

Chemie & Mikrobiologie des Weines

Teil 2

HR Dr. Reinhard EDER
Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau
Wiener Straße 74, 3400 Klosterneuburg
Tel. 02243/37910-223
Reinhard.Eder@weinobst.at

HEFEN AUF DER TRAUBE

Römpf:

Eukaryonten; Gruppe von **Pilzen**, i.d.R. einzellig, nur wenige mit **Myzel**-Bildung
rundlich ovale Einzelzellen (Länge: 1-9 µm, Durchmesser: 1-5 µm)
meist wenig-zellig bis verzweigt-kettige Verbände

Dittrich:

Pilze, Vermehrung durch **Sprossung (asexuell)**; oder auch **Sporen (sexuell)**
keine systematisch einheitliche Gruppe

Charakteristika von Hefen:

Eukaryo(n)ten, zählen zu Pilzen > 500 Hefearten bekannt
Zellwand: Homopolysaccharide (**Glucan** und **Mannan**) und Mannoproteine, gelegentlich **Chitin** (Peptidoglycan).
Reservestoff = **Glycogen**, hoher Gehalt an **Vitamin B**.
In Zellwand periphere Membranproteine (z.B. Invertase, Transportproteine)

Morphologie: unterschiedlich, meist rundlich bis oval,

Größe: 5-10 x 5-12 µm (Ø 10 x 10 µm)

Generationszeit: ca. 60 min

UNTERSCHIEDUNG WILDE HEFE - WEINHEFEN

Nach Boulton, et al. USA, 1996:

WEINHEFEN: Hefen auf Trauben, in Weingärten in Tafel- oder Dessertweinen, in gesunden wie in verdorbenen Weinen, sowie in Kellereien und auf Kellereigeräten. Können Gärung vollenden, hohe Alkoholtoleranz.

Gattungen **Saccharomyces**, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Dekkera* und *Zygosaccharomyces*

WILDE HEFEN: Gärfähige Hefen, die **nicht** zur Gattung **Saccharomyces** zählen.

Können, falls sie nicht gehindert (SO₂-empfindlich) werden, an Weinvergärung, insb. zu Gärungsbeginn, teilnehmen; geringe Alkoholtoleranz.

Gattungen: *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Hansenula* und *Metschnikowia*.

Vermehrung:

Vegetative Vermehrung: Sprossung, Spaltung (*Schizosacch.*)

Generative (geschlechtliche Vermehrung): Sporen, Ascus.

EINTEILUNG DER HEFEN

1) Ascosporige Hefen: = echte Hefen.

bilden Asci und sind Schlauchpilze (Ascomycetes) z.B. *Saccharomyces*

2) Basidiosporogene Hefen = Ständerpilze
Basidiomyceten, keine Weinhefen

3) Ballistosporogene Hefen: z.B. *Bullera*

4) Fungi imperfecti, („unvollständige Pilze“), Deuteromyceten, hefeartige Pilze, asporogene Hefen; keine sexuelle Vermehrungsform bekannt
z.B. *Candida*, *Torulopsis*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula* .

Methoden zur Taxonomie von Weinhefen:

I) Morphologische & physiologische Tests:

1) Art der Zellteilung:

1.1. Spaltung (*Schizosaccharomyces*), Sprossung (*Knospung*): a) bipolar (z.B. *Hanseniaspora*); b) multilateral (z.B. *Saccharomyces*), c) mehrfach-gleichzeitig (z.B. *Brettanomyces*, *Dekkera*)

2) Sporulation:

Sporenbildung: ja (z.B. *Brettanomyces*), nein (z.B. *Dekkera*), Weinhefen üblicherweise diploid (**vegetativer Zyklus**), Ausnahmefälle haploid z.B. *Zygosaccharomyces*.

sexuelle, generative Zyklus: Reduktionsteilung (Meiose) =>

4 haploide Zellen = Ascosporen (2 Typen α & a) Unterscheidung: Sporenform (Lichtmikroskop)

3) Kolonienfarbe

rosa/rote Kolonien: *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus*
cremige/gelbe Kolonien: *Candida* (*Hansenula*, *Pichia* ...)

