

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

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstellen:	Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz Institut für Weinbau und Oenologie, Neustadt/Weinstraße 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. (dwv), Bonn Projektkoordinator: Steffan Haub Reh Kendermann Weinkellerei GmbH, Bingen
Laufzeit:	01.02. 2017 – 31.12.2020
Zuwendungssumme:	€ 519.7500,-- (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 Fehl aroma wahrgenommen. Unterhalb der 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 im Wein 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 Kirschessigfliege *Drosophila suzukii* zu starken phytosanitären Problemen geführt und prognostiziert eine angespannte Situation in den kommenden Jahren für deutsche Winzer.

Bereits seit einigen Jahren werden membrangestützte Verfahren der Essigsäurereduzierung betroffener Weine erprobt, allerdings nur mit mäßigem Erfolg. Eine Zulassung innerhalb der EU ist jedoch 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 Praxisauglichkeit, 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 molekularbiologischer Grundlagen des Essigsäuremetabolismus von Hefen sollte zudem eine rasche Screening-Möglichkeit von Hefestämmen bezüglich ihrer Essigsäureabbaufähigkeit geschaffen werden. In einer komplementären technologischen Strategie sollten 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 den 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 molekularbiologische 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 Abbauprobieren 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 Maß *Candida guilliermondii* und *Candida zeytanoidea* 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, das 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 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 an sich können Anlagenbauer der Getränketechnologie sowie die Hersteller prozessanalytischer Technologien durch Erschließung oder Erweiterung neuer Betätigungsfelder direkt von den Forschungsergebnissen profitieren. Auch Hersteller von Reinzuchthefen können insbesondere durch die rasche Selektionsmöglichkeit anhand der molekularbiologischen Marker auf die Anforderungen seitens der Weinerzeuger reagieren und entsprechende Produkte entwickeln bzw. vermarkten.

Publikationen (Auswahl)

- 2018** G. Roca-Domènech, R. Cordero-Otero, N. Rozès, M. Cléroux, A. Pernet, R. Mira de Orduña, Metabolism of *Schizosaccharomyces pombe* under reduced osmotic stressconditions afforded by fed-batch alcoholic fermentation of white grape must, Food Res Int 113: 401-406
- 2018** C.A. Frohman, R. Mira de Orduña , The substratostatan automated near-infrared spectroscopy-based variable-feed system for fed-batch fermentations of grape musts. OENO One 52 (4): 1-11
- 2020** Salvadé, Jaccard, Pernet and Mira de Orduña (2020) Real-time quantification of sugars and ethanol during wine fermentation using an innovative miniature spectral analyser Journal of Wine Research
- 2021** Scharfenberger-Schmeer and Mira de Orduña (2021) Acetic acid metabolism of oenological Saccharomyces and non-Saccharomyces yeast in model grape must at various initial sugar and acetic acid concentrations OENO One (in Arbeit)

Weiteres Informationsmaterial

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum

(DLR) Rheinpfalz

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

Förderhinweis

...ein Projekt der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie



Forschungsnetzwerk
Mittelstand



FORSCHUNGSKREIS DER
ERNÄHRUNGSINDUSTRIE E.V.

Das o.g. IGF-Vorhaben 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.