

Aus dem Forschungs-Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof

# Über die Milchsäurebakterien des Weines und den biologischen Säureabbau

## Übersicht

### I. Systematik und chemische Grundlagen

von

F. RADLER

<b>A. Einleitung</b> . . . . .	144
<b>B. Geschichtliches</b> . . . . .	148
<b>C. Kulturmethoden und Systematik der Milchsäurebakterien des Weines</b> . . . . .	148
1. Kultur- und Isolierungsmethoden . . . . .	148
2. Bakterielle Weinkrankheiten und biologischer Säureabbau . . . . .	152
3. Übersicht über die Systematik der aus Wein und Obstwein isolierten Milchsäurebakterien . . . . .	156
<b>D. Chemische Grundlagen</b> . . . . .	162
1. Die Zusammensetzung des Mostes und Weines . . . . .	162
2. Analysenmethoden zur Untersuchung des biologischen Säureabbaus . . . . .	163
3. Die enzymatischen Vorgänge beim biologischen Säureabbau . . . . .	164
<b>E. Physiologie und Ökologie der Bakterien des biologischen Säureabbaus*)</b>	
<b>F. Methoden zur Veränderung des Säuregehaltes im Wein</b>	
<b>G. Ausblick</b>	
<b>H. Zusammenfassung</b>	

\*) Die Abschnitte E — H erscheinen in den folgenden Heften

### A. Einleitung

Bei der Weinbereitung ist die Vergärung des Zuckers durch Hefen die wichtigste und auffälligste Veränderung des Traubenmostes. Mit der Gärung ist jedoch die Entstehung des Weines nicht beendet, es folgen noch eine Reihe von chemischen und mikrobiologischen Vorgängen, die häufig als das Reifen und Altern bezeichnet werden (CARLES und LAMAZOU-BETBEDER 1959). Die auf die Gärung folgenden Prozesse sind in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Einmal führen sie zu einer Veredelung und Reifung des Weines, zum anderen sind es Alterserscheinungen und sog. Weinkrankheiten, die schließlich den Wein minderwertig oder ungenießbar werden lassen. Es ist nun die vornehmliche Aufgabe der Kellerwirtschaft, den Wein so zu behandeln, daß die Reifungsvorgänge in der günstigsten Weise ablaufen, der Wein möglichst lange frisch gehalten wird und frei von Krankheiten bleibt. Je besser die einzelnen Vorgänge bekannt sind, um so sicherer werden sie durch geeignete Maßnahmen beeinflußt werden können. Im folgenden soll eine Übersicht gegeben werden über die nach der Gärung hauptsächlich durch Milchsäurebakterien bewirkten

Umsetzungen der organischen Säuren und die damit verbundenen Vorgänge, sowie über die Möglichkeiten, diese Prozesse zu lenken.

Die quantitativ größte stoffliche Veränderung beim Reifen des Weines ist die häufig nach der Gärung zu beobachtende Verminderung des Gehaltes an freier Säure. Diese Säureverminderung, die im Gegensatz zur sehr auffälligen Gärung erst um die Jahrhundertwende erkannt wurde, hat zwei Ursachen: Die Weinsteinausfällung und der biologische Säureabbau.

Nach der Gärung kommt es infolge sich ändernder Löslichkeitsverhältnisse (steigender Alkoholgehalt, niedrige Lagertemperatur) zur Ausfällung von Weinstein, dem sauren Kaliumsalz der Weinsäure. Durch die Ausscheidung des sauren Salzes wird in jedem Fall der Gehalt an freier Säure im Wein vermindert. Da der Weinsteinanfall von der Konzentration an Weinsäure und Kalium, sowie der Temperatur, dem Alkoholgehalt und dem pH-Wert abhängig ist, kann die Weinsteinbildung vorausberechnet werden (NEGRÉ und Mitarb. 1960). Gleichzeitig mit der Ausfällung von Weinstein erfolgt eine Veränderung des Säuregrades: Weine mit einem pH-Wert von  $< 3,5$  werden saurer, Weine mit einem pH von  $> 3,5$  werden weniger sauer (BIEDERMANN 1951).

Beim biologischen Säureabbau wird von Milchsäurebakterien die zweibasische Äpfelsäure zur schwächer dissoziierten einbasischen Milchsäure dekarboxyliert; die freier werdende Kohlensäure entweicht. Das wesentliche Resultat des biologischen Säureabbaus ist eine Verminderung des Gehaltes an freier Säure und eine Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration, also ein Anstieg des pH-Wertes. Von INGRAHAM und Mitarb. (1960) wird darauf hingewiesen, daß der biologische Säureabbau eine dreifache Wirkung auf den Wein ausübt: 1. Säureverminderung, 2. Stabilisierung, 3. Geschmacksveränderung. Zugleich mit der Verminderung des Säuregehaltes wird eine Stabilisierung des Weines erzielt; d. h. ein Wein, der nach dem Äpfelsäureabbau auf Flaschen gefüllt wurde, wird dann nicht mehr zu einer unerwünschten Kohlensäurebildung neigen. Ferner soll durch den biologischen Säureabbau der Geschmack („flavor complexity“) des Weines verbessert werden.

Der biologische Säureabbau kann in allen Weinbaugebieten der Welt beobachtet werden. In Deutschland dürfte er für die überwiegende Mehrzahl der Qualitäts- und Konsumweine von großer Bedeutung sein. \*)

RIBÉREAU-GAYON (1946) betont, daß der Säureabbau eine fast unerläßliche Voraussetzung für die Qualitätsweine von Burgund ist. In ähnlicher Weise wurde von LAMAZOU-BETBEDER und PECH (1955) auf die Wichtigkeit des biologischen Säureabbaus für Qualitätsweine (Vins délimités de qualité supérieure) aus dem Anbaugebiet von Toulouse hingewiesen, da in fast allen untersuchten Rotweinen und den meisten Rosé-Weinen ein Säureabbau nachgewiesen werden konnte. BERGERET (1958a) untersuchte das Vorkommen des biologischen Säureabbaus in Qualitätsweinen (Vins d'appellation contrôlée) aus Burgund der Sorten Pinot noir, Chardonnay und Aligoté des Jahrganges 1957. Bis zum April des folgenden Jahres war der Säureabbau nur in 59 von 148 Weinen und bis Juni nur in 32 von 93 Weinen erfolgt. INGRAHAM und COOKE (1960) betonen, daß durch den Säureabbau nicht nur die Acidität reduziert, sondern auch der Geschmack des Weines verändert wird. Von 144 untersuchten californischen Weinen wurde in 79 ein Abbau der Äpfelsäure nachgewiesen. In 75 % der Rotweine, in 32,1 % der trockenen Weißweine und in 12,5 % der Rosé-Weine war die Äpfelsäure bakteriell abgebaut worden. Die Häufigkeit des Säureabbaus weist eine Abhängigkeit vom Anbaugebiet auf. Allgemein wird angegeben, daß der Säureabbau in californischen Qualitätsweinen besonders häufig vorkommt. FÖRNACHON (1957) konnte jedoch in Australien keine Korrelation zwischen Rebensorten, Anbaugebiet und Säureabbau

\*) Leider fehlen über die praktische Bedeutung des Säureabbaus und die Häufigkeit in Qualitäts- und Konsumweinen in Deutschland bisher genaue Angaben.

im Wein finden. Von 317 trockenen Weinen hatten 144 die Säure nach 8 Monaten abgebaut, aber von 84 gespritzten Weinen 3. Auch in portugiesischen Weinen wird dem Säureabbau eine große Bedeutung zugesprochen, so z. B. für Weine der Sorte „verdejo“, deren Ausbau unter Flor-Hefe erfolgt (FEDUCHY und SANDOVAL 1959). RIBÉREAU-GAYON und PEYNAUD (1960) halten den Säureabbau für Qualitätsrotweine für unerlässlich. Nach ihrer Ansicht sind Rotweine, in denen der Säureabbau nicht erfolgt ist, kellertechnisch falsch behandelt worden.

Wenn auch der bakterielle Säureabbau sicher der natürlichste Weg zur Verminderung eines zu hohen Säuregehaltes im Wein ist, so gilt dieser Vorgang keineswegs immer als vorteilhaft. Von VAUGHN (1955) wird zwar eingeräumt, daß Milchsäurebakterien im Wein eine wünschenswerte Säureverminderung bewirken können, aber in normalen und säurearmen Weinen wird von ihm die Tätigkeit dieser Organismen als wenig nützlich oder gar gefährlich angesehen. Und tatsächlich bestehen zwischen dem eigentlichen biologischen Säureabbau und bakteriellen Weinkrankheiten sehr enge Beziehungen. Wenn Weine nur wenig Säure enthalten, wie das für die Mehrzahl der Weine aus südlichen Ländern zutrifft, dann ist natürlich eine Verminderung des Säuregehaltes unerwünscht, da sie gefährliche Folgen haben kann. Betrachtet man nicht nur ein Weinbaugebiet, sondern verschiedene Anbaugebiete der Welt, dann wird man die allgemein gestellte Frage, ob der Säureabbau im Wein wünschenswert ist oder verhindert werden soll (VAUGHN und TSCHELISTSCHEFF 1957), nicht mehr mit Sicherheit beantworten können.

Trotz der weltweiten Verbreitung des Säureabbaus ist über die Herkunft der Erreger (einer Anzahl verschiedener Milchsäurebakterien) bisher nur wenig bekannt. — Von den Weinhefen weiß man, daß sie im Erdboden und auf Pflanzen und Früchten vorkommen und von diesen Standorten isoliert werden können. Die Bakterien des biologischen Säureabbaus sind bisher immer nur aus Wein, während oder nach dem biologischen Säureabbau, isoliert worden. RADLER (1957) konnte aus frischem Traubenmost keine Äpfelsäure-abbauenden Bakterien isolieren. Auf Rebenblättern kommen zwar Keime mit der Fähigkeit, Äpfelsäure anaerob zu dekarboxylieren, vor, aber diese Bakterien sind sehr wahrscheinlich nicht die Erreger des biologischen Säureabbaus. Milchsäurebakterien, die unter den sehr ungünstigen Lebensbedingungen des Weines oder Traubenmostes lebens- und vermehrungsfähig wären, sind relativ selten. Von PEYNAUD und DOMERCQ (1959) wird die Beobachtung, daß der Säureabbau in großen Behältern im allgemeinen leichter vonstatten geht als — bei gleicher Temperatur — in kleinen Gefäßen, auf das seltene und vor allem unregelmäßige Vorkommen dieser Mikroorganismen zurückgeführt. Von den gleichen Autoren (PEYNAUD und DOMERCQ, 1961b) konnte später gezeigt werden, daß Äpfelsäure-abbauende Bakterien auch auf Traubenbeeren vorkommen. Bei aseptischer Gewinnung von Traubenmost und spontaner Vergärung (bei pH 3,8) von 49 Proben aus je 1 kg Trauben wurde nur in 8 Fällen das Vorkommen von säureabbauenden Bakterien beobachtet. Daraus folgt, daß diese Bakterien auf Trauben vorkommen, ihre Zahl aber sehr gering ist. Vermutlich handelt es sich bei den im Wein lebenden, nützlichen oder schädlichen Bakterien nicht um selbständige, nur im Wein vorkommende Organismen. Es ist vielmehr anzunehmen, daß diese „Weinbakterien“ spezialisiert und an die besonderen Bedingungen des Milieus angepaßte Rassen oder Varietäten von bekannten und an verschiedenen Standorten verbreiteten Milchsäurebakterien sind. So wurden beispielsweise von OLSEN (1948) aus Silage Milchsäurebakterien isoliert, die in sehr saurem Milieu auch bei Gegenwart von Alkohol wach-

sen, Äpfelsäure abbauen können und sich auch in ihren übrigen Eigenschaften nicht wesentlich von Bakterien unterscheiden, die im Wein vorkommen. Nach VAUGHN (1955) können aus gärendem Sauerkraut, Gurken oder Oliven, Speichel, Faeces, Milch und anderen Substraten Milchsäurebakterien isoliert werden, die nach einigen Passagen dazu gebracht werden können, in Traubenmost oder Wein zu wachsen, in dem sie dann meist unerwünschte Umsetzungen durchführen können.

Auch die folgenden Beobachtungen von WEBB und INGRAHAM (1960) deuten darauf hin, daß Äpfelsäure-abbauenden Bakterien auf Trauben nur selten vorkommen. Trauben eines Weinbergs wurden zu zwei verschiedenen Kellereien gebracht und dort unter den gleichen Bedingungen verarbeitet. In der einen Kellerei erfolgte spontan der Säureabbau, in der anderen zunächst nicht. Nach künstlicher Infektion des Weines mit geeigneten Bakterien erfolgte auch in der zweiten Kellerei der Säureabbau. Dessen Ausbleiben war offensichtlich nicht durch unterschiedliche kellertechnische Maßnahmen bedingt, sondern durch das Fehlen der Bakterien.

Von WEBB und INGRAHAM (1960) wird angenommen, daß die säureabbauenden Bakterien aus dem Hefetrub kommen. Damit ist allerdings die Frage der Herkunft dieser Bakterien nicht geklärt, denn Hefetrub ist ja kein natürlicher Standort. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß durch die Stoffwechseltätigkeit der Hefe in räumlich eng begrenzten Stellen — im Hefetrub oder auch nur an der Oberfläche von Hefezellen — für die Milchsäurebakterien Lebensbedingungen entstehen, die den Bakterien trotz der ungünstigen Bedingungen des Großraumes ein Wachstum im Most oder Wein ermöglichen (RADLER 1957). Gelegentlich werden sich unter diesen Bedingungen aus einigen Milchsäurebakterienarten Typen entwickeln können, die an so extreme Milieubedingungen wie Traubenmost oder Wein angepaßt sind. Weiterhin wird man annehmen müssen, daß sich solche durch Selektion oder Mutation angepaßte Bakterientypen in Kellereien über längere Zeiträume erhalten können.

Weinkeller und Kellereigeräte dürften also mit großer Wahrscheinlichkeit das Reservoir darstellen, von dem aus gewöhnlich die Infektion des Weines mit spezialisierten Milchsäurebakterien erfolgen kann. Von PEYNAUD und DOMERCQ (1961) wird dagegen angenommen, daß in gut geführten Kellereien das Gerät keine Infektionsquelle darstellen dürfte. Bisher scheint diese Frage allerdings noch nicht experimentell überprüft worden zu sein. — Bei der Apfelweinherstellung sollen die Milchsäurebakterien zum Teil mit der Ernte eingeschleppt werden. Infolge der Konkurrenz mit den schnellwachsenden Hefen sollen dann Typen auftreten, die Substanzen verwerten können, welche von verwandten Bakterien anderer Standorte nicht umgesetzt werden (CARR 1960).

Wegen der großen Bedeutung, die die Milchsäurebakterien für die Weinwirtschaft haben, sind diese Bakterien in den letzten Jahren in einer Reihe von Laboratorien sehr intensiv bearbeitet worden. Im folgenden soll der Versuch gemacht werden, in einer Übersicht die Fortschritte und Ergebnisse darzustellen, die die Untersuchungen der Milchsäurebakterien des Weines und besonders der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien erbracht haben. Im Rahmen dieser zusammenfassenden Darstellung sollen darüber hinaus auch mikrobiologische und chemische Arbeiten berücksichtigt werden, die für das Verständnis der Milchsäurebakterien des Weines, deren Stoffwechsel und die damit zusammenhängenden Probleme von Bedeutung sind. Bei der Fülle des vorliegenden Materials kann natürlich eine möglichst vollständige Darstellung nur angestrebt werden.

