

Hochschule Heilbronn und Weingut Georg und Anja Merkle GbR

Einsatz von Wildhefen zur maloalkoholischen Gärung in der Weinherstellung

Abschlussbericht über ein Entwicklungsprojekt,
gefördert unter dem Az: 34053/01-32 von der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt

Prof. Dr. Michael Brysch-Herzberg

Heilbronn, Oktober 2022

Projektdatenblatt

06/02		Projektkennblatt der Deutschen Bundesstiftung Umwelt			
Az	34053	Referat	32	Fördersumme	125 000 €
Antragstitel		Einsatz von Wildhefen zur maloalkoholischen Gärung in der Weinherstellung			
Stichworte		Wein, Säure, maloalkoholische Gärung, Biodiversität,			
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)		
3 Jahre	11.08.2017	31.05.2022			
Zwischenberichte					
Bewilligungsempfänger	Hochschule Heilbronn Prof. Dr. Michael Brysch-Herzberg Max-Planck-Straße 39 74081 Heilbronn			Tel	
				Fax	
				Projektleitung Prof. Dr. Brysch-Herzberg	
		Bearbeiter Prof. Dr. Brysch-Herzberg			
Kooperationspartner	Weingut Georg und Anja Merkle Blankenhornstraße 12-14 74343 Sachsenheim				
Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens					
<p>Moste und Weine werden, soweit dies die jahrgangsabhängigen Säuregehalte notwendig machen, entweder durch eine malolaktische Gärung oder chemisch teilentsäuert. Ziel des Projektes war es die maloalkoholische Gärung mit Hefepilzen der Gattung <i>Schizosaccharomyces</i> als alternativen Prozess zur malolaktischen Gärung mit Milchsäurebakterien oder zur chemischen Entsäuerung mit kohlen-saurem Kalk in der Praxis zu etablieren. Durch diesen alternativen biotechnologischen Prozess sollte modelhaft der unmittelbare Nutzen von Biodiversität aufgezeigt und natürliche Ressourcen geschont werden. Die Alleinstellung der handwerklich produzierten Weine in der Vermarktung sollte den weiteren, kostenintensiven Anbau von Reben in Steillagen einer einmaligen Kulturlandschaft sichern. Im Wein sollte durch das alternative Verfahren der Gehalt an potentiell gesundheitsbelastenden biogenen Aminen gesenkt werden.</p>					
Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden					
<p>Voraussetzung für die Durchführung des Projektes war es ein breites Spektrum von Hefestämmen aller Arten der Gattung <i>Schizosaccharomyces</i> zu gewinnen. Die gezielte Isolierung der Art mit dem höchsten Potential zur Weinherstellung, <i>S. pombe</i>, war durch eine dem Projekt vorausgegangene Entwicklung einer effizienten Isolierungsmethode erstmals möglich. Für das Projekt konnte ein breites Spektrum neuer Hefestämmen von vielfältigen Herkünften gewonnen werden.</p>					
<p>Die Eignung zur Weinherstellung der Hefestämmen wurden zunächst im Labor untersucht. Parameter wie der Äpfelsäureabbau- und das Alkoholbildungsvermögen oder die Produktion von Essigsäure wurden bestimmt. Außerdem wurden von Anfang an die sensorischen Eigenschaften der Versuchsweine mitberücksichtigt.</p>					
<p>Die aufgrund der Laborergebnisse ausgesuchten Hefestämmen wurden in der Produktion von Pilotchargen eingesetzt. Es wurden weitere Erkenntnisse sowohl über die Praxistauglichkeit der</p>					

Hefestämme als auch über die notwendige Arbeitsweise mit den für die Weinproduktion neuartigen Hefen gewonnen. Im letzten Schritt wurden selektierte Hefestämme im Produktionsmaßstab eingesetzt.

Anhand von Gesamtgenomdaten aller untersuchter Hefestämme wurde im Nachhinein beurteilt, wie groß der Anteil der untersuchten Hefestämme an der gesamten globalen genetischen Breite der Arten war.

Deutsche Bundesstiftung Umwelt □ An der Bornau 2 □ 49090 Osnabrück □ Tel. 0541/9633-0 □ Fax 0541/9633-190 □ <http://www.dbu.de>

Ergebnisse und Diskussion

Es wurden insgesamt mehrere hundert Hefestämme der Arten *S. pombe*, *S. octosporus*, *S. japonicus* und *S. osmophilus* gewonnen. Die Art *S. osmophilus* war vor dem Projekt nicht bekannt und wurde erst im Projekt wissenschaftlich beschrieben.

Die Laborversuche ergaben, dass nur die Stämme der Art *S. pombe* ein ausreichendes Äpfelsäure- und Zuckergärvermögen für den Einsatz in der Weinbereitung besitzen. Zwar zeigten auch Stämme von *S. japonicus* teils hohe Gärleistungen, alle Stämme dieser Art produzierten aber so starke Fehltöne, dass die Art für die Weinherstellung nicht in Frage kommt.

In Pilotchargen im Weinkeller konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von *S. pombe* auch hohe Äpfelsäuregehalte von 10 g/l innerhalb der ersten 2-5 Tage der Maischegärung vollständig abgebaut werden können. Für den erfolgreichen Einsatz der Art sind andere Bedingungen wie eine höhere Temperatur und eine moderate Schwefelung der Moste notwendig.

Die mit *S. pombe* produzierten Weine zeigten sich überwiegend sensorisch unauffällige. Der schon in der Literatur beschriebene eigenartige sensorische „pombe-Ton“ konnte in den Weinen entweder nur schwach oder gar nicht wahrgenommen werden.

Im Produktionsmaßstab wurden Weiß- und Rotweine hergestellt und vermarktet. Sie stellten ein Alleinstellungsmerkmal dar, welches das Weingut in der Kundenansprache nutzen konnte. Im Produktionsmaßstab zeigte sich auch, dass unter bestimmten noch nicht geklärten Bedingungen *S. pombe* Fehltöne in einem Maß verursachen kann, welche sich auch nicht durch übliche Behandlungs- und Schönungsmaßnahmen beseitigen lassen. Das Verwerfen ganzer Chargen kann die Konsequenz sein.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Die Ergebnisse der Arbeiten wurden in folgenden Fachartikeln und Konferenzbeiträgen publiziert.:

, G.-S. Jia, M. Seidel, I. Assali and L.-L. Du (2022). Insights into the ecology of *Schizosaccharomyces* species in natural and artificial habitats. *Antonie van Leeuwenhoek*: 1-35.

Brysch-Herzberg, M., A. Tobias, M. Seidel, R. Wittmann, E. Wohlmann, R. Fischer, D. Dlačny and G. Peter (2019). *Schizosaccharomyces osmophilus* sp. nov., an osmophilic fission yeast occurring in bee bread of different solitary bee species. *FEMS yeast research* 19(4): foz038

Brysch-Herzberg, M., R. Wittmann and M. Seidel (2019) Oenological application of the genus *Schizosaccharomyces*. 46th Annual Conference on Yeasts, Smolenice, Slovakia. (Vortrag und Tagungsband)

Fazit

Im Projekt konnte das hohe Potential der Hefeart *S. pombe* für die Weinherstellung nachgewiesen werden. Neuartige Weine können hergestellt werden. Der Herstellprozess kann um den Schritt der üblichen malolaktischen Gärung verkürzt werden. Natürliche Ressourcen

können geschont werden, in dem die chemische Teilentsäuerung vermieden wird. Die Vermarktung der neuartigen Weine schafft eine hohe Aufmerksamkeit beim Kunden, was mittelfristig den Weinanbau in den für die Kulturlandschaft wichtigen Steillagen Württembergs sichert. Das Projekt zeigt auf, dass die natürliche mikrobiologische Diversität ein unschätzbares Reservoir an genetischen Ressourcen bereitstellt und ganz neue Wege in der Produktion eröffnen kann.

Die Analyse der Genome hunderter Stämme der Gattung *Schizosaccharomyces* zeigt, dass im Projekt erst ein kleiner Teil der vorhandenen genetischen Diversität der Gattung untersucht wurde.

Bevor die Stämme der Art *S. pombe* routinemäßig in der Produktion genutzt werden könnten, ist entweder zu klären unter welchen Produktionsbedingungen die Hefe Fehltöne produziert oder es müssen Stämme der Art identifiziert werden, die nicht in der Lage sind die Fehltöne hervorrufenden Substanzen zu produzieren.

Inhalt

Projektdatenblatt	2
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Zusammenfassung.....	8
Hefekulturen	10
Gewinnung neuer Hefekulturen	10
Formale Beschreibung der neuen Art <i>Schizosaccharomyces osmophilus</i> Brysch-Herzberg, Tobias, Seidel, Wittmann, Fischer, Dlačny & Peter sp. nov.....	11
Eignung der <i>Schizosaccharomyces</i> -Arten zur Weinherstellung	15
Erste Laborversuchsreihe in Traubensaft.....	15
Gärintensität.....	15
Chemisch analytische Eigenschaften der Versuchsweine	17
Sensorische Prüfung der Versuchsweine	17
Zweite Laborversuchsreihe in vollsynthetischem künstlichem Most.....	18
Zuckervergärung.....	19
Äpfelsäurevergärung.....	21
Sensorik	22
Weißmostgärung im Labor.....	22
Gärversuche im Pilotmaßstab.....	23
Jahrgang 2018	23
Versuchsdurchführung.....	23
Hefepopulationen während der Maischegärung	24
Vergären von Äpfelsäure und Zucker während der Maischegärungen	26
Jahrgang 2019	28
Fazit Maischegärungen im Pilotmaßstab.....	30
Einsatz von <i>S. pombe</i> im Produktionsmaßstab.....	30
Fazit der Gärversuche im Produktionsmaßstab	31
Anteil der im Projekt untersuchten Hefestämme an der global vorhandenen genetischen Vielfalt in <i>S. pombe</i>	31

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Gärdynamik von <i>S. pombe</i> -Stämmen in Traubensaft im Labor	S. 15
Abb. 2: Gärdynamik von <i>S. japonicus</i> -Stämmen in Traubensaft im Labor	S. 16
Abb. 3: Gärdynamik von <i>S. octosporus</i> -Stämmen in Traubensaft im Labor	S. 16
Abb. 4: Glucose- und Fructosegehalte nach 5 Tagen Gärung in künstlichem Most bei Einsatz unterschiedlicher Stämme verschiedener <i>Schizosaccharomyces</i> -Arten	S. 20
Abb. 5: Dynamik der Glucose- und Fructosegehalte während der Gärung mit 3 verschiedenen <i>S. pombe</i> -Stämmen in künstlichem Most	S. 20
Abb. 6: Äpfelsäuregehalte nach 5 Tagen Gärung in künstlichem Most mit Hefestämmen verschiedener <i>Schizosaccharomyces</i> -Arten	S. 21
Abb. 7: Dynamik der Äpfelsäure- und Glucosegehalte im Verlauf der Gärung mit <i>S. pombe</i> in künstlichem Most	S. 22
Abb. 8: Äpfelsäuregehalte nach der Vergärung von Weißmost aus der Weinproduktion mit unterschiedlichen <i>S. pombe</i> -Stämme	S. 23
Abb. 9: Maischegärversuche in wärmeisolierte Maischefässer im Weinkeller	S. 24
Abb. 10: Dynamik der Populationsdichten von <i>S. pombe</i> und Wildhefen in der Gärung	S. 25
Abb. 11: Dynamik der Äpfelsäuregehalte und der Dichte in der ersten Maischegärung im Pilotmaßstab 2018	S. 27
Abb. 12: Dynamik der Äpfelsäuregehalte und der Dichte in der zweiten Maischegärung im Pilotmaßstab 2018	S. 27
Abb. 13: Dynamik der Äpfelsäuregehalte und der Dichte in der zweiten Maischegärung im Pilotmaßstab 2018	S. 28
Abb. 14: Dynamik der Äpfelsäuregehalte und der Dichte in der zweiten Maischegärung im Pilotmaßstab 2019	S. 29

