

## Äpfelsäure-, Milchsäure- und Zitronensäuregehalte in Schweizer Weinen

von

K. MAYER und G. PAUSE

Die Säureverhältnisse in konsumfertigen Weinen werden im wesentlichen geprägt durch mehr oder weniger große Gehalte an Weinsäure, Milchsäure und Äpfelsäure. Hinzu kommen noch verschiedene weitere Verbindungen mit saurem Charakter, worunter vor allem die Essigsäure, Bernsteinsäure, Zitronensäure und einige Aminosäuren von organoleptischem und analytischem Interesse sind.

Mit der vorliegenden Arbeit wird eine größere Zahl Schweizer Weine auf ihre Gehalte an Äpfelsäure, Milchsäure und Zitronensäure hin untersucht. Die Analysen erstreckten sich auf rund 90 Getränke, vorwiegend Flaschenweine des Jahrgangs 1966; der Querschnitt bleibt somit von vornherein lückenhaft. Die nachfolgenden Angaben über Äpfelsäure- und Milchsäuregehalte kennzeichnen vor allem die Ausbau-Situation in zahlreichen Ost- und Westschweizer Weinen. Für das Vorkommen von Zitronensäure in Wein sind in der Literatur genaue Werte eher selten anzutreffen; die hier gefundenen Ergebnisse ergänzen und präzisieren die bisherigen Daten. Mit verschiedenen Gäransätzen wurde sodann versucht, einige im Verlauf der Alkoholgärung und des biologischen Säureabbaus auftretende Veränderungen von der mikrobiologischen Seite her zu beleuchten.

### Methodik

**Äpfelsäure:** Äpfelsäure liegt in Weinen ausschließlich in Form der L(-)-Äpfelsäure vor (19); deren Bestimmung erfolgte enzymatisch<sup>1)</sup> mit L-Malatdehydrogenase und NAD nach einer schon früher von uns beschriebenen Methode (12). Die Proben wurden 100- bis 250fach mit dest. H<sub>2</sub>O verdünnt, die Reaktionsgemische nach Enzym-Zugabe während 30 min bei 37° C gehalten und die Extinktion hierauf ein zweitesmal bei 340 nm bestimmt.

**Gesamte Milchsäure:** Durch Kombination der Verfahren nach DIMOTAKI-KOURAKOU (4, 5) und KOCH und BRETTAUER (8) ließen sich Störungen durch Butylenglykol und verschiedene Säuren vermeiden. In der Regel wurden 3ml-Proben Anionenaustauscher-behandelt und das auf pH 4,0 gestellte Eluat einer CuSO<sub>4</sub>/Ca(OH)<sub>2</sub>-Behandlung unterworfen. Die Bestimmung der Milchsäure erfolgte nach Permanganat-Oxydation im Lieb-Zacherl-Apparat als Acetaldehyd, welcher in Bisulfit aufgefangen und mit Jod titriert wurde. Für Einzelheiten verweisen wir auf eine kürzlich erschienene Arbeit (15).

**L(+)-Milchsäure:** Enzymatischer „Lactat-UV-Test“ mit L(+)-Lactatdehydrogenase und NAD (10). Die Eigenfarbe der 50- bis 100fach verdünnten Weinstuster machte eine Messung der Extinktion vor Enzymzugabe notwendig. Die Berechnung der L(+)-Lactatgehalte geschah über die Extinktionsdifferenz  $E_{60 \text{ min}} - E_{0 \text{ min}}$ .

<sup>1)</sup> Sämtliche bei den enzymatischen Analysen verwendeten Enzym- und Koenzympräparate waren Produkte der Firma C. F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim.

**Zitronensäure:** Enzymatische Bestimmung mit Citrat-Lyase, Malatdehydrogenase und NADH nach einem von GRUBER und MOELLERING (6, 16) entwickelten und von uns schon früher angewandten Verfahren (14). Mit Rotweinen ließ sich im Reaktionsgemisch gelegentlich eine Extinktionszunahme vor dem Enzymzusatz beobachten; das Ablesen der Anfangsextinktion geschah in solchen Fällen erst nach Erreichen eines konstanten Wertes, d. h. nach 2–3 min. Nach dem Einmischen der Enzyme benötigte die Reaktion 6–9 min. Abgelesen wurde nach Erreichen eines stabilen Endwerts, der, wenn einmal erreicht, über längere Zeit (mindestens 30 min) konstant blieb. Ein Lactatdehydrogenase-Zusatz erübrigte sich.

Zusammensetzung des Reaktionsgemischs: 2,84 ml 0,1 M Triäthanolamin-Puffer (pH 7,6), 0,03 ml 0,01 M NADH, 0,01 ml 0,03 M  $ZnCl_2$ , 0,10 ml Probe mit höchstens 0,5 g Citrat/l, 0,01 ml Malatdehydrogenase, 0,01 ml Citrat-Lyase. Citrat-Lyase: 5 mg Trockenpräparat + 0,2 ml eiskalte Pufferlösung [6 g  $(NH_4)_2SO_4$  + 4 mg  $ZnCl_2$  in 100 ml 0,01 M Triäthanolamin-Puffer, pH 7,6]. Ausreichend für ca. 20 Bestimmungen.

Bei insgesamt vier besonders gerbstoffreichen Rotweinen war eine Zitronensäure-Bestimmung ohne Vorbehandlung der Proben nicht möglich. Durch zweimalige Filtration der Weine durch eine „Polyclar“-Schicht (Polyvinylpyrrolidone, General Aniline & Film Corp., 20 g/l) ließ sich der Hemmeffekt beheben. Bei Weinen mit geringen Zitronensäuregehalten wurde dem Reaktionsgemisch nach Ablauf der üblichen Inkubationsfrist zur Kontrolle 1 Tropfen Zitronensäure (ca. 0,02 N) zugesetzt. Abgesehen von wenigen Ausnahmen (4 Rotweine) setzte daraufhin ein rascher Extinktionsabfall ein, was eine substratbedingte Hemmwirkung auszuschließen erlaubte.

