



## 1. Einleitung

Der allgemeine Trend, speziell Rotweine möglichst lange Zeit ohne stabilisierende Maßnahmen reifen zu lassen, birgt ein erhöhtes Risiko des mikrobiologischen Verderbs. Die Idee dahinter war ursprünglich, einen möglichst hohen Anteil Aroma, Pigmente und Kolloide zu erhalten, um das volle Potential des Weines nutzen zu können. Die sensorische Qualität der Weine kann durch den Ausbau in Holzfässern zusätzlich verbessert werden, jedoch bietet die poröse Oberfläche des Fasses kaum Möglichkeiten der Reinigung oder gar Sterilisation. Hohe pH-Werte und geringe SO<sub>2</sub>-Dosagen stellen in dem Zusammenhang sehr gute Vermehrungsmöglichkeiten für verschiedenste Mikroorganismen dar (Suarez, Suarez-Lepe et al. 2007). Auch wenn Weine ohne Holzkontakt ausgebaut werden, bietet die im Zuge der Klimaveränderung eintretende Reifeverschiebung und fast kontinuierliche pH-Wert Erhöhung immer bessere Vermehrungsmöglichkeiten für Schadhefen und –bakterien (Dittrich und Großmann 2005).

Reinzuchthefen und –bakterien werden aufgrund ihrer positiven Eigenschaften selektioniert und auf ihre genetische Stabilität auch unter Weinbedingungen überprüft. Der gegenläufige Trend, Weine spontan nur mit einer zufälligen Population aus wilden Hefen und Bakterien auszubauen, hat in den letzten Jahren allerdings wieder mehr an Bedeutung gewonnen. Die Mikroorganismen haben in diesem Fall unvorhersehbare Eigenschaften und können den Wein bis zum völligen Verderb hin negativ beeinflussen. Da natürlich auf Trauben oder Kelleroberflächen vorkommende Mikroorganismen höhere pH-Werte bevorzugen (Bousbouras und Kunkee 1971), ist das Risiko der Fehltonbildung durch die angesprochene klimatische Veränderung zusätzlich verstärkt. So können sich durch fehlenden Selektionsdruck andere Gattungen in der Weinbereitung durchsetzen und so das Produkt nachhaltig verändern.

Eine andere oenologische Strategie, die zu Problemen mit der Reintönigkeit von Weinen führen kann, ist die simultane Beimpfung von Hefen und Bakterien. Zwar werden die Milchsäurebakterien zur Durchführung des biologischen Säureabbaus leicht zeitversetzt inokuliert, dennoch spielen die noch sehr reiche Zusammensetzung des Mediums zu diesem Zeitpunkt und die komplexe Interaktion der Mikroorganismen eine große Rolle für die Art der Stoffwechselaktivität. Da hier zahlreiche Substrate für eventuelle Fehltonen vorliegen, birgt die Simultanbeimpfung



ein zusätzliches schwer zu kalkulierendes Risiko. Dennoch wird die Technik immer wieder eingesetzt, um Zeit bei der Weinbereitung und damit Geld einzusparen.

Die Weinwirtschaft steht vor der Herausforderung, dem Konsumenten ein Produkt zu liefern, das sowohl dessen Erwartungen erfüllt, als auch höchsten Qualitätsansprüchen genügt. In einem globalisierten Markt mit mehr als 34 weinproduzierenden Ländern werden jährlich etwa sechs Milliarden Liter Wein produziert, der nicht verkaufsfähig ist (Swiegers, Bartowsky et al. 2005), was etwa 2 % der weltweiten Produktionsmenge gleich kommt.

Um diese Zusammenhänge besser verstehen und entsprechende Maßnahmen frühzeitig ergreifen zu können, ist es wichtig die Faktoren zu kennen, die das Wachstum der Schadbakterien und damit die Fehltonbildung beeinflussen können.

## 1.1. Bakterien in der Weinbereitung

Im Verlauf der Traubenerzeugung und Weinbereitung spielen verschiedene Bakteriengattungen eine Rolle. Zum einen werden sie gezielt eingesetzt, um eine bestimmte stoffliche Umsetzung zu erreichen, zum überwiegenden Teil sind sie aber unerwünscht. Bakterielle Weinfehler sind im Gegensatz zu Fehltonen, die durch Hefen verursacht sind, weitaus schwerer oder gar nicht behandelbar. Daher kommt ihrer Vermeidung eine besondere Bedeutung zu.

Essigsäurebakterien sind obligat aerob und spielen daher unter Weinbedingungen nur eine untergeordnete Rolle. Milchsäurebakterien (MSB) sind eine Gruppe Gram-positiver, Sauerstoff-toleranter Stäbchen oder Kokken, die Milchsäure aus Kohlenhydraten bilden können und keine Sporen bilden (Radler 1966). Sie gehören überwiegend zu den Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weisella*, *Oenococcus* und *Leuconostoc*, können aber nur zum Teil den eigentlichen biologischen Säureabbau (BSA) unter Weinbedingungen durchführen, das heißt, bei Ethanolgehalten von 12-14 %vol. und pH-Werten zwischen 3,0 und 3,5. *Pediococcus*- und *Lactobacillus*-Arten kommen im laufenden BSA in geringen Mengen vor und treten meist erst danach bei höheren pH-Werten auf. Ihr Erscheinen ist häufig mit steigenden Mengen flüchtiger Säure korreliert (Davis 1986), wobei hier besonders *Lactobacillus brevis* hervorzuheben ist. Homofermentative Lactobacillen sind die am häufigsten vorkommende Bakterienart auf Trauben. Sie werden zu Beginn der alkoholischen Gärung durch *L. mesenteroides* und danach durch *O. oeni*



verdrängt (Moreno-Arribas, Polo et al. 2003). Außer den kommerziellen Bakterien Starterkulturen wachsen Milchsäurebakterien meist nur schwach und sehr unvorhersehbar in Wein.