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zur Isolierung von <i>Schizosaccharomyces</i> -Arten verwendete Anreicherungsmedien	S. 11
Tabelle 2: Überblick über die Ergebnisse der Isolierungsversuche	S. 12
Tabelle 3: Tabelle 3: Chemische Zusammensetzung des künstlichen Mosts	S. 18

Zusammenfassung

Weine und Moste werden, soweit notwendig, entweder durch die malolaktische Gärung oder chemisch teilentsäuert. Ziel des Projektes war es die maloalkoholische Gärung mit Hefepilzen der Gattung *Schizosaccharomyces* als alternativen Prozess zur malolaktischen Gärung mit Milchsäurebakterien oder zur chemischen Entsäuerung in der Praxis zu etablieren. Durch diesen alternativen biotechnologischen Prozess sollte modelhaft der unmittelbare Nutzen von Biodiversität aufgezeigt und natürliche Ressourcen geschont werden. Die Alleinstellung der handwerklich produzierten Weine in der Vermarktung sollte den weiteren kostenintensiven Anbau von Reben in einer einmaligen Kulturlandschaft sichern. Außerdem sollte der Gehalt an gesundheitsbelastenden biogenen Aminen gesenkt werden.

Voraussetzung für die Durchführung des Projektes war ein breites Spektrum von Hefestämmen aller Arten der Gattung *Schizosaccharomyces*. Die gezielte Isolierung der Art mit dem höchsten Potential zur Weinherstellung, *S. pombe*, war durch eine dem Projekt vorausgegangene Entwicklung einer effizienten Isolierungsmethode erstmals möglich. Es wurden insgesamt mehr als 200 Stämme von *S. pombe* isoliert. Auch von den anderen Arten der Gattung konnte ein breites Spektrum an Stämmen isoliert werden.

Im Laborgärversuchen in Traubensaft und später in einem vollsynthetischen künstlichen Most wurde die Eignung der einzelnen *Schizosaccharomyces*-Arten untersucht. Es wurden Charakteristika wie die Zuckervergärungs- und die Äpfelsäurevergärungsrate, die Produktion von Gärungsnebenprodukten wie Essigsäure und die sensorischen Eigenschaften der Versuchsweine berücksichtigt. Stämme der Arten *S. cryophilus*, *S. octosporus*, *S. osmophilus* and *S. japonicus* stellten sich als nicht zur Weinherstellung geeignet heraus. Entweder ist das Gärvermögen der Stämme zu gering oder wie im Fall von *S. japonicus* ist das Gärvermögen ausreichend, aber die Bildung von starken Fehltonen schließt eine Nutzung zur Weinherstellung aus. Entsprechend wurde nur mit Stämmen von *S. pombe* weitergearbeitet.

Aufgrund der Ergebnisse der Laborversuchsgärungen wurden *S. pombe*-Stämme ausgesucht und in zwei aufeinanderfolgenden Jahren im Pilotchargenmaßstab in der Weinherstellung erprobt. In diesen Versuchen wurden die produktionstechnischen Bedingungen ermittelt, unter denen sich die Hefen in der Produktion einsetzen ließe.

Es zeigte sich, dass die *S. pombe*-Stämme in höherer Zelldichte, bei höheren Temperaturen und unter Einsatz schwefliger Säure zur Unterdrückung der mikrobiologischen Begleitflora eingesetzt werden müssen. Die Äpfelsäureeliminierung erfolgt dann stets vollständig innerhalb der ersten 2- 5 Tage der Gärung.

Im letzten Schritt wurden selektierte Hefestämme im Produktionsmaßstab eingesetzt. Es zeigte sich, dass mit *S. pombe* marktkonforme Weine produziert werden können. Im Produktionsmaßstab traten in manchen Gärungen auch starke Fehltöne auf die eine Vermarktung der Weine ohne intensive Behandlungen nicht möglich machten. Entweder muss ein besseres Verständnis der Faktoren erreicht werden unter denen die verwendeten *S. pombe*-Stämme Fehltöne produzieren oder es müssen Stämme identifiziert werden, die die Fehltöne verursachende Substanzen unter praxisüblichen Bedingungen nicht produzieren.

Um das Potential der Art *S. pombe* für die Weinherstellung zu beurteilen, wurde das genetische Spektrum der im Projekt untersuchten Hefestämme mit dem global nach dem Projekt bekannten Spektrum verglichen. Die im Projekt untersuchten Stämme stellen nur einen Bruchteil der global vorhandenen genetischen Diversität der Art dar. Daher scheint es gerechtfertigt anzunehmen, dass die Art *S. pombe*, auch wenn die Praxisreife der maloalkoholischen Gärung im Projekt nicht erreicht werden konnte, weiterhin ein großes Potential für die Weinherstellung hat.

Hefekulturen

Gewinnung neuer Hefekulturen

Für viele der önologischen Versuche, die in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts durchgeführt wurden, wurden die gleichen Hefestämme der Art *S. pombe* genutzt. Vor dem hier beschriebenen Projekt wurde geschätzt, dass es weltweit in mikrobiologischen Kulturinstituten nur ca. 160 Stämme der Art gibt. Es wurde gezeigt, dass viele dieser Kulturen genetisch identisch sind. Zur Bewertung der Eignung der *Schizosaccharomyces*-Arten war es daher zunächst notwendig eine ausreichende Basis an genetisch möglichst nicht verwandter Stämme der einzelnen Arten zu gewinnen.

Neu entwickelt wurden für das Projekt Methoden zur Isolierung der einzelnen *Schizosaccharomyces*-Arten. Da sich die Arten in ihrer Physiologie deutlich unterscheiden, mussten für jede Art eigene Anreicherungs- und Isolierungsmethoden entwickelt werden. Zusätzlich unterschieden sich die Substrate, aus denen die Hefen isoliert werden sollten sehr stark sowohl in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften als auch in ihrer mikrobiologischen Begleitflora. Aus diesem Grund mussten in Abhängigkeit vom jeweiligen Substrat oft unterschiedliche Isolierungsmethoden für die Isolierung derselben Art angewendet werden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Isolierungsmedien.

Für das Projekt wurden mehr als 2100 Proben unterschiedlicher Substrate bearbeitet. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die untersuchten Proben und die Häufigkeit mit der die verschiedenen *Schizosaccharomyces*-Arten mit den unterschiedlichen Anreicherungsmedien isoliert werden konnten. Insgesamt wurden 226 Stämme von *Schizosaccharomyces pombe*, 150 Stämme von *S. octosporus*, 18 Kulturen von *S. osmophilus* und 10 Stämme von *S. japonicus* isoliert.

Die wichtigsten Substrate zur Isolierung von *S. pombe* waren Traubenmaischen aus einer großen Zahl verschiedener Weinbaubetriebe und Proben, die aus großen Haufen faulender Äpfel in verschiedenen Obstbaubetrieben stammten, Honig, rohe fermentierte jedoch noch nicht geröstete Kakaobohnen und Trockenfrüchte. *S. octosporus* wurde vor allem aus Honig und von Trockenfrüchten isoliert. Stämme von *S. osmophilus* stammten vor allem aus Bienenbrot von Mauerbienen, aber auch aus Honig und von Trockenfrüchten. *S. japonicus* wurde nur von frischen Früchten und Substraten aus Wäldern gewonnen (Saffflüsse, Baumrinde, Waldboden).

Durch diese Arbeiten stand eine ausreichende Basis zur Beurteilung der Eignung der einzelnen Arten zur Weinbereitung als auch zur Abschätzung des in die Untersuchungen einbezogenen genetischen Spektrums im Vergleich zum Global bekannten genetischen Spektrums zur Verfügung.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden zusammen mit Prof. Dr. Li-Lin Du National Institute of Biological Sciences, Beijing, China im Journal *Antonie van Leeuwenhoek* veröffentlicht (<https://doi.org/10.1007/s10482-022-01720-0>).

Tabelle 1: Zur Isolierung von *Schizosaccharomyces*-Stämmen verwendete Anreicherungsmedien; Anteile der Komponenten an den Medien in Prozent (w/v)

Medium	Glucose	Fructose	Cycloheximide	Ethanol	Essigsäure	NaCl	Chloramphenicol	Pepton	Hefeextrakt
FG [‡]	5*	55*	-	-	-	-	-	0,5	0,5
Na [‡]	2	-	-	-	-	16 %	0,01	0,5	0,5
O	2	-	-	8	-	-	0,01	0,5	0,5
CY	2	-	0,001	6	0,8		0,01	0,5	0,5
MC	2	-	0,001	6			0,01	0,5	0,5
YPD [†]	2	-					0,01	0,5	0,5

Angaben in Prozent (w/w)

Formale Beschreibung der neuen Art *Schizosaccharomyces osmophilus* Brysch-Herzberg, Tobias, Seidel, Wittmann, Fischer, Dlauchy & Peter sp. nov.

Die taxonomische Einordnung von Mikroorganismen ist auch in der angewandten Forschung wichtig, da sich Arten in ihrer Physiologie unterscheiden und damit schon von der Art auf bestimmte technisch relevante Eigenschaften bzw. die Eignung eines Stammes geschlossen werden kann.

Im Projekt vielen eine Reihe von Hefestämmen auf die zunächst der Art *S. octosporus* zugeordnet wurden. Nach der genetischen Charakterisierung anhand von Sequenzen des rRNA gene repeats wurde klar, dass diese Stämme eine neue unbekannte Art repräsentierten. Da es im Projekt unter anderem um die Bewertung der Eignung der verschiedenen *Schizosaccharomyces*-Arten zur Weinherstellung ging, war eine formale Artbeschreibung notwendig. Eine Einordnung der betreffenden Stämme als *S. octosporus* hätte leicht zu einer Fehlinterpretation bei Leser*innen des vorliegenden Berichts führen können. Die Artneubeschreibung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Gabor (Ungarn) und Prof. Dr. Reinhard Fischer (KIT, Karlsruhe) durchgeführt und wurde im internationalen Journal *FSME Yeast Research* veröffentlicht (<https://doi.org/10.1093/femsyr/foz038>). Die neue Art heißt *S. osmophilus*. Der Name bezieht sich darauf, dass die Stämme der neuen Art nur in einem Medium mit erhöhtem osmotischen Wert wachsen können.

