

Verringerung der Essigsäure in Traubenmost und Wein durch Anwendung mikrobiologisch-technischer Verfahren

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Neustadt Institut für Weinbau und Oenologie Prof. Dr. Ulrich Fischer/Prof. Dr. Maren Scharfenberger-Schmeer Westschweizer Hochschule für angewandte Wissenschaften und Kunst Changins, Hochschule für Vitikultur und Önologie, Nyon Prof. Dr. Roland Riesen/Prof. Dr. R. Mira de Orduña Heidinger
Industriegruppe(n):	Deutscher Weinbauverband e.V. (dvw), Bonn Projektkoordinator: Steffan Haub Reh Kendermann Weinkellerei GmbH, Bingen
Laufzeit:	2017 - 2020
Zuwendungssumme:	€ 519.750,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Essigsäure wird bereits ab 0,5 g/L bzw. 0,6 g/L in Weiß- und Rotweinen als Fehleroma wahrgenommen. Unterhalb dieser sensorischen Schwelle kann Essigsäure als störend empfunden werden und zudem die Sortenaromatik eines Weines maskieren. Die Bildung des sensorisch besonders auffälligen Ethylacetats, oft als Lösungsmittelnote beschrieben, ist aufgrund seiner Bildung aus Essigsäure als direkter Folgeschaden anzusehen. Die Essigsäureproblematik spielt sich für den Weinerzeuger somit bereits deutlich unterhalb der gesetzlichen Grenzwerte für Essigsäure von 1,08 g/L bzw. 1,2 g/L in Weiß- und Rotweinen ab.

Im Prozess der Weinbereitung wird Essigsäure bereits im Lesegut, vor allem durch Essigsäurebakterien der Gattungen *Acetobacter* und *Gluconobacter*, gebildet. Diese werden oft als Sekundärinfektion bei beschädigten Weintrauben angetroffen. In den letzten Jahren hat insbesondere das starke Auftreten der Kirschesigfliege *Drosophila suzukii* zu starken phytosanitären Problemen geführt und prognostiziert eine angespannte Situation in den kommenden Jahren für deutsche Winzer.

Bereits seit einigen Jahren werden membranstützte Verfahren zur Essigsäurereduzierung betroffener Weine erprobt, allerdings nur mit mäßigem Erfolg. Eine Zulassung dieser Verfahren innerhalb der EU ist nicht in Sicht und wäre zudem nicht zur Behandlung von Weinen oberhalb der Grenzwerte legal. Für eine Behandlung von Most ist diese Methode zudem technisch ungeeignet. Es gibt Ansätze, die im Most vorhandene Essigsäure bereits während der Gärung durch Hefen abzubauen. So konnte in einzelnen Experimenten gezeigt werden, dass geeignete Weinhefen unter bestimmten Gärbedingungen prinzipiell Essigsäure abbauen können. Es bestand jedoch noch keine Praxistauglichkeit dieser Verfahren, da die komplexen Faktoren, die zu einem stabilen Essigsäureabbau führen, weitgehend unbekannt waren. Entscheidend scheint vor allem der Gehalt an Zucker während der Gärung zu sein, der innerhalb eines gewissen Rahmens die Weinhefen zur Nutzung der Essigsäure als alternative Energiequelle stimuliert. Die Möglichkeiten dieser Stimulation sind zudem stark abhängig von der genetischen Ausstattung des jeweiligen Weinhefestammes und sind nur zum Teil erforscht. Mit dem sog. Fed-Batch-Verfahren, das z.B. in der