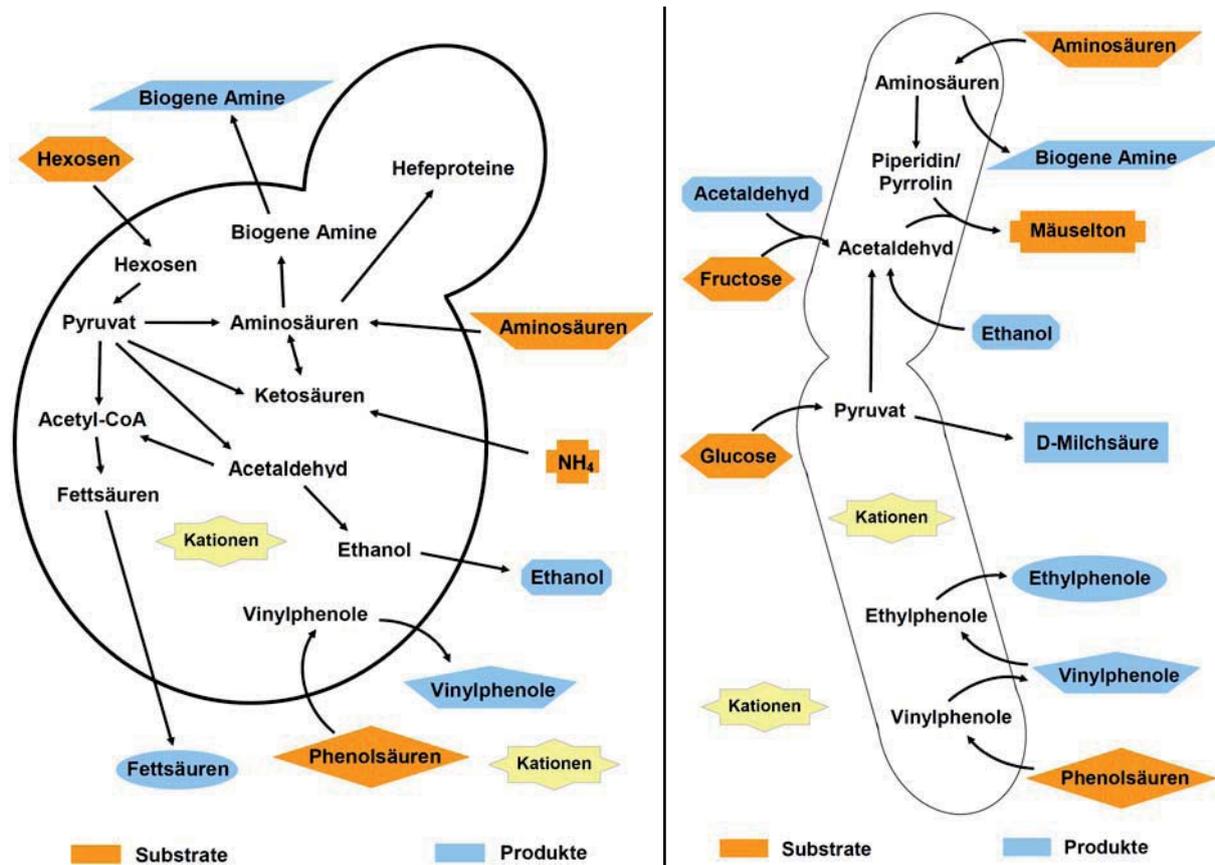


Abbildung 1-1 Schematische Übersicht über den projektrelevanten Hefe- und Bakterienstoffwechsel

Besonders bei Chardonnay ist in manchen Jahrgängen die Gefahr des stockenden BSA verbunden mit Fehltonen sehr hoch (Husnik, Volschenk et al. 2006). Heterofermentative MSB verstoffwechseln Glucose über den Hexose-Monophosphat- bzw. Pentose-Phosphat-Weg zu Milchsäure, Kohlendioxid und Ethanol bzw. Essigsäure. Das Verhältnis von Ethanol zu Essigsäure wird durch das Redoxpotential des Mediums und den Pantothersäuregehalt bestimmt (Campos, Figueiredo et al. 2009; König, Unden et al. 2009). Homofermentative MSB hingegen bilden aus Hexosen fast ausschließlich Milchsäure. Es gibt Anzeichen dafür, dass auch die Enzyme zum Äpfelsäureabbau in homo- und heterofermentativen Milchsäurebakterien nicht gleich sind (Radler 1966).