		Total				YPD				CY				O				FG				Na				MC							
		Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj				
Verschiedene frische Früchte außer Äpfeln und Weintrauben	n	134				-				45				80 [±]				22				9				-							
	+	0	0	0	S	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
	%	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
Weinbergsböden	n	38				-				20				18				-				-				-							
	+	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	%	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Boden unter Obstbäumen	n	32				-				32				28				-				-				-							
	+	S	0	0	0	-	-	-	-	S	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	%	-	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rinde und Saftflussmaterial von Obstbäumen außerhalb des Waldes	n	51				-				-				51 [±]				-				-				-							
	+	0	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	%	0	0	0	3.9	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	3,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trockenfrüchte	n	430				-				20				303				430				-				-							
	+	35	88	3		-	-	-	-	0	0	0	0	27	31	0	0	9	73	4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	%	8.5	21.3	0.8		-	-	-	-	0	0	0	0	9.5	10.9	0	0	2.1	17.0	0.9	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Honig	n	386				386				54				386				386				192				-							
	+	49	61	S	0	27	37	0	0	0	0	0	0	31	28	0	0	2	30	S	0	0	7	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	%	12.7	16.3	-	0	7.0	9.6	0	0	0	0	0	0	8.0	7.3	0	0	0.5	7.8	-	0	0	0.1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-

		Total				YPD				CY				O				FG				Na				MC			
		Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj	Sp	Sc	Ss	Sj
Material aus Honigbienenstöcken	n	37				-				29				37				37				37				-			
	+	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
	%	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
Bienenbrot von Solitärbiene	n	123				-				21				30				123				42				-			
	+	0	S	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	14	0	0	0	0	0	-	-	-	-
	%	0	-	11.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	11.4	0	0	0	0	0	-	-	-	-
Materialien aus dem Wald (Rinde, Saftfluss, Boden)	n	219				-				41				203				41				41				-			
	+	0	0	0	7	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
	%	0	0	0	3.2	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	3.4	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
Rohe Kadaobohnen (fermentiert und ungeröstet)	n	75				75 [‡]				-				-				-				-				75			
	+	50	0	0	0	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46	0	0	0
	%	66.7	0	0	0	42.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61.3	0	0	0

*Proben von 9 verschiedenen Orten, 2 in China und 7 in Deutschland (*S. pombe* gefunden an allen Deutschen und einem chinesischen Ort); Sp = *S.*

pombe; Sc=*S. octosporus*; Ss = *S. osmophilus*; Sj = *S. japonicus*.

Eignung der *Schizosaccharomyces*-Arten zur Weinherstellung

Erste Laborversuchsreihe in Traubensaft

Im Labor wurden im 450 ml-Maßstab Versuchsgärungen in Traubensaft mit Stämmen der Arten *S. pombe*, *S. japonicus* und *S. octosporus* durchgeführt. Von *S. pombe* wurden 19, von *S. japonicus* 16 und von *S. octosporus* 23 Stämme berücksichtigt. Der international viel genutzte Hefestamm EC1118 wurde als Referenz eingesetzt. Alle Gäransätze wurden in dreifacher Wiederholung pro Stamm durchgeführt.

Gärintensität

Die Gärintensität schwankte innerhalb der Arten in einem weiten Bereich. Einige Stämme reichten fast an die Gärintensität der Vergleichshefe EC1118 heran, während andere nur sehr schleppend gärten. Abbildungen 1-3 zeigen die Dichteabnahme des Mostes während einer dreiwöchigen Gärung für die Arten *S. pombe*, *S. japonicus* und *S. octosporus*.

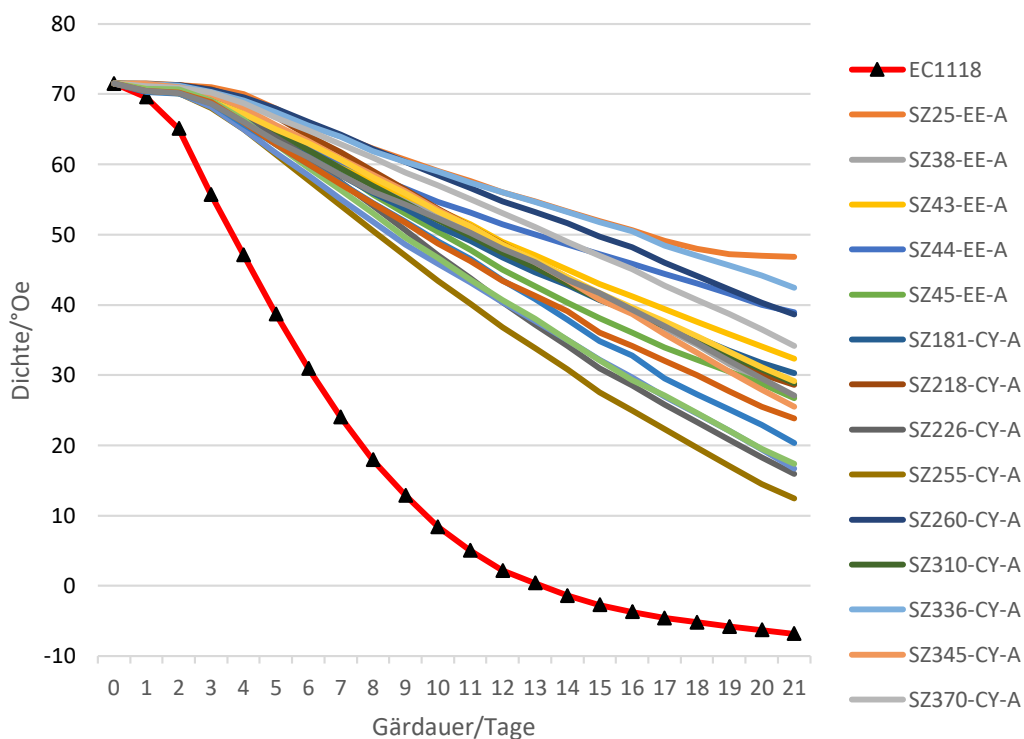


Abb.1: Gärdynamik von *S. pombe*-Stämmen in Traubensaft im Labor; Darstellung der Mittelwerte dreier Wiederholungen; EC1118 = *Saccharomyces* hybrid-Referenzhefe

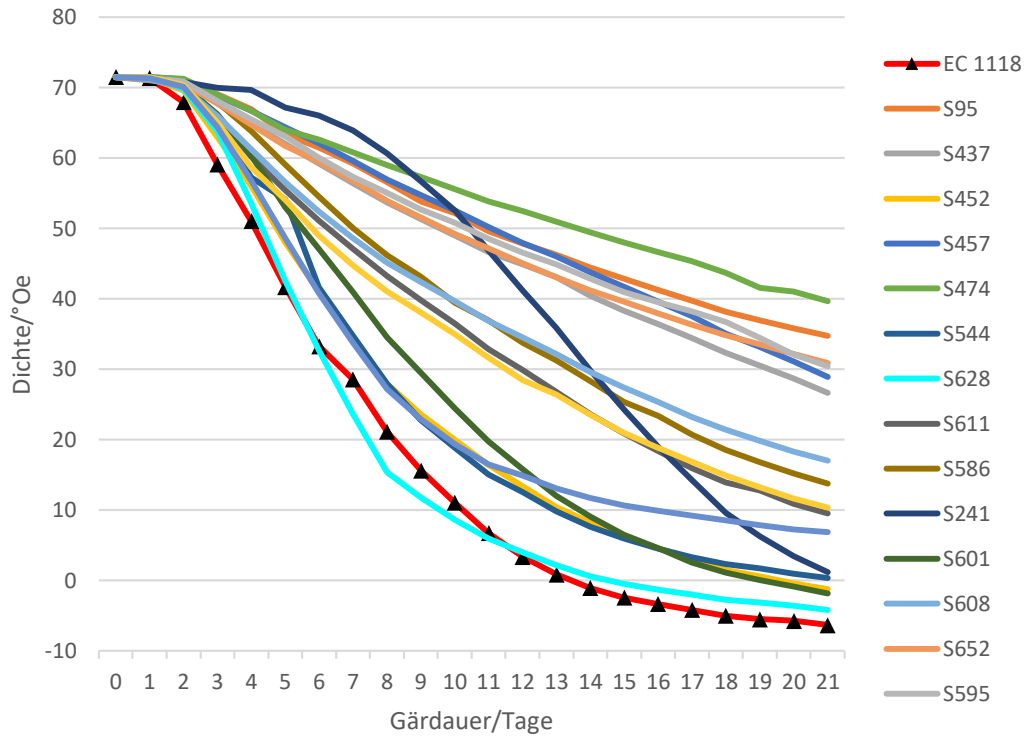


Abb. 2: Gärdynamik von *S. japonicus*-Stämmen in Traubensaft im Labor; Darstellung der Mittelwerte dreier Wiederholungen; EC1118 = *Saccharomyces* hybrid-Referenzhefe

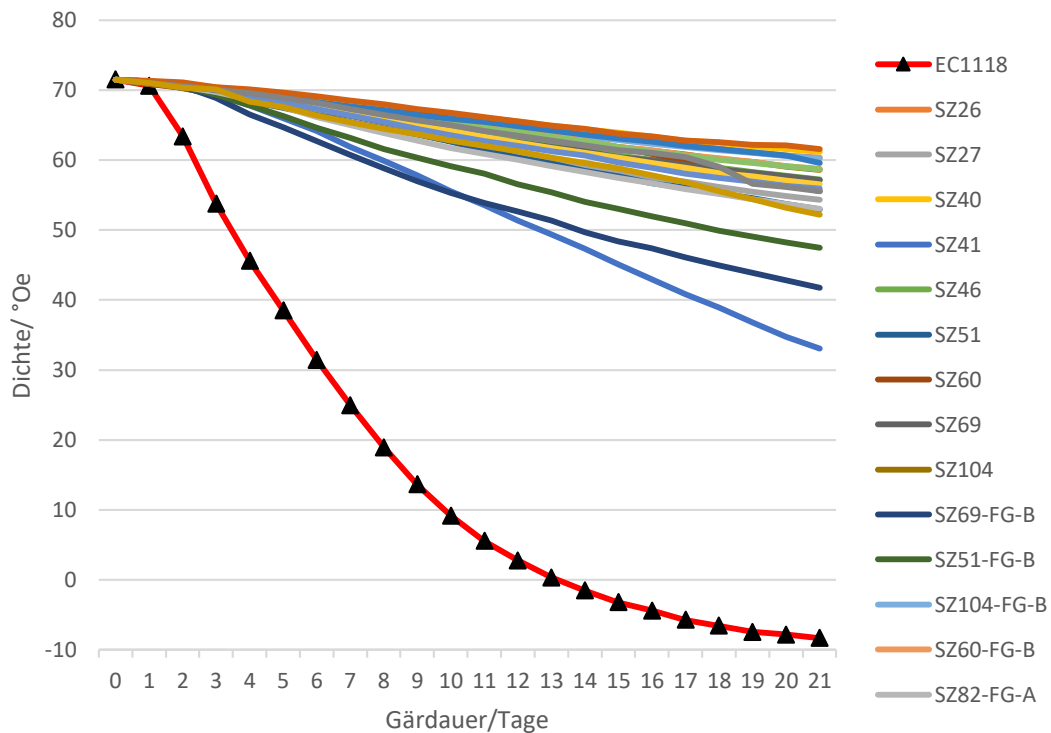


Abb. 3: Gärdynamik von *S. octosporus* in Traubensaft im Labor; Darstellung der Mittelwerte dreier Wiederholungen; EC1118 = *Saccharomyces* hybrid-Referenzhefe

Chemisch analytische Eigenschaften der Versuchsweine

In den Gäransätzen wurden zu Beginn der Gärung und nach drei Wochen die Gehalte an Äpfelsäure, Milchsäure und Essigsäure bestimmt. Die Dichteabnahme wurde protokolliert.

