

Über die Milchsäurebakterien des Weines und den biologischen Säureabbau

Übersicht

II. Physiologie und Ökologie der Bakterien

VON
F. RADLER

A. Einleitung*)	144
B. Geschichtliches	148
C. Kulturmethoden und Systematik der Milchsäurebakterien des Weines	148
D. Chemische Grundlagen	162
E. Physiologie und Ökologie der Bakterien des biologischen Säureabbaus	207
1. Chemische Faktoren (Nähr-, Wuchs- und Hemmstoffe)	208
a) Stoffwechsel der Kohlenstoffverbindungen	208
b) Stickstoffverbindungen, Purine	212
c) Vitamine	216
d) Mineralstoffe	218
e) Wachstumshemmend wirkende Faktoren	219
α) Äthylalkohol	219
β) Schweflige Säure	221
γ) Säureanionen	223
δ) Wasserstoffionenkonzentration	223
ε) Gerbstoffe und ähnliche Verbindungen	225
ζ) Sauerstoff und Kohlensäure	226
η) Antibiotika, Konservierungsmittel u. a.	227
2. Physikalische Faktoren	228
a) Temperatur	228
b) Kohlensäuredruck, Zentrifugieren, Klären	228
3. Biologische Faktoren	229
a) Hefen	229
b) Andere Mikroorganismen	232
F. Methoden zur Veränderung des Säuregehaltes im Wein**)	
G. Ausblick	
H. Zusammenfassung	

*) Abschnitte A — D: Vitis 3, 144 — 176 (1962)

**) Abschnitte F — H erscheinen im folgenden Heft

E. Physiologie und Ökologie der Bakterien des biologischen Säureabbaus

Wie bereits ausgeführt, ist der biologische Säureabbau die einzige durch Bakterien bewirkte Veränderung im Wein, die häufig erwünscht ist. Dieser Säureabbau ist natürlich ein rein chemischer oder besser enzymatischer Vorgang. Die Kenntnis der Äpfelsäure-abbauenden Enzyme allein genügt jedoch nicht zum Verständnis dieser Erscheinung, da der Äpfelsäureabbau im Wein von lebenden Bakterien durchgeführt wird. Es ist daher erforderlich, auch die Faktoren zu kennen, die die Lebenstätigkeit oder genauer das Wachstum dieser Bakterien beeinflussen. Traubenmost enthält ja nur so wenige Milchsäurebakterien, daß sie darin gewöhnlich nicht nachweisbar sind (vgl. Seite 146). Voraussetzung für die enzymatischen Umsetzungen ist daher zunächst das Wachstum bzw. die Vermehrung der Bakterien. N u r

von den lebenden Bakterienzellen können im Wein die Enzyme gebildet werden, die schließlich die Äpfelsäure in mehreren Reaktionsschritten zu Milchsäure und Kohlensäure abbauen. Das Wachstum der Milchsäurebakterien im Wein wird durch chemische und physikalische Faktoren und durch die Anwesenheit weiterer Mikroorganismen beeinflusst.

1. Chemische Faktoren (Nähr-, Wuchs- und Hemmstoffe)

a) Stoffwechsel von Kohlenstoffverbindungen

Für alle Wachstums- und Lebensvorgänge ist Energie notwendig. Da die Bakterien des biologischen Säureabbaus Äpfelsäure zu Milchsäure und Kohlensäure umsetzen, war zunächst angenommen worden, daß die Äpfelsäure die Kohlenstoff- und Energiequelle dieser Bakterien darstellt. Diese Annahme ist jedoch nicht zutreffend, worauf zuerst von SCHANDERL (1943) hingewiesen wurde. Er stellte fest, daß die Verbrennungsenthalpie der Milchsäure $326 \text{ cal. mol}^{-1}$ und die der Äpfelsäure nur $321 \text{ cal. mol}^{-1}$ beträgt (vgl. jedoch SCHMIDT 1959). Die Umsetzung der Äpfelsäure zu Milchsäure erbringt also für die Bakterien keinen Energiegewinn.

Die Frage der Energiequelle der Bakterien des biologischen Säureabbaus wurde lebhaft diskutiert. Von SCHANDERL (1943) wurde angenommen, daß stickstoffhaltige oder eiweißhaltige Verbindungen den Milchsäurebakterien als Energiequelle dienen würden, eine Auffassung, die auch von PEYNAUD und DOMERCO (1961) vertreten wird. RIPPEL (1943, 1950) vermutete dagegen, ebenso wie BÖHRINGER (1955), daß Äpfelsäure von den Bakterien nicht nur zu Milchsäure und Kohlensäure dekarboxyliert wird, sondern daß ein Teil der Äpfelsäure zur Energiegewinnung vollständig zu Wasser und Kohlensäure veratmet wird.

Von SCHMIDT (1959) ist die thermodynamische Berechnung des Abbaus der Äpfelsäure durchgeführt worden. Dabei wurde gefunden, daß der Äpfelsäureabbau bei Berücksichtigung der Ionen und nicht der Verbrennungsenthalpie der Salze eine *exergonische Reaktion* ist und nicht wie früher angenommen wurde, eine *endergonische Reaktion*. Der Äpfelsäureabbau kann also ohne Energiezufuhr erfolgen. Der Energiegewinn ist allerdings sehr gering; er beträgt $\Delta Q = +1,78 \text{ kcal/Mol}$. Der Äpfelsäureabbau erbringt auch nach dieser Berechnung keinen Nutzeffekt für die Bakterien.

Die biologische Bedeutung des Äpfelsäureabbaus ist unklar. Nach HOCHSTRASSER (1955) fördert Äpfelsäure die Schleimbildung bei Milchsäurebakterien, da Äpfelsäure aber zu mindestens 95 % zu Milchsäure und Kohlensäure abgebaut wird, ist unverständlich, worauf diese Wirkung beruht. ^{14}C -markierte Äpfelsäure wird praktisch nicht in die Bakterienzellen eingebaut, Äpfelsäure spielt also keine Rolle beim Baustoffwechsel (SCHMIDT 1959). Wahrscheinlich wird das Bakterienwachstum durch die Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration begünstigt, die der Abbau der Äpfelsäure bedingt. Allgemein wird angenommen, daß von den Äpfelsäure-abbauenden Bakterien zum Wachstum zusätzliche Energiequellen benötigt werden (LÜTHI 1957c, RADLER 1958a, WEBB und INGRAHAM 1960, PEYNAUD und DOMERCO 1961). Äpfelsäure allein ermöglicht kein Bakterienwachstum, sie wird nur zu Milchsäure abgebaut, wenn andere Kohlenstoffquellen vorhanden sind (DUPUY 1957).

Von RADLER (1958d) konnte durch Kultur in synthetischen Nährmedien nachgewiesen werden, daß Äpfelsäure-abbauende Bakterien zum Wachstum

ein vergärbares Kohlenhydrat benötigen, das ihnen als Energiequelle dient. Ohne Zusatz eines vergärbaren Kohlenhydrates zum Nährmedium erfolgte in einem Zeitraum von 10 — 14 Tagen kein nennenswerter Abbau der Äpfelsäure. Für das Wachstum der Bakterien erwies es sich auch bei Gegenwart von Kohlenhydrat als unerheblich, ob Äpfelsäure anwesend war oder nicht; durch Äpfelsäure wird das Wachstum der Bakterien nicht gefördert*). Es konnten quantitative Beziehungen zwischen dem Bedarf an Glucose zum Wachstum und dem Abbau der Äpfelsäure aufgezeigt werden (RADLER 1958d). Zur Dekarboxylierung von 1 g Äpfelsäure in Traubenmost innerhalb von etwa 10 Tagen genügt bereits die Entwicklung von etwa 0,01 g Bakterienmasse**). 0,01 g Bakterien benötigen zum Wachstum etwa 0,1 g Glucose oder ein anderes vergärbares Kohlenhydrat. Glucose wird von heterofermentativen Milchsäurebakterien zu je einem Molekül Milchsäure, Äthylalkohol und Kohlensäure und von homofermentativen Bakterien zu zwei Molekülen Milchsäure umgesetzt.

An sich ist es nicht weiter überraschend, daß die aus Wein isolierten Milchsäurebakterien Kohlenhydrat als Energiequelle verwerten. Es sind nämlich nur wenige Milchsäurebakterien bekannt, die auf anderen Stoffen als Kohlenhydrat (z. B. Zitronensäure) wachsen können (TITTLER und Mitarb. 1952); allerdings wird diesen Stoffen unter natürlichen Bedingungen keine wesentliche Bedeutung als Energiequelle zugesprochen.

Ohne Zweifel ist Zucker die wichtigste Energiequelle der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien im Wein. Da die Milchsäurebakterien unter den Bedingungen des erwünschten biologischen Säureabbaus nur ein geringes Wachstum zeigen, ist der Zuckerverbrauch im Wein ebenfalls gering. RIBEREAU-GAYON (1938) konnte nachweisen, daß gleichzeitig mit der Säureabnahme eine Erniedrigung des Zuckergehaltes um 0,4–0,8 g je Liter erfolgt, was in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen an synthetischen Nährlösungen steht (RADLER 1958d). MELAMED (1962) fand, daß Weine vor dem bakteriellen Äpfelsäureabbau einen höheren Gehalt an Zuckern aufweisen als nach dem Säureabbau.

Beim Wachstum von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien in Traubenmost entsteht mehr Milchsäure als dem Abbau der Äpfelsäure entspricht, was auf eine gleichzeitige Milchsäuregärung des Zuckers deutet (FLESCH und JERCHEL 1960). PEYNAUD (1955) beobachtete, daß das Vorhandensein von Zucker den Säureabbau sehr erleichtert und ein Zusatz von Glucose zum Wein — bei Bedingungen, unter denen Hefen nicht gären und wachsen — bereits am zweiten oder dritten Tag eine deutliche Gasentwicklung bewirkt. VAUGHN (1955) berichtete, daß in trockenen Weinen (weniger als 0,1 % Zucker) das Wachstum von Milchsäurebakterien gehemmt ist, während sich in Weinen mit Zuckergehalten von 0,5 — 1 % diese Bakterien entwickeln können. DUPUY (1957a) konnte ein aus Wein isoliertes Milchsäurebakterium in Hefewasser nur bei Gegenwart von Kohlenhydrat kultivieren, ohne Zucker erfolgte auch nach 30 Tagen kein Wachstum. Auch ein Milchsäurebakterium, das in Wein Schleim bildet, konnte nur bei Gegenwart von Glucose kultiviert werden (HOCHSTRASSER 1955). — Wie bereits erwähnt, wird Glucose von *Lactobacillus plantarum* zur adaptiven Bildung des Äpfelsäureenzym benötigt (BLANCHARD und Mitarb. 1950).

*) Die Notwendigkeit von Glucose für das Wachstum von *Lactobacillus plantarum* wurde von DUPUY und MELAMED (1959) und MELAMED (1962) bestätigt

***) JERCHEL und Mitarb. (1956) fanden einen nur wenig geringeren Äpfelsäureumsatz; „*B. gracile*“ setzte in einem Birnensaftmedium täglich zwei- bis dreimal soviel Äpfelsäure um wie Bakterienmasse vorhanden war

Wenn auch feststeht, daß Kohlenhydrat für das Wachstum und für die Enzyymbildung von Milchsäurebakterien wesentlich ist, so gibt es Hinweise, daß der Abbau der Äpfelsäure bei Abwesenheit von Kohlenhydrat erfolgen kann. Für die rein enzymatischen Reaktionen des Abbaus der Äpfelsäure zu Milchsäure und Kohlensäure ist Kohlenhydrat nicht erforderlich. Wenn in Modellversuchen eine größere Einsaatmenge von Bakterien verwendet wird, kann man auch bei Abwesenheit von Kohlenhydrat einen Äpfelsäureabbau beobachten. FLESCH und JERCHEL (1960) fanden, daß von „*B. gracile*“ auch in einem kohlenhydratfreien Medium, das 1 g Caseinhydrolysat je Liter enthält, 30 — 50 % der vorhandenen Äpfelsäure (1,2-2 g) abgebaut werden. FORNACHON (1957) verwendete sogar zur Isolierung von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien ein kohlenhydratfreies Medium. OLSEN (1948) benutzte zum Nachweis des Äpfelsäureabbaus ein zuckerfreies Medium mit Zusatz von 1 % Äpfelsäure, deren Dekarboxylierung allerdings nur durch Titration bestimmt wurde. Aus eigenen Versuchen (RADLER, unveröffentl.) geht hervor, daß einzelne Stämme Äpfelsäure-abbauender Milchsäurebakterien in einem synthetischen, kohlenhydratfreien Medium ein schwaches Wachstum zeigen und ca. 4 g Äpfelsäure je Liter vollständig abbauen können, wenn das Medium einen erhöhten Gehalt an Glutaminsäure aufweist.

In Fischmarinaden vermögen Milchsäurebakterien auch bei Abwesenheit von Kohlenhydraten zu wachsen und Aminosäuren (vor allem Arginin, Glutaminsäure, Histidin, Lysin und Tyrosin) zu dekarboxylieren. Diese Keime sind mit den Milchsäurebakterien des Weines nahe verwandt (MEYER 1956, 1959). Es ist daher möglich, daß auch die Äpfelsäure-abbauenden Bakterien des Weines beim Fehlen von Kohlenhydrat unter Verwertung von Aminosäuren oder höher molekularen Verbindungen als Energiequelle wachsen können.

Auf sehr interessante Beziehungen zwischen der Zucker- und Zitronensäurekonzentration und dem Bakterienwachstum und Äpfelsäureabbau haben LÜTHI und VETSCH (1959a) hingewiesen. Bei Abwesenheit von Glucose erfolgt wahrscheinlich kein Bakterienwachstum und kein Äpfelsäureabbau; beim Fehlen von Zitronensäure ist das Bakterienwachstum bei niedrigem Zuckergehalt (1 g je Liter) besser als bei höherer Zuckerkonzentration (10 g je Liter). Bei hohem Zuckergehalt verschwindet zuerst die Zitronensäure restlos aus der Nährlösung, bevor der Zucker oder gar die Äpfelsäure in stärkerem Maße angegriffen oder zerlegt werden. Bei geringem Zuckergehalt wird die Äpfelsäure abgebaut ehe die Zitronensäure aus der Nährlösung verschwindet. Es wird angenommen, daß die Bedeutung der Kohlenhydrate als Energiequelle sehr stark von den Konzentrationsverhältnissen verschiedener Milieu-Faktoren, wie Zucker, Zitronensäure, pH-Wert abhängt und Kohlenhydrate nicht die einzige wesentliche Energiequelle darstellen.