## B. Geschichtliches

Von PASTEUR (1866) sind wohl zuerst Bakterien im Wein als Erreger von Weinkrankheiten nachgewiesen worden. Der Säurerückgang im Wein nach der Gärung wurde allerdings zunächst auf die Weinsteinausscheidung zurückgeführt. Erst später wurden Mikroorganismen für die Säureverminderung verantwortlich gemacht. Dabei vermutete u. a. SCHUKOW (1896), daß die Hefen die Ursache des Säurerückganges wären. MÜLLER-THURGAU (1891) hat wohl zum ersten Mal darauf hingewiesen, daß der Säureabbau von Bakterien bewirkt werden könnte, was dann von KOCH (1898) und von SEIFERT (1901, 1903) bestätigt wurde. Eine Übersicht über die geschichtliche Entwicklung gibt RIPPEL (1950). In einer sehr ausführlichen und gründlichen Arbeit haben MÜLLER-THURGAU und OSTERWALDER (1913) die Kenntnisse über die Milchsäurebakterien des Weines zusammenfassend dargestellt. Obwohl seit dieser Zeit die bakterielle Ursache des biologischen Säureabbaus als gesichert gilt, fehlt es jedoch auch in neuerer Zeit nicht an Hinweisen, daß auch von der Hefe Äpfelsäure abgebaut werden kann (KUDRJAWZEW 1960, RZEDOWSKI und RZEDOWSKA (1960). Ohne Zweifel können eine Reihe von Hefen Äpfelsäure abbauen, so z. B. *Pichia membranaefaciens* und *Candida mycoderma* (FLESCHE und JERCHEL 1960); jedoch sind bei diesem Prozeß oxydative Vorgänge unter Mitwirkung von Sauerstoff beteiligt, während der vollständige Abbau der Äpfelsäure durch Bakterien unter anaeroben Bedingungen erfolgen kann. Die zunehmende Kenntnis von den bakteriellen Vorgängen im Wein, vor allem dem biologischen Säureabbau, ist eng gekoppelt an die Entwicklung und Anwendung neuer experimenteller Methoden. PASTEUR (1866) konnte mit Hilfe des Mikroskops Bakterien als Erreger von Weinkrankheiten erkennen. Die zunehmende Anwendung der Säurebestimmung durch Titration hatte zur Folge, daß dem Säureabbau besondere Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Der Ausbau der bakteriologischen Technik, der Sterilisation und der Herstellung von Reinkulturen ermöglichten es MÜLLER-THURGAU und OSTERWALDER (1913), KOCH (1900) und SEIFERT (1901, 1903), die Erreger des biologischen Säureabbaus und einiger Weinkrankheiten zu isolieren und näher zu untersuchen. Durch Anwendung enzymchemischer Methoden wurden schließlich wesentliche Einblicke in den enzymatischen Verlauf des bakteriellen Abbaus der Äpfelsäure gewonnen (OCHOA 1952, JERCHEL und Mitarb. 1956, SCHMIDT 1959). Gleichzeitig eröffnete die Papierchromatographie die Möglichkeit, die organischen Säuren schnell nachzuweisen, wodurch in Verbindung mit den verfeinerten Methoden der mikrobiologischen Vitamin- und Aminosäurebestimmung wesentliche Erkenntnisse über Nährstoffansprüche der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien und deren Beziehungen zu den Weinhefen gewonnen werden konnten (ZICKLER 1956, RADLER 1958a, 1960, LÜTHI 1957a, c, PEYNAUD und DOMERCO 1959). Es ist zu vermuten und zu hoffen, daß der Einsatz neuerer Methoden, wie z. B. der Isotopentechnik oder der Gaschromatographie, unsere Kenntnisse von den bakteriellen Umsetzungen im Wein weiter vertiefen wird.

## C. Kulturmethoden und Systematik der Milchsäurebakterien des Weines

### 1. Kultur- und Isolierungsmethoden

Voraussetzung für die Untersuchung der Bakterien, die im Wein Äpfelsäure abbauen oder andere, weniger erwünschte Umsetzungen durchführen, ist die Gewinnung von Reinkulturen dieser Organismen.

Übereinstimmend wird von den meisten Autoren betont, daß die Milchsäurebakterien des Weines in Laboratoriumsmedien häufig nur sehr langsam und schlecht oder auch gar nicht wachsen. Wegen des schlechten Wachstums dieser Organismen war daher schon von KOCH (1900) empfohlen worden, die frischen Kulturen mit einer größeren Bakterienmenge zu beimpfen. Es nimmt nicht wunder, daß im Laufe der Zeit viele Vorschläge gemacht wurden, wie diese empfindlichen Bakterien am besten isoliert und kultiviert werden können. Die Milchsäurebakterien des Weines nehmen jedoch im Hinblick auf die schlechte Kultivierbarkeit keine Sonderstellung ein; auch die Kultur von Milchsäurebakterien von anderen Standorten bereitet häufig sehr große Schwierigkeiten, worüber von ROGOSA und SHARPE (1959) ausführlich berichtet wird. Bei der ersten Isolierung von Milchsäurebakterien aus Wein können zusätzlich die in großer Zahl vorkommenden und rasch wachsenden Hefen sehr stören, so daß es häufig erforderlich ist, das Wachstum dieser wenig anspruchsvollen Organismen weitgehend einzuschränken.

Die Tabellen 1 und 2 sollen eine Übersicht über einige zur Isolierung und Kultur von Milchsäurebakterien aus Wein verwendete Medien geben. Wesentliche Bestandteile der meisten Medien sind Obst- oder Fruchtsäfte wie Traubenmost, Tomaten- und Birnensaft und Hefewasser oder -extrakt. Bereits die ersten Untersucher von Milchsäurebakterien des Weines verwendeten Nährmedien, die diese Bestandteile enthielten und von manchen Autoren wurde mit Erfolg entsäuertes, reiner Traubenmost, Birnensaft, Malzextrakt oder Hefewasser verwendet (ARENA 1936, SCHANDERL 1954, RADLER 1958b). Im Gegensatz dazu wird jedoch von OLSEN (1948) berichtet, daß aus Obstweinen isolierte Milchsäurebakterien nie in rohem Fruchtsaft wuchsen; gleichzeitig wurde ein niedriger pH-Wert und ein Gehalt von 10 Vol.-% Alkohol für das Wachstum dieser Keime als wichtig angesehen, während die meisten Autoren einen Zusatz von Alkohol vermeiden. Gut bewährt haben sich zur Kultur der Milchsäurebakterien aus Wein Medien mit einem hohen Gehalt an Tomatensaft (INGRAHAM und Mitarb. 1960) oder auch Apfelsaft (MILLIS und Mitarb. 1958); beide Säfte enthalten keine störenden Mengen von Gerbstoffen. Besonders schwierig scheint die Kultur von homofermentativen Kokken zu sein. INGRAHAM und Mitarb. (1960) konnten diese anspruchsvollen Keime nur auf einem Tomatensaftmedium mit einem Zusatz von Leberextrakt kultivieren.

Je nach Verwendungszweck erhalten die meisten der in der Tabelle 1 und 2 angeführten Medien einen Zusatz von 1,1 — 4,0 % Agar oder eine zur Verfestigung notwendige Menge Gelatine. Zur Unterdrückung des Hefewachstums wird den Isolierungsmedien entweder Actidion, Sorbinsäure oder 8-Hydroxychinolin zugesetzt. Die Ansichten über die Harmlosigkeit dieser Mittel gehen allerdings auseinander. Während Actidion und Sorbinsäure in den angegebenen Konzentrationen das Wachstum der Milchsäurebakterien nicht beeinflussen sollen, wurde von INGRAHAM und Mitarb. (1960) ein Hemmstoffzusatz als nicht erforderlich angesehen, und durch Sorbinsäure soll sogar die Isolierung der Milchsäurebakterien erschwert worden sein.

Gelegentlich erweist sich die Verwendung von Spezialmedien als notwendig oder nützlich. So wurde von MILLIS und Mitarb. (1958) zur Kultur von schleimbildenden Milchsäurebakterien aus Apfelwein unter anderem ein Medium aus frischen Gerstenkeimen hergestellt, sowie ein Medium aus doppelt hydrolysiertem Casein und einem besonderen Hefeautolysat. Von FLESCH und JERCHEL (1958) ist versucht worden, Melasse als Substrat zur Massenkultur eines Äpfelsäure-abbauenden Bakteriums zu verwenden. Von besonderem Interesse erscheint vielleicht noch das von FORACHON (1957) angegebene Medium, das zur Isolierung von Milchsäurebakterien verwendet wurde (siehe Tabelle 1) und im Gegensatz zu den sonstigen Medien keine reduzierenden Kohlenhydrate enthält; der Vorteil dieses Mediums liegt sicher darin, daß sich in ihm die störenden Hefen kaum entwickeln werden, jedoch werden in diesem Medium wohl auch nur wenige Milchsäurebakterienarten wachsen können.



Tabelle 2

Bestandteile (je Liter) von Kulturmedien für aus Wein isolierte Milchsäurebakterien

	Fornachon (1936)	Olsen (1948)	Bidan (1956)	Jerchel u. Mitarb. (1956)	Peynaud u. Domezq (1959)	Sudraud u. Cassignard (1958)	Tomatensaftmedium
pH-Wert	4,5	4,2		5	4,2	4,2	4,8
Traubenmost ml					500	500	
Birnensaft ml				450			
Tomatensaft ml			25				400
Hefewasser <sup>1)</sup> ml	1000	500		11 <sup>1)</sup>			
Hefeextrakt g			6		5	2,5	
Pepton g				3,3			10
peptonisierte Milch g							10
Malzkeimextrakt ml		200(5 <sup>0</sup> /oig)					
Casein, pankreatisch verdaut ml				16,5			
Glucose g	15	10					
Rohrzucker g	15						
Fructose g		10					
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> g	1,0						
CaCO <sub>3</sub> g			1				
MgSO <sub>4</sub> ·aq g	0,2		0,1				
Äpfelsäure <sup>2)</sup> g			2	1,5 3			
Kaliumbitartrat g	3						
Natriumacetat g			3,0				
		100 ml Äthylalkohol		Fe u. Mn Spuren.			

<sup>1)</sup> Autolysat aus Bier- und Weinhefe

Neben der Zusammensetzung des Mediums sind natürlich auch die Bedingungen der Umgebung wichtig. Für die Kultur der Milchsäurebakterien aus Wein wird in der Regel eine Temperatur von 20 — 30° gewählt. Anaerobe

Bedingungen werden als wachstumsbegünstigend angesehen (PEYNAUD und DOMERCO 1959); die Mehrzahl der Keime kann aber — vor allem in festen Medien — bei Luftzutritt kultiviert werden. Ein fester Verschuß der Kulturfäße dürfte jedoch in jedem Fall günstig sein. Von INGRAHAM und Mitarb. (1960) wird ferner empfohlen, die zur Kultur von Milchsäurebakterien verwendeten Agarplatten in einen Exsikkator zu stellen und darin den Kohlensäuregehalt der Luft durch Abbrennen einer Kerze zu erhöhen.

Zur Klärung spezieller Fragen des Nährstoffbedarfs der Milchsäurebakterien des Weines werden in zunehmendem Maße halbsynthetische oder vollsynthetische Medien verwendet (RADLER 1958c, FLESCHE und JERCHEL 1958, LÜTHI 1959a, b, INGRAHAM und Mitarb. 1960). Die Herstellung solcher Medien ist möglich geworden, nachdem die Nähr- und Wuchsstoffansprüche einer größeren Zahl von Milchsäurebakterien aufgeklärt werden konnten. Gewöhnlich ist das Wachstum der Milchsäurebakterien aus Wein in den aus vielen einzelnen Substanzen bestehenden synthetischen Medien nicht so gut wie in den komplexen, natürlichen Medien, doch in den meisten Fällen genügt dieses Bakterienwachstum den Versuchsanforderungen.

## 2. Bakterielle Weinkrankheiten und biologischer Säureabbau

Unerwünschte Veränderungen des Weines sind schon sehr lange bekannt. Seit den klassischen Untersuchungen von PASTEUR weiß man, daß viele der sogenannten Weinkrankheiten durch Bakterien verursacht werden. Im Laufe der Zeit sind die unerwünschten Veränderungen des Weines mit verschiedenen Namen belegt worden, so daß es schwierig erscheint, eine Übersicht zu behalten. Grundsätzlich lassen sich zwei wichtige Gruppen von Weinkrankheiten unterscheiden, die durch Essigsäurebakterien oder durch Milchsäurebakterien verursacht werden.

Die Essigsäurebakterien (*Acetobacter*) sind aerobe Organismen und ihre schädliche Wirkung besteht darin, daß von ihnen Alkohol zu Essigsäure oxydiert wird, wobei als Nebenprodukte Acetaldehyd und weitere Verbindungen entstehen können. Als aerobe Organismen können Essigsäurebakterien den Wein nur bei Luftzutritt schädigen. Die durch diese Bakterien hervorgerufene Krankheit wird gewöhnlich als Essigstich bezeichnet. Essigstichiger Wein gilt als verdorben und ist nicht mehr verkehrsfähig. In Deutschland ist der zulässige Höchstgehalt an flüchtiger Säure für Rotwein auf 1,6 g je Liter und für Weißwein auf 1,2 g je Liter gesetzlich festgelegt. Eine Übersicht über die für Wein wichtigen Essigsäurebakterien geben u. a. SCHANDLER (1959) und DUPUY (1957b). — Das „Mäuseln“ des Weines ist eine Krankheit, bei der der Wein einen unangenehmen, an Mäuseharn erinnernden Geruch und üblen, „beim Kosten am Gaumen haftenden“, Geschmack annimmt. Möglicherweise steht auch diese Krankheit in sehr enger Beziehung zum Essigsäurestich. Von VAUGHN (1938) wurde aus steckengebliebenem, verdorbenem Traubenmost das Essigsäurebakterium *Acetobacter aceti* isoliert. Dieser Organismus bewirkte bei Einsaat in sterilen Most oder Mostkonzentrat eine Veränderung, die dem Mäuseln entsprach. VAUGHN (1955) vermutet, daß das Mäuseln (das häufig mit der Milchsäuregärung von *Lactobacillus*-Arten verwechselt wird) eine Erscheinung ist, die gleichzeitig mit der Glucuronsäurebildung auftritt. Offensichtlich wird also das Mäuseln nicht von Milchsäurebakterien bewirkt, wie MÜLLER-THURGAU und OSTERWALDER (1913) und auch CRUESS (1943) annahmen. Nach SCHANDLER (1959) wird das Mäuseln nur in Weinen mit einem hohen Redoxpotential beobachtet, und es verschwindet, wenn das Redoxpotential durch Zugabe von schwefliger Säure herabgesetzt wird. Da „mäuselnde“ Weine sehr viel schweflige Säure binden sollen, ist es sehr wahrscheinlich, daß die als „Mäuseln“ bezeichnete Erscheinung im wesentlichen durch einen hohen Gehalt an freiem Acetal-

dehyd bedingt wird, der durch Essigsäurebakterien oder Hefen gebildet worden sein kann. Freier Acetaldehyd ist nur in einem Wein vorhanden, der keine freie schwefelige Säure enthält und der dann beim Fehlen anderer Reduktionsmittel auch ein hohes Redoxpotential aufweist. Diese Annahme stimmt auch mit Angaben von RIBÉREAU-GAYON und PEYNAUD (1960) überein, die berichten, daß das „Mäusel“ auch in Kulturen von den langsam gärenden Hefen der Gattung *Brettanomyces* wahrgenommen werden kann.

Für die Betrachtung der durch Milchsäurebakterien bewirkten Veränderungen von Wein ist es nützlich, die wesentlichen Stoffwechsel- und Wachstumserscheinungen dieser Bakterien aufzuzählen. Milchsäurebakterien sind anaerob oder mikroaerophil, d. h. sie benötigen zum Wachstum keinen Sauerstoff, können aber evtl. auch bei Gegenwart von Sauerstoff wachsen. Das überwiegende Endprodukt des Stoffwechsels ist Milchsäure. Homofermentative Milchsäurebakterien bilden aus Zucker (Hexose) fast ausschließlich Milchsäure, während heterofermentative Milchsäurebakterien neben Milchsäure, Alkohol, CO<sub>2</sub> und Essigsäure bilden. Heterofermentative Milchsäurebakterien können außerdem Fructose zu Mannit reduzieren, und einige Arten bilden aus Kohlenhydraten schleimige Polymerisate. — Die meisten Milchsäurebakterien haben die Fähigkeit, Äpfelsäure anaerob zu dekarboxylieren, wobei als Endprodukte Milchsäure und Kohlensäure entstehen. Einige Arten können Zitronensäure zersetzen, und auch Weinsäure kann unter Umständen von einzelnen Milchsäurebakterien abgebaut werden.

Aus dieser Darstellung der Stoffwechselreaktionen von Milchsäurebakterien lassen sich die Veränderungen, die durch diese Keime im Wein bewirkt werden, zwanglos ableiten. Je nach der Zusammensetzung des Milieus, der gegebenen Bedingungen und den hervortretenden Eigenschaften des anwesenden Organismus wird man in einem Wein entweder den harmlosen oder gar erwünschten biologischen Säureabbau, den Milchsäurestich, das Lind- oder Zähwerden, den Verderb gespritzter Weine oder die als „tourne“ = Umschlagen bezeichnete Krankheit beobachten können.

