3 TOH, 4 ILA, 5 Indol-3-pyruvat, 6 Indole-3-acetaldehyd.

Highest TOH concentrations (> 2 mg/L) were observed within all mash fermentations, and with most fermentations of late harvested grapes at higher temperatures (22–24 °C). This elucidates the influence of the fermentation temperature and the composition of the must on this pathway. Six to 22 mol-% of the initial amount of Trp (without mash fermentations since 'mash extractable' Trp could not be determined) are converted to TOH during the fermentations under investigation. Consequently, in yeasts Trp is mainly metabolised to TOH, besides in-corporation into proteins, which was also reported by Shin et al. (21).

The higher alcohols like TOH are thought to be waste products of the yeasts, which are not further metabolized. However, during storage a significant decrease of TOH could be observed in all samples. From the experiments it is not clear whether this degradation is non-specific chemical or enzymatic although TOH is a relatively stable substance. It could be of interest to see if the TOH decrease during 3 months storage may be enzymatically catalysed.

3.4.2 Indole-3-lactic acid

ILA is, like TOH, a metabolite of the Trp deamination pathway. In contrast to TOH, low amounts of ILA are detectable in the musts (early harvest: 0.1 mg/L; late harvest: 0.25 mg/L). During the fermentations of the early harvested grapes no marked synthesis of ILA was detectable (only formation up to 0.1 mg/L) except for the mash fermented samples (0.3–0.4 mg/L ILA formed). Similarly, low amounts of ILA were formed in the beginning of the fermentation of the late harvested grapes whereas relatively high amounts (> 0.1 mg/L) were released into the medium at the end of fermentation and after sulphuration, respectively. In accordance with the results of the early harvested grapes, mash fermentation and to a lesser extent 'pressure extract' formed the highest ILA values (0.4–2.0 mg/L). Neither addition of DAP nor of Fermaid[®] was able to induce ILA formation like that observed during mash fermentation, indicating certain extractable substances in the skin of the grapes that can alter metabolism either by themselves or by influencing the yeasts gene expression.

After sulphuration during 3 months storage a significant decrease of ILA was detected in wines made from early harvested grapes. By contrast, a significant increase of ILA during storage was observed in wines made from late harvested grapes. Similarly in the case of

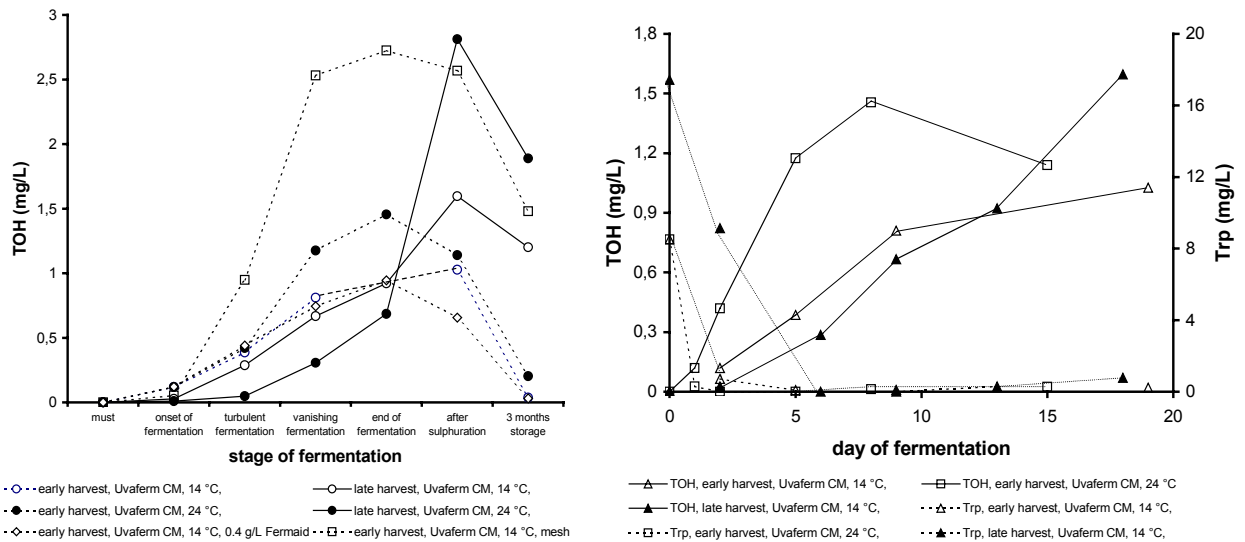


Fig. 5: Formation of TOH from Trp.

a) Influences of grape ripeness and different cellar measures, b) Time course of Trp depletion and TOH formation during fermentation.

Fig. 5: Bildung von TOH aus Trp.

a) Einfluss der Traubenreife und verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen, b) Zeitlicher Verlauf von Trp-Abnahme und TOH-Bildung während der Gärung.

Fig. 5: La formation de TOH du Trp.

a) L'influence de la maturation des baies et des mesures œnologiques différentes, b) La diminution du Trp et la formation de TOH au cours de la fermentation

TOH the activity of different enzymes after sulphuration of the wine may be speculated upon (Fig. 6).

3.4.3 Indole-3-acetic acid

IAA is, like TOH and ILA, a metabolite of the Trp deamination pathway of *Saccharomyces* (21). In the musts only traces of unbound IAA have been detectable (< 3 µg/L), which might be due to a regulation of this phyto-hormone by the *V. vinifera* plant. The regulation might be facilitated by conjugation of IAA with amino acids (12). In the examined musts sodium hydroxyde hydrolysable IAA was determined in amounts of 35-90 µg/L.

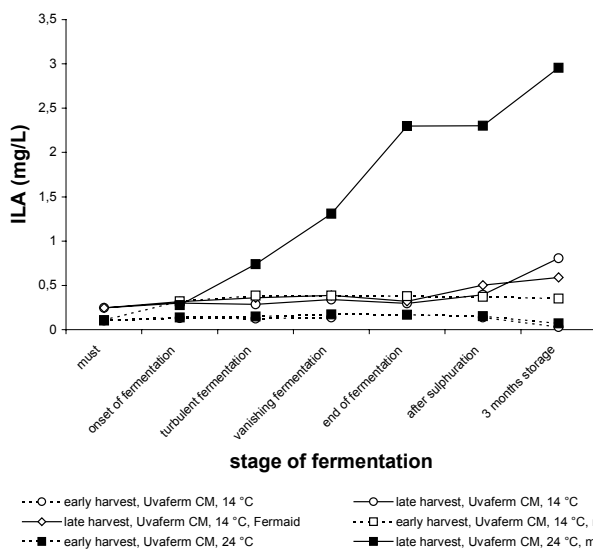


Fig. 6: Influences of grape ripeness and different cellar measures on the time course of the formation of ILA.

Fig. 6: Einfluss der Traubenreife und verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf Bildung von ILA.

Fig. 6: L'influence de la maturation des baies et des mesures œnologiques différentes sur la formation du ILA.

In the musts of the late harvested grapes 80-90 µg/L conjugated IAA were determined, while lower amounts were detected in the early harvested grapes (35-45 µg/L).

During fermentation of the musts the conjugated IAA disappeared from the fermentation solution, reaching a minimum concentration of about 20 µg/L in the first stages of fermentation parallel to the Trp uptake (Fig. 7).

If the IAA in the musts is conjugated to amino acids or peptides (which is likely) it could be actively transported into the yeast cell, where the yeast can utilize the amino acids after hydrolysis. Becker

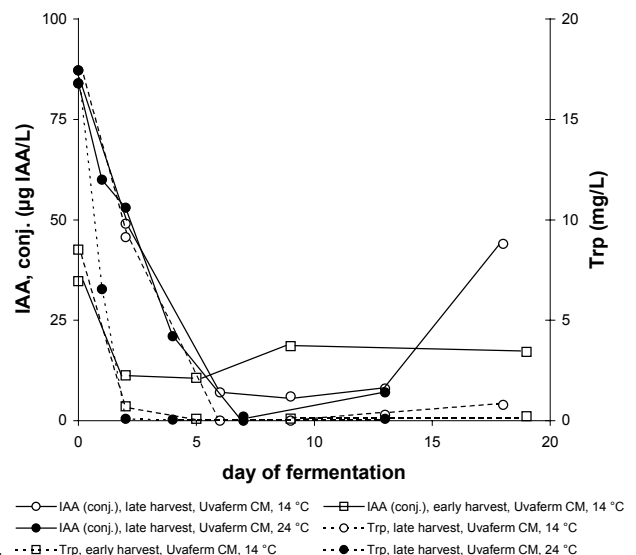


Fig. 7: Consumption of bound IAA and unbound Trp during fermentation.

Fig. 7: Abnahme von konjugierter IAA und nicht gebundenem Trp während der Gärung.

Fig. 7: La diminution de IAA conjugué et du Trp non-conjugué au cours de la fermentation.

and Naider (23) reported a single broad specific transport system in *S. cerevisiae*, which is capable of taking up di- and tripeptides (preference for hydrophobic peptides) without prior hydrolysis. The relatively fast decrease of conjugated IAA in parallel with the Trp consumption makes this hypothesis rather probable. However, the wild yeast strains *K. apiculata* and *M. pulcherima* did not exhibit the uptake of the conjugated IAA to the described extent.

Becker and Naider (23) also state that oligopeptides require extracellular hydrolysis to smaller peptides and free amino acids by secreted peptidases, which are commonly not attributed to *S. cerevisiae*. Only low amounts of unbound IAA (<30 µg/L) are detectable until sulphuration, indicating that hydrolysis of IAA cannot be facilitated by extracellular hydrolysis by the yeasts under investigation. The release of unbound IAA into the wine after sulphuration indicates that the excess of stored IAA in the yeasts might permeate through the membrane because of the high alcohol concentration at the end of fermentation.

The yeasts performed a different IAA metabolism depending on the ripeness of the fermented grapes (Fig. 8). In the fermentation media of early harvested grapes an increase of unbound and total IAA (unbound + conjugated) can be observed with a maximum at the middle of fermentation, indicating a bio-synthesis and secretion of unbound IAA by the yeasts (20–120 µg/L).

Unlike the fermentation of early harvested grapes, in the fermentation media of late harvested grapes only the amount of unbound IAA increases slightly, while total IAA decreases during fermentation. This could be traced back to an intensive deamination catabolism of Trp in the N-deficient fermentation medium, which might be used for the synthesis of urgently needed N-substances for the yeasts.

After the turbulent fermentation of both early and late harvested grapes the IAA content decreases continuously, which indicates an enzymatic or chemical degradation. At the end of fermentation and after sulphuration an increase of IAA compounds can be observed only in the wines resulting from late harvested grapes. Further, it has to be evaluated whether the release of IAA after sulphuration in production scale fermentations is comparable to 2 L model fermentations. From our experiments it remains unclear which point of time in the course of fermentation (prior to or following sulphuration) should be taken for the measurement of unbound IAA as precursor of AAP.

3.5 Yeast metabolism and formation of 2-aminoacetophenone

IAA was evaluated as a potential precursor of the UTA aroma impact compound AAP. AAP can be formed from IAA after sulphuration of the young wine (10). Additionally the occurrence of UTA was correlated with water deficient vegetation periods, a lack of N-sources and unripe harvested grapes. However, it was shown by Hoenicke et al. (11) that the IAA content of late harvested grapes was higher than in early harvested grapes.

Our fermentation experiments have shown that the IAA content in the fermentation media varies widely during the different stages of fermentation and is influenced by the ripeness of the fermented grapes, nutritional supplements, the fermentation temperature and the yeast strain (see Fig. 8). Ripe grapes contained higher amounts of bound IAA, but during their fermentation lower amounts of unbound IAA were released compared to the fermentation of unripe grapes. Addition of Fermaid® to the must of early harvested grapes seemed to decrease the tendency of unbound IAA release during fermentation. This could indicate that IAA formation depends on the nutritional supply of the yeasts and that Fermaid® might resolve this deficiency in the must of early harvested grapes, but not DAP (at least in the musts under investigation). Fermentation performed at higher temperatures led to a higher formation of unbound IAA. The highest amounts of unbound IAA (>100 µg/L) were formed in the course of the fermentation with the wild yeast strains.

AAP responsible for UTA should be formed within one year after fermentation. However, its formation depends on the storage temperature. After 10 months storage at 14 °C in the dark the amounts of AAP in the samples were all below 0.4 µg/L. After 72 h storage at 40 °C simulating the 'normal' storage at room temperature over several months a significant increase of AAP concentrations (<0.05–1.9 µg/L) was analysed in single wines. Due to the low quantity of the model wines a sensory evaluation by a skilled panel was not possible to perform.

Since the amount of unbound IAA at the time of sulphuration should reflect best the amount of IAA as precursor, the amount of unbound IAA prior to and directly after sulphuration was correlated with the amount of AAP determined after 10 months storage and a further storage at elevated temperatures (40 °C) for 72 h (Fig. 9).

We found a highly significant correlation ($\alpha < 0.02$) of the amounts of unbound IAA prior to and after sulphuration and AAP. The coefficient of determination r^2 were 0.54 and 0.27, respectively. This indicates that about 30–50% of the variation of AAP can be

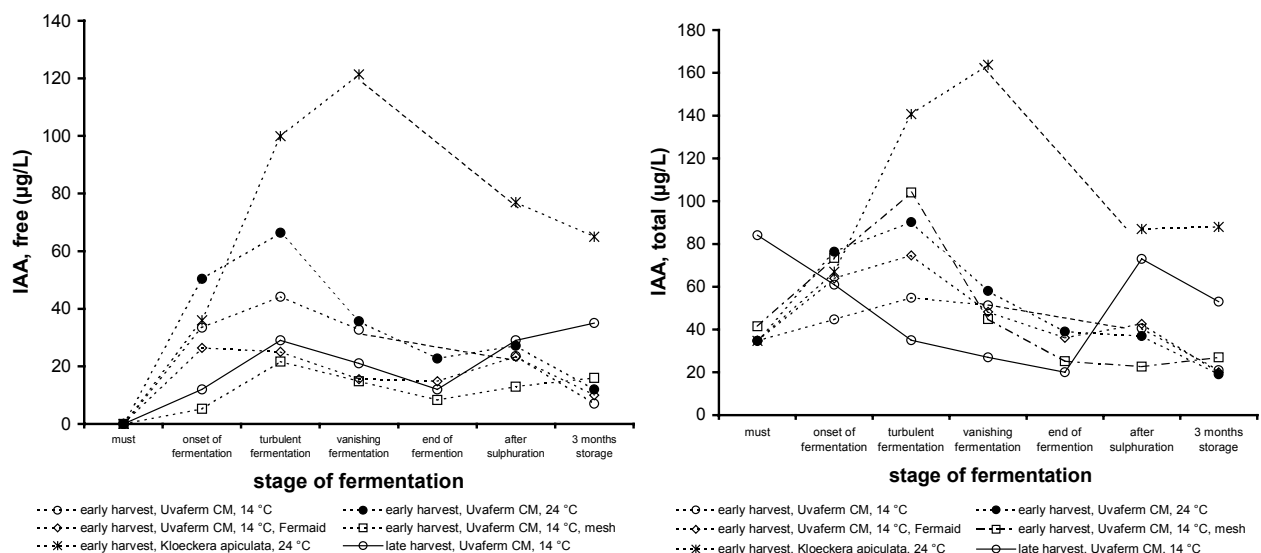


Fig. 8: Influences of grape ripeness and different cellar measures on

a) the formation of unbound IAA, b) the time course of total IAA (unbound and conjugated).

Fig. 8: Einfluss der Traubenreife und verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf

a) die Bildung von nicht gebundener IAA, b) den zeitlichen Verlauf von gesamt IAA (nicht gebunden und konjugiert).

Fig. 8: L'influence de la maturation des baies et des mesures œnologiques différentes sur

a) la formation de IAA non-conjugué, b) la donnée de IAA totale (conjugué et non-conjugué) au cour de fermentation.

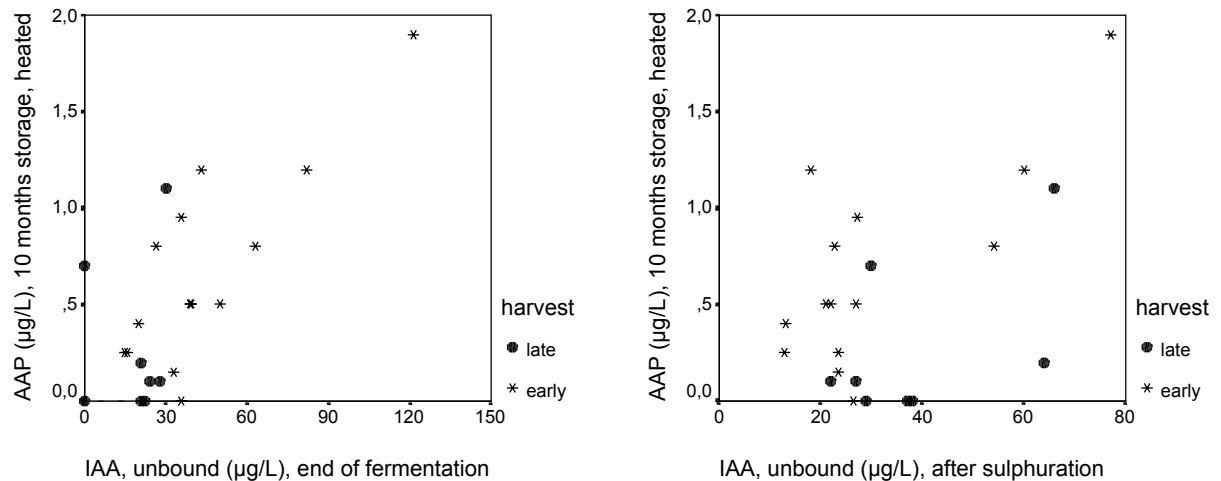


Fig. 9: Correlation of the amount of unbound IAA and AAP after 10 months storage and heat treatment.

a) Amount of unbound IAA at the end of fermentation ($\alpha < 0.001$, $r^2 = 0.54$), b) Amount of unbound IAA after sulphuration ($\alpha = 0.014$, $r^2 = 0.27$).

Fig. 9: Korrelation des Gehaltes an nicht gebundener IAA und AAP nach 10 Monaten Lagerung und Hitzebehandlung.

a) Gehalt an nicht gebundener IAA am Ende der Gärung ($\alpha < 0.001$, $r^2 = 0.54$), b) Gehalt an nicht gebundener IAA nach der Schwefelung ($\alpha = 0.014$, $r^2 = 0.27$).

Fig. 9: Relation entre la donnée en IAA non-conjugué et AAP après 10 mois du stockage et un traitement d'échauffage.

a) teneur de IAA non-conjugué à la fin de la fermentation ($\alpha < 0.001$, $r^2 = 0.54$), b) teneur de IAA après la sulfite ($\alpha < 0.014$, $r^2 = 0.27$).

traced back to the concentration of its precursor IAA. However, this also indicates that other relevant factors beside the amount of unbound IAA must influence AAP formation.

deamination pathway, IAA (0-1 mol-%) and ILA (0-5 mol-%) were also formed (Fig. 11).

4 Conclusions

The metabolism of the amino acid Trp was investigated during vinifications of different musts using diverse oenological techniques. Trp (8.5-17.4 mg/L) was completely consumed in all fermentation batches prior to the turbulent phase of fermentation (<0.2 mg/L) within all different experimental conditions. It was either used for the production of biomass or catabolized to different compounds, of which MTHCC, TOH, ILA, and IAA were investigated (Fig. 10).

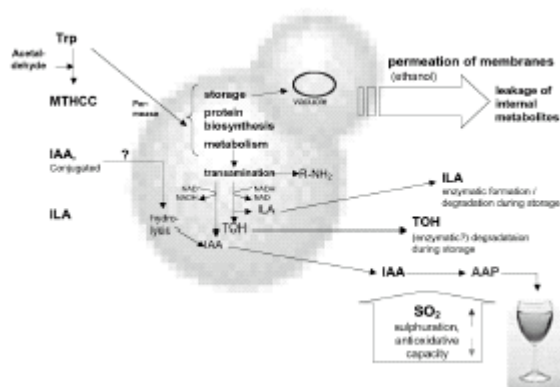


Fig. 10: Overview of the proposed metabolism of Trp and AAP formation.

Fig. 10: Übersicht über den Metabolismus von Trp und Bildung von AAP.

Fig. 10: Aperçu général de la métabolisme de Trp et AAP

Depending on the velocity of fermentation MTHCC is formed in a Pictet-Spengler-Reaction (1-10 mol-% of the initial amount of Trp), which cannot be utilized by the yeasts. Most of the Trp was metabolised, yielding TOH (6-22 mol-%), which indicates that the α -amino-N of Trp was used for the formation of other N-containing substances after deamination. Following the same

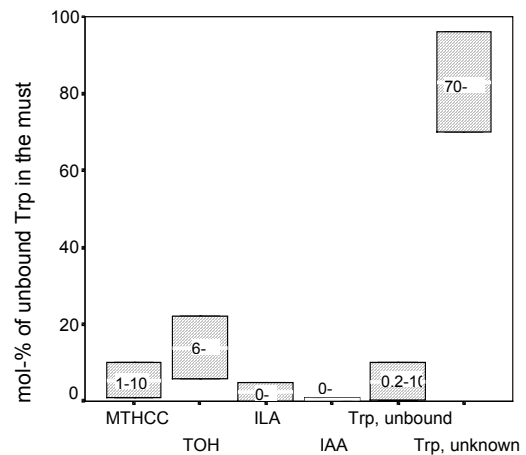


Fig. 11: Metabolic fates of the unbound Trp in must during fermentation (Trp, unknown = difference of the sum of metabolites and the initial amount of unbound Trp).