Einige Milchsäurebakterien-Gattungen haben die Fähigkeit, die ungünstigen Milieubedingungen während der Weinbereitung zu tolerieren. Dazu gehören niedrige



pH-Werte, erhöhte Ethanolgehalte, schwefelige Säure, niedrige Temperaturen und Nährstoffmangel (Campos, Couto et al. 2003). Die im Wein vorkommenden MSB sind fakultativ anaerob und können je nach Milieubedingungen neben dem erwünschten Abbau der Äpfelsäure zahlreiche Weinfehler verursachen. Sie kommen in geringen Mengen bereits auf den Trauben vor und können so in den Keller gelangen, wo besser angepasste Stämme eine Kellerflora bilden können (Radler 1966).

Milchsäurebakterien sind ethanolsensitiv und haben Schwierigkeiten sich bei Ethanolgehalten über 13,5 %vol. zu vermehren. Die Überlebensfähigkeit hängt insbesondere von der Fettsäurezusammensetzung der Zellmembran ab. Ethanolgehalte über 12 %vol. hemmen das Wachstum ohne einen Einfluss auf die BSA-Aktivität zu haben (Malherbe, Bauer et al. 2007). MSB brauchen B-Vitamine, Kalium, Natrium, Magnesium und Mangan um zu wachsen. Mangan wirkt dabei als Co-Faktor für den Abbau von Äpfelsäure. In Gegenwart eines vergärbaren Kohlenhydrats wird die Decarboxylierung gefördert (Radler 1966). L-Äpfelsäure wird zu L-Milchsäure abgebaut, während der Anteil an D-Milchsäure bei heterofermentativen MSB ein Produkt des Zuckerstoffwechsels ist. Üblicherweise sind circa 20 % der Gesamtmilchsäure in der D-Form, wobei ihre Bildung bei niedrigeren pH-Werten begünstigt wird (Bousbouras und Kunkee 1971). Ein sensorisch akzeptabler Wert liegt bei 200 mg/L (Perez-Zuniga, Abad et al. 1994), wobei hier weniger das D-Lactat den Weinfehler verursacht, sondern die begleitende flüchtige Säure, die in der Kombination den an Sauerkraut erinnernden Eindruck hinterlässt.

Milchsäurebakterien benötigen vergärbaren Zucker zur Zellvermehrung, wobei die gebildete Zellmasse durch die Zuckermenge bestimmt wird und auch von einem Überschuss an Äpfelsäure nicht beeinflusst werden kann. Daraus kann abgeleitet werden, dass Äpfelsäure nicht als primäre Energiequelle zur Vermehrung dient, obwohl auch hier Energie in Form von ATP gewonnen werden kann. Ein weiterer Nutzen liegt wahrscheinlich in der Anhebung des pH-Werts und damit in der Verbesserung der Milieubedingungen.

Der Zuckergehalt nimmt vor und während des biologischen Säureabbaus um 0,4 bis 0,8 g/L ab. Das Temperaturoptimum für den Äpfelsäureabbau liegt zwischen 22 und 25 °C, obwohl auch bei deutlich niedrigeren Temperaturen ein verlangsamter Stoffwechsel zu beobachten ist (Radler 1966). Zur erfolgreichen Durchführung ist



eine Bakterienpopulation von etwa  $10^6$  KBE/mL notwendig (Versari, Parpinello et al. 1999).

Die simultane Beimpfung mit Hefen und Bakterien wird häufig als Alternative für Weine genannt, die insbesondere aufgrund hoher potentieller Ethanolgehalte Probleme mit dem Äpfelsäureabbau bereiten. Dabei ist die Interaktion zwischen Hefen und Bakterien aber deutlich komplexer als bei einer klassischen Beimpfung nach abgeschlossener alkoholischer Gärung. Frühere Studien belegen, dass der simultane Stoffwechsel von Hefen und Bakterien nicht zwangsläufig zu einer Erhöhung von Essig- und D-Milchsäure führt. Ungewöhnlich hohe Mengen flüchtiger Säure sind meist Resultat eines stockenden oder teilweise ablaufenden BSA und Folgeaktivität unerwünschter Bakterien (Zapparoli, Tosi et al. 2006).

Während der alkoholischen Gärung reichert die Hefe Aminosäuren und leicht verfügbare Nährstoffe im Wein ab und setzt komplexe Makromoleküle frei. Bakterien profitieren direkt von diesen Stoffwechselprodukten. Peptide bis 10 kDa sind leicht in die Zelle aufzunehmen und können dann hydrolysiert werden. Der Aufnahmeprozess erfordert generell Energie, ist aber energetisch nicht ungünstiger als der Transport einzelner Aminosäuren. Die Aufnahme von Aminosäuren ist ferner pH-Wert abhängig (Remize, Gaudin et al. 2006), wobei der Protonengradient die Transportsysteme direkt beeinflusst.

Peptide und Aminosäuren aus der Proteinhydrolyse können von großem Wert für die Bakterienernährung sein. Die Fähigkeit von *O. oeni* extrazelluläre Proteine abzubauen, kann andere nicht-proteolytische Bakterien im Medium begünstigen. In einer gemischten Kultur ist die proteolytische Aktivität bis zu 80 % höher als in einer Reinkultur. Das hat direkte Auswirkungen auf die Aminosäureversorgung aller beteiligten Bakterien. Die Co-Inokulation von verschiedenen Bakterien hätte somit ernährungsphysiologische Vorteile (Aredes Fernandez und Manca Nadra 2006).