Beim biologischen Säureabbau wird von den Bakterien im wesentlichen nur die Äpfelsäure zu Milchsäure und Kohlensäure dekarboxyliert. Alle Nebenreaktionen treten im Vergleich zum Äpfelsäureabbau in quantitativer Hinsicht zurück und sind damit von geringerer Bedeutung. Neben der Äpfelsäure kann unter Umständen auch die nur in geringen Mengen vorkommende Zitronensäure abgebaut werden. Der biologische Säureabbau ist die einzige bakterielle Umsetzung im Wein, die erwünscht und nützlich sein kann, vor allem in Weinen mit einem hohen Säuregehalt. Gewöhnlich erfolgt der Abbau der Äpfelsäure einige Wochen nach Beendigung der alkoholischen Gärung. Der Säureabbau kann aber — besonders bei niedriger Kellertemperatur — im Winter ausbleiben und erst bei zunehmender Kellertemperatur im späten Frühjahr einsetzen. Es kann aber auch bei Rot- und Weißweinen vorkommen, daß der Säureabbau gleichzeitig mit der Gärung erfolgt und mit ihr beendet ist (CHARPENTIER 1954), siehe Abb. 1.

Wenn sich im Traubenmost, Obstsaft, Wein oder Obstwein Milchsäurebakterien in größerem Umfang vermehren, wobei größere Mengen von Zucker zu Milchsäure und weiteren Substanzen vergoren werden, dann kommt es zum sogenannten Milchsäurestich, Sauerkraut- oder Molkege-

s c h m a c k (MÜLLER-THURGAU und OSTERWALDER 1913, ARENA 1936, VAUGHN und DOUGLAS 1938, CRUESS 1943, OLSEN 1948, VAUGHN 1955, DUPUY 1957 a, SCHANDERL 1959). Durch die Vergärung von Zucker zu Milchsäure wird das Produkt

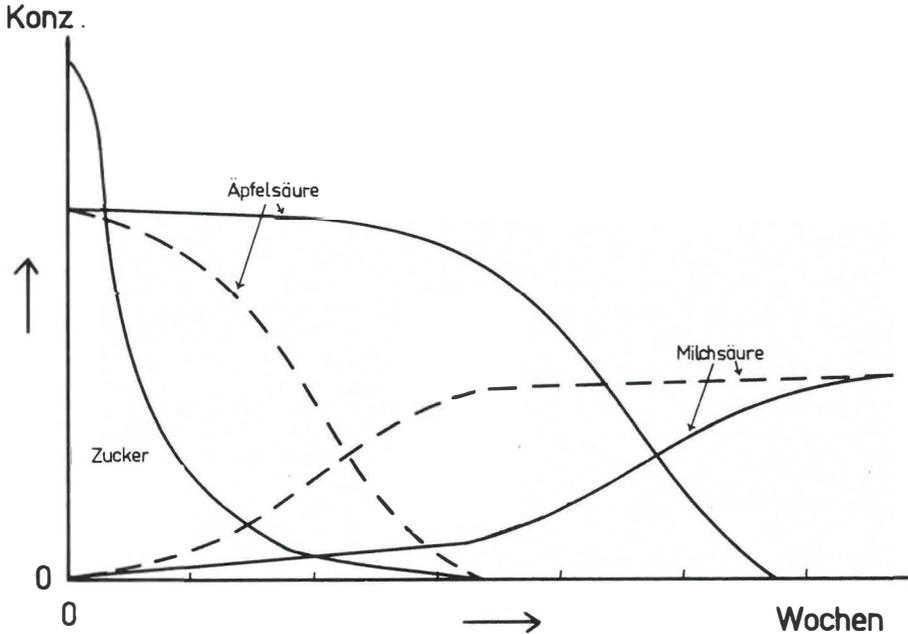


Abb. 1: Verlauf von alkoholischer Gärung und Äpfelsäureabbau  
(— Säureabbau nach der Gärung, - - - Säureabbau gleichzeitig während der Gärung)

(Wein, Most, Obstsaft) unangenehm sauer. Der unschöne Geschmack rührt nicht von der Milchsäure her, sondern von Nebenprodukten, die von den Milchsäurebakterien gebildet werden. Durch die Bakterien wird der Wein oder Most trüb, und die vorhandene Äpfelsäure wird in der Regel dekarboxyliert. Entsprechend den Eigenschaften der Organismen werden mehr oder weniger große Mengen von Essigsäure und Mannit gebildet. Die Mannitkrankheit der Südweine ist somit nichts anderes als eine durch heterofermentative Milchsäurebakterien verursachte Milchsäuregärung.

Beim Lind- oder Zählwerden kommt es zu keiner auffälligen Bakterienentwicklung. Die meist kokkenförmigen Organismen (LÜTHI 1949, MILLIS und Mitarb. 1958) bilden jedoch sehr viskose polymere Kohlenhydrate, so daß der Wein eine schleimige Beschaffenheit annimmt. Die Entwicklung dieser Milchsäurebakterien wird durch die Gegenwart von Hefen und anderen Mikroorganismen sehr wesentlich begünstigt (HOCHSTRASSER 1955).

In gespritzten Weinen mit Alkoholgehalten von 20 Vol.-% und darüber können sich besonders spezialisierte Milchsäurebakterien entwickeln (FORNACHON 1936, DOUGLAS und McCLUNG 1937). Diese gespritzten Dessertweine

werden nur aus sehr zuckerhaltigen und säurearmen Traubenmosten hergestellt. Bei zu geringer Schwefelung können sich in diesen Weinen, deren pH-Wert meist über pH 3,6 liegt, langsam wachsende, fädige Milchsäurebakterien entwickeln, die schließlich den Wein ungenießbar werden lassen. Neben den Zuckern kann von diesen Organismen auch die Äpfelsäure abgebaut werden.

Am wenigsten Klarheit besteht über die im Französischen als „*tourne*“ = Umschlagen bezeichnete Weinkrankheit. Diese Krankheit kommt offensichtlich nur in sehr säurearmen Südweinen vor. Sie äußert sich in einem starken Säureverlust und einer Braunverfärbung der Rotweinfarbe. Möglicherweise ist diese Krankheit im Grunde von den oben angeführten, durch Milchsäurebakterien bewirkten Weinveränderungen nicht scharf zu trennen. Es wird jedoch gelegentlich hervorgehoben, daß beim eigentlichen „*tourne*“ nicht nur die Äpfelsäure sondern auch die Weinsäure zersetzt wird. Von RIBEREAU-GAYON (1937) werden sogar die Milchsäurebakterien des Weines in zwei Gruppen unterteilt: a) die Bakterien der Äpfelsäure-Milchsäurevergärung und b) die „*tourne*“-Bakterien. Für diese soll typisch sein, daß sie Weinsäure zu Essigsäure umsetzen. Von OSTERWALDER (1952) sind ebenfalls Bakterien beschrieben worden, die Weinsäure abbauen können. Es ist jedoch nicht ganz sicher, ob es sich bei diesen Keimen tatsächlich um Milchsäurebakterien handelt. Sicher kann von *Lactobacillus*-Arten Weinsäure angegriffen werden, wie von VAUGHN (1955) beschrieben worden ist. Es erscheint jedoch zweifelhaft, ob dieser Umsetzung im Wein tatsächlich eine wesentliche Bedeutung zukommt.

Neben dem Essigstich und den durch Milchsäurebakterien bewirkten Veränderungen im Wein sind noch einige weitere Weinkrankheiten bekannt, die nicht durch Vertreter dieser beiden Gruppen verursacht werden.

Das „Bitterwerden“ der Rotweine (RENTSCHLER und TANNER 1951, 1952) wird vermutlich durch *Bacillus*-Arten verursacht, die das im Wein vorhandene Glycerin zu dem scharf riechenden und schmeckenden Acrolein umsetzen können. In Rotweinen soll das Acrolein mit Polyphenolen, besonders Gerbstoffen vom Typ des Epikatechins, Bitterstoffe ergeben. In Obstmaischen und Obstweinen können gelegentlich so erhebliche Mengen von Acrolein von *Bacillus*-Arten gebildet werden (WILHARM und HOLZ 1951 a b, TAVERNIER 1958), daß die Alkoholdestillation nur nach Vorbehandlung der Brennweine durchgeführt werden kann (TAVERNIER und JACQUIN 1949).

In süßen Apfelweinen kommt eine Krankheit vor, die im Englischen „*cider sickness*“ und im Französischen „*framboisé*“ genannt wird. Der Erreger ist ein bewegliches Bakterium aus der Familie der *Pseudomonadaceae* *Zymomonas anaerobiae* var. *pomaceae* (MILLIS 1957). Dieser Organismus vergärt Zucker zu Alkohol und Kohlensäure, wobei jedoch sehr große Mengen von Acetaldehyd entstehen, die die Ursache der Geschmacksveränderung sind (MILLIS und Mitarb. 1958). Für die Entstehung des unerwünschten Acetaldehyds wird auch folgende Möglichkeit erörtert: Milchsäurebakterien setzen zunächst Äpfelsäure zu Milchsäure um, aus der dann Essigsäurebakterien unter partiell anaeroben Bedingungen Acetoin und Acetaldehyd bilden sollen (TAVERNIER 1958). Diese Annahme stützt sich vor allem auf die Beobachtung, daß in sterilen Apfelweinen, die keine Milchsäure enthalten, die „*framboisé*“-Krankheit nicht erzeugt werden kann (BIDAN und MAUGENET 1960).

Aus verdorbenen californischen Dessertweinen und von Kellereigerät wurden von GINI und VAUGHN (1962) alkohol- und hitzeresistente *Bacillus*-Arten isoliert. Diese Stämme vermochten sich auch bei pH Werten von  $< 4$  zu entwickeln und bildeten neben Milchsäure auch flüchtige Säure. Allerdings konnte durch Einsaat dieser Keime in SO<sub>2</sub>-freien, sterilen Wein die ursprünglich beobachtete Erscheinung des Verderbens nicht erzielt werden. Obwohl die Bakterien ein geringes Wachstum zeigten, bleibt ungeklärt, ob sie als aerobe Keime die alleinige Ursache des Verderbs sind.

Sehr selten kommt es in Obstsaften zu einer Buttersäuregärung (LÜTHI und VETSCH 1957), wobei es jedoch fraglich ist, ob sie von *Clostridium*-Arten verursacht wird, da bei den Erregern bisher keine Sporenbildung beobachtet werden konnte.

### 3. Übersicht über die Systematik der aus Wein und Obstwein isolierten Milchsäurebakterien

Aus der Tatsache, daß sich verschiedene Bakterien in Wein entwickeln können und dabei die verschiedensten Veränderungen bewirken, ergibt sich schon allein zum Zwecke der gegenseitigen Verständigung der Experimentatoren die Notwendigkeit, die beobachteten und isolierten Bakterien zu ordnen und zu Gruppen verwandter Organismen zusammenzufassen. Darüber hinaus wird immer anzustreben sein, die Bakterien des Weines nicht als isolierte Gruppe zu betrachten, sondern sie in Beziehung mit bereits bekannten Vertretern von anderen Standorten zu setzen. Von vielen Autoren ist nun versucht worden, die Weinbakterien nach diesen Gesichtspunkten zu ordnen. Dabei ergeben sich jedoch außerordentlich große Schwierigkeiten, die vielfältige Ursachen haben (siehe auch die Übersicht von TITTLER und Mitarb. 1952).

In der Familie der *Lactobacillaceae* (Milchsäurebakterien) ist auf Grund physiologischer Eigenschaften eine Gruppe von Bakterien vereinigt (BREED und Mitarb. 1957), denen unter anderem die Fähigkeit der Vergärung von Kohlenhydraten zu Milchsäure, anaerobes oder mikroaerophiles Wachstum und hohe Ansprüche an das Nährmedium gemeinsam ist. Die heterogene Zusammensetzung der physiologischen Einheit der Milchsäurebakterien kommt dadurch zum Ausdruck, daß man die erste Unterteilung der Familie nach morphologischen Gesichtspunkten vornimmt: Die kokkenförmigen *Streptococceae* werden den stäbchenförmigen *Lactobacillaceae* gegenübergestellt. Im System von KRASSILNIKOV (1959) wird dagegen den morphologischen Eigenschaften eine größere Bedeutung beigemessen und die physiologische Gruppe der Milchsäurebakterien völlig aufgelöst, indem die kokkenförmigen Arten den *Coccales* und die stäbchenförmigen den *Mycobacteriales* zugeordnet werden.

Unabhängig von diesen mehr theoretischen Überlegungen ist gerade bei Milchsäurebakterien die Unterscheidung von kokkenförmigen oder stäbchenförmigen Keimen nicht immer leicht. Dazu kommt ferner, daß die Veränderlichkeit der Zellform von der Zusammensetzung der Nährlösung abhängig ist. Stäbchenförmige und fädige Formen werden vor allem bei niedrigem pH-Wert und hohem Gehalt an Alkohol beobachtet (LÜTHI 1957c), aber gelegentlich können auch gerade entgegengesetzte Veränderungen beobachtet werden (DUPUY 1957a). Wegen dieser schwierigen Unterscheidbarkeit wird gelegentlich die Bezeichnung „coccobacilli“ angewandt (ROGOSA und SHARPE 1959) und von SHIMWELL (1949) ist empfohlen worden, bei Milchsäurebakterien wegen der großen Variabilität der Zellmorphologie dieser nicht zu viel Wert bei der Systematik zuzumessen.

Die physiologischen oder biochemischen Eigenschaften, die zur Charakterisierung von Milchsäurebakterien herangezogen werden müssen, lassen sich leider auch nicht immer mit der wünschenswerten Sicherheit bestimmen. Auch hier ist die Wahl und Zusammensetzung des Mediums entscheidend für das Resultat, worauf besonders nachdrücklich von ROGOSA und SHARPE (1959) hingewiesen wird.

So kann man beispielsweise bei der Prüfung der Vergärung von Kohlehydraten unterschiedliche Ergebnisse erhalten, je nachdem ob ein neutrales Grundmedium oder eines mit einem pH von 5,5 — 6,0 verwendet wurde. Für den Nachweis der Bildung von Kohlendioxyd aus Kohlenhydraten (zur Unterscheidung von homofermentativen und heterofermentativen Organismen) ist die Verwendung genügend großer Einsaatmengen von kräftigen Kulturen und eine genügend hohe Konzentration an Kohlenhydrat Voraussetzung.

Das sehr wichtige Unterscheidungsmerkmal der homo- oder heterofermentativen Gärung ist allerdings auch nicht absolut konstant, denn von COOLIDGE (1951) wurde beobachtet, daß zwei heterofermentative Milchsäurebakterienstämme nach einigen Passagen in einem halbsynthetischen Medium homofermentativ wurden, also keine Kohlensäure mehr bildeten. HODGES und Mitarb. (1951) fanden an Einzelkulturen von heterofermentativen Milchsäurebakterien, daß plötzlich die Fähigkeit auftrat, Sorbit und Mannit zu vergären, daß Lakmusmilch unter Säurebildung koaguliert und reduziert wurde, die Stämme homofermentativ wurden und den Wuchsstoff Thiamin nicht mehr benötigten.

Milchsäurebakterien vermögen Nitrat infolge des Fehlens der entsprechenden Reduktasen nicht zu reduzieren. In Medien mit nur geringem Kohlenhydratgehalt (0,1 % Glucose) kann aber bei pH-Werten um pH 6 von einigen Stämmen von *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus fermenti* Nitrit aus Nitrat gebildet werden (ROGOSA 1961).

Ähnliche Beobachtungen wurden beim Nachweis des Enzyms Katalase gemacht. Die Milchsäurebakterien (*Streptococceae* und *Lactobacilleae*) sind Katalase-negativ. Bei Kultur in einem Medium mit einem Gehalt von nur 0,05 % Glucose wurde bei allen sechs untersuchten Stämmen der zu den *Streptococcaceae* gehörenden Gattung *Pediococcus* Katalase nachgewiesen (FELTON und Mitarb. 1953). Damit wird zugleich die Frage aufgeworfen, ob es sich bei diesen Stämmen um *Lactobacillaceae* oder vielleicht doch um *Micrococci* handelt.

Diese einzelnen Beispiele sollen lediglich einen kleinen Eindruck von den methodischen und taxonomischen Problemen vermitteln, die sich bei der Bearbeitung von Milchsäurebakterien ergeben. Besondere Schwierigkeiten werden durch zwei Tatsachen verursacht. Einmal neigen die heterofermentativen Milchsäurebakterien dazu, unter ungünstigen Bedingungen wie hoher Salzkonzentration, niedriger Temperatur usw., atypische Stämme hervorzubringen (PEDERSON und ALBURY 1955); zum anderen sind häufig die Angaben über die Eigenschaften eines neu isolierten Stammes unsicher oder nicht genügend vollständig. Oft werden nur wenige Stämme untersucht, wodurch die tatsächliche Variationsbreite ungenügend erfaßt wird.