Fig. 11: Abbau und Bildung der Metabolite von nicht gebundenem Trp im Most während der Gärung (Trp, unknown = Differenz der Summe gebildeter Trp Metabolite und dem ur-sprünglichen Gehalt an nicht gebundenem Trp).

Fig. 11: Dégradation et formation des métabolites de Trp non-conjugué dans le moût au cours de la fermentation (Trp, unknown= la différence entre la somme des métabolites formés de Trp dans le moût et la teneur origine de Trp non-conjugué)

The amount of conjugated IAA dropped during fermentation to about 20 µg/L. It may be speculated whether IAA is bound to peptides which could be transferred into the yeast cell by specific peptide transport systems. Unbound IAA - a potential pre-cursor of AAP - was released during fermentation, predominantly in the fermentation media of early harvested grapes. A neosynthesis of IAA by the yeasts could be observed. Although the total amount of IAA was higher in the late harvested grapes than in early harvested (85 and 35 µg/L), the amount of unbound IAA prior to sulphuration was higher in the

fermentation media of early harvested grapes. A marked decrease for the concentration of free IAA was observed during 3 months storage.

UTA relevant amounts of AAP (up to 1.9 µg/L) in single wines were measured after a simulation of a longer storage at room temperature by using a 72 h storage at 40 °C. The amount of unbound IAA prior to and after sulphuration and the AAP concentration after heat treatment correlated significantly, indicating that about 30-50% of the variance of the AAP values might be traced back to the amount of its precursor. The amount of IAA prior to sulphuration is influenced by the ripeness of the grapes used, the nutritional supply of the yeasts, the fermentation temperature and the yeast strain. However, this experiment shows that other factors than the amount of the precursor IAA contribute to the formation of AAP, factors which are still unknown. Additionally, skilled sensory panels judged wines with high intensities of UTA descriptors which did not contain sensory relevant amounts of AAP. This indicates that other odorous compounds might also contribute to UTA, which have to be identified by sensory and analytical investigations in future.

Zusammenfassung

Der Metabolismus der Aminosäure Trp wurde bei der Vergärung unterschiedlicher Moste und unter Anwendung verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen verfolgt. Trp (8.5-17.4 mg/L) wurde bis zur Mitte der Gärung in allen Ansätzen nahezu vollständig (<0.2 mg/L) von den Hefen aufgenommen. Die Hefe benötigt Trp hauptsächlich zum Aufbau von Biomasse (v.a. Proteine). Daneben wird es zu anderen Substanzen umgesetzt, von denen MTHCC, TOH, ILA und IAA untersucht wurden (Fig. 10). In Abhängigkeit von der Gärgeschwindigkeit wurde Trp im Gärmedium in einer Pictet-Spengler-Reaktion zu MTHCC umgesetzt (1-10 mol-%), welches der Hefe als Nährstoffquelle nicht zur Verfügung steht. Ein großer Teil des Trp wurde nach dessen Desaminierung zu TOH umgesetzt (6-22 mol-%), so dass davon ausgegangen werden kann, dass der α-Aminostickstoff des Trp dem Aufbau anderer N-haltiger Substanzen dient. Neben TOH wurden in geringen Mengen auch IAA (0-1 mol-%) und ILA (0-5 mol-%) als Produkte der Trp-Desaminierung gebildet (Fig. 11).

Während der Fermentation nahmen die Konzentrationen an gebundener IAA im Gärmedium kontinuierlich bis auf etwa 20 µg/L ab. Es wird vermutet, dass peptidisch gebundene IAA über spezielle Peptidtransportsysteme in die Hefezellen aktiv aufgenommen werden kann. Nicht gebundene IAA - der Precursor von AAP - wurde vor allem während der Gärung des früh gelesenen Traubenmaterials freigesetzt. Eine IAA-Eigensynthese der Hefen konnte nachgewiesen werden. Obwohl die Menge an Gesamt IAA (nicht gebunden + konjugiert) in den spät gelesenen Trauben höher war als in den früh gelesenen (85 bzw. 35 µg/L), fanden sich zum Zeitpunkt der Schwefelung die höchsten IAA-Gehalte in den Gärmedien der früh gelesenen Trauben. Nach 3-monatiger Lagerung des Weins konnte ein signifikanter Abfall des IAA-Gehaltes festgestellt werden.

Nach 10 Monaten Lagerung der Versuchsweine lagen deren AAP-Gehalte unter 0.4 µg/L. UTA-relevante Mengen bildeten sich erst nach einer Stresslagerung (3 Tage bei 40 °C), die eine längere (>6 Monate) handels- und haushaltsübliche Lagerung bei Raumtemperatur simulieren sollte. Die Gehalte an nicht gebundener IAA vor und nach der Schwefelung sowie der Gehalt an AAP nach Stressbehandlung der entsprechenden Weine korrelierten signifikant, wobei 30-50% der Varianz der AAP-Gehalte auf den Precursor-gehalt nach bzw. vor der Schwefelung zurückgeführt werden konnten. Die Gehalte des Precursors IAA waren abhängig von der Traubenreife, der Zugabe von Hefenährstoffen, der Gärungstemperatur und dem Hefestamm. Allerdings zeigten diese Versuche, dass neben dem Gehalt an IAA auch andere bisher nicht bekannte Faktoren die Bildung von AAP im Wein beeinflussen. In diesem Zusammenhang wird darauf hingewiesen, dass – aufgrund von Erfahrungen aus der Qualitätsweinprüfung in den verschiedenen deutschen Anbaubereichen – Weine sensorisch mit UTA angesprochen werden, obwohl keine bzw. keine sensorisch relevanten AAP-Gehalte nachweisbar sind. Inwieweit andere Verbindungen für die Fehlnote UTA verantwortlich sein können, muss durch

weitere sensorische und analytische Untersuchungen geklärt werden.

Résumé

Les métabolismes de l'acide aminé Tryptophane (Trp) et de l'acide indole-3-acétique (IAA) pendant la fermentation des moûts et des traitements en cave ont été étudiés. Trp (8.5 – 17.4 mg/l) a été métabolisé complètement par les levures jusqu'à la mi-fermentation dans toutes les séries d'essais. Les levures ont besoin du Trp pour produire du biomasse (protéines). Trp est aussi métabolisé en autres substances, comme MTHCC, TOH, ILA et IAA qui ont été étudiées (Fig. 10). En dépendance de la vitesse de la fermentation Trp a été convertie dans une réaction 'Pictet-Spengler' (1 – 10 mol-%) en MTHCC, qui n'est pas disponible pour aux levures comme une source de substances alimentaires. Un grand part du Trp a été converti après la désamination en TOH (6 – 22 mol-%), en conséquence que l'azote aminé du Trp est utilisé pour produire d'autres substances azotées. Outre du Trp, IAA (0 – 1 mol-%) et ILA (0 – 5 mol-%) ont été formés comme des produits de la désamination du Trp (Fig 11). Au cours de la fermentation la concentration du IAA bondé a été réduite permanent dans le milieu de la fermentation jusqu'au 20 µg/l. On peut bien supposer, que l'IAA (qui est) bondé peptidique, est activement incorporé dans les cellules de levure avec des systèmes de transport peptidique spéciaux. IAA-non bondé – le précurseur du 2-aminoacétophenon (AAP) – a été dégagé en particulier pendant la fermentation de grappes non mûres. Une synthèse propre du IAA par des levures ne pouvait pas être détectée. Bien que le quantité de IAA total (bondé et non bondé) a été plus élevée dans les grappes bien mûres que dans les grappes non mûres (85 resp. 35 µg/l), on a trouvé des teneurs plus élevées du IAA dans les préparations de la fermentation de grappes non mûres. Après le stockage du vin produit de grappes non mûres pendant 3 mois, une diminution évidente de la teneur de IAA a été observée. Au bout de 10 mois du stockage, les teneurs de IAA dans les vins d'essai étaient au-dessous de 0.4 µg/l. Une teneur AAP, résultante d'une odeur de 'vieillesse atypique' (UTA), s'est formée seulement après une stockage de stress (3 jours, 40°C), qui devrait simuler un stockage typique commercial aux températures de ménage. Les teneurs en IAA non bondée avant et après la sulfuration ainsi que les teneurs en AAP après le stockage de stress des vins correspondants, ont indiquées une corrélation évidente, ou 30 - 50 % de la variance des teneurs du AAP pouvaient être ramenées aux teneurs du précurseur après resp. avant la sulfuration. Les teneurs du précurseur IAA dépendaient de la maturation des grappes, l'addition de substances alimentaires pour levures, la température de la fermentation et de la variété de la levure. En effet les essais ont montrés que des facteurs encore non bien connus, autres que la teneur de IAA, influencent la formation de AAP dans le vins. Dans ce contexte il faut bien remarquer que – par expérience des vérifications de la qualité du vin dans les régions viticoles allemands – quelques vins sont évalués sensoriellement d'avoir UTA, même si une teneur d'importance de AAP ne peut pas être détectée. Il est nécessaire d'éclaircir à moins de méthodes d'analyse et de méthodes sensoriels, si d'autres composants peuvent être responsables pour le changement du goût et pour l'odeur désigné comme UTA.

Acknowledgements

We thank Mrs. Poggendorf and Mr. Rakow (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) for the determination of AAP in the model wines.

References

1. Rapp, A., Versini, G., Ullemeyer, H., 1993, 2-Aminoacetophenon : Verursachende Komponente der "Untypischen Alterungsnote" („Naphtalin-ton“, „Hybridton“) bei Wein, *Vitis* 32:61-62.
2. Rapp, A., Versini, G., 1995, Fehlaroma: Die untypische Weinalterung, *Dtsch. Weinbau* 18:18-22.
3. Christoph, N., Bauer-Christoph, C., Geßner, M., Köhler, H. J., 1996, Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil VI: Untersuchungen zur Bildung von *o*-Aminoacetophenon aus Produkten des Tryptophan-Stoffwechsels vor der alkoholischen Gärung, *Rebe Wein* 49:246-250.
4. Geßner, M., Köhler, H. J., Christoph, N., Bauer-Christoph, C., 1996, Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil VII: Untersuchungen zur Bildung von *o*-Aminoacetophenon aus Produkten des Tryptophan-Stoffwechsels bei der alkoholischen Gärung, *Rebe Wein* 49:251-255.
5. Christoph, N., Bauer-Christoph, C., Geßner, M., Köhler, H. J., 1995, Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil I: Untersuchungen zum Auftreten und zur sensorischen Charakterisierung der „Untypischen Alterungsnote“, *Rebe Wein* 48:350-356.
6. Geßner, M., Köhler, H. J., Christoph, N., Bauer-Christoph, C., Miltenberger, R., Schmitt, A., 1995, Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil II: Beschreibende Verkostung von UTA-Weinen; Beziehungen zwischen Sensorik und chemisch-physikalischen Analysenwerten, *Rebe Wein* 48:388-394.
7. Fischer, U., Sponholz, R., 2000, Die sensorische Beschreibung der Un-typischen Alterungsnote, *Dtsch. Weinbau* 3:16-21.
8. Köhler, H. J., Christoph, N., Geßner, M., Bauer-Christoph, C., 1995, Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil III: Zu-sammenhänge zwischen dem Auftreten der „Untypischen Alterungsnote“ und dem Reifestadium der Trauben (Lesetermin), *Rebe Wein* 48:424-430.
9. Schwab, A., Peternel, M., Köhler, H. J., Heigel, K. P., 1996, Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil IV: Beeinflussung durch weinbauliche Maßnahmen, *Rebe Wein* 49:181-187.
10. Christoph, N., Bauer-Christoph, C., Geßner, M., Köhler, H. J., Simat, T. J., Hoenicke, K., 1998, Bildung von 2-Aminoacetophenon und Formylaminoacetophenon im Wein durch Einwirkung von schwefliger Säure auf Indol-3-essigsäure, *Vitic. Enol. Sci.* 53:79-86.
11. Hoenicke, K., Simat, T. J., Steinhart, H., Köhler, H. J., Schwab, A., 2001, Determination of free and conjugated indole-3-acetic acid, tryptophan and tryptophan metabolites in grape must and wine, *J. Agric. Food Chem.* 49:5494-5501.
12. Cohen, J. D., Bandurski, R. S., 1982, Chemistry and physiology of the bound auxins, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:403-430.
13. Hoenicke, K., Simat, T. J., Steinhart, H., Geßner, M., Köhler, H. J., Schwab, A., Christoph, N., 2001, Indoleessigsäure in Mosten und Weinen – Bedeutung hinsichtlich der Ausbildung einer "Untypischen Alterungsnote"(UTA) in Wein, pp. 113-123, in: *Intervitis Interfructa*, 6th International Symposium: Innovations in Wine Technology, Stuttgart, Germany.
14. Simat, T. J., Meyer, K., Steinhart, H., 1994, Synthesis and analysis of oxidation and carbonyl condensation compounds of tryptophan, *J. Chromatogr. A* 661:93-99.
15. Walker, G. M., 1998, *Yeast Physiology and Biotechnology*, John Wiley and Sons, Chichester, USA.
16. Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P. A., 1995, Amino Acid and Ammonium Utilization by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts from a Chemically Defined Medium, *Am. J. Enol. Vitic.* 46:75-83.
17. Bisson, L. F., 1991, Influences of Nitrogen on Yeast and Fermentation of Grapes, pp. 78-89, in: *Rautz, J. M., Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, Seattle, USA.
18. Ancin, C., Ayestaran, B., Garrido, J., 1996, Clarification by vacuum filtration of Grenache must. Utilization of free amino acids during fermentation and bottle-aging of wine, *Am. J. Enol. Vitic.* 47:313-322.
19. Bisson, L. F., 2001, Functional Genomic Analysis of Commercial and Natural Isolates of *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Con-ditions, pp. 230-239, in: *Intervitis Interfructa*, 6th International Symposium: Innovations in Wine Technology, Stuttgart, Germany.
20. Monteiro, F. F., Bisson, L. F., 1991, Amino Acid Utilization and Urea Formation During Vinification Fermentations, *Am. J. Enol. Vitic.* 42:199-208.
21. Shin, M., Shinguu, T., Sano, K., Umezawa, C., 1991, Metabolic Fates of L-Tryptophan in *Saccharomyces uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*), *Chem. Pharm. Bull.* 39:1792-1795.
22. Martens, D. A., Frankenberger, W. T., 1993, Metabolism of Tryptophan in Soil, *Soil Biol. Biochem.* 25:1679-1687.
23. Becker, J. M., Naider, F., 1980, Transport und Utilization of Peptides by Yeast, pp. 257-279, in: *Payne, J. W., Microorganisms and Nitrogen Sources*, John Wiley, Chichester, USA.

3.3.3

Mögliche Ursachen der Entstehung einer „Untypischen Alterungsnote“ (UTA) im Wein

Katrin Hoenicke¹, Thomas Simat¹, Hans Steinhart¹, Martin Geßner², Hans-Jürgen Köhler², Arnold Schwab²

¹ Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Grindelallee 117, D-20146 Hamburg

² Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau, Herrnstr. 8, D-97209 Veitshöchheim

Der Typtophanmetabolit Indolessigsäure (IAA) gilt als Precursor von 2-Aminoacetophenon (AAP), welches für die Ausbildung eines als „Untypischen Alterungsnote“ bezeichneten Fehlromas verantwortlich ist. Die Bildung von AAP kann durch Umsetzung von IAA mit schwefliger Säure bei der Schwefelung des Jungweines nach der Gärung erfolgen. Untersuchungen zum Einfluss verschiedener weinbaulicher und kellerwirtschaftlicher Parameter zeigten einen Einfluss des Reifegrades der verwendeten Trauben auf die Bildung des Precursors IAA durch den Stoffwechsel der Hefen. In trockenen Jahren scheint eine bei frühen Lesen auftretende unzureichende Nährstoffversorgung des Mostes zu einem abweichenden Hefemetabolismus und damit zu höheren IAA-Konzentrationen zum Zeitpunkt der Schwefelung zu führen.

Bei der „Untypischen Alterungsnote“ (UTA) handelt es sich um eine innerhalb eines Jahres auftretende negative Veränderung des Weinbuketts, die sensorisch mit Begriffen wie „nasser Lappen“, „Naphthalinnote“, „Bohnerwachs“ oder „Fuselalkohol“ beschrieben wird [1]. Breitgestreute Untersuchungen ließen erkennen, dass die UTA in Abhängigkeit von den klimatischen Verhältnissen eines Jahres insbesondere in trockengestressten Anlagen mit hohen Erträgen, flachgründigen Böden und bei frühen Lesen auftritt [2,3]. Als UTA-korrelierende Aromakomponente wurde 2-Aminoacetophenon (AAP) identifiziert, dessen sensorischer Schwellenwert je nach Aromafülle des Weines zwischen 0.5 und 1.5 µg/L liegt [4]. Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von AAP ergaben, dass dieses durch Umsetzung des Tryptophan (Trp) Metaboliten Indolessigsäure (IAA) mit schwefliger Säure bei der Schwefelung des Jungweines nach der Gärung entstehen kann [5]. IAA ist ein Phytohormon, das in der Pflanze vor allem konjugiert als Ester oder Säureamid vorliegt.

Um zu überprüfen inwiefern Trp und IAA durch verschiedene weinbauliche und kellerwirtschaftliche Maßnahmen beeinflusst werden, wurden Moste und Weine aus unterschiedlich kultivierten Reben auf ihren Gehalt an Trp und freier bzw. konjugierte IAA untersucht. Durch die Analyse von Trp und IAA in verschiedenen Stadien der Fermentation wurde die Bildung bzw. Freisetzung und der Abbau der IAA durch die Hefen betrachtet.

Keywords

Untypische Alterungsnote, Indolessigsäure, Tryptophan, *Saccharomyces cerevisiae*

Material und Methoden

Untersuchungsmaterial

Um den Einfluss verschiedener weinbaulicher Faktoren wie Ertragsbelastung (10 bzw. 20 Augen/Stock), Lesetermin (Lese bei Vollreife, 2 Wochen frühere Lese), Laubwandreduzierung (Reduzierung um 50 %, keine Laubarbeiten) und Bodenbearbeitung (offener Boden, Dauerbegrünung) auf den Gehalt an Trp und IAA zu überprüfen, wurden Moste und Weine der Rebsorte Kerner aus einem Weinanbauversuch der Bayerischen Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau in Veitshöchheim (LWG) untersucht. Insgesamt standen 48 Moste und die aus diesen Mosten hergestellten Weine der Jahrgänge 1996-1999 zur Verfügung.

Um den Einfluss des Hefemetabolismus während der Fermentation auf den Gehalt an Trp und freier bzw. konjugierter IAA zu überprüfen, wurde an der LWG ein Gärversuch mit einem Müller-Thurgau Most aus früher und später Lese durchgeführt. Hierzu wurden die Moste mit *Saccharomyces cerevisiae* (Uvaferm CM) bei 14 °C vergoren. Von den Ausgangsmosten und den jeweiligen Gäransätzen wurden zu Gärbeginn (Abnahme von 5 °Oe), zur Mitte der Gärung (55-45 °Oe), während der abklingenden Gärung (35-30 °Oe), nach Abstich und Schwefelung sowie nach Lagerung (7 Monate, 12 °C) Proben genommen.

Bestimmung von Trp und IAA

Die Bestimmung von Trp und IAA erfolgte nach der Methode von Hoenicke et al. [6]. Konjugierte IAA wurde durch alkalische Hydrolyse in Natronlauge, 5 mol/L, in 5 Stunden bei 120 °C im Vakuum freigesetzt. Nach Neutralisation wurde die Lösung mittels Festphasenextraktion an einer C18/OH-Phase gereinigt und IAA anschließend an einem stark basischen Anionenaustauscher (SAX) isoliert. Trp bzw. freie IAA wurden direkt nach Festphasenextraktion (SAX) analysiert. Eine quantitative Bestimmung erfolgte mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion.

Sensorische UTA-Bewertung

Für die sensorische UTA-Bewertung wurden die Weine von einem fachlich versierten Prüferpanel unter Verwendung einer 0-3

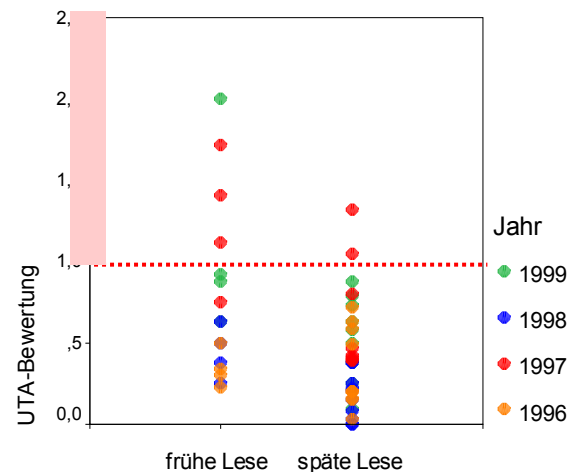


Abb. 1: Einfluss des Lesezeitpunktes auf die UTA-Ausprägung des Weines. UTA-Bewertung, 1 = schwache UTA; 2 = deutliche UTA.