4) Physiologische Tests:

- 4.1. Assimilation verschiedener C-Quellen
- 4.2. Vergärung von Zuckern
- 4.3. Essigsäure-Bildung (*Dekkera*, *Brettanomyces*)
- 4.4. Nitrat-Assimilation (*Hansenula*)
- 4.5. Wachstum in vitaminfreien Medien u.a.
- 4.6. Bildung von H₂S

5) Myzel-Bildung:

- 5.1. kein Myzel, lose Zellen, keine Verbindung (*Saccharomyces*)
- 5.2. echtes Myzel (*Schizosaccharomyces*),
- 5.3. ungegliedertes Myzel (*Brettanomyces*)
- 5.4. Pseudomyzel, astförmig, sprossende Zellen (*Candida*, *Pichia*)

6) Bestimmung Isoenzym-Polymorphismus:

II) Karyotype Analyse - DNA/RNA Analyse

Zellkern der Wildhefen i.d.R. diploid =>

2x16 Chromosomen, 1 Chromosom ca. 200.000 Basen,
Gesamtenom ca. 14.000.000 Basen

Extrachromosmale genetische Information :

Plasmid, Mitochondrien (ca. 80.000 Basen)

Reinzucht-Weinhefen häufig polyploid,

i.d.R. Tri- & Tetraploidie: >2 homologe Chromosomensätze.

Ursache der Polyploidie: jahrhundertelanger Selektionsarbeit.

Bedeutung: verstärkte Genproduktsynthese, stärkeres Wachstum, intensiverer Stoffwechsel, geringere phänotypische Ausprägung von Mutationen

Restriktions-Enzym-Schnittmuster:

Probleme: große Bruchstücke

Verbesserung: Analyse repetitiver DNA-Sequenzen oder von mitochondrialer DNA (Microsatelliten)

2) Neuordnen (rearrangement) des Genoms:

=> unterschiedlich lange DNA-Bruchstücke, Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

3) Chromosomen-Analyse:

Elektrophoretische Trennung und Bestimmung der Chromosomengröße durch Feldumkehr-Elektrophorese (FIGE) bzw. Pulsfeldgelelektrophorese

4) Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

Wiederholte Vermehrung (Amplifizierung) kleinster DNA-Mengen

HEFEZAHL AUF TRAUBEN

10-100 Zellen/ml - 10^1 - 10^2 Zellen pro ml Most

Hpts. *Hanseniaspora* (60-90%), *Metschnikowia*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*

Anteil *Saccharomyces cerevisiae* sehr gering (ca. 1%), zT. noch niedriger Anteil (<1 %)

Nach dem Pressen: 1.000-10.000.000 Zellen/ml ; 10^3 - 10^7 Zellen pro ml

Hefe bei Spontangärung kommt zumeist vom Keller und nicht vom Weingarten („terroir“)

APICULATUSHEFEN:

(„*Wilde Hefen*“)

Form: Kugelige, ellipsoide an beiden Polen zugespitzt Zellen, relativ klein (1,5-5)x(2,5-11) µm („*Flughefen*“)

Vertreter von 2(4) Gattungen :

Brettanomyces/Dekkera:

Verursacher des Weinefehlers „Pferdeschweiß“

Hanseniaspora (früher Kloeckera – keine Sporenbildung)

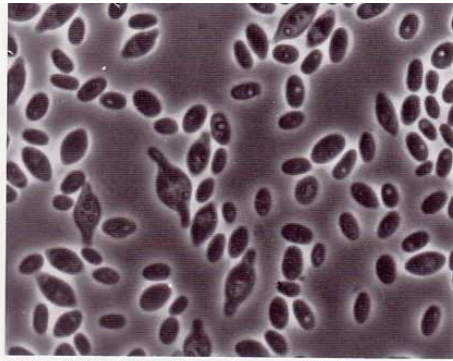
Zitronenförmig zugespitzt (bipolar), auch ellipsoid

