

Auswirkungen der Biodiversität von Hefen auf das Weinaroma

ANDREA JUREK und ERICH LEITNER

Technische Universität Graz
Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie
AG „Lebensmittelchemie und Humansensorik“
A-8010 Graz, Stremayrgasse 9/2
E-Mail: erich.leitner@tugraz.at

Betrachtet man die mittlere Zusammensetzung von Wein, so besteht dieser aus 85 % Wasser, 12 % Ethanol und einem Rest von 3 %. Dieser wiederum besteht aus Zucker, Säuren, Glycerin, Mineralien und der Aromafraktion. Obwohl diese mit einer ungefähren Konzentration von unter einem Gramm pro Liter mengenmäßig nur einen sehr bescheidenen Anteil der Zusammensetzung des Weines ausmacht, ist diese doch dafür verantwortlich, dass Wein ein so faszinierendes Getränk darstellt. Von den vielen hundert Einzelverbindungen, welche die Aromafraktion enthält, können nur wenige das Aroma entscheidend beeinflussen. Einige Aromastoffe sind bereits in der Traube vorhanden, die auch in fertigem Wein das Aroma oder die Typizität des Produktes ausmachen. Das gilt unter anderem für Rebsorten wie 'Muskateller' (Schlüsselverbindung: Linalool) oder 'Gewürztraminer' (Schlüsselverbindungen: Geraniol und Rosenoxid). Daneben gibt es jedoch eine Vielzahl unterschiedlicher Rebsorten, deren unfermentierter Traubenmost ein sehr geringes Aroma besitzt, dieses entwickelt sich erst bei der Gärung. Das Aroma von Wein kann durch unterschiedlichste Faktoren beeinflusst werden. Neben der Traubensorte und -reife spielen die Vinifikation (oxidativ, reduktiv, Holzfass, Stahltank), aber auch die an der alkoholischen Gärung beteiligten Mikroorganismen eine entscheidende Rolle.

Schlagwörter: Wein, Aroma, Mikroorganismen, *Saccharomyces cerevisiae*

Impact of the biodiversity of yeasts on the aroma of wine. On the average wine consists of 85 % water, 12 % ethanol and of 3 % other substances. These in turn include sugars, acids, glycerol, minerals and aroma substances. Although these at an approximate concentration of less than one gram per liter represent a very modest proportion of the total composition of wine, they ensure that wine is such a fascinating beverage. Of the many hundreds of individual compounds of the aromatic fraction, only few can affect the aroma significantly. Some aromatic compounds already present in the grapes can be responsible for the aroma or the typicality of a finished wine. This applies for varieties such as 'Muskateller' (key compound: linalool) or 'Gewürztraminer' (key compounds: geraniol and rose oxide). But there are a number of different grape varieties, the unfermented juice of which has very little aroma, this only develops during fermentation. The aroma of wine can be affected by many different factors. Additionally to grape variety, ripeness and vinification technology (oxidative, reductive, wooden casks, steel tank ...) micro-organisms involved in the alcoholic fermentation play a crucial role.

Keywords: wine, aroma, microorganisms, *Saccharomyces cerevisiae*

Mikroorganismen und das Aroma von Wein

Die Fermentation von Traubenmost und die Produktion von qualitativ hochwertigen Weinen ist ein komplexer ökologischer und biochemischer Prozess. Dieser Prozess beruht auf der Wechselwirkung von Pilzen, Hefen, Milchsäurebakterien und Essigsäurebakterien

als auch von Mycoviren und Bakteriophagen, die diese mit den Trauben in Verbindung stehenden Mikroorganismen beeinflusst (PRETORIUS, 2000). Vor allem die Diversität und Wechselwirkung der Hefen trägt zum charakteristischen Aroma der Weine bei. In seltenen Fällen können diese jedoch auch zur Produktion von unerwünschten Verbindungen mit negativer Auswirkung

auf das Aroma führen.