Punkte umfassenden Bewertungsskala (0 = keine UTA; 3 = starke UTA) sensorisch beurteilt.

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss weinbaulicher Maßnahmen

In den untersuchten Mosten wurden in Abhängigkeit vom Jahrgang zwischen 2 und 80 mg/L Trp sowie <12 bis 120 µg/L konjugierte IAA nachgewiesen. Freie IAA war in den Mosten nicht nachweisbar (<3 µg/L). Ihre Bildung erfolgte im Verlauf der Fermentation. So wurden in den Weinen bis zu 90 µg/L freie IAA nachgewiesen, während der Anteil an konjugierter IAA auf weniger als 40 µg/L abnahm. Auch der Gehalt an Trp war in den Weinen mit <0.012 bis 24 mg/L deutlich geringer als in den Mosten.

Hinsichtlich der Trp- und IAA-Gehalte zeigte sich eine deutliche Jahrgangsdifferenzierung. Moste und Weine des relativ gleichmäßig durchfeuchteten Jahres 1996 lieferten unter den 4 Versuchsjahren die deutlich höchsten Trp- und IAA-Gehalte, die des relativ trockenen Jahres 1999 die geringsten. Bis auf den Anschnitt zeigten alle durchgeführten weinbaulichen Maßnahmen einen signifikanten Einfluss auf den Trp- und IAA-Gehalt. Bei früh gelesenen Trauben und durch Laubwandreduzierung wurden in den Mosten und Weinen hochsignifikant geringere Trp- und IAA-Gehalte analysiert ($\alpha < 0.01$). Bei der Bodenbearbeitung wurden unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit von den klimatischen Verhältnissen eines Jahres

beobachtet. Während in feuchten Jahren eine Begrünung zu höheren Trp- und IAA-Gehalten führte, wiesen in trockenen Jahren die offenen Varianten vergleichsweise höhere Trp- und IAA-Gehalte auf.

Die sensorische UTA-Bewertung zeigte, dass insbesondere der Lesezeitpunkt und der Jahrgang einen Einfluss auf die UTA-Neigung des Weines haben. So trat eine UTA hauptsächlich bei Weinen aus früh gelesenen Traubengut auf. Gefährdet waren dabei vor allem Weine der trockenen Jahre 1997 und 1999 (Abb. 1). Da sich diese Weine gleichzeitig durch vergleichsweise geringe Trp- und IAA-Gehalte im Most bzw. Wein auszeichneten, kann folglich die durch die klimatischen Verhältnisse und durch weinbauliche Maßnahmen beeinflusste Menge an Trp und IAA in der Traube nicht direkt für einen erhöhten AAP-Gehalt im Wein verantwortlich gemacht werden.

Einfluss des Hefemetabolismus

Nach Christoph et al. [5] erfolgt eine AAP-Bildung aus freier IAA infolge der üblichen Schwefelung nach Gärabschluss. Daher sollte insbesondere der freie IAA-Gehalt zum Zeitpunkt der Schwefelung von Interesse sein. Bisherige Ergebnisse zeigten, dass während der Fermentation signifikante Änderungen in den Trp- und IAA-Gehalten auftreten. Während Trp und konjugierte IAA von den Hefen metabolisiert werden, kommt es zu

einer signifikanten Bildung von freier IAA. Dies kann einerseits durch Hydrolyse der konjugierten IAA, andererseits durch Neosynthese aus Trp erfolgen (Abb. 2). Im folgenden wurden daher die Gehalte an Trp sowie freier und konjugierter IAA im Verlauf der Fermentation eines Mostes aus früher Lese (Most A) und später Lese (Most B) untersucht.

Zu Beginn der Fermentation lagen die Konzentrationen an Trp und konjugierter IAA im Most B etwa um den Faktor 2 höher als im Most A. Während Trp in beiden Gäransätzen bereits zur Mitte der Gärung nahezu vollständig von den Hefen metabolisiert wurde, unterschieden sich die beiden Ansätze im IAA-Stoffwechsel signifikant voneinander. Beim Most A (Abb. 3a) erfolgte zu Gärbeginn parallel mit der Abnahme des Gehaltes an Trp und konjugierter IAA eine Zunahme der freien IAA und der gesamt IAA (freie plus konjugierte IAA). Diese Zunahme kann nur durch eine Neosynthese von IAA durch die Hefen erklärt werden. Nach Erreichen eines Maximums zur Mitte der Gärung nahm die Konzentration an freier IAA zum Gärende und nach Schwefelung und Lagerung des Weines wieder ab. Beim Most B (Abb. 3b) erfolgte zu Beginn der Gärung eine vergleichsweise geringe Zunahme der freien IAA. Im Gegensatz zum Most A wurde hier eine Abnahme der gesamt IAA beobachtet. Die Zunahme der freien IAA kann demnach nicht unmittelbar auf eine Neosynthese zurückgeführt werden. Zum Gärende (vor der Schwefelung) lag der Gehalt an freier IAA im Ansatz B trotz einer höheren IAA- und Trp-Ausgangskonzentration etwa um ein

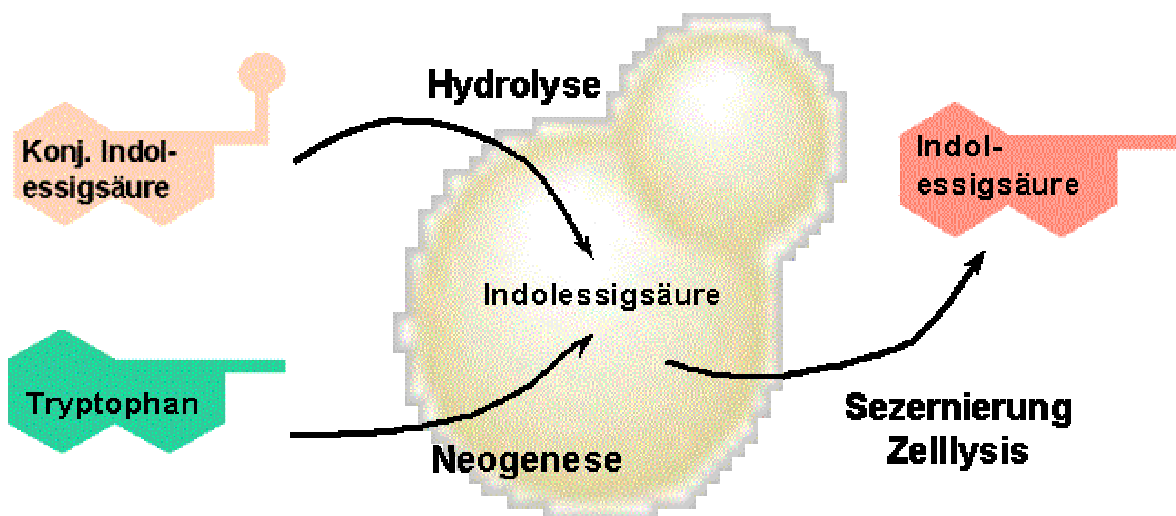


Abb. 2: Biosynthese von Indolessigsäure durch den Stoffwechsel der Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*).

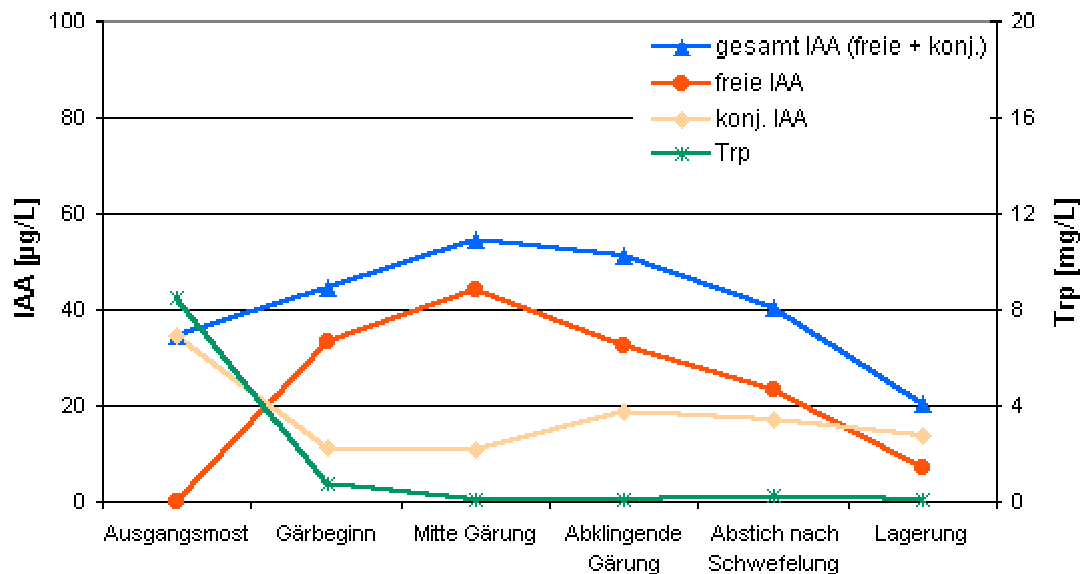


Abb. 3a: Verlauf der Trp-Konzentration sowie der freien und konjugierten IAA in verschiedenen Stadien der Fermentation und nach Lagerung eines Mostes aus früher Lese (Most A).

Drittel niedriger als im Ansatz A.

Im Ansatz B wurde nach Abstich und Schwefelung eine hochsignifikante Zunahme der konjugierten IAA beobachtet, die im Ansatz A in dieser Form nicht auftrat. Während der Lagerung erfolgte eine Abnahme der konjugierten IAA unter gleichzeitiger Freisetzung von freier IAA.

Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass der Reifegrad des Lesegutes einen signifikanten Einfluss auf den Hefemetabolismus hinsichtlich Bildung und Freisetzung des

Precursors IAA zu haben scheint. In der Reifephase der Traube erfolgt unter guten klimatischen Bedingungen (gleichmäßige Feuchte) eine intensive Aufnahme von Aminosäuren, Mineralstoffen und Polyphenolen in die Weinbeere [2]. Bei Trockenheit ist diese Nährstoffaufnahme durch die Wurzeln behindert. Da eine UTA insbesondere in trockenen Jahren bei frühen Leseterminen auftritt, scheint dem Hefemetabolismus bei unzureichender Nährstoffversorgung des Mostes eine entscheidende Rolle zuzukommen.

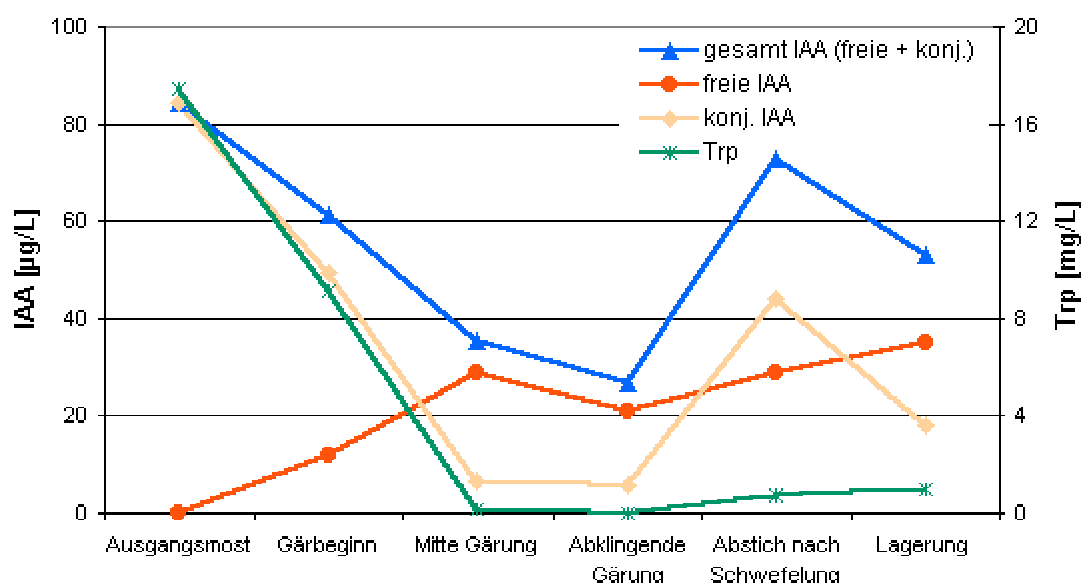


Abb. 3b: Verlauf der Trp-Konzentration sowie der freien und konjugierten IAA in verschiedenen Stadien der Fermentation und nach Lagerung eines Mostes aus später Lese (Most B).

Literatur

- [1] Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Geßner, M.; Köhler, H.J.: *Rebe & Wein* 48, 350-356 (1995)
- [2] Köhler, H.J.; Christoph, N.; Geßner, M.; Bauer-Christoph, C.: *Rebe & Wein* 48, 424-430 (1995)
- [3] Schwab, A.; Peterel, M.; Köhler, H.J.; Heigel, K.P.: *Rebe & Wein* 49, 181-187 (1996)
- [4] Rapp, A.; Versini, G.; Ullemeyer, H.: *Vitis* 32, 61-62 (1993)
- [5] Christoph, N.; Bauer-Christoph, C.; Geßner, M.; Köhler, H.J.; Simat, T.J.; Hoenicke, K.: *Vitic. Enol. Sci.* 53, 79-86 (1998)
- [6] Hoenicke, K.; Simat, T.J.; Steinhart, H.; Köhler, H.J.; Schwab, A.: *J. Agric. Food Chem.*, eingereicht

Dieses Projekt wurde durch den Fränkischen Weinbauverband und aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung, Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi/AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert. AiF-Projekt-Nr.: 11770 N.

4 DISKUSSION

4.1 Aufklärung des Bildungsmechanismus von 2-Aminoacetophenon

4.1.1 *Synthese und Identifizierung möglicher Intermediärprodukte*

Die Ausbildung des Fehlaramas UTA wird im Zusammenhang mit der Aromasubstanz AAP diskutiert, dessen Bildung im Wein aus den Trp-Metaboliten Kyn und IAA postuliert wird. Die Ursachen der AAP-Bildung sowie der Bildungsmechanismus und die dabei auftretenden Zwischenprodukte sind bisher weitgehend unbekannt. Zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus und zur Identifizierung der Zwischenstufen wurden zunächst mögliche Intermediate synthetisiert, die kommerziell nicht erhältlich sind.

Zur Verifizierung von Kyn als möglicher Precursor von AAP und zur Identifizierung der beim Abbau auftretenden Zwischenprodukte sollte die Synthese der von MAKINO et al. (1954) als Kyn-Metabolit postulierten und kommerziell nicht erhältlichen Substanz APDB erfolgen (siehe 1.3.1, Abb. 3). Die Synthese wurde in Anlehnung an die Arbeit von MAKINO et al. (1954) in drei Stufen durchgeführt, wobei den Autoren zufolge in der dritten Stufe durch katalytische Hydrierung von 4-(2-Nitrophenyl)-2,4-dioxobutansäure APDB entstehen soll. Als Produkte der Hydrierung konnten jedoch ausschließlich Kynurensäure und ihr *N*-Oxid identifiziert werden, nicht aber APDB (siehe 3.1.2). Entsprechende Ergebnisse werden auch von MUSAJO et al. (1950) beschrieben.

Kynurensäure kann durch Cyklisierung von APDB unter Abspaltung von Wasser entstehen (Abb. 4). Durch Optimierung der Hydrierungsbedingungen (Lösungsmittel, pH-Wert, Temperatur, H₂-Sättigung, Art und Menge des Katalysators) konnte zwar die Bildung von Kynurensäure zugunsten ihres *N*-Oxids zurückgedrängt werden, eine Bildung von APDB war jedoch auch intermediär nicht nachweisbar. Dieses lässt auf eine sehr hohe Instabilität der APDB schließen und bestätigt die Arbeiten von SCHÖPF et al. (1956), die eine Existenz dieser Substanz aus energetischen Gründen anzweifeln. Da bei der Bildung der *N*-Oxokynurensäure ein Ringschluss bereits vor einer vollständigen Hydrierung der Nitrogruppe stattfindet, wird angenommen, dass die geschlossene Ringform gegenüber der offenkettigen Form die energetisch günstigere Konstitution darstellt. In Verbindung mit der Tatsache, dass in keinem der verschiedenen Versuchsansätze AAP nachgewiesen werden konnte, wird APDB als ein möglicher Precursor von AAP ausgeschlossen.

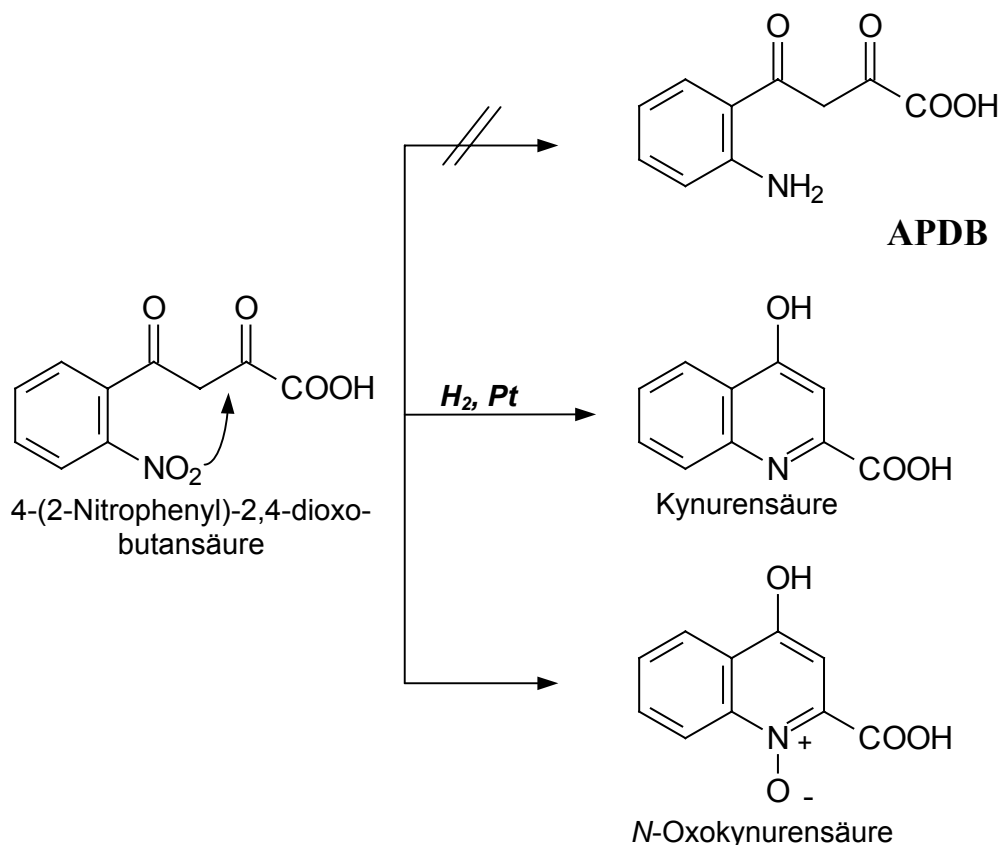


Abb. 4: Bildung von Kynurensäure und N-Oxokynurensäure durch Ringschluss während der Hydrierung von 4-(2-Nitrophenyl)-2,4-dioxobutansäure

Zur Verifizierung von IAA als möglichem Precursor von AAP und zur Identifizierung der beim Abbau auftretenden Zwischenprodukte wurden die Substanzen Oxoskatol, OxIAA und FAPOP synthetisiert, da diese kommerziell nicht erhältlich sind (siehe 3.1.2). Zusätzlich sollte die Synthese von DiOxIAA analog der Synthese von Dioxindolylalanin nach SAVIGE (1975) durch Begasung von OxIAA in alkalischer Lösung mit Luftsauerstoff erfolgen. Neben diversen unbekannten Substanzen wurde AAP als Syntheseprodukt identifiziert. DiOxIAA selbst war nicht nachweisbar. Daher wurde versucht, dieses analog der Synthese von Dioxoskatol nach HINMAN und BAUMAN (1964) darzustellen. Hierzu wurde IAA zunächst mit N-Bromsuccinimid zu 3-Bromoxindol-3-essigsäure umgesetzt. Anschließend sollte Brom im wässrigen Medium durch Zugabe von Natriumhydrogensulfat nucleophil durch eine Hydroxygruppe unter Bildung von DiOxIAA substituiert werden. Aber auch dieser Versuch der Darstellung führte zu zahlreichen verschiedenen Syntheseprodukten, wobei eine Isolierung der DiOxIAA nicht möglich war.

