Vitis 13, 336—347 (1975)

Institut für Mikrobiologie und Biochemie der Forschungsanstalt für Weinbau, Gartenbau, Getränketechnologie und Landespflege, Geisenheim

Vergleichende Untersuchungen von Mosten und Weinen aus gesunden und aus Botrytis-infizierten Traubenbeeren

II. Modellversuche zur Veränderung des Mostes durch Botrytis-Infektion und ihre Konsequenzen für die Nebenproduktbildung bei der Gärung[1])

von

H. H. Dittrich, W.-R. Sponholz und H. G. Göbel[2])

Comparative investigations on musts and wines from healthy and Botrytis-infested grape-berries. II. Pattern tests on changing of musts by Botrytis infestion and their consequences for the production of by-products of fermentation

Summary. — During the fermentation of "noble rotten" musts (musts from *Botrytis*-infested grapes) the production of pyruvic acid and ketoglutaric acid is significantly increased, which causes high SO_2 binding. Investigations were performed to clarify whether this process is due to the high sugar concentration, a deficiency of amino acids or nitrogen, or to the low thiamine content of these musts.

Therefore, samples of must were treated as follows: a) unadulterated, b) infested by *Botrytis*, c) treated with cation exchanger in order to simulate the presumed effect of *Botrytis* and, particularly, to cause a deficiency of amino acids and thiamine. These variants were fermented a) without additives, b) after addition of an amino acid mixture, c) after addition of ammonium-ions. Besides, all these variants were fermented with a dose of 0,5 mg thiamine/l.

The analysis of the SO_2 binding metabolites showed a very high formation of pyruvic acid and ketoglutaric acid in *Botrytis*-infested samples and in the cation-depleted ones, as already observed in fermented musts with "noble rot". The accumulation of these metabolites is independent of the nitrogen content. In any case, it is diminished to a normal concentration only by thiamine.

The result proves that the high requirement of SO_2 in wines made from *Botrytis*-infested grapes is essentially caused by the disturbed metabolism of yeasts during the fermentation of these musts. This disturbance is due to the thiamine depletion in grapes by *Botrytis*. Owing to this deficiency, the yeast in these musts cannot perform the normal decarboxylation of its metabolites pyruvic acid and ketoglutaric acid. Therefore, both SO_2 binding metabolites build up to high concentrations which can amount to a multiple of the quantity found in normal young wines. A dose of 0,5 mg thiamine/l normalizes the metabolism of the yeasts and, in consequence of this process, the increase in SO_2 binding in wines made from *Botrytis*-infested material.

Einleitung und Problemstellung

Vergleichende Untersuchungen (Dittrich *et al.* 1974) von Mosten aus gesundem und aus *Botrytis*-infiziertem Lesegut und den aus diesen Mosten gewonnenen Weinen hatten u. a. folgendes ergeben: Moste aus faulem Lesegut enthalten nicht mehr Acetaldehyd als Moste aus gesundem Lesegut, aber mehr Pyruvat und mehr Ketoglutarat. Nach der Vergärung enthalten die Jungweine aus faulem Beerenmaterial etwas mehr Acetaldehyd, vor allem aber etwa dreieinhalbmal mehr Pyruvat und auch mehr als doppelt soviel Ketoglutarat.

[1]) Dem Bundesminister für Jugend, Familie und Gesundheit danken wir für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

[2]) Die Zahlenwerte sind größtenteils der vom Fachbereich Weinbau und Getränketechnologie, Geisenheim, angenommenen Ing.-Arbeit von H. G. Göbel entnommen.

Diese Ergebnisse brachten eine andere Erklärung des hohen SO_2-Bedarfs von Weinen aus faulem Lesegut. Bis dahin schien nämlich der hohe SO_2-Bedarf der Spitzengewächse im wesentlichen vom hohen Acetaldehydgehalt abhängig zu sein, wie bei den anderen Weinen auch. Diese Annahme beruhte auf der Tatsache, daß bei stark gedrosselten Gärungen der Acetaldehydgehalt zwar ansteigt, aber dann kaum mehr zurückgeht (DITTRICH und STAUDENMAYER 1968), und daß mit steigendem Zuckergehalt die Brenztraubensäurebildung kleiner wird, die Acetaldehydbildung aber zunimmt (DITTRICH und GONGSAKDI 1969).

Neben der hohen Zuckerkonzentration schien für die langsame Vergärung und die damit in Zusammenhang gebrachte hohe Acetaldehydbildung außerdem der geringe Stickstoffgehalt der „faulen" Moste verantwortlich. Schon MÜLLER-THURGAU (1888) hatte nämlich gefunden, daß infolge der *Botrytis*-Infektion der Stickstoffgehalt dieser Moste stark zurückgeht. Genauere Untersuchungen zeigten dann eine starke Abnahme der freien Aminosäuren in edelfaulen Beeren (RAPP und REUTHER 1971, SPONHOLZ und DITTRICH 1974).

Die letzten Untersuchungen (DITTRICH *et al.* 1974) lieferten insofern eine gute Beurteilungsbasis, als das zugrundeliegende Versuchsmaterial keine großen Unterschiede im Zuckergehalt aufwies. Hingegen deutete der relativ geringe Acetaldehydunterschied sowie andererseits der sehr große Pyruvat- und Ketoglutarat-Unterschied der „faulen" im Vergleich zu den „gesunden" Jungweinen auf eine andere Ursache hin. Beide Metaboliten werden nämlich von einem Enzym decarboxyliert, das Thiamin-Pyrophosphat-abhängig ist. Ein so hohes Vorkommen, also eine so starke Aufstauung innerhalb des Stoffwechselflusses, scheint nur erklärlich, wenn angenommen wird, daß *Botrytis* neben Aminosäuren, Mineralien und ähnlichen Stoffen auch Thiamin aufnimmt. In der Hefe, die im edelfaulen Most zur Vermehrung kommt, kann es anscheinend nicht so schnell selbst synthetisiert werden, wie aus gesunden Mosten von ihr aufgenommen werden kann.