Vorkommen: ubiquitär, v.a. verletzte, verderbende Beeren, Übertragung: Essigfliege *Drosophila* (Darm), Moste, Traubenwein, in der Angärungsphase (Apfelweinaroma), Rasche Vermehrung; Unterdrückung durch Reinzuchthefer, SO₂.

- ❖ *kurze Generationszeit (1/2 so lang wie Saccharomyces),*
- ❖ *geringe Gärvermögen (idR. 5-6 % vol, max 10 %vol),*
- ❖ *Kälteverträglich (Vorsicht bei Kaltmazeration)*
- ❖ *höhere Alkoholtoleranz (bis 12 % vol), ev. Nachtrübungen*
- ❖ *Glucose & Fructose werden gleich schnell vergoren, Saccharose kann nicht vergoren werden*
- ❖ *starke Glycerinbildung,*
- ❖ *geringe SO₂-Toleranz, vollständige Unterdrückung durch Mostschwefelung mit 50 mg/l*
- ❖ *starke Bildung von Essigsäure (bis 1,2 g/l) und Essigsäureethylester (EET-UHU-Ton) => Weinefehler*
- ❖ *Bildung von Schwefelwasserstoff (unreiner Ton)*
- ❖ *Antibiose gg Saccharomyces cerevisiae*

Arten: *Hanseniaspora uvarum* früher *Kloeckera uvarum*

Verhinderung: Most-SO₂, Entschleimung, Reinzuchthefer



11 *Kloeckera apiculata*. Bipolare Sprossung. WA (P).

KAHMHEFEN:

Gärschwache Hefen - geringe Alkoholtoleranz, sind an Angärphase beteiligt.

Vertreter von 5 Gattungen:

Candida, Metschnikowia, Hansenula, Pichia, Debaryomyces

Zellen wachsen in die Länge => Pseudomycel (Hefedecke),

Fetteinlagerung, schwimmen auf Flüssigkeit auf,

bilden Kahmhaut (weißer, samtiger Schaum, wie Frischkäse, anfangs am Gefäßrand Ring, => Inseln, wachsen zusammen).

Gattung: PICHIA:

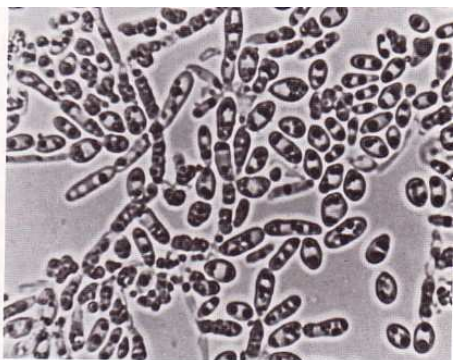
Typische Kahmhefen, mehrseitige Vermehrung, Sprossung; ascosporogen, geringe Gärfähigkeit

Art: Pichia membranaefaciens:

Zellen eiförmig, oval oder zylindrisch, einzelne Zellen bilden Pseudomycel, aerobe Hefe, geringes Gärvermögen (1-2 %vol), bildet auf Traubenmost weiße, später gelblich bis rötliche, dick und grob gefaltete Decken (Name!)

Art: Pichia farinosa

mehlige, befallene Flüssigkeit wie mit Mehl bestreut



12 *Pichia membranaefaciens*. (H).

Gattung: HANSENULA

Sporenbildend (Ascosporen), multilaterale Sprossung, Zellen kugelförmig, ellipsenförmig.