Trotz der angedeuteten Schwierigkeiten sollte nun nicht etwa auf die systematische Bearbeitung von aus Wein isolierten Milchsäurebakterien verzichtet werden, indem den Keimen auf Grund vielleicht nur morphologischer Merkmale ein herkömmlicher Name zugeschrieben wird, ohne zu bedenken, daß es sich bei dem untersuchten Organismus vielleicht um eine abweichende oder gar neue Art handeln könnte; auf die Notwendigkeit einer sorgfältigen Bearbeitung von Milchsäurebakterien aus Bier — wo die Verhältnisse ähnlich sind — hat SHIMWELL (1949) nachdrücklich hingewiesen. — Da die aus Wein isolierten Milchsäurebakterien keine selbständige Gruppe von Mikroorganismen darstellen, ist es unerläßlich, diese Keime im Zusammenhang mit Keimen von anderen Standorten zu sehen. Leider werden allerdings in den systematischen Übersichten die Weinbakterien nur teilweise berücksichtigt.

Es ist das Verdienst von MÜLLER-THURGAU und OSTERWALDER (1913), das erste umfassende System der Milchsäurebakterien des Weines aufgestellt zu haben. Zweifelloso gibt dieses System auch heute noch eine gute Übersicht (SCHANDERL 1959), es wird aber den heutigen Vorstellungen der Taxonomie (TITSLER und Mitarb. 1952, SKERMAN 1949, BREED und Mitarb. 1957) nicht mehr gerecht. MÜLLER-THURGAU und OSTERWALDER (1913) ordneten die anaeroben Weinbakterien in zwei Gattungen ein: *Bacterium* und *Micrococcus*. Die Bezeichnung *Bacterium* ist heute nur eine Bezeichnung für die Zellgestalt (Stäbchen); die Gattung *Micrococcus* umfaßt nur a e r o b e Organismen.

Es ist in der letzten Zeit eine Reihe von Vorschlägen gemacht worden, wie die Klassifikation der Milchsäurebakterien aus Wein und Obstwein verbessert werden könnte (VAUGHN 1955, VAUGHN und TSCHELISTCHEFF 1957, OLSEN 1948, BIDAN 1956, DUPUY 1957a, LÜTHI und VETSCH 1959a, HOCHSTRASSER 1955, LAMBION und MESKHI 1957, RADLER 1958b, CARR 1957, 1958, 1959, INGRAHAM und Mitarb. 1960). Ein allgemein anwendbares System ist noch nicht geschaffen worden, da keiner der Bearbeiter die Möglichkeit hatte, einmal eine sehr große Zahl von Stämmen von Milchsäurebakterien von Weinen aus allen Weinbauländern der Welt vergleichend zu untersuchen. Nur auf diesem Wege wäre es vielleicht möglich, eine Übersicht über die Vielfalt der Stämme und die vorkommenden Variationsbreiten der Arten zu gewinnen. Es soll hier lediglich versucht werden, die Gesichtspunkte für die systematische Ordnung der aus Wein isolierten Milchsäurebakterien aufzuzeigen, ohne damit eine allgemein anwendbare Klassifizierung geben zu wollen.

Trotz des Vorranges der morphologischen Eigenschaften bei der Klassifizierung von Bakterien dürfte es zweckmäßig sein, die physiologische Gruppe der typischen aus Wein isolierten Milchsäurebakterien in die Familie der *Lactobacillaceae* einzureihen. Unter dieser Voraussetzung wären dann die stäbchenförmigen Organismen der Unterfamilie der *Lactobacilleae* einzuordnen und die kokkenförmigen der Unterfamilie der *Streptococceae*, sofern man Bergey's Manual (BREED und Mitarb. 1957) folgen will.

In der Unterfamilie der *Lactobacilleae* werden fünf Gattungen unterschieden: *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Catenabacterium*, *Ramibacterium*, *Cillobacterium*. Da es sich bei den aus Wein isolierten Organismen fast ausschließlich um fakultativ anaerobe oder mikroaerophile Keime handelt, dürften die stäbchenförmigen Milchsäurebakterien zur Gattung *Lactobacillus* gehören. Bei den Vertretern der anderen vier strikt anaeroben Gattungen handelt es sich meist um Organismen, die aus Leibeshöhlen, entzündetem Gewebe, Abszessen etc. isoliert worden sind. Die Gattung *Lactobacillus* umfaßt heute alle Organismen, die früher *Thermobacterium*, *Streptobacterium* und *Betabacterium* benannt wurden. Nach BREED und Mitarb. (1957) besteht kein Grund mehr, die Gattung *Lactobacillus* aufzuteilen; überdies sind zwei der alten Gattungsnamen unzulässige Synonyme.

Während also die Gattung der stäbchenförmigen Weinbakterien relativ leicht festgestellt werden kann, ist es häufig nicht möglich, die Art eindeutig zu bestimmen. Sowohl heterofermentative wie homofermentative Arten kommen im Wein vor. Häufig sind die isolierten Arten nicht ganz typisch und nehmen Zwischenstellungen zwischen beschriebenen Arten von anderen Standorten ein. Diese Erscheinung ist aber keineswegs überraschend und ist eigentlich bei so hoch spezialisierten Organismen zu erwarten (vergl. auch die Ausführung über Ökologie und Herkunft der Weinbakterien, Teil II). Die beobachteten Abweichungen beziehen sich vor allem auf die Fähigkeit der Vergärung einzelner Kohlenhydrate und das Temperaturoptimum. Bei der Häufigkeit des Auftretens „untypischer“ Milchsäurebakterien ist es eine zu diskutierende Frage, ob es zweckmäßiger ist, abweichende Bakterienstämme nur zu beschreiben (OLSEN 1948, DUPUY 1957a, BARRE und GALZY 1960, RADLER 1958b) oder ob man solche Organismen besser gleich als neue Arten oder Varietäten mit neuen Namen versehen soll (BIDAN 1956, LAMBION und MESKHI 1957, HOCHSTRASSER 1955).

Aus Wein wurden in den letzten Jahren alle bekannten heterofermentative *Lactobacillus*-Arten isoliert:

*Lactobacillus fermenti* (= *B. gayoni* und *B. intermedium* MÜLLER-THURGAU und OSTERWALDER 1913), vergärt Arabinose nicht (BIDAN 1956, FORNACHON 1957, VAUGHN 1955).

*Lactobacillus brevis*, Raffinose und häufig auch Rohrzucker und Laktose werden nicht vergoren (VAUGHN 1955, FORNACHON 1957, INGRAHAM und Mitarb. 1960).

*Lactobacillus buchneri* (= *B. mannitopoeum*) vergärt Raffinose, Rohrzucker, Laktose, Arabinose, Xylose (FORNACHON 1957, VAUGHN 1955).

*Lactobacillus pastorianus*, vergärt Raffinose, Rohrzucker, Arabinose, Mannit (aus Apfelwein, CARR 1957).

Außer diesen vier Arten sind zwei weitere Arten beschrieben worden, die sehr langsam wachsen, besondere Ansprüche an das Nährmedium stellen, sehr hohe Alkoholgehalte vertragen können und keine Trübung, sondern nur einen Bodensatz im Medium bilden. Diese beiden, bisher nicht anerkannten Arten, wurden aus verdorbenen aufgespritzten Dessertweinen isoliert.

*Lactobacillus trichodes*, fadenbildend, vergärt nur Glucose und Fructose, Äpfelsäure und Zitronensäure werden nicht angegriffen (FORNACHON und Mitarb. 1949).

*Lactobacillus hilgardii*, fadenbildend, vergärt bei pH 6,8 — 7,0 nur Fructose und d-Xylose, bei pH 4,5 — 5,5 werden außerdem Glucose, Galactose, Maltose, Lactose, Rohrzucker und Raffinose vergoren. Äpfelsäure und Zitronensäure werden stets abgebaut (VAUGHN und Mitarb. 1949).

Von DUPUY (1957a), BARRE und GALZY (1960) sind ferner weitere heterofermentative *Lactobacillus*-Stämme beschrieben worden, die sich den bekannten Arten nicht eindeutig zuordnen lassen.

H o m o f e r m e n t a t i v e Arten kommen offensichtlich weniger häufig und nur in geringer Artenzahl im Wein vor. Dies beruht allerdings vor allem darauf, daß die meisten homofermentativen Arten definitionsgemäß ihr Temperaturoptimum oberhalb von 37° haben (*Thermobacterium*), was bei den typischen Weinbakterien kaum vorkommen dürfte. Folgende homofermentative Arten konnten aus Wein, Apfelwein oder Most isoliert werden:

*Lactobacillus plantarum*, bildet inaktive Milchsäure (CARR 1957, 1958, LAMBION und MESKHI 1957, RADLER 1958b).

*Lactobacillus casei*, bildet rechtsdrehende Milchsäure (CARR 1957, 1958, OLSEN 1948).

*Lactobacillus delbrückii*, Temperaturoptimum bei 45°, bildet linksdrehende Milchsäure, Xylose, Arabinose, Lactose werden nicht vergoren (INGRAHAM und Mitarb. 1960).

Während die Zuordnung der aus Wein isolierten Milchsäurebakterien zur Gattung *Lactobacillus* recht eindeutig ist, sofern man von dem gelegentlichen Vorkommen von Katalase bei *Lactobacillus plantarum* absieht, das evtl. Beziehungen zur Gattung *Microbacterium* erkennen läßt (CARR 1959), bereitet die Klassifizierung der Kokken etwas größere Schwierigkeiten. Wie bereits ausgeführt, dürfte es am zweckmäßigsten sein, auch diese Organismen als *Lactobacteriaceae* anzusehen; innerhalb dieser Familie würden die aus Wein isolierten Kokken dann den *Streptococcaeae* angehören. Wie bei den *Lactobacillus*-Arten kommen auch bei den Kokken heterofermentative und homofermentative Arten vor. Da die „Weinkokken“ nicht obligat anaerob sind, müssen die heterofermentativen Arten zur Gattung *Leuconostoc* gerechnet werden. Alle drei als gültig anerkannten Arten dieser Gattung sind aus Wein isoliert worden:

*Leuconostoc mesenteroides*, bildet Schleim, vergärt Rohrzucker und Pentosen (BIDAN 1956, LAMBION und MESKHI 1957, VAUGHN 1955, OLSEN 1948).

*Leuconostoc dextranicum*, bildet Schleim, vergärt Rohrzucker, aber keine Pentosen (VAUGHN 1955).

*Leuconostoc citrovorum*, bildet keinen Schleim, Rohrzucker wird nicht vergoren (RADLER 1958b).

Der Schleimbildung sollte vielleicht keine zu große Bedeutung zugemessen werden, da diese Fähigkeit auch bei frisch isolierten Stämmen rasch verlorengehen kann (SHIMWELL 1949, MILLIS 1951). Die Mehrzahl der Bakterien, die in sauren Weinen den biologischen Säureabbau durchführen, dürften zur Gattung *Leuconostoc* gehören. Auch das von MÜLLER-THURGAU und OSTERWALDER (1913) beschriebene *Bacterium gracile*, dessen Name vielfach für Weinbakterien ohne nähere Überprüfung verwendet wird, dürfte eine *Leuconostoc*-Art sein (PEDERSON 1949, BREED und Mitarb. 1948, CARR 1959). Die Angabe, daß *Bacterium gracile* stäbchenförmig ist, braucht dabei gar nicht zu überraschen, da die *Leuconostoc*-Arten in saurem Milieu eine längliche Form annehmen können.

Welche Stellung die homofermentativen Kokken aus Wein in dem System der Bakterien erhalten sollen, ist noch nicht geklärt. Da sich diese Organismen nur sehr schlecht kultivieren lassen, werden sie seltener isoliert und sind daher auch weniger bekannt.

Von den homofermentativen Gattungen der Unterfamilie der *Streptococceae* kommen nur die Gattungen *Streptococcus* und *Pediococcus* für die homofermentativen, nicht parasitären Kokken in Betracht. Die Arten der Gattung *Streptococcus* bilden rechtsdrehende Milchsäure und die Arten der Gattung *Pediococcus* racemische Milchsäure. Die Unterscheidung zwischen diesen beiden Formen ist theoretisch ganz einfach, in Wirklichkeit recht mühsam und bei den oft sehr langsam wachsenden Stämmen mit geringer Säurebildung äußerst unsicher. Zur Bestimmung der optischen Drehung der Milchsäure wird diese gewöhnlich mit Aether extrahiert und dann als Zinksalz gefällt. Homofermentative Kokken aus Wein sind sowohl als *Streptococcus* und auch als *Pediococcus* beschrieben worden (BIDAN 1956, LAMBION und MESKHI 1957). Die Berechtigung der Gattung *Pediococcus* wird nun keineswegs allgemein anerkannt. So wurde von SHIMWELL (1948) erwogen, ob diese Gattung nicht überhaupt in der Gattung *Streptococcus* aufgehen sollte und DICKSCHEIT (1961 a, b) empfiehlt, die Vertreter der Gattung *Pediococcus* in die Gattung *Micrococcus* einzugliedern. Erschwerend kommt nun noch hinzu, daß Bakterien aus Wein in der Übersicht über die Gattung *Pediococcus* von PEDERSON (1949) gar nicht erwähnt worden sind; *Pediococcus*-Arten sollen aber von *Streptococcus* und *Leuconostoc* leicht zu unterscheiden sein. Von CARR (1960) wird angegeben, daß aus Apfelwein bisher keine Organismen der Gattungen *Streptococcus* und *Pediococcus* isoliert werden konnten. Es besteht offensichtlich noch keine völlige Klarheit darüber, wie die kokkenförmigen Milchsäurebakterien zu klassifizieren sind.

Wie schwierig es ist, selbst bekannte und sehr häufig verwendete Stämme systematisch einzuordnen, veranschaulicht folgendes Beispiel. Nach FELTON und NIVEN (1953) ist der Stamm *Leuconostoc citrovorum* 8081 eigentlich *Pediococcus cerevisiae* und ebenso ist der Stamm *Leuconostoc citrovorum* P 60 ein *Pediococcus* (GARVIE 1959).

Erst nach weiteren umfangreicheren Untersuchungen wird es möglich werden, eine bessere Übersicht über die systematische Ordnung der Milchsäurebakterien einschließlich der aus Wein isolierten Keime zu gewinnen. Dafür wird es unerlässlich sein, eine möglichst große Zahl von Stämmen zu untersuchen, und darüber hinaus werden wahrscheinlich weitere Merkmale, wie z. B. serologische Eigenschaften (SIERRA und McCLESKY 1956, SHARPE 1956, GÜNTHER

Tabelle 3

Wichtige Eigenschaften und Unterscheidungsmerkmale von aus Wein isolierten Milchsäurebakterien  
(Es wurden vor allem die gültigen Arten aufgeführt. Zusammengestellt nach VAUGHN (1955), BIDAN (1956), CARR (1957), RADLER (1958b), LAMBION und MESKHI (1957), OLSEN (1948), BARRE und GALZY (1960) u. a.)

Art	Zellgröße (μ)	Vergärung oder Abbau von										
		Arabinose	Xylose	Rhamnose	Mannose	Galaktose	Rohrzucker	Laktose	Maltose	Raffinose	Mannit	Äpfelsäure
Heterofermentative Stäbchen												
<i>Lactobacillus fermenti</i>	0,5 - 1 × 3 - 15	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>brevis</i>	0,7 - 1 × 2 - 4	+	+	-	+	+	- (+)	- (+)	+	- (+)	+	-
<i>buchneri</i>	0,35 × 0,7 - 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>pastorianus</i>	0,5 - 1 × 7 - 35	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>(trichodes)</i>	0,4 - 0,6 × 2 - 4	-	-	-	-	-	- (+)	-	- (+)	-	-	-
<i>(hilgardii)</i>	0,5 - 0,8 × 2 - 4	-	+	-	-	+	+	- (+)	+	- (+)	+	- (+)
Homofermentative Stäbchen												
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,7 - 1 × 3 - 8	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>casei</i> <sup>1)</sup>	0,7 × 2	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>delbrückii</i> <sup>2)</sup>	0,5 - 0,8 × 2 - 9	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
Heterofermentative Kokken												
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,9 - 1,2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>(Morphotyp I)</i>	0,48 - 0,75 × 0,58 - 0,87	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Morphotyp II</i> )	0,57 - 0,85 × 0,87 - 1,31	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>dextranicum</i>	0,6 - 1	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>citrovorum</i> <sup>1)</sup>	0,5 - 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Homofermentative Kokken												
<i>Pedococcus cerevisiae</i>	1 - 1,5	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+

<sup>1)</sup> Artzuordnung unsicher;

<sup>2)</sup> nach BREED und Mitarb. (1957).

und WHITE 1961a,b), Infrarotspektroskopie (GOULDEN und SHARPE 1958), Zusammensetzung der Zellwandbestandteile (KANDLER und HUND 1959) herangezogen werden müssen.