Der Verlauf und die Geschwindigkeit des BSA werden direkt vom pH-Wert beeinflusst (Bousbouras und Kunkee 1971). Das Bakterienwachstum nimmt bei einer Anhebung des pH-Wertes von 3,0 auf 4,0 kontinuierlich zu. Üblicherweise ist *Oenococcus oeni* die einzige Milchsäurebakterienart, die unter pH 3,5 isoliert werden kann. Über pH 3,5 dominieren *Lactobacillus* und *Pediococcus* über *Oenococcus*.

Das Temperaturoptimum von Milchsäurebakterien liegt unter Weinbedingungen zwischen 23 und 25 °C, kann aber bei geänderten Umgebungsbedingungen auch variieren (Malherbe, Bauer et al. 2007) Bei erhöhten Alkoholgehalten zeigen sie sich



beispielsweise deutlich empfindlicher gegenüber höheren Temperaturen. *Lactobacillus plantarum* hat Mechanismen entwickelt, die es ihm erlauben unter Weinbedingungen zu überleben und zu wachsen (Hernandez, Estrella et al. 2007).

Zur Induktion des Malatenzyms benötigt *Lactobacillus* die gleichen Aminosäuren, die schon zum Wachstum gebraucht werden. Besonders hervorzuheben ist hier Histidin. In Gegenwart von Äpfelsäure werden die zur Umsetzung erforderlichen Enzyme in großem Umfang gebildet. Unter Versuchsbedingungen waren in einer Studie von Radler (1966) 10 % Glucose und 1-3 % Äpfelsäure zur Enzyminduktion notwendig, wobei Glucose durch andere vergärbare Kohlenhydrate ersetzt werden kann. Ethanol und schwefelige Säure hemmen die Induktion (Radler 1966).

Die Hemmung der Bakterien in Anwesenheit von gärender Hefe ist wahrscheinlich auf die SO<sub>2</sub>-Produktion der Hefe zurück zu führen. Konzentrationen über 50 mg/L freie schwefelige Säure unterdrücken prinzipiell das Wachstum von Bakterien in Wein (Malherbe, Bauer et al. 2007), verstärkt bei niedrigen pH-Werten, mit denen die mikrobiozide Wirkung der SO<sub>2</sub> exponentiell ansteigt (Davis 1986).

Im Gegensatz zu SO<sub>2</sub> nimmt die Effizienz von Lysozym mit steigendem pH-Wert zu. Zur Hemmung von Bakterien können SO<sub>2</sub>, Lysozym oder Pasteurisation verwendet werden. Lysozym tötet Milchsäurebakterien ab, kann aber zusammen mit anderen Eiweißstoffen durch Gerbstoffe oder Bentonit ausgefällt werden. Ein bis zwei Minuten Erhitzen bei 60 °C reichen ebenfalls aus, um Milchsäurebakterien abzutöten (Radler 1966).

Nach Ergebnissen von Gerbaux et al. (1997) sind die meisten MSB, die in Wein vorkommen, sensitiv gegenüber Lysozym. Der BSA kann demnach mit einer Zugabe von 250 mg/L herausgezögert werden, 500 mg/L verhindern den Säureabbau vollständig. Der inhibierende Effekt von 500 mg/L Lysozym ist vergleichbar mit einer Zugabe von 40 mg/L SO<sub>2</sub>. Nach dem BSA genügen 125 mg/L Lysozym um einen Wein zu stabilisieren, da MSB in geklärtem Medium sensitiver sind (Gerbaux, Villa et al. 1997). Andere Arbeiten haben allerdings gezeigt, dass einzelne MSB auch Resistenzen gegenüber Lysozym entwickeln können (Weiand, Fröhlich et al. 2004).

Während des biologischen Säureabbaus ist ein leichter Anstieg der vergärbaren Zucker, besonders der Glucose, zu beobachten. Ein Grund könnte die Hydrolyse von Trehalose während der Hefeautolyse sein (Davis 1986).

Milchsäurebakterien haben im Vergleich zu Hefen einen hohen und komplexen Nährstoffbedarf. Zucker wird entweder homo- oder heterofermentativ zu Milchsäure



und anderen Metaboliten verstoffwechselt. Die Affinität zu Äpfelsäure ist dabei aber höher als die zu Zucker, was sich darin äußert, dass Äpfelsäure schneller aus dem Medium entfernt wird (Dittrich und Großmann 2005). In Abbildung 1-2 ist die übliche Abfolge des Stoffwechsels von MSB in Verbindung mit den Endprodukten dargestellt.