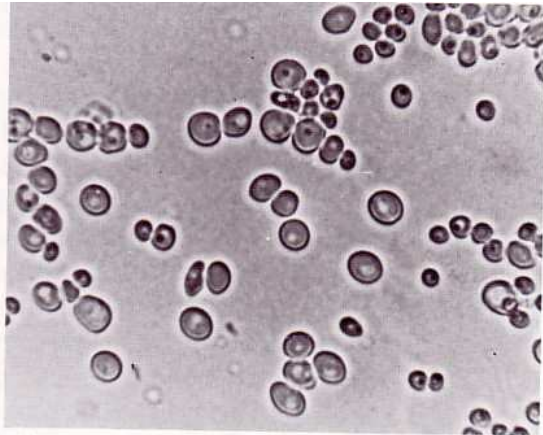
Vorkommen:

bei Luftzutritt auf Most, Wein: trocken, matt aussehende Kahmhaut; Oxidieren Restzucker, Alkohol, Glycerin & Säuren.

CO₂ kann nicht durch Decken entweichen, hohe CO₂ Konz hemmt andere Hefen (z.B. Sacch. cer.) starke Esterbildung (Ethylacetat, Amylacetat), starke Phenylethanolbildung Empfindlich gg. Alkohol, SO₂, positive Nitrat-Assimilation (Unterscheidung zu Pichia).

Art: Hansenula (Pichia) anomala

einzelnen oder in kleinen Haufen, Pseudomycel



6 Hansenula anomala. (H).

Gattung: CANDIDA

keine Sporenbildung, (*F. imperfecti*), haploid, Zellen kugelig, eiförmig, multilaterale Sprossung, weiß-cremefarbenen Kolonien, einfache bis baumähnlich verzweigte Pseudomycel, unterschiedliche Formen, zumeist trockene Haut, grau, weich, glatt, leicht granuliert.

Vorkommen:

Häufig auf Traubenbeeren, Angärung von Mosten (hohe Gehalte an Ethylacetat, Fuselöle (Isobutanol) - [Humaninfektionen]

Art: Candida vini

Häufigste Kahlhefe d Weines, kein Gärvermögen, Oxidation von Ethanol, Glycerin (gering)

Art: Candida stellata:

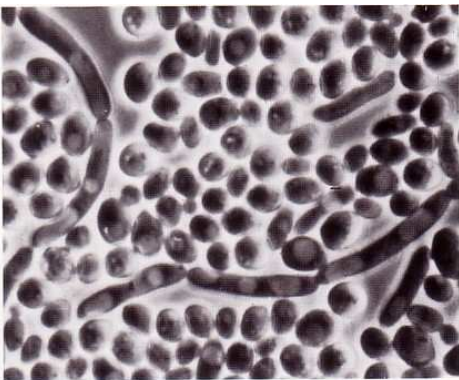
Osmotolerant, hpts. auf botrytisinfizierten Beeren, zuckerreichen Mosten, sternartige Sproßverbände, rel kleine Zellen. Starke Bildung von Glycerin, Mannit & Sorbit.

Art: Candida glabrata:

Früchte & Moste, dünne Haut

Art: Candida (Metschnikowia) pulcherrima:

Schönste Hefe, kugelige Zellen mit Ölkugel, orange bis rote Kolonien. Geringes Gärvermögen, starke Bildung von Arabit, Mannit & Sorbit schon am Stock. Sporenbildende Hefe => Metschnikowia (hpts. in südl. Ländern und bei Botrytis)

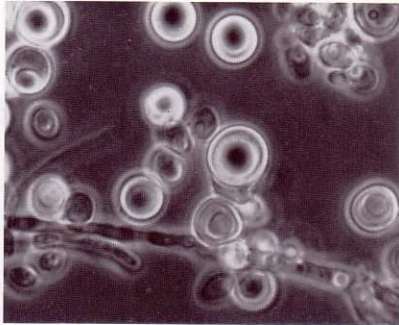


3 Candida kefyr (Candida macedoniensis), WA (P).

Gattung: DEBARYOMYCES

Öfters auf Trauben, verunreinigten Moste,
sehr schwaches Gärvermögen dh. bei Vergärung sehr rasch durch *Apiculatus* und
Saccharomyces Hefen unterdrückt

Bedeutung: Kahmbildende Infektionshefe bei Mosten.