Biotechnologie seit Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt wird, existiert ein prozesstechnologischer Ansatz zur gezielten Vergärung von Traubenmost unter strenger Kontrolle von gewünschten Zielparametern. Diese Technologie sollte im Forschungsvorhaben genutzt werden, um stabile Rahmenbedingungen für eine aktive Essigsäurereduzierung durch Hefen zu schaffen, und den Praxisbetrieben eine zuverlässige Möglichkeit zu bieten, bereits während der Gärung und vor dem Weinstadium problematische Essigsäuregehalte im Endprodukt zu vermeiden.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, durch Entwicklung einer modifizierten Gärführung eine analytisch und sensorisch relevante Minderung des Essigsäuregehalts in Most und Wein zu gewährleisten. Hierzu sollten innovative mikrobiologisch-technische Strategien, wie die Fed-Batch-Gärung, eingesetzt werden. Die Eigenschaften bestimmter Weinhefen, Essigsäure abzubauen, sollten erforscht und für die Weinbereitung nutzbar gemacht werden. Durch die Aufklärung molekular-biologischer Grundlagen des Essigsäuremetabolismus von Hefen sollte zudem eine rasche Screening-Möglichkeit von Hefestämmen bezüglich ihrer Essigsäureabbaufähigkeit geschaffen werden. In einer komplementären technologischen Strategie sollen diese molekularbiologischen Erkenntnisse bei der Modifikation klassischer Gärungen und dem Fed-Batch-Gärverfahren umgesetzt werden.

Forschungsergebnis:

Bei der Schwellenwertbestimmung konnte gezeigt werden, dass die Schwellenwerte für Ethylacetat sortenunabhängig waren, während für Essigsäure signifikante sortenabhängige Unterschiede bestimmt wurden. Beim Screening von 31 *S.-cerevisiae*-Stämmen ergab sich ein breites Spektrum, das von Stämmen mit Tendenzen zur Bildung bis zum Abbau von Essigsäure reichte. Die in diesem Kontext positiv aufgefallenen Resultate bei Einsatz des Hefestamms DV10 im Jahr 2017 erwiesen sich in späteren Jahren jedoch als nicht reproduzierbar, ebenso weitere zuvor positiv aufgefallene Stämme. Die potentiellen Kandidaten wurden zwischenzeitlich in weiteren Versuchsreihen erprobt. In Versuchen zur Refermentation von Weinen mit erhöhten Essigsäuregehalten zeigte sich, dass diese ohne eine Vorbehandlung des Heferefermentationsansatzes nicht zum gewünschten Abbau führte, daher wurden in weiteren Versuchen mögliche Manipulationen des Essigsäuremetabolismus erforscht. Zwischenzeitlich hatte die molekular-

biologische Charakterisierung zum einen gezeigt, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Essigsäureabbau und der Expression der am Essigsäurestoffwechsel beteiligten Gene ACS1, ACS2 und FPS besteht. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass in Abwesenheit von Zucker die Gene ACS1, ACS2 und FPS erst 10-14 Tage nach der Hefezugabe überexprimiert werden und die Überexpression bei ACS1 um ein Vielfaches höher als bei ACS2 ist. Daher wurden Abbauxperimente mit zuckerfrei vorkultivierten *S. cerevisiae* durchgeführt. Hierbei zeigte sich jedoch, dass dieses Vorgehen alleine den Essigsäureabbau nicht wie gewünscht anregt. Auch weitere Parameter, wie pH-Wert, Pantothen säureversorgung und Inokulationsdosage, führten nicht zur Aktivierung des Essigsäureabbaus der Hefezellen. Hohe Inokulationsdosagen von 250 g/hl führten sogar zu einer zusätzlichen Bildung von Essigsäure.

In einem Nicht-Saccharomyceten-Screening wurden *Metschnikowia pulcherrima* und in geringerem Maße *Candida guilliermondii* und *Candida zeytanoides* als potentielle Stämme für Essigsäureabbau identifiziert. Diese können als Ausgangspunkt künftiger Forschung zum Essigsäuremanagement dienen und bereits in die kellerwirtschaftliche Beratung einfließen. Im Rahmen der molekularbiologischen Charakterisierung wurde zudem eine Methode zur Stabilisierung von biologischen Proben entwickelt, die den Austausch von Fermentationsproben in künftigen Forschungsvorhaben zwischen Forschungsstellen oder Kooperationspartnern ermöglicht.