PEYNAUD und DOMERCQ (1961) konnten durch Kultur verschiedener Äpfelsäure-abbauender Bakterien in verdünntem, mit Hefeextrakt angereichertem Traubenmost zeigen, daß der Abbau von Äpfelsäure und die Vergärung von Kohlenhydrat sehr stark vom pH-Wert abhängen. Größere Mengen von Zucker werden erst bei höheren pH-Werten (pH 3,6) von den Bakterien vergoren. Äpfelsäure kann dagegen von einigen Stämmen auch bei pH 3 abgebaut werden. Das pH-Intervall, in dem Äpfelsäure abgebaut werden kann, Zucker aber noch nicht in nennenswertem Umfang vergoren wird, ist bei den einzelnen Bakterienstämmen sehr unterschiedlich und vielleicht im Hinblick auf die technische Brauchbarkeit der Bakterien von Bedeutung.

Bei Untersuchungen über die Energiequelle der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien sollte vielleicht die Möglichkeit berücksichtigt werden, daß nicht nur reduzierende Kohlenhydrate sondern auch Polyalkohole den Milchsäurebakterien als Substrat dienen können. Von PEYNAUD und LAFOURCADE (1955) wurde festgestellt, daß der Inositgehalt des Weines durch die alkoholische Gärung kaum verändert wird. In Weinen, in denen Milchsäurebakterien zur Entwicklung kamen, kann er stark abnehmen. Die Abnahme des Inosits soll aber erst nach dem Abbau der Äpfelsäure erfolgen. Stoffwechselprodukte des Inositabbaus wurden im Wein noch nicht nachgewiesen.

Neben Äpfelsäure kommen in Traubenmost, Wein und Obstsaften noch eine Reihe weiterer Carbonsäuren vor. Einige dieser Säuren können von den Milchsäurebakterien verändert werden, jedoch bestehen große Unterschiede im Verhalten der verschiedenen Bakterienarten und Stämme gegenüber diesen Säuren. Ein von BARRE und GALZY (1960) isoliertes Bakterium vermochte keine andere Säure als Äpfelsäure abzubauen. LAMBION und MESKHI (1957) untersuchten bei 16 Stämmen von Milchsäurebakterien den Abbau von Äpfel-, Zitronen-, Milch-, Bernstein- und Weinsäure und konnten unter anaeroben Bedingungen allenfalls nur ein geringes Wachstum bei einigen Stämmen feststellen.

Der Abbau der Zitronensäure ist im Wein von einiger Bedeutung, wenn auch ihr Gehalt meist gering ist. Zitronensäure wird hauptsächlich von heterofermentativen Milchsäurebakterien angegriffen, aber es gibt darunter auch Stämme, die diese Säure nicht abbauen können (WEBB und INGRAHAM 1960). Als alleinige Kohlenstoffquelle ist Zitronensäure für Milchsäurebakterien so wenig geeignet, daß sie zur Einleitung des Wachstums nicht genügt (CHRISTENSEN und PEDERSON 1958). In Tomatensaftmedium wird Zitronensäure von „*B. gracile*“ abgebaut, jedoch unterbleibt der Abbau, wenn 6% Äpfelsäure zugesetzt werden (ZICKLER 1956). SCHMIDT (1959) beobachtete, daß *B. gracile* auch nach 5 Wochen nur wenig $^{14}\text{CO}_2$ aus 1,5- ^{14}C -dimarkierter Zitronensäure bildet.

Als Endprodukte des Abbaus von Zitronensäure durch „*B. gracile*“ (und auch Brenztraubensäure) wurden von CHARPENTIER und Mitarb. (1951) Butylenglykol, Acetoin und Diacetyl gefunden. Auf Grund von Bilanzversuchen ist von PEYNAUD (1955) ein Schema für den Abbau von Zitronensäure angegeben worden. Von HARVEY und COLLINS (1961) wurde der Abbau von Zitronensäure mit zellfreien Extrakten von *Streptococcus diacetylactis* und *Leuconostoc citrovorum* durchgeführt. Die erste Reaktion ist eine Spaltung zu Essigsäure und Oxalessigsäure, dann folgt die Dekarboxylierung von Oxalessigsäure zu Brenztraubensäure, die dann zu Acetoin und Kohlensäure umgewandelt wird. Als Cofaktoren sind Magnesium oder Mangan und Thiaminpyrophosphat erforderlich.

Brenztraubensäure wird von zellfreien Extrakten ebenfalls zu Acetoin und Kohlensäure umgesetzt. Die Dekarboxylierung von Brenztraubensäure durch intakte Zellen von *Lactobacillus plantarum* hat ein scharfes Maximum bei pH 3-4, die Reaktion wird — wahrscheinlich infolge einer Veränderung der Zellpermeabilität für Brenztraubensäure — durch geringe Mengen von Glucose gefördert (MOAT und LICHSTEIN 1953). Von CARLES und Mitarb. (1958) wurde Citramalsäure (2-Hydroxy-2-methyl-bernsteinsäure) im Wein gefunden und die Möglichkeit diskutiert, ob diese Säure von Bakterien aus Zitronensäure gebildet werden kann, entsprechend den Vorgängen bei der Umwandlung von Äpfelsäure zu Milchsäure.

In Apfelsaft kann bis zu 30% der Gesamtsäure als *Chinasäure* enthalten

sein. Diese Säure kann von Milchsäurebakterien, die *Lactobacillus brevis* nahe stehen, zu Shikimisäure umgesetzt werden (CARR und Mitarb. 1954). *Lactobacillus pastorianus* reduziert Chinasäure zu Dehydroshikimisäure, wobei wahrscheinlich Shikimisäure als Zwischenprodukt gebildet wird. Chlorogensäure kann von *Lactobacillus pastorianus* zu Chinasäure und Kaffeesäure hydrolisiert werden. Kaffeesäure kann zu Dehydrokaffeesäure reduziert und schließlich zu Äthylcatechol dekarboxyliert werden (CARR 1959).

Als noch nicht geklärt gilt die Frage, ob und in welchem Umfang Weinsäure von Milchsäurebakterien im Wein abgebaut oder umgewandelt werden kann. Bekanntlich soll der Abbau von Weinsäure zu Essigsäure typisch für die Bakterien sein, die das Umschlagen des Weines (tourne) bewirken (RIBEREAU-GAYON 1937). Nach OSTERWALDER (1952) entsteht bei der Zusetzung von Weinsäure flüchtige Säure, ohne daß sich der Gesamtsäuregehalt verändert. Stämme von *Lactobacillus plantarum* vermögen unter günstigen Bedingungen Weinsäure zu zersetzen, wobei überwiegend Milchsäure und Kohlensäure entstehen sollen (VAUGHN 1955). Wie bereits erwähnt, besteht auch die Möglichkeit, daß die Zersetzung von Weinsäure und Glycerin durch Propionsäurebakterien bewirkt wird.

b) Stickstoffverbindungen, Purine

Milchsäurebakterien stellen im Hinblick auf ihre Versorgung mit Stickstoffverbindungen besondere Ansprüche; die Bakterien des Weines bilden in dieser Hinsicht keine Ausnahme. Durch einen Zusatz von organischen Stickstoffverbindungen in Form von Caseinhydrolysat, Fleischextrakt oder Hefeautolysat wird in der Regel das Wachstum von Milchsäurebakterien in Wein oder Most begünstigt. Die Zusammenhänge zwischen dem Gehalt des Weines an Stickstoffverbindungen und der Bakterienentwicklung sind schon vielfach diskutiert worden. Als Stickstoffquelle kommen für die Milchsäurebakterien vor allem Aminosäuren und vielleicht Eiweiße und Peptide in Betracht. Einige Arten können Eiweiß hydrolysieren und Peptide verwerten. In Traubenmost und Wein kommen Proteine vor, jedoch ist bisher nicht bekannt, welche Bedeutung diese Substanzen unter natürlichen Bedingungen für die Bakterien des biologischen Säureabbaus haben.

Von SCHANDLER (1943) wurde angenommen, daß der Säureabbau immer mit einem Abbau von höher molekularen Stickstoffverbindungen gekoppelt ist; ohne den Abbau solcher Verbindungen soll der Äpfelsäureabbau „nicht funktionieren“. ZICKLER (1956) beobachtete, daß „*B. gracile*“ in einem Most wachsen kann, aus dem durch Behandlung mit Austauschern die Aminosäuren entfernt worden waren. Es wurde daraus gefolgert, daß Eiweiße zur Deckung des Stickstoffbedarfs verwendet werden können. LÜTHI und VETSCH (1959a) fanden, daß für das Wachstum von „*B. gracile*“ ein Partialhydrolysat von Casein weit besser geeignet ist als ein Totalhydrolysat, woraus ebenfalls abgeleitet wurde, daß Eiweiße oder Peptide für das Wachstum Äpfelsäureabbauender Bakterien wichtig sind. Allerdings könnte die geringere wachstumsfördernde Wirkung des Totalhydrolysates auch darauf beruhen, daß bei der längeren Hydrolyse essentielle Aminosäuren oder Wachstumsstoffe zerstört werden. Bacto-Trypton, ein tryptisches Proteinhydrolysat fördert — vor allem bei höheren Konzentrationen (5%) — das Wachstum von *Lactobacillus plantarum* bei niedrigem pH-Wert und Gegenwart von Alkohol. Auch von FLESCH und JERCHEL (1960) wird angenommen, daß Äpfelsäureabbauende Bakterien — wenn Kohlenhydrate fehlen — Eiweiße verwerten können.

Sicher werden die Eiweiße und Peptide des Weines einen günstigen Einfluß auf das Wachstum der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien ausüben; zum Wachstum dieser Bakterien sind diese Verbindungen aber nicht unbedingt erforderlich. Dies konnte durch Kultur dieser Bakterien in einem synthetischen Medium nachgewiesen werden, das als organische Stickstoffquelle nur Aminosäuren enthielt (RADLER 1958c).

Bereits von ORLA-JENSEN und Mitarb. (1936) war gezeigt worden, daß Milchsäurebakterien verschiedene Aminosäuren zum Wachstum benötigen. Von HUTCHINGS und PETERSON (1943) wurde der Aminosäurebedarf von *Lactobacillus casei* näher untersucht. 10 Aminosäuren (Leucin, Serin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Valin, Asparaginsäure, Cystin, Arginin, Tryptophan, Tyrosin) waren zum Wachstum unbedingt erforderlich, sechs weitere Aminosäuren (Threonin, Methionin, Alanin, Isoleucin, Lysin, Histidin) förderten das Wachstum und vier Aminosäuren (Glycin, Norleucin, Prolin, Hydroxyprolin) waren ohne Einfluß.

Aus Wein isolierte Bakterien benötigen zum Wachstum und Abbau der Äpfelsäure folgende Aminosäuren: Arginin, Cystin-Cystein, Glutaminsäure, Histidin, Leucin, Phenylalanin, Serin, Tryptophan, Tyrosin, Valin; weitere zwölf Aminosäuren waren im Auslassungstest ohne Einfluß oder zeigten nur eine fördernde Wirkung (RADLER 1958c). Zwischen den einzelnen Bakterienstämmen bestanden Unterschiede in ihrem Aminosäurebedarf.

Von KOSER und THOMAS (1955) ist der Aminosäurebedarf von oralen Milchsäurebakterien untersucht worden. Unabhängig von Art- oder Stammunter-

Tabelle 5

Die Mengen von Aminosäuren (in mg je Liter), die von Milchsäurebakterien der Gattung *Lactobacillus* zum maximalen Wachstum benötigt werden (nach KOSER und THOMAS 1955)

Aminosäure	Homofermentative Stämme	Heterofermentative Stämme
D,L-Alanin	100	40 — 100
L-Arginin - HCl	20	20 — 40
L-Cystein - HCl	40 — 100	40
L-Glutaminsäure	100 — 200	100
D,L-Leucin	40	40
D,L-Isoleucin	20 — 40	10
D,L-Phenylalanin	20 — 40	20 — 40
D,L-Threonin		20 — 40
L-Tryptophan	5 — 10	5
L-Tyrosin	10 — 20	10 — 20
D,L-Valin	40 — 100	40 — 100

schieden waren — neben 3-6 weiteren, nur fördernd wirkenden Aminosäuren für die meisten Bakterien notwendig: Arginin, Cystein-Cystin, Glutaminsäure, Leucin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Valin; also die gleichen Aminosäuren, die auch von den aus Wein isolierten Organismen benötigt werden. Die für ein optimales Wachstum erforderlichen Mengen an Aminosäuren gibt Tabelle 5 an. Der optimale Bedarf liegt also zwischen 5 mg je Liter (für Tryptophan) und 100 — 200 mg je Liter (für Glutaminsäure).

Aminosäuren sind ein normaler Bestandteil des Traubenmostes (siehe Seite 163). Von den Hefen werden bereits 24 — 28 Stunden nach Beginn der Gärung 70 — 95 % der Aminosäuren aufgenommen, vor allem Arginin, Glutaminsäure, Valin, Isoleucin, Leucin, Histidin, Asparaginsäure, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Methionin (CASTOR 1953a, b, CASTOR und ARCHER 1959). Der Gehalt an Glycin, Lysin und Cystin wird durch die Hefe kaum verändert. Nach der Gärung werden Valin, Isoleucin, Leucin, Tryptophan und Tyrosin wieder an das Medium abgegeben. Durch die Gärung wird die Aminosäurezusammensetzung verändert und der Gehalt erniedrigt; Wein enthält also geringere Aminosäuremengen als Traubenmost, aber noch etwa 1 — 15 % der Aminosäuremengen wie sie für Testmedien für Milchsäurebakterien verwendet werden.

Über den tatsächlichen, mengenmäßigen Bedarf der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien an einzelnen Aminosäuren liegen noch keine Untersuchungen vor. RADLER (1958d) gibt an, daß die Entwicklung von 50 mg Bakterienmasse je Liter Traubenmost für einen vollständigen Abbau der L-Äpfelsäure genügt. Bei der Annahme, daß die Bakterien zu 80 % aus Eiweiß bestehen, genügen zu ihrer Entwicklung insgesamt etwa 40 mg Aminosäuren, sofern diese nur zur Bildung von Zellmaterial benötigt werden. Da die Bakterien aus mindestens 17 verschiedenen Aminosäuren bestehen, sind also je Aminosäure nur 1 — 5 mg je Liter Most oder Wein für das Wachstum notwendig. Diese Aminosäuremengen dürften in der Regel im Traubenmost oder Wein vorhanden sein, so daß die säureabbauenden Bakterien die erforderlichen Stickstoffverbindungen stets vorfinden. In Apfel- und Birnenmost liegen die Verhältnisse jedoch anders. Diese Moste sind viel ärmer an Stickstoffverbindungen als Traubenmost; ZICKLER (1956) konnte in Apfel- und Birnenmost nur je sechs Aminosäuren nachweisen. In Übereinstimmung damit wuchs „*B. gracile*“ in diesen Substraten im Vergleich zu Traubenmost nur spärlich oder gar nicht.