Zur Überprüfung von DiOxIAA als ein Precursor von AAP wurde dieses schließlich, wie auch das Schwefeladdukt der IAA, die (2-Sulfoindol)-3-essigsäure (IAA-HSO₃), mittels präparativer HPLC nach Umsetzung von IAA mit Kaliumpyrosulfit isoliert (siehe 3.1.2).

Mit Hilfe zweier HPLC-UV-Methoden wurde jeweils der Abbau des Kyn und der IAA in verschiedenen Modellmedien verfolgt und dabei auftretende Zwischenprodukte identifiziert. Eine zusätzliche HPLC-Methode mit MS-Detektion diente der Absicherung und der Identifizierung von Substanzen von denen zunächst keine Referenzsubstanzen vorlagen (DiOxIAA, IAA-HSO₃). Die Vorteile der entwickelten Methoden lagen insbesondere in ihrer einfachen und schnellen Durchführbarkeit. So konnten Kyn bzw. IAA und die jeweils postulierten Abbauprodukte ohne weitere Aufarbeitung bei Nachweisgrenzen von 5-20 µg/L (Kyn und Kyn-Abbauprodukte) bzw. 50-100 µg/L (IAA und IAA-Abbauprodukte) sicher identifiziert werden (siehe 3.1.2).

4.1.2 Untersuchungen zur fermentativen Bildung von 2-Aminoacetophenon

In der Literatur bestehen vielfach Widersprüche hinsichtlich der Möglichkeit einer fermentativen Bildung von AAP aus Trp und dessen Metaboliten Kyn und IAA. Während RAPP et al. (1995) AAP nach Vergärung von Trp nachweisen konnten, schließen DOLLMANN et al. (1996) Trp als direkte Vorstufe von AAP aus. Sie weisen vielmehr Kyn eine entscheidende Rolle in der Entstehung von AAP zu. GEBNER et al. (1996) konnten dagegen Kyn in der Rolle als Precursor von AAP nicht bestätigen. Ihren Untersuchungen zufolge erfolgt weder nach Zusatz von Trp noch von Kyn oder dessen Metabolit Kynuramin zum Most eine signifikante Bildung von AAP. Sie weisen vielmehr der IAA eine Schlüsselrolle in der Entstehung von AAP zu. Nach Zusatz von IAA zum Most wiesen sie im Wein deutlich höhere Mengen an AAP als im Vergleichswein ohne IAA-Zusatz nach. Allerdings bleibt bei ihren Untersuchungen offen, ob AAP bereits während der alkoholischen Gärung oder erst nach Abschluss der Gärung infolge der anschließend durchgeführten Schwefelung gebildet wurde.

In dieser Arbeit durchgeführte Modellstudien konnten eine relevante fermentative Bildung von AAP aus Trp bzw. Kyn und IAA nicht bestätigen. Die AAP-Bildungsraten lagen jeweils unter 0.06 mol-% (siehe 3.1.2 und 3.1.3). Während Trp bereits zu Beginn der einsetzenden Gärung relativ zügig von der Hefe aufgenommen wurde und schon nach wenigen Tagen im Gärmedium nicht mehr nachweisbar war, wurden sowohl Kyn als auch

IAA nur sehr langsam von der Hefe absorbiert. Ein Abbau des Trp erfolgte dabei hauptsächlich nach EHRLICH (1912) zum TOH, wobei entsprechend den Ergebnissen von SHIN et al. (1991 b) IAA und IAld als Nebenprodukte entstanden. Zusätzlich wurde eine relevante Bildung von 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure (MTHCC) nachgewiesen, das in einer Pictet-Sprengler-Reaktion mit dem Gärungsnebenprodukt Acetaldehyd entsteht.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SHIN et al. (1991 a) und YONAHARA et al. (1975) wurde als Hauptabbauprodukt des Kyn die Kynurensäure analysiert. Als wesentliche Abbauprodukte der IAA wurden OxIAA und IAld identifiziert (siehe 3.1.2).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Modellstudien wird der alkoholischen Gärung bei der Bildung von AAP keine große Bedeutung zugemessen. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf reale Bedingungen nur bedingt möglich ist. So kann beispielsweise nicht ausgeschlossen werden, dass durch bestimmte Mostinhaltsstoffe, wie Vitamine, Fettsäuren, Sterole und Spurenelemente oder durch die Anwesenheit anderer Mikroorganismen eine Umsetzung des Trp zum AAP möglich ist. Der Ausschluss einer relevanten fermentativen Bildung von AAP geht aber konform mit der Beobachtung, dass AAP in Mosten und ungeschwefelten Jungweinen nicht nachweisbar ist (GEBNER et al., 2000) und eine UTA im allgemeinen erst wenige Monate nach der Schwefelung und Lagerung des Weines auftritt (CHRISTOPH et al., 1995). Fraglich bleibt aber, inwieweit andere potentielle AAP-Vorstufen während der Gärung gebildet werden können, aus denen nach Abschluss der Gärung im Laufe der Lagerung eine AAP-Bildung möglich ist. Auch CHRISTOPH et al. (1998) gehen von einer möglichen Bildung von AAP-Vorstufen durch die Hefen aus. Somit muss, wenn auch eine fermentative Bildung von AAP als nicht relevant angesehen wird, der Gärungsprozess selbst nicht ohne Bedeutung hinsichtlich der Entstehung einer UTA sein.

4.1.3 Untersuchungen zur physikalisch-chemischen Bildung von 2-Aminoacetophenon

Untersuchungen von CHRISTOPH et al. (1998) zum Bildungsmechanismus von AAP zeigten eine relativ zügige Umsetzung von IAA (bis zu 20 mol-%) in ethanolischer Lösung durch die Einwirkung von schwefliger Säure. Eine entsprechende Bildung von AAP aus Kyn wurde dagegen weder bei Raumtemperatur noch durch die Einwirkung von Wärme nachgewiesen.

Auch nach den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Modellschwefelungen wird eine relevante Umsetzung des Kyn zum AAP ausgeschlossen, die AAP-Bildungsrate lag bei unter 0.01 mol-%. Aufgrund dieser Tatsache und der in Abschnitt 4.1.2 diskutierten Ergebnisse wird Kyn als ein möglicher Precursor von AAP im Wein ausgeschlossen.

Eine signifikante Bildung von AAP erfolgte dagegen, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von CHRISTOPH et al. (1998) sowohl im Modell- als auch im Realwein nach Umsetzung von IAA mit Kaliumpyrosulfit. Neben AAP wurden IAld, OxIAA, DiOxIAA, IAA-HSO₃, FAP und erstmalig auch FAPOP als Abbauprodukte der IAA sicher identifiziert. Von diesen Abbauprodukten wurden wiederum FAPOP und FAP als direkte Vorstufen von AAP charakterisiert: Lediglich aus diesen Substanzen erfolgte nach Reaktion mit Kaliumpyrosulfit eine Bildung von AAP (siehe 3.1.3). Skatol und Oxoskatol, welche von CHRISTOPH et al. (1998) ebenfalls als mögliche Intermediate bei der Bildung von AAP aus IAA postuliert wurden, konnten dagegen weder im geschwefelten Modellwein noch im geschwefelten Realwein nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die bereits von mehreren Autoren erwähnte Schlüsselrolle der IAA in der Entstehung der UTA (CHRISTOPH et al. 1996; GEBNER et al. 1996; CHRISTOPH et al. 1998). Als Mechanismus der AAP-Bildung nehmen CHRISTOPH et al. (1998) eine Kooxidation von IAA und SO₂ an. Hierbei wird nach Untersuchungen von YANG und SALEH (1973) der Pyrrolring der IAA durch Superoxid- und Hydroxylradikale oxidiert. Durch Pyrrolringspaltung entsteht nach CHRISTOPH et al. (1998) FAP, welches anschließend zu AAP hydrolysiert. Untersuchungen von GEBNER et al. (1999) zeigten, dass eine AAP-Bildung durch entsprechende weineigene Inhaltsstoffe verzögert bzw. durch einen Zusatz von Ascorbinsäure zum Jungwein unterdrückt werden kann. Ascorbinsäure wirkt dabei als leicht oxidierbare Substanz und ist als solche in der Lage, die entstehenden Sauerstoffradikale abzufangen.

Anhand von Untersuchungen zum IAA-Abbau in spezifischen radikalerzeugenden Systemen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Umsetzung der IAA zum AAP allein durch die Anwesenheit von Superoxidradikalen erfolgt. Anhand der in den jeweiligen Modellsystemen nachgewiesenen IAA-Abbauprodukte und in Verbindung mit den Arbeiten von HINMANN und LANG (1965) und BALOGH-HERGOVICH und SPEIER (1982) wurde ein möglicher Reaktionsmechanismus formuliert. Demnach erfolgt unter Abstraktion eines Elektrons zunächst die Bildung eines Indolradikalkations. Superoxidradikale reagieren mit diesem Indolradikalkation unter Spaltung des Pyrrolringes

und Bildung von FAPOP, wobei diese Reaktion in der Entstehung von AAP als der entscheidende Schritt anzusehen ist. FAPOP wird anschließend zum FAP decarboxyliert, welches langsam zu AAP hydrolysiert. Sind ausschließlich Hydroxylradikale anwesend, reagieren diese an Stelle der Superoxidradikale mit dem Indolradikalkation unter Bildung von OxIAA. Sind beide Radikalspezies vorhanden kann die gekoppelte Oxidation von IAA durch Hydroxyl- und Superoxidradikale entsprechend den Arbeiten von HORNG und YANG (1975) zur Bildung von DiOxIAA führen (siehe 3.1.3).

4.2 Testverfahren zur Beurteilung des UTA-Potentials von Mosten und Weinen

4.2.1 Identifizierung von Tryptophan und Tryptophan-Metaboliten

Als relevanter Precursor von AAP wurde in dieser Arbeit der Trp-Metabolit IAA verifiziert. Zur Untersuchung von IAA neben Trp und weiteren Trp-Metaboliten in Mosten und Weinen wurde ein Hydrolyseverfahren zur Freisetzung von konjugierter IAA entwickelt und ein flüssigchromatographisches Detektionssystem validiert.

Hydrolyse von gebundener Indolelessigsäure

IAA liegt in der Pflanze hauptsächlich gebunden in Form von Estern oder Säureamiden vor (COHEN und BANDURSKI, 1982). Zur Bestimmung der IAA in Mosten und Weinen wurde daher eine Methode zur Hydrolyse von IAA-Konjugaten entwickelt (siehe 3.2.2).

Im Verlauf der Methodenentwicklung stellte sich heraus, dass IAA wesentlich labiler gegenüber einer alkalischen Hydrolyse ist als Trp. Zusätzlich traten Artefakte auf, die auch von anderen Autoren beschrieben wurden und sich in einer starken Zunahme des IAA-Gehaltes äußerten (BIALEK und COHEN, 1989). Diese Zunahme kann nicht allein mit einer Freisetzung von IAA aus ihren Bindungen erklärt werden, sondern ist auf eine oxidative Umsetzung von Trp zu IAA zurückzuführen, welches im Most in einer etwa 1000-fach höheren Konzentration als IAA vorliegt. Bereits geringste Umsetzungsraten des Trp haben somit einen signifikanten Anstieg der IAA-Konzentration zur Folge.

Der Versuch einer enzymatischen Hydrolyse mit Pronase E oder Carboxypeptidase erwies sich in Übereinstimmung mit Ergebnissen von COHEN und BANDURSKI (1982) als ineffizient. Aus diesem Grund wurde in Anlehnung an die Literatur eine alkalische Hydrolyse mit Natronlauge im Vakuum durchgeführt. Während der Entwicklung des

hydrolytischen Verfahrens zeigte sich, dass zur Spaltung der im Most und Wein vorliegenden IAA-Konjugate andere Bedingungen erforderlich sind als die, die üblicherweise zur Hydrolyse von IAA-Konjugaten in Mais oder in Samen verschiedener Leguminosen angewandt werden (BANDURSKI und SCHULZE, 1977; BIALEK und COHEN, 1989). Schließlich wurde bei der in dieser Arbeit angewandten Hydrolysetechnik ein geeigneter Kompromiss zwischen vollständiger Freisetzung der gebundenen IAA, Stabilität der nach Spaltung frei vorliegenden IAA und dem Ausschluss von Artefakten gefunden.

Chromatographische Trennung und Detektion von Tryptophan und Tryptophan-Metaboliten

In der Literatur werden sowohl gaschromatographische (KISLIN und KEFELI, 1981; BADENOCH-JONES et al., 1982; KELL und STEINHART, 1990) als auch flüssigchromatographische Verfahren (YOUNG und LAU, 1979; LEBHUHN und HARTMANN, 1993; SIMAT et al., 1996) zur Identifizierung und Quantifizierung von Trp und Trp-Metaboliten beschrieben. Im Vergleich zur Flüssigchromatographie bietet die Gaschromatographie den Vorteil einer hohen Trennstufenzahl. Demgegenüber steht der Nachteil, dass zur Erhöhung der Flüchtigkeit einzelner Substanzen polare Gruppen derivatisiert werden müssen. Außerdem stellt sich das Problem der Selektivität, da neben Trp auch alle anderen Aminosäuren im Most bzw. Wein erfasst werden.

Trp, IAA und weitere in dieser Arbeit untersuchte Trp-Metabolite unterscheiden sich von den meisten anderen Aminosäuren durch ihre fluoreszierenden Eigenschaften. Das Verfahren der flüssigchromatographischen Trennung mit anschließender Fluoreszenzdetektion stellt daher eine einfache und selektive Methode zur Identifizierung und Quantifizierung dieser Substanzen dar. Als problematisch erwies sich zunächst die Trennung der IAA von dem im Wein in hohen Mengen vorhandenen TOH. Diese Problematik wird auch von LEBHUHN und HARTMANN (1993) beschrieben. In dieser Arbeit wurde eine Trennung durch eine Festphasenextraktion an einem stark basischen Anionenaustauscher erreicht. Durch diesen Schritt wurde ein leistungsfähiges Verfahren erhalten, mit dem insgesamt sieben im Hinblick auf eine UTA möglicherweise relevante Substanzen im Most und im Wein selektiv nebeneinander erfasst werden können.

4.2.2 *Verfahren zur Messung der antioxidativen Kapazität von Weinen*

Der oxidative Abbau von IAA zu AAP wird durch Superoxidradikale initiiert und kann durch antioxidativ wirksame Substanzen im Wein verhindert bzw. verzögert werden. Für die Ausbildung einer UTA scheint daher neben dem Precursor IAA auch die antioxidative Kapazität eines Weines eine entscheidende Rolle zu spielen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Verfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Weinen entwickelt, die auf jeweils unterschiedlichen Prinzipien beruhen und sich insbesondere in ihrer Spezifität in Bezug auf bestimmte Radikale unterscheiden. Das in Anlehnung an die Methode von MILLER et al. (1993) entwickelte Verfahren zur Messung des ‚Total Antioxidativen Status‘ (TEAC-Test; siehe 3.1.3) beruht auf dem gleichen Prinzip wie das RANDOX antioxidant kit (Randox Laboratories Ltd., Ardmore, Crumlin, UK), das in der Weinanalytik vielfach Anwendung findet (SIMONETTI et al., 1997; SOLEAS et al., 1997; BADERSCHNEIDER et al., 1999). Das Verfahren misst unspezifisch die Fähigkeit, freie Radikale abzufangen. Die Radikalerzeugung erfolgt durch Reaktion von ABTS mit Wasserstoffperoxid und Metmyoglobin. Metmyoglobin wird zuvor aus Myoglobin und Kaliumhexacyanoferrat(III) nach säulenchromatischer Reinigung gewonnen. Neben dem finanziellen Aspekt weist das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren im Vergleich zum kommerziell erhältlichen Testkitt einen größeren Arbeitsbereich auf, was sich insbesondere für die Analytik der Versuchsweine als vorteilhaft herausstellte. Nachteilig ist der höhere Arbeitsaufwand, da Metmyoglobin vor jeder Messung frisch hergestellt werden muss.

Neben dem TEAC-Test wurden zwei weitere Verfahren entwickelt und validiert, die spezifisch die Fähigkeit messen, Superoxidradikale abzufangen (siehe 3.1.3). Diese beiden Verfahren sind daher in Bezug auf die UTA-Problematik besonders geeignet, die antioxidative Kapazität von Weinen zu beurteilen. Voneinander unterscheiden sie sich in der Art der Radikalerzeugung und der Detektion. Bei dem in Anlehnung an die Methode von OKAMURA et al. (1993) entwickelten Verfahren erfolgt die Generierung von Superoxidradikalen enzymatisch durch Reaktion des Enzyms Xanthinoxidase (XOD) mit dem Substrat Xanthin. Hierbei wird Xanthin durch XOD unter Bildung von Superoxidradikalen zu Harnsäure umgesetzt. Die Menge der im System vorhandenen Superoxidradikale wird durch deren Reaktion mit der Detektorsubstanz Nitroblau-tetrazoliumchlorid photometrisch bestimmt. Als nachteilig erwies sich bei diesem Verfahren die nur geringe Stabilität der XOD-Lösung, die vor jeder Messung frisch hergestellt werden muss. Ein weiteres Problem stellt die Weinmatrix selbst dar. So scheint

das Enzym XOD teilweise durch bestimmte Weininhaltsstoffe, wie z.B. Gerbstoffe, inhibiert zu werden. Diese auch von HATANO et al. (1990) beschriebene Hemmung führt zu einer geringeren Bildung von Superoxidradikalen, was als Ergebnis eine scheinbar höhere antioxidative Kapazität zur Folge hat. Weitere Probleme traten bei der Messung von Ascorbinsäure auf. Diese reagiert bereits vor der Zugabe von XOD mit der aus Xanthin und Nitroblautetrazoliumchlorid bestehenden Reaktionslösung zu einem blauen Farbstoff, der die Messung stört.

Bei dem in Anlehnung an die Methode von POPOV et al. (1994) durchgeführten photochemischen Verfahren werden Superoxidradikale durch optische Anregung einer photosensiblen Substanz mit UV-Licht generiert. Ihr Nachweis erfolgt durch Lumineszenzmessung nach Reaktion mit Luminol. Gegenüber der enzymatischen Methode bietet diese Technik den Vorteil der einfacheren Handhabung und der Störungsfreiheit in Bezug auf die Weinmatrix. Von Nachteil ist jedoch der hohe materielle und damit auch finanzielle Aufwand, der sich lediglich für die Routine lohnt.

Der Vorteil der beiden Methoden gegenüber den herkömmlichen Techniken zur Messung der antioxidativen Kapazität (TEAC, DPPH, DMPD, TRAP, LDL, DMPO) liegt insbesondere in ihrer Spezifität in Bezug auf Superoxidradikale. Dabei muss erwähnt werden, dass das Ergebnis der antioxidativen Kapazität sehr stark von der jeweils angewandten Methode abhängt. Ein direkter Vergleich der mit unterschiedlichen Verfahren ermittelten antioxidativen Kapazitäten ist generell in Übereinstimmung mit den Aussagen anderer Autoren (BÖHM et al., 2001) nicht möglich.

Schließlich bleibt anzumerken, dass eine vergleichbare und reproduzierbare Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Mosten mit keiner der drei Techniken möglich war. Aufgrund von noch aktiven Polyphenoloxidasen im Most kam es in Abhängigkeit von der Standzeit der Proben zu einer Oxidation der enthaltenen Polyphenole und damit zu einer Abnahme des antioxidativen Potentials.

4.3 Einfluss Weinbaulicher und Kellerwirtschaftlicher Maßnahmen hinsichtlich der Entstehung einer UTA

Die eigentlichen Ursachen für die Entstehung einer UTA im Wein sind bis heute nicht geklärt. Fest steht, dass

- AAP als eine wesentliche zum Fehl aroma beitragende Aromakomponente angesehen werden kann und
- eine Bildung von AAP durch eine radikalische Oxidation der IAA, initiiert durch Superoxidradikale, nach der Schwefelung des Weines erfolgt.

Als gesichert gilt auch, dass zwischen dem Auftreten einer UTA und dem Lesetermin in Verbindung mit den klimatischen Verhältnissen eines Jahres ein enger Zusammenhang besteht (KÖHLER et al., 1995). Daneben gibt es Berichte, dass

- hohe Erträge, insbesondere auf trockenheitsgefährdeten Standorten (LÖHNERTZ 1996; SCHWAB et al., 1996; SCHWAB et al., 1999),
- Wasser- und Nährstoffstress durch Dauerbegrünungen (LÖHNERTZ 1996; SCHWAB et al., 1996; WOHLFAHRT, 1996; REDL, 1999),
- eine erhöhte Wasserverdunstung über die Blätter bei fehlender Entlaubung, vor allem in heißen und trockenen Jahren (SCHWAB et al., 1996),
- eine verstärkte Bildung des Phytohormons IAA als Reaktion auf einen Nährstoff- und/oder Wasserstress (SCHWAB et al., 1999)
- sowie die Anwesenheit bestimmter Wildhefen bei der alkoholischen Gärung (HÜHN et al., 1996)

die Entstehung einer UTA begünstigen.