Auf der kellertechnologischen Seite erlaubte das Fed-Batch-Verfahren auch traditionellen *Saccharomyces-cerevisiae*-Hefen, große Mengen Essigsäure abzubauen, und zwar unabhängig davon, ob Essigsäure bereits im Most vorhanden war oder während der Gärung zugegeben wurde. Der Abbau erreichte unter günstigen Bedingungen über 80 % bei Essigsäurekonzentrationen von 1-1,2 g/l. Gleichwohl demonstrieren die Ergebnisse auch, dass das Potential des Fed-Batch-Verfahrens nur bei einer ausreichenden Nährstoffversorgung effektiv umgesetzt werden kann. Die Zugabe von Thiamin war unerlässlich, um eine signifikante Bildung von Brenztraubensäure (Pyruvat) in Gegenwart hoher Essigsäurekonzentrationen zu vermeiden. Die Relevanz anderer Vitamine und Kationen bedarf weiterer Studien. Fed-Batch-Fermentationen konnten auch bei Anwendung im größeren Maßstab (20 l Gebinde) im Vergleich zu Batch-Fermentationen eine effektivere Reduzierung von

Essigsäure bewirken. Es zeigte sich, dass aufgrund der größeren Systemkomplexität von Fed-Batch-Verfahren höhere Ansprüche an die Systemrobustheit gestellt werden müssen. Diese Weiterentwicklung kann die Grundlage für einen entsprechenden Anlagenbau im Kontext eines integrierten Essigsäuremanagements bilden, von der zahlreiche Winzerbetriebe langfristig profitieren.

Wirtschaftliche Bedeutung:

In Deutschland wurden im Jahr 2019 insgesamt 7,7 Mio hl Wein, davon 63 % Weißwein, produziert. Die deutsche Weinwirtschaft, zu der 18.700 Weinbaubetriebe zählen, besteht ausschließlich aus kleinen und mittelständischen Unternehmen, die keine eigenen Forschungsressourcen besitzen. Der Essigsäureproblematik konnte daher bisher nicht strategisch begegnet, und Qualitätsminderungen durch Essig- und Ethylacetatstich bis hin zum Verlust der Verkehrsfähigkeit mussten in Kauf genommen werden. Hohe Essigsäuregehalte (~0,6-0,7 g/L) selbst unterhalb der gesetzlichen Schwellenwerte führen angesichts des scharfen Wettbewerbs im Weinimportland Nr. 1 schnell zur Auslistung oder Ablehnung durch die aufkaufenden Kommissionäre. Die Verluste können auf 2-5 Mio. € p.a. geschätzt werden.

Durch die Forschungsergebnisse wurden Grundlagen geschaffen, um im Rahmen kellerwirtschaftlicher Beratung den Betrieben diejenigen Praktiken zu empfehlen, die zu Vermeidung und Verminderung hoher Essigsäuregehalte beitragen. Neben der Weinwirtschaft können auch Unternehmen des Maschinen- und Anlagenbaus sowie die Hersteller prozessanalytischer Technologien durch Erschließung oder Erweiterung neuer Betätigungsfelder von den Forschungsergebnissen profitieren. Auch Hersteller von Reinzuchthefen können insbesondere durch die rasche Selektionsmöglich-

keit anhand der molekularbiologischen Marker auf die Anforderungen seitens der Weinerzeuger reagieren und entsprechende Produkte entwickeln bzw. vermarkten.

Publikation (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2020.
2. Roca-Domènech, G., Cordero-Otero, R., Rozès, N., Cléroux, M., Pernet, A. & Mira de Orduña, R.: Metabolism of *Schizosaccharomyces pombe* under reduced osmotic stress conditions afforded by fed-batch alcoholic fermentation of white grape must. Food Res. Int. 113, 401-406 (2018).
3. Frohman, C.A. & Mira de Orduña, R.: The substratostatan automated near-infrared spectroscopy-based variable-feed system for fed-batch fermentations of grape musts. OENO One 52 (4), 1-11 (2018).

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei den Forschungsstellen abzurufen.

Weiteres Informationsmaterial:

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum
(DLR) Rheinland
Institut für Weinbau und Oenologie
Breitenweg 71, 67435 Neustadt/Weinstraße
Tel.: +49 6321 671-294
Fax: +49 6321 671-375
E-Mail: maren.scharfenberger-schmeer@dlr.rlp.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das IGF-Vorhaben **AiF 18907 N** der Forschungsvereinigung
Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Godesberger Allee
125, 53175 Bonn, wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur
Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom
Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines
Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.