Um die von *Botrytis* hervorgerufenen Veränderungen der Moste und die davon ausgehenden Stoffwechselveränderungen der Hefe während der Gärung modellhaft zu erfassen, wurden Gärung und Gärungs-Nebenproduktbildung der Hefe in sterilisiertem Most verglichen mit der Gärung und Nebenproduktbildung in dem gleichen Most, der aber längere Zeit von einer *Botrytis*-Decke bewachsen worden war. Um die *Botrytis*-Wirkung auf einen Most zu simulieren, wurde drittens der gleiche Most einer Kationenaustauscher-Behandlung unterworfen. Es konnte nämlich angenommen werden, daß die Kationenaustauscher-Behandlung nicht nur essentielle Kationen, sondern auch einen wesentlichen Teil der Aminosäuren und auch das Thiamin, das ja ein Kation ist, entfernt. Zur „Reparation" dieser simulierten Verarmung des Mostes wurde entweder ein Gemisch aller Aminosäuren oder eine auf den gleichen Stickstoffgehalt berechnete Menge Ammoniumionen zugesetzt. Das Mineraliendefizit wurde durch Zusätze von KH_2PO_4, $MgSO_4$ und einer Spurenelementmischung ausgeglichen. Zur Prüfung der beschriebenen Thiamin-Hypothese wurde eine zweite Versuchsgruppe wie oben, aber jeweils mit Thiamin-Zusatz versehen.

Aus dem unbehandelten (A), dem *Botrytis*-bewachsenen (B) und aus dem kationenverarmten Most (C) wurden also im einzelnen folgende Versuchsansätze hergestellt:

1 Most, verdünnt auf 50 °Oe, heiß eingelagert;
1 a Most + 2 g Aminosäure-Gemisch/l;
1 b Most + 100 mg NH_4^+ ≙ 2 g Aminosäuregemisch/l;
2 Wie 1 — 1 b, jedoch mit 0,5 mg Thiamin/l.

Diese Versuche haben wir mit einem frisch gepreßten Most höheren Zuckergehalts (68 °Oe) wiederholt, um eventuelle grundsätzliche, spezifisch zuckerabhängige Unterschiede in der Nebenproduktbildung erkennen zu können.

Die Grundlage der Untersuchungen bildet die Feststellung der Gärungsintensität. Nach beendeter Gärung wurden bestimmt: Hefe-Zellzahl, Acetaldehyd, Pyruvat, Ketoglutarat und die SO_2-Bindung, sowie Restzucker, Alkohol, Glycerin, Gesamtsäure und pH-Wert.

Die geschilderte Versuchsanstellung sollte die Frage beantworten, ob die hohe SO_2-Bindung von Auslesen, bzw. die ihr u. a. zugrundeliegende starke Bildung SO_2-bindender Hefe-Metaboliten verursacht wird vom hohen Zuckergehalt, vom Aminosäure- bzw. Stickstoff-Defizit oder vom geringen Thiamin-Gehalt edelfauler Moste.

Material und Methoden

Gärsubstrat der ersten Versuchsserie war verdünnter (50 °Oe), heiß eingelagerter Traubenmost (Sortengemisch), in der Folge mit A bezeichnet. Zur Herstellung eines vergleichbaren, durch *Botrytis* veränderten Mostes (B) wurde der verdünnte Ausgangs-Most (50 °Oe) in Fernbach-Kolben gefüllt (je 500 ml) und nach Sterilisation mit *Botrytis* hinreichend stark beimpft. Nach 18 Tagen wurde von der *Botrytis*-Decke abfiltriert. Um die *Botrytis*-Wirkung zu simulieren, wurde der verdünnte Ausgangsmost zwecks Verringerung des Aminosäuren- und des Thiamin-Gehaltes über eine mit stark saurem Kationenaustauscher (Merck, Lewatit S 100) beschickte Säule gegeben. Dieser kationenverarmte Most wird im weiteren mit C gekennzeichnet.

Die aus dem Most A gewonnenen Moste B und C wurden dann mit Glucose wieder auf 50 °Oe gebracht und mit NaOH bzw. HCl auf den ursprünglichen pH-Wert 3,5 eingestellt. Most C erhielt je l einen Zusatz von 1 g KH_2PO_4, 1 g $MgSO_4$, 5 mg Spurenelementlösung folgender Zusammensetzung: 560 mg H_3BO_3, 300 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1560 mg $ZnCl_2$, 400 mg $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 540 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 400 mg $(NH_4)Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 180 mg KJ, 1000 mg Fe-Citrat, das ganze nach Zusatz von 50 ml 1n Salzsäure in 1000 ml H_2O dest. gelöst.

Die so gewonnenen Moste A, B und C wurden in drei Teile geteilt. Davon blieb der erste unverändert (1), der zweite (1 a) bekam je l einen Zusatz von 2 g eines Aminosäurengemisches, bestehend aus gleichen Mengen von Asparaginsäure, Threonin, Leucin, Isoleucin, Alanin, Phenylalanin, Lysin, Methionin, Cystin, Histidin, Valin, Prolin, Serin, Arginin, Glycin, Tryptophan, Tyrosin und Glutaminsäure. Der dritte Teil (1 b) bekam die annähernd gleiche Stickstoffmenge in Form von NH_4^+ (als $(NH_4)_2SO_4$). Die Moste 2 — 2 b erhielten die gleiche Vorbereitung mit gleichen Zusätzen wie 1 — 1 b, nur wurde ihnen außerdem noch 0,5 mg/l Thiamin zugesetzt (vgl. Tab. 1).