Um die genauen Ursachen für die Entstehung einer UTA im Wein zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Weinbaulicher Maßnahmen auf die Gehalte an IAA, Trp und weiteren Trp-Metaboliten in Mosten und Weinen ermittelt. Der Einfluss Weinbaulicher Maßnahmen auf die antioxidative Kapazität eines Weines wurde durch Messung des antioxidativen Status (TEAC-Test) und seiner Superoxidradikalfangenden Eigenschaften bestimmt. Die Rolle der Fermentation hinsichtlich der Entstehung möglicher AAP-Vorstufen und der Einfluss verschiedener Kellerwirtschaftlicher Maßnahmen wurde

durch eine Analyse von IAA, Trp und weiteren Trp-Metaboliten in spezifischen Stadien der Gärung näher betrachtet.

4.3.1 Einfluss weinbaulicher Maßnahmen

Der Einfluss verschiedener weinbaulicher Maßnahmen auf die Bildung des AAP-Precursors IAA, auf Trp und andere ausgewählte Trp-Metabolite sowie auf die antioxidative Kapazität des Weines wurde anhand eines mehrjährigen Weinbauversuches im Bereich der Stockpflege und der Bodenbewirtschaftung untersucht. Aus den Untersuchungen der aus insgesamt vier Versuchsjahren stammenden Moste und Weine der Art *V. vinifera* cv. Kerner wird ersichtlich, dass die verschiedenen weinbaulichen Maßnahmen einen z.T. hochsignifikanten Einfluss auf die Gehalte an Trp und Trp-Metaboliten und auf die antioxidative Kapazität des Weines ausüben (siehe 3.1.3 und 3.2.2).

Weder signifikant auf die antioxidative Kapazität des Weines noch auf die Gehalte an Trp und Trp-Metaboliten wirkte sich der *Anschnitt* (Ertragsniveau) aus. Fraglich ist jedoch, ob bei der in dieser Arbeit untersuchten Hochleistungssorte Kerner durch eine Erhöhung des Ertrages von 10 auf 20 Augen pro Stock überhaupt ein Stress für die Weinrebe induziert werden konnte. RAPP und VERSINI (1995) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass unter den Voraussetzungen einer optimalen Versorgung der Reben, der Ertrag keinen Einfluss auf den AAP-Gehalt eines Weines hat. Nach SCHWAB et al. (1996) wird durch eine Reduzierung des Anschnittes die Aromenkomplexität und dadurch die Qualität eines Weines erhöht und dessen UTA-Ausprägung verringert.

Den stärksten Einfluss auf die Gehalte an Trp und Trp-Metaboliten und auf die antioxidative Kapazität besaß der *Lesezeitpunkt*. Eine späte Lese führte zu höheren Trp-Gehalten im Most und zu einem Anstieg der antioxidativen Kapazität des Weines. Aus der höheren Trp-Konzentration im Most resultierten im Wein höhere Mengen an Trp-Metaboliten. Der signifikante Anstieg von einzelnen Most- und Weininhaltsstoffen mit fortschreitendem Lesetermin ist ein in der Literatur vielfach beschriebener Effekt. So nehmen in Abhängigkeit von der Niederschlagsverteilung während der Sommermonate im Verlauf der Traubenreife neben den Zuckern auch verschiedene andere wertgebende Inhaltsstoffe, wie Aminosäuren, Mineralstoffe, Aromastoffe und Gerbstoffe kontinuierlich zu. Nach LÖHNERTZ et al. (1998) stellt die Traube gerade in der letzten Phase der Reife ein

starkes Attraktionszentrum für die Einlagerung von Stickstoffverbindungen dar. Untersuchungen von KÖHLER et. al (1995) zeigten, dass in der letzten Phase der Reife bei nur noch geringfügig zunehmendem Mostgewicht die Gehalte an Polyphenolen und Stickstoffsubstanzen nochmals deutlich ansteigen können.

Die in dieser Arbeit ermittelten höheren antioxidativen Kapazitäten in den Weinen aus später Lese können auf einen höheren Polyphenolgehalt der entsprechenden Moste zurückgeführt werden. Infolge der höheren antioxidativen Kapazität weisen diese Weine einen besseren Schutz der IAA vor einer radikalischen Oxidation und damit vor der Bildung von AAP und der Entstehung einer UTA auf. Parallel mit dem Anstieg einzelner Traubeninhaltsstoffe wurde im Most mit fortschreitender Traubenreife aber auch eine Zunahme der Konzentration an gebundener IAA und damit ein Anstieg der Menge an potentielltem Precursor ermittelt. Aufgrund von umfangreichen Untersuchungen zum Auftreten der UTA gilt es jedoch als gesichert, dass die Verarbeitung vollreifer Trauben zur Vermeidung des Aromafehlers UTA beiträgt. Dies ist nach Meinung von KÖHLER et al. (1995) und SCHWAB et al. (1999) nicht nur auf eine Steigerung der Aromafülle, sondern auch auf eine geringere AAP-Konzentration zurückzuführen. Demzufolge kann aber die Menge an vorliegendem Precursor im Most nicht allein ursächlich für die Entstehung einer UTA im Wein sein.

Der Einfluss des *Bodenpflegesystems* auf die Gehalte an Trp und Trp-Metaboliten war nicht homogen, sondern abhängig von den klimatischen Verhältnissen eines Jahres, insbesondere der Niederschlagsmenge und deren Verteilung. Eine intensive Dauerbegrünung der Rebassen führte, verglichen mit einer offenen Bodenbearbeitung, in den durch Trockenphasen gekennzeichneten Jahren (1997-1999) zu geringeren Trp- und IAA-Gehalten. In gleichmäßig feuchten Jahren wie 1996, hatte eine ganzjährige Begrünung dagegen vergleichsweise höhere Trp- und IAA-Gehalte zur Folge. In Bezug auf die antioxidative Kapazität der Weine konnte ein entsprechender heterogener Einfluss nicht ermittelt werden. Hier führte eine ganzjährige Begrünung generell zu höheren antioxidativen Kapazitäten. Diese Erscheinung geht konform mit Untersuchungen von CORINO et al. (1999), die in Weinen aus begrünter Anlagen generell höhere Polyphenolgehalte als in solchen aus offenen Varianten ermittelten.

Nach LÖHNERTZ et al. (1998) werden durch das Bodenpflegesystem sowohl der Wasser- als auch der Nitrathaushalt des Bodens entscheidend beeinflusst. In dauerbegrünter Anlagen ist in der Regel bedingt durch eine Wasser- und Nährstoffkonkurrenz der

Begrünungspflanzen, ein geringerer Gehalt an pflanzenverfügbarem Wasser und ein geringeres Nitratangebot vorhanden. Die hieraus resultierende geringere Aufnahme von Stickstoffsubstanzen aus dem Boden in die Rebe führt erfahrungsgemäß zu geringeren Einlagerungen von Aminosäuren in die Traube (LÖHNERTZ, 1996; LÖHNERTZ et al., 1998; REDL, 1999; SCHALLER, 1999). In ausgesprochen niederschlagsreichen Jahren kann eine Begrünung dagegen eine Auswaschung von Nitraten aus dem Boden verhindern bzw. reduzieren. Hierdurch lassen sich die in dem feuchten Jahr 1996 vergleichsweise höheren Gehalte an Trp und Trp-Metaboliten in den Mosten und Weinen aus der begrünten Anlage erklären.

Generell beeinflusst eine wasserzehrende Dauerbegrünung die Entstehung einer UTA aber nicht in dem Maße wie beispielsweise ein früher Lesetermin. Nach RAPP und VERSINI (1995) ist bei ausreichender Wasserversorgung kein Unterschied in den AAP-Gehalten von Weinen aus begrünten und offenen Systemen nachweisbar. Demzufolge kann nur bei extremer Trockenheit dem Einfluss einer Dauerbegrünung eine Bedeutung zugemessen werden. In den relativ trockenen Jahren 1997-1999 zeichneten sich die in dieser Arbeit analysierten Moste und Weine aus dauerbegrünten Anlagen aber gerade durch geringere Gehalte an IAA aus.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von LÖHNERTZ et al. (1998) führte eine *Reduzierung der Blattfläche* zu geringeren Gehalten an Trp und Trp-Metaboliten. Durch die Verringerung der Blattfläche tritt im allgemeinen eine stärkere Besonnung der Traubenzone ein. Die damit verbundenen höheren Temperaturen in den Trauben haben eine verstärkte Proteinbiosynthese und damit eine Abnahme des Gehaltes an freien Aminosäuren zur Folge. Zusätzlich führt eine Entblätterung zu einem Verlust der in den Blättern gespeicherten Aminosäuren, welche insbesondere in der letzten Phase der Reife verstärkt in die Traube verlagert werden (LÖHNERTZ et al., 1998; STEINER, 1999). Hinsichtlich der UTA-Problematik ist aber der Einfluss der Blattflächenreduzierung als eher gering einzustufen. So konnte selbst in den trockenen und UTA-gefährdeten Jahren 1997-1999 keine signifikante Erhöhung des AAP-Gehaltes durch eine Blattflächenreduzierung ermittelt werden (AAP-Analytik durch Dr. N. Christoph, Bayerisches Landesuntersuchungsamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Würzburg; Werte nicht dargestellt). Nach SCHWAB und PETERNEL (2001) führt jedoch eine starke Blattflächenreduzierung zu einer Verringerung der sensorischen Qualität, da hier grüne

Noten in den Vordergrund treten. Aus diesem Grund werden solche Weine gleichzeitig meist auch mit höheren UTA-Noten bewertet.

Die Auswertung des Weinbauversuches über vier Versuchsjahre zeigte, dass insbesondere die Gehalte an Trp und Trp-Metaboliten aber auch die antioxidative Kapazität jahrgangsabhängigen Schwankungen unterliegt. Besonders auffällig waren die deutlich höheren Gehalte an Trp und Trp-Metaboliten in den Mosten und Weinen des Jahrgangs 1996. Der Jahrgang 1996 war im Unterschied zu den Jahrgängen 1997-1999 durch gleichmäßig verteilte Niederschläge geprägt, während sich die anderen drei Versuchsjahre durch längerandauernde Trockenphasen und höhere Temperaturen auszeichneten. Eine sich in Abhängigkeit vom Witterungsverlauf unterschiedlich stark ausgeprägte Jahrgangsdifferenzierung wird auch von diversen anderen Autoren beschrieben (FLANCY und POUX, 1965; SCHRADER et al., 1976; TUSSEAU et al., 1989; SCHWAB et al., 1996; LÖHNERTZ et al., 1998; SCHWAB et al., 1999). Demnach haben Sonnenscheindauer und Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Stoffwechselvorgänge im Blatt und die Einlagerung von Stoffwechselprodukten in die Traube. Starke Sonneneinstrahlung und hohe Temperaturen führen infolge der intensiveren Proteinbiosynthese zu geringeren Gehalten an freien Aminosäuren. Sinkt zudem infolge geringer Niederschlagsmengen das pflanzenverfügbare Bodenwasser unter einen bestimmten Schwellenwert, wird die Wasseraufnahme durch die Wurzeln der Rebe stark reduziert. Dies führt zu einer geringeren Aufnahme von Stickstoffverbindungen aus dem Boden, da diese mit dem Wasser über die Wurzeln aufgenommen und im Transpirationsstrom transportiert werden. Dementsprechend geringer waren 1997-1999 die Einlagerungen von Trp in die Trauben und damit die Konzentrationen an Trp und Trp-Metaboliten in den entsprechenden Mosten und Weinen.

In Bezug auf die antioxidative Kapazität der Weine war eine entsprechende Jahrgangsdifferenzierung nicht zu erkennen. Vergleichsweise geringere antioxidative Kapazitäten wurden in den Jahren mit deutlich negativer Wasserbilanz (1997 bzw. 1999) ermittelt. Untersuchungen von QUINTANA GANA und GOMEZ PINOL (1989) zum Einfluss des Klimas auf den Polyphenolgehalt der Traube zeigten, dass Trockenstress zu geringeren Polyphenolkonzentrationen führt. Gleichzeitig hat aber nach ROBIN et al. (1996) eine hohe Sonneneinstrahlung einen Anstieg der Polyphenolkonzentration zur Folge. Durch diesen gegenläufigen Effekt kann eine Nivellierung der Polyphenolgehalte erklärt werden, die zu

einer nur gering ausgeprägten Jahrgangsdifferenzierung hinsichtlich der antioxidativen Kapazität der Weine führte.

Entgegen den bisherigen Vermutungen wurde im Versuchsjahr 1997 trotz des vorhandenen extremen Wasserstress für die Weinrebe keine verstärkte Bildung des Phytohormons IAA nachgewiesen. Die Konzentration an IAA in der Traube scheint vielmehr parallel mit der Bildung und Einlagerung anderer relevanter Inhaltsstoffe anzusteigen. Zwischen dem Gehalt an Trp und dem Gehalt an konjugierter IAA im Most wurde eine signifikante Korrelation ermittelt.

Die Korrelationen des AAP-Gehaltes der Weine aus dem Weinanbauversuch bzw. deren UTA-Intensität mit den jeweiligen IAA-Gehalten (siehe 3.3.1, Abb. 2) bzw. der antioxidativen Kapazität (siehe 3.1.3, Abb. 3) zeigten, dass eine sichere Vorhersage der UTA weder durch Analytik des Precursors IAA im Most oder Wein noch durch die Analytik der antioxidativen Kapazität des Weines möglich ist.

Insgesamt zeigen die durchgeführten Versuche, dass die Bildung und Einlagerung verschiedener Substanzen in die Beere eng mit den jeweiligen Umweltinteraktionen verbunden ist. Da eine UTA insbesondere in heißen und trockenen Jahren auftritt, scheinen dem Wasserstress und der damit verbundenen geringeren Aufnahme von Nährstoffen aus dem Boden (insbesondere Stickstoff) eine entscheidende Rolle zuzukommen. Fest steht, dass die Weinrebe auf Stresssituationen nicht mit einer verstärkten Produktion des Phytohormons IAA reagiert. Demzufolge kann aber auch die Konzentration an IAA im Most oder im Wein nicht allein entscheidend für die Ausbildung einer UTA sein. Die Weine mit einer Neigung zur UTA zeichneten sich generell durch geringe Gehalte an Trp und IAA und relativ geringe antioxidative Kapazitäten aus. Die sicherere Vorhersage einer möglichen UTA-Gefährdung ist aber weder durch die Bestimmung des Gehaltes an Precursor im Most und/oder Wein noch durch die Bestimmung der antioxidativen Kapazität möglich.

4.3.2 Einfluss kellerwirtschaftlicher Maßnahmen

In der Literatur werden signifikante Veränderungen des Stickstoffgehaltes im Verlauf der Gärung beschrieben (BERGNER und HALLER, 1969; POLO und LLAGUNO, 1974; KLUBA et al., 1978; SPONHOLZ, 1991). In Abhängigkeit vom Hefemetabolismus kann die Konzentration bestimmter Stickstoffsubstanzen dabei sowohl zu- als auch abnehmen. Die Auswirkungen verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf die Bildung von AAP im Verlauf des Weinausbaus wurden eingehend von KÖHLER et al. (1996) untersucht. Den Autoren zufolge haben weder eine Mostoxidation, die Enzymbehandlung bei Mosten, der Zusatz von Hefenährsalz (DAP) sowie Klär- und Filtrationsverfahren einen nennenswerten Einfluss auf die Ausbildung einer UTA. Die Senkung der Gärtemperatur führt zu einer Minderung der UTA-Intensität, ohne dass (insbesondere bei problematischem Ausgangsmaterial) generell unbelastete Weine erhalten werden können. Auch durch die Auswahl der Trockenhefe lässt sich die Intensität, nicht aber das Auftreten der UTA beeinflussen. Bei Versuchen von Köhler et al. (1996) schnitten Weine, die mit den Reinzuchthefen Lalvin E, Lalvin W oder Shiha 3 vergoren wurden, bei der sensorischen UTA-Bewertung besser ab, als jene, die mit Uvaferm CM bereitet wurden oder spontan vergorene Weine. In UTA-kritischen Jahren konnte jedoch mit keiner der genannten Hefen unter den gegebenen Ausgangsbedingungen ein vollkommen UTA-unbelasteter Wein bereitet werden.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen von Mosten und Weinen aus dem Weinbauversuch (siehe 3.2.2) zeigten eine signifikante Bildung von freier IAA während der Weinbereitung bei gleichzeitiger Abnahme sowohl der konjugierten IAA als auch des Trp. Da nur die freie IAA als Precursor von AAP verifiziert wurde (siehe 3.1.3), ist ihre Bildung hinsichtlich der Entstehung einer UTA von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, zu welchem Zeitpunkt der Weinbereitung eine Bildung der freien IAA erfolgt, ob durch Hydrolyse der konjugierten IAA und/oder durch den Stoffwechsel der Hefe, und in welcher Form bestimmte kellerwirtschaftliche Maßnahmen ihre Bildung beeinflussen können. Hierzu wurden die Konzentrationen von Trp, IAA und weiteren Trp-Metaboliten während der Fermentation im Gärmedium sowie nach Schwefelung und Lagerung in den jeweiligen Weinen ermittelt, wobei der Einfluss des Traubenreifegrades, der Kelterung (Most, Pressmost), einer Maischegärung, der Zugabe von Hefenährstoffen, des Hefestammes und der Gärtemperatur untersucht wurde.

Metabolismus von Trp und Bildung der Trp-Metaboliten

In allen Ansätzen erfolgte bereits zu Gärbeginn eine signifikante Abnahme des Trp-Gehaltes, welches zur Mitte der Gärung im Gärmedium nicht bzw. in nur noch sehr geringen Mengen nachweisbar war (<0.2 mg/L). In Abhängigkeit von der Gärgeschwindigkeit wurde ein Teil des Trp im Gärmedium zu MTHCC umgesetzt, welches als Nährstoffquelle für die Hefen nicht zur Verfügung steht (siehe 3.3.2). Hinsichtlich der Bedeutung des Trp für Wachstum und Vermehrung der Hefen existieren in der Literatur unterschiedliche Meinungen. Sowohl JONES und PIERCE (1964) als auch RAPP und VERSINI (1991) beschreiben Trp als eine Aminosäure, die für das Hefewachstum im Vergleich zu anderen Aminosäuren wie Glutamin, Asparagin, Serin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Arginin keine große Bedeutung hat. Jedoch werden nach BISSON (1991) Aminosäuren, die wie Trp in eher geringen Mengen im Most vorliegen, bevorzugt und bereits vor Beginn der Wachstumsphase von der Hefe adsorbiert. Für den Transport des Trp aus dem Gärmedium in das Cytosol besitzt die Hefezelle unspezifische Permeasen (General Amino acid Permease, GAP) (WALKER, 1998). Das aufgenommene Trp dient in erster Linie dem Aufbau von Biomasse (v.a. Proteine). Daneben wird es nach Desaminierung zu anderen Substanzen umgesetzt, wobei der α -Aminostickstoff des Trp für die Synthese anderer stickstoffhaltiger Verbindungen zur Verfügung steht. Gleichzeitig entstehen hierbei aus Trp verschiedene Stoffwechselprodukte wie TOH, ILA oder IAA, die bereits während der Gärung oder am Gärende in das Gärmedium desorbiert werden (siehe 3.3.2). Nicht umgesetztes Trp wird zunächst in der Vakuole der Hefezelle für weitere Stoffwechselvorgänge akkumuliert (BISSON, 1991; WALKER, 1998). Am Ende der Gärung erfolgte in allen Ansätzen eine Freisetzung von geringen Mengen an Trp (0.2-1 mg/L). Diese ist nach MONTEIRO und BISSON (1991) auf die Exkretion von Aminosäuren aus dem intrazellulären Pool der Hefezelle als Folge von intra- und extrazellulären proteolytischen Aktivitäten zurückzuführen.

Erstmals wurde in dieser Arbeit auch der Metabolismus von IAA während der Gärung und in Abhängigkeit von verschiedenen kellerwirtschaftlichen Faktoren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Hefe in der Lage ist, säureamidisch- bzw. estergebundene (NaOH hydrolysierbare) IAA zu resorbieren (siehe 3.3.2 und 3.3.3). Da ihre Konzentration im Gärmedium parallel mit der des Trp abnahm, wird vermutet, dass diese über spezielle Peptidtransportsysteme, die von BECKER und NAIDER (1980) beschrieben werden, aktiv in die Hefezelle aufgenommen wird. Den Autoren zufolge besitzt *S. cerevisiae* neben GAP

ein weiteres spezifisches Transportsystem, welches in der Lage ist Di- und Tripeptide ohne vorhergehende Hydrolyse in das Cytosol zu transportieren. Auf diese Weise ist ein Influx der meist an Aminosäuren säureamidisch gebunden vorliegenden IAA denkbar. Parallel mit der Abnahme der gebundenen IAA nahm die Konzentration an nicht gebundener IAA im Gärmedium zu und erreichte etwa zur Mitte der Gärung ihre maximale Konzentration (siehe 3.3.3, Abb. 3a). Da die Konzentration an freier und konjugierter IAA in Summe z.T. höher war als jene, die ursprünglich im Ausgangsmost vorlag, ist anzunehmen, dass eine Bildung von IAA nicht nur durch Hydrolyse der IAA-Konjugate, sondern auch durch den Stoffwechsel der Hefe erfolgt. Nach Erreichen des Maximums nahm die Konzentration an freier IAA durch enzymatische oder chemische Umsetzungen kontinuierlich bis zum Ende der Gärung wieder ab. Bei den Ansätzen der späten Lese erfolgte nach Abschluss der Gärung und Schwefelung der Weine, parallel mit der Zunahme anderer Trp-Metabolite (TOH, ILA) im Medium, ein erneuter Anstieg der Konzentration an freier und gebundener IAA (siehe 3.3.2, Abb. 8).