Zur Vermittlung einer Übersicht über die aus Wein isolierten Milchsäurebakterien und deren Eigenschaften sind diese in Tabelle 3 zusammengefaßt. Aus Raumgründen sind dabei nur die Merkmale angeführt, in denen sich die einzelnen Stämme voneinander unterscheiden. Gemeinsam ist allen Stämmen, daß sie mikroaerophil, Gram-positiv und fast ausschließlich Katalase-negativ sind, Nitrat nicht zu Nitrit reduzieren, Glucose und Fructose unter Säurebildung vergären und besondere Ansprüche an die Zusammensetzung des Nährmediums stellen. Die Mehrzahl der Stämme neigt zur Bildung von kurzen oder langen Zellfäden, besonders in saurem Milieu.

In der Tabelle 3 sind nur Arten aufgeführt, die aus Wein, Most oder Obstwein isoliert worden sind. Es sind dabei vor allem die gültigen Arten berücksichtigt worden, und es wurde bewußt darauf verzichtet, sogenannte untypische Stämme in großer Zahl mit anzuführen. Es wurde auch nicht der Versuch gemacht, die oft unvollständigen Angaben älterer Autoren zu berücksichtigen.

#### D. Chemische Grundlagen

##### 1. Die Zusammensetzung des Mostes und Weines sowie die chemischen Veränderungen während Gärung und biologischem Säureabbau

Zum Verständnis der bakteriellen Vorgänge im Wein ist eine möglichst gründliche Kenntnis der bakteriellen Zusammensetzung von Most und Wein eine unabdingbare Voraussetzung. Als Naturprodukte bestehen Most und Wein aus einer sehr großen Zahl von organischen und anorganischen Verbindungen, von denen viele nur in sehr geringen Mengen vorkommen und bisher nur zum Teil bekannt sind. Eine eingehende Darstellung würde den Rahmen dieser Übersicht sprengen. Es sei daher auf die umfangreichen und ausführlichen Darstellungen von AMERINE (1954, 1958) verwiesen; unter Verwendung dieser Angaben und Werte von CASTOR (1953c), LAFON-LAFOURCADE und PEYNAUD (1961) soll hier lediglich eine tabellarische Übersicht über die in Traubenmost und Wein vorkommenden Stoffe und deren Mengen (Extremwerte) gegeben werden, soweit ihr Vorkommen eine Bedeutung für die Bakterien im Wein hat. Leider war es dabei nicht möglich, die in Most und Wein gefundenen Gehalte gesondert anzugeben.

##### A. Organische Bestandteile

1. Alkohole und verwandte Verbindungen: a) Äthylalkohol (8-24 Vol-%), b) Geringe Mengen von Methylalkohol, Fuselölalkoholen, Glycerin, 2,3-Butylenglycol. c) Acetyl-methylcarbinol und Diacetyl (0-30 mg je Liter).
2. Aldehyde und verwandte Verbindungen: a) Acetaldehyd (3-500 mg je Liter), b) Spuren von Acetal, Aceton, Benzaldehyd, Hydroxymethylfurfural, Acrolein.
3. Säuren: a) Weinsäure (0,7-4,5 g je Liter) b) Äpfelsäure (2-12 g je Liter), c) Zitronensäure (0-0,6 g je Liter), d) Bernsteinsäure (0,05-2 g je Liter), e) Milchsäure (0-6,1 g je Liter), f) Geringe Mengen von Ameisensäure, Buttersäure, Citramalsäure, Essigsäure, Gluconsäure, Glucuronsäure, Glyoxylsäure, g) pH-Wert (2,76-4,40).
4. Kohlenhydrate und ähnliche Verbindungen: a) Glucose und Fructose (Hauptbestandteil in Traubenmost), b) Arabinose (0,5-1,3 g je Liter), c) Rhamnose (0,15-0,3 g je Liter). Rohrzucker wird Traubenmost falls erforderlich zugesetzt; der natürliche Gehalt ist in den Trauben von *Vitis vinifera*-Sorten sehr gering.

5. Sonstige Verbindungen: a) Ester und andere Aromastoffe, b) Polyhydroxyphenole Tannine 0,01-4,1 g je Liter, Rotweinfarbstoffe = Anthocyane, Anthocyanidine, Chlorogensäure.
6. Stickstoffverbindungen: a) Aminosäuren in mg je Liter:
  - a) Alanin (10-33), Arginin (70-1,100), Asparaginsäure (12-99), Cystin (2-15), Glutaminsäure (40-680), Glycin (3-38), Histidin (3-143), Isoleucin (9-100), Leucin (1-81), Lysin (0-30), Methionin (1,5-18), Phenylalanin (2,0-78), Prolin (430-500), Serin (36-54), Threonin (62-240), Tryptophan (4,1-64), Tyrosin (10-46), Valin (19-88).
  - b) Geringe Mengen von Proteinen, Proteiden und ähnlichen Verbindungen.
7. Vitamine und ähnliche Wirkstoffe in  $\mu\text{g}$  je Liter: a) Vitamin A (5), b) Thiamin (7-300), c) Riboflavin (68-220), d) Pyridoxin (300-2900), e) Pantothensäure (300-3400), f) p-Aminobenzoesäure (50-200), g) Nicotinsäure (1800-8800), h) Cobalamin (0-0,002), i) Biotin (1-60), j) Inosit (400 000).

#### B. Anorganische Bestandteile (mg je Liter).

1. Kationen: Al (0,3-1,5), As (0-4), Ca (6-214), Cu (0,04-34), Fe (0-350), Pb (0-0,9), Mg (45-165), Mn (0,4-15), K (100-1700), Na (5-443) sowie Spuren von weiteren Elementen.
2. Anionen:  $\text{CO}_2$  (Gehalt abhängig von Temperatur und Druck, 0-20 000), Cl (11-600), Phosphat (26-900), Sulfat (70-4400, als K-Salz), schweflige Säure (je nach Zusatz) sowie geringe Mengen von weiteren Anionen.

## 2. Analysenmethoden zur Untersuchung des biologischen Säureabbaus

Die wichtigsten bakteriellen Stoffwechsellätigkeiten in Wein sind Bildung oder Umbau von organischen Säuren. Es ist daher eine Voraussetzung für viele Untersuchungen, daß Methoden verfügbar sind, diese Säuren *quantitativ* zu bestimmen. Leider sind die in Most und Wein vorkommenden Karboxylsäuren wenig reaktionsfähig; da sie keine spezifisch reagierende Gruppen enthalten, sind die Bestimmungen recht schwierig. Besonders die Bestimmung der Äpfelsäure war bisher langwierig und unsicher, so daß deren Abbau häufig nur an der Verringerung des Gehaltes an freier Säure gemessen werden konnte.

Einen wesentlichen Fortschritt brachte die *Papierchromatographie*, die sich vorzüglich zum Nachweis und zur Bestimmung der Säuren während des Abbaus eignet (RIBEREAU-GAYON 1953, LÜTHI 1957b, ZICKLER 1956). Die Papierchromatographie konnte inzwischen soweit vereinfacht werden, daß sie sogar zur Betriebskontrolle beim Weinausbau angewendet werden kann.

Von RENTSCHLER (1948) wurde zuerst auf die Möglichkeit hingewiesen, Äpfelsäure *manometrisch* mit Äpfelsäure-abbauenden Bakterien zu bestimmen. Für eine Bestimmung wurden 20-50 ml Wein neutralisiert (pH 5), auf 5-10 ml eingengt und das Zentrifugat einer Reinkultur eines aus Wein isolierten Äpfelsäure-abbauenden Bakteriums zugesetzt. Die  $\text{CO}_2$ -Mengen wurden in einem einfachen Manometer gemessen und daraus die Äpfelsäure errechnet. Eine ähnliche manometrische Methode zur Bestimmung von L-Äpfelsäure wurde von BLANCHARD und Mitarb. (1950) beschrieben, wobei die mögliche Störung der Bestimmung durch Fumarsäure und Brenztraubensäure berücksichtigt wurde. Es wurde für die Bestimmung das Milchsäurebakterium *Lactobacillus plantarum* verwendet, das adaptiv das Äpfelsäure spaltende „malic enzym“ bildet. Von NOSSAL (1952) wurde diese Bestimmungsmethode weiter verbessert, so daß sogar eine fast 100%ige Ausbeute an  $\text{CO}_2$  erzielt werden konnte. Zur Gewinnung des enzymhaltigen Bakterienpräparates wird der Stamm *Lactobacillus arabinosus* 17-5 (= *L. plantarum*) in einem komplexen Medium bei Gegenwart von 0,1 mol D,L-Malat vorkultiviert. Nach 12stündigem Wachstum erfolgt ein neuer Zusatz von 0,1 mol D,L-Malat. Die Zellen werden nach weiteren 12 Stunden bei 30° mit Wasser gewaschen und mit 0,1 n Kaliumchloridlösung wird eine 20%ige Zellsuspension

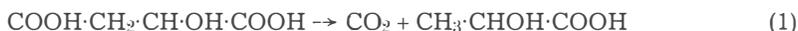
(Frischgewicht) hergestellt. 1 mg Trockenmasse dieser Zellen vermag in einer Stunde etwa 1 mg Äpfelsäure zu dekarboxylieren.

Auch die rein chemischen Bestimmungsmethoden sind wesentlich verbessert worden. Für die Milchsäure wurde von HULLIN und NOBLE (1953) eine verbesserte Vorschrift zur raschen quantitativen Bestimmung angegeben. Milchsäure reagiert mit conc. Schwefelsäure und p-Hydroxydiphenyl unter Bildung einer violetten Farbe, die bei 560 m $\mu$  kolorimetrisch gemessen werden kann.

CORDONNIER und BIZEAU (1959) geben eine Übersicht über die chemischen Methoden der Äpfelsäurebestimmung: Chemische Fällungen, Polarimetrie, Colorimetrie, Chromatographie auf Papier, Silicagel oder Kieselgur, sowie die Trennung mit Ionenaustauschern. Besonders die letztgenannte Trennungsmethode wurde neuerdings für die Weinanalytik angewandt. Nach CORDONNIER und BIZEAU (1960) können Milchsäure, Bernsteinsäure und Äpfelsäure auf folgende Weise getrennt und bestimmt werden: Die Säureanionen werden zunächst auf eine Anionenaustauschersäule gebracht und dann mit 0,75 m Ameisensäurelösung fraktioniert eluiert. Die Ameisensäure wird durch Eindampfen entfernt und die getrennten Säuren werden titrimetrisch bestimmt. REBELEIN (1961) trennt bei der Bestimmung von Weinsäure und Milchsäure zunächst die Zucker-, Farb- und Gerbstoffe ab, indem die Säuren auf einer basischen Austauschersäule (in Acetatform) festgehalten werden. Die Säuren werden dann mit 7,1% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung eluiert. Im Eluat wird die Weinsäure nach Zugabe von Ammoniummetavanadat bei 530 m $\mu$  kolorimetrisch bestimmt; Milchsäure wird mit Cer(IV)-sulfat zu Acetaldehyd oxydiert und dieses mit Nitroprussidnatrium und Piperidin umgesetzt und bei 570 m $\mu$  kolorimetriert.

### 3. Die enzymatischen Vorgänge beim biologischen Säureabbau

Bald nach der Beobachtung des nicht durch Weinsteinfällung bedingten Säurerückgangs im Wein wurde erkannt, daß diese Erscheinung auf der Dekarboxylierung der Äpfelsäure zu Milchsäure beruht (SEIFRT 1901):



Zunächst blieb unberücksichtigt, daß die Formel (1) nur die Bruttoreaktion wiedergibt. Biochemische Untersuchungen an anderen Organismen führten später zu wesentlichen Erweiterungen der Kenntnisse über den Reaktionsablauf des Abbaus der Äpfelsäure.

Von KRAMPITZ und WERKMAN (1941) wurde in *Micrococcus lysodeikticus* ein Enzym nachgewiesen, das Oxalessigsäure zu Brenztraubensäure dekarboxyliert.



Da Äpfelsäure durch das bekannte Enzym Äpfelsäuredehydrogenase leicht zu Oxalessigsäure oxydiert werden kann und Brenztraubensäure wiederum durch Milchsäurehydrogenase leicht zu Milchsäure reduziert wird, war damit eine Reaktionsfolge aufgefunden worden, nach der auch der anaerobe Äpfelsäureabbau im Wein ablaufen könnte. Die Wasserstoffübertragung müßte dabei durch ein Coenzym (DPN oder TPN) übernommen werden:



Von *Micrococcus lysodeikticus* wurde Äpfelsäure unter anaeroben Bedingungen nicht dekarboxyliert. Die Dekarboxylierung der Oxalessigsäure wurde nur von Zellen bewirkt, die mit Aceton getrocknet worden waren; intakte Zellen waren für Oxalessigsäure nicht permeabel. — Isolierte Oxalessigsäuredekarboxylase, Äpfelsäuredehydrogenase und Milchsäuredehydrogenase bewirken jedoch wegen der ungünstigen Lage des Gleichgewichtes auch bei gleichzeitiger Einwirkung der drei Enzyme keine Dekarboxylierung von Äpfelsäure zu Milchsäure. Das Reaktionsgleichgewicht von (2) und (3) liegt nämlich in beiden Fällen in Richtung auf die Umsetzung der Oxalessigsäure. In Reaktion (2) wird also Oxalessigsäure reduziert und in Reaktion (3) wird Oxalessigsäure dekarboxyliert. Es kommt also nicht zu einer für den Reaktionsablauf (3 und 2) notwendigen Bildung von Oxalessigsäure; die verwendeten Enzympräparate vermögen daher auch gemeinsam die Dekarboxylierung der Äpfelsäure nicht zu bewirken.

EVANS und Mitarb. (1943) beobachteten, daß Kohlendioxyd von Taubenleber in größeren Mengen fixiert wird und von OCHOA und Mitarb. (1947) wurde in Taubenleber ein Enzym nachgewiesen, das Äpfelsäure direkt zu Brenztraubensäure dekarboxylieren kann:



Zur Unterscheidung von Äpfelsäuredehydrogenase wurde dieses Enzym „malic enzyme“ = Äpfelsäureenzym genannt. Dieses Enzym konnte auch in dem Milchsäurebakterium *Lactobacillus arabinosus* Stamm 17-5 (= *L. plantarum*) nachgewiesen werden (KORKES und OCHOA 1948).

Wie bereits ausgeführt wurde, gilt *Lactobacillus plantarum* u. a. als Erreger des biologischen Säureabbaus. Präparate dieses Bakteriums setzen Äpfelsäure quantitativ zu Milchsäure und Kohlensäure um; die zunächst entstehende Brenztraubensäure (Reaktion 5) wird sofort von gleichzeitig anwesender Milchsäuredehydrogenase zu Milchsäure reduziert (Reaktion 4). Während bei dem Enzym aus Taubenleber TPN als Cofaktor dient, benötigt das Äpfelsäureenzym aus *Lactobacillus plantarum* DPN. In beiden Fällen wird außerdem  $\text{Mn}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  benötigt, siehe auch Tabelle 4, (OCHOA 1952).