Neben der Untersuchung des Aminosäurebedarfs der säureabbauenden Bakterien im Auslassungstest, dessen Nachteil in der Möglichkeit der Verfälschung der Ergebnisse infolge synergistischer und antagonistischer Wirkungen verschiedener Aminosäuren liegt, ist versucht worden, die Umsetzungen von Aminosäuren in Traubenmost oder komplexen Nährlösungen zu verfolgen. LÜTHI und VETSCH (1952) hatten darauf hingewiesen, daß durch papierchromatographische Untersuchungen Zusammenhänge zwischen Aminosäuregehalt und Säureabbau gefunden werden können. Während des Säureabbaus soll vor allem Alanin von „*B. gracile*“ aus dem Wein aufgenommen werden. JERCHEL und Mitarb. (1956) beobachteten beim Wachstum des gleichen Organismus in einem Casein- und Bierhefeautolysat enthaltenden Medium einen Umsatz der Aminosäuren Alanin, Serin, Glykokoll, Threonin, Glutaminsäure, Arginin, Asparagin sowie die Umsetzung von Prolin und α -Aminobuttersäure bei einem zweiten Stamm von „*B. gracile*“. ZICKLER (1956) konnte nachweisen, daß beim Wachstum von „*B. gracile*“ in Traubenmost Glycin, Arginin und Histidin verbraucht wird.

LAFON-LAFOURCADE und PEYNAUD (1961) bestimmten den Gehalt an Aminosäuren im Wein gleichzeitig mikrobiologisch und chromatographisch, wobei die mikrobiologische Bestimmung bei der Analyse von Wein stets höhere Werte ergab. Diese Beobachtung wird mit dem Vorkommen von Peptiden im Wein erklärt, die nur mit der mikrobiologischen Methode erfaßt werden. Auf Grund dieser Untersuchungen wird angenommen, daß ein großer Teil des organisch gebun-

denen Stickstoffs im Wein als Peptid vorliegt. Von besonderem Interesse sind Analysen des Aminosäuregehaltes von Weinen vor und nach dem biologischen Säureabbau. Überraschenderweise wurde nicht nur eine Abnahme sondern auch eine Zunahme von Aminosäuren beobachtet. Es werden demnach von den Bakterien nicht nur Aminosäuren aufgenommen, sondern auch einige Aminosäuren neu gebildet, wahrscheinlich durch Hydrolyse von Peptiden. Die Resultate waren jedoch außerordentlich wechselnd, die gleiche Aminosäure konnte in einem Versuch in ihrer Konzentration abnehmen, in einem anderen wiederum zunehmen. Wahrscheinlich sind die Ergebnisse sehr stark von der Zusammensetzung des Weines und der Dauer der Autolyse der Zellen abhängig. Außerdem wurden die Versuche nicht mit Bakterienreinkulturen durchgeführt — was bei Kellerversuchen auch kaum möglich ist —, so daß die wechselnden Ergebnisse möglicherweise auf das unterschiedliche Verhalten verschiedener Bakterienstämme zurückgeführt werden können.

Die von den Äpfelsäure-abbauenden Bakterien benötigten Aminosäuren werden wahrscheinlich überwiegend in die Zellmasse eingebaut. In guter Übereinstimmung wurden in Hydrolysaten von säureabbauenden Bakterien, die in Traubenmost gezüchtet worden waren, folgende Aminosäuren nachgewiesen: L-Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Cystin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Hydroxyprolin, Leucin-Isoleucin, Methionin-Valin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin (ZICKLER 1956, RADLER 1958c). Nach PEYNAUD und DOMERCO (1961) hat das Eiweiß von säureabbauenden Milchsäurebakterien bei Kultur in mit Hefeextrakt angereichertem Traubenmost folgende Zusammensetzung (‰): α -Alanin (3,2), Arginin (11,6), Asparaginsäure (5,0), Cystin (0,2), Glykokoll (4,8), Glutaminsäure (10,3), Histidin (1,2), Isoleucin (6,0), Leucin (5,3), Lysin (12,8), Methionin (2,2), Phenylalanin (2,3), Prolin (2,4), Serin (4,6), Threonin (4,6), Tryptophan (0,6), Tyrosin (3,9), Valin (6,0).

Durch einen Zusatz von Aminosäuren zum Wein oder dem Nährmedium soll das Wachstum der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien gefördert werden können. Nach LÜTHI und VETSCH (1957) soll ein Zusatz von Cystein, Threonin, Prolin und Tryptophan günstiger sein als ein Zusatz einer größeren Zahl von Aminosäuren. SUDRAUD und CASIGNARD (1958) hielten eine Förderung des Säureabbaus im Wein durch Zusatz von Aminosäuren für möglich, konnten die Förderung aber nicht nachweisen. JERCHEL und Mitarb. (1956) fanden, daß Glutathion und Cystin wachstumsfördernd wirken, später geben FLESCH und JERCHEL (1958) an, daß L-Cystin das Wachstum von *B. gracile* sogar hemmen soll. Cystein oder Cystin sind jedoch für viele Milchsäurebakterien essentielle Aminosäuren.

Über den Stoffwechsel der Aminosäuren durch die Äpfelsäure-abbauenden Bakterien im Wein ist noch sehr wenig bekannt. ARCHINARD und BOUDOT (1955) bestätigten die Angaben älterer Autoren, wonach durch die Tätigkeit der Bakterien des Äpfelsäureabbaus der Gehalt des Weines an NH_3 zunimmt. Nach dem Säureabbau wurde eine Erhöhung des NH_3 -Gehaltes bis zu Höchstwerten von 30 mg NH_3 je Liter festgestellt. Diese Ammoniumionen dürften sicher durch Desaminierung von Aminosäuren entstanden sein. Möglicherweise spielen Aminosäuren — im Gegensatz zur Auffassung von TITTLER und Mitarb. (1952) — doch eine Rolle als Energiequelle für Milchsäurebakterien unter extremen Bedingungen. CARLES und Mitarb. (1961) nehmen an, daß der Dekarboxylierung von Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure, Diaminopimelinsäure, Serin) durch Bakterien eine große Bedeutung bei der Alterung des Weines zukommt. LAGERBORG und CLAPPER (1952) isolierten *Lactobacillus-*

Stämme, die Arginin, Glutaminsäure, Histidin, Ornithin oder Tyrosin dekarboxylieren. Es ist durchaus möglich, daß auch im Wein Milchsäurebakterien vorkommen, die diese Dekarboxylierungen bewirken können. Wie bereits erwähnt, können Aminosäuren in Fischmarinaden von Milchsäurebakterien, die den Arten *Lactobacillus buchneri*, *L. brevis* und *L. fermenti* nahestehen, bei Abwesenheit von Kohlenhydrat dekarboxyliert werden (MEYER 1956, 1961). Aus Glutaminsäure entsteht γ -Aminobuttersäure, aus Lysin Cadaverin, aus Tyrosin Tyramin, aus Histidin Histamin und aus Arginin Citrullin und Ornithin. In den Marinaden kommt es zu einer deutlichen Gasbildung wenn die Konzentration der Aminosäuren mehr als 0,3 % beträgt. Ob ähnliche Umsetzungen im Wein vorkommen, ist bisher nicht bekannt. Von CARLES und Mitarb. (1961) wird diskutiert, wie Äthanolamin aus Aminosäuren gebildet werden kann und von PEYNAUD und DOMERCO (1961) wird auf die Möglichkeit hingewiesen, daß ein Teil der für den Äpfelsäureabbau erforderlichen Energie von den Bakterien durch Zersetzung von stickstoffhaltigen Substanzen gewonnen werden könnte.

Neben Aminosäuren werden von den Äpfelsäure-abbauenden Bakterien Purin- und Pyrimidinderivate benötigt. Adenin, Xanthin, Guanin und Uracil wirken wachstumsfördernd oder werden unbedingt benötigt (RADLER 1958c, LÜTHI und VETSCH 1959a); nach FLESCH und JERCHEL (1958) sollen dagegen Uracil, Xanthin und Guanin hemmend wirken.

c) Vitamine

Von den Milchsäurebakterien werden Vitamine der B-Gruppe in besonderem Maße benötigt. Schon von ORLÅ-JENSEN und Mitarb. (1936) war gezeigt worden, daß das Wachstum der Milchsäurebakterien von der Gegenwart von Riboflavin und Pantothenensäure abhängig ist. Inzwischen ist der Vitaminbedarf von Milchsäurebakterien sehr eingehend untersucht worden.

RIFFEL (1942, 1943) hat darauf hingewiesen, daß der bakterielle Abbau der Äpfelsäure im Wein von Inhaltsstoffen der Weinbeere abhängig ist, die ihrer Wirkungsweise nach als Biokatalysatoren zu bezeichnen sind. Tatsächlich werden von den Äpfelsäure-abbauenden Bakterien Vitamine benötigt. Diese kommen allerdings regelmäßig in Traubenmost oder Wein vor, so daß das Bakterienwachstum nicht etwa durch das Fehlen dieser Stoffe beschränkt wird. Ganz sicher unterscheiden sich die verschiedenen Stämme von aus Wein isolierten Milchsäurebakterien in ihrem Vitaminbedarf. Es wird also nicht möglich sein, die Vitaminansprüche genau festzulegen und unterschiedliche Resultate verschiedener Autoren können auf die Variation der Eigenschaften der Organismen zurückgeführt werden. Als besondere Schwierigkeit kommt hinzu, daß einzelne Vitamine nicht absolut notwendig zu sein brauchen, sondern nur eine Wachstumsförderung bewirken. Darüber hinaus ist es nicht einfach, vitaminfreie Medien herzustellen, die alle übrigen zum Wachstum erforderlichen Stoffe enthalten.

Von PEYNAUD (1955) wird angegeben, daß ein Zusatz von den Vitaminen Thiamin, Pantothenensäure, Nicotinsäure, Pyridoxin, Biotin, Mesoinosin und vor allem Riboflavin zum Wein allein oder zusammen den biologischen Säureabbau fördert. Im Gegensatz dazu konnten SUDRAUD und CASSIGNARD (1958) keine Förderung des Säureabbaus durch Zusatz von Vitaminen der B-Gruppe nachweisen. JERCHEL und Mitarb. (1956) beobachteten, daß in einem Medium, in dem schon ohne Zusatz 33—50 % der Äpfelsäure durch „*B. gracile*“ abgebaut werden konnten, durch Zusatz von Riboflavin und Pantothenensäure oder — bei einem anderen Bakterienstamm — durch Zusatz von Riboflavin und Inosit eine Zunahme der Milchsäurebildung bewirkt wird. Bei einem Zusatz zum Wein sollen diese Verbindungen den Säureabbau fördern (FLESCH und JERCHEL 1958), gleichzeitig wird allerdings angegeben, daß Adermin (Vitamin B₆) in einer Nährlösung das Wachstum von „*B. gracile*“ hemmt, während Pyridoxin (ebenefalls Vitamin B₆) im Wein den Säureabbau fördern soll.

Nach LÜTHI (1957c) ist für das Wachstum von „*B. gracile*“ Riboflavin, Pantothenensäure, Nicotinsäure und Folsäure unerlässlich, die Rolle von Biotin war nicht eindeutig zu klären. Von RADLER (1958c) wurde der Bedarf der Vitamine der B-Gruppe bei vier verschiedenen Äpfelsäure-abbauenden Bakterien im Auslassungstest untersucht. Dabei wurde gefunden, daß alle Stämme Folsäure und Nicotinsäure zum Wachstum und zum Äpfelsäureabbau benötigten. Riboflavin, Biotin und Pantothenensäure wirkten bei allen Stämmen wachstumsfördernd und waren bei einigen für den Äpfelsäureabbau unerlässlich. p-Aminobenzoensäure und Pyridoxin zeigten nur bei einzelnen Stämmen eine schwache wachstumsfördernde Wirkung. Inosit wurde als Wuchsstoff von den Bakterien in der verwendeten Nährlösung nicht benötigt.

Der Vitaminbedarf von insgesamt 37 Stämmen von aus Apfelwein isolierten Milchsäurebakterien der Arten *Lactobacillus plantarum*, *L. pastorianus*, *Leuconostoc mesenteroides*, sowie einigen weiteren heterofermentativen und homofermentativen *Lactobacillus*-stämmen, wurde von CARR (1958) untersucht. Als essentiell wurde eine Substanz angesehen, wenn das Wachstum (Trübung) beim Fehlen dieses Stoffes im Auslassungstest nur ein Drittel, als fördernd wenn es nur zwei Drittel des Wachstums im vollständigen, alle Wuchsstoffe enthaltenden Kontrollmedium erreichte. Die aus Apfelwein isolierten Stämme haben andere Vitaminansprüche als die aus Wein isolierten. Es benötigten alle 37 Stämme (aus Apfelwein) Pantothenensäure, 36 Stämme Nicotinsäure und nur 10 Stämme Riboflavin, das für 6 weitere fördernd war; Riboflavin war für das Wachstum der homofermentativen *Lactobacillus*-Stämme und für *Leuconostoc* Morphotyp I erforderlich. Thiamin war bei 8 Stämmen unwirksam und bei 24 Stämmen fördernd, es wurde hauptsächlich von den heterofermentativen Stäbchen benötigt. Biotin war für 29, Pyridoxin für 31 Stämme nicht erforderlich. Ein Stamm von *Leuconostoc mesenteroides* wurde durch Biotin um 17 % gehemmt. Kein Stamm brauchte Folsäure, p-Aminobenzoensäure oder Inosit zum Wachstum.

Den besonderen Nähr- und Wuchsstoffansprüchen der Milchsäurebakterien wird beim Wachstum im nährstoffarmen Apfelwein eine große Bedeutung zugemessen. Die Hefegärung führt im Apfelwein zu einer starken Nährstoffverarmung, so daß das größte Bakterienwachstum entweder vor der Gärung erfolgt oder danach, wenn die Hefen wieder durch Autolyse Nährstoffe abgeben.

LÜTHI und VETSCH (1959a, b) erwähnen, daß von säureabbauenden Bakterien im Wein p-Aminobenzoensäure, Pantothenensäure, Biotin, Folsäure und Meinoinosit in beträchtlichen Mengen verbraucht wird. Ferner wird angenommen, daß weitere nicht bekannte Wuchsstoffe das Wachstum der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien begünstigen können. So wurde in teilweise hydrolysiertem Caseinpepton und Hefeextrakt ein wachstumsfördernder Faktor beobachtet, der von Kohle adsorbiert wird, hitzestabil und dialysierbar ist. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Stoff um ein oder mehrere Peptide.

Die Milchsäurebakterien des Weines benötigen zum Wachstum eine Reihe von Vitaminen der B-Gruppe. Diese Substanzen sind Bestandteile von Enzymen oder Cofaktoren und haben als solche die gleiche Bedeutung für die Milchsäurebakterien wie für andere Organismen. Eine besondere Bedeutung kommt lediglich dem Biotin für die Bildung des adaptiven Äpfelsäureenzym zu (BLANCHARD und Mitarb. 1950, ABLES und Mitarb. 1961, PLAUT 1961).

d) Mineralstoffe

Bisher ist die Bedeutung von Mineralstoffen für die Milchsäurebakterien des Weines nur wenig bearbeitet worden. Diese Bakterien werden die gleichen Elemente benötigen wie auch andere Mikroorganismen. Der tatsächliche Bedarf an Mineralstoffen für die Bakterien des biologischen Säureabbaus ist sehr gering. Da beim Äpfelsäureabbau in einem Traubenmost nur etwa 50 mg Bakterienmasse je Liter gebildet werden (RADLER 1958d), wird von diesen Zellen kaum mehr als 1 — 2 mg mineralischer Substanz aufgenommen werden.