Der zweiten Versuchsserie lag ein frisch gepreßter Huxel-Most von 68 °Oe (A) zugrunde. Die Herstellung der Most-Derivate B und C aus diesem Most erfolgte wie schon für den verdünnten Most von 50 °Oe beschrieben, mit der Ausnahme, daß bei B das Befüllen der sterilen Fernbachkolben durch EK-Filtration erfolgte. B und C wurden nach Kationen-Austausch bzw. *Botrytis*-Bewuchs auf 68 °Oe und den pH-Wert von A (3,1) eingestellt.

Beimpfung und Gärung: Die vorbereiteten Mostproben wurden zu je 100 ml in sterile 200 ml-Erlenmeyerkolben mit Gäraufsätzen gefüllt und mit einer gärenden Kultur *Saccharomyces cerevisiae* Stamm Epernay so beimpft, daß der fertige Gäransatz 3000 Zellen/ml enthielt. Gärtemperatur 15 °C. Die Feststellung der Gärungsintensität erfolgte durch tägliche Wägung des CO_2-Verlustes. — Die Hefezählung erfolgte mikroskopisch in der Zählkammer nach Bürker.

Tabelle 1

Hefezahl, SO_2-bindende Substanzen und SO_2-Bindung von Weinen aus einem verdünnten, heiß eingelagerten Most (50 °Oe), der durch verschiedene Behandlungen und Zusätze variiert wurde

Number of yeast cells, SO_2 binding substances and SO_2-fixation in wines, made from diluted and heat-treated musts (50 °Oe), varied by different treatments and additives

Versuchsvariante		Hefe-anzahl 10^6/l	Acet-aldehyd mg/l	Pyruvat mg/l	Keto-glutarat mg/l	SO_2-Bindung mg/l
Unbehandelt						
Unvergoren	A 0	—	2,2	16,8	6,1	184
Ohne Thiamin						
vergoren	A 1	60,0	51,0	108,7	59,4	285
mit AS vergoren	A 1 a	67,5	18,8	72,1	53,3	270
mit NH_4^+ vergoren	A 1 b	72,5	34,0	88,4	36,6	260
Mit Thiamin						
vergoren	A 2	61,2	15,0	20,3	45,7	200
mit AS vergoren	A 2 a	77,5	17,5	30,9	38,1	215
mit NH_4^+ vergoren	A 2 b	72,0	26,5	30,2	36,6	215
Botrytis-bewachsen						
Unvergoren	B 0	—	2,1	6,2	21,3	161
Ohne Thiamin						
vergoren	B 1	27,5	17,0	228,2	9,9	220
mit AS vergoren	B 1 a	47,5	11,4	416,6	110,7	210
mit NH_4^+ vergoren	B 1 b	52,5	34,0	245,7	77,7	210
Mit Thiamin						
vergoren	B 2	28,0	12,3	110,2	87,7	180
mit AS vergoren	B 2 a	60,0	17,8	31,8	27,4	205
mit NH_4^+ vergoren	B 2 b	55,0	25,8	11,3	36,4	185
Kationenverarmt						
Unvergoren	C 0	—	2,2	11,5	8,6	160
Ohne Thiamin						
vergoren	C 1	10,0	10,4	105,1	33,5	225
mit AS vergoren	C 1 a	55,0	10,7	340,6	306,3	220
mit NH_4^+ vergoren	C 1 b	42,5	31,0	324,2	307,5	240
Mit Thiamin						
vergoren	C 2	12,0	5,3	63,0	44,2	170
mit AS vergoren	C 2 a	72,5	10,6	177,6	129,5	205
mit NH_4^+ vergoren	C 2 b	47,5	97,8	150,2	105,1	180

Zucker und Alkohol wurden nach Rebelein (1973) bestimmt, Gesamtsäure und pH-Wert nach potentiometrischer Titration mit n/3 KOH. Die Bestimmung des Acetaldehyds wurde nach Then und Radler (1968) durchgeführt. Glycerin, Pyruvat und Ketoglutarat wurde mit enzymatischen Tests nach Bergmeyer (1970) bestimmt.

Die Bestimmung der SO_2-Bindung erfolgte durch Zusatz von 0,3 ml einer Lösung von 50 000 mg SO_2/l zu 50 ml vergorenem Most (das entspricht 300 mg freiem SO_2/l). Sofort danach wird in 25 ml Most jodometrisch die freie SO_2 bestimmt. Mindestens 6 Stunden später erfolgt eine weitere SO_2-Bestimmung in der Parallel-Probe. Die Differenz beider Werte ergibt die SO_2-Bindung in mg/l. Dieser Wert kann als Maß für die Gesamtheit aller SO_2-bindenden Stoffe — nicht nur der drei angegebenen — gelten.

Ergebnisse und Diskussion

Gärung

Die Gärungsintensitäten des heiß eingelagerten, verdünnten Mostes von 50 °Oe (A 1) und seiner Varianten durch *Botrytis*-Bewuchs (B 1) und Kationenaustauscherbehandlung (C 1) zeigt Abb. 1. Der kationenfreie Most hat eine äußerst schleppende Gärung, aber auch der *Botrytis*-bewachsene gärt viel langsamer als der unbehandelte Most A. Thiaminzusätze von 0,5 mg/l (A 2, B 2, C 2) fördern die Gärung nur wenig oder überhaupt nicht. Durch die Zugabe des Aminosäuren-Gemisches erfährt die Gärung der Moste B und C eine starke Beschleunigung. Eine zusätzliche Zugabe von Thiamin steigert die Gärungsintensität noch weiter (Abb. 2). Ammonium-Ionen, die für Hefe eine gut assimilierbare Stickstoffquelle sind, steigern die Gärung ähnlich wie das Aminosäurengemisch. Auch hierbei verbessert die gleichzeitige Thiaminversorgung die Gärungsintensität stark.