Tabelle 4

Bestandteile des Äpfelsäureenzymsystems von *Lactobacillus plantarum*

Messung der  $\text{CO}_2$ -Entwicklung im Warburgapparat; 0,15 m Phosphatpuffer,

$1,85 \times 10^{-3}$  m  $\text{MnCl}_2$ ,  $1,1 \times 10^{-4}$  m DPN, 0,5 ml dialysierter Enzymextrakt

(4,5 mg Protein), Gesamtvolumen 2,7 ml; Luft, 25°

Zusätze	$\text{CO}_2$ -Entwicklung in 10 Minuten ( $\text{mm}^3$ )	
	0,04 m L-Äpfelsäure (pH 6,0)	0,03 m Oxalessigsäure (pH 4,5)
Vollständiges System	146	
ohne Phosphat	110	156
ohne $\text{MnCl}_2$	16	12
ohne DPN	20	165
TPN anstelle von DPN	25	

Von den Äpfelsäureenzympräparaten aus *Lactobacillus plantarum* wird sowohl L-Äpfelsäure wie auch Oxallessigsäure dekarboxyliert. Die Unterscheidung und Differenzierung von Äpfelsäureenzym und Oxallessigsäure-dekarboxylase ist daher schwierig. Den Präparaten fehlt jedoch die Äpfelsäuredehydrogenaseaktivität: Oxallessigsäure wird nämlich auch bei Gegenwart eines Überschusses von  $\text{DPNH}_2$  nicht zu Äpfelsäure reduziert. — Von den Äpfelsäureenzympräparaten wird stets Äpfelsäure und auch Oxallessigsäure oxydativ zu Brenztraubensäure dekarboxyliert. Die Aktivität beider Enzyme bleibt jedoch bei weiterer Reinigung im gleichen Verhältnis. Mit Hilfe von  $^{14}\text{C}$ -markierter  $\text{CO}_2$  konnte nachgewiesen werden, daß Oxallessigsäure bei der Äpfelsäureenzym-Reaktion (5) nicht auftritt. Außerdem wurde nachgewiesen, daß das Äpfelsäureenzym ein Aktivitätsmaximum bei pH 6,0 und Oxallessigsäuredekarboxylase ein Aktivitätsmaximum bei pH 4,5 hat, siehe Abb. 2. Darüber hinaus benötigt Oxallessigsäurehydrogenase im Gegensatz zum Äpfelsäureenzym keine Pyridinnucleotide als Cofaktoren. Es kann demnach als sicher gelten, daß die Reaktionen (3) und (5) voneinander unabhängig sind. Die Enzymwirkgruppen sind jedoch wahrscheinlich an das gleiche Protein gebunden.

Das Äpfelsäureenzym konnte nicht nur aus Taubenleber (SALLES und OCHOA 1950) und *Lactobacillus plantarum* (KORKES und Mitarb. 1950) isoliert werden, sondern es scheint als lösliches Enzym im Gewebe höherer Pflanzen weit verbreitet zu sein. Von CONN und Mitarb. (1949) wurde es in Weizenkeimen, Rüben, Spinat, Karotten, Selleriewurzeln, Pastinake und Erbsen nachgewiesen. Der Nachweis in höheren Pflanzen

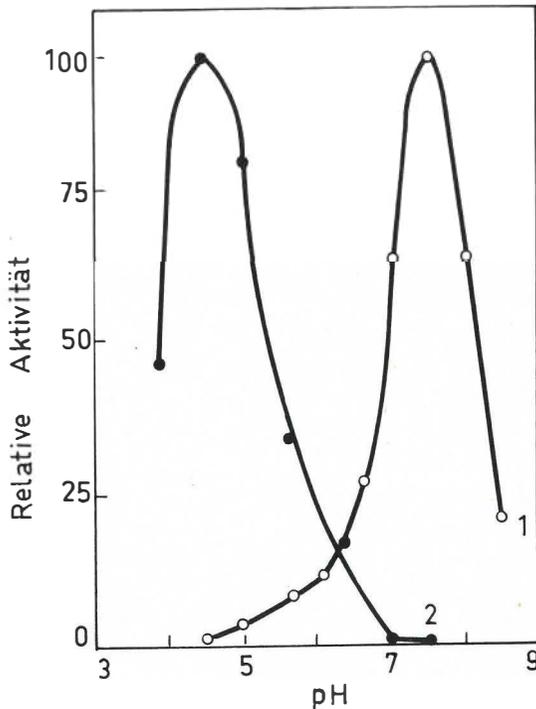


Abb. 2: Die Aktivität von Äpfelsäureenzym (1) und Oxallessigsäuredekarboxylase (2) in Abhängigkeit vom pH-Wert

wird allerdings häufig durch die Gegenwart von TPN-inaktivierenden Enzymen stark behindert und ist häufig nur möglich, wenn diese Faktoren durch Zusatz von ATP, DPN und Adenylsäure gehemmt werden.

Die Bestimmung der Aktivität des Äpfelsäureenzymes bei *Lactobacillus plantarum* erfolgt durch Messung der Kohlendioxydbildung aus L-Äpfelsäure bei Gegenwart von DPN und  $\text{Mn}^{2+}$  (OCHOA 1952).

Das Reaktionsgemisch besteht aus 0,08 m Phosphatpuffer, pH 6,0, 0,002 m  $\text{MnCl}_2$ ,

$1,2 \times 10^{-4}$  m DPN, 0,06 m L-Malat, pH 6,0 und Enzymlösung. Das Gesamtvolumen ist 1 ml, die Reaktion wird in 6 ml Warburggefäßen ausgeführt. Nach Temperaturengleich ( $25^\circ$ ) wird die Enzymlösung vom Seitenarm zugekippt und die Kohlendioxidbildung alle 5 Minuten abgelesen. Eine Enzymeinheit wurde willkürlich festgesetzt als die Menge Enzym, die  $1 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2$  in 10 Minuten freisetzt, berechnet aus der  $\text{CO}_2$ -Entwicklung während der zweiten fünf Minuten nach Zugabe des Enzymes.

Zur Isolierung des Äpfelsäureenzymes aus *Lactobacillus plantarum* werden zunächst die Zellen durch Zentrifugieren gewonnen, nach 24stündigem Wachstum bei  $30^\circ$  in einem Medium, das folgende Zusammensetzung hat: 20 g D,L-Äpfelsäure, 20 g Glucose, 10 g Hefeextrakt, 10 g Bouillonpulver, 10 g Natriumacetat ( $3\text{H}_2\text{O}$ ), 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 ml Salzlösung B und  $5 \mu\text{g}$  Biotin je Liter, pH 6,8. Die Bakterienmasse wird mit wenig destilliertem Wasser aufgeschlämmt, abgekühlt und im 10fachen Volumen Aceton von  $-10^\circ$  2 Minuten lang im Homogenisator mazeriert. Der Zellbrei wird abgesaugt, mit wenig Aceton gewaschen und bei Zimmertemperatur getrocknet. Das Pulver wird fein gemahlen, es ist im Eisschrank ein Jahr lang haltbar. Zur Enzymanreicherung werden folgende Schritte im Kühlraum durchgeführt: 1. Extraktion mit 0,02 m Phosphatpuffer pH 7,0, 2. Ammoniumsulfatfällung des Extraktes; der Niederschlag bei 50-100%iger Sättigung wird in 0,02 m Phosphatpuffer aufgenommen und dialysiert, 3. Fällung von Nucleinsäuren und inaktivem Protein mit Protamin, 4. Entfernung von inaktivem Protein durch Adsorption an Calciumphosphatgel, 5. Ammoniumsulfatfällung und 6. Adsorption an Calciumphosphatgel. Es wurde eine etwa 20fache Anreicherung bei einer spezifischen Aktivität von 1800 Einheiten je ml Lösung bei einem Gehalt von 0,7 mg Protein je ml erreicht.

Von dem Äpfelsäureenzym wird nur L-Äpfelsäure dekarboxyliert. D-Äpfelsäure wird nicht angegriffen und stört auch nicht die Dekarboxylierung der L-Äpfelsäure (OCHOA 1952). JERCHEL und Mitarb. (1956) beobachteten dagegen, daß nach 3monatigem Wachstum von „*B. gracile*“ in einem komplexen Medium 0,9 g D,L-Äpfelsäure restlos abgebaut werden können. SCHMIDT (1959) und SCHMIDT und Mitarb. (1962) fanden ebenfalls, daß eine geringe Menge von D-Äpfelsäure von intakten Zellen von einem aus Wein isolierten Milchsäurebakterium dekarboxyliert werden kann.

Die Dekarboxylierung der Äpfelsäure ist reversibel. Unter geeigneten Bedingungen kann Brenztraubensäure unter Reduktion zu Äpfelsäure karboxyliert werden (OCHOA und Mitarb. 1950). Das Gleichgewicht der Äpfelsäureenzymreaktion des Enzymes aus *Lactobacillus plantarum* konnte bisher nicht bestimmt werden, da dieses Enzym nicht von der gleichzeitig anwesenden Milchsäuredehydrogenase getrennt werden konnte. Aus Weizenkeimen gelang es jedoch, Äpfelsäureenzym zu isolieren, das frei von Milchsäuredehydrogenase war (HARARY und Mitarb. 1953). Für dieses — zum Unterschied von *Lactobacillus plantarum* — TPN-abhängige Enzym ist bei pH 7,4 und  $22-25^\circ$ :

$$K = \frac{(\text{L-Malat}^2) (\text{TPN}^+)}{(\text{Pyruvat}) (\text{CO}_2) (\text{TPNH})} = 19,6 (\text{Liter} \cdot \text{mol}^{-1})$$

Bei pH 7,0 und  $22^\circ$  in einer Atmosphäre von 5%  $\text{CO}_2$  und bei gleichen Konzentrationen von TPN und TPNH sind  $3,5 \cdot 10^2$  m Malat im Gleichgewicht mit 1 m Pyruvat. Es ist durchaus möglich, daß das Gleichgewicht der Reaktion des Äpfelsäureenzymes aus *Lactobacillus arabinosus* ähnlich liegt, doch wird in diesem Fall die entstehende Brenztraubensäure sofort zu Milchsäure reduziert werden.

In energetischer Hinsicht ist der Abbau der Äpfelsäure zu Milchsäure eine exergonische Reaktion, die ohne Energiezufuhr ablaufen kann (SCHMIDT 1959). Die freiwerdende Energie ist jedoch so gering, daß die Bakterien keinen nennenswerten Energiegewinn erzielen können (siehe auch Teil II).

Wie von BLANCHARD und Mitarb. (1950) beobachtet worden war, handelt es sich bei dem Äpfelsäureenzym von *Lactobacillus plantarum* nicht um ein konstitutives, sondern um ein adaptives Enzym. Das Enzym ist also in „normalen“ Zellen nicht oder nur in sehr geringer Aktivität nachweisbar und wird nur bei Gegenwart von Äpfelsäure gebildet. Durch Äpfel-

säure wird die Bildung des Äpfelsäureenzym induziert, beim Fehlen von Äpfelsäure kommt es wieder zu einer Deadaptation. Die Steigerung der Aktivität des Äpfelsäureenzym erfolgt also nicht durch Mutation oder Selektion der Bakterienzellen, sondern durch Biosynthese des Enzyms. Das Problem der Enzyminduktion und -bildung ist von großem theoretischem Interesse. Deshalb ist auch das adaptive Äpfelsäureenzym der Milchsäurebakterien sehr intensiv bearbeitet worden.

Nach den Angaben von DUERRE und LICHSTEIN (1961) ist das Äpfelsäureenzym induzierbar in folgenden Milchsäurebakterien: *Lactobacillus arabinosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrückii*, *Leuconostoc mesenteroides* und *Streptococcus faecalis*. Es ist daher anzunehmen, daß dieses Enzym auch in Milchsäurebakterien, die aus Wein isoliert wurden, nur adaptiv vorkommt. Möglicherweise kommen allerdings bei heterofermentativen Milchsäurebakterien aus Wein auch konstitutive Äpfelsäure-abbauenden Enzyme vor (CARR, FLESCHE, persönl. Mitteilungen).

Für die optimale adaptive Bildung von Äpfelsäureenzym benötigt *Lactobacillus plantarum* Äpfelsäure, Kohlenhydrate und die normalen Bestandteile des Mediums, d. h. Vitamine, Aminosäuren, Mineralsalze (BLANCHARD und Mitarb. 1950). Unter den angegebenen Bedingungen können die Bakterien sich vermehren; aber es sollen auch ruhende Zellen zur adaptiven Enzymbildung befähigt sein. Biotinmangelzellen haben eine niedrigere Aktivität an Äpfelsäureenzym. Durch einen Biotinzusatz wird die Aktivität von Enzympräparaten oder ruhenden Zellen jedoch nicht erhöht. Biotin ist weder eine prosthetische Gruppe noch ein Bestandteil einer solchen Gruppe des Äpfelsäureenzym, das Biotin gar nicht enthält.

DUERRE und LICHSTEIN (1961) fanden, daß Biotin für die Induktion von Äpfelsäureenzymen bei *Lactobacillus plantarum* erforderlich ist, dagegen von *Lactobacillus casei* nicht benötigt wird. In Übereinstimmung damit hemmt Homobiotin die Induktion bei *Lactobacillus plantarum* und ist ohne Einfluß auf *Lactobacillus casei*. Adenin vermag Biotin bei *Lactobacillus plantarum* für die Enzyminduktion zu ersetzen und kann die Induktionshemmung von Homobiotin aufheben. Es wird daher angenommen, daß die Wirkung von Biotin bei der Induktion des Äpfelsäureenzym auf einer bisher unbekanntem Beteiligung dieses Enzym bei der Synthese von Purinen beruht. Zu einem ähnlichen Resultat kommen ABLES und Mitarb. (1961). Der Biotinbedarf für die adaptive Enzymbildung von Biotinmangelzellen von *Lactobacillus plantarum* kann durch Asparagin oder besser durch Glycylasparagin oder Glutamylasparagin gedeckt werden, jedoch nicht durch Asparaginsäure. Durch die Gegenwart von Biotin und einem Asparaginpeptid wird die Enzymbildungsgeschwindigkeit gesteigert, was auf das Vorhandensein von zwei Synthesewegen zu einer gemeinsamen Zwischenstufe für die Enzymbildung hindeutet. In Übereinstimmung damit hemmt Asparaginsäure die Biotinwirkung für die Induktion, jedoch nicht die Wirkung von Glycylasparagin. Es wird angenommen, daß Asparaginsäure die Bildung oder Aktivität eines Enzym hemmt, das für die Synthese einer 4-Kohlenstoffverbindung erforderlich ist. Zellen, die in einem oleathaltigen, biotinfreiem Medium vorkultiviert wurden, vermögen Asparaginsäure für die Synthese von Äpfelsäureenzym zu verwerten; ebenso wird Asparaginsäure von Biotinmangelzellen verwertet, wenn diese vor der eigentlichen Induktion bei Abwesenheit von Äpfelsäure in das Induktionsmedium gebracht werden. Biotin wirkt offensichtlich bei der Synthese von 4-Kohlenstoffverbindungen mit und wird von den Zellen zur adaptiven Bildung von

Äpfelsäureenzym lediglich benötigt, weil exogene Asparaginsäure von den Zellen unter einigen Bedingungen nicht verwertet werden kann. PLAUT (1961) fand, daß Zellen von *Lactobacillus arabinosus* in einem biotinfreien Medium ebenso gut wie bei Gegenwart von Biotin wachsen, wenn Tween 80 und D,L-Aspartat vorhanden sind. Unterschiede bei der induktiven Bildung von Äpfelsäureenzym wurden nicht beobachtet. Jedoch wurde  $^{14}\text{CO}_2$  von Zellen, die im biotinfreien Medium gewachsen waren, nur in geringem Umfang eingebaut.

Der Stoffwechsel von Vitamin-Mangelzellen ist allgemein etwas gestört; diese Zellen haben häufig eine geringere Äpfelsäureenzymaktivität (NATHAN 1961). Ein Mangel an Pantothersäure oder Pyridoxin führt jedoch nicht zu einer Verminderung der Dissimilation von Äpfelsäure (BLANCHARD und Mitarb. 1950). Durch einen Mangel an Vitamin B<sub>6</sub> (Pyridoxin) wird der Aminosäurebedarf der Zellen für die Induktion erhöht. Bei Vitamin-B<sub>6</sub>-Mangel werden von *Lactobacillus plantarum* von 18 Aminosäuren nur Prolin und Cystein für die Enzyminduktion nicht benötigt (DEAL und LICHTSTEIN 1961). Nikotinsäuremangelzellen haben eine verringerte Aktivität an Äpfelsäureenzym, was durch die Notwendigkeit des Nikotinsäure-haltigen Kofaktors DPN bedingt ist, siehe Tabelle 4. Bei Gegenwart von Glucose führt jedoch Nikotinsäurezusatz zur Wiederherstellung der Äpfelsäureenzymaktivität.