Tabelle 1  
Zitronensäure-, Milchsäure- und Äpfelsäuregehalte in Ostschweizer Weinen

| Nr.                 | Bezeichnung                        | pH   | L(-)-Äpfelsäure<br>g/l | Zitronensäure<br>mg/l | Gesamte<br>Milchsäure<br>g/l | L(+)-<br>Milchsäure<br>g/l |
|---------------------|------------------------------------|------|------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------------------|
| <b>A. Rotweine</b>  |                                    |      |                        |                       |                              |                            |
| 1                   | Elfinger                           | 3,73 | 0,065                  | 87                    | 3,66                         | 3,19                       |
| 2                   | Trasadinger                        | 3,73 | 0,060                  | 10                    | 3,41                         | 2,87                       |
| 3                   | Fläscher                           | 3,82 | 0,070                  | 66                    | 4,15                         | 3,47                       |
| 4                   | Henggartner                        | 3,68 | 0,065                  | 29                    | 3,85                         | 3,50                       |
| 5                   | Rudolfinger                        | 3,72 | 0,030                  | 13                    | 3,97                         | 3,32                       |
| 6                   | Wiesendanger                       | 3,69 | 0,065                  | 158                   | 3,02                         | 2,97                       |
| 7                   | Teufener                           | 3,75 | 0,070                  | 7                     | 3,61                         | 3,24                       |
| 8                   | Neunforner                         | 3,60 | 0,050                  | 97                    | 4,10                         | 3,37                       |
| 9                   | Malanser                           | 3,84 | 0,050                  | 11                    | 3,76                         | 3,48                       |
| 10                  | Hallauer                           | 3,74 | 0,050                  | 108                   | 3,85                         | 3,25                       |
| 11                  | Clevner VAW*)                      | 3,80 | 0,085                  | 232                   | 4,82                         | 4,70                       |
| 12                  | Clevner Auslese VAW                | 3,92 | 0,070                  | 195                   | 3,45                         | 3,40                       |
| <b>B. Weißweine</b> |                                    |      |                        |                       |                              |                            |
| 13                  | Räuschling                         | 3,47 | 0,040                  | 140                   | 3,38                         | 2,50                       |
| 14                  | Riesling × Sylvaner                | 3,56 | 0,210                  | 123                   | 2,24                         | 1,93                       |
| 15                  | Riesling × Sylvaner VAW            | 3,63 | 0,020                  | 69                    | 4,31                         | 4,23                       |
| 16                  | Gewürztraminer VAW                 | 3,45 | 4,20                   | 290                   | 1,10                         | 0,30                       |
| 17                  | Freiburg VAW                       | 3,62 | 6,15                   | 470                   | 1,33                         | 0,43                       |
| 18                  | Riesling × Sylvaner<br>Auslese VAW | 3,60 | 0,160                  | 184                   | 3,01                         | 2,38                       |
| 19                  | Räuschling VAW                     | 3,63 | 0,060                  | 196                   | 3,91                         | 3,63                       |
| 20                  | Tokayer Spätlese VAW               | 3,91 | 0,110                  | 386                   | 4,07                         | 3,41                       |
| 21                  | Auxerrois VAW                      | 3,58 | 0,100                  | 192                   | 2,33                         | 2,10                       |

\*) VAW: Weine der Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil.

te. Für weitere methodische Details sei im übrigen auf zwei frühere diesbezügliche Arbeiten (14, 15) verwiesen.

### Ergebnisse

#### A. Untersuchungen an Weinen

Insgesamt 88 Weine wurden untersucht auf die Gehalte an L(-)-Äpfelsäure, Zitronensäure, gesamter Milchsäure und L(+)-Milchsäure. Die Ergebnisse sind zusammengefaßt in den Tabellen 1 und 2. Im weiteren wurden in einigen Fällen die durch den biologischen Säureabbau bewirkten Veränderungen hinsichtlich dieser Säuren untersucht; Tabelle 3 enthält die betreffenden Daten für sieben Weine je vor und nach dem Säureabbau.

#### Äpfelsäure und pH

Von insgesamt 88 Weinen enthielten 11 Weißweine und 4 Rotweine noch Äpfelsäure in Mengen von über 0,5 g/l; der größte Teil der Getränke hatte somit den biologischen Säureabbau mehr oder weniger vollständig beendet. Hinsichtlich des Abbaugrades und der durchschnittlichen pH-Werte ergibt sich folgendes Bild:

| L(-)-Äpfelsäure | Rotweine |        | Weißweine          |        |
|-----------------|----------|--------|--------------------|--------|
|                 | pH       | Anzahl | pH                 | Anzahl |
| < 0,5 g/l       | 3,70     | 36     | 3,62               | 37     |
| > 0,5 g/l       | 3,41     | 4      | 3,47 <sup>2)</sup> | 11     |

Tabelle 2

Zitronensäure-, Milchsäure- und Äpfelsäuregehalte in Westschweizer und Tessiner Weinen

| Nr.                | Bezeichnung            | pH   | L(-)-Äpfelsäure<br>g/l | Zitronensäure<br>mg/l | Gesamte<br>Milchsäure<br>g/l | L(+)-<br>Milchsäure<br>g/l |
|--------------------|------------------------|------|------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------------------|
| <b>A. Rotweine</b> |                        |      |                        |                       |                              |                            |
| 22                 | Gamay                  | 3,54 | 0,045                  | 42                    | 2,40                         | 2,05                       |
| 23                 | Salvagnin              | 3,67 | 0,060                  | 23                    | 2,47                         | 2,18                       |
| 24                 | Rouge de Diolly VAL*)  | 3,67 | 0,100                  | 158                   | 2,67                         | 2,33                       |
| 25                 | Gamay d'Arcenant VAL   | 3,60 | 0,145                  | 209                   | 3,47                         | 3,03                       |
| 26                 | Merlot Pully VAL       | 3,68 | 0,105                  | 17                    | 3,05                         | 2,67                       |
| 27                 | Pinot noir Pully VAL   | 3,64 | 0,180                  | 337                   | 3,45                         | 3,01                       |
| 28                 | Gamay Changins VAL     | 3,67 | 0,050                  | 132                   | 2,48                         | 2,13                       |
| 29                 | Cabernet Sauvignon VAL | 3,74 | 0,020                  | 247                   | 3,36                         | 3,18                       |
| 30                 | Pinot noir Pully VAL   | 3,62 | 0,130                  | 333                   | 4,10                         | 3,68                       |
| 31                 | Rosé du Valais         | 3,61 | 0,305                  | 246                   | 1,97                         | 1,83                       |
| 32                 | Goron                  | 3,70 | 0,105                  | 109                   | 3,27                         | 3,06                       |
| 33                 | Pinot noir             | 3,87 | 0,140                  | 66                    | 3,35                         | 3,34                       |
| 34                 | Dôle, Gloire du Rhône  | 3,82 | 0,105                  | 192                   | 3,19                         | 3,11                       |
| 35                 | Dôle, Chanteauvieux    | 3,78 | 0,110                  | 224                   | 2,77                         | 2,37                       |
| 36                 | Dôle                   | 3,62 | 0,125                  | 184                   | 2,77                         | 2,54                       |
| 37                 | Merlot 1               | 3,30 | 4,170                  | 220                   | 1,16                         | 0,27                       |
| 38                 | Merlot 2               | 3,59 | 0,480                  | 28                    | 2,04                         | 1,72                       |
| 39                 | Merlot 3               | 3,53 | 0,350                  | 46                    | 2,25                         | 1,72                       |
| 40                 | Nostrano 1             | 3,55 | 0,900                  | 52                    | 2,77                         | 2,50                       |
| 41                 | Merlot 4               | 3,45 | 0,520                  | 163                   | 1,95                         | 1,88                       |
| 42                 | Nostrano 2             | 3,35 | 0,235                  | 7                     | 2,76                         | 2,52                       |
| 43                 | Merlot 5               | 3,35 | 4,790                  | 177                   | 0,75                         | 0,47                       |
| 44                 | Bondola                | 3,47 | 0,470                  | 41                    | 3,47                         | 3,35                       |
| 45                 | Twanner Kapfgut        | 3,88 | 0,000                  | 16                    | 4,37                         | 4,20                       |