Einfluss verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen

Die Aufnahme und der Metabolismus von Aminosäuren und anderen Stickstoffsubstanzen während der Gärung wird nach ANCIN et al. (1996) vom Hefestamm, den physiologischen Bedingungen sowie den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Gärmediums beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass der Metabolismus von Trp und die Bildung von IAA vor allem vom *Reifegrad* der verwendeten Trauben abhängig ist. Bei der Verwendung von früh gelesenen Lesegut erfolgt eine intensivere Bildung und Freisetzung von IAA als Stoffwechselprodukt des Hefemetabolismus zu Beginn der Gärung als bei den Ansätzen der späten Lese (siehe 3.3.2, Abb. 8). In den Ansätzen der späten Lese war zudem auch eine signifikante Bildung von ILA nachweisbar, die in den Ansätzen der frühen Lese nicht oder nur in geringen Mengen zu erkennen war. TOH, das Hauptabbauprodukt der oxidativen Desaminierung (Ehrlich-Abbauweg) wurde in den Gärmedien der späten Lesen zeitlich verzögert und im Verhältnis zur Trp-Ausgangskonzentration in geringeren Mengen als in den Ansätzen der frühen Lese gebildet (siehe 3.3.2, Abb. 5).

Einen entscheidenden Einfluss auf den Trp-Metabolismus der Hefe hat zudem die *Gärtemperatur*. Eine Erhöhung der Temperatur um 10 °C führt zu einer Erhöhung der Gärgeschwindigkeit und zu einer stärkeren Bildung und Freisetzung sowohl von TOH als

auch von IAA (siehe 3.3.2, Abb. 1, 5, 8). Es wird angenommen, dass hohe Temperaturen einen Katabolismus von Trp durch Desaminierung begünstigen.

Als eine weitere wichtige Erkenntnis kann die Tatsache gesehen werden, dass der aus der Verarbeitung von früh gelesenen Trauben resultierende Trp-Metabolismus durch einen *Zusatz von DAP* zum Most nicht signifikant beeinflusst werden kann. Demnach scheint ein durch fehlende Reife bedingter Nährstoffmangel, allein durch die Zugabe von Stickstoff in Form von Ammoniumsalzen nicht behebbar zu sein. Durch Zugabe von Fermaid[®], welches neben Aminosäuren auch Vitamine, Sterole und Fettsäuren enthält, wird dagegen ein Anstieg der Gärgeschwindigkeit und eine Verringerung der Menge an gebildeter und ins Gärmedium freigesetzter IAA erreicht (siehe 3.3.2). Zu entsprechenden Ergebnissen kamen auch MONTEIRO und BISSON (1991). In ihrer Arbeit untersuchten sie den Einfluss eines Zusatzes verschiedener Nährstoffquellen zum Most und stellten fest, dass ein Zusatz von Ammonium allein oder ein Zusatz eines Nährmediums, welches verschiedene essentielle Salze, Mineralien und Vitamine aber kein Ammonium enthält, keinen Einfluss auf die Gärdauer hat. Eine deutliche Steigerung der Fermentationsrate erreichten sie dagegen durch die kombinierte Zugabe von Ammonium und dem Nährmedium. Den Autoren zufolge kann aus der Behebung eines bestimmten Nährstoffmangels gleichzeitig ein neuer Mangel resultieren. Die Zugabe von Ammonium führt zu einer Stimulierung der Zellvermehrung, die wiederum einen erhöhten Bedarf an Mineralstoffen und Vitaminen zur Folge hat. Kann dieser erhöhte Bedarf durch die Inhaltsstoffe des Gärmediums nicht gedeckt werden, entstehen erneut Stresssituationen für die Hefe, die zu Gärstörungen führen können.

Fermentationen mit unterschiedlichem Ausgangssubstrat (Most, Pressmost, Maische) zeigten, dass die *Zusammensetzung des Gärmediums* einen entscheidenden Einfluss auf den Gärverlauf und den Trp-Metabolismus hat. Es scheint, dass bei einer dem Prinzip der Rotweinbereitung entsprechenden Maischegärung ein durch eine frühe Lese bedingter Nährstoffmangel ausgeglichen wird. Die Maischegärung von früh gelesenen Trauben zeigte hinsichtlich der Bildung und Freisetzung von IAA einen ähnlichen Gärverlauf wie bei der „normalen“ Gärung von spät gelesenen Trauben (siehe 3.3.2, Abb. 8). In der Literatur wird eine Stimulierung der Fermentation durch feste Partikel aus dem Traubengewebe beschrieben, die zudem auch einen Einfluss auf den Stickstoffmetabolismus haben können (SIEBERT et al., 1986; ANCIN et al., 1996). Erklärt wird diese Stimulierung mit einer zusätzlichen Versorgung der Hefen durch Nährstoffe

(Stickstoffsubstanzen, Lipide, Spurenelemente) aus den suspendierten festen Traubenbestandteilen. So sind in der Schale und in den Kernen nicht nur der größte Teil der in der Traube enthaltenen Polyphenole sondern auch etwa 80% des Gesamtstickstoffs lokalisiert. Dies würde erklären, warum bei Rotweinen sowie bei Weißweinen aus einer Maischegärung und bei stark gepressten Mosten bisher noch keine UTA nachgewiesen werden konnte (KÖHLER et al., 1996; CHRISTOPH et al., 1998).

Die von ANCIN et al. (1996) beschriebene Abhängigkeit des Stickstoffmetabolismus vom *Hefestamm* wird durch Ergebnisse der Gärversuche mit Wildhefen (*K. apiculata*, *M. pulcherrima*) bestätigt. Bei der Fermentation der frühen Lese mit Wildhefen wurde eine signifikant geringere Abnahme der Konzentration an konjugierter IAA im Gärmedium bei gleichzeitig höheren Bildungsraten von freier IAA beobachtet. Dies führte zwischenzeitlich zu auffällig hohen Konzentrationen an IAA (freie und konjugierte IAA in Summe) in den entsprechenden Ansätzen. HÜHN et al. (1996) beschreiben eine stärkere Bildung von AAP bei der Fermentation von Mosten mit Reinkulturen von *K. apiculata* und *M. pulcherrima* insbesondere in solchen Ansätzen, die einen Mangel an essentiellen Hefenährstoffen aufwiesen. Diese Beobachtung kann im Zusammenhang mit den nur in den Ansätzen der frühen Lesen analysierten auffallend hohen Gehalten an freier IAA stehen.

Die Gehalte an freier IAA vor und nach der Schwefelung sowie der Gehalt an AAP entsprechender Weine nach einer 10-monatigen Lagerung und anschließender Stressbehandlung (72 h bei 40 °C) korrelierten signifikant, wobei 50 bzw. 30% der Varianz der AAP-Gehalte auf den Precursorgehalt vor bzw. nach der Schwefelung zurückgeführt werden konnten (siehe 3.3.2).

Im Verlauf der dreimonatigen Lagerung der Weine fanden eine Reihe weiterer Umsetzungen statt, die zu signifikanten Veränderungen der Konzentrationen einzelner Trp-Metabolite führten. In den Ansätzen der frühen Lese wurde eine signifikante Abnahme der Konzentration an freier IAA analysiert, während sich konjugierte IAA als relativ stabil erwies. Dabei korrelierte der jeweilige Gehalt an IAA nach Lagerung nicht mit dem direkt am Ende der Gärung bzw. direkt nach Schwefelung gemessenem Gehalt. Es wird vermutet, dass die Abnahme der freien IAA z.T. aus der oxidativen Umsetzung mit Sauerstoffradikalen resultiert, die infolge der Schwefelung des Weines entstehen. Da diese Umsetzungen hauptsächlich in den Ansätzen der frühen Lese erfolgten, zeichneten sich diese Weine durch geringere Mengen an IAA als jene der späten Lese aus. Dies steht im

Einklang mit den Ergebnissen des Weinbauversuches (siehe 4.3.1). Demnach lässt aber auch eine Analyse des IAA-Gehaltes in Weinen keinen Rückschluss auf die eigentliche Konzentration an Precursor zum Zeitpunkt der Schwefelung zu. Da aber nach den Ergebnissen dieses Versuches auch die Menge an gebundener IAA im Most nicht mit dem Gehalt an Precursor zum Zeitpunkt der Schwefelung korreliert (höhere Mengen an freier IAA trotz geringerer Ausgangskonzentration an gebundener IAA), erlaubt weder die Kenntnis des IAA-Gehaltes im Most noch die im Wein einen Rückschluss auf die eigentliche Konzentration an Precursor zum Zeitpunkt der Schwefelung. Diese scheint vielmehr von mehreren Faktoren abhängig zu sein, von denen an dieser Stelle die Gärtemperatur, der verwendete Hefestamm sowie die Versorgung des Ausgangssubstrates mit essentiellen Hefenährstoffen genannt werden können.

Aufgrund des aus dem Kellerversuch geschlossenen Fazits müssen auch die Ergebnisse des Weinbauversuches unter einem neuen Gesichtspunkt betrachtet werden. Die Weine waren bereits geschwefelt und über einen Zeitraum von ein bis vier Jahren gelagert. Es ist davon auszugehen, dass in dieser Zeit in Abhängigkeit von der antioxidativen Kapazität der Weine (welche bei jenen der frühen Lese geringer ist als bei denen aus später Lese), ein oxidativer Abbau der IAA erfolgte. Die bei diesem Versuch gemessenen IAA-Gehalte lassen demnach keinen Rückschluss auf die tatsächlich zum Zeitpunkt der Schwefelung vorliegende Konzentration an Precursor zu. Trotz der geringeren Konzentrationen an gebundener IAA im Most bzw. an freier IAA in den Weinen der frühen Lese, kann aufgrund der Ergebnisse dieses Kellerversuches davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Schwefelung höhere Mengen an Precursor vorlagen. In Verbindung mit einer geringeren Aromafülle können hieraus die im allgemeinen höheren UTA-Bewertungen solcher Weine resultieren.

4.4 Fazit: Ursachen der Entstehung einer UTA

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben verdeutlicht, dass bei der UTA-Problematik mehrere Faktoren eine Rolle spielen. Als wesentliche Ursache kann in Übereinstimmung mit den Arbeiten anderer Autoren ein Stickstoffmangel angesehen werden (RAPP und VERSINI, 1995; LÖHNERTZ, 1996; HÜHN et al. 1997; MÜLLER et al., 1998). Neben der Verfügbarkeit von Stickstoffverbindungen scheint aber auch eine ausreichende Versorgung des Mostes mit anderen essentiellen Hefenährstoffen wie Mineralstoffen, Fettsäuren, Sterole, Vitamine und Spurenelemente eine wichtige Rolle zu spielen.

Im Most vorhandene Zucker und Aminosäuren ermöglichen gemeinsam mit Vitaminen und Mineralstoffen die Vermehrung der Hefen. Je besser die Versorgung an hefeverwertbarem Stickstoff, desto höhere Hefezellzahlen werden während der Gärung erreicht. Steht zu wenig organischer Stickstoff zur Verfügung, ist die Hefe nicht mehr in der Lage, Stoffwechsel und Vermehrung entsprechend aufrecht zu erhalten. Die Lebendzellzahl im Gärmedium sinkt durch eintretende Autolyse. Es kommt zu einer schleppenden Gärung bis hin zum Gärstopp. Daneben werden verstärkt Sekundärprodukte gebildet, die verschiedene Fehlpararomen im Wein hervorrufen können. Nach BRUNOLD et al. (1996) kann sich bei Mikroorganismen ein durch Nährstoffmangel oder Nährstoffkonkurrenz ausgelöster Stress wachstums- und vermehrungsstörend auswirken, womit in der Regel auch eine Produktion von unerwünschten Substanzen und eine negative Beeinflussung des Weinaromas verbunden ist.

Der Gehalt an Stickstoffverbindungen im Most schwankt normalerweise zwischen 60 und 2400 mg/L, wobei etwa 60 bis 90% in Form von Aminosäuren vorliegen. Das Aminosäuremuster ist abhängig von der Rebsorte, dem Rebschnitt, der Bepflanzungsdichte, der Art und Menge der Düngung, der Zusammensetzung des Bodens, der Traubenreife, dem Grad an *Botrytis cinerea* Befall, der Erntemethode und den klimatischen Verhältnissen (RAPP und VERSINI, 1991). Die Weinrebe nimmt den für ihr Wachstum und verschiedene Stoffwechselprozesse benötigten Stickstoff hauptsächlich als Nitrat aus dem Boden auf. Dieses wird anschließend zu Ammonium reduziert und dient als solches der Synthese zahlreicher stickstoffhaltiger Substanzen. Zu Beginn der Traubenreife erfolgt eine verstärkte Einlagerung von stickstoffhaltigen Substanzen in die Traube. Dabei kann die Stickstoffversorgung des Bodens die Qualität der Trauben stark beeinflussen. Der Stickstoffgehalt des Bodens ist abhängig von der Mineralisation der organischen Materie, der Stickstofffixierung durch Bakterien sowie der Einbringung von stickstoffhaltigen

Substanzen durch Niederschlag und Düngung. Da bei einer unzureichenden Wasserversorgung der Reben die Aufnahme von Nährstoffen durch die Wurzel erschwert ist, können längerandauernde Trockenphasen während der Sommermonate zu einer Aufnahmeverzögerung von Stickstoff und damit zu einer Stagnation der Aminosäurebildung führen. Daher kommt insbesondere der Niederschlagsmenge während der Vegetationsperiode eine große Bedeutung in der Einlagerung von Stickstoffverbindungen und anderen Inhaltsstoffen in die Traube zu.

In trockenen Jahren muss versucht werden, einen Nährstoffmangel durch eine Bewässerung (z.B. Tropfberieselung) und eine späte Lese abzuwenden. Eine intensive Dauerbegrünung der Rebassen kann durch Entzug von Nährstoffen insbesondere in niederschlagsarmen Jahren zu einem Nährstoffmangel führen, während in niederschlagsreichen Jahren eine Begrünung der Auswaschung von Nährstoffen entgegenwirkt. Zweckmäßig wäre daher eine Winterbegrünung, um in den niederschlagsreichen Wintermonaten Bodenerosionen und Auswaschungen zu verhindern. Beim späteren Einpflügen können zusätzlich humusbildende oder stickstoffliefernde Substanzen (Gründüngung) in den Boden eingebracht werden. Auch durch einen kontrollierten Anschnitt der Reben kann insbesondere bei schlechten Witterungseinflüssen einem Nährstoffmangel vorgebeugt werden. Vor allem aber führt eine Lese bei Vollreife zu höheren Stickstoffgehalten im Most und zu höheren antioxidativen Kapazitäten im Wein, so dass insbesondere in trockenen Jahren die Gefahr einer UTA verringert wird. Fehler, die bei der Lese begangen werden, haften dem Wein während seiner ganzen Entwicklung an und können durch kellertechnische Maßnahmen nur bedingt ausgeglichen werden.

Neben den weinbaulichen Faktoren haben aber auch kellerwirtschaftliche Maßnahmen einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung einer UTA. Zwar lässt sich im Keller der aus einer frühen Lese resultierende Nährstoffmangel allein durch die Zugabe von Ammoniumsalzen zum Most nicht mehr beheben, doch kann die Bildung und Freisetzung des AAP-Precursors IAA während der Gärung durch kontrollierte Temperaturen und durch den Einsatz von Reinzuchthefen vermindert werden.

Insgesamt scheinen hinsichtlich der UTA-Problematik die in Abb. 5 dargestellten Faktoren von entscheidender Bedeutung zu sein.

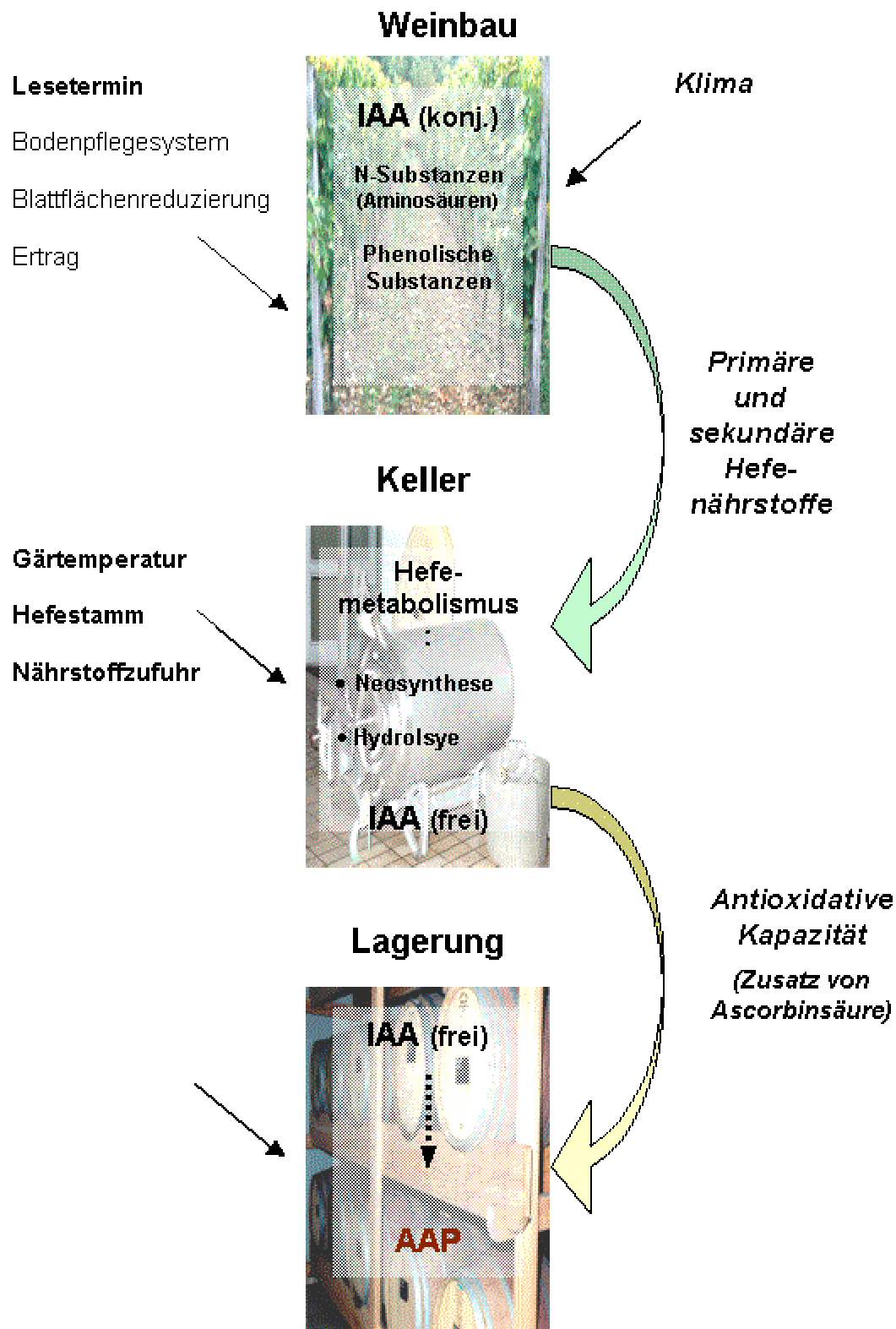


Abb. 5: Einflussfaktoren für die Entstehung einer UTA im Wein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Seit 1988 treten in Deutschland vermehrt Fehltonen bei Weißweinen verschiedener Anbaugebiete auf, die unter der Bezeichnung „Untypische Alterungsnote“ (UTA) zusammengefasst werden. Als Ursache für die Entstehung einer UTA werden Stresssituationen im Weinbau, hervorgerufen durch Wasser- und Stickstoffmangel, diskutiert. Als Einflussfaktoren werden neben den klimatischen Verhältnissen vor allem das Bodenpflegesystem, die Ertragshöhe und der Erntetermin genannt. Die Ausbildung dieser negativen Aromaveränderung wird im Zusammenhang mit der Substanz 2-Aminoacetophenon (AAP) beschrieben, dessen Bildung aus Tryptophan (Trp) oder dessen Metaboliten Kynurenin (Kyn) und Indolessigsäure (IAA) diskutiert wird.