Die Gärintensitäten des frisch gepreßten Huxel-Mostes von 68 °Oe und seiner Varianten B 1 und C 1 gleichen im Prinzip denen des oben beschriebenen, heiß eingelagerten Mostes: Die schwächste Gärungsintensität hat der kationenarme Most (C 1). Es kann angenommen werden, daß er einen großen Teil seines natürlichen Aminosäurengehaltes und Thiamins verloren hat. Der *Botrytis*-bewachsene Most (B 1) hat eine etwas bessere Gärung, die aber doch stark hinter der des unbehandelten Mostes (A 1) zurückbleibt.

Durch Zusatz von Thiamin wird die Gärungsintensität deutlich gesteigert. Eine Ausnahme macht auch hier der kationenarme Most. Er ist wohl zu sehr „verarmt" worden, so daß die Hefe die entscheidenden Synthesen infolge Substratmangels gar nicht vollziehen kann. Die notwendige Basis für die Optimierung des Stoffwechsels durch das Thiamin ist anscheinend nicht gegeben. — Auch bei diesen Mosten wird die Gärung durch Zusatz von Aminosäuren gefördert. Eine weitere Förderung ist wiederum durch gleichzeitige Thiamin-Gaben zu verzeichnen. Auch durch NH_4-Ionen ist bei diesen Mosten die Gärungsgeschwindigkeit zu steigern, hier waren ebenfalls weitere Steigerungen durch Thiamin möglich.

Hefevermehrung

Die Verarmung der Moste A 1, sowohl durch *Botrytis*-Bewuchs (B 1) wie auch durch Kationenaustausch (C 1), spiegelt sich in den Hefezahlen: Sie sind durch den *Botrytis*-Bewuchs stark gesunken, noch mehr aber durch die Austauscherbehandlung. Diese Abstufung der Hefezahlen ist beim heiß eingelagerten, wie auch beim frisch gepreßten Most und ihren Varianten gleich. Die Vermehrungszahlen der Hefe sind auch Maß und Erklärung der Gärungsintensitäten dieser Moste: Die Gärungsintensität fällt in der angegebenen Reihenfolge ab. Bei Stickstoffzusatz, sei es in Form von Aminosäuren oder in Form von Ammonium, vermehrt sich die Hefe wesentlich stärker. Ungefähr im gleichen Maße steigt auch die Gärfähigkeit. Erhöhungen der Zellzahlen und damit auch der Gärungsintensität bringen dann die Thiaminzusätze. Im Ausgangsmost wird dadurch die Hefevermehrung nicht oder nur

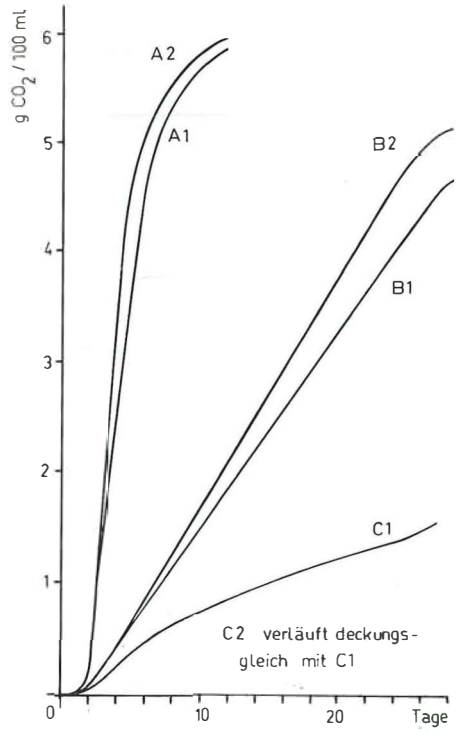


Abb. 1

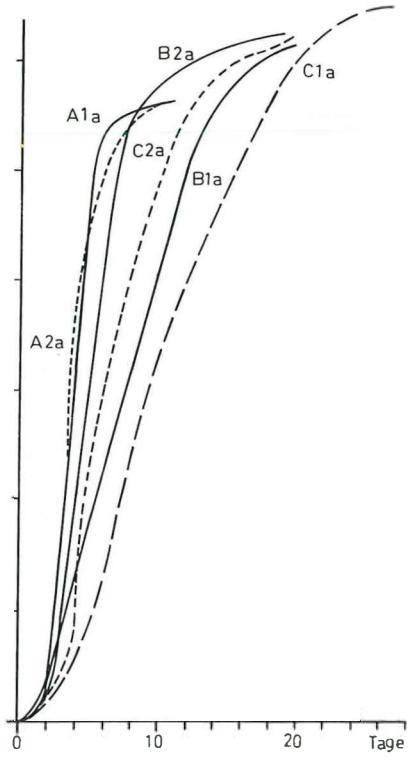


Abb. 2

Abb. 1: Gärungsintensität eines heiß eingelagerten, auf 50 °Oe verdünnten Mostes (A 1) und seiner Varianten nach *Botrytis*-Bewuchs (B 1) und Kationenaustauscherbehandlung (C 1) sowie die Gärungsintensität der gleichen Varianten nach zusätzlicher Anreicherung mit 0,5 mg Thiamin/l (A 2, B 2, C2).

Abb. 2: Gärungsintensität eines heiß eingelagerten, auf 50 °Oe verdünnten Mostes (A 1a) und seiner Varianten durch *Botrytis*-Bewuchs (B 1a) und Kationenaustauscherbehandlung (C 1a) nach Zugabe von jeweils 2 g Aminosäuregemisch/l sowie die Gärungsintensität der gleichen Varianten nach zusätzlicher Anreicherung mit 0,5 mg Thiamin/l (A 2a, B 2a, C 2a).

Fig. 1: Fermentation intensity of a heat treated must, diluted to 50 °Oe (A 1), and its variants infested by *Botrytis* (B 1), and treated with a cation exchanger (C 1), and fermentation intensity of the same variants enriched with 0,5 mg thiamine/l (A 2, B 2, C 2).