\*) VAW: Weine der Eidg. Forschungsanstalt Lausanne.

2) Streuung der pH-Werte von 3,19—3,80.

(Fortsetzung Tabelle 2)

| Nr.          | Bezeichnung                           | pH   | L(-)-Äp-<br>felsäure<br>g/l | Zitronen-<br>säure<br>mg/l | Gesamte<br>Milchsäure<br>g/l | L(+)-<br>Milchsäure<br>g/l |
|--------------|---------------------------------------|------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| B. Weißweine |                                       |      |                             |                            |                              |                            |
| 46           | Lutry                                 | 3,50 | 0,065                       | 138                        | 2,48                         | 2,30                       |
| 47           | Johannisberg                          | 3,61 | 0,100                       | 156                        | 2,87                         | 2,31                       |
| 48           | Villette les Raviolles                | 3,59 | 0,045                       | 170                        | 3,10                         | 2,64                       |
| 49           | Château la Bâtie                      | 3,50 | 0,035                       | 185                        | 2,86                         | 2,33                       |
| 50           | Château de Malessert                  | 3,58 | 0,000                       | 157                        | 3,46                         | 2,49                       |
| 51           | Château de Luins                      | 3,43 | 0,040                       | 88                         | 2,30                         | 2,03                       |
| 52           | St. Eloi                              | 3,56 | 0,030                       | 183                        | 2,31                         | 2,07                       |
| 53           | Fendant de Sion                       | 3,64 | 0,620                       | 185                        | 2,61                         | 1,96                       |
| 54           | Epresses                              | 3,64 | 0,050                       | 183                        | 3,81                         | 3,14                       |
| 55           | Pinot gris VAL                        | 3,60 | 0,090                       | 228                        | 3,40                         | 3,21                       |
| 56           | Riesling Heffenheim VAL               | 3,19 | 2,780                       | 170                        | 1,33                         | 0,68                       |
| 57           | Freiburg Pully VAL                    | 3,56 | 0,145                       | 255                        | 2,77                         | 2,42                       |
| 58           | Traminer VAL                          | 3,57 | 0,150                       | 222                        | 2,65                         | 2,33                       |
| 59           | Sauvignon blanc VAL                   | 3,38 | 2,860                       | 273                        | 1,28                         | 0,69                       |
| 60           | Perle d'Alzey VAL                     | 3,87 | 0,070                       | 181                        | 2,47                         | 2,25                       |
| 61           | Chardonnay VAL                        | 3,67 | 0,100                       | 273                        | 3,36                         | 3,04                       |
| 62           | Main-Riesling VAL                     | 3,32 | 2,905                       | 304                        | 1,27                         | 0,61                       |
| 63           | Pully Aligoté VAL                     | 3,18 | 3,180                       | 228                        | 1,47                         | 1,07                       |
| 64           | Chasselas Changins VAL                | 3,41 | 0,045                       | 151                        | 2,01                         | 1,66                       |
| 65           | Auxerrois VAL                         | 3,22 | 1,815                       | 147                        | 1,00                         | 0,72                       |
| 66           | Sylvaner Pully VAL                    | 3,55 | 0,150                       | 238                        | 2,71                         | 2,54                       |
| 67           | Riesling X Sylvaner VAL               | 3,41 | 0,280                       | 238                        | 3,48                         | 3,30                       |
| 68           | Vin blanc du Valais<br>„Trois Plants“ | 3,70 | 0,130                       | 175                        | 3,34                         | 2,79                       |
| 69           | Johannisberg Spätlese                 | 3,93 | 0,085                       | 335                        | 3,05                         | 2,77                       |
| 70           | Fendant Auslese                       | 3,62 | 0,330                       | 188                        | 1,94                         | 1,67                       |
| 71           | Johannisberg                          | 3,79 | 0,215                       | 213                        | 3,01                         | 2,64                       |
| 72           | Ermitage Spätlese                     | 3,81 | 0,070                       | 136                        | 2,55                         | 2,27                       |
| 73           | Malvoisie Spätlese                    | 3,80 | 1,040                       | 362                        | 2,06                         | 1,57                       |
| 74           | Amigne                                | 3,54 | 1,660                       | 201                        | 1,52                         | 0,90                       |
| 75           | Malvoisie Selection                   | 3,80 | 1,875                       | 347                        | 1,91                         | 1,17                       |
| 76           | Fendant Rapilles                      | 3,62 | 0,385                       | 213                        | 2,11                         | 1,64                       |
| 77           | Ermitage                              | 3,70 | 0,110                       | 151                        | 2,57                         | 2,30                       |
| 78           | Arvine                                | 3,50 | 0,140                       | 229                        | 2,86                         | 2,64                       |
| 79           | Twanner Kapfgut                       | 3,50 | 0,000                       | 9                          | 4,32                         | 4,11                       |
| 80           | Château d'Auvernier                   | 3,62 | 0,000                       | 73                         | 4,56                         | 3,62                       |
| 81           | Neuchâtel                             | 3,62 | 0,000                       | 198                        | 3,25                         | 2,74                       |

Ungeachtet der durchgeführten Entsäuerungsmaßnahmen chemischer Natur – in Frage kommt in der Schweiz, wo die Münz'sche Doppelsalzausfällung nicht gestattet ist, nur eine Calciumtartratausfällung mit  $\text{CaCO}_3$  – zeigt sich für die meisten dieser Weine die bekannte Abhängigkeit zwischen Äpfelsäuregehalt und pH-Wert. Ausnahmen von dieser Regel finden sich bei einigen Westschweizer Weinen, wo entweder deutliche Äpfelsäuregehalte und hohe pH-Werte (Weine Nr. 73 und 75) oder tiefe pH-Werte und das Fehlen von Äpfelsäure (Nr. 64, 67, 46, 49, 51) sich durchaus miteinander vereinbaren lassen. Derartige Erscheinungen sind verhältnismäßig häufig; neben unterschiedlichen Gehalten an weiteren Säuren (z. B. Weinsäure) spielen gelegentlich besondere Jahrgangs- und Sorteneigenschaften eine Rolle.