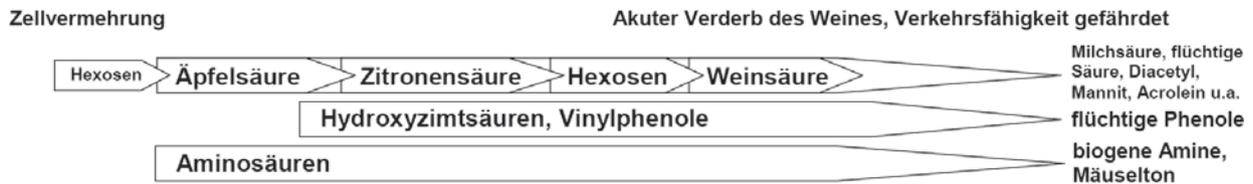


Abbildung 1-2 Sequenz des Milchsäurebakterien-Stoffwechsels in Wein

Durch verschiedene Versuche konnte nachgewiesen werden, dass Hefen durch Stoffwechsel- und Autolyseprodukte das Wachstum von Bakterien fördern können. Das gilt nicht nur in Nährstoffmangel-Situationen, sondern auch für niedrige pH-Werte (Radler 1966). Mit der Ausnahme von Histidin und Arginin, die während des BSA vollständig aus dem Medium entfernt werden, nimmt die Menge der übrigen Aminosäuren leicht zu. Es gibt dabei kein Muster, nur Arginin nimmt immer ab und wird wahrscheinlich zu Ornithin umgebaut (Davis 1986). Einige Milchsäurebakterien besitzen Proteasen und können durch Hydrolyse von Mostproteinen zu einem Anstieg an freien Aminosäuren beitragen (Radler 1966).

Neben dem gewünschten biologischen Säureabbau können Milchsäurebakterien für eine Reihe von Weinfehlern wie flüchtige Säure, Mannit-Stich, Zähwerden, Diacetyl, biogene Amine und Acrolein verantwortlich sein (Lay 2003). Insbesondere *Lactobacillus* Arten werden ferner mit dem sehr persistenten Mäuselton in Verbindung gebracht (Costello, Lee et al. 2001). Einige MSB können außerdem Weinsäure abbauen (Radler 1966). In Tabelle 1-1 sind einige weinrelevante MSB und deren Fehltonpotential dargestellt.

*Lactobacillus* Stämme sind die meist genannten Milchsäurebakterien, die mit Weinverderb in Verbindung gebracht werden (Campos, Couto et al. 2003). Obwohl *Pediococcus*-Stämme auch häufig für die Bildung von Fehltonen verantwortlich gemacht werden, konnten einzelne Stämme identifiziert werden, die einen BSA ohne Weinfehler durchführen können (Edwards, Peterson et al. 1994).



Tabelle 1-1 Fehltonbildungspotential einiger weinrelevanter Milchsäurebakterien

Gattung	Art	Biogene Amine	Fehltöne	Quelle
<i>Lactobacillus</i>	<i>buchneri</i>	+	+	Costello, 2001
<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	+	+	Dittrich, 2005
<i>Lactobacillus</i>	<i>hilgardii</i>	+/-	+	Sponholz, 1993
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	+	+	Arena, 2001 Chatonnet, 1995
<i>Lactobacillus</i>	<i>cellobiosus</i>		+	Sponholz, 1993
<i>Lactobacillus</i>	<i>mali</i>	+/-	+	Couto, 2006
<i>Lactobacillus</i>	<i>crispatus</i>		+	Couto, 2006
<i>Lactobacillus</i>	<i>collinoides</i>		+	Couto, 2006
<i>Lactobacillus</i>	<i>kunkeei</i>	+/-	+	Edwards, 1998
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	+	+	Sponholz, 1993
<i>Leuconostoc</i>	<i>dextranicum</i>		+	Dittrich, 2005
<i>Oenococcus</i>	<i>oeni</i>	+	+/-	Liu, 1994
<i>Pediococcus</i>	<i>damnosus</i>	+	+	Delfini, 1989
<i>Pediococcus</i>	<i>parvulus</i>	+	+	Costello, 2001
<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		+	Chatonnet, 1995
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>		+	Couto, 2006

+ häufige Bildung    +/- schwache Bildung    - keine Bildung

In einem Mangelmedium, wie es am Ende von alkoholischer und malolaktischer Gärung vorliegt, haben sich einige Milchsäurebakterien die Fähigkeit bewahrt, aus zahlreichen Substraten Energie zu gewinnen. Dabei haben sich vor allem verschiedenste Decarboxylierungsreaktionen als ergiebig erwiesen. Zusätzlich kann aus Arginin, ähnlich wie bei Glucose, Energie aus einer Phosphorylierung gewonnen werden (Tonon und Lonvaud-Funel 2002).

Der genetisch modifizierte Äpfelsäure abbauende Hefestamm ML01 hat bereits GRAS Status bei der FDA erreicht (Generally Regarded As Safe) und ist in Moldavien und den USA kommerziell erhältlich. Der Stamm produziert eine equimolare Menge Milchsäure aus Äpfelsäure ohne nennenswerte Nebenprodukte. Dabei kann die Äpfelsäure auch unter Wachstumsbedingungen verstoffwechselt werden, bei denen MSB keinen erfolgreichen BSA gewährleisten können, wie beispielsweise niedrige pH-Werte und niedrige Temperaturen. Auch die Synthese biogener Amine kann nahezu vollständig unterbunden werden (Husnik, Volschenk et al. 2006).