Die Bestimmung der Milchsäure wurde durchgeführt um auszuschließen, dass eine malolaktische Gärung durch Milchsäurebakterien ungewollt abgelaufen ist. Milchsäure konnte in keiner Gärung in relevanter Menge nachgewiesen werden.

Die Essigsäure als in höheren Konzentrationen unerwünschter Stoff im Wein wurde nur in Konzentrationen festgestellt, die als normal und unproblematisch anzusehen sind. Die Gehalte bewegten sich zwischen 0 und 0,4 g/l. In den Versuchsweinen, die mit der Vergleichshefe EC1118 *Saccharomyces bayanus* hergestellt wurden, lag der Essigsäuregehalt bei 0,3 bis 0,4 g/l.

Beim Äpfelsäureabbau gab es deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Arten. Der Ausgangssaft enthielt 7,4 g/l Äpfelsäure. In den Versuchsweinen, die mit der Vergleichshefe EC1118 hergestellt wurden, lag der Gehalt bei 6,9 g/l. Bei *S. pombe* wurden im Schnitt 0,6 g/l, bei *S. japonicus* 4,6 g/l und bei *S. octosporus* 4,4 g/l nach der Gärung gemessen. Zwölf von 19 *S. pombe* Stämmen bauten die Äpfelsäure bis unter die Nachweisgrenze ab, während andere Stämme nur etwa 2/3 der Äpfelsäure abbauten. Bei den Stämmen von *S. japonicus* lagen die Äpfelsäuregehalte nach den Gärungen zwischen 40 und 97 % des Ausgangswertes. *S. octosporus* baute zwischen 11 % und 79 % der Äpfelsäure während der Gärung ab.

Sensorische Prüfung der Versuchsweine

Alle Gäransätze wurden sensorisch von 3 qualifizierten Personen beurteilt. Die sensorische Prüfung der Versuchsweine ergab deutliche Unterschiede sowohl zwischen den Arten als auch zwischen den Stämmen einer Art.

Bei *S. pombe* vielen einige Stämme durch den sogenannten „Pombeton“ auf. Diese weinuntypische Note ist in der Literatur beschrieben und den Testern aus Vorversuchen bekannt. Es gab auch Stämme die durch böcksrige (H₂S) Fehltöne auffielen. Einige Weine vielen besonders vorteilhaft auf.

Alle Weine die mit *S. octosporus* produziert wurden waren reintönig. Weinfehler konnten nicht festgestellt werden. Einige Hefestämme der Art ergaben eine auffallend vorteilhafte fruchtige und sahnige Aromatik.

Alle Weine die mit *S. japonicus* hergestellt wurden waren stark fehlerhaft. Es wurden ein sehr starker Lösungsmittelton (Ethylacetat) und deutlich böcksrige Aromen (H₂S und Mercaptoalkohole) festgestellt. Diese Ergebnisse decken sich mit Vorversuchen vor

Projektbeginn. Daher wurde *S. japonicus* im weiteren Projektverlauf nicht mehr berücksichtigt.

Zweite Laborversuchsreihe in vollsynthetischem künstlichem Most

Während der Laborversuchsgärungen mit Traubensaft aus Flaschen wurde klar, dass Säfte schnell in der Flasche während der Lagerung altern und so eine vergleichbare Gärung im gleichen Saft zu einem späteren Zeitpunkt kaum noch möglich ist. Daher wurden alle Folgegärungen in einem künstlichen Most wiederholt. Der künstliche Most wurde vollsynthetisch hergestellt und ähnelt in seiner Zusammensetzung natürlichem Traubensaft (Tabelle 1). So war es möglich vergleichende Gärungen unter identischen Bedingungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchzuführen. Versuchsgärungen wurden mit den Arten *S. pombe*, *S. octosporus*, *S. cryophilus* und *S. osmophilus* zu unterschiedlichen Fragestellungen durchgeführt. Von der Art *S. cryophilus* ist weltweit nur ein einziger Stamm bekannt. Im Projekt gelang es trotz intensiver Bemühungen nicht neue Stämme zu isolieren. Daher konnte nur diese eine Kultur in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

Nur mit größten Schwierigkeiten konnte von den *S. osmophilus*-Stämmen eine ausreichende Zellzahl herangezogen werden, um damit die Laborgärungen zu starten. *S. osmophilus* zeigte in den Gärungen eine ein sehr geringes Gärvermögen und eine geringe Fähigkeit zum Äpfelsäureabbau. Eine gute Vermehrbarkeit und ein starkes Wachstum in der technischen Anwendung sind Voraussetzung für den Einsatz in der Praxis. Daher wurde *S. osmophilus* nicht weiter in die Gärversuche mit einbezogen.

Tabelle 3: Chemische Zusammensetzung des künstlichen Mosts

Kompound	Concentration	Compound	Concentration
Fructose	90 g/L	L-leucine	40 mg/L
Glucose	90g/L	L-aspartic acid	90 mg/L
Tartaric Acid	5g/L	L-valine	40 mg/L
Malic Acid	10g/L	L-phenylalanine	35 mg/L
Potassium metabisulfite	100 mg/L	L-isoleucine	30 mg/L
Potassium dihydrogen phosphate	1500 mg/L	L-histidine	30 mg/L
Magnesium sulfate	400 mg/L	L-methionine	10 mg/L
Calcium chloride	150 mg/L	L-glycine	15 mg/L
Sodium chloride	100 mg/L	L-lysine	15 mg/L
Myo-Inositol	350 mg/L	L-cysteine	5 mg/L
Gallic Acid	500 mg/L	L-tyrosine	30 mg/L
Sodium oleate	2 mg/L	L-tryptophan	10 mg/L
Manganese sulfate	1.5 mg/L	Pantothenic acid (Vitamin B5)	1 mg/L
Zinc sulfate	4 mg/L	Riboflavin (Vitamin B2)	0.7 mg/L
Copper sulfate	1 mg/L	Thiamine HCl (Vitamin B1)	0.3 mg/L

Kompound	Concentration	Compound	Concentration
Potassium iodide	1 mg/L	Pyridoxine HCl (Vitamin B6)	0.5 mg/L
Cobalt (II) chloride	0.4 mg/L	Nicotinic acid (Niacin)	2.5 mg/L
Boric Acid	1 mg/L	Folic Acid	0.0015 mg/L
Sodium molybdate	0.1 mg/L	Cobalamine (Vitamin B12)	0.05 mg/L
Asparagine	45 mg/L	p-aminobenzoic acid	0.05 mg/L
L-proline	150 mg/L	L-ascorbic acid	0.05 mg/L
L-glutamine	200 mg/L	Cholin	0.03 mg/L
L-arginine	150 mg/L	Biotin (Vitamin H)	0.003 mg/L
L-alanine	150 mg/L	Palmitic Acid	40 mg/L
L-glutamic acid	140 mg/L	Linoleic acid	60 mg/L
L-threonine	150 mg/L	alpha-Linolenic acid	25 mg/L
L-serine	140 mg/L		

Zuckervergahrung

Fast alle Hefen, die für die Weinbereitung verwendet werden sind glucophil, was bedeutet, dass sie im Most, dessen Zuckergehalt sich etwas zu 50 % aus Glucose und zu 50 % aus Fructose zusammensetzt, zunächst verstärkt die Glucose vergären, so dass gegen Ende der Gährung ausschließlich Fructose vorhanden ist. Zwar können die Hefen die Fructose auch zu Ethanol vergären, es kommt aber häufig zu dem Zeitpunkt, zu dem die Glucose erschöpft ist, zu einer Garstockung und nicht selten bleiben unerwünscht hohe Zuckergehalte im Jungwein übrig. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob die Arten *S. pombe*, *S. octosporus* und *S. cryophilus* eine Präferenz für Glucose oder Fructose aufweisen.

Abb. 4 zeigt die Mengen an Glucose und Fructose, welche nach 5 Tagen Gährung noch vorhanden war. Zu Anfang der Gährung waren Glucose und Fructose jeweils mit 90 g/l vorhanden.

Die in der Wein- und Sektproduktion weltweit viel eingesetzte *Saccharomyces* hybride EC1118 hat nach 5 Tagen die gesamte Glucose vergoren und es sind noch 25 g/l Fructose vorhanden. Alle *S. pombe*-Stämme sind ebenfalls glucophil, wenn auch nicht im selben Umfang wie EC1118. Im Gegensatz dazu sind die 5 untersuchten *S. octosporus*-Stämme alle fructophil. Sie vergären Fructose schneller als Glucose. Der eine vorhandene Stamm von *S. cryophilus* ist glucophil.

Für die technische Anwendung bedeuten diese Ergebnisse, dass eine Kombination von *S. pombe* mit einer konventionellen Weinhefe zu einem späten Zeitpunkt in der Gährung zu Problemen führen kann, da unter Umständen ausschließlich Fructose vorhanden ist, die viele Hefen nur zögerlich vergären. Eine spezielle fructophile Endvergahrungshefe könnte eine Lösung für dieses kellertechnisch eher vernachlässigbare Problem sein. Die *S.*

octosporus-Stämme sind aufgrund ihrer Fructophilie ein unproblematischer Partner für viele Hefen.

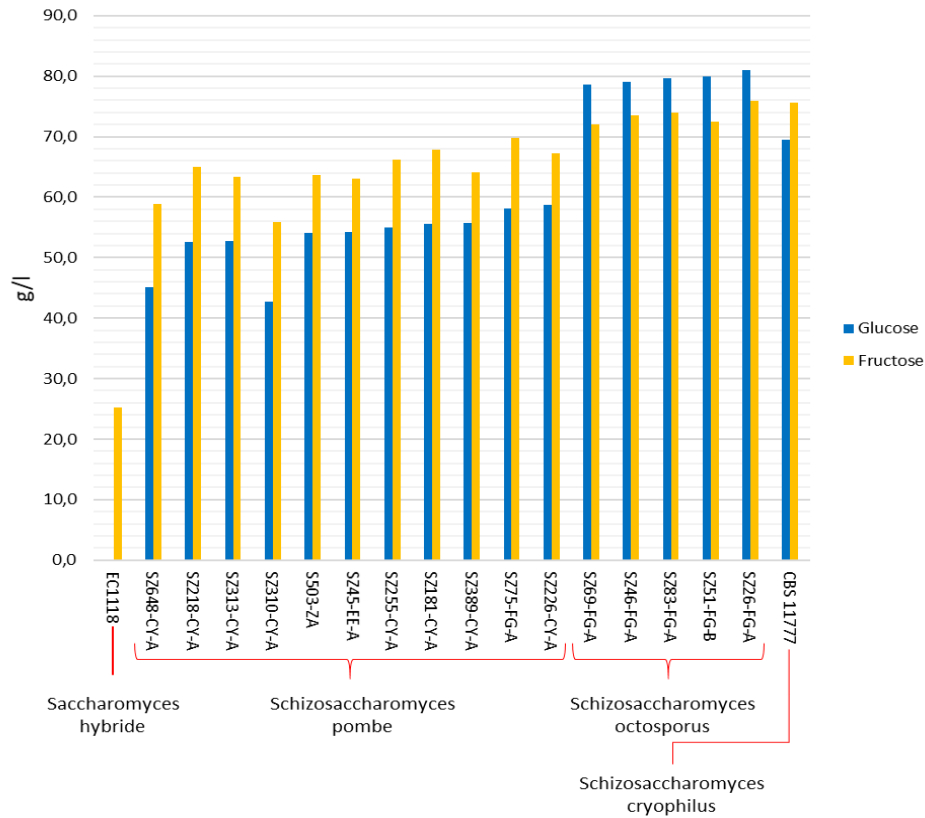


Abb 4: Glucose- und Fructosegehalte nach 5 Tagen Gärung in künstlichem Most bei Einsatz unterschiedlicher Stämme verschiedener *Schizosaccharomyces*-Arten