#### Zitronensäure

Das natürliche Vorkommen von Zitronensäure in Wein wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Da gewisse Schimmelpilze, z. B. *Botrytis cinerea*, zur Zi-

tronensäurebildung auf Traubenmost befähigt sind (23), kann bei starkem Fäulnisbefall der Zitronensäuregehalt erhöht sein. So fanden wir bei Säften von frisch gelesenen Riesling  $\times$  Sylvaner-Trauben, aufgeteilt in gesundes und faules Material, Zitronensäuremengen von 19 resp. 154 mg/l. Neben der Preßmethode (2) ist sodann der Verlauf des biologischen Säureabbaus von großem Einfluß (3, 24). Findet ein Säureabbau statt, so wird der schließliche Zitronensäuregehalt bestimmt durch das unterschiedliche Vermögen der beteiligten Bakterien, diese Verbindung anzugreifen. Die Zitronensäure ihrerseits vermag den Säureabbau u. U. ebenfalls zu beeinflussen; es scheint, daß sie in gewissen Fällen die Entwicklung der Bakterien fördert (11).

Die hier gefundenen Zitronensäuregehalte lagen zwischen 0 und 470 mg/l. Weine mit weniger als 100 mg/l fanden sich verhältnismäßig häufig bei den Ostschweizer Rotweinen. Rund ein Drittel aller Weine enthielten andererseits über 200 mg/l, vermutlich weniger infolge von Zitronensäurezusätzen als wegen entsprechender Bakterieneigenschaften.

#### Gesamte Milchsäure und L(+)-Milchsäure

Die im Wein vorkommende Milchsäure ist zum größten Teil ein Produkt mikrobieller Stoffwechselprozesse. Bereits während der Alkoholgärung entsteht etwas Milchsäure; gemäß neueren Untersuchungen bildet die Hefe unter anaeroben Bedingungen vorwiegend das D(-)-Isomer (9, 17, 20). Der Großteil der Milchsäure entsteht jedoch während des biologischen Säureabbaus, wobei die Anteile an L- und D-Milchsäure je nach Bakterienart etwas verschieden sein können. Die in den Tabellen 1 und 2 aufgeführten Zahlen ergeben überall ein starkes Überwiegen des L-Isomers mit zumeist über 80% L-Anteil, bezogen auf die gesamte Milchsäure. Bezeichnenderweise stellen die wenigen Ausnahmen hiervon durchwegs Weine mit nicht oder nur unvollständig vollzogenem Säureabbau dar (Weine Nr. 43, 56, 59, 62, 63, 74, 75); der Anteil an D-Milchsäure erreichte in derartigen Fällen bis über 50%.

PEYNAUD *et al.* fanden in französischen Weinen ebenfalls ein starkes Überwiegen der L(+)-Milchsäure; die erwähnten Autoren erblicken darin eine Möglichkeit zum Nachweis verbotener DL-Milchsäure-Zusätze, da in solchen Fällen ein hoher Anteil an D-Milchsäure vorliegen muß (21).

Die ausgebauten Weine wiesen im Gehalt an gesamter Milchsäure sehr große Unterschiede auf, dies zweifelsohne aufgrund stark differierender ursprünglicher Äpfelsäuregehalte. Die Zahlen variieren von rund 2 g/l bis 4 g/l; in Einzelfällen traten bei einigen Rotweinen (vgl. Tabelle 3) Gehalte von über 5 g/l auf.

Die Zahlen in Tabelle 3 illustrieren die durch den biologischen Säureabbau bewirkten Veränderungen der Säureverhältnisse bei sieben Weinen. In mancher Hinsicht ergibt sich ein sehr unterschiedliches Bild. So ist das überall nahezu vollständige Verschwinden der Äpfelsäure begleitet von pH-Anstiegen, welche bei einem Vergleich untereinander den abgebauten Äpfelsäuremengen nur schlecht entsprechen. Beispielsweise bewirkt bei derselben Traubensorte ein Absinken des Äpfelsäuregehaltes um ca. 9 g/l im einen Fall einen pH-Anstieg von 0,35 Einheiten (Nr. 85), in einem nächsten Fall (Nr. 86) von nur 0,17 Einheiten.

Die Zitronensäure wurde mit einer Ausnahme (Nr. 85) nirgends vollständig abgebaut. Dieses Ergebnis überraschte insofern, als in sämtlichen Fällen Bakterien des sog. „*gracile*“-Typs vorherrschten, welche normalerweise die Zitronensäure rasch, vielfach noch vor der Äpfelsäure, angreifen.

Ein Vergleich der Milchsäuregehalte vor und nach dem biologischen Säureabbau zeigt folgendes: Unmittelbar nach der Alkoholgärung enthielten die Jungweine recht unterschiedliche Milchsäuremengen (1,49 bis 2,85 g/l); der Anteil an L(+)-Milchsäure

Tabelle 3  
Zitronensäure-, Milchsäure- und L(-)-Äpfelsäuregehalte einiger Weine vor und nach dem biologischen Säureabbau (BSA)