## **1.2. Bakteriell induzierte Weinfehler in Most und Wein**

### **1.2.1. Allgemeine Klassifizierung von Weinfehlern**

Ob eine Stoffwechselaktivität eines an der Weinbereitung beteiligten Mikroorganismus gewollt oder unerwünscht ist, hängt von mehreren Faktoren ab. Zum einen spielt der angestrebte Weinstil eine entscheidende Rolle, zum anderen müssen Rebsorteneigenheiten und Kundenpräferenzen berücksichtigt werden. Nicht jedes bakteriell erzeugte und sensorisch aktive Molekül kann eindeutig zu den Weinfehlern gezählt werden. Diacetyl beispielsweise, das dem Wein einen buttrigen Charakter verleiht, wird für manche Weinstile sogar aktiv gefördert, in vielen Weinen aber weitestgehend vermieden.

Im Rahmen dieser Arbeit sind nur solche Stoffe als Weinfehler in Betracht gezogen worden, die unbestreitbar zum Verderb oder der sensorischen Ablehnung des Weines beitragen, sofern sie in geeigneten Mengen gebildet werden. Dazu zählt die Stoffklasse der flüchtigen Phenole, die aus Hydroxycimtsäuren gebildet werden und die den „Mäuselton“ verursachenden Pyridine, die aus dem Aminosäurestoffwechsel stammen. Als meist nicht sensorisch relevante Stoffgruppe werden ebenfalls biogene Amine betrachtet, da sie als Verderbnisindikatoren angesehen werden und in einigen Fällen eine direkte Auswirkung des Bakterienstoffwechsels darstellen.

### **1.2.2. Vorstufen der Fehltonsubstanzen**

#### **1.2.2.1. Aminosäuren**

Das Wissen um die Zusammensetzung der Aminosäuren in Mosten und Weinen ist von entscheidender Wichtigkeit für die Qualität des fertigen Produkts (Fantozzi und Montedoro 1974). Aminosäuren tragen nicht nur zum Geschmack von Lebensmitteln bei, sondern sind auch Vorstufen für Aroma- und Farbstoffe. Die Gesamtzahl der natürlich vorkommenden Aminosäuren liegt bei 200, wobei nur etwa 20 davon in Proteine eingebaut werden (Belitz, Grosch et al. 2001).

Stickstoff wird in die Pflanze in Form von Ammonium aufgenommen und über die Zwischenstufen Glutamin und Glutaminsäure in andere Aminosäuren umgewandelt. Traubenmost enthält zwischen 60 und 2400 mg Stickstoff pro Liter. Proteine machen



im Most bis zu 13 % des Gesamtstickstoffs aus. Im Wein kann der Gehalt auf bis zu 38 % ansteigen. Der Anteil von Polypeptiden liegt abhängig von der Art der Traubenverarbeitung zwischen 20 und 90 % des Gesamtstickstoffs. Prolin macht den mengenmäßig größten Anteil an Aminosäuren im Most aus, wobei der Gehalt erst bei zunehmender Traubenreife ansteigt. Anfänglich ist Glutamin für den größten Anteil verantwortlich. Fäulnisbefall beeinflusst die Aminosäurezusammensetzung nachhaltig und kann zu einer Reduktion des Gehaltes von bis zu 61 % führen (Zoecklein, Fugelsang et al. 1999). Für Aminosäuren gibt es im Most drei verschiedene Stoffwechselwege, die von Hefen verwendet werden können: [1] direkte Verstoffwechslung, [2] Umbau in eine andere Substanz und [3] Abbau unter Freisetzung von Stickstoff (Boulton, Singleton et al. 1996).

Ein Teil der in der Traube vorhandenen Stickstoffverbindungen fällt bei der Traubenverarbeitung gebunden an Gerbstoffe aus. Die verbleibenden 70-80 % werden von der Hefe teilweise genutzt (Belitz, Grosch et al. 2001), die wie jeder Mikroorganismus Stickstoffverbindungen zum Aufbau von Zellmasse und damit zur Vermehrung benötigt. Während der Hefevermehrung findet hauptsächlich eine Umbildung der Aminosäuren statt, das heißt, die Hefe transaminiert einige Aminosäuren um ihren spezifischen Bedarf zu decken (Boulton, Singleton et al. 1996).

Durch die Gärung nimmt der Aminosäuregehalt um durchschnittlich 80 % ab (Dittrich und Großmann 2005). Die Aminosäureaufnahme in die Zelle durch Aminosäure-Permeasen ist abhängig vom Sterolgehalt der Plasmamembran, der wiederum unter anderem von der Sauerstoffversorgung in der Angärphase abhängig ist (Zoecklein, Fugelsang et al. 1999). Die Hefe variiert die Aufnahme während der Gärung. Wenn die Versorgung im Most gut ist, wird Arginin nur sehr wenig oder gar nicht verwendet, sondern reichert sich in der Hefe-Vakuole an. *Saccharomyces* verwendet vorzugsweise Glutamin, Glutaminsäure, Asparagin, Asparaginsäure, Arginin, Serin und Alanin. Andere Aminosäuren werden nur in Spuren oder gar nicht genutzt.