Von über 100 Hefegattungen stehen nur 16 in Verbindung mit der Weinerzeugung, da die komplexe Zusammensetzung des Mostes, der hohe Zuckergehalt und der niedrige pH-Wert einen starken selektiven Druck auf die Mikroorganismen ausüben. Hefen, die diesem Druck standhalten, entstammen den Gattungen *Brettanomyces* und ihrem sexuellen Äquivalent *Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* und dem sexuellen Äquivalent *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulasporea*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* und *Zygosaccharomyces*.

Nicht-*Saccharomyces*-Hefen, die eine geringe Fermentationsaktivität aufweisen, sind auf der Traube und im Traubenmost dominant und prägen die frühen Phasen der Fermentation (ANDORRA, 2010). Mit fortschreitender Fermentationsdauer kommt es zu einer Zunahme der Saccharomyceten, die auf Grund ihrer hohen Alkoholtoleranz für eine vollständige Fermentation sorgen. Bei den *Saccharomyces*-Hefen gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Spezies, die in die alkoholische Fermentation eingreifen. Obwohl Saccharomyceten eine hohe Alkoholtoleranz haben, unterscheiden sie sich deutlich hinsichtlich der Produktion an Säuren, Acetaldehyd und höheren Alkoholen. Die am häufigsten vorkommende Gärhefe der Gattung *Saccharomyces* ist *S. cerevisiae*. Weitere häufig vorkommende Vertreter sind *S. bayanus* und *S. uvarum*.

Die metabolischen Eigenschaften der in die Fermentation involvierten Hefen haben einen starken Einfluss auf den resultierenden Wein (VERGINER, 2010). Aufgabe der Hefen ist die effiziente und komplette Konversion des in den Trauben enthaltenen Zuckers zu Ethanol,

Kohlendioxid und einem geringen Anteil sensorisch wichtiger Metaboliten, den Aromastoffen (SWIEGERS, 2005). Die flüchtigen Hauptprodukte des Hefemetabolismus, Ethanol und Kohlendioxid, stellen dabei nur einen geringen Beitrag zum Weinaroma. Das fermentative Bouquet des Weines wird überwiegend von flüchtigen Säuren, höheren Alkoholen, Kohlenstoffverbindungen, Phenolen, Estern, Schwefelverbindungen und Monoterpenoiden gebildet, wobei unterschiedliche Hefegattungen auf die Bildung der Aromastoffe Einfluss nehmen. Auf Grund des größeren Einflusses der Nicht-*Saccharomyces*-Hefen auf Ester, Phenole und Terpene (Tab. 1) tragen diese Hefen einen wesentlichen Anteil zum fruchtigen, floralen Aroma von Weinen bei.

Induzierte Gärung und Spontangärung

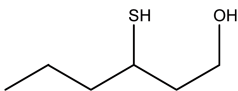
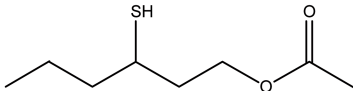
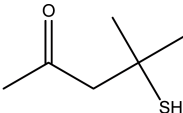
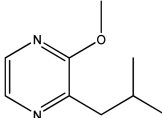
Ursprünglich erfolgte die Weinherstellung durch Spontangärung unter Ausnutzung von Hefen, die von der natürlichen Mikroflora der Trauben und der Weinkellerei stammten (PARAPOULI, 2010). Heutzutage wird eine Vielzahl an Fermentationen durch Zugabe von Starterkulturen definierter Hefespezies, meist der Gattung *Saccharomyces*, gestartet. Chemische Analysen von spontanen und induzierten Gärungen zeigen deutliche Unterschiede in den chemischen Zusammensetzungen und den sensorischen Eigenschaften der Weine (BLANCO, 2008). Spontan vergorene Weine sind vor allem durch höhere Gehalte an Estern, vor allem Ethylestern, Aldehyden und Ketonen charakterisiert. Weine mit induzierter Gärung weisen hingegen einen höheren Alkoholgehalt auf. Spontan vergorene Weine werden häufig als fruchtiger, voller und runder als mit Reinzuchthefen vergorene Weine beschrieben. Hinsichtlich dessen zeigt sich der große Einfluss der Nicht-*Saccharomyceten* auf das Weinaroma im Gegensatz zur Inokulation mit einem einzelnen Hefestamm.