Wenn aus Traubenmost, Hefewassermedium oder Tomatensaftnährlösung die Kationen durch Behandlung mit Ionenaustauschern (Entaschung) entfernt werden, dann ist in diesen Substraten kein Wachstum und kein Abbau von Äpfelsäure durch „*B. gracile*“ mehr möglich (ZICKLER 1956). Bei „entaschtem“ Traubenmost oder Tomatensaft konnte ein Wachstum der Bakterien erzielt werden, wenn K^+ , Na^+ , Ca^{2+} und Mn^{2+} wieder zugesetzt wurden. In „entaschtem“ Hefewasser wurde auch schon bei Zusatz von K^+ ein geringes Wachstum beobachtet. Natrium kann Kalium nur teilweise ersetzen, nämlich nur soweit es die Azidität reguliert. Mangan kann durch Magnesium ersetzt werden; Äpfelsäure wird nur abgebaut, wenn wenigstens eines dieser beiden Elemente vorhanden ist. Bereits 2 mg Magnesium je Liter wurden als optimal für das Bakterienwachstum angesehen. Mangan ist für das Wachstum von Milchsäurebakterien von Bedeutung. Als Kofaktor des Äpfelsäureenzym (OCHOA 1952), kann es teilweise durch Magnesium ersetzt werden. Von PEYNAUD (1955) wird angegeben, daß 2 — 5 mg Mn (als Sulfat) den biologischen Säureabbau fördern.

BOCKER (1959) berichtet, daß Traubenmoste aus muschelkalkhaltigen Lagen reicher an basischen Mineralstoffen, insbesondere Kalium und Magnesium sind, als Traubenmoste aus Weinbergen mit Buntsandstein- oder Lößlehmboden. Trauben haben mit zunehmender Reife einen höheren Mineralstoffgehalt. Es wird nun vermutet, daß der biologische Säureabbau vom Kaliumgehalt des Mostes abhängig ist und um so schneller ausgelöst wird, je höher der relative Kaliumgehalt ist. Da Moste aus reiferen Trauben und Moste mit einem höheren Kaliumgehalt in der Regel auch einen höheren pH-Wert (der leider nicht bestimmt wurde) aufweisen, dürfte diesem Faktor bei der beobachteten Förderung des Säureabbaus eine vielleicht wesentlichere Rolle als dem K-Gehalt zukommen. RENTSCHLER und Mitarb. (1954) messen dem Kaliumgehalt eine Bedeutung beim biologischen Säureabbau bei. Durch Mostentsäuerung mit Calciumcarbonat bleibt der Kaliumgehalt des Weines weitgehend erhalten, was für den Säurerückgang günstig sein soll. Es wird jedoch darauf hingewiesen, daß durch die Entsäuerung gleichzeitig der pH-Wert erhöht wird.

Neben den genannten Kationen werden von den Milchsäurebakterien sicher noch eine Reihe von Spurenelementen und einige Anionen wie Phosphat und Sulfat benötigt werden. Bisher liegen jedoch darüber keine Untersuchungen vor. Abgesehen von dem Bedarf an Mangan für die Reaktionen des Äpfelsäureenzym gibt es keine Hinweise dafür, daß die Bakterien des biologischen Säureabbaus besondere Ansprüche an den Mineralstoffgehalt des Mediums stellen.

Feinstverteilter elementarer Schwefel bewirkt nach SCHA DERL (1954) eine ausgeprägte Wachstumsförderung von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien in Trauben- und Birnenmost. Ein Zusatz der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein zeigt dagegen eine vergleichsweise nur geringe Wachstumsförderung. Von JERCHEL und Mitarb. (1956) wurde ebenfalls beobachtet, daß 10 mg ‰ Schwefel in seiner gelben α -Form eine Wachstumssteigerung bei „*B. gracile*“ hervorrufen. Elementarer Schwefel kommt

im Traubenmost nicht vor, kann aber im Wein unter Umständen aus schwefliger Säure und Schwefelwasserstoff entstehen. Die Bakterienzellen sollen den Schwefel in die Zellen einlagern; über den Wirkungsmechanismus ist nichts bekannt.

e) Wachstumshemmend wirkende Faktoren

Traubenmost und Wein sind keine Substrate, die ein optimales Wachstum von Bakterien gestatten. Wegen der außerordentlich ungünstigen Wachstumsbedingungen ist es daher nur einer geringen Zahl von spezialisierten Keimen möglich, in diesen Substraten nicht nur zu überleben, sondern zu wachsen und sich zu vermehren. Von folgenden Faktoren ist zu erwarten, daß sie das Wachstum der Bakterien hemmen oder begrenzen: 1. Alkohol, 2. Schweflige Säure, 3. Säureanionen, 4. Wasserstoffionenkonzentration, 5. Gerbstoffe und ähnliche Verbindungen, 6. Sauerstoff und Kohlensäure, 7. Konservierungsmittel, Antibiotika u. a. Im folgenden soll versucht werden, die Bedeutung dieser Faktoren für die Milchsäurebakterien des Weines, insbesondere die Äpfelsäureabbauenden, aufzuzeigen. Es muß dabei wiederum darauf hingewiesen werden, daß sich die verschiedenen Bakterienarten und -stämme, vor allem unter unterschiedlichen Bedingungen, keineswegs gleichartig verhalten. Es ist kaum möglich, die einzelnen hemmenden Faktoren für sich allein zu betrachten, da sie ja stets gleichzeitig vorkommen und gemeinsam auf das Bakterienwachstum einwirken.

a) Äthylalkohol

Äthylalkohol wird wegen seiner bakteriziden Eigenschaft als Desinfektionsmittel verwendet; es ist daher selbstverständlich, daß der bei der Gärung des Weines entstehende Alkohol einen sehr wesentlichen Einfluß auf das Wachstum der Bakterien ausübt. Schwierigkeiten bereitet es jedoch anzugehen, welche Alkoholkonzentrationen ein Bakterienwachstum vollständig verhindern können.

Bereits von KOCH (1900) wurde auf die Hemmwirkung des Alkohols für den biologischen Säureabbau hingewiesen; 70 g Alkohol je Liter (= 8.8 Vol.-%) verzögert das Bakterienwachstum und bei 90 g Alkohol je Liter (= 11.3 Vol.-%) war auch nach 5 Monaten kein Wachstum zu beobachten. SEIFERT (1903) stellte ebenfalls die hemmende Wirkung des Alkohols fest; bei 3.8—6.1 Vol.-% Alkohol begann das Bakterienwachstum bereits nach 14 Tagen, bei 9 Vol.-% erst nach 20 Tagen; höhere Alkoholkonzentrationen verhindern das Wachstum der säureabbauenden Bakterien. Auf Grund von Kellerversuchen konnte OMEYS (1911, 1912) feststellen, daß der Säureabbau mit steigendem Alkoholgehalt des Weines verlangsamt wird. HALENKE und KRUG (1911) empfehlen deshalb zur Unterstützung des Säureabbaus säurereiche Weine nicht zu stark zu zuckern; 100 g Alkohol je Liter (= 12.6 Vol.-%) sollen die Säureabnahme beeinträchtigen und somit säureerhaltend wirken. Auch MÜLLER-THURGAU und OSTERWALDER (1913) beobachteten bei 9.66 Vol.-% Äthylalkohol eine Hemmung und bei 9.65 Gew.-% Alkohol (= 12.0 Vol.-%) eine sehr starke Verlangsamung des Wachstums der Äpfelsäureabbauenden Bakterien. Nach ARENA (1936) sind „*Micrococcus*“-Arten gegen Alkohol empfindlicher, sie werden bereits bei 8 Vol.-% Alkohol gehemmt und wachsen bei 12 Vol.-% Alkohol nicht mehr. Stäbchenförmige Organismen sollen bis 12 Vol.-% nicht wesentlich in ihrem Wachstum beeinflusst werden, vergl. auch VAUGHN (1955). Nach ZICKLER (1956) wird durch einen Zusatz von 10 Vol.-% Alkohol das Wachstum von „*B. gracile*“ stark verzögert, wenn nicht ganz unterdrückt; FLESCHE und JERCHEL (1958) fanden, daß dieser Organismus bei 12 Vol.-%

Alkohol gehemmt wird und bei 14 Vol.-% Alkohol keine Milchsäure mehr bildet. Bei einer schleimbildenden, aus Apfelwein isolierten, *Lactobacillus*-Art bewirken 6 Vol.-% Äthylalkohol eine Verzögerung des Wachstumsbeginns und 10 Vol.-% eine starke Verringerung des Wachstums (MILLIS und Mitarb. 1958). RADLER (1958e) fand, daß das Wachstum (d. h. die nach 10 Tagen gebildete Bakterienmasse) von vier aus Wein isolierten säureabbauenden Bakterien bereits durch 6 Vol.-% Äthylalkohol gehemmt wird. Bei höheren Konzentrationen als 10 Vol.-% Alkohol war nur noch ein sehr geringes Wachstum meßbar. DUPUY und MELAMED (1959) beobachteten, daß *Lactobacillus arabinosus* in Traubenmost auch noch bei 12 Vol.-% Alkohol im Verlauf eines Monats etwas wachsen kann. PEYNAUD (1955) berichtet, daß eine Änderung des Alkoholgehaltes von 10 Vol.-% auf 13,5 Vol.-% keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit des biologischen Säureabbaus hatte.

Es wurden jedoch auch Milchsäurebakterienstämme mit höherer Alkoholtoleranz beobachtet; BIDAN (1956) konnte bei aus Wein isolierten Milchsäurebakterien noch bei 17—20 Vol.-% Alkohol ein geringes und verzögertes Wachstum erkennen. In Dessertweinen, deren Alkoholgehalt durch Zusatz von Destillat erhöht worden ist, kommen Milchsäurebakterien vor (FORNACHON 1936, DOUGLAS und McCLUNG 1937, CRUESS 1943, VAUGHN 1955). Diese Keime können noch bei Alkoholkonzentrationen von 18—22 Vol.-% langsam wachsen und den Wein durch Bildung von flüchtiger Säure und Milchsäure aus Zucker verderben.

Unter Umständen kann Alkohol das Bakterienwachstum sogar begünstigen. OLSEN (1948) konnte aus Obstwein Milchsäurebakterienstämme isolieren, deren Wachstum bei Gegenwart von 5—15 Vol.-% optimal war. Auch DUPUY und MELAMED (1959) fanden, daß das Wachstum von *Lactobacillus arabinosus* in einem Medium mit einem Gehalt von 2% Bacto-Trypton durch die Gegenwart von Alkohol begünstigt wurde. Dies sind jedoch nur selten beobachtete Sonderfälle.

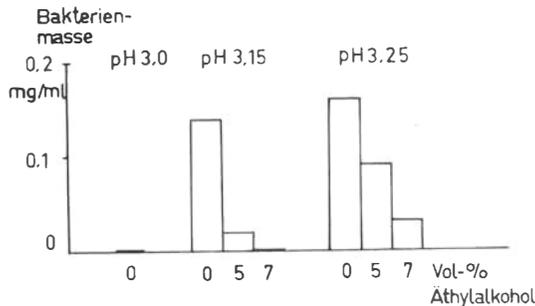


Abb. 3: Der Einfluß von pH-Wert und Äthylalkoholkonzentration auf das Wachstum von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien (Stamm 12a. *Leuconostoc*)

Es ist schon wiederholt darauf hingewiesen worden, daß die Hemmwirkung des Äthylalkohols durch weitere hemmend wirkende Faktoren beeinflusst wird. Von FLESCHE und JERCHEL (1960) wurde die Abhängigkeit der Milchsäurebildung bei „*B. gracile*“ von pH-Wert (3,5-5,5) und Alkoholkonzentration (5-11 Vol.-%) untersucht und eine additive Wirkung dieser beiden Faktoren festgestellt. Abb. 3 zeigt wie das Bakterienwachstum eines Äpfelsäure-abbauenden Bakteriums (*Leuconostoc*) durch Alkohol und Wasserstoffionenkonzentration beeinflusst wird. Die Bakterienmasse ist nach etwa 10 Tagen bestimmt worden, bei längerer Versuchsdauer erfolgt eine weitere Bakterienvermehrung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bereits Alkoholkonzentrationen von weniger als etwa 7 Vol.-% das Wachstum von Milchsäurebakte-

rien verzögern. Die meisten aus Wein isolierten Keime werden jedoch erst bei Alkoholkonzentrationen von mehr als 12 — 15 Vol.-% vollständig im Wachstum gehemmt. Organismen, die bei noch höheren Alkoholkonzentrationen (18 — 22 Vol.-%) wachsen können, sind sehr empfindlich gegen hohe Wasserstoffionenkonzentration und vermögen bei niedrigeren pH-Werten als pH 3,6 nicht mehr zu wachsen.

β) Schweflige Säure

Wohl der wichtigste Faktor, der das Wachstum der Milchsäurebakterien im Wein beeinflusst, ist die schweflige Säure. Sie ist antimikrobiell wirksam, wird aber dem Wein oder Traubenmost zugesetzt, um den bei der Gärung entstehenden Acetaldehyd zu binden, einen Oxydationsschutz zu gewährleisten, die Polyphenoloxidasen zu inaktivieren und die unerwünschten, nur schwach gärenden oder oxydativ wachsenden Hefen zu unterdrücken. Gegen Bakterien ist schweflige Säure wesentlich wirksamer als gegen gärende Hefen, die erst bei hohen Konzentrationen völlig gehemmt werden. Der Zusatz der schwefligen Säure zum Most oder Wein erfolgt entweder durch Verbrennen von elementarem Schwefel im Behälter vor der Füllung, durch Zusatz von wässrigen SO_2 -Lösungen, SO_2 -Gas, oder durch Zugabe von Kaliumpyrosulfit.

Eine quantitative Beurteilung der Wirksamkeit der schwefligen Säure ist schwierig, da im wesentlichen das undissoziierte Molekül antimikrobiell wirksam ist. Der Anteil des undissoziierten Moleküls steht mit den Ionen HSO_3 und SO_3 in einem pH-abhängigen Gleichgewicht. (Eine Übersicht über die antimikrobielle Wirkung der schwefligen Säure geben REHM und WITTMANN 1962). Mit zunehmender Wasserstoffionenkonzentration nimmt die Dissoziation ab und gleichzeitig die antimikrobielle Wirkung der schwefligen Säure zu. Die sogenannte „freie schweflige Säure“ liegt also als undissoziiertes Molekül und in Ionenform vor. Die im Wein überwiegend an Acetaldehyd „gebundene schweflige Säure“ ist für Hefen antimikrobiell unwirksam. Milchsäurebakterien des Weines können dagegen aus Acetaldehydschwefliger Säure SO_2 frei setzen, die dann das Bakterienwachstum hemmt (FÖRNACHON 1963). Ferner scheint die Aldehydschweflige Säure selbst das Bakterienwachstum zu beeinträchtigen, da die Hemmwirkung der SO_2 nicht durch Zusatz von Acetaldehyd zum Medium aufgehoben werden kann. — Im Wein ist die Bindung von schwefliger Säure an Zucker gering, jedoch sollen unbekannte Weinbestandteile SO_2 binden (KIELHÖFER und WÜRDIG 1960).

Unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse wird es in der Regel möglich sein, die Zusammenhänge zwischen bakteriellem Säureabbau und schwefliger Säure zu verstehen und auch sehr abweichende Versuchsergebnisse zu interpretieren. Leider ist bisher nicht bekannt, unter welchen Bedingungen und bei welchen Konzentrationen an schwefliger Säure die Milchsäurebakterien im Wein völlig abgetötet werden. Sie wird nämlich, besonders bei Gegenwart von Eisenionen, allmählich oxydiert und verliert dann ihre antimikrobielle Wirksamkeit. Wenn also durch die erste Zugabe von schwefliger Säure die Mikroorganismen nicht abgetötet worden sind, wird man in der Regel erwarten können, daß die Keime nach Absinken des SO_2 -Gehaltes zu wachsen beginnen. Bei langfristigen Versuchen wird aus diesem Grund auch bei recht hohen Anfangskonzentrationen an schwefliger Säure noch ein Wachstum der Milchsäurebakterien möglich sein.

Die Wirkung der schwefligen Säure auf den biologischen Säureabbau war schon sehr frühzeitig erkannt worden. SEIFERT (1901) warnte bereits vor dem Einschwefeln sehr saurer Weine, weil dadurch auch die säurezersetzenden Bakterien in Mitleiden-schaft gezogen werden und übermäßiges Schwefeln den weiteren Ausbau des Weines stark verzögern kann. OMEIS (1911, 1912) beobachtete, daß vor allem das Schwefeln der Fässer bei den Abstichen den biologischen Säureabbau stark hemmt.

Durch einen Zusatz von 100 — 150 mg schwefliger Säure wird der biologische Säureabbau oder das Wachstum von Milchsäurebakterien im Wein verzögert oder gar in Frage gestellt (PEYNAUD 1955, VAUGHN 1955), in Nährlösungen kann bereits bei Konzentrationen von weniger als 100 mg je Liter eine sehr starke Hemmung des Wachstums (Bakterienmasse nach 10 Tagen) beobachtet werden (RADLER 1958e). Nach SUDRAUD und CASSIGNARD (1958) haben 25 mg schweflige Säure je Liter nur eine sehr geringe Wirkung, erst ab 50 mg wird eine Hemmung des Bakterienwachstums beobachtet. Durch eine Mostschwefelung mit 50 — 100 mg SO₂ je Liter soll eine Verzögerung des biologischen Säureabbaus um 40 — 60 Tage bewirkt werden. Nach SCHANDERL (1954) sollen allerdings die normalerweise bei der Mostschwefelung angewendeten SO₂-Mengen den Säureabbau im fertigen Wein nicht beeinträchtigen. Versuche von FELL (1961) zeigen, daß der biologische Säureabbau auch bei Gegenwart von Hefe durch Zusatz von 100 mg schwefliger Säure um 30 Tage verzögert wird. FLESCH und JERCHEL (1958) konnten in Birnensaftmedium Milchsäurebildung durch „*B. gracile*“ nach vierwöchigem Wachstum bei Gegenwart von ca. 50 bis 200 mg schwefliger Säure beobachten. OLSEN (1948) hatte gefunden, daß aus Obstwein isolierte Milchsäurebakterien sehr unterschiedliche Mengen an schwefliger Säure ertragen können; eine vollständige Hemmung erfolgt erst bei etwa 200 mg SO₂ je Liter. Nach CHARPENTIÉ (1954) erfolgt in Weißweinen der Säureabbau sehr leicht, wenn sie nicht geschwefelt werden, 100 — 300 mg schweflige Säure und evtl. auch schon geringere Zusätze hemmen sehr stark.

BERGERET (1958b) stellte fest, daß der biologische Säureabbau gewöhnlich vor dem Abstich erfolgt, wenn nicht mehr als 40 mg Gesamt-SO₂ und 6 — 10 mg freie schweflige Säure je Liter vorhanden sind. Unter diesen Bedingungen soll auch ein niedriger pH-Wert und eine niedrige Temperatur den Säureabbau nicht hemmen. Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen, wonach Milchsäurebakterien noch bei 0,5 ‰ schwefliger Säure ein schwaches Wachstum erkennen lassen (ARENA 1936). In Kellergroßversuchen wurde von PAUL (1954) noch ein Säureabbau nach Zusatz von 350 mg schwefliger Säure je Liter beobachtet, allerdings war bei diesen Versuchen der Gehalt an freier schwefliger Säure auf 18 mg je Liter abgesunken.

Ohne Zweifel ist die schweflige Säure der wichtigste Faktor, der das Wachstum der Milchsäurebakterien und damit den biologischen Säureabbau begrenzt. Wenn durch die Gärung ein großer Teil der schwefligen Säure gebunden werden kann, wird auch nach hohen SO₂-Zusätzen das Bakterienwachstum nach einer zeitlichen Verzögerung einsetzen. Wenn dagegen der Gehalt an wirksamer schwefliger Säure nicht verringert wird, dann ist bereits bei Konzentrationen von 100 — 200 mg je Liter mit einer mehr oder weniger vollständigen Hemmung des Bakterienwachstums zu rechnen. Der Mechanismus der Wirkung der schwefligen Säure ist bisher nicht genau bekannt. Orientierende Versuche lassen vermuten, daß auch das Äpfelsäureenzym bereits durch geringe Mengen von SO₂ gehemmt wird (RADLER, unveröffentl.).

γ) Säureanionen

Die Anionen der im Wein vorkommenden Carbonsäuren können vielen Mikroorganismen als Kohlenstoffquelle dienen. Im allgemeinen wird diesen Säuren, in den im Wein und Most vorliegenden Konzentrationen, keine wesentliche Wirkung auf das Wachstum von Milchsäurebakterien zugesprochen. FLESCH und JERCHEL (1958) fanden aber, daß bereits 1 g Weinsäure je Liter (bei pH 3,5) eine Verzögerung der Milchsäurebildung durch „*B. gracile*“ bewirkt. Im Gegensatz dazu wurde von RADLER (1958e) nachgewiesen, daß das Wachstum von *Lactobocillus plantarum* und 4 aus Wein isolierten Äpfelsäure-abbauenden Bakterien in einer Tomatensaftlösung, bei pH 5,2, auch durch 20 g Weinsäure je Liter nicht nennenswert beeinflußt wird. Metaweinsäure, die dem Wein zur Verzögerung des Weinsteinausfalls zugesetzt wird, hat bei einer Konzentration von 100 mg je Liter keinen Einfluß auf den biologischen Säureabbau (SUDRAUD und CASSIGNARD 1958).

δ) Wasserstoffionenkonzentration

Für das Wachstum von Bakterien ist die Wasserstoffionenkonzentration des Mediums von entscheidender Bedeutung. Wein und Most haben einen sehr niedrigen pH-Wert und es ist zunächst überraschend, daß sich in einem solch ungünstigen Milieu überhaupt Bakterien entwickeln können. Wie bereits für die anderen Faktoren angeführt, gilt auch für die Wasserstoffionenkonzentration, daß nicht nur sie allein auf das Bakterienwachstum einwirkt. Darüber hinaus zeigen die verschiedenen Bakterienarten und -stämme große Unterschiede in ihrem Verhalten. Nach CHARPENTIE (1954) bestehen sogar Beziehungen zwischen dem pH-Wert des Weines, aus dem das zur Einsaat verwendete Bakteriensediment stammte, und dem Grenz-pH-Wert, der das Wachstum dieser Organismen einschränkt.

Der pH-Wert der Traubenmoste und Weine (pH 2,8 — 4,0) liegt in dem Grenzbereich, in dem ein Wachstum von einigen spezialisierten Bakterien gerade noch möglich ist. Das Wachstumsoptimum der aus Wein isolierten Milchsäurebakterien liegt oberhalb von diesem Bereich, in der Regel zwischen pH 4,0 und 6,0 (OLSEN 1948, FORNACHON 1936, FORNACHON und Mitarb. 1940, LÜTHI 1957c, CARR 1960, INGRAHAM und Mitarb. 1960). Der Grenzwert des Wachstums im alkalischen Bereich ist nur von geringem Interesse und daher nur selten bestimmt worden. Eine Übersicht über die Kardinalbereiche der Reaktion für Milchsäurebakterien aus Apfelwein gibt Tabelle 6.

Tabelle 6

Kardinalbereiche der Reaktion für aus Apfelwein isolierte Milchsäurebakterien, nach CARR (1960)

Organismen	optimales Wachstum pH	Wachstums- minimum pH	Wachstums- maximum pH
heterofermentative Stäbchen	4,0 — 6,0	3,2	7,2
homofermentative Stäbchen	5,8 — 7,0	4,0	7,4
heterofermentative Coccen	4,0 — 6,0	3,2	6,5

Es besteht kein Zweifel darüber, daß der minimale pH-Wert, unterhalb dessen kein Wachstum für Milchsäurebakterien im Wein mehr möglich ist, im Bereich von pH 2,8 — 3,2 liegt. RADLER (1958e) zeigte, daß unterhalb von pH 3,0 kein nennenswertes Wachstum von *Lactobacillus plantarum* und vier aus Wein isolierten Milchsäurebakterien mehr zu beobachten ist. RIPPEL (1942) war es nicht möglich „*B. gracile*“ in Hefewasser bei pH 3 zu kultivieren. ARENA (1936) prüfte das Wachstum der aus Wein isolierten Bakterien nur bis pH 3,5 und stellte bereits bei diesem Wert eine Verminderung der Säurebildung fest. VAUGHN (1955) gibt an, daß Werte unterhalb von pH 3,2 — 3,5 das Bakterienwachstum begrenzen, was allerdings in Kalifornien ohne Bedeutung ist, da die Weine nicht unterhalb von diesem Bereich liegen. PEYNAUD (1955) sieht in dem pH-Wert den Hauptfaktor für den biologischen Säureabbau, da unterhalb von pH 3 im Laboratorium ein Abbau der Äpfelsäure in der Regel nicht gelingt. Auch FLESCH und JERCHEL (1958) sprechen dem pH-Wert eine große Bedeutung zu, da in allen Traubensäften und Weinen der Äpfelsäureabbau mit Sicherheit einsetzt, wenn der pH-Wert vor dem Beimpfen auf 4,0 oder 4,5 heraufgesetzt wird. Auch in „nicht abbaufähigen“ Weinen konnte das Bakterienwachstum in Gang gebracht werden, wenn der pH-Wert erhöht wurde. Weitere Zusätze waren nicht nötig. BEECH (1958) nimmt an, daß in Apfelweinen bereits Werte von pH 3,3 — 3,4 kritisch für den Äpfelsäureabbau sind. Bei hohen pH-Werten soll andererseits in Apfelsäften der Äpfelsäureabbau bereits vor der Hefegärung beginnen. Ein von DUPUY und MELAMED (1959) aus Wein isoliertes Milchsäurebakterium zeigte in Traubenmost bei pH 4,53 — 4,17 sehr gutes Wachstum, wuchs verzögert bei pH 3,74 — 3,47 und bei pH 3,15 erst nach 20 Tagen. Bei pH 2,95 war nur bei Gegenwart von 5 % Bacto-Trypton noch ein Wachstum möglich. BIDAN (1956) konnte seine aus Wein isolierten Organismen ebenfalls bei pH 2,85 — 2,90 nicht mehr kultivieren und auch bei pH 3,20 — 3,25 wuchsen zwei der Stämme nicht.

Dagegen wurde von MARTIN (1948) ein Bakterium aus lindem Wein isoliert, das noch bei pH 2,8 wachsen konnte und OLSEN (1948) berichtet sogar, daß sich „*Betabacterium arabinosaceum*“ nach einem Monat noch bei pH 2,4 entwickelt habe. Von LÜTHI (1957c) wurde ein sehr geringes Wachstum bei pH 2,85 beobachtet, ebenso von FLESCH und JERCHEL (1958) in einem Fall bei pH 2,6. In einem halbsynthetischen Medium wurde durch Anwendung von Bakterien-Hefe-Mischkulturen bei pH 2,98 ein vollständiger und bei pH 2,85 ein teilweiser Abbau der Äpfelsäure erzielt (RADLER 1960). Nach BERGERET (1958b) ist in Weinen aus Burgund auch bei pH 2,78 noch ein Äpfelsäureabbau möglich, sofern die Moste nur eine geringe Schwefelung (50 — 70 mg SO₂ je Liter) erhielten.

Im Gegensatz zu diesen sehr säuretoleranten Keimen des typischen biologischen Säureabbaus können Bakterien, die in Dessertwein unerwünschte Umsetzungen durchführen, erst bei pH-Werten von 3,7 — 3,8 zur Entwicklung kommen (FORNACHON 1936, DOUGLAS und McCLUNG 1937).

ZICKLER (1956) empfiehlt zur Verhinderung des Säureabbaus 8 g Weinsäure je Liter zum Wein zuzusetzen. Der biologische Säureabbau soll dabei durch Verminderung des Kaliumgehaltes gehemmt werden. Abgesehen davon, daß diese Maßnahme ungesetzlich ist und in geschmacklicher Hinsicht kaum vertretbar sein dürfte, kann angenommen werden, daß für die Unterdrückung des Säureabbaus nicht der Kaliumgehalt maßgebend ist, sondern die durch Weinsäurezusatz bewirkte Herabsetzung des pH-Wertes auf pH 2,8.

Ohne jeden Zweifel wird das Wachstum der Bakterien vom pH-Wert des Mediums sehr wesentlich beeinflusst. Obwohl saure Weine mit ihrem pH-Wert im Grenzbereich liegen, in dem ein Wachstum für Bakterien gerade noch möglich ist, wird man den pH-Wert wahrscheinlich nicht als einzigen oder wesentlichen Faktor für die Hemmung des Äpfelsäureabbaus ansehen dürfen. Es wird jedoch immer damit zu rechnen sein, daß in Weinen mit niedrigeren pH-Werten als pH 3,0 — 3,1 der biologische Säureabbau unterbleibt, besonders wenn zusätzlich weitere Faktoren das Wachstum der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien behindern.

ε) Gerbstoffe und ähnliche Verbindungen

Der Gerbstoff- oder Tanningehalt des Mostes oder Weines wird ebenfalls als ein Faktor angesehen, der das Wachstum von Bakterien beeinflusst (MASQUELIER und JENSEN 1953). So soll Tannin das Wachstum von Bakterien im Wein hemmen. Aus geschmacklichen Gründen ist es nicht möglich, es als antibakterielles Mittel dem Wein zuzusetzen (VAUGHN 1955).