Zur Aufklärung der Ursachen für die Ausbildung einer UTA wurde in dieser Arbeit der Bildungsmechanismus von AAP untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bildung von AAP durch eine radikalische Oxidation der IAA, initiiert durch Superoxidradikale erfolgt. Superoxidradikale entstehen durch die Reaktion von Schwefeldioxid mit Sauerstoff während der Schwefelung des Weines. Bei dieser radikalischen Oxidation wird der Pyrrolring der IAA gespalten. Als Intermediärprodukte wurden nach Synthese der jeweiligen Referenzsubstanzen 3-(2-Formylaminophenyl)-3-oxopropionsäure (FAPOP) und *N*-Formylaminoacetophenon (FAP) identifiziert. Außerdem wurden (2-Oxo-2,3-dihydroindol)-3-essigsäure (OxIAA), (3-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydroindol)-3-essigsäure (DiOxIAA), (2-Sulfoindol)-3-essigsäure (IAA-HSO₃) und Indol-3-aldehyd (IAld) als weitere Abbauprodukte der IAA nachgewiesen. Für diese Substanzen konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich nicht um Precursoren von AAP handelt.

Mit der Kenntnis des Bildungsweges von AAP wurde die Möglichkeit der Vorhersage einer UTA in Mosten und Weinen überprüft. Zum einen wurde eine einfache und selektive Methode zur Bestimmung von IAA, Trp und weiteren möglicherweise relevanten Trp-Metaboliten entwickelt. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte nach Festphasenextraktion an einem Anionenaustauscher mittels RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion. Die in Mosten hauptsächlich an Aminosäuren oder an Zucker gebunden vorliegende IAA konnte nach alkalischer Hydrolyse ebenfalls mit dieser Technik erfasst werden. Zum anderen wurden verschiedene Verfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Weinen validiert. Neben einer Methode, die allgemein die Fähigkeit misst,

freie Radikale abzufangen, wurden zwei weitere sehr spezifische Verfahren entwickelt, mit denen speziell die Fähigkeit ermittelt werden kann, Superoxidradikale abzufangen. Mit Hilfe dieser Verfahren wurde der Einfluss verschiedener weinbaulicher und kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf die Konzentration an Trp, IAA und anderen ausgesuchten Trp-Metaboliten in Mosten und Weinen und der Einfluss weinbaulicher Maßnahmen auf die antioxidative Kapazität des Weines untersucht.

Die Untersuchung von Mosten und Weinen aus einem vierjährigen Weinbauversuch (1996-1999) zeigte vor allem einen Einfluss der klimatischen Verhältnisse auf die verschiedenen Weininhaltsstoffe. So wiesen Moste und Weine in niederschlagsreichen Jahren signifikant höhere Mengen an IAA, Trp und Trp-Metaboliten auf. Innerhalb eines Jahres wurden die jeweiligen Gehalte sowie die antioxidative Kapazität des Weines insbesondere durch den Lesetermin beeinflusst. Mit steigendem Reifegrad wurde ein Anstieg der Konzentrationen an IAA, Trp und Trp-Metaboliten sowie der antioxidativen Kapazität ermittelt. Eine intensive Dauerbegrünung in trockenen Jahren und eine Reduzierung der Blattfläche führten zu geringeren Gehalten an Trp und IAA. Eine Erhöhung des Anschnittes von 10 auf 20 Augen pro Stock hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss. Zwischen dem Gehalt an IAA im Most oder Wein und der UTA-Sensorik bzw. dem AAP-Gehalt im Wein konnte kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden. Gleiches gilt für die antioxidative Kapazität eines Weines. Daher war eine Einschätzung des UTA-Potentials von Weinen weder durch die Bestimmung des Gehaltes an Precursor im Most oder Wein noch durch die Bestimmung der antioxidativen Kapazität des Weines möglich.

Der Reifegrad der Trauben hatte nicht nur einen Einfluss auf die stoffliche Zusammensetzung des Mostes bzw. Weines sondern auch auf den Gärverlauf selbst und die während der Gärung gebildeten Mengen an IAA. So wurden während der Fermentation von früh gelesenen Trauben signifikant höhere Mengen an IAA durch die Hefen gebildet und ins Gärmedium freigesetzt als bei den spät gelesenen Trauben. Während der Lagerung der entsprechenden Weine nahm hingegen die Konzentration an IAA in den Weinen aus früher Lese signifikant stärker ab als in jenen aus später Lese. Der Gehalt an freier IAA vor und nach der Schwefelung sowie der Gehalt an AAP nach Stressbehandlung der entsprechenden Weine korrelierten jedoch signifikant, wobei 50 bzw. 30% der Varianz der AAP-Gehalte auf den Gehalt an Precursor vor bzw. nach der Schwefelung zurückgeführt werden konnte.

Die Gehalte des Precursors IAA waren neben dem Reifegrad auch abhängig von der Art des Ausgangssubstrates (normal gepresster Most, Pressmost, Maische), der Gärtemperatur und dem Hefestamm. Hohe Gärtemperaturen und Wildhefen führten zu signifikant höheren Konzentrationen an IAA im Gärmedium.

Insgesamt weisen die verschiedenen Untersuchungen dieser Arbeit hinsichtlich der Entstehung einer UTA auf eine signifikante Rolle der Versorgung des Mostes mit essentiellen Hefenährstoffen (Stickstoffsubstanzen, Vitamine, Mineralstoffe, Lipide, etc.). Allerdings scheinen auch andere bisher nicht bekannte Faktoren die Bildung einer UTA im Wein zu beeinflussen. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass teilweise auch Weine sensorisch mit UTA angesprochen werden, obwohl keine bzw. keine sensorisch relevanten AAP-Gehalte nachweisbar sind. Inwieweit andere Verbindungen für die Fehlnote UTA verantwortlich sein können, muss daher durch weitere sensorische und analytische Untersuchungen geklärt werden.

SUMMARY

Since 1989 an off-flavor has been frequently reported in white wines of different wine growing regions in Germany. This off-flavor is called ‘untypical aging off-flavor’ (UTA). As main causes of UTA-formation, particularly dry-stress for the vines caused by low rainfall or intensive solar radiation and nutrient deficiencies are supposed. Additionally, high yield and an early grape vintage seem to be related to the occurrence of UTA. 2-Aminoacetophenone (AAP) was regarded to be the aroma impact compound, since its amount could be significantly correlated with the UTA-intensity. Tryptophan (Trp) and its metabolites kynurenine (Kyn) and indole-3-acetic acid (IAA) are considered as potential precursors of AAP.

In the present thesis potential intermediates were synthesized in order to elucidate the mechanism of AAP-formation. It could be shown, that a significant AAP-formation occurred after reaction of IAA with superoxide radicals. These radicals were formed by reaction of sulfurous acid with residual oxygen during sulfuration of the wine. Hereby, a pyrrole ring cleavage of IAA occurred. As intermediate products 3-(2-formylamino-phenyl)-3-oxopropionic acid (FAPOP) and *N*-formylaminoacetophenone (FAP) could be identified after syntheses of the respective reference substances. Furthermore the formation of the IAA degradation compounds (2-oxo-2,3-dihydroindole)-3-acetic acid (OxIAA), (3-hydroxy-2-oxo-2,3-dihydroindole)-3-acetic acid (DiOxIAA), (2-sulfoindole)-3-acetic acid (IAA-HSO₃) and indole-3-aldehyde (IAld) could be observed. However, these substances could not be elucidated as precursors of AAP.

With the knowledge of AAP-formation the possibility of a prediction of the UTA-developing potency was examined. For this, a simple and selective method for the determination of IAA, Trp and other different Trp-metabolites was developed. The identification and quantification was achieved after solid phase extraction with an anion exchange material followed by RP-HPLC with fluorescence detection. In grape must IAA is mainly bound to sugar or amino acid moieties. The determination of this bound IAA was possible after alkaline hydrolysis. Moreover, two different techniques for the determination of the antioxidative capacity of wines have been validated: the measurement of the total antioxidative status (TAS) and the measurement of the superoxide scavenger activity. While the measurement of TAS describes a general ability to scavenge free radicals

unspecific towards the reacting radical species, the superoxide scavenger activity describes specifically the ability to scavenge superoxide radicals.

The influence of different viticultural and cellar measures was investigated by determination of Trp, IAA, and different Trp-metabolites in grape musts and in wines as well as by determination of the antioxidative capacity of the wines. During a four year wine growing trial, a significant influence of the climate on the amount of several wine components could be shown. Grape musts and wines of rainy years contained significantly higher amounts of IAA, Trp, and Trp-metabolites. Within a vintage especially the time of harvest exhibited a significant effect. With the stage of maturity the amounts of IAA, Trp, and Trp-metabolites, as well as the antioxidative capacity increased. A permanent green cover crop in years with a low rainfall and a reduction of the leaf area lead to a decrease of the amounts of Trp and IAA. On the other hand, a reduction of the vine prune from 20 to 10 buds per vine had no significant effect.

In addition, the ripeness of the grapes significantly affected the course of fermentation and the amount of IAA formed by yeast metabolism. The use of unripe grapes lead to higher amounts of IAA during fermentation. The concentration of IAA decreased rapidly during storage of the respective wines, probably as a result of oxidation, while IAA in the wines from late harvested grapes was relatively stable. The amount of unbound IAA prior to and after sulphuration and the AAP concentration after heat treatment correlated significantly, indicating that about 30-50% of the variance of the AAP values might be traced back to the amount of its precursor. Besides the grade of ripeness the kind of must preparation (free-run juice, pressure extract, mash), the fermentation temperature, and the yeast strain (commercial, wild yeast strain) had a significant effect. High fermentation temperatures and wild yeast strains favored the neosynthesis of IAA and lead to higher IAA-concentrations in the fermentation medium.

Altogether, the examinations done show that the nutrient supply of the grape must (e.g. nitrogen substances, vitamins, mineral substances, lipids) plays a significant role in the formation of UTA. However, it seems that also other factors than the amount of the precursor IAA contribute to the formation of AAP, factors which are still unknown. Additionally, skilled sensory panels judged wines with high intensities of UTA descriptors which did not contain sensory relevant amounts of AAP. This indicates that other odorous compounds might also contribute to UTA, which have to be identified by sensory and analytical investigations in future.

6 LITERATUR

ACREE, T. E., LAVIN, E. H., NISHIDA, R., WATANABE, S. *o*-Aminoacetophenone, the “foxy” smelling component of *Labruscana* grapes. In *Flavor Science and Technology*; Bessière, Y., Thomas, A. F., Eds.; Wiley, Chichester, UK; 1990; pp 49-52.

ANCIN, C., AYESTARAN, B., GARRIDO, J. Clarification by vacuum filtration of Grenache must. Utilization of free amino acids during fermentation and bottle-aging of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47*, 313-322.

ARNOLD, R. G., LINDSAY, R. C. Quantitative Determination of *N*-Methylketones and *o*-Aminoacetophenone in Sterilized Concentrated Milk. *J. Dairy Sci.* **1969**, *7*, 1097-1100.

ARUOMA, O. I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods Enzymol.* **1994**, *233*, 57-66.

BADENOCH-JONES, J., SUMMONS, R. E., ENTSCH, B., ROLFE, B. G., PARKER, C. W., LETHAM, D. S. Mass spectrometric identification of indole compounds produced by *Rhizobium* strains. *Biomed. Mass. Spectrometry* **1982**, *9*, 430-436.

BADERSCHNEIDER, B., LUTHRIA, D., WATERHOUSE, A. L., WINTERHALTER, P. Antioxidants in white wine (cv. Riesling): I. Comparison of different testing methods for antioxidant activity. *Vitis* **1999**, *38*, 127-131.

BALOGH-HERGOVICH, É.; SPEIER, G. Ring cleavage and ring expansion of indoles by superoxide ion. *Tetrahedron Letters* **1982**, *23*, 4473-4476.

BANDURSKI, R. S., SCHULZE, A. Concentration of indole-3-acetic acid and its Derivates in Plants. *Plant Physiol.* **1977**, *60*, 211-213.

BANDURSKI, R. S., SCHULZE, A., REINICKE, D. M. Biosynthetic and metabolic aspects of auxins. In *Plant Growth Substances 1985*; Bopp, M., Ed.; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo; 1986; pp 83-91.

BECKER, J. M., NAIDER, F. Transport und Utilization of peptides by yeast. In *Microorganisms and Nitrogen Sources*; Payne, J.W. (Ed.); 1980; pp 257-379.

BERGNER, K. G., HALLER, H. E. Das Verhalten der freien Aminosäuren von Weißwein im Verlauf der Gärung bei Ausbau, Lagerung und Umgärung. *Mitt. Klosterneuburg* **1969**, *19*, 264-288.

- BIALEK, K., COHEN, J. D. Quantification of Indoleacetic Acid Conjugates in Bean Seeds by Direct Tissue Hydrolysis. *Plant Physiol.* **1989**, 90, 398-400.
- BISSON, L. F. Influences of Nitrogen on Yeast and Fermentation of Grapes, In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, Rautz, J. M., Ed.; Seattle, WA, USA; 18-19 June 1991; pp 78-89.
- BÖHM, V., SCHLESIER, K., HARWAT, M., BITSCH, R. Comparison of different in vitro methods to evaluate the antioxidant activity with ascorbic acid, gallic acid, trolox and uric acid as standard antioxidants. In *Biologically-active phytochemicals in food. Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function*, Pfannhauser, W., Fenwick, G. R., Khokhar, S., Eds.; Norwich, UK; 2001; pp 296-299.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1995**, 28, 25-30.
- BRUNHOLD, C., RÜEGSEGG, A., BRÄNDLE, R. *Stress bei Pflanzen*. UTB-Verlag, Bern, 1996.
- BUTTERY, R. G., LING, L. C. Volatile flavor components of corn tortillas and related products. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1878-1882.
- CHRISTOPH, N., BAUER-CHRISTOPH, C., GEBNER, M., KÖHLER, H. J. Die „Untypische Alterungsnote im Wein“, Teil I: Untersuchungen zum Auftreten und zur sensorischen Charakterisierung der „Untypischen Alterungsnote“. *Rebe Wein* **1995**, 48, 350-356.
- CHRISTOPH, N., BAUER-CHRISTOPH, C., GEBNER, M., KÖHLER, H. J. Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil VI: Untersuchungen zur Bildung von o-Aminoacetophenon aus Produkten des Tryptophan-Stoffwechsels vor der alkoholischen Gärung. *Rebe Wein* **1996**, 49, 246-250.
- CHRISTOPH, N., BAUER-CHRISTOPH, C., GEBNER, M., KÖHLER, H. J., SIMAT, T. J., HOENICKE, K. Bildung von Komponenten der „Untypischen Alterungsnote“ durch Einwirkung von schwefeliger Säure auf Indol-3-essigsäure und andere Tryptophanstoffwechselprodukte im Wein. *Vitic. Enol. Sci.* **1998**, 53, 79-86.
- CLARK, A. G. Indole acetic acid production by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Microbios* **1974**, 11, 29-35.
- COHEN, J. D., BANDURSKI, R. S. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1982**, 33, 403-430.

- CORINO, L., GAMBINO, E., DI STEFANO, R., PIGELLA, P. Soil management and rootstock effects on grape yield and quality in the wine-growing region of northwestern Italy. *Rivista Vitic. Enol.* **1999**, 52, 3-32.
- COX, C. D., PARKER, J. Use of 2-Aminoacetophenone production in Identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **1979**, 9, 479-484.
- DEVRIES, J. W., KOSKI, C.M., EGBERG, D. C., LARSON, P. A comparison between a spectrometric and a high-pressure liquid chromatography method for determining tryptophan in food products. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, 28, 896-898.
- DOLLMANN, B., WICHMANN, D., SCHMITT, A., KOEHLER, H. J., SCHREIER, P. Formation of the „untypical aging off-flavour“ in wine: Generation of 2-aminoacetophenone in model studies with *Saccharomyces cerevisiae*. *Viticult. Enol. Sci.* **1996**, 51, 122-125.
- DOLLMANN, B., RICHLING, E., HERDERICH, M., KÖHLER, H. J., SCHWAB, A., SCHMITT, A., SCHREIER, P. High performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS) for the quantification of L-kynurenine and indole-3-acetic acid in grape must by isotope dilution assay. *Vitis* **1997**, 36, 97-101.
- EHRlich, F. Über Tryptophol (β -Indolyläthylalkohol), ein neues Gärprodukt der Hefe aus Aminosäure. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1912**, 45, 883.
- FLANCY, D., POUX, C. Notes sur la teneur en acides aminés du moût de raisin et du vin function de conditions de l'année. *Ann. Technol. Agric.* **1965**, 14, 87-88.
- FOGLIANO, V., VERDE, V., RANDAZZO, G., RITIENI, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1035-1040.
- FRANKEL, E. N., GERMAN, J. B., DAVIES, P. A. Headspace gas chromatography to determine human low-density-lipoprotein oxidation. *Lipids* **1992**, 27, 1047-1051.
- FRYDMAN, R. B., TOMARO, M. L., FRYDMAN, B. Pyrroloxigenases: biosynthesis of 2-Aminoacetophenone. *FEBS Letters* **1971**, 17, 273-276.
- GARCIA, S. E., BAXTER, J. H. Determination of Tryptophan Content in Infant Formulas and Medical Nutritionals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **1992**, 75, 1112-1119.
- GEBNER, M., KÖHLER, H. J., CHRISTOPH, N., BAUER-CHRISTOPH, C. Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil VII: Untersuchungen zur Bildung von o-Aminoacetophenon

aus Produkten des Tryptophan-Stoffwechsels bei der alkoholischen Gärung. *Rebe Wein* **1996**, 49, 251-255.

GEBNER, M., KÖHLER, H. J., CHRISTOPH, N., BAUER-CHRISTOPH, C., MILTENBERGER, R., SCHMITT, A. Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil II: Beschreibende Verkostung von UTA-Weinen; Beziehungen zwischen Sensorik und chemisch-physikalischen Analysenwerten. *Rebe Wein* **1995**, 48, 388-394.

GEBNER, M., KÖHLER, H. J., CHRISTOPH, N. Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil VIII: Auswirkung von Inhaltsstoffen und Antioxidantien auf die Bildung von *o*-Aminoacetophenon. *Rebe Wein* **1999**, 52, 264-267.

GEBNER, M., KÖHLER, H. J., CHRISTOPH, N. Ascorbinsäure kann bei UTA helfen. *Badische Winzer* **2000**, 25, 36-40.

GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E., FERRO-LUZZI, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biol. Med.* **1995**, 18, 29-36.

GIBSON, R. A., SCHNEIDER, E. A. WIGHTMAN, F. Biosynthesis and metabolism of indole-3-yl-acetic acid. II. *In vivo* experiments with ¹⁴C-labelled precursor of IAA in tomato and barley shoots. *J. Experimental Botany* **1972**, 23, 381-399.

GORDON, S. A. Occurrence, formation and inactivation of auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1954**, 5, 341-378.

HATANO, T., YASHUHARA, T., YOSHIHARA, R., AGATA, I., NORO, T., OKUDA, T. Effects of Interaction of Tannins with Co-existing Substances. VII. Inhibitory Effects of Tannins and Related Polyphenols on Xanthin Oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, 38, 1224-1229.

HINMAN, R. L., BAUMAN, C. P. Reactions of 3-Bromooxindoles. The Synthesis of 3-Methylenoxindole. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2431-2437.

HINMAN, R. L., LANG, J. Peroxidase-catalyzed Oxidation of Indole-3-acetic Acid. *Biochem.* **1965**, 4, 144-158.

HORNG, A. J., YANG, S. F. Aerobic oxidation of indole-3-acetic acid with bisulfite. *Phytochem.* **1975**, 14, 1425-1428.

HÜHN, T., SPONHOLZ, W. R., BOTTERO, S., KALLINIKIDOU, E. The Influence of Yeast Strains on Hybrid Aroma. *Vitic. Enol. Sci.* **1996**, 51, 159-168.

- HÜHN, T., SPONHOLZ, W. R., GAFNER, J. Einflußfaktoren der vorzeitigen und untypischen Weinalterung. *Schweizer Z. Obst Weinbau* **1997**, 133, 636-638.
- ILIC, N., NORMANLY, J., COHEN, J. D. Quantification of Free Plus Conjugated Indoleacetic Acid in *Arabidopsis* Requires Correction for the Nonenzymatic Conversion of Indolic Nitriles. *Plant Physiol.* **1996**, 111, 781-788.
- JAWANDA, J. S., SINGH, R., PAL, R. N. Effect of growth regulators on floral bud drop, fruit characters and quality of Thompson seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* **1974**, 13, 215-221.
- JONES, M., PIERCE, J. S. Adsorption of amino acids from wort by yeasts. *J. Instit. Brew.* **1964**, 70, 307-315.
- KASEDA, H., NOGUCHI, T., KIDO, R. Biosynthetic routes to 2-aminoacetophenone and 2-amino-3-hydroxyacetophenone. *J. Biochem.* **1973**, 74, 127-133.
- KELL, G., STEINHART, H. Oxidation of Tryptophan by H₂O₂ in Model Systems. *J. Food Sci.* **1990**, 55, 1120-1132.
- KETTERN, W. Muß es Schwefel sein? *Getränkeindustrie* **1991**, 9, 720-725.
- KISLIN, E. N., KEFELI, V. I. Indole-3-essigsäure und Abscisinsäure in Rebtrieben. Quantitative Analyse. *Fiziol. Rast. (Moskau)* **1981**, 28, 156-162.
- KLUBA, R. M., MATTICK, L. R., HACKLER, L. R. Changes in the concentration of free and total amino acids of several native American grape cultivars during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **1978**, 29, 181-186.
- KOCHEN, W., BYRD, D. J., BÜHNER, R., BÜHRLIN, E., Tryptophan-Stoffwechseluntersuchungen bei unbehandelten Phenylketonurikern, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **1975**, 13, 1-12.
- KÖHLER, H. J., CHRISTOPH, N., BAUER-CHRISTOPH, C., GEBNER, M., CURSCHMANN, K. Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil V: Einfluss kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf die Ausprägung der UTA. *Rebe Wein* **1996**, 49, 213-218.
- KÖHLER, H. J., CHRISTOPH, N., GEBNER, M., BAUER-CHRISTOPH, C. Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil III: Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der „Untypischen Alterungsnote“ und dem Reifestadium der Trauben (Lesetermin). *Rebe Wein* **1995**, 48, 424-430.