| Nr. | Wein                       | BSA  | pH   | Äpfelsäure |                     | Zitronensäure<br>mg/l | Gesamte Milchsäure |                     | L(+)-Milchsäure |       |
|-----|----------------------------|------|------|------------|---------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-----------------|-------|
|     |                            |      |      | g/l        | Abnahme während BSA |                       | g/l                | Zunahme während BSA | g/l             | %*    |
| 82  | Riesling X                 | vor  | 3,47 | 4,77       |                     | 160                   | 1,49               | 0,32                | 21,5            |       |
|     | Sylvaner                   | nach | 3,67 | 0,42       | 4,35                | 89                    | 3,26               | 1,77                | 3,08            | 94,5  |
| 83  | Räuschling                 | vor  | 3,40 | 7,60       |                     | 239                   | 1,93               | 0,40                | 20,7            |       |
|     |                            | nach | 3,60 | 0,38       | 7,22                | 152                   | 3,41               | 1,48                | 3,21            | 94,1  |
| 84  | Auxerrois                  | vor  | 3,61 | 6,98       |                     | 222                   | 1,66               | 0,09                | 5,4             |       |
|     |                            | nach | 3,78 | 0,02       | 6,96                | 221                   | 3,30               | 1,64                | 3,30            | 100,0 |
| 85  | Clevner 1                  | vor  | 3,48 | 8,98       |                     | 234                   | 1,56               | 0,29                | 18,6            |       |
|     |                            | nach | 3,83 | 0,07       | 8,91                | 14                    | 5,10               | 5,02                | 98,4            | 4,73  |
| 86  | Clevner 2                  | vor  | 3,63 | 9,19       |                     | 324                   | 2,20               | 1,42                | 64,5            |       |
|     |                            | nach | 3,80 | 0,06       | 9,13                | 238                   | 5,43               | 3,23                | 5,12            | 94,3  |
| 87  | Clevner 3<br>(Warmmaische) | vor  | 3,50 | 10,60      |                     | 454                   | 2,15               | 0,44                | 20,5            |       |
|     |                            | nach | 3,77 | 0,09       | 10,51               | 241                   | 6,20               | 4,05                | 5,49            | 88,5  |
| 88  | Clevner 4                  | vor  | 3,68 | 7,62       |                     | 286                   | 2,85               | 1,61                | 56,5            |       |
|     |                            | nach | 3,80 | 0,10       | 7,52                | 257                   | 5,62               | 2,77                | 5,27            | 93,8  |

\*) L(+)-Milchsäure in % der gesamten Milchsäure.

lag in fünf Fällen bei etwa 20% oder weniger. Der in zwei Jungweinen schon als Anfangswert erhaltene hohe L(+)-Milchsäureanteil ist vermutlich auf den zu jenem Zeitpunkt bereits einsetzenden biologischen Säureabbau zurückzuführen. Nach beendetem Ausbau lagen die Gehalte an gesamter Milchsäure zwischen rund 3 und 6 g/l mit L(+)-Milchsäureanteilen von 88–100%. Vergleicht man die Zunahmen an gesamter und L(+)-Milchsäure während des Abbaus, so mögen die in jedem Fall stärker angestiegenen L(+)-Milchsäuregehalte vorerst erstaunen. Als Ursache hierfür kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht, vor allem die Eigenschaft gewisser Milchsäurebakterien, mit Hilfe entsprechender Lactatrazemasen vorhandene D(-)-Milchsäure in L(+)-Milchsäure umzuformen (21). Mehrere derartige Fälle sind für Milchsäurebakterien bereits beschrieben worden (7).

Gemäß der Reaktionsgleichung



wäre je Gramm verschwundene Äpfelsäure theoretisch ein Milchsäureanstieg von 0,67 g zu erwarten. Daß eine stöchiometriegetreue Milchsäureausbeute unter normalen Kellerbedingungen nicht erreicht wird, bestätigt sich hier erneut: die Quotienten gebildete Gesamtmilchsäure/verschwundene Äpfelsäure liegen zwischen 0,20 und 0,41. In diesem Zusammenhang sei auf die Eigenschaft vieler Weinhefen, den Äpfelsäuregehalt während der Weingärung stark zu senken, hingewiesen (18, 13). Ein Abbau bzw. Einbau dieser Säure durch die Hefe dauert möglicherweise auch während des bakteriellen Abbaus noch an.

## B. Untersuchungen an Gärsubstraten

### 1. Milchsäurebildung durch Weinhefen

Ein mit verschiedenen Weinheferassen auf Traubensaft angesetzter Gärversuch hatte zum Ziel, einige Anhaltspunkte über die Milchsäurebildung bei der Hefe-Ver-gärung von natürlichen Substraten zu gewinnen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 festgehalten.

Es ergibt sich für den vorliegenden Versuch, daß während der Traubensaft-Ver-gärung in allen Varianten nur geringe Milchsäuremengen – meist weniger als 200 mg gesamte Milchsäure/l – gebildet wurden, wobei die L(+)-Milchsäure anteilmäßig zwischen 6 und 35% ausmachte. Dieses Ergebnis deckt sich gut mit entsprechenden

Tabelle 4  
Milchsäurebildung auf Traubensaft während der Alkoholgärung

| Hefen<br>Nr. | Produzierte gesamte<br>Milchsäure mg/l | Produzierte L(+)-<br>Milchsäure (mg/l) |
|--------------|--|--|
| 5            | 180                                    | 18                                     |
| 18           | 70                                     | 18                                     |
| 31           | 210                                    | 13                                     |
| 5 + 18       | 40                                     | 14                                     |
| 5 + 31       | 100                                    | 13                                     |
| 18 + 31      | 150                                    | 19                                     |
| 5 + 18 + 31  | 60                                     | 21                                     |

Vorgelegt wurden 70 ml pasteurisierter weißer Traubensaft (67° Oe, pH 3,3) in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Gäraufsätzen. 2 Parallelen. Drei Weinhefen (Nr. 5, 18 und 31 unserer Sammlung) wurden einzeln und in Kombinationen in Form von 0,2 ml wasserigen Suspensionen eingeimpft. Gärdauer: 7–8 Tage.

Befunden von PEYNAUD *et al.* (20), welche bei der anaeroben Vergärung von Traubensaft mit verschiedenen Hefen 8–26 mg L(+)- und 101–269 mg totale Milchsäure/l feststellten. Als Durchschnittsgehalte von 10 Weinen, die den biologischen Säureabbau nicht durchlaufen hatten, fanden die gleichen Autoren 4,65 mval (= 419 mg/l) totale und 1,28 mval (= 115 mg/l) L(+)-Milchsäure.

## 2. Bakterielle Milchsäurebildung aus L(–)-Äpfelsäure

Während bei der Vergärung von Hexosen durch die Milchsäurebakterien je nach Organismenart unterschiedliche L(+)- und D(–)-Milchsäureanteile anfallen können, besteht die aus L(–)-Äpfelsäure gebildete Milchsäure wahrscheinlich ausschließlich aus dem L(+)-Isomer (1, 21, 22). PEYNAUD *et al.* sind der Ansicht, daß deshalb der bisher angenommene Mechanismus für die Milchsäurebildung aus Äpfelsäure (über Pyruvat) in Frage gestellt ist; insbesondere wird die Rolle der Brenztraubensäure als Intermediärprodukt sowie das Vorliegen einer spezifischen Lactatdehydrogenase bezweifelt. Unserer Ansicht nach müssen hier – unter Berücksichtigung neuerer Erkenntnisse über feedback-Effekte bei enzymatischen Reaktionen – noch weitere Deutungsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden. Beispielsweise ist denkbar, daß Malat als Substrat entweder eine starke Repression oder D(–)-Lactatdehydrogenase oder eine Induktion bzw. Stimulation der L(+)-Lactatdehydrogenase oder beides bewirkt. Bevor sich die Brenztraubensäure als Intermediärprodukt ausschließen läßt, sollten jedenfalls noch zusätzliche Anhaltspunkte gewonnen werden. Wir beabsichtigen, hierüber in nächster Zeit Untersuchungen anzustellen.