CASIOR (1953a) beobachtete bei der mikrobiologischen Bestimmung von Aminosäuren mit Milchsäurebakterien als Testkeimen in Traubenmost Faktoren, die das Analysenergebnis in Abhängigkeit von der Menge der angewandten Probe veränderten. Bei der Bestimmung von Glutaminsäure, Asparaginsäure und Cystin wurde mit steigender Konzentration des Substrates eine relative Verminderung der Milchsäurebildung und bei der Bestimmung von Isoleucin eine entsprechende Förderung der Milchsäurebildung beobachtet. Die Faktoren, die die Hemmung der Milchsäurebildung, also des Bakterienwachstums bewirkten, konnten durch Sieden oder durch Verdünnen mit dem fünf-fachen Volumen Alkohol, Filtration und Entfernen des Alkohols im Vakuum, entfernt werden. Tannin aus Traubenkernen hemmt ebenfalls die Milchsäurebildung, kann aber nicht der einzige im Traubenmost wirksame Faktor sein, da keine gute Korrelation zwischen dem Tanningehalt des Traubenmostes und der Hemmung der Milchsäurebildung gefunden wurde. Bactericide Polyphenole werden von SUDRAUD und CASSIGNARD (1958) als Ursache dafür angesehen, daß bei Rotweinen im ungepreßten Traubenmost (Vorlauf) der Säureabbau besser und schneller erfolgt als in dem durch Keltern gewonnenen Most. DUPUY und MELAMED (1959) fanden, daß durch Verdünnen eines künstlichen Nährmediums mit Wasser oder ein Jahr altem Traubenmost selbst bei konstant gehaltenem pH-Wert (3,2) das Wachstum von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien im Medium mit Traubenmost verzögert ist. Es wird angenommen, daß Traubenmost Hemmstoffe enthält, da die Hemmung des Bakterienwachstums durch Behandlung mit Gelatine oder mit Casein (durch Alkohol ausgefällt) weitgehend aufgehoben werden konnte. Auch von FLESCH und JERCHEL (1959) wird vermutet, daß in Weinen hemmende Stoffe vorkommen; in vier Weinen, die allerdings schon 1 — 2 g Milchsäure je Liter enthielten, konnte auch nach Ausfällen der Weinsäure und Entgeisten, trotz Beimpfen mit „*B. gracile*“ keine weitere Zunahme der Milchsäure beobachtet werden.

Es ist durchaus möglich, daß in Rotweinen die Anthocyane einen Einfluß auf das Wachstum der Bakterien ausüben. POWERS und Mitarb. (1960) untersuchten die Wirkung von Anthocyanen auf *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* mit dem Plättchentest. *Lactobacillus casei* war weniger empfindlich als die anderen Organismen. Durch Anthocyanextrakte aus Wein wurde *Lactobacillus casei* nicht gehemmt, sondern eher leicht gefördert. Während Malvidin-3,5-diglucosid

und Malvidin im allgemeinen fördernd wirkten, hemmten 10 mg je Plättchen Malvidin-3,5-diglucosid und Pelargonidin-3-monoglucosid das Wachstum von *Lactobacillus casei*. PRATT und Mitarb. (1960) zeigten, daß Stachelbeer- und Traubenanthocyanine das Wachstum von *Escherichia coli* und *Lactobacillus acidophilus* beeinflussen. Durch Gegenwart von 50 mg % Pelargonidin-3-monoglucosid oder Delphinidin-3-monoglucosid wurde das maximale Wachstum von *Lactobacillus acidophilus* um 30 % vermindert. Von 6 Fraktionen, die durch Hitzeabbau in 1 n Salzsäure aus Pelargonidin-3-monoglucosid gewonnen wurden, hemmten einige *Lactobacillus casei*, andere förderten dessen Wachstum (HAMDY und Mitarb. 1961). Die Wachstumsförderung wird auf die Veränderung des Redoxpotentials zurückgeführt und außerdem besteht die Möglichkeit, daß *Lactobacillus casei* die β -glykosidische Bindung der Anthocyane spalten und dann die freiwerdende Glucose verwerten kann.

Wenn auch die im Wein vorkommenden Gerbstoffe und Polyphenole einen Einfluß auf das Wachstum von Milchsäurebakterien ausüben können, so kommen diese Stoffe in der Regel nur in geringen Konzentrationen vor. Es ist deshalb wenig wahrscheinlich, daß diese Substanzen im Wein das Wachstum der Milchsäurebakterien und insbesondere die Äpfelsäure-abbauenden Organismen wesentlich beeinflussen.

ζ) Sauerstoff und Kohlensäure

Die in Wein und Most vorkommenden Mikroorganismen gelten im allgemeinen als mikroaerophil, d. h. sie benötigen keine nennenswerten Sauerstoffmengen zum Wachstum, können aber auch bei Gegenwart von Sauerstoff wachsen. In der Regel können diese Keime in Nährlösungen oder Stichkulturen ohne Luftabschluß kultiviert werden. Von CHARPENTÉ (1954) wurde der Einfluß von Sauerstoff auf das Wachstum von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien untersucht. Es konnte kein Unterschied im Wachstum der Bakterien unter aeroben oder anaeroben Bedingungen gefunden werden. Unter völliger Anaerobiose, wenn also der zur Kultur verwendete Wein zur restlosen Entfernung des Sauerstoffs bereits einen Monat vor Einsaat der Bakterien unter alkalischer Pyrogalllösung aufbewahrt wurde, konnte eine geringe Hemmung des Bakterienwachstums beobachtet werden. Sauerstoff hemmt den biologischen Säureabbau also nicht, sondern fördert ihn in geringen Mengen. Eine vollständige Anaerobiose ist für die Äpfelsäure-abbauenden Bakterien — ebenso wie für Hefen — nicht günstig. Nach PEYNAUD (1955) wird der biologische Säureabbau im Wein sogar durch Lüftung gefördert und selbst durch Sättigung mit Sauerstoff nur verzögert, aber nicht verhindert.

Bei der alkoholischen Gärung entstehen große Mengen an Kohlensäure. Da Kohlensäure ebenfalls ein Stoffwechselprodukt der Milchsäurebakterien ist, war zu erwarten, daß sie nicht ohne Einfluß auf diese Organismen sein würde. JERCHEL und SCHMIDT (1958) konnten nachweisen, daß vor allem bei höheren Drucken CO_2 das Äpfelsäureenzym hemmt. Außerdem war unter 4 at CO_2 das Bakterienwachstum im Vergleich zu Luft verlangsamt und erreichte nicht die gleiche Zelldichte (SCHMIDT 1959). Andererseits werden von Milchsäurebakterien geringe Mengen an Kohlensäure zum optimalen Wachstum benötigt und bei Kohlensäuremangel wird die „lag-Phase“ verlängert. (WHITEHEAD und Mitarb. 1958).

7) Antibiotika, Konservierungsmittel u. a.

ZICKLER (1956) untersuchte die Wirkung einiger Antibiotika auf das Wachstum von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. In Hefewasser (pH 5) bei Gegenwart von 5‰ Äpfelsäure wird das Wachstum von „*B. gracile*“ bereits durch 2 µg Aureomycin oder Terramycin je ml gehemmt. In sterilem Traubenmost wird der gleiche Keim durch die doppelte Antibiotikamenge gehemmt, der Abbau der Äpfelsäure wird aber schon durch 1 µg je ml dieser Antibiotika unterdrückt. Bei einem Zusatz von 1 — 16 µg Aureomycin zu Wein während des Säureabbaus wurde dieser nicht unterbrochen. Auch wenn Aureomycin dem Wein vor Beginn des Äpfelsäureabbaus zugesetzt wurde, blieb dieser nicht aus, die Äpfelsäure wurde dann durch resistente Kokken abgebaut. In einem unbehandelten Wein waren 2 — 48‰ der Bakterien Kokken, bei Aureomycin-zusatz 425 — 740‰. — Unabhängig von hygienischen Bedenken wird bei der Vielzahl der den Äpfelsäureabbau bewirkenden Organismen durch einen Zusatz von Antibiotika der Säureabbau im Wein kaum zu verhindern sein.

Von KIELHÖFER (1960) wurde beobachtet, daß in Moselwein durch 200 mg Sorbinsäure der bakterielle Säureabbau im Wein nicht gestört wird. Sorbinsäure ist ein Konservierungsmittel, das in dieser Konzentration geschmacklich kaum wahrnehmbar ist und bei unvergorenem Zucker und niedrigem Alkoholgehalt vor Nachgärungen schützen soll. Bei der Isolierung von Milchsäurebakterien ist Sorbinsäure zur Unterdrückung des Hefewachstums bereits mehrfach angewandt worden, siehe Tabelle 1.

Pyrokohlensäurediäthylester, ein Konservierungsmittel, das ebenfalls auf seine Brauchbarkeit zur Verhinderung von Nachgärungen untersucht wird, verhindert bei einer Anwendung von 100 mg je Liter nicht das Wachstum von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien bei einer geringen Einsaat von nur etwa 100 Zellen je ml (MAYER und LÜTHI 1960). In unvergorenen Apfelsäften wird sogar noch nach einem Zusatz von 600 mg je Liter ein Wachstum von Bakterien und Pilzen beobachtet (LÜTHI und Mitarb. 1961).

Durch eine Behandlung von zentrifugiertem Traubenmost mit dem Enzympräparat Pectinol 100 D (1,5 g je Liter) zur Spaltung von Pektinen, wird das Wachstum von *Lactobacillus arabinosus* nicht beeinträchtigt (DUPUY und MELAMED 1959).

Zu erwähnen sei noch, daß Milchsäurebakterien (*Lactobacillus pastorianus*) im Bier auch durch große Mengen Hopfen nicht im Wachstum gehemmt werden, lediglich die „initial stationary phase“ kann etwas verlängert werden. MILLIS und Mitarb. (1958) beobachteten, daß eine schleimbildende *Lactobacillus*-Art bei Gegenwart von 0,0005‰ Humulon nicht wuchs und daß das Wachstum bei 0,00025‰ Humulon verzögert war.

Hühnereiweiß, das zur Schönung von Wein verwendet wird, enthält Lysozym, das Bakterien durch Auflösen der Zellmembranen abtöten kann. PEYNAUD und DOMERCQ (1961) fanden, daß kristallines Lysozym die Milchsäurebakterien im Wein bis auf einen geringen Prozentsatz resistenter Keime abtötet. Durch Hühnereiweiß wird jedoch im Wein die Zahl der Milchsäurebakterien nicht wesentlich vermindert; möglicherweise wird das Lysozym beim Klären des Weines mit Hühnereiweiß nicht frei, sondern zusammen mit Eiweiß und Gerbstoffen ausgefällt.

2. Physikalische Faktoren

a) Temperatur

Seit dem Beginn der Untersuchungen über die Milchsäurebakterien des Weines wird auf die Bedeutung der Temperatur für das Wachstum dieser Keime hingewiesen. MÜLLER-THURGAU und OSTERWALDER (1913) haben das Wachstum von aus Wein isolierten Milchsäurebakterien bei Kultur in einem säurearmen Obstsaft bei Temperaturen von $6,5 - 34,5^\circ$ verfolgt und die Veränderungen im Gehalt an Gesamtsäure, flüchtiger Säure und Milchsäure bestimmt. Unter diesen Bedingungen erfolgt nicht nur ein Äpfelsäureabbau, sondern es wird auch Milchsäure und flüchtige Säure aus Zucker gebildet. Das Temperaturoptimum lag, wenn man von Abweichungen bei einzelnen Stämmen absieht, etwa im Bereich von $22 - 25^\circ$. Aber auch bei $6,5^\circ$ war — allerdings meist erst nach 79 Tagen — noch eine Milchsäurebildung bei gleichzeitiger Abnahme des Gesamtsäuregehaltes zu beobachten; es erfolgte also auch bei dieser Temperatur ein Äpfelsäureabbau. Diese Beobachtungen sind im Prinzip immer wieder bestätigt oder ergänzt worden.

OMEIS (1910) hat bei Kellerversuchen beobachtet, daß der Säureabbau im geheizten Keller bei $14 - 16^\circ$ leicht, bei 9° aber nicht mehr eintritt. KLENK (1954) hält es ebenfalls für wesentlich, daß für den Säureabbau die Kellertemperatur auf $14 - 18^\circ$ gehalten wird. PEYNAUD (1955) erwähnt, daß Temperaturen von 25° für den Säureabbau besonders günstig sind und SUDRAUD und CASSIGNARD (1958) fanden für den Säureabbau $21 - 27^\circ$ optimal, beobachteten ihn aber auch bei 15° .

Für die Temperatur gilt das gleiche wie für alle anderen Faktoren: Auch im ungünstigen Bereich, also bei niedrigen Temperaturen (unterhalb von 10°) werden die Äpfelsäure-abbauenden Bakterien zur Entwicklung kommen, wenn das Wachstum nicht noch zusätzlich durch andere ungünstige Faktoren beeinträchtigt wird.

Über die Temperaturverträglichkeit von aus Wein isolierten Milchsäurebakterien liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. Es ist aber durchaus möglich, daß dieser Frage bei der zunehmenden Anwendung von Plattenrhitzen zur Entkeimung von Most und Wein eine größere Bedeutung zukommen wird. Da Milchsäurebakterien keine Sporen bilden, werden sie vermutlich etwa von den gleichen Temperaturen abgetötet werden wie die Hefen.

Nach CRUESS (1943) sind für Wein schädliche Organismen gefunden worden, die bei Gegenwart von $19 - 20$ Vol.-% Alkohol wachsen können und $2 - 15$ Minuten bei 80° überdauern; im allgemeinen wird angenommen, daß die Bakterien im Wein durch eine Behandlung von $1 - 2$ Minuten bei 60° abgetötet werden. OLSEN (1948) fand jedoch, daß in einem sauren Wein (pH 3,83) eine Temperaturbehandlung (25 Minuten 60°) nicht den geringsten Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien ausübte. In der Praxis sollen im Plattenrhitze $80 - 90^\circ$ zur Abtötung der Bakterien ausreichen.

b) Kohlensäuredruck, Zentrifugieren, Klären

Kohlensäuredruck übt einen ungünstigen Einfluß auf das Wachstum von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien aus. JERCHEL und SCHMIDT (1958) beobachteten eine Verzögerung des Äpfelsäureabbaus durch „*B. gracile*“ bei Kultur in einem Birnenmost bei einem Kohlensäuredruck von $4 - 6$ Atmosphären.

Von SUDRAUD und CASSIGNARD (1958) wurde gefunden, daß eine Klärung des Weines durch Bentonit oder Gelatine ohne Einfluß auf den Säureabbau ist. Diese Beobachtung steht allerdings im Gegensatz zur landläufigen Auffassung, wonach eine rasche Klärung des Weines zu vermeiden ist, wenn der Säureabbau gefördert werden soll. BEECH (1959) bestimmte die Veränderung des Keimgehaltes von Apfelweinen, die durch das Zentrifugieren von ungeschwefelten Apfelsäften nach Beginn der Gärung verursacht wird. Durch das Zentrifugieren wird das Verhältnis von Bakterien zu Hefen sehr ungünstig verändert, da vor allem die Hefen aus dem Saft entfernt werden.