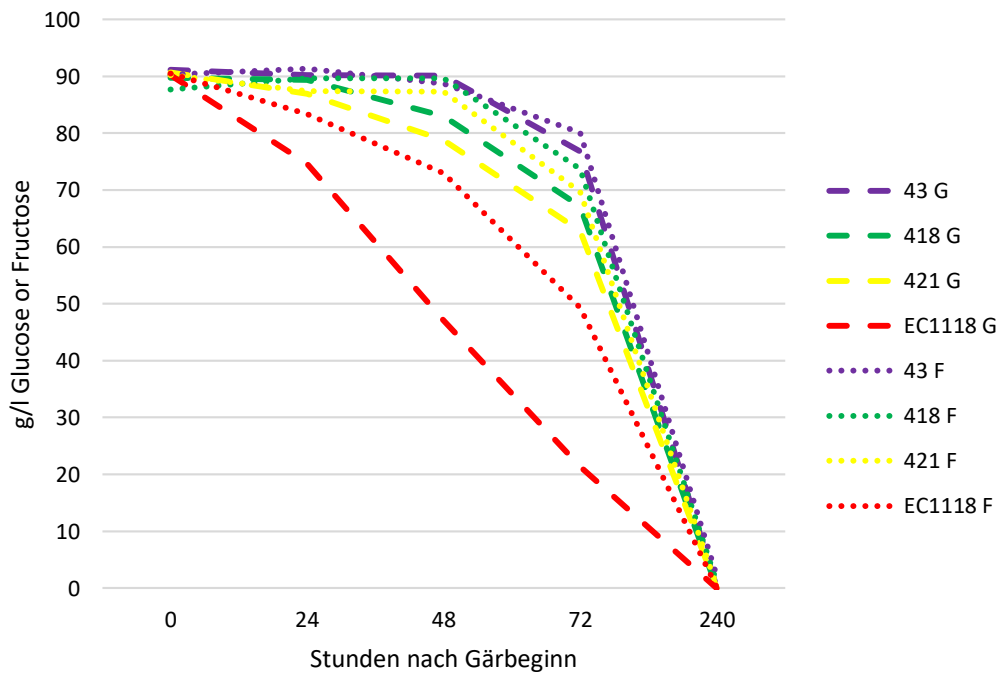


Abb 5: Dynamik der Glucose- und Fructosegehalte während der Gärung mit 3 verschiedenen *S. pombe*-Stämmen in künstlichem Most

Äpfelsäurevergärung

Im künstlichen Most wurde die Dynamik der Äpfelsäurevergärung untersucht. Bei einem Anfangsgehalt an Äpfelsäure von 10 g/l wurde im Abstand von 24 h der Gehalt an Äpfelsäure gemessen. In Abb. 6 sind exemplarisch für einige Stämme verschiedener *Schizosaccharomyces*-Arten die Äpfelsäuregehalte nach 5 Tagen Gärung im künstlichen Most dargestellt. Es gibt große Unterschiede sowohl zwischen den Arten als auch zwischen den Stämmen innerhalb einer Art. Die *S. octosporus*-Stämme und der eine vorhandene Stamm von *S. cryophilus* bauen noch nicht einmal ein Drittel der Äpfelsäure ab. Für eine technische Nutzung ist der Äpfelsäureabbau zu gering.

Bei *S. pombe* ist das Bild sehr heterogen. Eine Reihe von Stämmen bauen die Äpfelsäure fast komplett ab. Vier Stämme schaffen es nicht die Hälfte der Äpfelsäure zu eliminieren.

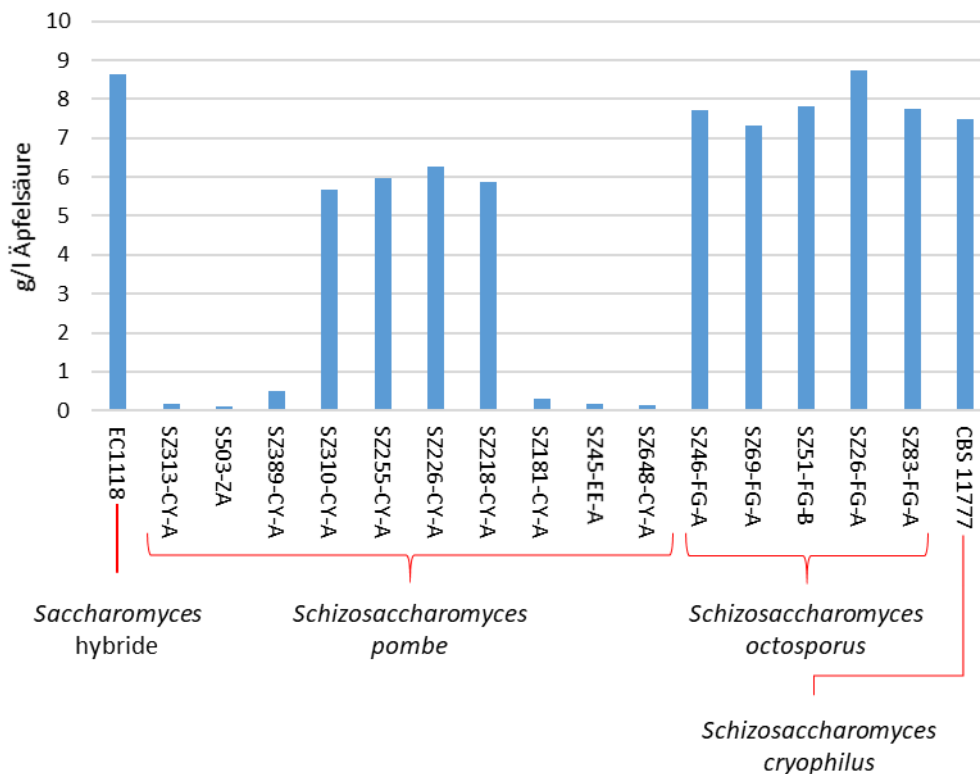


Abb 6: Äpfelsäuregehalte nach 5 Tagen Gärung in künstlichem Most mit verschiedenen Hefestämmen verschiedener *Schizosaccharomyces*-Arten

S. pombe beginnt innerhalb der ersten 24 h nach dem Beimpfen des künstlichen Mostes mit hoher Intensität die Äpfelsäure zu vergären. Glucose wird erst mit einer Verzögerung von etwa 2 Tagen im größeren Umfang vergoren. Zu diesem Zeitpunkt sind schon etwa 50 % der Äpfelsäure zu Ethanol vergoren. Sowohl die Äpfelsäure als auch die Glucose werden innerhalb von 10 Tagen vollständig vergoren. Abbildung 7 stellt die Dynamik der Äpfelsäure- und Glucosevergärung dar.

Sensorik

Während der Laborgärversuche wurde die Gärungen zu verschiedenen Zeitpunkten abgerochen, um Fehltonen und andere sensorische Auffälligkeiten protokollieren zu können. Die Aufzeichnungen dienten dazu am Ende der Gärversuche Stämme für die kellertechnischen Versuche auszuwählen. Auch in ihrer Sensorik unterschieden sich die Stämme stark. Während einige Stämme den künstlichen Most vergoren ohne Fehltonen zu Produzieren führte die Gärung anderer Stämme zu unangenehmen Fehltonen.

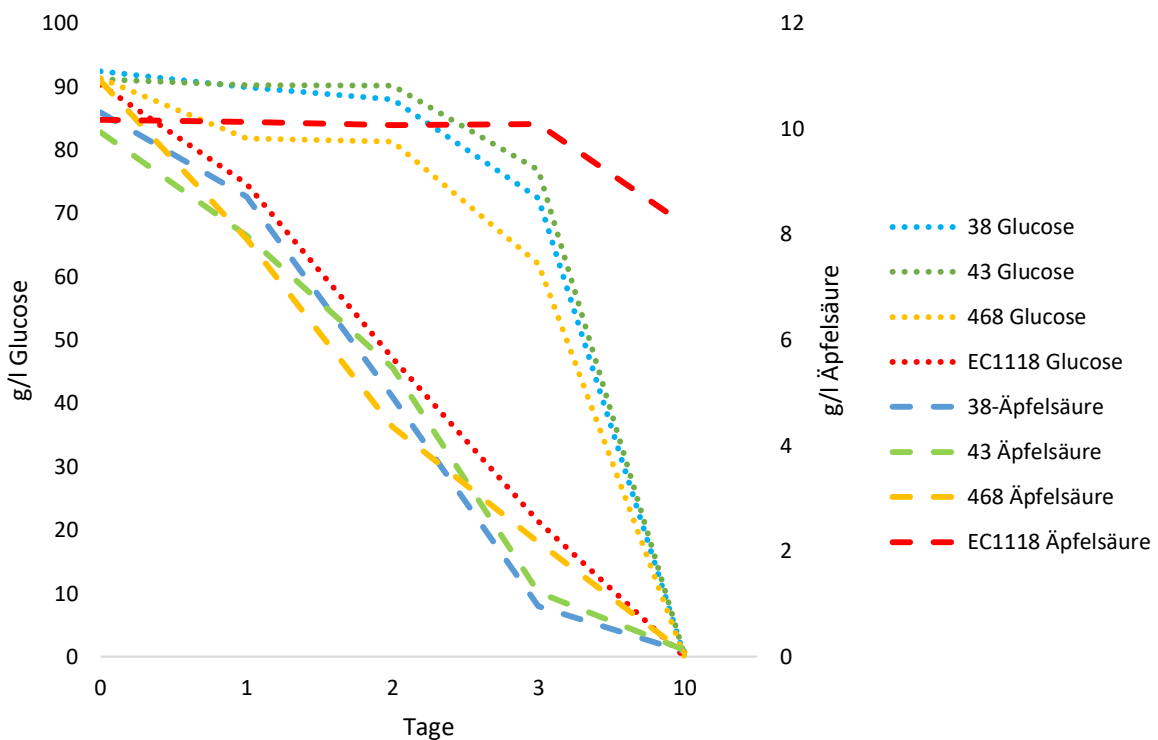


Abb. 7: Dynamik der Äpfelsäure- und Glucosegehalte im Verlauf der Gärung im Labor in künstlichem Most

Weißmostgärung im Labor

Im Weinkeller wurde Rieslingmost wie im Betrieb üblich durch Flotation vorgeklärt. Der Most wurde im Labor für Versuchsgärungen genutzt. Der angereicherte Most enthielt 9,7 g/l Äpfelsäure, 227 g/l vergärbaren Zucker und 0,5 g/l Diamoniumhydrogenphosphat. Außerdem wurde 0,4 g/l Heferindenpräparat und 100 mg/l Kaliumdisulfid zugesetzt. Die Gärung wurde bei 23 °C durchgeführt. Es kamen 10 verschiedene *S. pombe*-Stämme und eine *Saccharomyces*-Referenzhefe in dreifacher Wiederholung zum Einsatz.