- KRADOLFER, P., NIEDERBERGER, P., HÜTTER, R. Tryptophan degradation in *Saccharomyces cerevisiae*: Characterisation of two aromatic aminotransferases. *Arch. Microbiol.* **1982**, *133*, 242-248.
- KUTÁČEK, M., KEFELI, V. Biogenesis of indole compounds from D-tryptophan and L-tryptophan in segments of etiolated seedlings of cabbage, maize and pea. *Biologia Plantarum* **1970**, *12*, 145-158.
- LEBHUHN, M., HARTMANN, A. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptophan catabolism in soils. *J. Chromatogr.* **1993**, *7*, 213-218.
- LUCKNER, M. *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals*. 3rd ed.; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo; 1990.
- LÖHNERTZ, O. UTA und Rebenernährung. Streß macht alt. *Dtsch. Weinmagazin* **1996**, *18*, 18-23.
- LÖHNERTZ, O., PRIOR, B., BLESER, B., LINSSENMEYER, A. Einfluß von weinbaulichen Maßnahmen auf die Aminosäuregehalte in Trauben und Mosten der Sorte Riesling. In *Intervitis Interfructa. 5. Internationales Symposium: Innovationen in der Kellerwirtschaft. Mikroorganismen und Weinbereitung*; Stuttgart, Germany; 11-12 June 1998; pp 1-23.
- MACHEIX, J. J., SAPIS, J. C., FLEURIET, A. Phenolic Compounds and Polyphenoloxidase in Relation to Browning in Grapes and Wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1991**, *30*, 441-486.
- MAKINO, K., SATOH, K., NISHI, K. Synthesis of some biological intermediate of the tryptophan metabolism. *Kumamoto med. J.* **1954**, *6*, 122-127.
- MANN, S. Besonderheiten im Tryptophanstoffwechsel von *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Hyg. Bakteriol.* **1967**, *151*, 474-491.
- MANULIS, S. SHAFRIR, H., EPSTEIN, E., LICHTER, A., BARASH, I. Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces spp.* *Mirobiol.* **1994**, *140*, 1045-1050.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **1968**, *45*, 594-598.
- MARTENS, D. A., FRANKENBERGER, W. T. Metabolism of tryptophan in soil. *Soil Biol. Biochem.* **1993**, *25*, 1679-1687.

- MILLER, J., RICE-EVANS, A., DAVIES, J., GOPINATHAN, V., MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407-412.
- MONTEIRO, F. F., BISSON, L. F. Biological Assay of Nitrogen Content of Grape Juice and Prediction of Sluggish Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 47-57.
- MONTEIRO, A. M., CROZIER, A., SANDBERG, G. The biosynthesis and conjugation of indole-3-acetic acid in germinating seeds and seedlings of *Dalbergia dolichopetala*. *Planta* **1988**, *174*, 561-568.
- MÜLLER, E., PETERNEL, M., LÖHNERTZ, O. Aktuelle Forschungsergebnisse: Stickstoff und Qualität. *Dtsch. Weinbau* **1998**, *7*, 14-17.
- MUSAJO, L., SPADA, A., BULGARELLI, E. Sintesi del l'acido *o*-nitobenzoilpiruvico e sua riduzione catalitica. *Gazz. chim. ital.* **1950**, *80*, 161-170.
- OKAMURA, H., MIMURA, A., YAKOU, Y., NIWANO, M., TAKAHARA, Y. Antioxidant Activity of Tannins and Flavonoids in *Eucalyptus Rostrata*. *Phytochem.* **1993**, *23*, 557-561.
- PALAMAND, S. R., GRIGSBY, J. H. Stale flavors in beer. Identification of *o*-aminoacetophenone and ethyl nicotinate in beer. *Brew. Dig.* **1974**, *49*, 58-60.
- PALMA, B. A., JACKSON, D. L. Inflorescence initiation in grapes-response to plant growth regulators. *Vitis* **1989**, *28*, 1-12.
- POLO, M. C., LLAGUNO, C. Changes in free amino acids during the alcoholic fermentation of grape juice by flower yeasts. II: Composition of wines and yeast cells. *Connaiss. Vigne Vin.* **1974**, *8*, 321-342.
- POOL, R. M., POWELL, L. E. Der Einfluß von Cytokininen auf die Sproßentwicklung bei „Concord“ Reben „in vitro“. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **1975**, *100*, 200-202.
- POPOV, I., BLUMSTEIN, A., LEWIN, G. Antioxidant Effects of Aqueous Garlic Extract – 1st Communication: Direct detection using the photochemiluminescence. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* **1994**, *44*, 602-604.
- QUINTANA GANA, M., GOMEZ PINOL, J. M. Influence of soil, climate and other factors on the phenolic content of the grape variety Xarello. *Bull. l'O.I.V.* **1989**, *62*, 485-497.
- RAPP, A., VERSINI, G. Fehlaroma: Die untypische Weinalterung. *Dtsch. Weinbau* **1995**, *18*, 18-22.

RAPP, A., VERSINI, G. Influence of Nitrogen Compounds in Grapes on Aroma Compounds of Wines. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*; Rautz, J.M., Ed.; Seattle, WA, USA; 18-19 June 1991; pp 156-163.

RAPP, A., VERSINI, G., ENGEL, L. Nachweis und Bestimmung von 2-Aminoacetophenon in vergorenen Modellösungen. *Vitis* **1995**, 34, 193-194.

RAPP, A., VERSINI, G., ULLEMEYER, H. 2-Aminoacetophenon: Verursachende Komponente der „Untypischen Alterungsnote“ („Naphtalinton“, „Hybridton“) bei Wein. *Vitis* **1993**, 32, 61-62.

REDL, H. Gärungsprobleme und Beeinträchtigungen der Weinqualität durch Weingartenbegrünung? *Winzer* **1999**, 55, 6-11.

REINICKE, D., BANDURSKI, R. S. Auxin biosynthesis and metabolism. In *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*; Davies, P. J., Ed.; Martinus Nijhoff Publishers; Dordrecht, The Netherlands; 1987; pp 24-42.

RIOV, J., BANGERTH, F. Metabolism of Auxin in Tomato Fruit Tissue. *Plant Physiol.* **1992**, 100, 1396-1402.

ROBIN, J. P., SAUVIGE, F. X., BOULET, J. C., SUARD, B., FLANCY, C. Reinforcement of the radiative and thermic stresses of the grapevine in field conditions using reflective soil cover. Repercussions on the must composition and on the wine quality. In *4th International Symposium on Cool Climate Viticulture and Enology*; Rochester, NY; 1996.

SATO, M., SUZUKI, Y., HANAMURE, K., KATOH, I., YAGI, Y., OTSUKA, K., Winemaking From Koshu Variety by the *sur lie* Method: Behavior of Free Amino Acids and Proteolytic Activities in the Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, 48, 1-6.

SAVIGE, W. E. New Oxidation Products of Tryptophan. *Aust. J. Chem.* **1975**, 28, 2275-2287.

SCHALLER, K. Influence of different soil tillage systems on uptake of N, P, K, Mg, Ca, and organic N in berries during growth and development of the variety white Riesling. *Bull. l' O.I.V.* **1999**, 72, 602-629.

SCHÖPE, C., KOEPKE, G., KOWALD, B., SCHÜLDE, F., WUNDERLICH, D. Darstellung und Eigenschaften der *o*-Formamino- und der *o*-Aminobenzoylessigsäure, zweier zellmöglicher Abbauprodukte des Tryptophans und Heteroauxins. *Chem. Ber.* **1956**, 12, 2877-2887.

- SCHRADER, U., LEMPERLE, E., BECKER, N. J., BERGNER, K. G. Der Aminosäure-, Zucker-, Säure- und Mineralgehalt von Weinbeeren in Abhängigkeit vom Kleinklima des Standortes der Rebe. II. Mitteilung Aminosäuregehalt. *Vitic. Enol. Sci.* **1976**, *31*, 9-24.
- SCHWAB, A., CHRISTOPH, N., KÖHLER, H. J., GEBNER, M., SIMAT, T. J. Einfluß weinbaulicher Maßnahmen auf die Ausprägung der Untypischen Alterungsnote bei Weißweinen. Teil I: Einfluß des Lesezeitpunktes. *Vitic. Enol. Sci.* **1999**, *54*, 114-120.
- SCHWAB, A., PETERNEL, M., KÖHLER, H. J., HEIGEL, K. P. Die „Untypische Alterungsnote“ im Wein, Teil IV: Beeinflussung durch weinbauliche Maßnahmen. *Rebe Wein* **1996**, *49*, 181-187.
- SCHWAB, A., PETERNEL, M. Ungenügende Traubenreife – Ursache der Untypischen Alterungsnote (UTA). <http://www.stmelf.bayern.de/lwg/weinbau/info/uta.html>; 2001.
- SHI, X., DALAL, N. S., JAIN, A. C. Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem. Tox.* **1991**, *29*, 1-6.
- SHIN, M., SANO, K., UMEZAWA, C. Metabolism of Tryptophan to Niacin in *Saccharomyces uvarum*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1991 a**, *37*, 269-283.
- SHIN, M., SHINGUU, T., SANO, K., UMEZAWA, C. Metabolic Fates of L-Tryptophan in *Saccharomyces uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*). *Chem. Pharm. Bull.* **1991 b**, *39*, 1792-1795.
- SIEBERT, K. J., BLUM, P. H., WISK, T. J., STENROOS, L. E., ANKLAM, W. J. The effect of trubs on fermentation. *MBAA Technical Quarterly* **1986**, *23*, 37-43.
- SIMAT, T. J., VAN WICKERN, B., EULITZ, K., STEINHART, H. Contaminants in biotechnologically manufactured L-tryptophan. *J. Chromatogr. B* **1996**, *685*, 41-51.
- SIMONETTI, P., PIETTA, P., TESTOLIN, G. Polyphenol Content and Total Antioxidant Potential of Selected Italian Wines. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1152-1155.
- SITBON, F., ÖSTIN, A., SUNDBERG, B., OLSSON, O., SANDBERG, G. Conjugation of Indole-3-acetic Acid (IAA) in Wild-Type and IAA-Overproducing Transgenic Tobacco Plants, and Identification of the Main Conjugates by Frit-Fast Atom Bombardment Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Plant Physiol.* **1993**, *101*, 313-320.

SOLEAS, G. J., TOMLINSON, G., DIAMANDIS, E. P., GOLDBERG, D. M. Relative Contribution of Polyphenolic Constituents to the Antioxidant Status of Wines: Developement of a Predictive Model. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3995-4003.

SPONHOLZ, W. R. Nitrogen Compounds in Grapes, Must, and Wine. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*; Rautz, J. M., Ed.; Seattle, WA, USA; 18-19 June 1991; pp 67-77.

STEINER, R. Die Grundlagen der Entblätterung für die Praxis. *Badische Winzer* **1999**, *5*, 32-33.

TUSSEAU, D., BENOIT, C., VALADE, M. Amino acids contents during grape ripening. In *Actualities Oenologique 89, Comptes Rendus de 4. Symposium International d'oenologie*; Ribereau-Gayon, P., Lonvaud, A., Eds.; Bordeaux, France; 15-17 Juin 1989; pp 20-24.

VAN WICKERN, B., SIMAT, T. J., STEINHART, H. HPLC analysis of γ -irradiation-induced products of tryptophan in peptides and lysozymes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1997**, *205*, 446-451.

VIVAS, N., SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, N., GLORIES, Y. Influence de SO₂ et de l'acide ascorbique sur l'activite antiradicalaire des tannins, mesuree sur l'anion superoxyde. Application aux vins rouges. *Vitis* **1997**, *36*, 91-96.

WALKER, G. M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley and Sons, Chichester, 1998.

WALKER, N. J., MANNING, D. J. Components of the musty off-flavour of stored dried lactic casein. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* **1976**, *11*, 1-9.

WOHLFAHRT, P. Einfluß der Bodenpflege auf die Weinqualität. *Winzer Z.* **1996**, *11*, 19-20.

WRIGHT, A. D., SAMPSON, M. B., NEUFFER, M. G., MICHALEZUK, L., SLOVIN, J. P. COHEN, J. D., COHEN, J. D. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotrop. *Science* **1991**, *254*, 998-1000.

YANG, S., SALEH, M. Destruction of indole-3-acetic acid during the aerobic oxidation of sulfite. *Phytochem.* **1973**, *12*, 1463-1466.

YONAH, K., MORIGOUCHE, M., HIRASAWA, T., YAMAMOTO, T., SODA, K. Occurrence of Kynurenine Aminotransferase in Extracts of Yeast. *Bull. Inst. Chem. Res.* **1975**, *53*, 315-318.

YOUNG, S., LAU, S. Rapid determination of tryptophan, kynurenine and indoles using reversed phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1979**, *175*, 343-346.

7 ANHANG

7.1 Publikationen und Vorträge

Publikationen

In dieser Dissertationsschrift vorgestellte und diskutierte Publikationen:

HOENICKE, K., SIMAT, T. J., STEINHART, H., CHRISTOPH, N., KÖHLER, H. J., SCHWAB, A.
Determination of tryptophan and tryptophan metabolites in grape must and wine.
Adv. Exp. Med. Biol. **1999**, 467, 671-677.

CHRISTOPH, N., GEBNER, M., SIMAT, T. J., HOENICKE, K.
Off-flavor compounds in wine and other food products formed by enzymatical, physical,
and chemical degradation of tryptophan and its metabolites.
Adv. Exp. Med. Biol. **1999**, 467, 659-669.

HOENICKE, K., SIMAT, T. J., STEINHART, H., GEBNER, M., KÖHLER, H. J. SCHWAB, A.
CHRISTOPH, N.
Indolessigsäure in Mosten und Weinen – Bedeutung hinsichtlich der Ausbildung einer
„Untypischen Alterungsnote“ (UTA) in Wein.
In *Intervitis Interfructa. 6. Intern. Symposium: Innovationen in der Kellerwirtschaft*,
Stuttgart, Germany, 14.-16. Mai 2001; pp 113-123.

HOENICKE, K., SIMAT, T. J., GEBNER, M., KÖHLER, H. J., SCHWAB, A.
Mögliche Ursachen der Entstehung einer „Untypischen Alterungsnote“ (UTA) im Wein.
GIT **2001**, 45, 945-948.

HOENICKE, K., SIMAT, T. J., STEINHART, H., KÖHLER, H. J., SCHWAB, A.
Determination of Free and Conjugated Indole-3-acetic Acid, Tryptophan, and Tryptophan
Metabolites in Grape Must and Wine.
J. Agric. Food Chem. **2001**, 49, 5494-5501.

HOENICKE, K., SIMAT, T. J., STEINHART, H., CHRISTOPH, N., GEBNER, M., KÖHLER, H. J.
‘Untypical aging off-flavor’ in wine: formation of 2-aminoacetophenone and evaluation of
its influencing factors.
Anal. Chim. Acta **2002**, 458, 29-37.

HOENICKE, K., BORCHERT, O., GRÜNING, K., SIMAT, T. J.

“Untypical Aging Off-flavor” in Wine: Synthesis of Potential Degradation Compounds of Indole-3-acetic Acid and Kynurenine and Their Evaluation as Precursors of 2-Aminoacetophenone.

J. Agric. Food Chem. **2002**, 50, 4303 - 4309.

SIMAT, T. J., HOENICKE, K., GEBNER, M., CHRISTOPH, N.

Metabolism of Tryptophan and Indole-3-acetic Acid Formation During Vinification.

Vitic. Enol. Sci., **2003**, in press.

Folgende Publikationen geben keine substanziell neuen Informationen, so dass auf einen Abdruck verzichtet wurde:

CHRISTOPH, N., BAUER-CHRISTOPH, C., GEBNER, M., KÖHLER, H. J., SIMAT, T. J., HOENICKE, K.

Bildung von Komponenten der „Untypischen Alterungsnote“ durch Einwirkung von schwefeliger Säure auf Indol-3-essigsäure und andere Tryptophanstoffwechselprodukte im Wein.

Vitic. Enol. Sci. **1998**, 53, 79-86.

CHRISTOPH, N., BAUER-CHRISTOPH, C., GEBNER, M., HOENICKE, K., KÖHLER, H. J., SIMAT, T. J.

Untypical aging off-flavour in wine: Formation of 2-Aminoacetophenone in white wine by radical cooxidation of indole-3-acetic acid and sulfite.

In *Frontiers of Flavour Science. 9th Weurman Flavour Research Symposium*, Schieberle, P., Engel, K. H. (Eds.); Freising, Germany, 22-25 June 1999.

HOENICKE, K., CHRISTOPH, N., SCHWAB, A., SIMAT, T. J., STEINHART, H.

“The untypical aging off-flavor” (UTA) in wine – Formation and possible preventions.

Czech J. Food Sci. **2000**, 18, 52-54.

SIMAT, T. J., HOENICKE, K., GEBNER, M., KÖHLER, H. J., SCHWAB, A.

Formation and degradation of indole-3-acetic acid in grape musts and wines: A potential precursor in the development of the “untypical aging off-flavor”.

In *Biologically-active phytochemicals in food. Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function*. Pfannhauser, W., Fenwick, G. R., Khokhar, S. (Eds.); Norwich, UK, 2001 pp 91-96.

Vorträge

Bestimmung und Relevanz von Trp-Metaboliten im Hinblick auf die Ausbildung einer „Untypischen Alterungsnote“ im Wein.

Lebensmittelchemische Gesellschaft, Regionalverbandstagung Nord, Hamburg, 1999.

The „untypical aging off-flavour“ (UTA) in wine – Formation and possible prevention. Chemical Reaction in Food IV, Prague, Czech Republic, 2000.

Bestimmung von freier und gebundener Indolessigsäure in Mosten und Weinen.

Erstes Anwendertreffen Weinanalytik, Dortmund, 2001.

Indolessigsäure in Mosten und Weinen - Bedeutung hinsichtlich der Ausbildung einer „Untypischen Alterungsnote“ (UTA) im Wein.

Intervitis Interfructa, 6. Internationales Symposium: Innovationen in der Kellerwirtschaft, Stuttgart, 200.

Influences on the amount of indole-3-acetic acid in grape musts and wines, a potential precursor in the formation of the “untypical aging off-flavour”.

In Vino Analytica Scientia, Bordeaux, France, 2001.

Indolessigsäure in Mosten und Weinen - Relevanz hinsichtlich der Entstehung der „Untypischen Alterungsnote“.

Deutscher Lebensmittelchemikertag, Braunschweig, 2001.

Poster

HOENICKE, K., SIMAT, T. J., STEINHART, H., CHRISTOPH, N., KÖHLER, H. J., SCHWAB, A.
Determination of Tryptophan and Tryptophan Metabolites in Grape Must and Wine.
Istry, Hamburg, 1998.

HOENICKE, K., SIMAT, T. J., STEINHART, H., CHRISTOPH, N., KÖHLER, H. J., SCHWAB, A.
Bestimmung von Tryptophan und Tryptophanmetaboliten in Mosten und Weinen.
Deutscher Lebensmittelchemikertag, München, 1998.

HOENICKE, K., SIMAT, T. J., STEINHART, H.
Bestimmung von freier und gebundener Indolessigsäure in Mosten und Weinen.
Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart, 2000.

SIMAT, T. J., HOENICKE, K., GEBNER, M., KÖHLER, H. J., SCHWAB, A.

Formation and degradation of indole-3-acetic acid in grape musts and wines: A potential precursor in the development of the “untypical aging off-flavour.

Euro Food Chem XI, Norwich, UK, 2001.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katrin Hoenicke
Geboren: 02. April 1973 in Osterholz-Scharmbeck
Anschrift: Hamburger Landstr. 36a, D-21465 Wentorf

Schulausbildung

1979-1983 Grundschule Rodenkirchen
1983-1985 Orientierungsstufe Stadland-Jade
1985-1992 Gymnasium Nordenham
Abschluss: Abitur

Studium

10/1992-03/1995 Studium Chemie-Diplom, Universität Kiel
Abschluss: Vordiplom Chemie
04/1995-04/1998 Studium der Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
Abschluss: Erste lebensmittelchemische Staatsprüfung,
Diplom in Lebensmittelchemie

Werdegang nach Abschluss des Studiums

05/1998-11/1998 Studentische Hilfskraft an der Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
10/1998 Beginn der Promotion an der Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
11/1998-10/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
11/2001-04/2002 Praktikum am Hygiene Institut Hamburg
Abschluss: Zweite lebensmittelchemische Staatsprüfung