3 *Metschnikowia pulcherrima*. Isolat aus Jungwein WA (P).

Gattung: RHODOTORULA

Reine Atmungshefe, Kolonien rot oder lachsfarben eiförmige Zellen, asporogen,
mit Fetttropfchen und Schleimhülle

Vorkommen:

häufig auf Trauben, kaum im Wein, vertragen max. 8-10 %vol,

häufig auf Gerätschaften (Leitung, Tanks, Füller) => Schmutzindikator => mangelnde
Reinigung- und Desinfektionsarbeit.

Durch Schleimbildung mechanisch schwierig entfernbar, durch Hitze einwirkung schwer
abzutöten (überleben 30 min 55 °C).

Bestandteil des Kellerrotz (gemeinsam mit Bakterien + Algen)

Infektion der Traube, einzelner Beeren mit Schimmelpilzen

(Ascomyceten – so wie Hefen)



SCHIMMELPILZE AUF TRAUBEN

Botrytis cinerea

(Ordnung: Helotiales, Fam. Sclerotiniaceae)

Name von Nebenfruchtform; weißlich-grauer-schwarzer Mycelrasen,

Konidienträger sind gekammert und baumartig verzweigt, an Endzellen sitzen Konidien
10-15 µm lang und 6-10 µm breit

Infektion von Trauben:

Sauerfäule:

unreife Beeren mit wenig Zucker, hohe Säure, $KMW < 18\text{ ‰}KMW$

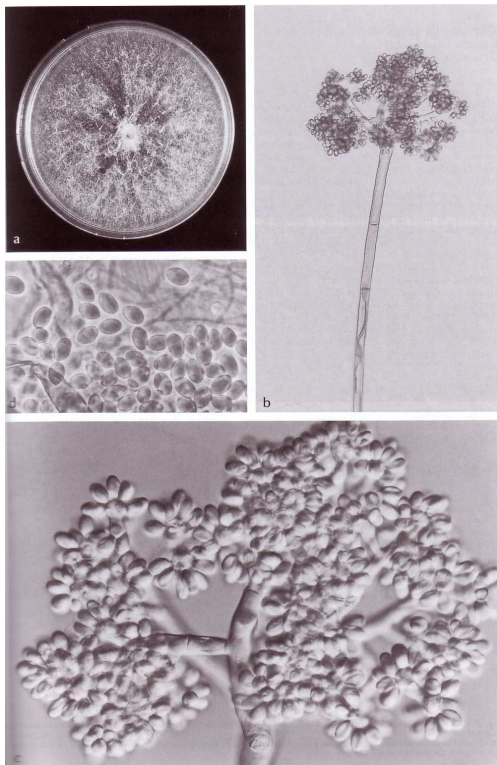
Edelfäule:

reife Beeren, optimaler Zuckergehalt für Prädikatsweine i.d.R. $KMW > 19\text{ ‰}KMW$