Der Prolingehalt liegt um 800 mg/L in Most und Wein. Unter Gärungsbedingungen wird Prolin nicht von der Hefe verwertet, da die Enzyme zur Aufnahme und Verarbeitung der zyklischen Aminosäure von der Anwesenheit von Ammonium gehemmt werden. Die Verarbeitung ist außerdem sauerstoffabhängig, was das Zeitfenster während der Weinbereitung zusätzlich einschränkt. Erhöhte



Sauerstoffzufuhr kann zur Aufnahme und Verarbeitung von Prolin führen (Zoecklein, Fugelsang et al. 1999).

Der grundlegende Aminosäurestoffwechsel ist in Abbildung 1-3 dargestellt.

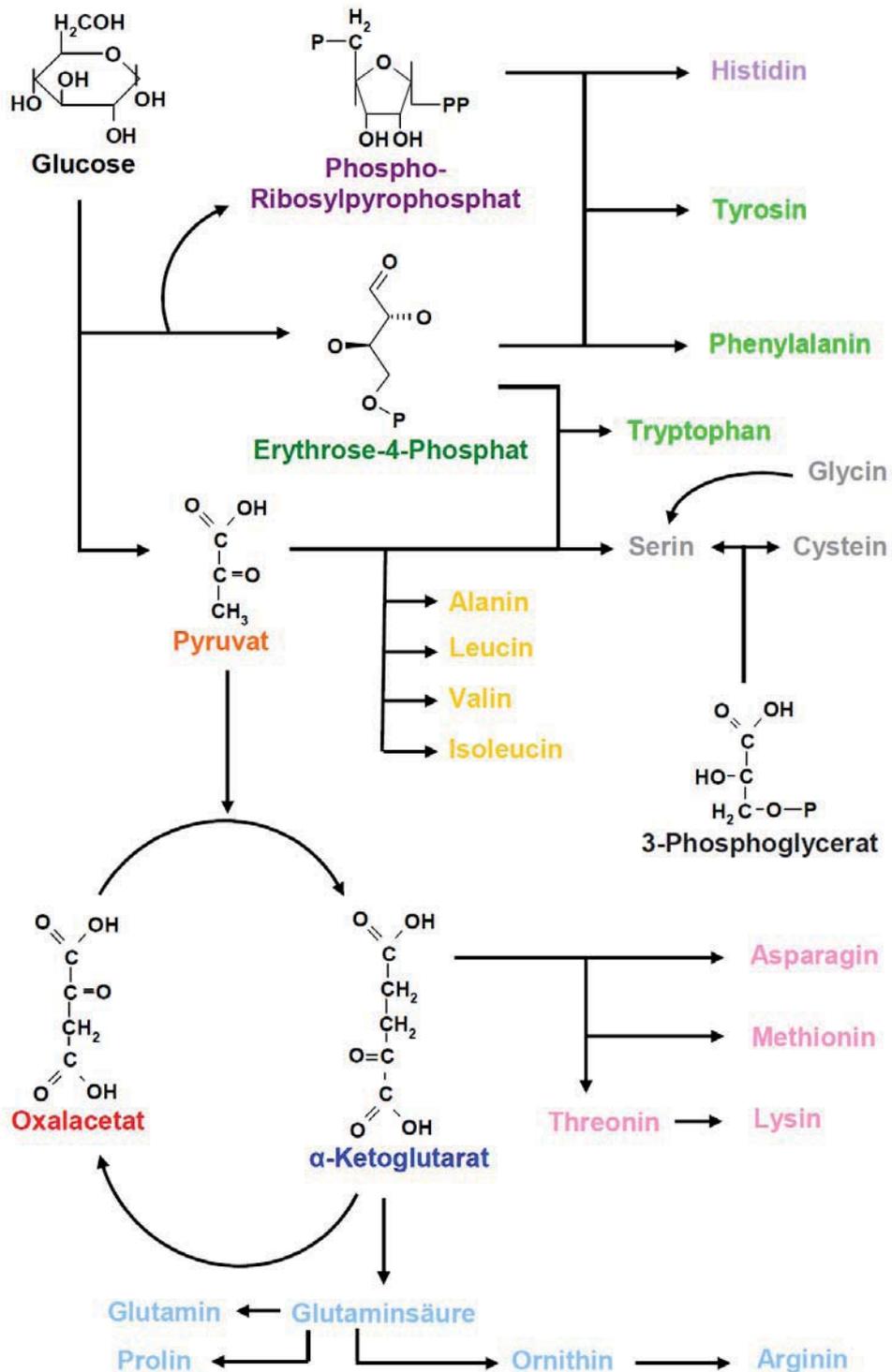


Abbildung 1-3 Bildung von Aminosäuren im Stoffwechsel von Pflanzen und Mikroorganismen



Im Vorfeld und während des Abbaus der ersten zwei Prozent Zucker werden zahlreiche Stickstoffverbindungen von der Hefe aufgenommen. Dabei werden zuerst Aminosäuren konsumiert, die zur Synthese von Zellbestandteilen wie Proteinen gebraucht werden, danach erfolgt erst die Aufnahme zur Verwendung in anderen Reaktionen (Boulton, Singleton et al. 1996).

Durch die Hefeautolyse treten wieder Aminosäuren in den Wein über und verändern das Spektrum nachhaltig (Troost, Bach et al. 1995). Vor allem Arginin wird direkt über dem Hefegeläger in höheren Konzentrationen vorgefunden (Dittrich und Großmann 2005). Das Maximum ist hierbei nach circa zwei Monaten Hefelagerung erreicht. Die freigesetzten Aminosäuren sind ein potentiell Nährmedium für andere Mikroorganismen wie zum Beispiel Milchsäurebakterien (Zoecklein, Fugelsang et al. 1999).