Fig. 2: Fermentation intensity of a heat treated must, diluted to 50 °Oe (A 1a), and its variants infested by *Botrytis* (B 1a), and treated with a cation exchanger (C 1a); 2 g of an amino acid mixture are added to all musts. A 2a, B 2a, C 2a: The same variants enriched with 0,5 mg thiamine/l.

mehr wenig gefördert: Die Thiaminmenge des Mostes reicht für die Bedürfnisse der Hefe unter diesen Bedingungen anscheinend aus.

SO_2-bindende Hefe-Stoffwechselprodukte und SO_2-Bindung der vergorenen Moste

Der Acetaldehydgehalt liegt beim Ausgangsmost des heiß eingelagerten Mostes atypisch hoch. Wie der frisch gepreßte Most zeigt, senken Zusätze von

Stickstoffverbindungen die Acetaldehydbildung normalerweise kaum. Auch Thiamin-Zusätze senken sie nicht oder nur wenig. Diese Feststellung gilt auch für die *Botrytis*-bewachsenen und die kationenverarmten Moste. Bemerkenswert ist, daß bei normalem Most durch den *Botrytis*-Bewuchs die Acetaldehydbildung nach der nachfolgenden Vergärung nicht höher ist als beim unbehandelten Ausgangsmost. Beim Vergleich von Weinen aus gesundem und *Botrytis*-infiziertem Lesegut waren die Acetaldehydgehalte der „faulen" Weine meist etwas höher als die der gesunden (Dittrich *et al.* 1974). Wahrscheinlich ist das auf den meist höheren Zuckergehalt der „faulen" Moste und ihre langsamere Gärung zurückzuführen (Dittrich und Gongsakdi 1969), möglicherweise auch auf den vermehrten Gehalt an hydrierbaren Stoffen in diesen oxidierten Mosten.

Der Vergleich der Acetaldehydbildung verschiedener Aufbereitungen eines Mostes zeigt jedenfalls eine überraschende Gleichartigkeit. Dieser Eindruck verstärkt sich beim Vergleich des verdünnten, heiß eingelagerten mit dem frisch gepreßten Most. Weder Stickstoff noch Thiamin haben einen nennenswerten Einfluß auf die Acetaldehydbildung.

Die Pyruvatbildung eines normalen Mostes (Tabelle 2, A 1 — A 1 b) wird von Stickstoffzusätzen wenig beeinflußt. Thiaminzusatz zum Ausgangsmost senkt aber die Pyruvatbildung etwa auf die Hälfte (A 2), beim heiß eingelagerten Most sogar auf ein Fünftel. Das zeigt an, daß die Zusammensetzung dieses Ausgangsmostes durch die Verdünnung und die Hitzebehandlung nicht mehr so qualifiziert ist hinsichtlich seiner Verwendung als Gärsubstrat.

Die beiden *Botrytis*-bewachsenen Moste (B 1) haben nach der Vergärung eine stark erhöhte Pyruvatkonzentration. Stickstoffzusätze können sie nicht verringern, die Aminosäurezusätze erhöhen sie sogar nochmals bei beiden Mosten B 1 a. Thiaminzusätze senken die Pyruvatbildung etwa auf die Hälfte, bei zusätzlichen Stickstoffzusätzen (B 2 a, b) sogar noch viel mehr. In beiden Mosten belegt die Pyruvatbildung, daß Stickstoffzusätze allein den Zellstoffwechsel der Hefe nicht optimieren und auch der Thiaminzusatz nur eine, wenn auch bedeutende, Besserung bringt. Erst die Kombination beider Faktoren ergibt eine Optimierung.

Die kationenverarmten Moste (C 1) haben ebenfalls hohe Brenztraubensäurewerte. Typischer ist auch hierbei der frisch gepreßte Most. Beim heiß eingelagerten Most wirken die Stickstoffzusätze sogar ausgesprochen „ketogen", sie erhöhen die Pyruvat- aber auch die Ketoglutaratbildung. Bei Thiaminzusatz nimmt die Pyruvatkonzentration wieder deutlich ab; bei den Proben ohne Stickstoffzusatz auf etwa die Hälfte. Bei zusätzlichen Stickstoffgaben verhalten sich die beiden verschiedenen Moste aber gerade gegensätzlich. Beim verdünnten, heiß eingelagerten Most nehmen sowohl die Brenztraubensäure- wie auch die Ketoglutarsäurekonzentrationen (C 2 a, 2 b) gegenüber der thiaminversetzten Probe (C 2) stark zu, beim frisch gepreßten Most nehmen sie aber deutlich ab, nur Ketoglutarat nimmt mit Aminosäuren leicht zu.

Die überschlägige Betrachtung der Pyruvatmengen der unterschiedlichen Mostproben läßt erkennen, daß die Bildung dieser 2-Ketosäure von Thiamin in jedem Falle stark gesenkt wird. Zusatz von hefeverwertbarem Stickstoff modifizert höchstens die Brenztraubensäurebildung: Bei den *Botrytis*-bewachsenen Mosten und bei den kationenarmen Mosten, bei denen durch den Kationenentzug der *Botrytis*-Bewuchs simuliert worden war, steigt die Pyruvatbildung. Sie steigt außerdem auch bei den zusätzlich thiaminangereicherten unbehandelten Mosten (A 2 a, b). Sie nimmt ab bei den unbehandelten stickstoffangereicherten Ausgangsmosten (A 1 a, b) und bei den *Botrytis*-bewachsenen thiaminangereicherten Proben (B 2 a, b). Nur

beim frisch gepreßten Most nimmt sie außerdem auch bei den kationenarmen zusätzlich thiaminversetzten Proben (C 2 a, b) ab.