3. Biologische Faktoren

a) Hefen

Die Milchsäurebakterien kommen im Wein nicht allein, sondern stets zusammen mit den Hefen vor. Es ist daher damit zu rechnen, daß sich diese beiden Organismen gegenseitig beeinflussen. Mengenmäßig überwiegen die Hefen, von denen im Jungwein 1 — 2 g je Liter vorhanden sind, was etwa $10\text{--}100 \cdot 10^9$ Zellen je ml entspricht. Äpfelsäure-abbauende Bakterien werden im Wein kaum 0,05 — 0,1 g je Liter überschreiten (RADLER 1958d). Allein auf Grund dieser Mengenverhältnisse erscheint die Annahme gerechtfertigt, daß der Einfluß der Hefe auf das Wachstum der Bakterien wesentlich größer ist als umgekehrt. Durch die Hefen kann das Wachstum der Milchsäurebakterien im Wein gehemmt werden und zwar durch Bildung von Alkohol (siehe Seite 219) und durch Verbrauch von wichtigen Nähr- und Wachstoffsstoffen. Ferner ist damit zu rechnen, daß Hefen entweder im Verlauf des Wachstums oder bei der Autolyse der Zellen wieder Stoffe — vor allem Aminosäuren und Vitamine — ausscheiden, die das Wachstum der Milchsäurebakterien begünstigen.

Wahrscheinlich ist mit der Wirkung des Alkohols die Beobachtung zu erklären, daß der Äpfelsäureabbau rascher eintritt, wenn die Gärung langsamer verläuft (PEYNAUD 1955). Bei einer Gärdauer von 20 Tagen soll der Säureabbau bereits bis zum Abstich vollendet sein können, während bei einer raschen, nur siebentägigen Gärung, der Säureabbau sich bis zum Frühjahr verzögern kann. Bei der langsamen Gärung konnten sich die Bakterien bei zunächst noch geringen Alkoholkonzentrationen gut entwickeln, während bei raschem Gärungsverlauf die Alkoholkonzentration das Wachstum der Milchsäurebakterien sehr verzögerte. Allerdings sind bei Kellerversuchen häufig mehrere Erklärungen möglich.

Von RADLER (1960) konnte gezeigt werden, daß zunächst von den Hefen dem Traubenmost Stoffe entzogen werden, die für das Wachstum der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien wesentlich sind. Wenn also die Hefen vier Tage nach Gärungsbeginn aus dem Traubenmost entfernt werden, ist das Wachstum der Bakterien unabhängig vom gebildeten Alkohol verzögert. Durch einen Zusatz von vollständigen Nährlösungen, Zucker, Natriumacetat oder Cystein kann im „angegorenen“, aber hefefreien Most wieder ein Abbau der Äpfelsäure durch Milchsäurebakterien erzielt werden.

Zur Stabilisierung von Wein wird es von NIKOVA (1958) als wesentlich angesehen, die Hefen möglichst rasch zu entfernen; dadurch und durch Zusatz von schwefliger Säure soll auch bei einem Restzuckergehalt ein Abbau der Säure verhindert werden können.

Bei der Vergärung von nährstoffarmem Apfelwein wird der Nährstoffaufnahme durch Hefen eine große Bedeutung zugesprochen (CARR 1960). Infolge der Konkurrenz mit den schnellwachsenden Hefen sollen extreme Bakterientypen selektiert werden; diese können Substrate verwerten, die weder von Hefen noch von ähnlichen Bakterien anderer Standorte umgesetzt werden.

Allgemein wird angenommen, daß die Hefen einen günstigen Einfluß auf das Wachstum der Milchsäurebakterien im Wein ausüben. Bereits KOCH (1900) vermutete, daß Hefen Stoffe abgeben, die die Äpfelsäure-abbauenden Bakterien fördern; wenn Wein zusammen mit Hefe sterilisiert wird, dann wachsen in einem solchen Substrat die Bakterien besser als in einem hefefreien Most. Auch SEIFERT (1903) wies auf eine solche positive Beeinflussung des Bakterienwachstums hin. OMEIS (1911, 1912) beobachtete in Kellerversuchen, daß besonders in alkoholreichen Weinen der Säureabbau durch Aufrühren der Hefe gefördert wird und HALENKE und KRUG (1910, 1911, 1912) konnten in einem Wein den Säureabbau nach einer Umgärung im folgenden Jahr beobachten. Später ist von SCHANDERL (1943) auf die Bedeutung der Ausscheidung von Stickstoffverbindungen durch Hefen hingewiesen worden.

Es besteht keinerlei Zweifel daran, daß die Hefen wichtige Bakteriennährstoffe enthalten und an das umgebende Medium abgeben. Der große Nährstoffreichtum der Hefen ist ja schließlich der Grund dafür, daß Hefewasser und Hefeextrakt wesentlicher Bestandteil vieler zur Kultur und Isolierung von Milchsäurebakterien verwendeter Nährmedien ist.

Die Äpfelsäure-abbauenden Bakterien sind aber keineswegs auf ein vorangegangenes Wachstum der Hefen oder auf eiweißhaltige Ausscheidungsprodukte derselben angewiesen. Die Milchsäurebakterien des Weines können sowohl in unvergorenem Traubenmost wie auch in eiweißfreien, synthetischen Nährlösungen kultiviert werden (RADLER 1958c).

Von den Hefen werden Nährstoffe an das Medium ausgeschieden; dabei ist es für die Bakterien unwesentlich, ob diese Substanzen schon während des Wachstums oder erst beim Absterben der Zellen und deren Autolyse abgegeben werden. Stickstoffverbindungen können schon in frühen Wachstumsstadien von den Hefezellen ausgeschieden werden (JOSLYN 1955). Bei der Autolyse, der enzymatischen Selbstzerstörung der Zellen, kommt es zur Hydrolyse protoplasmatischer Bestandteile und deren Exkretion. Cytologisch ist zunächst wenig zu sehen. Es kommt zu einem Protoplasmaverlust, zur Vergrößerung der Vakuolen und einer Abnahme der intracellulären Granula. Im Medium werden Aminosäuren, Peptide, Polypeptide, Proteasen, Peptidasen, Invertase und andere Enzyme, Purin- und Pyrimidinbasen sowie Vitamine angereichert. Allerdings wäre unter den Bedingungen des Weines in Analogie zu den Angaben von JOSLYN und VOSTI (1955) eher mit dem Absterben als mit einer Autolyse der Hefezellen zu rechnen. (Die Autolyse ist keine notwendige Folge des Absterbens der Zellen.) Die Optimumtemperatur für die Autolyse liegt bei 45° und schon bei 34° ist die Autolyse der Zellen gering; der optimale pH-Wert liegt bei pH 4,3 — 5,0.

In weinähnlichen Modellösungen (pH 3,3, 15 Vol.-% Äthylalkohol) konnten KIELHÖFER und AUMANN (1958) zeigen, daß die Hefetrockensubstanz in 76 Tagen um 46 — 49 % und deren Stickstoffgehalt um 38 — 40 % abnehmen. Gleichzeitig wurde eine Zunahme des Aminosäuregehaltes und das Auftreten von wahrscheinlich niederen Peptiden in der Lösung beobachtet.

CASTOR (1953c) hat den Vitamingehalt von Traubenmosten während der Gärung untersucht. Dabei konnte eine Zunahme der Vitamine Riboflavin und B₁₂ und eine Abnahme des Pantothen säuregehaltes beobachtet werden. Der Biotingehalt nimmt zunächst ab und dann später infolge Ausscheidung von der Hefe wieder zu. Der Vitamin B₆-Komplex, p-Aminobenzoesäure und Inosit zeigen nur unwesentliche Veränderungen. In Modell-Nährmedien analysierten PEYNAUD und LAFOURCADE (1958) die „Vitamingleichgewichte“ der Hefe. Durch das Fehlen eines Vitamins kann der Vergärungsgrad und die Trockensubstanzbildung auch bei einer auxoautotrophen Hefe beeinflußt werden. Die Synthesefähigkeit der Zellen reicht also nicht völlig zur „Selbstversorgung“ mit Vitaminen aus. Bei Mangel an einem Vitamin wird der Gehalt der Zellen an diesem Vitamin und die Abgabe von anderen an das Medium beeinflußt. Beim Fehlen aller Vitamine werden aber von der Hefe noch folgende Mengen je Liter Medium abgegeben: Riboflavin 86 µg, Thiamin 4,8 µg, Biotin 3 µg, Pantothen säure 7,5 µg, Nicotinsäureamid 370 µg, Pyridoxin 27 µg, Mesoinosit 4,6 mg.

Neben Kohlenhydrat sind Aminosäuren und B-Vitamine die wichtigsten Nähr- und Wuchsstoffe für Milchsäurebakterien. Da diese Stoffe von den Hefen an das Medium abgegeben werden, war dadurch eine Förderung des Wachstums von Milchsäurebakterien zu erwarten. CHALLINOR und ROSE (1954) stellten fest, daß ein Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*, der Inosit, Pantothen säure und Biotin benötigte, und ein *Lactobacillus*-Stamm, der Biotin, Pantothen säure, Nicotinsäure, Thiamin und Folsäure benötigte, in Mischkultur auch beim Fehlen von Nicotinsäure und Thiamin wuchsen. Ebenso konnte der *Lactobacillus*-Stamm beim Fehlen von essentiellen Purinderivaten oder einigen Aminosäuren in Mangelmedien gemeinsam mit der Hefe wachsen. YOUNG und Mitarb. (1956) konnten *Lactobacillus acidophilus* in Medien ohne die essentiellen Vitamine Pantothen säure, Pyridoxin, Riboflavin und Nicotinsäure gemeinsam mit der Hefe *Candida albicans* kultivieren. Auf Agarplatten konnte beobachtet werden, daß die Milchsäurebakterien in Mangelmedien einen Ring um die Hefekolonien bildeten.

Die gegenseitige Beeinflussung des Wachstums von Sake-Hefen und Milchsäurebakterien wurde von ITO und Mitarb. (1957) untersucht. KOSER und Mitarb. (1960) fanden, daß die Milchsäurebakterien *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus fermenti* gemeinsam mit *Candida albicans* oder *Saccharomyces cerevisiae* in defizienten Medien kultiviert werden konnten, die den Milchsäurebakterien allein das Wachstum nicht ermöglichten.

VON RADLER (1960) wurden die Stoffwechselbeziehungen zwischen Äpfelsäure-abbauenden Bakterien und Weinhefen in synthetischen Nährmedien untersucht. Obwohl diese Milchsäurebakterien sehr differenzierte Nähr- und Wuchsstoffansprüche haben, konnten sie in Mangelmedien, in denen einzelne oder mehrere Aminosäuren oder Vitamine fehlten, gemeinsam mit der Hefe soweit zur Entwicklung kommen, daß etwa 5 g Äpfelsäure je Liter dekarboxyliert wurden. Die Versorgung der Bakterien mit Aminosäuren und Vitaminen durch die Hefen geht sogar so weit, daß auch bei geringer Einsaat beide Organismen in einem Medium wachsen, das neben Kohlenhydrat, Äpfelsäure und Mineralsalzen nur die für die Hefe notwendigen Vitamine Biotin, Inosit und Pantothen säure enthält. Die Wachstumsförderung der säureabbauenden Bakterien erfolgt auch, wenn beide Organismen im gleichen Mangelnährmedium, aber durch eine Dialysiermembran räumlich getrennt,

kultiviert werden. Das Bakterienwachstum wird in Mischkulturen nicht nur bei Nährstoffmangel, sondern auch bei niedrigen pH-Werten begünstigt. Auf Grund dieser Beobachtung wurde empfohlen, für die Einleitung des Säureabbaus im Wein nicht Bakterienreinkulturen, sondern Bakterien-Hefe-Mischkulturen zu verwenden. WEBB und INGRAHAM (1960) konnten durch gemeinsame Einsaat von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien mit den Hefestämmen *Montrachet*, *Burgundy*, *Tokay*, *Champagne* und *Jerez* in Traubenmost in allen Fällen den Abbau der Äpfelsäure einleiten.

In vollständigen Medien, unter günstigen Bedingungen für die Milchsäurebakterien, kann bei Mischkulturen von *Saccharomyces carlsbergensis* mit *Lactobacillus plantarum* oder *Lactobacillus casei* durch Variation von pH-Wert und Temperatur das Wachstum der Hefe beeinflusst werden (NAKAMURA und HARTMAN 1961). FLESCH und JERCHEL (1960) fanden, daß in einer für die Milchsäurebakterien allein geeigneten Birnensaft-Hefeautolysat-Caseinpepton-Nährlösung der Abbau der Äpfelsäure durch Gegenwart von verschiedenen Hefearten im Vergleich mit Bakterienreinkulturen etwas verzögert werden kann. In allen Fällen wurde aber von den Mischkulturen nach 18 — 35 Tagen die gleiche Äpfelsäuremenge oder sogar noch mehr abgebaut als von den Bakterien allein.

Wenn auch durch die Hefen das Wachstum der Milchsäurebakterien im Wein vorübergehend gehemmt oder durch die Alkoholwirkung verzögert werden kann, so wird der wachstumsfördernden Wirkung der Hefen doch eine größere Bedeutung zukommen. Eine notwendige Voraussetzung für das Bakterienwachstum sind die Hefen oder ihre Ausscheidungsprodukte nicht. Es werden aber alle Stoffe an das Medium abgegeben, die die Milchsäurebakterien zum Wachstum benötigen. Deshalb kann weitgehend ausgeschlossen werden, daß das Wachstum von säureabbauenden Bakterien im Wein durch das Fehlen von Nähr- oder Wuchsstoffen ausbleiben kann, solange Hefen vorhanden sind.

b) Andere Mikroorganismen

Im Wein kommen außer Hefen und Milchsäurebakterien gewöhnlich keine Mikroorganismen vor. Die Weintrauben können jedoch von Pilzen befallen werden, deren Stoffwechselprodukte dann in den Traubenmost gelangen. *Botrytis cinerea*, der Erreger der Edelfäule der Trauben, bildet einen Stoff, der die Gärung hemmt (RIBEREAU-GAYON und Mitarb. 1952a, b). Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob und in welchem Umfang diese Substanzen auch die Milchsäurebakterien beeinflussen. Überraschend ist, daß gewaschenes Mycel von *Botrytis cinerea* die Gärung fördert.