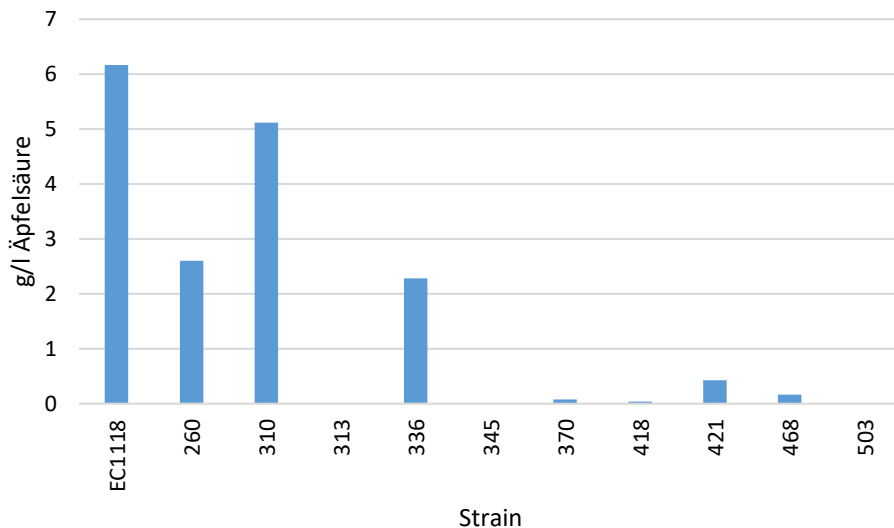


Abb. 8: Äpfelsäuregehalte nach Weißmostvergärung

Nicht alle *S. pombe*-Stämme vergären die Äpfelsäure vollständig (Abb. Bis auf die *Saccharomyces*-Referenzhefe zeigen alle mit *S. pombe* vergorene Moste einen deutlichen weinuntypischen sensorischen Ton. Einige *S. pombe* Stämme haben während der Gärung auch einen ausgeprägten Böxer (schweflig-fauliger Fehlton) produziert.

Gärversuche im Pilotmaßstab

In den Jahren 2018 und 2019 wurden kellertechnische Maischegärversuche im Pilotmaßstab durchgeführt.

Jahrgang 2018

Die sehr warme bis heiße Witterung des Ausnahmejahrs 2018 hat dazu geführt, dass die Äpfelsäure in den Beeren schon am Weinstock fast vollständig abgebaut wurde. Die Äpfelsäuregehalte lagen um und unter 1 g/l. Um den Äpfelsäureabbau trotzdem experimentell untersuchen zu können, war es nötig die Moste mit 8 g/l L-Äpfelsäure anzureichern. Ein Gehalt von mehr als 8 g/l Weinsäure ist in kühleren Jahren häufig anzutreffen.

Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden mit drei aufgrund der Ergebnisse der Laborversuche ausgesuchten *S. pombe*-Stämmen durchgeführt. Eine in der Herstellpraxis gängige Hefe (Oenoferm® Rouge), die durch die Firma Erbslöh vertrieben wird, wurde zum Vergleich in die Versuche mit einbezogen. Alle Gärungen wurden in dreifacher Wiederholung pro Hefestamm durchgeführt. Es wurden rote Maischen in 120-Literfässern vergoren (Abb. 4). Allen Maischen wurde einheitlich 0,5 g/l Diamoniumhydrogenphosphat (DAP) zur besseren Stickstoffversorgung zugesetzt. Zur Unterdrückung der mikrobiologischen Begleitflora wurden 50 mg/l Kaliumdisulfid eingesetzt. Das Volumen der jeweils vergorenen Maische betrug 100 l. Wie

schon oben erwähnt wurden die Maischen mit 8 g/l L-Äpfelsäure angereichert. Zur Gärung wurden Maischen der Rebsorten Schwarzriesling und Trollinger verwendet.

Durch das geringe Maischevolumen kühlten die Fässer schnell vor Einsetzen der stark exothermen Hauptgärung aus. Im Verhältnis zum wärmeproduzierenden Inhalt ist die wärmeabgebende Oberfläche von kleinen Fässern im Vergleich zu großen Fässern größer. Daher reichte die von den Hefen produzierte Wärme nicht aus, um die Energieabgabe über die Fassoberfläche auszugleichen. Die Fässer mussten zusätzlich isoliert werden. Außerdem wurden die Fässer auf Wärmedämmplatten gestellt, um die Wärmeabgabe an den Betonboden zu verringern (Abb. 9). Vor Beginn der ersten Maischegärung wurde die Maische auf 25 °C erwärmt. Vierundzwanzig Stunden nach Gärbeginn musste die Maische erneut auf 24 – 25 °C mit einer Infrarotheizkerze erwärmt werden. Danach reichte die endogene Wärme der zunehmend stärker verlaufenden Gärungen aus, um die Temperatur auf 28 – 30 °C anzuheben und bis zum Gärende zu halten. In den folgenden zwei Maischegärungen wurde die Maische erwärmt und mit einer Temperatur von 30 °C in die jetzt isolierten Fässer gefüllt.



Abb. 9: Maischegärversuche in wärmeisolierte Maischefässer im Weinkeller

Hefepopulationen während der Maischegärung

S. pombe wird in der Literatur als eine konkurrenzschwache Hefe beschrieben. Um eine zuverlässige Gärung in der Produktion zu erreichen, war es wichtig einen Eindruck von der Populationsdynamik von *S. pombe* und der Hefebegleitflora (Wildhefen) zu bekommen. Hierfür wurden in den ersten 5 Tagen der Gärung Proben genommen und die Zellen von *S. pombe* und der Wildhefen unter dem Mikroskop gezählt. *S. pombe* lässt sich gerade zu Beginn der Gärung, wenn die Hefen sich stark vermehren, gut vom Rest der Hefen trennen.

Die Bildung von Querwände, die bei der Zellteilung entstehen, ist gut vom Sprossen der übrigen Hefen zu unterscheiden. Die Hefen, die mit dem Lesegut aus dem Weinberg in die Gärung geraten oder die schon in Pumpen, Schläuchen usw. im Weinkeller vorhanden sind, werden hier unter dem Begriff „Wildhefen“ zusammengefasst.

S. pombe wurde zu Beginn mit einer in der Produktion üblichen effektiven Populationsdichte von 10 Mio. Zellen/ml eingesetzt und vermehrte sich nur relativ schwach zu Beginn der Maischegärung. Die Population wuchs bis zur 2-4-fachen Dichte der eingesetzten Population innerhalb der ersten 12-24 Stunden der Gärung heran. Eine Dichte von 40 Mio. *S. pombe*-Zellen pro Milliliter wurde nicht überschritten. Auf diesem Niveau hielten sich die Population bis etwa 60 Stunden nach Gärbeginn. Danach brechen die *S. pombe*-Populationen zusammen. Ihre Dichte fällt unter das zu Beginn eingesetzte Niveau. Die Wildhefen beginnen erst nach ca. 36 Stunden nach Gärbeginn sich stark zu vermehren und erreichen innerhalb der darauffolgenden 24-48 Stunden maximale Populationsdichten von 110 – 150 Mio. Zellen.

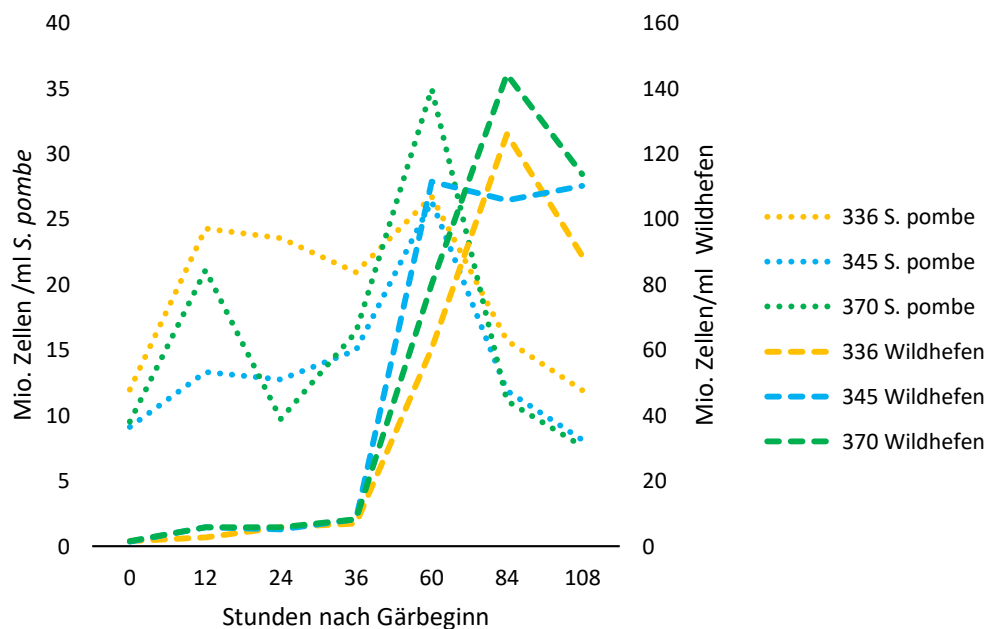


Abb 10: Populationsdichten von *S. pombe* und Wildhefen im Verlauf der Maischegärung; *S. pombe* wurde mit einer effektiven Populationsdichte von 10 Mio. Zellen pro Milliliter zugesetzt

Die Ergebnisse bestätigen, dass *S. pombe* sich nicht ohne weiteres in einer Maische gegen die Hefenbegleitflora durchsetzen kann. *S. pombe* hat eine deutlich höhere Toleranz gegen schweflige Säure in ihrer undissoziierten Form. Die eingesetzten 50 mg/l Kaliumhydrogensulfid verschaffen bei den niedrigen pH-Werten (um 3,0) einen deutlichen Konkurrenzvorteil. Auch die in der Produktion unüblich Praxis der Erwärmung der Maische stärkt die Konkurrenzfähigkeit der besonders wärmebedürftigen *S. pombe*. Trotz dieser

Maßnahmen vermehrt sich *S. pombe* in der Maische nur vergleichsweise schwach. Daher können die gewählten Bedingungen für die Maischegärung mit *S. pombe* als unbedingt notwendig angesehen werden. Durch sie kann eine erfolgreichen Äpfelsäure- und Zuckervergärung sichergestellt werden.

Vergären von Äpfelsäure und Zucker während der Maischegärungen

Die Dichteveränderung wird in der Weinbereitung als Maß für den Zuckerabbau während der Gärung gemessen. Wenn gerade zu Anfang der Gärung der Zuckerabbau nur schleppend verläuft und im Zuge dessen der Alkoholgehalt nur langsam ansteigt besteht die Gefahr, dass sich Wildhefen oder Bakterien schnell vermehren und Fehltöne wie Ethylacetat oder Essigsäure produzieren. Daher ist ein schnelles Einsetzen der Gärung unbedingt notwendig.

In der ersten Maischegärung im Pilotmaßstab waren die Temperaturen für die Zuckervergärung durch *S. pombe* anfangs zu niedrig. Erst nachdem die Fässer wärmeisoliert wurden und die Temperatur der Maische angehoben wurde, erreichte *S. pombe* ähnlich Zuckerabbauraten wie die eingesetzte Vergleichshefe (Abb. 11). In der zweiten und dritten Maischegärung wurde die Maische zunächst auf 30 °C erwärmt und dann in die wärmeisolierten Fässer gefüllt. In beiden Gärungen war die Dichteabnahme und damit die Zuckervergärung mit *S. pombe* vergleichbar mit der durch die Vergleichsgärung (Abb. 12 u. 13).