Überraschend ist die Beobachtung von NATHAN (1961), daß bei p-Aminobenzoesäuremangel eine erhöhte Aktivität der Zellen von *Lactobacillus plantarum* an Äpfelsäureenzym vorkommt. Durch den Hemmstoff Chloramphenicol wird die Synthese von Äpfelsäureenzym in normalen Zellen stärker als in p-Aminobenzoesäure-Mangelzellen gehemmt. Zellen, bei denen der p-Aminobenzoesäuremangel durch Zusatz von Methionin und Thymin aufgehoben wird, reagieren wie normale Zellen. Adeninmangel bewirkt wie p-Aminobenzoesäuremangel eine Erhöhung der Äpfelsäureenzymaktivität, jedoch gehen Adeninmangelzellen im Gegensatz zu p-Aminobenzoesäuremangelzellen in ihrem Verhalten zu normalen Zellen über, wenn während der Enzyminduktion Adenin zugesetzt wird. Es wird vermutet, daß es bei einem Mangel an p-Aminobenzoesäure auch bei Abwesenheit von Äpfelsäure zur Bildung von Vorstufen von Äpfelsäureenzym kommt, die dann auch bei Gegenwart des Hemmstoffes Chloramphenicol zu Äpfelsäureenzym synthetisiert werden können. Bei einem Zusatz von Adenin während der Induktion sollen diese Vorstufen dagegen nicht mehr zur Enzymsynthese verwendet werden können und das Enzym wird dann wie bei normalen Zellen aus freien Aminosäuren aufgebaut.

Wichtiger als die B-Vitamine, deren Wirkung auf die Enzyminduktion nicht unter allen Versuchsbedingungen festgestellt werden kann, sind die Aminosäuren. Nach BOCKS (1961) sind bei *Lactobacillus plantarum* für die optimale Induktion des Äpfelsäureenzym 11 Aminosäuren erforderlich und zwar je 25 mg je 100 ml Medium: L-Arginin, L-Cystein, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Methionin, D,L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Tyrosin und D,L-Valin. Außerdem werden je 10 mg Adeninsulfat, Guanin, Thymin und Uracil je 100 ml Medium benötigt. Getrennt hatten Aminosäuren und Purine eine geringere Wirkung. Ein Vitaminzusatz hatte keinen Einfluß, was vermutlich darauf zurückgeführt werden kann, daß keine Mangelzellen, sondern Zellen aus einem vollständigen Medium für die Enzyminduktion verwendet wurden.

Nach DEAL und LICHTSTEIN (1961) ist der Aminosäurebedarf für Wachstum und Induktion sehr ähnlich, so daß die Untersuchung der Induktion von Äpfelsäureenzym als Basis für die Bestimmung des Bedarfs und der Stoffwechselfunktion von Aminosäuren und Vitaminen geeignet ist. Im Auslassungstest ergab das Fehlen einer der folgenden Aminosäuren bei der Äpfelsäureenzym-

induktion bei *Lactobacillus plantarum* eine Verringerung der CO<sub>2</sub>-Bildung aus Äpfelsäure (= Enzymaktivität) um mehr als 10 %: L-Serin, L-Methionin, L-Histidin, L-Arginin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Tyrosin, L-Glutaminsäure. Es bestehen jedoch auch Unterschiede für den Aminosäurebedarf zum Wachstum und zur Induktion. So ist Histidin im Auslassungstest für die Enzyminduktion erforderlich, für das Wachstum nicht. Andererseits werden Cystein und Threonin zum Wachstum, aber nicht zur Induktion benötigt. Für die Induktion kann Arginin durch Citrullin, aber nicht durch Ornithin ersetzt werden; L-Glutaminsäure hat die gleiche Wirkung wie D-Glutaminsäure. Indol vermag das Fehlen von Tryptophan teilweise auszugleichen. IFLAND und SHIVE (1956) fanden, daß auch das Fehlen von Asparaginsäure im Inkubationsgemisch die induktive Bildung von Äpfelsäureenzym vermindert. Dementsprechend hemmen auch die Asparaginsäure-Analogen Cysteinsäure und  $\beta$ -Hydroxyasparaginsäure die Enzymbildung. Aus Versuchen über die Enthemmung mit Asparaginsäure, Glycylasparagin und Asparagin konnte abgeleitet werden, daß die Verwertung des Peptids für die Enzymsynthese nicht über die freien Aminosäuren erfolgt.

Die induktive Bildung des Äpfelsäureenzym ist eine außerordentlich komplizierte Folge von chemischen Umsetzungen. Unter den Bedingungen der Induktion wird von den Bakterienzellen nicht nur Protein, sondern auch Ribonucleinsäure neu gebildet (DUERRE und LICHSTEIN 1961), wobei das Verhältnis Protein : Ribonucleinsäure keine wesentliche Verschiebung erfährt. Bei Abwesenheit von exogenen Purinderivaten konnte beobachtet werden, daß bei der induktiven Enzymbildung zunächst ein geringer Abbau zelleigener Ribonucleinsäure erfolgt; nach erneutem Aufbau erscheint das Enzym. Bei *Lactobacillus casei*, der eine längere Induktionszeit benötigt, konnte nachgewiesen werden, daß bei der Induktion die Synthese von Ribonucleinsäure der Proteinsynthese vorangeht.

Beim Wachstum von Milchsäurebakterien im Wein wird die adaptive Bildung des Äpfelsäureenzym sicher ebenso ablaufen wie in Modellnährlösungen. Da die Enzyminduktion fast ausnahmslos erfolgen kann, wenn die Bakterien zum Wachstum geeignete Bedingungen vorfinden, werden im Wein stets nur Milchsäurebakterien vorkommen, bei denen die Bildung des Äpfelsäureenzym bereits induziert ist. Die Enzyme von aus Wein isolierten Äpfelsäure-abbauenden Bakterien wurden von JERCHEL und Mitarb. (1956) eingehend untersucht. Die Enzympräparate wurden aus vorkultivierten Zellen von 2 Bakterienstämmen („*B. gracile* r und s“) entweder mit flüssiger Luft (Zellfrierextrakt) oder mit Aluminiumoxydpulver hergestellt. Es konnten Hinweise für das Vorkommen folgender Enzyme des Äpfelsäureabbaus erhalten werden:

- a) Äpfelsäurehydrogenase, durch Messung der Methylenblaufärbung im Thunberg-Versuch oder durch spektrophotometrische Messung der Oxydation von DPNH<sub>2</sub>.
- b) Oxalessigsäuredekarboxylase, durch Bestimmung der Kohlensäurebildung aus Oxalessigsäure bei pH 7,2 (diese Reaktion soll nicht durch Äpfelsäureenzym bewirkt werden, da dessen Optimum bei pH 4-6 liegen soll, vergl. jedoch Abb. 1).
- c) Milchsäurehydrogenase, durch spektrophotometrische Messung der Oxydation von DPNH<sub>2</sub> bei Verwendung von Brenztraubensäure als Substrat.
- d) Äpfelsäureenzym, durch Bestimmung der Kohlensäurebildung aus Äpfel-

säure; dieses Enzym wurde im Aluminiumoxydpulverextrakt nachgewiesen, der keine Äpfelsäurehydrogenaseaktivität enthielt.

Auf Grund dieser Untersuchungen kann angenommen werden, daß die Äpfelsäure-abbauenden Bakterien des Weines Äpfelsäure sowohl über Oxal-essigsäure und Brenztraubensäure zu Milchsäure abbauen (Reaktionen 3, 2 und 4) als auch direkt mit Äpfelsäureenzym oxydativ dekarboxylieren können (Reaktionen 5 und 4). Wahrscheinlich wird jedoch das Äpfelsäureenzym bei den aus Wein isolierten Milchsäurebakterien die Umsetzung der Äpfelsäure zum größten Teil bewirken. JERCHEL und SCHMIDT (1958) fanden, daß das mit Aluminiumpulver und Veronalpuffer (pH 7,2) gewonnene Enzym eines Weinbakteriums („*B. gracile*“) von steigenden CO<sub>2</sub>-Partialdrucken ebenso gehemmt wird, wie das Äpfelsäureenzym von *Lactobacillus arabinosus* Stamm 17-5.

Im Gegensatz zu der allgemein weit verbreiteten Annahme, daß die Endprodukte des Abbaus der Äpfelsäure im Wein Milchsäure und Kohlendioxyd sind, fand CARR (1959), daß von *Lactobacillus pastorianus* außer Milchsäure auch Bernsteinsäure gebildet wird. Für die Entstehung von Milchsäure oder Bernsteinsäure ist die Wasserstoffionenkonzentration entscheidend. Bei pH 3,2 entsteht überwiegend Milchsäure, bei pH 3,6 werden von *Lactobacillus pastorianus* oder *Lactobacillus brevis* noch überwiegend Milchsäure, daneben aber bereits größere Mengen von Bernsteinsäure gebildet, und bei pH 4,8 und darüber kann nur noch Bernsteinsäure nachgewiesen werden. Inwieweit dieser Beobachtung eine allgemeinere Bedeutung zukommt, werden spätere Untersuchungen ergeben. Wein hat ja meist pH-Werte, die unter pH 3,5 liegen, so daß Milchsäure Endprodukt des Abbaus der Äpfelsäure sein dürfte. Von der Hefe wird während der Gärung immer etwas Bernsteinsäure gebildet, ein Teil der im Wein nachweisbaren Bernsteinsäure könnte aber von Milchsäurebakterien aus Äpfelsäure gebildet worden sein.

### Literaturverzeichnis

- ABLES, P. G., J. M. RAVEL and W. SHIVE: The indirect role of biotin in the synthesis of the malic enzyme. *J. biol. Chem.* **236**, 3263 — 3266 (1961).
- AMERINE, M. A.: Composition of wines. I. Organic constituents. *Adv. in Food Res.* **5**, 354 — 510 (1954).
- — : Composition of wines. II. Inorganic constituents. *Adv. in Food Res.* **8**, 133 — 224 (1958).
- ARENA, A.: Alteraciones bacterianas de vinos Argentinos. *Rev. Fac. Agronomia y Veterinaria* **8**, 155 — 320 (1936).
- BARRE, P. et P. GALZY: Étude d'une nouvelle bactérie malolactique. *Ann. Technol. agric.* **9**, 331 — 343 (1960).
- BERGERET, J.: Observations sur la fermentation malolactique des vins de Bourgogne récoltés en 1957. Note I. Statistiques et allure du phénomène. *C. R. Acad. Agric. France* **44**, 673 — 677 (1958).
- BIDAN, P.: Sur quelques bactéries isolées de vins en fermentation malolactique. *Ann. Technol. agric.* **4**, 597 — 617 (1956).
- — et J. MAUGENET: Contribution a l'étude de l'altération des cidres appelée «framboisé». *C. R. Acad. Agric. France* **46**, 358 — 361 (1960).
- BIEDERMANN, W.: Die pH-Änderungen bei der Abscheidung von Weinstein aus Getränken. *Mitt. Gebiete d. Lebensmittelunters. u. Hyg.* **42**, 476 — 482 (1951).
- BLANCHARD, M. L., S. KORKES, A. CAMPILLO and S. OCHOA: Function of biotin in the metabolism of *Lactobacillus arabinosus*. *J. biol. Chem.* **187**, 875 — 890 (1950).
- BOCKS, S. M.: Nutritional requirements for the induced formation of malic enzyme in *Lactobacillus arabinosus* (17 — 5). *Nature* **192**, 89 — 90 (1961).
- BREED, R. S., E. G. D. MURRAY and A. P. HITCHENS: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore (1948).
- — and N. R. SMITH: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. London (1957).

- CARLES, J. et M. LAMAZOU-BETBEDER: Le problème du vieillissement des vins. Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse **94**, 452 — 461 (1959).
- CARR, J. G.: Occurrence and activity of some lactic acid bacteria from apple juices, ciders and perries. J. Inst. Brewing **63**, 436 — 440 (1957).
- — : The vitamin requirements of lactic acid bacteria from ciders. Antonie van Leeuwenhoek, J. Mikrobiol. Serol. **24**, 63 — 68 (1958).
- — : Lactic acid bacteria as spoilage organisms of fruit juice products. J. appl. Bacteriol. **21**, 267 — 271 (1959).
- — : Some special characteristics of the cider Lactobacilli. J. appl. Bacteriol. **22**, 377 — 383 (1960).
- CHARPENTIER, Y.: Contribution a l'étude biochimique des facteurs de l'acidité des vins. Th. Sc. Ing. — Doct. Bordeaux (1954).
- CONN, E., B. VENNESLAND and L. M. KRAEMER: Distribution of a triphosphopyridine nucleotide-specific enzyme catalyzing the reversible oxidative decarboxylation of malic acid in higher plants. Arch. Biochem. **23**, 179 — 197 (1949).
- COOLIDGE, T. B.: Hetero- to homofermentative change in Lactobacilli. J. Infect. Diseases **88**, 241 — 242 (1951).
- CORDONNIER, R. et C. BIZEAU: Dosage de l'acide malique dans les mouts et les vins. Ann. Technol. agric. **8**, 69 — 79 (1959).
- — et — — : Séparation par chromatographie d'échange d'ions et dosage des acides lactique, succinique et malique du vin. Ann. Technol. agric. **9**, 349 — 362 (1960).
- CRUESS, W. V.: The role of microorganisms and enzymes in wine making. Adv. in Enzymology **3**, 349 — 386 (1943).
- DEAL, S. J. and H. C. LICHTSTEIN: Malic enzyme induction by lactic acid bacteria. I. A method for the study of nutritional interactions. Canad. J. Microbiol. **7**, 153 — 161 (1961).
- DICKSCHEIT, R.: Beiträge zur Physiologie und Systematik der Pediokokken des Bieres. I. Mitt. Methodik der Isolation und Züchtung von Kokken und die Diagnostik säurebildender Kokken, sowie ihr Verhalten im Bier. Zbl. Bakteriol., Parasitenkde., Infektionskrankh. u. Hyg. **114**, 270 — 284 (1961a).
- — : Beiträge zur Physiologie und Systematik der Pediokokken des Bieres. II. Mitt. Diagnostik der nichtsäurebildenden Kokken, sowie von Sarzinen und das Verhalten dieser Organismen im Bier. Zbl. Bakteriol., Parasitenkde., Infektionskrankh. u. Hyg. **114**, 460 — 474 (1961b).
- DOUGLAS, H. C. and L. S. McCLUNG: Characteristics of an organism causing spoilage in fortified sweet wines. Food Res. **2**, 471 — 475 (1937).
- DUERRE, J. A. and H. C. LICHTSTEIN: Malic enzyme induction by lactic acid bacteria. II. Purine and pyrimidine requirements. Canad. J. Microbiol. **7**, 217 — 226 (1961).
- DUPUY, P.: Une nouvelle altération bactérienne dans les vins de liqueur. Ann. Technol. agric. **6**, 93 — 102 (1957a).
- — : Les acétobacter du vin — identification de quelques souches. Ann. Technol. agric. **6**, 217 — 233 (1957b).
- EVANS, E. A., B. VENNESLAND and L. SLOTIN: The mechanism of carbon dioxide fixation in cell-free extracts of pigeon liver. J. biol. Chem. **147**, 771 — 784 (1943).
- FEDUCHY, E. y J. A. SANDOVAL: La fermentacion malolactica y los vinos para crianza en „flor“ elaborados con mostos de uva „verdejo“. I. Congr. mondiale della sperimentazione agraria. Roma 781 — 785 (1959).
- FELTON, E. A., J. B. EVANS and C. F. NIVEN: Production of catalase by the Pediococci. J. Bacteriol. **65**, 481 — 482 (1953).
- — and C. F. NIVEN: The identity of „*Leuconostoc citrovorum* strain 8081“. J. Bacteriol. **65**, 482 — 483 (1953).
- FLESCH, P.: Neue Untersuchungen zum Abbau der L-Äpfelsäure durch *Bacterium gracile* in Wein. Dtsch. Wein-Ztg. **94**, 536 — 540 (1958).
- — und D. JERCHEL: Neue Untersuchungen zum Abbau der L-Äpfelsäure durch *Bacterium gracile*. Mitt. Klosterneuburg **8A**, 301 — 312 (1958).
- — und — — : Über die Züchtung von *Bacterium gracile* in natürlichen L-Äpfelsäure enthaltenden Nährmedien. Mitt. Klosterneuburg **10A**, 1 — 13 (1960).
- FORNACHON, J. C. M.: A bacterium causing „disease“ in fortified wines. Austr. J. Exper. Biol. Med. Sci. **14**, 215 — 222 (1936).
- — : The occurrence of malo-lactic fermentation in Australian wines. Australian J. appl. Sci. **8**, 120 — 129 (1957).
- — , H. C. DOUGLAS and R. H. VAUGHN: *Lactobacillus trichodes* nov. spec., a bac-