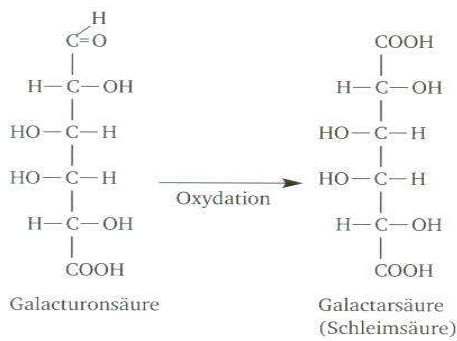
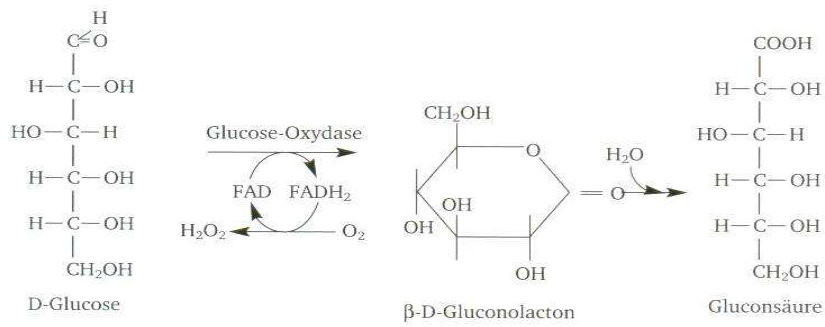
Danach: **Sekundärinfektionen** mit *Penicillium*, *Aspergillus* ...

Botrytis ist Voraussetzung für Beerenauslesen ($25\text{ ‰}KMW$), Ausbruch ($27\text{ ‰}KMW$) und Trockenbeerenauslese ($30\text{ ‰}KMW$),

- Zunahme **Mostgewicht**
- Zunahme **Gesamtsäure**, Äpfelsäure, Zitronensäure
- Bildung von **Glyzerin** = Mostglyzerin
- Bildung von **Zuckersäuren**, Gluconsäure, Galactarsäure (Mucate)
- Bildung von **flüchtiger Säure (Essigsäure)**
- Bildung von **Polysacchariden (Glucane – β 1-3, β 1-6 Glucosen)** – auch Hefe (*Sacch. cerevisiae* bildet etwas Glucan): Filtrationsprobleme, Abbau mit Glucanasen
- Bildung von Laccase (para-Diphenoloxidase, p-DPO): enzym. Oxidation, Farbverluste
- Bildung spezifischer Aromastoffe: Sotolon, Octanole, Octenole
Oxidation, Abbau von Terpenen
- erhöhten SO_2 -Bedarf (Thiamin↓, Depot SO_2 ↑)
- Verringerung des FAN (hefeverfügbare N)
- Verringerung der Rotweinfarbstoffe (Anthocyane)

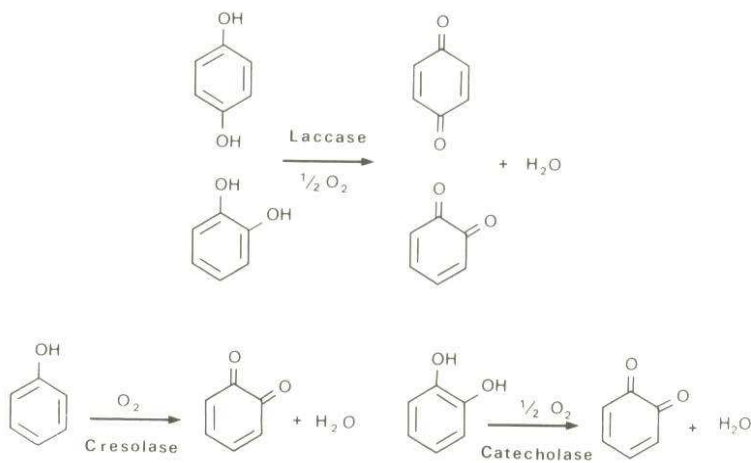


Zuckersäuren infolge Botrytisinfektion:



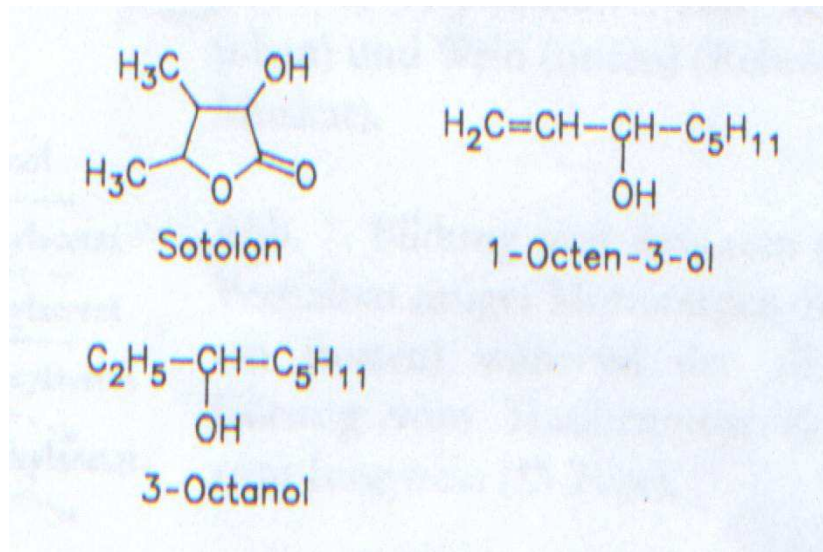
Auch Galactarsäure - Schleimsäure - ist ty

Phenoloxidation durch para-Diphenol-Oxidase (Laccase):



o-Diphenol oxygen oxidoreductase
(Catechol oxidase)

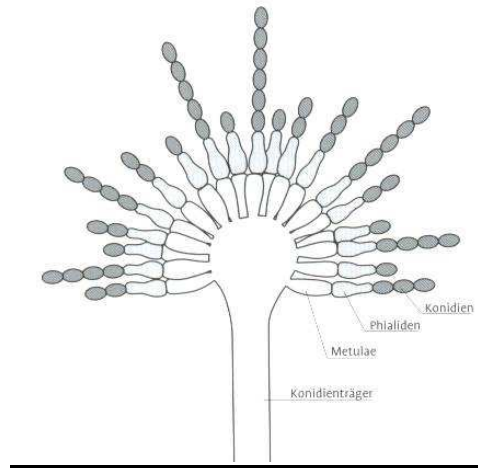
Sekundäre Aromastoffe infolge Botrytisinfektion:



INFEKTION MIT ANDEREN SCHIMMELPILZEN:

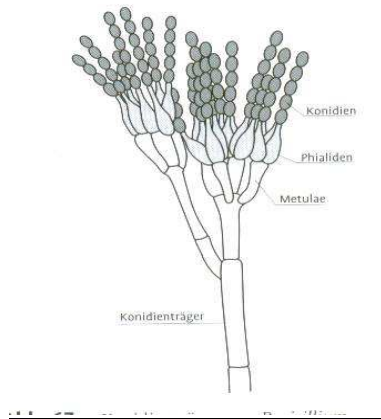
Aspergillus (Gießkannenschimmel)

grün-gelb-schwarzer Rasen, wärmeliebend, Schimmelton, Mykotoxinbildung (OTA)



Penicillium - Pinselschimmel

weißlich-grün-gelb, kälteliebend, Schimmelton, bitter, Mykotoxine (OTA)



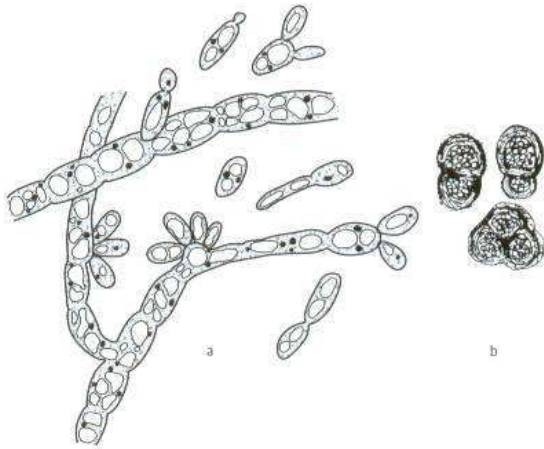
Trichoderma roseum

rosa Fäule, selten, säureempfindlich, Schimmelton, Mykotoxine (Trichotecin)



Aurebasidium pullulans - Russtaupilz

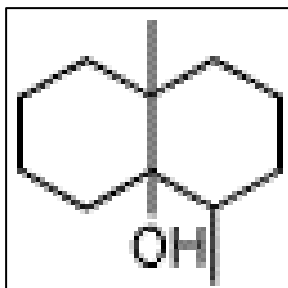
schwarzer Belag, Schimmelton, im Exkret von Läusen, keine Mykotoxine (?)