Die spontane alkoholische Fermentation ist ein komplexer mikrobiologischer Prozess, bei dem eine Vielzahl verschiedener Hefespezies involviert ist. Auf den reifen Trauben sowie im frischen Most sind überwiegend Nicht-*Saccharomyces*-Hefen der Gattungen *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia* und *Kluyveromyces* vorhanden (FLEET, 2003). In seltenen Fällen sind in diesem Stadium der Gärung auch Hefen der Gattungen *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulasporea*, *Dekkera* und *Schizosaccharomyces* präsent. Auf Grund ihrer geringen Ethanoltoleranz sind diese Nicht-*Saccharomyceten* jedoch nicht in der Lage, Zucker vollständig zu vergären, wodurch das Endstadium

Tab. 1: Einfluss der Hefegattung auf die Bildung von Aromastoffen

Substanzklasse der Aromastoffe	Hefegattung
Säuren	<i>Saccharomyces</i>
Alkohole	<i>Saccharomyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Candida</i>
Kohlenwasserstoffe	<i>Kloeckera</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Saccharomyces</i>
Phenole	<i>Brettanomyces</i> , <i>Dekkera</i> , <i>Saccharomyces</i>
Ester	<i>Hanseniaspora</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Candida</i> , <i>Debaryomyces</i>
Schwefelverbindungen	<i>Saccharomyces</i>
Monoterpenoide	<i>Kluyveromyces</i> , <i>Torulasporea</i> , <i>Saccharomyces</i>

Tab. 2: Liste sortenrelevanter Aromastoffe von 'Sauvignon blanc'

Aromastoff	Struktur	Geruchsbeschreibung	Schwelle (ng/l)
3-Mercaptohexan-1-ol (3MH)		Grapefruit, Passionsfrucht	60
3-Mercaptohexyl-acetat (A3MH)		Schwarze Johannisbeere, Passionsfrucht	4
4-Mercapto-4-methylpentan-2-on (4MMP)		Schwarze Johannisbeere, Buchsbaum, Katzenurin	0,8
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin (IBMP)		grüner Paprika, grün Gemüse	2

spontaner Gärungen ebenfalls von alkoholtoleranten *Saccharomyceten* geprägt wird.

Die induzierte Gärung basiert auf der früher fälschlich angenommenen Theorie, dass Nicht-*Saccharomyces*-Hefen im Gegensatz zu *Saccharomyces*-Hefen nur eine untergeordnete, vernachlässigbare Rolle im Gärprozess spielen. Die Induktion erfolgt überwiegend durch die Zugabe der Arten *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* sowie Mischkulturen verschiedener *Saccharomyceten*. Die Inokulation mit Reinzuchthefen bringt die Vorteile einer einfacheren Prozesskontrolle und einer kürzeren Gärdauer sowie ein geringeres Risiko unvollständiger Fermentationen und Inhomogenitäten in der Weinqualität.

Um mittels induzierter Gärung eine ausgewogenere Aromastoffzusammensetzung zu erhalten, wird auf die Zugabe von Mischhefen aus *Saccharomyceten* und Nicht-*Saccharomyceten* gesetzt. Erfahrungen mit dem Einsatz von Mischkulturen als Starterkulturen sind im Vergleich zu den anderen Methoden noch gering, diese Mischkulturen bergen jedoch großes wirtschaftliches Potenzial, sofern eine optimale Zusammensetzung der unterschiedlichen Hefearten erreicht werden kann.

Aroma von 'Sauvignon blanc'

Das Aroma von Weinen der Rebsorte 'Sauvignon blanc', welches sensorisch mit den Attributen von grün und grasig über Buchsbaum und Katzenurin bis hin zu exotischen Früchten (Passionsfrucht, Grapefruit) angesprochen wird, kann durch zwei unterschiedliche Verbindungsklassen geprägt werden. Grüne, grasige, an Pa-

prika erinnernde Noten werden durch Verbindungen aus der Klasse der Alkylmethoxypyrazine geprägt. Hierbei spielt vor allem die Verbindung 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin eine entscheidende Rolle für den Sortencharakter. Die Konzentration und damit verbunden der Anteil am Gesamtaroma hängt von mehreren Faktoren ab.