Hefen nehmen eine gewisse Menge an Aminosäuren auf und lagern diese ein. Die Aufnahme erfolgt in einer bestimmten Reihenfolge (Walker 2000), wobei es über ein einheitliches Verwertungsmuster keine Einigung gibt, da die Menge und Geschwindigkeit des Transports beispielsweise von der Konzentration im Medium, dem pH-Wert und dem verwendeten Stamm abhängig sind.

Wird der Most durch Absetzen vorgeklärt, reduziert sich der Stickstoffgehalt um 10-15 %. Bentonit entfernt abhängig vom pH-Wert Proteine, Peptide und Aminosäuren um bis zu 50 %, was zu Gärproblemen führen kann. 1 g/L Bentonit kann ausreichen um den Aminosäuregehalt um 15 – 30 % zu reduzieren (Zoecklein, Fugelsang et al. 1999).

Im Gegensatz zu Bakterien können Hefen einen Speicher an Aminosäuren in der Zelle anlegen. Basische und neutrale Aminosäuren werden in die Vakuole eingelagert, während saure im Cytoplasma bleiben. Bakterien speichern keine Aminosäuren in der Zelle, sondern nehmen nur das auf, was sie brauchen. Hefen verschaffen sich so einen Wettbewerbsvorteil (Boulton, Singleton et al. 1996).

Das Verwertungsmuster der im Most vorhandenen Aminosäuren ist oft schwer zu interpretieren, da es von zahlreichen Faktoren abhängig ist. Unter anderem ist die Konzentration der einzelnen Aminosäuren entscheidend. Ist die Konzentration nahe dem Niveau, welches physiologisch gebraucht wird, kommt es zur vollständigen Aufnahme des Stoffes. Ist die Aminosäure im Überfluss vorhanden, kann es sein, dass sie gar nicht aufgenommen wird. Andere Stoffgruppen können ebenfalls einen Einfluss auf die Aufnahme haben, wie Versuche in synthetischem Medium im



Vergleich zu Traubenmost gezeigt haben. Der Hefe- bzw. Bakterienstamm spielt auch eine wichtige Rolle. Daher dürfen Beobachtungen mit einzelnen Hefestämmen nicht generalisiert werden (Boulton, Singleton et al. 1996).

Glutaminsäure dient häufig als Stickstoff – Donor in Transaminierungsreaktionen. Viele Aminosäuren, die für andere Hefegattungen eine gute Stickstoffquelle darstellen, werden von *Saccharomyces* nicht oder nur schwach verstoffwechselt wie z.B. Lysin, Histidin, Cystein und Glycin. Unter Sauerstoffeinfluss kann in den Mitochondrien auch Prolin zu Glutaminsäure umgewandelt werden, wobei der Sauerstoff sowohl zur Enzymexpression des Transporters in die Zelle, als auch stöchiometrisch zur Reaktion benötigt wird. Unter Gärungsbedingungen findet also weder Aufnahme noch Verstoffwechslung statt. Arginin wird zuerst zu Ornithin abgebaut, das dann über Glutamat zu Prolin umgebaut oder zu Polyaminen verstoffwechselt wird. Über diesen Weg kann es zu einem Anstieg des Prolingehaltes kommen, wenn kein Sauerstoff zur Verfügung steht um Prolin abzubauen (Boulton, Singleton et al. 1996).

Aus dem bakteriellen Abbau von Arginin durch *Lactobacillus* wird Ammonium freigesetzt, was wiederum eine pH-Wert Anhebung zur Folge hat. Das könnte ebenfalls ein Schutzmechanismus sein, um das Zellinnere gegen niedrige pH-Werte zu schützen. Unter normalen Bedingungen verbleibt kein Arginin im Medium. Das nicht wie eben beschrieben umgesetzte Arginin, wird zu Ornithin oder Citrullin verstoffwechselt. Ein möglicher Grund könnte sein, dass der Transport des Arginin in die Zelle keine zusätzliche Energie kostet (Tonon und Lonvaud-Funel 2002).

Die Aminosäurezusammensetzung nach der Gärung korreliert nicht mit der Zusammensetzung des Mostes. Die größte Varianz entsteht durch die zahlreichen Trans- oder Deaminierungsreaktionen. Auch die Freisetzung gegen Ende der Gärung vor und bei der Autolyse entscheiden maßgeblich über die Ausgangssituation für einen eventuellen BSA. Ein überwiegender Teil der Aminosäuren wird vor der Autolyse frei gesetzt, wenn 90 % der Zellen noch vital sind. Die Gründe dafür sind unklar (Boulton, Singleton et al. 1996).

### 1.2.2.2. Phenolische Substanzen

Phenolische Substanzen können klassifiziert werden in Phenolsäuren ( $C_6-C_1$ ), Hydroxyzimtsäuren ( $C_6-C_3$ ), Stilbene ( $C_6-C_2-C_6$ ), Flavonoide ( $C_6-C_3-C_6$ ) und