- terium causing spoilage in appetizer and dessert wines. *Hilgardia* **19**, 129 — 132 (1949).
- GARVIE, E. J.: Reclassification of *Leuconostoc mesenteroides* P-60 as a *Pediococcus*. *Nature* **183**, 1411 — 1412 (1959).
- GINI, B. and R. H. VAUGHN: Characteristics of some bacteria associated with the spoilage of California dessert wines. *Amer. J. Enol. and Viticult.* **13**, 20 — 31 (1962).
- GOULDEN, J. D. S. and M. E. SHARPE: The infra-red absorption of Lactobacilli. *J. gen. Microbiol.* **19**, 76 — 86 (1958).
- GÜNTHER, H. L. and H. R. WHITE: The cultural und physiological characters of the *Pediococci*. *J. gen. Microbiol.* **26**, 185 — 197 (1961a).
- — and — — : Serological characters of the *Pediococci*. *J. gen. Microbiol.* **26**, 199 — 205 (1961b).
- HARARY, I., S. R. KOREY and S. OCHOA: Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. VII. Equilibrium of „malic“ enzyme reaction. *J. biol. Chem.* **203**, 595 — 604 (1953).
- HOCHSTRASSER, R.: Über einige Bedingungen beim Lindwerden der Weine. Diss. Zürich 1955.
- HODGES, E. A., T. B. COOLIDGE and R. W. HARRISON: Further observations on metabolic changes in oral Lactobacilli. *J. Infect. Diseases* **88**, 237 — 240 (1951).
- HULLIN, R. P. and R. L. NOBLE: The determination of lactic acid in microgram quantities. *Biochem. J.* **55**, 289 — 291 (1953).
- IFLAND, P. W. and W. SHIVE: The inhibition of aspartic acid utilization in the synthesis of the adaptive „malic enzyme“ in *Lactobacillus arabinosus*. *J. biol. Chem.* **223**, 949 — 957 (1956).
- INGRAHAM, J. L., R. H. VAUGHN and G. M. COOKE: Studies on the malo-lactic organisms isolated from California wines. *Amer. J. Enol. Viticult.* **11**, 1 — 4 (1960).
- — and G. M. COOKE: A survey of the incidence of the malo-lactic fermentation in California table wines. *Amer. J. Enol. Viticult.* **11**, 160 — 163 (1960).
- JERCHEL, D., P. FLESCH and E. BAUER: Untersuchungen zum Abbau der L-Äpfelsäure durch *Bacterium gracile*. *J. Liebig's Ann. Chem.* **601**, 40-60 (1956).
- — und H. L. SCHMIDT: Vergleich des Abbaues von L-Äpfelsäure durch *Bacterium gracile* und *Lactobacillus arabinosus*. *J. Liebig's Ann. Chem.* **613**, 198 — 203 (1958).
- KANDLER, O. und A. HUND: Untersuchungen über die Aminosäurezusammensetzung von Bakterienmembranen. *Zbl. Bakt., II. Abt.*, **113**, 63 — 70 (1959).
- KOCH, A.: Über die säureverzehrenden Organismen des Weines. *Weinbau und Weinhandel* **16**, 243 — 245 (1898).
- — : Über die Ursachen des Verschwindens der Säure bei Gärung und Lagerung des Weines. *Weinbau und Weinhandel* **18**, 395 — 396, 407 — 408, 417 — 419 (1900).
- KORKES, S. and S. OCHOA: Adaptive conversion of malate to lactate and carbon dioxide by *Lactobacillus arabinosus*. *J. biol. Chem.* **176**, 463 — 464 (1948).
- — , A. del CAMPILLO and S. OCHOA: Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. IV. Isolation and properties of an adaptive „malic“ enzyme from *Lactobacillus arabinosus*. *J. biol. Chem.* **187**, 891 — 905 (1950).
- KRAMPITZ, L. O. and C. H. WERKMANN: The enzymic decarboxylation of oxaloacetate. *Biochem. J.* **35**, 595 — 602 (1941).
- KRASSILNIKOV, N. A.: Diagnostik der Bakterien und Aktinomyzeten. Jena 1959.
- KUDRJAWZEW, W. I.: Die Systematik der Hefen. Berlin 1960.
- LAMAZOU-BETBEDER, M. et R. PECH: Application de techniques chromatographiques pour l'étude de la fermentation malolactique des vins dénommés de qualité supérieure de la région de Toulouse. *Ann. Technol. agric.* **4**, 293 — 300 (1955).
- LAMBION, R. et A. MESKHI: Les bactéries de la fermentation malolactique. *Rev. Ferment. Ind. Aliment.* **12**, 131 — 144 (1957).
- LÜTHI, H.: Über das Lindwerden der Weine und Obstweine. *Schweiz. Z. Obst- u. Weinbau* **58**, 266 (1949).
- — : Symbiotic problems relating to the bacterial deterioration of wines. *Amer. J. Enol.* **8**, 176 — 181 (1957a).
- — : Eine vereinfachte Methode zur Verfolgung des biologischen Säureabbaues in Weinen. *Weinblatt*, 974 — 976 (1957b).
- — : La rétrogradation malolactique dans les vins et les cidres. *Rev. Ferment. Ind. Aliment.* **12**, 15 — 21 (1957c).
- — und U. VETSCH: Ein seltener Fall von Buttersäuregärung in alkoholfreiem Apfelsaft. *Fruchtsaftind.* **2**, 54 — 58 (1957).
- — und — — : Beiträge zur Kenntnis des biologischen Säureabbaues in unver-

- gorenen und vergorenen Obst- und Traubensäften. I. Vorläufige Mitt. Schweiz. Z. Obst- u. Weinbau **68**, 1 — 8 (1959a).
- — und — — : Contributions to knowledge of the malolactic fermentation in wines and ciders. II. The growth promoting effect of yeast extract on lactic acid bacteria causing malolactic fermentation in wines. J. appl. Bacteriol. **22**, 384 — 391 (1959b).
- MILLIS, N. F.: Some bacterial fermentations of ciders. Thesis, Bristol 1951, cit. nach CARR (1959).
- — : A study of the cider-sickness Bacillus — a new variety of *Zymomonas anaerobia*. J. gen. Microbiol. **15**, 521 — 528 (1957).
- — , I. HUSEIN, A. N. HALL and T. K. WALKER: A mucilageforming *Lactobacillus* species isolated from cider. Part. I. Characteristics. J. appl. Bacteriol. **21**, 299 — 307 (1958).
- MÜLLER-THURGAU, H.: Ergebnisse neuer Untersuchungen auf dem Gebiete der Weinbereitung. Weinbau und Weinhandel **9**, 421 — 428 (1891).
- — und A. OSTERWALDER: Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen. Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde u. Infektionskrankh. II. Abt. **36**, 129 — 338 (1913).
- NATHAN, H. A.: Effect of nutritional deficiencies on synthesis of the inducible malic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Arch. Mikrobiol. **38**, 107 — 113 (1961).
- NEGRE, E., A. DUAL et J.-M. EVESQUE: La prévision de l'acidité fixe des vins est-elle possible? Ann. Technol. agric. **9**, 247 — 321 (1960).
- NOSSAL, P. M.: Estimation of L-malate and fumarate by malic decarboxylase of *Lactobacillus arabinosus*. Biochem. J. **50**, 349 — 355 (1952).
- OCHOA, S., A. MEHLER, M. L. BLANCHARD, T. H. JUKES, C. E. HOFFMANN and M. REGAN: Biotin and carbon dioxide fixation in liver. J. biol. Chem. **170**, 413 — 414 (1947).
- — , J. B. V. SALLES and P. J. ORTIZ: Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. III. Enzymatic synthesis of L-malic acid by reductive carboxylation of pyruvic acid. J. biol. Chem. **187**, 863 — 874 (1950).
- — : Enzymatic mechanisms of carbon dioxide fixation. In: SUMNER, J. B. and K. MYRBÄCK: The enzymes. New York 1952 Bd. II, 2, 929 — 1032.
- OLSEN, E.: Studies of bacteria in Danish fruit-wines. Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. **14**, 1 — 28 (1948).
- OSTERWALDER, A.: Über die durch Bakterien verursachte Zersetzung von Weinsäure und Glycerin im Wein. Die Bakterien der Weinstein- und Glycerinzersetzung Landw. Jb. Schweiz **66**, 181 — 197 (1952).
- PASTEUR, L.: Etudes sur le vin. Paris 1866, cit. nach RIPPEL (1950).
- PEDERSON, C. S.: The genus *Pediococcus*. Bacteriol. Rev. **13**, 225 — 232 (1949).
- — and M. N. ALBURY: Variation among the heterofermentative lactic acid bacteria. J. Bact. **70**, 702 — 708 (1955).
- PEYNAUD, E. et S. DOMERCO: Possibilité de provoquer la fermentation malolactique en vinification à l'aide de bactéries cultivées. C. R. Acad. Agric. France **45**, 355 — 358 (1959).
- — et — — : Presence démontrée de bactéries lactiques sur les raisins murs. C. R. Acad. Sci. (Paris) **252**, 3343 — 3344 (1961b).
- PLAUT, G. W. E.: The influence of biotin nutrition on carbon dioxide fixation and malic enzyme formation by *Lactobacillus arabinosus*. J. biol. Chem. **236**, 61 — 64 (1961).
- RADLER, F.: Untersuchungen über die experimentelle Durchführung des biologischen Säureabbaus. Vitis **1**, 42 — 52 (1957).
- — : Mikrobiologische Untersuchung des bakteriellen Säureabbaus im Wein. Naturwiss. **45**, 215 — 216 (1958a).
- — : Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. Isolierung und Charakterisierung von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. Arch. Mikrobiol. **30**, 64 — 72 (1958b).
- — : Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. II. Der Nähr- und Wuchsstoffbedarf der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. Arch. Mikrobiol. **32**, 1 — 15 (1958c).
- — : Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. III. Die Energiequelle der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. Arch. Mikrobiol. **31**, 224 — 230 (1958d).
- — : Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. V. Über das Metabiose-

- verhältnis zwischen Weinhefen und Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. Arch. Mikrobiol. **37**, 267 — 277 (1960).
- REBELEIN, H.: Kolorimetrisches Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung der Weinsäure und Milchsäure in Wein und Most. Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. **36** — 41 (1961).
- RENTSCHLER, H.: Die biochemische Bestimmung der Äpfelsäure. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. **39**, 30 — 35 (1948).
- — und H. TANNER: Das Bitterwerden der Rotweine. Beitrag zur Kenntnis des Vorkommens von Acrolein in Getränken und seine Beziehung zum Bitterwerden der Weine. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. **42**, 463 — 475 (1951).
- — und — — : Über die Krankheit des Bitterwerdens der Rotweine. Beitrag zur Kenntnis des Vorkommens von Acrolein in Getränken und seine Beziehung zum Bitterwerden der Rotweine. Schweiz. Z. Obst- und Weinbau **61**, 539 — 541 (1952).
- RIBÉREAU-GAYON, J.: Les bactéries du vin. Procès-verbaux séances soc. sci. phys. naturelles de Bordeaux **57** — 61 (1937).
- — : Sur la fermentation de l'acide malique dans les grands vins rouges. Bull. Off. Internat. de Vin **19**, 26 — 29 (1946).
- — : Méthode simple et expressive de caractérisation de la fermentation malolactique des vins. C. R. Acad. Agric. France **39**, 807 — 811 (1953).
- — et E. PEYNAUD: Traité d'Oenologie. Paris et Liège 1960.
- RIPPEL, K.: Der biologische Säureabbau im Wein. Arch. Mikrobiol. **14**, 509 — 530 (1950).
- ROGOSA, M. and M. E. SHARPE: An approach to the classification of the Lactobacilli. J. appl. Bacteriol. **22**, 329 — 340 (1959).
- — : Experimental conditions for nitrate reduction by certain strains of the genus Lactobacillus. J. gen. Microbiol. **24**, 401 — 408 (1961).
- RZEDOWSKI, W. und H. RZEDOWSKA: Untersuchungen über den biologischen Säureabbau in den Obstmosten. Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego **3**, 1 — 24 (1960), (referiert in Z. Lebensmittelunters. u. -forschg. **115**, 388 (1961)).
- SALLES, J. B. V. and S. OCHOA: Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. II. Further study of the properties of the „malic“ enzyme of pigeon liver. J. biol. Chem. **187**, 849 — 861 (1950).
- SEIFERT, W.: Über die Säureabnahme im Wein und den dabei stattfindenden Gärungsprozeß. Z. landwirtsch. Versuchswes. Österreich **4**, 980 — 992 (1901).
- — : Über die Säureabnahme im Wein und den dabei stattfindenden Gärungsprozeß. II. Mitt. Z. landwirtsch. Versuchswes. Österreich **6**, 567 — 585 (1903).
- SHARPE, E.: A serological classification of Lactobacilli. J. gen. Microbiol. **12**, 107 — 122 (1956).
- SHIMWELL, J. L.: A rational nomenclature for the brewery lactic acid bacteria. J. Inst. Brewing **54**, 100 — 104 (1948).
- — : Brewing bacteriology. VI. The lactic acid bacteria (family *Lactobacteriaceae*). Wallerstein Labor. Commun. **12**, 71 — 88 (1949).
- SIERRA, R. and C. S. McCLESKY: Serological studies on *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. **72**, 816 — 820 (1956).
- SKERMAN, V. B. D.: A mechanical key for the generic identification of bacteria. Bacteriol. Rev. **13**, 175 — 187 (1949).
- SCHANDERL, H.: Über die Rolle des Schwefelwasserstoffs und des molekularen Schwefels bei dem Metabioseverhältnis zwischen Weinhefen und Säureabbaubakterien. Naturwiss. **41**, 284 (1954).
- — : Handbuch der Kellerwirtschaft. II. Die Mikrobiologie des Mostes und Weines. Stuttgart 1959.
- SCHMIDT, H. L.: Untersuchungen zur Biochemie des Abbaues von Äpfelsäure durch *Bacterium gracile* mit Hilfe <sup>14</sup>C-markierter Säuren. Diss. Mainz (1959).
- — , G. HÜSKENS und D. JERCHEL: Zum Abbau von <sup>14</sup>C-markierter Äpfelsäure durch *Bacterium gracile*. Arch. Mikrobiol. **43**, 162 — 171 (1962).
- SCHUKOW, I.: Über den Säureverbrauch der Hefen. Zbl. Bakt. II. **2**, 601 — 612 (1896).
- TAVERNIER, J. et P. JACQUIN: Les eaux-de-vie dites « piquantes » en cidrieriedistillerie. Ind. Agric. et Aliment. **66**, 357 — 364 (1949).
- — : Sur quelques maladies microbiennes des cidres: Casse verte, maladie du framboisé, maladie de l'acroléine. Rev. Ferment. Ind. Aliment. **15**, 103 — 112 (1958).

- TRITTSLER, R. P., C. S. PEDERSON, E. E. SNELL, D. HENDLIN and C. F. NIVEN, jr.: Symposium on the lactic acid bacteria. *Bacteriol. Rev.* **16**, 227 — 260 (1952).
- VAUGHN, R. H. and H. C. DOUGLAS: Some Lactobacilli encountered in abnormal musts. *J. Bacteriol.* **36**, 318 — 319 (1938).
- — : Some effects of association and competition of *Acetobacter*. *J. Bacteriol.* **36**, 357 — 367 (1938).
- — , H. C. DOUGLAS and J. C. M. FORNACHON: The taxonomy of *Lactobacillus hilgardii* and related heterofermentative Lactobacilli. *Hilgardia* **19**, 133 — 139 (1949).
- — : Bacterial spoilage of wines with special reference to California conditions. *Adv. Food Res.* **6**, 67 — 108 (1955).
- — and A. TSCHELISTCHEFF: Studies on the malic acid fermentation of California table wines. I. An introduction to the problem. *Amer. J. Enol.* **8**, 74 — 79 (1957).
- WEBB, R. B. and J. L. INGRAHAM: Induced malo-lactic fermentations. *Amer. J. Enol. and Viticult.* **11**, 59 — 63 (1960).
- WILHARM, G. und G. HOLZ: Beitrag zur Kenntnis des Acroleins in Obstbränden, Maischen und Mosten. II. Mitt. Isolierung acroleinbildender Mikroorganismen und Erzeugung von Acrolein durch die gewonnenen Reinkulturen. *Arch. Mikrobiol.* **15**, 403 — 413 (1951a).
- — und — — : Beitrag zur Kenntnis des Acroleins in Obstbränden, Maischen und Mosten. III. Eine Methode zur quantitativen Acroleinbestimmung. *Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forschg.* **92**, 96 (1951b).
- ZICKLER, F.: Mikrobiologische Untersuchungen des Säureabbaues im Wein. Diss. Jena 1956.

eingegangen am 20. 7. 1962

Dr. F. RADLER  
 Forschungs-Institut für Rebenzüchtung  
 Geilweilerhof, Siebeldingen über Landau/Pfalz  
 z. Z. C. S. I. R. O. Research Station  
 Merbein, Vic.  
 Australien