Im Gegensatz zu vielen anderen Rebsorten produziert 'Sauvignon blanc' diese Verbindung in sehr hohen Konzentrationen zu Beginn der Beerenreife (über 100 ng/l), wobei deren Gehalt im Zuge der Reifung sinkt. Die finale Konzentration hängt in erster Linie von Traubenreife und Beschattung sowie der durchschnittlichen Temperatur während des Reifeprozesses ab. Hier spielen also das Weingartenmanagement sowie die klimatischen Gegebenheiten eine entscheidende Rolle (ALLEN, 1991).

Im Gegensatz dazu sind die in Tabelle 2 dargestellten drei Schwefelverbindungen in freier Form weder in der Traube noch in der Traubenschale zu finden und werden erst bei der alkoholischen Gärung aus nichtflüchtigen, geruchlosen Cystein- und/oder Glutathionkonjugaten gebildet (PEYROT DE GACHONS, 2002; DUBOURDIEU, 2006; ROLAND, 2010). Bei richtiger Auswahl der Hefe können die sensorischen Eigenschaften der Weine in eine gewünschte Richtung moduliert werden, die der Konsumentenerwartung entspricht (SWIEGERS, 2009). Eine weitere Optimierung der Produktakzeptanz gelingt durch den Einsatz von Mischpopulationen während der Fermentation, um die Thiole in optimaler Weise zu bilden (KING, 2008; KING, 2010; LUND, 2009).

Fehlaromen durch Mikroorganismen

Nicht immer sind die geruchsaktiven Verbindungen, die durch Mikroorganismen bei der Produktion von Wein gebildet werden, sensorisch positiv und erwünscht. Zu den häufigsten Fehltonen kann die Infektion mit *Brettanomyces/Dekkera* gezählt werden. Diese ubiquitär auftretenden Hefen haben die Eigenschaft, sich vor allem in fassgelagertem Rotwein auch bei sehr geringen Restzuckergehalten und hohen Alkoholgehalten zu vermehren. Dabei metabolisieren diese Hefen aus Ferulasäure, Kaffeesäure und p-Coumarinsäure die flüchtigen Verbindungen 4-Ethylphenol, 4-Vinylguaiacol und 4-Vinylcatechol (DIAS, 2003; HESFORD, 2004). Bei Überschreiten einer gewissen Schwellenkonzentration werden diese Substanzen sensorisch auffällig, wobei die Beschreibungen von „Pferdeschweiss, nasser Hund“ bis hin zu „phenolisch, medizinisch und Heftpflaster“ reichen. Bei einer eigenen Untersuchung von fast 300 österreichischen Rotweinen der Jahrgänge 2001 bis 2004 wurde eine Kontaminationsrate von ca. 20 % aller untersuchten Rotweine festgestellt (LEITNER, 2006). Zusätzlich sind diese Mikroorganismen auch noch in der Lage, durch die Bildung substituierter Tetrahydropyridine einen weiteren Fehler, das so genannte „Mäusel“ (intensiver, unangenehmer Geruch nach Mäuseurin - „mouse dripping“) in Wein hervorzurufen (HERESTZYN, 1986).