Die Pyruvat-verringernde Rolle des Thiamins ist seit der Erkennung seiner Funktion als Co-Enzym der Brenztraubensäuredecarboxylase (Lohmann und Schuster 1937) bekannt. Vor einiger Zeit hatten wir (Dittrich 1969) die Bildung von Acetaldehyd und Brenztraubensäure in synthetischer Nährlösung und in Traubenmost mit und ohne Thiamin untersucht. Es war gezeigt worden, daß die Synthese des Co-Enzyms Thiamin-Pyrophosphat für die Synthese der Brenztraubensäuredecarboxylase geschwindigkeitsbestimmend ist. Das heißt: Liegt Thiamin in einem Gärsubstrat vor, kann es von der Hefe aufgenommen, phosphoryliert und in die Decarboxylase eingebaut werden. Der Umsatz von Pyruvat zu Acetaldehyd ist dann gewährleistet. Bei mangelndem Thiamingehalt oder beim Fehlen von Thiamin wird dagegen Pyruvat mehr und mehr aufgestaut werden, da das für die Thiaminsynthese erforderliche Enzym nicht in der erforderlichen Aktivität vorliegt. Auch Wucherpfennig und Semmler (1972) kommen zu dem Ergebnis, „daß Thiamin-Mangel zu einem erhöhten Pyruvatgehalt führt" und „daß Pantothenat- und in geringerem Maße Thiaminmangel zu einem erhöhten Acetaldehydgehalt führen". Schon vorher hatten sich Lafon-Lafourcade *et al.* (1967) mit dem Einfluß des Thiamins auf die Bildung von Acetaldehyd, Pyruvat und Ketoglutarat bei der Weinbereitung befaßt. Sie fanden nach Thiamin-Zusatz „fast immer die Pyruvat- und α-Ketoglutaratwerte im fertigen Wein vermindert". Sie fanden weiter, daß Thiamin „als Folge davon in einem von drei Fällen" bei gleichem SO_2-Zusatz die freie SO_2 erhöht. Das bedeutet, daß durch Thiamin-Zusätze zu Most beim Jungwein schweflige Säure eingespart werden könnte. Wir haben diese SO_2-Einsparung durch Thiamin sowohl im Labor-, wie im halbtechnischen Maßstab nachgeprüft. Eine SO_2-sparende Wirkung des Thiamins ging aus diesen Versuchen aber nicht sicher hervor (Dittrich *et al.* 1970).

Nach den zitierten französischen und unseren Ergebnissen reicht der Thiamingehalt eines normalen Mostes aus. Darüber hinausgehende Thiamingaben haben dann keine ins Gewicht fallende Wirkung mehr. Das zeigen selbst diese Laborversuche mit dem frisch gepreßten Most, dessen Kontrollproben leider nicht ganz durchgegoren sind (A 1). Anders stellen sich schon die Verhältnisse beim verdünnten, heiß eingelagerten Most dar. Hier ist der Thiamingehalt anscheinend stark verringert worden. In diesem Falle erniedrigt Thiamin die Bildung der SO_2-bindenden Hefemetaboliten dann stark.

Ganz anders als beim normalen Most aus gesundem Beerenmaterial liegen die Bedingungen für die Hefe in einem Most aus *Botrytis*-infizierten Beeren. Dittrich *et al.* (1974) fanden in edelfaulen Mosten eine 3,5fache Pyruvatbildung und eine mehr als doppelt so hohe Ketoglutaratbildung wie in Mosten aus gesunden Beeren. Wie die Pyruvat- und Ketoglutaratbildung der beiden Moste und ihrer Varianten beweist, liegt der Grund hierfür tatsächlich in der schon damals vermuteten Thiamin-Verarmung durch die *Botrytis*-Infektion.

Die schon mehrfach angesprochene Ketoglutaratbildung verhält sich ganz ähnlich wie die Brenztraubensäurebildung. Auch Ketoglutarat wird nämlich durch ein Thiamin-pyrophosphathaltiges Enzym decarboxyliert. Meist wird weniger gebildet und bei Thiaminzusatz auch weniger abgebaut als Pyruvat.

Gegenüber den drei exakt bestimmten SO_2-Bindungspartnern kann die SO_2-Bindung nur ein ungefähres Maß für die Gesamtheit dieser drei Hefemetaboliten sein. Es ist nämlich daran zu denken, daß darüber hinaus *Botrytis* noch andere SO_2-bindende Stoffe bilden kann und daß außerdem die großen Restzuckermengen der

Tabelle 2

Hefeanzahl, SO_2-bindende Substanzen und SO_2-Bindung von Weinen aus einem Huxel-Most 68 °Oe), der durch verschiedene Behandlungen und verschiedene Zusätze variiert wurde. Erläuterungen der Varianten s. Tabelle 1
Number of yeast cells, SO_2 binding substances and SO_2 binding in wines, made from a must of Huxel-grapes (68 °Oe), varied by different treatments and additives. Explanation of the variants see Tabelle 1

Versuchsvariante	Hefeanzahl 10^6/l	Acetaldehyd mg/l	Pyruvat mg/l	Ketoglutarat mg/l	SO_2-Bindung mg/l
A 0	—	2,6	12,1	6,1	141
A 1	47,5	18,3	64,5	12,2	200
A 1 a	60,0	10,9	55,7	35,1	260
A 1 b	72,5	10,9	53,9	39,6	250
A 2	60,0	10,8	33,5	39,6	180
A 2 a	65,0	11,5	42,4	36,6	185
A 2 b	57,5	15,0	41,5	36,6	190
B 0	—	2,2	5,2	21,4	148
B 1	34,1	17,6	200,1	70,4	240
B 1 a	41,2	24,6	306,2	90,2	250
B 1 b	41,0	25,1	260,4	70,5	255
B 2	38,3	17,2	96,2	52,0	180
B 2 a	51,4	22,0	30,4	24,3	205
B 2 b	47,4	26,0	26,2	27,1	200
C 0	—	2,4	9,9	7,9	141
C 1	18,0	16,1	301,4	114,3	220
C 1 a	68,0	22,8	381,0	147,8	245
C 1 b	49,0	42,1	360,2	144,4	260
C 2	22,0	10,1	178,6	80,8	175
C 2 a	72,5	14,2	71,6	97,5	200
C 2 b	60,0	40,3	60,3	54,9	190