Eine Untersuchung der Drehrichtung der aus L(–)-Äpfelsäure gebildeten Milchsäure erfordert die möglichst vollständige Abwesenheit von Kohlenhydrat im Substrat. Für einen raschen Gär-Ablauf unter optimalen Bedingungen erwies sich die Anwendung der Warburg-Methode als vorteilhaft. Die Reaktionszeit läßt sich durch laufende Kontrolle der CO<sub>2</sub>-Bildung auf ein Minimum beschränken, was die Verwendung von Reservestoff-verarmtem Bakterienmaterial unter Ausschluß von Zellwachstum und -Vermehrung erlaubt.

In Tabelle 5 ist das Ergebnis eines mit sechs aus Weinen isolierten Milchsäurebakterien durchgeführten Versuchs (konventionelle Warburg-Technik) wiedergegeben.

Tabelle 5

CO<sub>2</sub>- und Milchsäurebildung einiger Milchsäurebakterien auf L(–)-Äpfelsäure

| Bakterienstamm | gebildete CO <sub>2</sub> |      | gesamte Milchsäure |       | L(+)-Milchsäure |      |
|----------------|---------------------------|------|--------------------|-------|-----------------|------|
|                | μl                        | μmol | μg                 | μmol  | μg              | μmol |
| B 2            | 207                       | 9,3  |                    |       | 904             | 10,0 |
| B 10           | 211                       | 9,4  | 883*)              | 9,8*) | 875             | 9,7  |
| B 64           | 212                       | 9,5  |                    |       | 892             | 9,9  |
| B 67           | 213                       | 9,5  |                    |       | 881             | 9,8  |
| B 87           | 205                       | 9,1  |                    |       | 845             | 9,4  |
| B 89           | 209                       | 9,4  |                    |       | 905             | 10,0 |

\*) Durchschnittswerte der zusammengegebenen Substrate.

Ansatz/Gefäß: Hauptraum: 2,8 ml Bakteriensuspension in 5,71‰ (w/v) Weinsäure, pH 3,8. 0,1 ml MnCl<sub>2</sub> mit 0,32 mg/ml. Seitenansatz: 0,3 ml mit 10 μm L(–)-Äpfelsäure (Nutritional Biochemicals Corporation, Aktivkohle-gereinigt). Bakterien dreimal in Ringer-Lösung, einmal in dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. 5–23 mg Zell-Trockensubstanz/Gefäß. Gasphase: Luft, Temperatur: 25° C. 2 Gefäße/Variante. Versuchsdauer 60 min. Äpfelsäure bei Versuchsbeginn eingekippt. Nach Versuchsende Zentrifugation der Gärsubstrate und Aufbewahrung bei 2° C bis zur Aufarbeitung.

Das Ergebnis widerspiegelt eine bemerkenswerte stöchiometrische Übereinstimmung zwischen vorgelegter Äpfelsäure und anfallenden Endprodukten: 10  $\mu\text{mol}$  L(-)-Äpfelsäure stehen im Durchschnitt 9,4  $\mu\text{mol}$   $\text{CO}_2$ , 9,8  $\mu\text{mol}$  totale Milchsäure und 9,8  $\mu\text{mol}$  L(+)-Milchsäure gegenüber. Es ergibt sich hieraus, daß die in diesem Experiment eingesetzten Bakterienstämme aus L(-)-Äpfelsäure ausschließlich L(+)-Milchsäure bildeten, ein Befund, der sich mit den von BRÉCHOT *et al.* (1) und PEYNAUD *et al.* (21, 22) gemachten Beobachtungen deckt.

### 3. Bakterielle Milchsäurebildung auf einem halbsynthetischen Substrat

Gegenstand eines weiteren Versuchs war die Milchsäurebildung einiger schon früher aus Wein isolierter Milchsäurebakterien auf einem halbsynthetischen Substrat folgender Zusammensetzung (Mengen/l): 20 g Difco B 320 („Micro Inoculum Broth“), 20 g Difco B 318 („Folic acid assay medium“). Die Hefeextrakt-, Caseinhydrolysat- und Glucose-haltige Nährlösung mit einem ursprünglichen pH von 6,7 wurde mit HCl auf pH 4,5 gestellt. Gemäß unserer Erfahrung besitzt diese Nährlösung den Vorzug, den verschiedensten aus Wein isolierten Milchsäurebakterien, gleichgültig, ob von Langstäbchen-, Kokken- oder *B. gracile*-Typ, eine verhältnismäßig rasche Vermehrung zu erlauben. Das Ergebnis des Versuchs ist in Tabelle 6 festgehalten.

Es fällt auf die sehr unterschiedliche, von etwa 2 g bis über 7 g/l reichende Milchsäurebildung durch die einzelnen Bakterien. Der Anteil an L(+)-Milchsäure blieb verhältnismäßig konstant; mit Ausnahme eines Falles (B 10) betrug er überall rund zwei Drittel.

### 4. Zitronensäureabbau durch Milchsäurebakterien

Ein mit fünf Weinhefen durchgeführter Versuch ergab, daß während der Vergärung eines Traubensaftes mit 270 mg Zitronensäure/l letztere nur geringfügig abnahm; es verschwanden bis höchstens 30 mg/l. Anders verhält es sich mit den Bakterien des biologischen Säureabbaus, von welchen bekannt ist, daß sie die Zitronensäure gelegentlich unter Bildung von Milchsäure, Essigsäure und weiteren Nebenprodukten rasch und vollständig abzubauen vermögen.

Ein entsprechender Versuch mit einigen Milchsäurebakterien ergab auf einer halbsynthetischen Nährlösung das in Tabelle 7 dargestellte Ergebnis.