Literatur

- ALLEN, M.S., LACEY, M.J., HARRIS, R.L.N. and BROWN, W.V. 1991: Contribution of Methoxy-pyrazines to Sauvignon blanc wine aroma, *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol 42(2)1991
- ANDORRÀ I., BERRADRE, N.R., ROZÈS, N., MAS, A., GUILLAMÓN, J. and ESTEVE-ZARZOSO, B. 2010: Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations, *European Food Research Technology* (2010) 215-224
- BLANCO, P., VÁZQUEZ-ALÉN, M. and LOSADA, A. 2008: Influence of yeast population in spontaneous and inoculated fermentations of must from *Vitis vinifera* Lado *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35 (2008) 183-188
- CALLEJÓN, R.M., CLAVIJO, A., ORTIGUEIRA, P., TRONCOSO, A.M., PANEQUE, P. and MORALES, M.L. 2010: Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Analytica Chimica Acta* 660 (2010) 68-75
- DIAS, L., DIAS, S., SANCHO, T., STENDER, H., QUEROL, A., MALFEITO-FERREIRA, M. and LOUREIRO V., 2003: Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiol.* 20 (2003), 567-574.
- DIAS, L., PEREIRA DA-SILVA, S., TAVARES, M., MALFEITO-FERREIRA, M. and LOUREIRO, V., 2003: Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* 20 (2003), 377-384.
- DUBOURDIEU, D., TOMINAGA, T., MASNEUF, I., PEYROT DE GACHONS, C. and MURAT, M.L. 2006: The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation: The Example of Sauvignon blanc *Am. J. Enol. Vitic.* 57:1 (2006)
- FLEET G. H., Yeast interactions and wine flavor, *International Journal of Food Microbiology* 86 (2003) 11 - 22
- FLEET G. H., 2008 Wine yeasts for the future, *FEMS Yeast Res* 8 (2008) 979-995
- HERESTZYN, T., 1986: Formation of substituted Tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 2.(1986)
- HESFORD F., SCHNEIDER K., PORRET N.A., GAFNER J., 2004: Identification and analysis of 4-ethyl catechol in wine tainted by *Brettanomyces* off-flavor. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 304A(2004)
- KING, E. S., SWIEGERS, J. H., TRAVIS B., FRANCIS, I. L., BASTIAN, S. E. P., PRETORIUS I. S. 2008: Coinoculated fermentations using *Saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 2008, 10829-10837.
- KING E. S., KIEVIT R.L., CURTIN C., SWIEGERS, J. H., PRETORIUS I. S., BASTIAN S.E.P., FRANCIS I.L., 2010: The effect of multiple yeasts co-inoculations on Sauvignon Blanc wine aroma composition, sensory properties and consumer preference *Food Chemistry* 122 (2010) 618-626
- LEITNER E. 2006: *Brettanomyces*infektion in Wein Vortrag ALVA Tagung ALVA 2006 in St. Pölten 22. - 23. 5. 2006
- LUND C. M., THOMPSON M. K., BENKOWITZ F., WOHLER M. W., TRIGGS C. M., GARDNER R., HEYMANN H., NICOLAU L., 2009: New Zealand Sauvignon Blanc distinct flavor characteristics: Sensory, Chemical, and Consumer Aspects *Am. J. Enol. Vitic.* 60:1 (2009)
- MATEOS J. A. R., NEVADO-PÉREZ F., FERNÁNDEZ-RAMÍREZ M., 2006: Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine, *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2006) 151-157
- PARAPOULI M., HATZILOUKAS E., DRAINAS C., PERISYNAKIS A., 2010: The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine flavor, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37 (2010) 85-93
- PEYROT DE GACHONS C., TOMINAGA T., DUBOURDIEU D., 2002: Localization of S-Cysteine Conjugates in the Berry: Effect of Skin Contact on Aromatic Potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc Must. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:2 (2002)
- PRETORIUS I. S. 2000: Tailoring wine yeasts for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast* 2000;16 (2000) 675-729
- ROLAND A., SCHNEIDER R., LE GUERNEVE CH., RAZUNGLES A., CAVELIER F. 2010: Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chemistry* 121 (2010) 847-855
- ROMANO P., FIORE C., PARAGGIO M., CARUSO M., CAPECE A: Function of yeast species and strains in wine flavour, *International Journal of Food Microbiology* 86 (2003) 169- 180
- SWIEGERS J.H., KIEVIT R.L., SIEBERT T., LATTEY K.A., BRAMLEY B.R., FRANCIS I.L., KING E.S., PRETORIUS I.S. 2009: The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiology* 26 (2009) 204-211

SWIEGERS J. H., BARTOWSKY E. J., HENSCHKE P. A., PRETORIUS I. S., 2005: Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11 (2005) 139-173

VERGINER M., LEITNER E., BERG G. 2010: Production of Volatile Metabolites by Grape-Associated Microorganisms, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58 (2010) 8344-8350