HOCHSTRASSER (1955) beobachtete, daß die Schleimbildung eines aus Wein isolierten Milchsäurebakteriums durch Mischkultur mit *Acetobacter rancens*, *Penicillium roquefortii* und *Debaryomyces klockeri* gefördert wird. Die Wirkung des Symbionten soll dabei nicht nur auf einem Sauerstoffverbrauch beruhen, sondern auch darüber hinaus die Lindstoffbildung begünstigen. Das schleimbildende Milchsäurebakterium konnte in Mischkultur mit *Penicillium roquefortii* auch in Nährmedien wachsen und Schleim bilden, die dem Bakterium allein das Wachstum nicht ermöglichten. Trockenpräparate aus Pilzmycel begünstigten ebenfalls das Wachstum des Bakteriums. LÜTHI (1957a) berichtet, daß die Schleimbildung von „*Streptococcus mucilaginosus*“ auch durch Destillate von *Acetobacter rancens* und durch n-Propanol etwas begünstigt wird. Die

beiden Organismen können auch durch eine Kollodiummembran voneinander getrennt kultiviert werden. Das Äpfelsäure-abbauende „*B. gracile*“ wurde in Nährbouillon ebenfalls durch einen nicht näher bestimmten Pilz im Wachstum gefördert. Die gegenseitige Wachstumsförderung durch verschiedene Organismen kann beim bakteriellen Verderb von Weinen eine Rolle spielen.

Literaturverzeichnis*

- ARCHINARD, P. et J. BOUDOT: La teneur en ammoniac des vins, et sa variation au cours du vieillissement. Ann. Falsif. Fraudes **48**, 17 — 21 (1955).
- BEECH, F. W.: Some recent work on the microbiology of apple juice (yeasts). Symposium, Fruchtsaft-Konzentrate, Bristol, 373 — 382 (1958).
- — : The yeast flora of apple juices and ciders. J. appl. Bacteriol. **21**, 257 — 266 (1959).
- BERGERET, J.: Observations sur la fermentation malolactique des vins de Bourgogne récoltés en 1957. Note II. Influence de l'anhydride sulfureux en relation avec les soutirages. C. R. Acad. Agric. France **44**, 783 — 785 (1958).
- BOCKER, H.: Untersuchungen über den Einfluß von Mineralstoffen auf den bakteriellen Säurerückgang in Trauben- und Fruchtwijnen. Zbl. Bakteriol. Parasitenkde., Infektionskrankh. u. Hyg. II. Abt. **112**, 337 — 350 (1959).
- BÖHRINGER, P.: Die Möglichkeit der Säureverminderung in der Kellerwirtschaft. Weinblatt, 719 — 723 (1955).
- CARLES, J., M. LAMAZOU-BETBEDER et R. PECH: Existe-t-il une fermentation citramalique dans le vin? C. R. Acad. Sci. (Paris) **246**, 2160 — 2162 (1958).
- — , — — et — — : État actuel de nos connaissances sur quelques actions bactériennes dans les vins. Ann. Technol. agric. **10**, 61 — 71 (1961).
- CARR, J. G., J. D. PHILLIPS, A. POLLARD, G. C. WHITING and A. H. WILLIAMS: Quinic acid metabolism in cider fermentation. Chem. and Ind., 1515 — 1516 (1954).
- CASTOR, J. G. B.: The free amino acids of musts and wines. I. Microbiological estimation of fourteen amino acids in California grape musts. Food Res. **18**, 139 — 145 (1953a).
- — : The free amino acids of musts and wines. II. The fate of amino acids of must during alcoholic fermentation. Food Res. **18**, 146 — 151 (1953b).
- — : The B-complex vitamins of musts and wines as microbial growth factors. Appl. Microbiol. **1**, 97 — 102 (1953c).
- — and T. E. ARCHER: The free amino acids of musts and wines. III. Effect of added ammonia and of fermentation temperature on the fate of amino acids during fermentation. Food Res. **24**, 167 — 175 (1959).
- CHALLINOR, S. W. and A. H. ROSE: Interrelationships between a yeast and a bacterium when growing together in defined medium. Nature **174**, 877 — 878 (1954).
- CHARPENTIER, Y., RIBERÉAU-GAYON, J. et E. PEYNAUD: Sur la fermentation de l'acide citrique par les bactéries malolactiques. Bull. Soc. Chim. biol. **33**, 1369 — 1378 (1951).
- CHRISTENSEN, M. D. and C. S. PEDERSON: Factors affecting diacetyl production by lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. **6**, 319 — 322 (1958).
- DUPUY, P. et N. MELAMED: La croissance de *Lactobacillus arabinosus* dans les jus de raisin: Influence du pH, de l'éthanol et d'un hydrolysat tryptique. Congr. Soc. savantes **84**, 263 — 274 (1959).
- FELL, G.: Étude sur la fermentation malolactique du vin et les possibilités de la provoquer par ensemencement. Ann. Agr. Suisse **62**, 249 — 264 (1961).
- FLESCH, P. und D. JERCHEL: Über die Züchtung von *Bacterium gracile* in Weinen. Wein-Wiss., 140 — 143 (1959).

* Die bereits in Teil I zitierte Literatur ist in dieser Zusammenstellung nicht nochmals erfaßt worden.

- FORNACHON, J. C. M.: Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulphur dioxide. *J. Sci. Food Agric.* (1963), im Druck.
- — —, H. C. DOUGLAS and R. H. VAUGHN: The pH requirements of some heterofermentative species of *Lactobacillus*. *J. Bact.* **40**, 649 — 655 (1940).
- HALENKE, D. und D. KRUG: Vergleichende Versuche über den Säurerückgang in ungezuckerten und gezuckerten Weinen des Jahrgangs 1908 aus dem Weinbaugebiet der Pfalz. I. Mitt. Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamt **35**, 404 — 429 (1910); II. Mitt. **39**, 450 — 470 (1911); III. Mitt. **42**, 607 — 622 (1912).
- HAMDY, M. K., D. E. PRATT, J. J. POWERS and D. SOMAATMADJA: Anthocyanins. III. Disc sensitivity assay of inhibition of bacterial growth by pelargonidin-3-monoglucoside and its degradation products. *J. Food Sci.* **26**, 457 — 461 (1961).
- HARVEY, R. J. and E. B. COLLINS: Role of citritase in acetoin formation by *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Bact.* **82**, 954 — 959 (1961).
- HUTCHINGS, B. L. and W. H. PETERSON: Amino acid requirement of *Lactobacillus casei*. *Proc. Soc. exper. Biol. and Med.* **52**, 36 — 38 (1943).
- ITO, Y., M. MATSUKI and T. UEMURA: Studies on the mixed association of microorganisms in the sake brewing process. Part I. Nutritional investigation of mixed association between sake yeasts and sake Lactobacilli. *J. agric. chem. Soc. Japan* **31**, 779 — 783 (1957).
- — — and T. UEMURA: Studies on the mixed association of microorganisms in the sake brewing process. Part. II. Nutritional investigation of mixed association between sake yeasts and sake Lactobacilli. *J. agric. chem. Soc. Japan* **31**, 783 — 786 (1957).
- JOSLYN, M. A.: Yeast autolysis. I. Chemical and cytological changes involved in autolysis. *Wallerstein Lab. Commun.* **18**, 107 — 121 (1955).
- — — and D. C. VOSTI: Yeast autolysis. II. Factors influencing the rate and extent of autolysis. *Wallerstein Lab. Commun.* **18**, 191 — 201 (1955).
- KIELHÖFER, E. und H. AUMANN: Die Wirkung der Hefe nach der Gärung auf den Wein. *Wein-Wiss.* **14** — 22 (1958).
- — —: Die biologische Stabilisierung der alkoholarmen Weine mit unvergorenem Zucker durch Sorbinsäure. *Weinblatt*, 991 — 995 (1960).
- — — und G. WÜRDIG: Die an unbekannte Weinbestandteile gebundene schweflige Säure (Rest-SO₂) und ihre Bedeutung für den Wein. *Weinberg u. Keller* **7**, 313 — 328, 361 — 372 (1960).
- KLENK, E.: Der biologische Säureabbau beim 1954er Wein. *Dtsch. Weinbau* **9**, 655 — 656 (1954).
- KOSER, S. A. and J. L. THOMAS: Amino acid requirements of oral Lactobacilli. *J. Infect. Diseases* **97**, 287 — 298 (1955).
- — —, E. HODGES, I. TRIBBY and J. T. STUEDELL: Growth of Lactobacilli in association with *Candida albicans*. *J. Infect. Diseases* **106**, 60 — 68 (1960).
- LAFON-LAFOURCADE, S. et E. PEYNAUD: Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. *Ann. Technol. agric.* **10**, 143 — 160 (1961).
- LAGERBORG, V. A. and W. E. CLAPPER: Amino acid decarboxylases of lactic acid bacteria. *J. Bact.* **63**, 393 — 397 (1952).
- LÜTHI, H. und U. VETSCH: Papierchromatographische Bestimmung von Aminosäuren in Weinen (vorläufige Mitt.). *Schweiz. Z. Obst- u. Weinbau* **61**, 390 — 394, 405 — 408 (1952).
- — —, K. MAYER und E. HOTZ: Versuche zur Konservierung von Wein und Fruchtsäften mit Pyrokohlensäure-Diäthylester. *Internat. Fruchtsaft-Union* 1961.
- MARTIN, L.: Beitrag zur Kenntnis der linden Weine. *Diss. Zürich* 1948.
- MASQUELIER, H. et H. JENSEN: Recherches sur l'action bactéricide des vins rouges. *Bull. Soc. Phar. Bordeaux* **91**, 24, 105 (1953).
- MAYER, K. und H. LÜTHI: Versuche mit Pyrokohlensäure-Diäthylester, einem neuen Getränkekonserverungsmittel. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. und Hyg.* **51**, 132 — 137 (1960).
- MELAMED, N.: Determination des sucres résiduels des vins, leur relation avec la fermentation malolactique. *Ann. Techn. agric.* **11**, 5 — 31 (1962).

- MEYER, V.: Probleme des Verderbens von Fischkonserven in Dosen. II. Aminosäuren-decarboxylase durch Organismen der *Betabacterium buchneri*-Gruppe als Ursache bombierter Marinaden. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven 4, 1 — 16 (1956).
- — : Probleme des Verderbens von Fischkonserven in Dosen. VI. Das Auftreten decarboxylierbarer Aminosäuren bei der Herstellung von Marinaden und ihr Nachweis. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven 7, 264 — 276 (1961).
- MOAT, A. G. and H. C. LICHTSTEIN: Factors affecting the formation of acetylmethylcarbinol by *Lactobacillus arabinosus*. J. Bacteriol. 66, 324 — 327 (1953).
- NAKAMURA, L. K. and P. A. HARTMAN: *Lactobacillus*: yeast interrelationships. J. Bacteriol. 81, 519 — 523 (1961).
- NIKOVA, Z.: Stabilization of wines and malic-lactic acid fermentation. Loszarstvo i Vinarstvo 7, 52 — 55 (1958).
- OMEIS, T.: Vergleichende Versuche über den Säurerückgang ungezuckerter und gezuckerter Weine des Jahrgangs 1908 aus dem Weinbaugebiet Franken. Arb. kaiserl. Gesundheitsamte 35, 393 — 403 (1910).
- — : Versuche und Untersuchungen zur Erforschung des Säurerückganges im Wein. Arb. kaiserl. Gesundheitsamte 39, 434 — 449 (1911); 42, 597 — 603 (1912).
- ORLA-JENSEN, S., N. C. OTTE and A. SNOG-KJÆR: The vitamin and nitrogen requirements of the lactic acid bacteria. Kgl. Danske Videnskabernes Selskabs Skrifter, Naturv. og Math. Afd., 9 Række VI, 5, 5 — 52 (1936).
- PAUL, F.: Die Qualitätsbeeinflussung durch schweflige Säure bei der Weinbereitung. Mitt. Klosterneuburg 4A, 125 — 132 (1954).
- PEYNAUD, E.: Neue Gegebenheiten bezüglich des biologischen Säureabbaus. Mitt. Klosterneuburg 5A, 183 — 191 (1955).
- — et S. LAFOURCADE: L'inositol dans les raisins et dans les vins et son dosage microbiologique. Ann. Technol. agric. 4, 381 — 396 (1955).
- — et — — : Les équilibres vitaminiques chez les levures. Ann. Inst. Pasteur 94, 78 — 88 (1958).
- POWERS, J. J., D. SOMAATMADJA, D. E. PRATT and M. K. HAMDY: Anthocyanins. II. Action of anthocyanin pigments and related compounds on the growth of certain microorganisms. Food Technol. 14, 626 — 632 (1960).
- PRATT, D. E., J. J. POWERS and D. SOMAATMADJA: Anthocyanins. I. The influence of strawberry and grape anthocyanins on the growth of certain bacteria. Food Res. 25, 26 — 32 (1960).
- RADLER, F.: Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. IV. Über Faktoren, die das Wachstum der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien beeinflussen. Vitis 1, 288 — 297 (1958).
- REHM, H. J. und H. WITTMANN: Beitrag zur Kenntnis der antimikrobiellen Wirkung der schwefligen Säure. I. Mitt. Übersicht über die Faktoren, die auf die antimikrobielle Wirkung der schwefligen Säure einen Einfluß ausüben und sich daraus ergebende Probleme. Z. f. Lebensmittel-Unters. u. -Forschg. (im Druck 1962).
- RENTSCHLER, H., H. TANNER und F. HAUSER: Theoretische Betrachtungen zum Säurerückgang in Traubenmosten und Jungweinen. Schweiz. Z. Obst- u. Weinbau 63, 285 (1954).
- RIBÉREAU-GAYON, J.: Note sur l'action des bactéries dans les vins. Procès-verbaux séances soc. sci. phys. naturelles de Bordeaux, 73 — 74 (1938).
- — , E. PEYNAUD et S. LAFOURCADE: Formation d'inhibiteurs et d'activeurs de la fermentation alcoolique par diverses moisissures. C. R. Acad. Sci. (Paris) 243, 251 — 253 (1952a).
- — , — — et — — : Sur la formation de substances inhibitrices de la fermentation par Botrytis cinera. C. R. Acad. Sci. (Paris) 234, 478 — 480 (1952b).
- RIPPEL, K.: Der bakterielle Abbau der Äpfelsäure im Wein als Folge biologischer aktiver Wirkstoffe (Biokatalysatoren) in den Weinbeeren. Ber. dtsh. bot. Ges. 60, 108 — 117 (1942).
- — : Neue Ergebnisse zur Frage des bakteriellen Säureabbaus im Wein. Dtsch. Weinbau, 51 — 52 (1943).

- SUDRAUD, P. et R. CASSIGNARD: Travaux récents sur la fermentation malolactique en Bordelais. Stat. Agronomique et Oenol. de Bordeaux 1958.
- SCHANDERL, H.: Über den bakteriellen Säureabbau im Wein. Wein-Ztg. 28. Mai 1943.
- WHITEHEAD, H. R., P. A. JONES and P. S. ROBERTSON: The influence of carbon dioxide on the growth of lactic Streptococci. J. Dairy Res. 25, 24 — 31 (1958).
- YOUNG, G., R. J. KRASNER and P. L. YUDKOFKY: Interactions of oral strains of *Candida albicans* and *Lactobacilli*. J. Bacteriol. 72, 525 — 529 (1956).

eingegangen am 20. 7. 1962

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