Tabelle 6  
Milchsäurebildung einiger Wein-Milchsäurebakterien auf einem halbsynthetischen Substrat

| Bakterienstamm                | Gesamte Milchsäure<br>g/l | L(+)-Milchsäure |      |
|-------------------------------|---------------------------|-----------------|------|
|                               |                           | g/l             | %    |
| B 89 Kokken                   | 6,07                      | 4,14            | 68,2 |
| B 64 Kurzstäbchen             | 3,85                      | 2,34            | 60,8 |
| B 67 Kokken                   | 5,75                      | 3,93            | 68,3 |
| B 10 <i>Bacterium gracile</i> | 7,30                      | 3,84            | 52,6 |
| B 91 Kokken                   | 3,52                      | 2,24            | 63,6 |
| B 61 Kurzstäbchen             | 6,32                      | 4,29            | 67,9 |
| B 83 <i>Bacterium gracile</i> | 6,26                      | 4,01            | 64,1 |
| B 6 <i>Bacterium gracile</i>  | 2,14                      | 1,53            | 71,5 |
| B 65 <i>Bacterium gracile</i> | 5,11                      | 3,43            | 67,1 |

Aerobe Kulturen in 30-ml-Kölbchen. Inkubation bei 25° C während 14 Tagen.

Tabelle 7

## Bakterieller Zitronensäureabbau in einer Nährlösung

Zusammensetzung des Substrats wie vorher, mit zusätzlichen 310 mg Zitronensäure und 3 g L(-)-Äpfelsäure/l. Der Zitronensäuregehalt wurde nach 14tägiger Bebrütung bei 25° C bestimmt.

| Bakterienstamm | Zitronensäure |             |
|----------------|---------------|-------------|
|                | mg/l          | Abnahme (%) |
| B 89           | 308           | —           |
| B 64           | 15            | 95,2        |
| B 67           | 309           | —           |
| B 10           | 291           | 6,1         |
| B 83           | 310           | —           |
| B 91           | 159           | 48,7        |
| B 6            | 10            | 96,8        |
| B 61           | 310           | —           |
| B 65           | 308           | —           |

Während nach zweiwöchiger Inkubationsdauer die Äpfelsäuregehalte in allen Substraten unter 100 mg/l abgesunken waren, ergab sich für die Zitronensäure ein wesentlich anderes Bild. In nur zwei Fällen war sie nahezu vollständig und in einem Fall etwa zur Hälfte verschwunden; fünf weitere Bakterienstämme ließen sie unverändert zurück. Somit sind auch unter optimalen Substratverhältnissen manche Säureabbau-Organismen nicht imstande, die Zitronensäure anzugreifen. Die zahlreichen in den Tabellen 1, 2 und 3 aufgeführten Beispiele von Weinen mit abgebauter Äpfelsäure und noch deutlichen Zitronensäuregehalten lassen sich vermutlich, mindestens zum Teil, durch derartige unterschiedliche Bakterieneigenschaften erklären.

## Diskussion

Für schweizerische Qualitätsweine werden im allgemeinen Gesamtsäuregehalte (titrierbare Säure, berechnet als Weinsäure) von 4,0–5,0 g/l bei den Rotweinen und 4,5–5,5 g/l bei den Weißweinen empfohlen. Die an unserem Untersuchungsmaterial gefundenen Zahlen — hier im einzelnen nicht wiedergegeben — streuten beträchtlich. So betragen bei den Rotweinen die Extremwerte 4,23 (Nr. 23) und 6,35 g/l (Nr. 28), bei den Weißweinen 3,83 (Nr. 72) und 6,5 g/l (Nr. 65). Bei diesen Gewächsen handelte es sich allerdings um Spezialitäten. Die Durchschnitts-Gesamtsäurewerte waren folgende (in g/l):

|             | Rotweine | Weißweine |
|-------------|----------|-----------|
| Ostschweiz  | 4,80     | 4,90      |
| Westschweiz | 5,13     | 4,90      |
| Tessin      | 5,36     |           |

Im Hinblick auf die kleine Probenzahl ist diesen Werten allerdings keine repräsentative Bedeutung beizumessen; auffallend sind immerhin die verhältnismäßig hohen mittleren Gesamtsäuregehalte der Rotweine.

Da in der Schweiz eine Senkung des Äpfelsäuregehalts weder durch chemische Eingriffe (Münz'sche Doppelsalzausfällung) noch über den indirekten Weg der Gallisierung statthaft ist, bleibt als einzige Möglichkeit eine Entfernung bzw. Umwandlung der Äpfelsäure auf biologischem Weg. Rund 5/6 der hier untersuchten Weine

hatten den biologischen Säureabbau durchlaufen, ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung dieser Methode für die Bereitung harmonischer, stabiler Qualitätsweine.

Es bestätigte sich erneut, daß die während des biologischen Säureabbaus anfallende Milchsäure deutlich unter den theoretisch zu erwartenden Mengen liegt. Teilweise mag dabei die Hefe mitbeteiligt sein, sei es durch einen gewissen eigenen, noch fortdauernden Malatabbau oder -einbau oder durch eine weitere Umwandlung der Milchsäure. Offensichtlich bleiben hier aber einige Erscheinungen noch ungeklärt.

Da während der alkoholischen Gärung nur wenig Milchsäure ( $< 1$  g/l) gebildet wird, ist der Gehalt fertig ausgebauter Weine abhängig vom ursprünglichen Äpfelsäuregehalt. Man wird also aus Äpfelsäure-reichen — eher geringen — Jungweinen nach dem Säureabbau zwangsläufig Milchsäure-reiche Endprodukte erhalten. Den extremsten Fall mit über 6 g Milchsäure/l stellte interessanterweise ein nach dem Warmmaischeverfahren gewonnener Clevner (Blauburgunder) dar. Zur Zeit laufende Versuche scheinen erhöhte Äpfelsäuregehalte in Warmmaischen und damit auch höhere Milchsäurewerte in den daraus hergestellten Rotweinen zu bestätigen.

Gemäß unseren Untersuchungsergebnissen sind manche Milchsäurebakterien wahrscheinlich befähigt, im Substrat enthaltene D(-)-Milchsäure in die L(+)-Form umzuwandeln. Vermutlich wird dieser Vorgang durch verschiedene Faktoren, wie Art der Vorzüchtung der Organismen, Substratzusammensetzung, Gärdauer usw. beeinflußt. Es stellt sich hieraus die Frage einer sinnvollen Berücksichtigung der Milchsäure-Drehrichtung als taxonomisches Kriterium. Möglicherweise lassen sich diesbezügliche Unsicherheiten durch Anwendung zweckmäßig standardisierter Methoden weitgehend beheben.