Varianten der *Botrytis*-bewachsenen und der kationenfreien Moste diese Werte mit wechselnd großen Unsicherheitsfaktoren belasten. Doch selbst mit diesen Einschränkungen kommt diesen Werten einiger Aussagewert zu. Offensichtlich ist, daß die SO_2-Bindung jeder Mostgruppe durch Thiamin deutlich gesenkt wird, beim *Botrytis*-Most (Tabelle 2, B 1 — B 2) z. B. von 240 mg/l auf 180 mg/l.

Zur näheren Kennzeichnung der Stoffbildung des frisch gepreßten Mostes und seiner Varianten dienen anhangsweise die Werte der Tabelle 3. Wegen der Ähnlichkeit der Gärungsverhältnisse mit der Bildung der SO_2-bindenden Substanzen ist auf die Wiedergabe der entsprechenden Analysendaten des verdünnten, heiß eingelagerten Mostes und seiner Abkömmlinge verzichtet worden.

Den höchsten Restzuckergehalt hat verständlicherweise der kationenverarmte Most ohne Zusatz. Nicht einmal der Thiaminzusatz kann die Vergärung wesentlich steigern. Stickstoffzusätze sind dafür die wichtigere Voraussetzung. Bei den Varianten des *Botrytis*-bewachsenen Mostes ist der Restzuckergehalt durchwegs hoch. Er wird zwar durch Stickstoffzusätze und Thiamin gesenkt und Thiamin plus Stickstoff senkt ihn noch weiter. Es bleibt aber der Eindruck, daß dabei trotz dieser Optimierung (B 2 a, b) von *Botrytis* gebildete Hemmstoffe wirken (Flesch 1974).

Tabelle 3

Zucker-, Alkohol-, Glycerin-, Gesamtsäure- und Gesamt-SO_2-Gehalte sowie pH-Werte von Weinen aus einem Huxel- Most(68 °Oe), der durch verschiedene Behandlungen und verschiedene Zusätze variiert wurde. Erläuterung der Varianten s. Tabelle 1
Amount of sugar, alcohol, glycerol, total acid, and total SO_2, and pH of wines, made from a must of Huxel-grapes (68 °Oe), varied by different treatments and additives. Explanation of the variants see Tabelle 1

	Zucker g/l	Alkohol g/l	Glycerin g/l	Gesamtsäure g/l	Gesamt-SO_2 mg/l	pH-Wert
A 0	169	0	—	7,9	20	3,1
A 1	8,5	69,0	5,7	8,3	20	3,1
A 1 a	3,2	70,0	6,0	8,3	25	3,1
A 1 b	2,0	71,6	6,1	8,5	25	3,1
A 2	2,5	76,0	6,2	8,3	20	3,1
A 2 a	2,9	74,9	6,3	8,6	25	3,1
A 2 b	2,8	72,6	6,3	8,3	23	3,2
B 0	148	0	4,4	4,1	25	3,6
B 1	71,1	36,0	6,0	4,3	29	3,3
B 1 a	47,4	50,1	7,4	4,5	28	3,2
B 1 b	53,0	46,4	7,3	4,5	28	3,3
B 2	51,0	47,1	7,4	4,4	26	3,2
B 2 a	33, 4	57,5	8,0	4,4	27	3,3
B 2 b	36,5	56,9	8,0	4,4	29	3,3
C 0	162	0	—	10,0	21	2,3
C 1	114	19,2	3,0	10,5	21	3,1
C 1 a	25,2	60,8	5,6	10,8	24	3,1
C 1 b	25,5	60,9	5,6	10,6	25	3,1
C 2	107	20,8	3,2	9,9	20	3,1
C 2 a	1,4	74,0	6,6	10,5	25	3,2
C 2 b	12,5	68,0	6,5	10,4	22	3,2

Die Alkoholgehalte sind nur die Projektion der jeweiligen Restzuckerwerte. Eine nähere Besprechung erübrigt sich daher.

Wie die Alkoholmenge ist auch die Glycerinbildung mit dem Restzucker bzw. der Gärung korreliert. Die Moste der B-Gruppe weichen hiervon natürlich ab. Wie schon der unvergorene *Botrytis*-bewachsene Most (B0) zeigt, bildete der Pilz auf dem Most eine beträchtliche Menge Glycerin. Das erklärt, warum die Glycerinwerte dieser Moste am höchsten sind, obwohl ihr Endvergärungsgrad relativ gering war. — Es ist klar, daß die im Sinne der Fragestellung erfolgreiche Simulierungswirkung der Kationenaustauscherbehandlung hier den *Botrytis*- Einfluß nicht ersetzt.

Auch die Minderung der Gesamtsäure-Werte ist für den *Botrytis*-Einfluß (B1) typisch. Verständlich ist auch die Säureerhöhung durch den Kationenaustausch. Die Zunahme der Säure während der Gärung ist überall etwa gleich. Bei Thiaminzusätzen ist sie meist etwas geringer infolge der Pyruvat- und Ketoglutaratabnahmen. Die pH-Werte sind das Abbild dieser Säurerelationen.

Ungefähr gleich ist auch bei allen Gruppen die Zunahme der gesamten schwefligen Säure. Der *Botrytis*- bewachsene Most (B 0) deutet darauf hin, daß auch *Botrytis* eine geringe SO_2- Bildung verursachen kann.

Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen sollten die Frage klären, ob die hohe Pyruvat- und Ketoglutaratbildung bei der Vergärung edelfauler Moste und die u. a. von ihr ausgehende hohe SO_2-Bindung von Auslesen verursacht wird vom hohen Zuckergehalt, vom Aminosäure- bzw. Stickstoffmangel oder vom geringen Thiamin-Gehalt dieser Moste.

Hierzu wurde Most 1.) normal belassen, 2.) einem *Botrytis*-Bewuchs unterworfen, 3.) kationenarm gemacht, um die erwartete *Botrytis*-Wirkung zu simulieren, insbesondere einen Aminosäure- und Thiamin-Mangel zu erzeugen. Die so hergestellten Varianten wurden jeweils a) ohne Zusatz, b) nach Zusatz eines Aminosäurengemisches, c) nach Zusatz von Ammonium-Ionen vergoren. Alle diese Varianten wurden außerdem mit 0,5 mg Thiamin/l angereichert und danach vergoren.

Die Analyse der SO_2-bindenden Hefe-Stoffwechselprodukte ergab bei den *Botrytis*-bewachsenen und den kationenverarmten Proben eine sehr starke Pyruvat- und Ketoglutaratbildung, wie sie auch schon von uns bei der Vergärung edelfauler Moste beobachtet worden war. Der Anstau dieser Metaboliten wird vom Stickstoffgehalt nicht beeinflußt. Allein von Thiamin wird er in jedem Falle auf eine normale Konzentration verringert.

Dieses Ergebnis beweist, daß das hohe SO_2-Bedürfnis von Weinen aus *Botrytis*-infizierten Beeren zu einem wesentlichen Teil eine Folge des gestörten Stoffwechsels der Hefe bei der Vergärung dieser Moste ist. Ursache dieser Stoffwechselstörung ist die Thiamin-Verarmung des Beeren-Inhaltes durch *Botrytis*. Die Hefe in solchen Mosten kann infolge ihres Thiamin-Defizits die Thiamin-abhängige Decarboxylierung ihrer Metaboliten Pyruvat und Ketoglutarat nicht normal vollziehen. Beide SO_2-bindenden Hefestoffwechselprodukte stauen sich daher in hohen Konzentrationen an, die ein Mehrfaches dieser Werte bei normalen Jungweinen betragen können. 0,5 mg Thiamin/l normalisieren diese Stoffwechselstörung der Hefe und die von ihr ausgehende erhöhte SO_2-Bindung von Weinen aus edelfaulem Lesegut.

Literatur

1. Bergmeyer, U., 1970: Methoden der enzymatischen Analyse II, 2. Aufl., Weinheim.
2. Dittrich, H. H., 1969: Untersuchungen zur Synthese der Brenztraubensäuredecarboxylase (E.C.4.1.1.1) bei Hefen. Arch. Mikrobiol. (Berlin) **64**, 223—228.
3. — — und Gongsakdi, S., 1969: Umkehrung des Brenztraubensäure/Acetaldehyd-Verhältnisses bei der Vergärung von Traubenmost in Abhängigkeit von der Zuckerkonzentration. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. **139**, 345—348.
4. — — , Sponholz, W. R. und Kast, W., 1974: Vergleichende Untersuchungen von Mosten und Weinen aus gesunden und aus *Botrytis*-infizierten Traubenbeeren. I. Säurestoffwechsel, Zuckerstoffwechselprodukte, Leucoanthocyangehalte. Vitis **13**, 36—49.
5. — — und Staudenmayer, T., 1968: Acetaldehydbildung bei der Mostgärung und bei der Süßreservebereitung. Wein-Wiss. **23**, 1—7.
6. — — , — — und Sponholz, W. R., 1970: Jahresber. Inst. f. Mikrobiol. u. Biochem., Hess. FA. Geisenheim, 53—60.
7. Flesch, P., 1974: Über hefetoxische Stoffwechselprodukte bei *Botrytis cinerea*. Vortr. 14. Arbeitstagung d. Forschungsringes d. Dt. Weinbaues, Würzburg.
8. Lafon-Lafourcade, S., Blouin, J., Sudraud, R. et Peynaud, E., 1967: Essais d'utilisation de la thiamine au cours de vinification expérimentales en vins blancs liquoreux. C. R. Séance Acad. Agricult. France **53**, 1046—1051.
9. Lohmann, K. und Schuster, P., 1937: Untersuchungen über die Cocarboxylase. Biochem. Z. **294**, 188—214.
10. Müller-Thurgau, H., 1888: Die Edelfäule der Trauben. Landwirtsch. Jahrb. Schweiz (Bern) **17**, 83—160.
11. Rapp, A. und Reuther, K. H., 1971: Der Gehalt an freien Aminosäuren in Traubenmosten von gesunden und edelfaulen Beeren verschiedener Rebsorten. Vitis **10**, 51—58.

12. Rebelein, H., 1973: Schnellverfahren zur Bestimmung des Alkohol-, Zucker- und Gesamt-SO_2-Gehaltes in Wein und Fruchtsäften, sowie des Blutalkoholgehaltes. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. **2**, 112—121.
13. Sponholz, W. R. und Dittrich, H. H., 1974: Vergleichende Untersuchungen von Mosten und Weinen aus gesunden und *Botrytis*-infizierten Traubenbeeren. III. Aminosäuregehalte. Höhere Alkohole. In Vorbereitung.
14. Then, R. und Radler, F., 1968: Zur Bestimmung von Acetaldehyd. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. **138**, 163—169.
15. Wucherpfennig, K. und Semmler, G., 1972: Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit vom pH-Wert und von einzelnen Vitaminen. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. **148**, 137—145.

Eingegangen am 16. 4. 1974

Prof. Dr. H. H. Dittrich
Inst. f. Mikrobiol. u. Biochemie
Forschungsanst. f. Weinbau,
Gartenbau, Getränketechnol.
und Landespflege
6222 Geisenheim