In allen drei Gärungen mit *S. pombe* wurde der Zucker und die Äpfelsäure vollständig vergoren. Die sehr geringen Gehalte der Weine an Milchsäure deuteten nicht auf eine malolaktische Gärung durch Milchsäurebakterien im größeren Umfang hin.

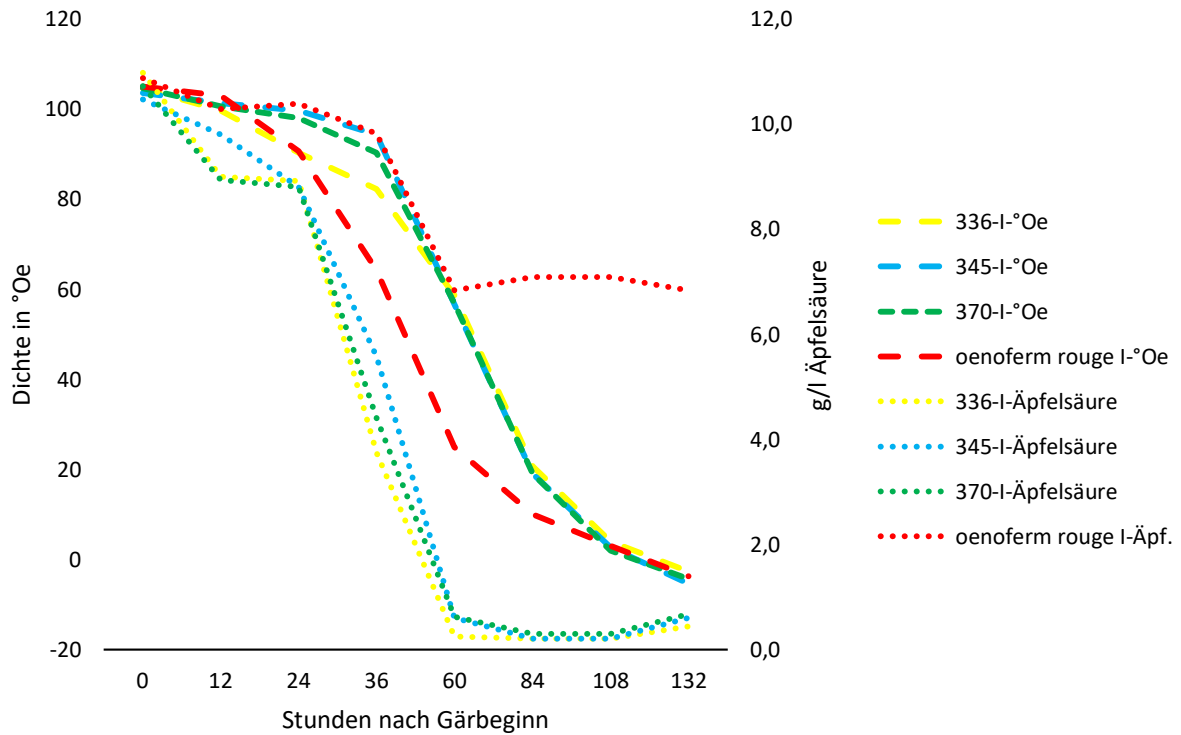


Abb 11: Erste Maischegärung im Pilotmaßstab; Dynamik der Äpfelsäuregehalte und der Dichte im Verlauf der Gärungen

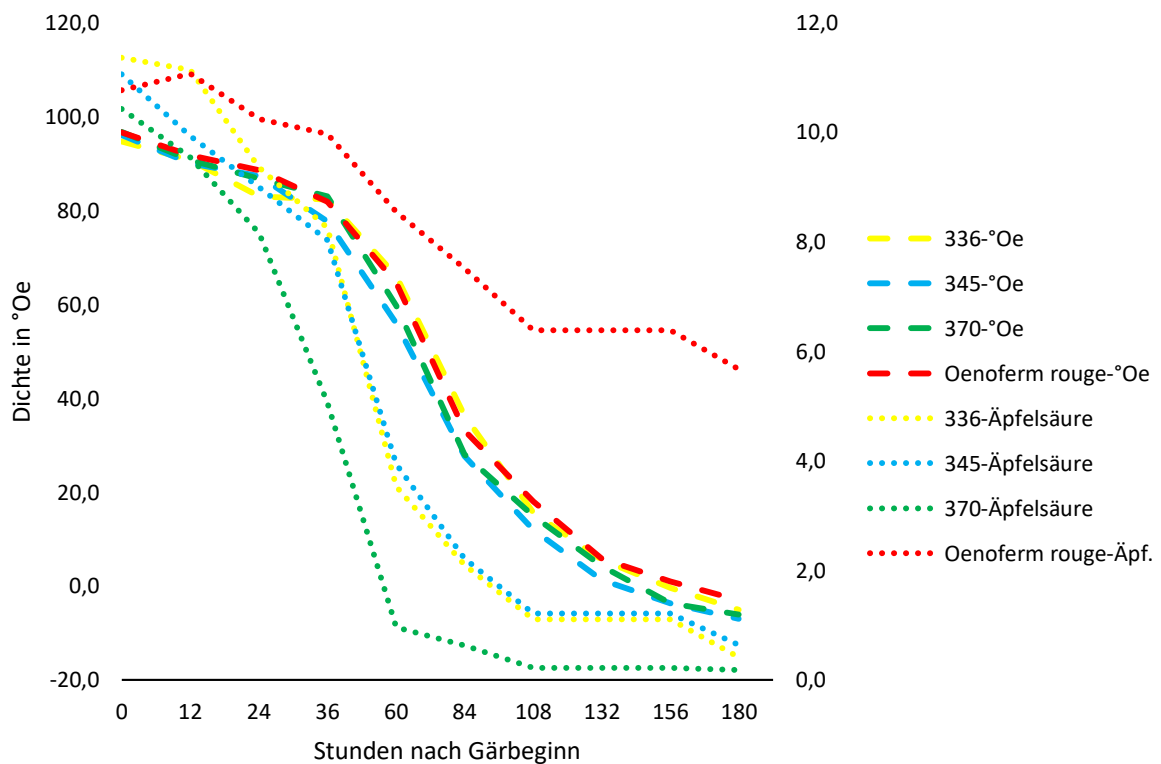


Abb 12: Zweite Maischegärung im Pilotmaßstab; Dynamik der Äpfelsäuregehalte und der Dichte im Verlauf der Gärungen

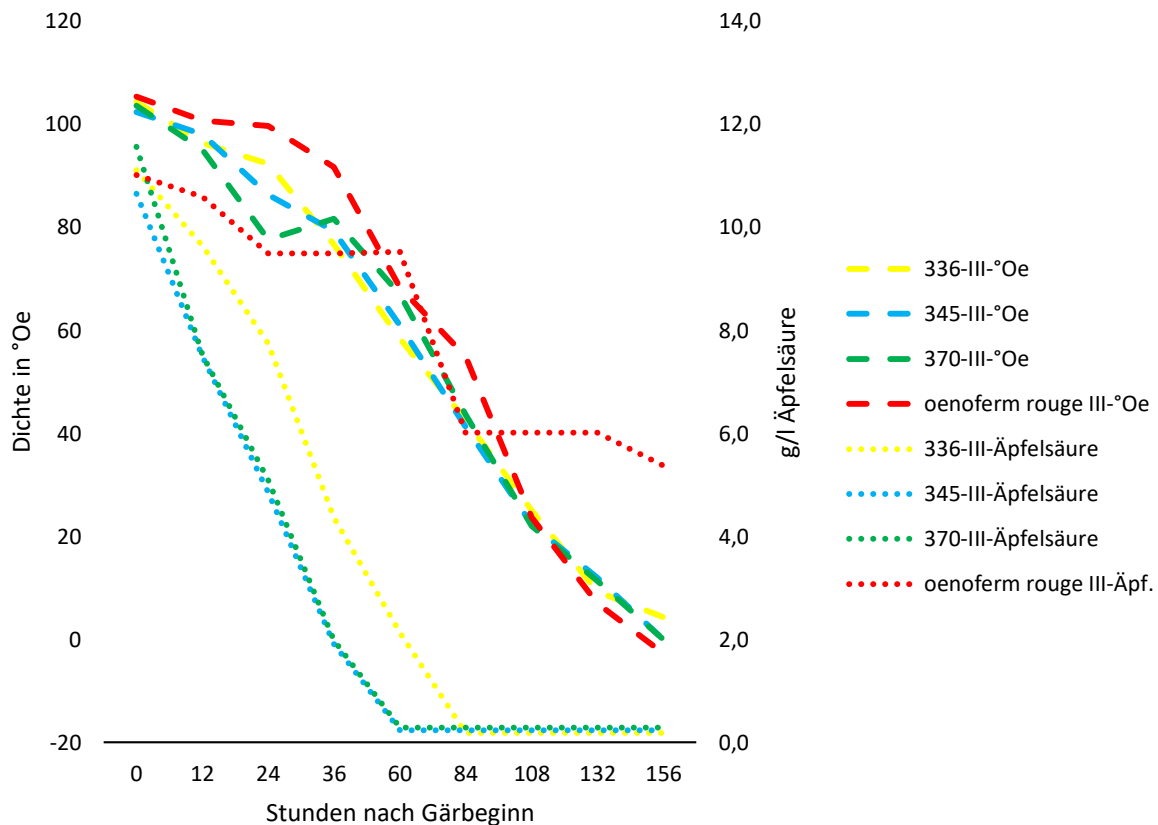


Abb 13: Dritte Maischegärung im Pilotmaßstab; Dynamik der Äpfelsäuregehalte und der Dichte im Verlauf der Gärungen

Jahrgang 2019

2019 wurde eine Gärreihe in Maische durchgeführt. Die Äpfelsäuregehalte lagen 2019 in einem moderaten Bereich bei etwa 3 g/l. Um möglichst praxisnah zu arbeiten wurde der Maische keine Äpfelsäure zugesetzt. Die Maische wurde auf 30 °C temperiert und wie im Vorjahr in dreifacher Wiederholung im Pilotmaßstab (100 l) vergoren. Die Zelldichte zu Anfang der Gärung betrug 10 Mio. Zellen/Milliliter. Da das Lesegut fast keine Fäulnis zeigte wurde die Maische, die durch die konventionelle Referenzhefe vergoren wurde, nicht vor der Gärung mit schwefliger Säure versetzt. Dies entspricht guter fachlicher Praxis. Bei den mit *S. pombe* vergorenen Maischen wurde 50 mg/l schweflige Säure angewendet um *S. pombe* einen Konkurrenzvorteil vor der mikrobiologischen Begleitflora zu ermöglichen. Die Dynamik der Dichteabnahme und des Äpfelsäureabbaus wurden erfasst. Zusätzlich wurden in der Maische vor Beginn der Gärung und im fertigen Versuchswein die Gehalte der biogenen Aminen Cadaverin, Histamin und Putrescin bestimmt. Cadaverin, Histamin und Putrescin sind biogene Amine die in Weinen in höheren Mengen auftreten können.