AROMASTOFFE DURCH SCHIMMEL:

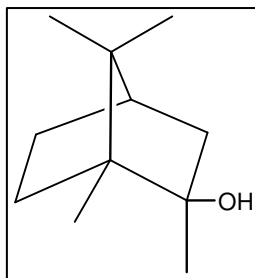
Geosmin (octahydro-4,8a-dimethyl-4a(2H)-Naphthalenol)

*trocken-erdig (25-60 ng/l), Kartoffelkeller Artischocken, Beton, Erde, Pilz und Schimmel
Bildung: Symbiose von Penicillium expansum und bestimmten Botrytis cinerea Stämmen, versteckte Infektion an Rappen*



Methylisoborneol

schimmelig, rote Rübe, 20-30 ng/l



2-Isopropyl-3-methoxypyrazin

schimmelig, Wurzel, Erdäpfel, 2-3 ng/l

Analytik von allen Aromastoffen::

- GC-MS nach Vorreinigung
- GC-MS mit SPME

Mykotoxine durch Traubenschimmel:

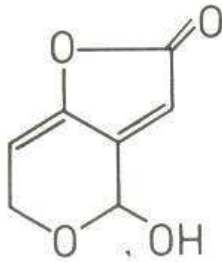
PATULIN (4-Hydroxy-4-H-fuopyran-2-on)

toxisch dh. krebserregend, WHO Empfehlung: Patulin < 50 µg/l

Bildung: *Penicillium expansum*
Aspergillus clavatus
Aspergillus giganteus

Gehalte in Traubensäften 10-230 µg/l
(70 % patulinfrei, 15 % > 50 µg/l)

ABER Zerstörung durch SO₂, Zerstörung im Zuge der alk. Gärung
=> im Wein kein Patulin nachweisbar (< 5 µg/l)



Analytik:

- HPLC nach Vorreinigung mit Immunoaffinitätssäulchen
- ELISA

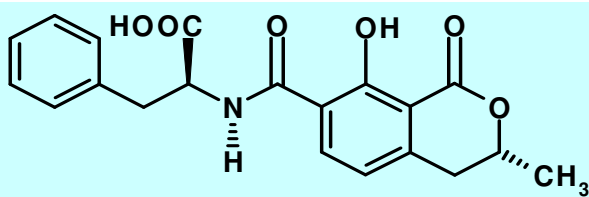
OCHRATOXIN A

Isocoumarin, mittels Carboxylgruppe, an L-β-Phenylalanin gebunden,
Toxikologische Eigenschaften: karzinogen (Niere...), teratogen, immunotoxisch,
neurotoxisch

NOEL: 21 µg/kg kg/Tag

Bildung: versch. Schimmelpilze z.B.

Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* und *Penicillium verucosum



Vorkommen: Pflanzenprodukten hpts. Getreide
(Codex: < 5 µg/kg), Bohnen, Kaffee, Trockenobst, Nüsse,
Gewürze, Bier, Innereien (Leber, Milz ..)

Analytik:

- HPLC nach Vorreinigung mit Immunoaffinitätssäulchen
- ELISA

VORKOMMEN IM WEIN (seit 2005 EU-Höchstwert 2 µg/L)

**In österreichischen Weinen auch Prädikatsweinen sehr geringe Gehalte,
in der Regel unter 0,1 µg/l (Eder et al., 2004)**