Bei der Zitronensäure erscheinen Gehalte bis zu 400 mg/l auch in naturreinen Weinen möglich. Über 500 mg/l natürliche Zitronensäure dürften dagegen nur in extrem fäulnishaltigem Traubenmaterial auftreten. Bei Weinen mit beendetem Ausbau ist der schließliche natürliche Zitronensäuregehalt abhängig von den Bakterieneigenschaften, d. h. vom Vermögen der beteiligten Organismen, die Zitronensäure abzubauen. Da bei der bakteriellen Zerlegung dieser Säure immer etwas flüchtige Säure und andere unerwünschte Produkte entstehen, wäre ein Abbau durch Zitronensäure-indifferente Organismen vorteilhaft.

Rund 50 Weine wurden gleichzeitig mit der Zitronensäurebestimmung durch zusätzliches Einmischen von L(+)-Lactatdehydrogenase auf das Vorkommen von Oxalessigsäure untersucht. Diese Säure konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, daß ihre instabilen Eigenschaften ein Auftreten in Wein verhindern.

### Zusammenfassung

In ca. 90 konsumreifen Weinen wurden die Gehalte an L(-)-Äpfelsäure, Zitronensäure, gesamter und L(+)-Milchsäure bestimmt. Es zeigte sich, daß der Großteil der Getränke den biologischen Säureabbau durchlaufen hatte. Anhand von Säurebestimmungen an sieben Weinen vor und nach dem Abbau werden einige durch diesen Vorgang bewirkte Veränderungen untersucht und diskutiert.

Verschiedene Gärversuche mit Hefen und Milchsäurebakterien auf Traubensäften und Nährlösungen dienten dazu, die Veränderungen im Gehalt an obigen Säuren noch von der mikrobiologischen Seite her näher zu charakterisieren.

Herrn K. WEIBEL danken wir für tatkräftige Mithilfe bei den Milchsäurebestimmungen und weiteren Analysen. Herrn U. VETSCH sind wir für die Bereitstellung von Bakterien-Gäransätzen zu Dank verpflichtet.

## Literaturverzeichnis

1. BRÉCHOT, P., CHAUVET, J., CROSON, M. et IRMANN, R., 1966: Configuration optique de l'acide lactique apparue au cours de la fermentation malolactique pendant la vinification. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris) 262, 1605—1607.
2. CARLES, J., 1967: Les acides organiques de la fermentation. Rev. Franç. Oenol. 7, 5—9.
3. CHARPENTIER, Y., RIBÉREAU-GAYON, J. et PEYNAUD, E., 1951: Sur la fermentation de l'acide citrique par les bactéries malolactiques. Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 1369—1371.
4. DIMOTAKI-KOURAKOU, V., 1966 a: Dosage de l'acide lactique. Méthodes OIV 204.
5. — — —, 1966 b: Remarques sur les méthodes de dosage de l'acide lactique. Méthodes OIV 205.
6. GRUBER, W. und MOELLERING, H., 1966: Citrat-Lyase und Bestimmung von Citrat. Biochem. Z. 346, 85—88.
7. KITAHARA, K., OBAYASHI, A. and FUKUI, S., 1951: Racemiasse. Part I. Cell free racemiasse. Enzymologia 15, 259—266.
8. KOCH, J. und BREITHAUER, G., 1951: Über eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der Milchsäure in Süßmost und Wein. Z. Analyt. Chemie 132, 346—356.
9. LABEYRIE, F., SLONIMSKI, P. P. et NASEIN, L., 1959: Sur la différence de stéréospecificité entre la deshydrogénase lactique extraite de la levure anaérobie et celle extraite de la levure aérobie. Biochim. Biophys. Acta 34, 262—265.
10. „Lactat-Test“. Angaben der Firma C. F. Boehringer u. Söhne GmbH, Mannheim.
11. LÜTHI, H. und VETSCH, U., 1959: Beiträge zur Kenntnis des biologischen Säureabbaus in unvergorenen und vergorenen Obst- und Traubensäften. I. Vorläufige Mitteilung. Schweiz. Z. Obst- u. Weinbau 68, 127—129 u. 144—148.
12. MAYER, K. und BUSCH, I., 1963: Über eine enzymatische Äpfelsäurebestimmung in Wein und Traubensaft. Mitt. Geb. Lebensmitteluntersuch. u. Hyg. (Bern) 54, 60—65.
13. — — —, — — — und PAUSE, G., 1964: Über die Bernsteinsäurebildung während der Weingärung. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. 125, 375—381.
14. — — — und PAUSE, G., 1965: Eine enzymatische Zitronensäure-Bestimmung. Mitt. Geb. Lebensmitteluntersuch. u. Hyg. 56, 454—458.
15. — — — und — — —, 1968: Zitronensäure- und Milchsäure-Bestimmungen in Wein. Schweiz. Z. Obst- u. Weinbau 104, 243—248.
16. MOELLERING, H. and GRUBER, W., 1966: Determination of citrate with citrate lyase. Analyt. Biochem. 17, 369—376.
17. NYGAARD, A. P., 1961: Various forms of D- and L-lactic dehydrogenases in yeast. Ann. N. Y. Acad. Sci. 94, 774—779.
18. PEYNAUD, E., 1938: L'acide malique dans les moûts et les vins de Bordeaux. Ann. Fals. Fraud. 31, 332—347.
19. — — — et BLOUIN, J., 1965: Comparaison de quelques méthodes de dosage de l'acide L-malique. Ann. Technol. Agric. (Paris) 14, 61—66.
20. — — —, LAFON-LAFOURCADE, S. et GUIMBERTEAU, G., 1967 a: Nature de l'acide lactique formé par des levures — un caractère spécifique de *Saccharomyces veronae* LODDER et VAN RIJ. Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. 33, 49—55.
21. — — —, — — — and — — —, 1967 b: L(+)-lactic acid and D(—)-lactic acid in wines. Amer. J. Enol. Viticult. 17, 302—307.
22. — — —, — — — et — — —, 1967 c: Sur la nature de l'acide lactique formé par les bactéries lactiques isolées des vins. Rev. Ferment. Ind. Aliment. (Bruxelles) 22, 61—66.
23. STALDER, L., 1954: Untersuchungen über die Graufäule (*Botrytis cinerea* PERS.) an Trauben. 2. Mitt. Phytopathol. Z. 22, 345—380.
24. VETSCH, U. und LÜTHI, H., 1964: Farbverluste während des biologischen Säureabbaus von Rotweinen. Mitt. Geb. Lebensmitteluntersuch. u. Hyg. (Bern) 55, 93—98.

Eingegangen am 9. 9. 1968

Dr. K. MAYER  
Eidgenöss. Forschungsanstalt  
f. Obst-, Wein- u. Gartenbau  
8820 Wädenswil  
Schweiz