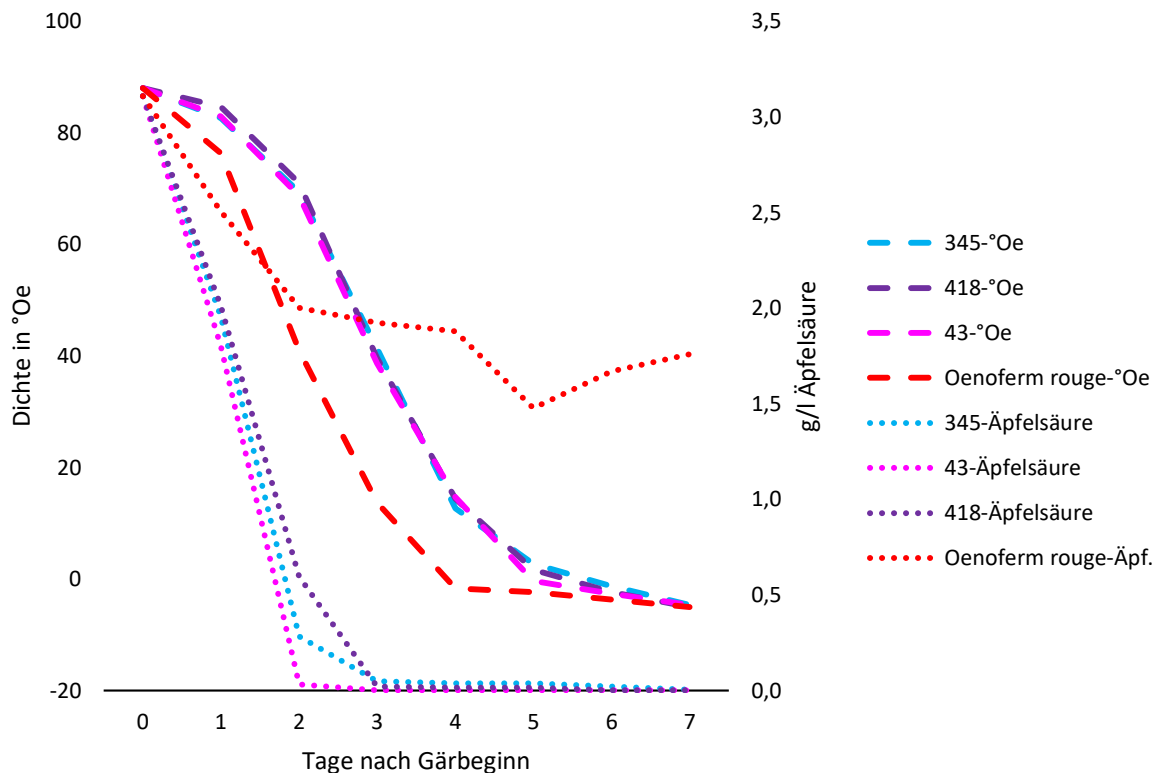


Abb 14: Zweite Maischegärung in Pilotmaßstab; Dynamik der Äpfelsäuregehalte und der Dichte im Verlauf der Gärungen

Die Dynamik der Äpfelsäuregehalte und der Dichte während der Gärung sind in Abb 14 dargestellt. Die relativ geringen Anfangsgehalte an Äpfelsäure von nur etwa 3 g/l wurden von allen Hefestämmen innerhalb der ersten 2-3 Tage der Gärung vollständig abgebaut. Der Zuckerabbau findet im Vergleich mit der Referenzhefe mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa einem Tag statt. Die Intensität des Abbaus ist aber auf ähnlichem Niveau wie bei der Referenzhefe.

Wie im Vorjahr erreicht die Zuckervergärung der *S. pombe*-Stämme ein Niveau wie das der Vergleichshefe. Im Unterschied zum Vorjahr findet die Zuckervergärung mit einer Verzögerung von ca. einem Tag im Vergleich zur Vergleichshefe statt. Die Äpfelsäure wurde innerhalb von 2-3 Tagen vollständig vergoren.

Die Gehalte an Cadaverin und Histamin lagen in allen Maischen unter der Nachweisgrenze von 1,0 mg/l. Putrescin war lag vor der Gärung in Konzentrationen von 6,9 mg/l bis 8,3 mg/l und nach der Gärung in Konzentrationen von 1,7 – 4,3 mg/l vor (Abb 15). Damit haben in allen Gärungen die Gehalte an Putrescin abgenommen.

Bedingt durch die geringe mikrobiologische Belastung des Leseguts (Fäulnisanteil) war die Bakteriendichte in der Vergleichsgärung sehr gering. Die Gehalte an biogenen Aminen waren sowohl im Ausgangsmaterial als auch im fertigen Wein durchgehend sehr niedrig. Es

ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gärungen mit der Vergleichshefe und den Gärungen mit *S. pombe*.

Einer Verkostung durch vier qualifizierte Personen ergab, dass die Weine keine Weinfehler aufwiesen. Sie wurden passend zur Rebsorte Trollinger als frisch und fruchtig beurteilt. Auffallend war, dass die Weine weniger Essigsäure enthielten als dies bei Weinen, die die malolaktische Gärung durchlaufen haben, in der Regel der Fall ist.

Fazit Maischegärungen im Pilotmaßstab

Die Maischegärungen im Pilotmaßstab haben gezeigt, dass ein Vergären der Äpfelsäure durch *S. pombe* in der Maische während der Rotweinbereitung möglich ist. Die Äpfelsäure wird von gärstarken *S. pombe*-Stämmen innerhalb der Tagen der Gärung vollständig in Ethanol umgewandelt. Auch bei hohen Anfangsgehalten an Äpfelsäure von etwa 10 g/l wird die Säure vollständig in Ethanol umgebaut, bevor die Zuckervergärung zu Ende ist. Die Alkoholbildung aus Zucker durch *S. pombe* setzt teilweise später ein als dies bei konventionellen Hefen der Gattung *Saccharomyces* der Fall ist. Die Gärung läuft dann aber mit vergleichbarer Geschwindigkeit vollständig ab. Die zeitliche Verzögerung bewegt sich in einem Rahmen der für die Produktion keine negative Auswirkung befürchten lässt.

Einsatz von *S. pombe* im Produktionsmaßstab

S. pombe wurde im Produktionsmaßstab zur Herstellung von Rotwein in der Maischegärung und im Weißwein zum Vergären weißer Moste eingesetzt. Die Maischen wurden auf 25-30 °C temperiert und mit 50 mg/l SO₂ geschwefelt. Die Maischen wurden mit einer effektiven Zelldichte von etwa 10 Mio. Zellen/ml beimpft. Die weißen Moste wurden praxisüblich vorgeklärt und mit derselben Zelldichte beimpft.

Während der Gärung wurde die Äpfelsäure in allen Gärungen vollständig abgebaut. Es konnten Weine mit dem Handelsnamen „Meilenstein“ als Weißwein und als Rotwein abgefüllt und vermarktet werden. Die Weine zeigten keine Fehltöne und vielen durch eine eigene Sensorik auf. Beim roten „Meilenstein“ viel auf, dass das Mundgefühl durch die niedrigen Säuregehalte weicher war als bei konventionellen Rotweinen. Der Wein war fruchtbetont. Die für maischevergorene Rotweine bis zu einem gewissen Grad typischen Gehalte an flüchtiger Säure (hauptsächlich Essigsäure) fehlten. Der weiße „Meilenstein“ viel durch die für einen Weißwein sehr niedrigen Säurewerte auf. Beide „Meilenstein“-Weine wurden vom Kunden mit großem Interesse angenommen.

Zwar wurden die beiden genannten Weine aus Marketinggründen unverschnitten als reine mit *S. pombe* vergorene „Meilenstein“-Weine abgefüllt, jedoch war dies nicht die Zielsetzung des Projekts. Selten stammen vermarktete Weine aus einer Gärung aus einem Gebinde. Üblicherweise wird ein Cuvée aus verschiedenen Gärungen so zusammengestellt, dass es den Anforderungen des Marktes und den Möglichkeiten des Betriebes entspricht. Durch das

Verschneiden verschiedener Weine werden unter anderem der Zucker-, Gerbstoff-, Farbstoff-, und Säuregehalt optimiert. Entsprechend sollen die mit *S. pombe* teilentsäuerten Weine weniger als reine „*S-pombe*-Weine“ vermarktet werden, sondern als Verschnittpartner dienen.

Obwohl einige Gärungen mit *S. pombe* im Produktionsmaßstab sehr erfolgreich verliefen und die Weine vermarktet werden konnten, liefen andere Gärungen sehr ungünstig. Eine mit *S. pombe* vergorene Maische entwickelte schon während der Gärung einen sehr starken Gärungsböckser (schwefelhaltige unangenehm richtende Substanzen), der mit den praxisüblichen und weinrechtlich zugelassenen Behandlungsmethoden wie Belüften oder dem Einsatz von Kupfersulfat nur schwer zu beheben war. Durch intensive Behandlungen mit denen Fehltöne beseitigt werden können verlieren die Weine auch im erheblichen Umfang wertgebende Substanzen. Es entstehen zusätzliche Sach- und Personalkosten.

Fazit der Gärversuche im Produktionsmaßstab

In der Produktion konnte gezeigt werden, dass *S. pombe* das Potential hat in der Weinherstellung im Produktionsmaßstab in der Gärung die Äpfelsäure vollständig zu Ethanol zu vergären. Ein breiter Einsatz von *S. pombe* in der Praxis wird erst dann möglich sein, wenn die Bedingungen unter denen *S. pombe* schwere Fehltöne im Wein produziert bekannt sind bzw. Stämme identifiziert werden können, die diese Fehltöne erst gar nicht entstehen lassen.

Anteil der im Projekt untersuchten Hefestämme an der global vorhandenen genetischen Vielfalt in *S. pombe*

Am Ende des Projektes sollte untersucht werden, wie breit das Spektrum der im Projekt untersuchten genetischen Variabilität im Vergleich zur global vorhandenen bzw. bekannten Variabilität ist. Dadurch sollte festgestellt werden, ob das genetische Potential von *S. pombe* im vorliegenden Projekt schon hinreichend untersucht worden ist oder ob es Verwandtschaftsgreise innerhalb der Art gibt, die noch nicht untersucht wurden und ein zusätzliches Potential für die praktische Anwendung darstellen.

Mit Prof. Dr. Li-Lin Du National Institute of Biological Sciences, Beijing, China wurde ein Partner gefunden der auf die Genomsequenzierung und Genomanalysen in der Gattung *Schizosaccharomyces* spezialisiert ist. Das Genom aller *Schizosaccharomyces*-Hefestämme, die im Projekt isoliert werden konnten und das Genom einer großen Zahl weiterer *Schizosaccharomyces*-Stämme wurde analysiert. Die Genomdaten von über 600 *S. pombe*-Stämmen konnten so in die Analyse mit einbezogen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die in das Projekt einbezogenen Stämme nur einen Bruchteil der gesamten global bekannten genetischen Vielfalt innerhalb der Art *S. pombe* repräsentieren. Dies gibt Anlass zu der Hoffnung das mit Hilfe der Genomdatenanalyse in Zukunft *S. pombe* Stämme identifiziert werden können, die in der Weinherstellung eingesetzt werden können, um die Äpfelsäure zu

eliminieren ohne Fehltöne zu bilden.