



Foto: Erbslöh

Abb. 1: Mikrobielle Analyse einer Pinot noir Rosé-Süßreserve mit intensivem Brett-„Aroma“. Die Analyse zeigte eine Vergesellschaftung von *Brettanomyces bruxellensis* (Petrischale links) mit dem Pilz *Penicillium carneum* (Petrischale rechts), der eine hohe Depsidase-Aktivität aufweist.

## Kriminelle Komplizen

**Depsidase Aktivität und Wirkung von *Brettanomyces bruxellensis*** Als Bestandteil der natürlichen Flora der Rebstöcke und Weintrauben ist *Brettanomyces* in der Rolle als weinverderbende Hefe nicht zu unterschätzen. Durch klimatische Veränderungen hält sie zunehmend Einzug in die Weinkeller. Eric Hüfner, Anne Besier, Florian Kraft, Hannes Weninger und Jürgen Fröhlich, Erbslöh Geisenheim, berichten unter dem besonderen Aspekt des Einflusses von Depsidase auf *Brettanomyces bruxellensis*.

Generell wird das Vorkommen von *Brettanomyces* von Oenologen kritisch bewertet und Weine mit zu intensiven „Brett“-Aroma häufig beanstandet. Obwohl *Brettanomyces* vor allem in den bisher wärmeren, südlichen Weinbauzonen bekannt ist, konnte die Untersuchung von Fröhlich et al. (Nachweis eines Lebenskünstlers, dwm, 2005, Ausgabe 21, Seite 26 bis 28) in Rheinhessen nachweisen, dass auch in deutschen Weinkellern diese Weinhefe zunehmend auftritt. Dabei zeigte sich, dass jeder sechste untersuchte Keller diese Hefe beherbergt. Das Bewusstsein der Winzer für die Existenz der Hefe in den eigenen Kellern lag nicht vor. Seit Beendigung der Studie treten, bedingt durch den Klimawandel, vermehrt höhere Zellzahlen auf, sodass auch eine Zunahme sensorisch auffälliger Weine zu verzeichnen ist. *Brettanomyces* und seine teleomorphe Form *Dekkera* werden als Schädlings-



Foto: Andrea Kerth

Abb. 2: Oft werden die von *Brettanomyces* freigesetzten Präkursoren sensorisch als „Pferdeschweiß“ beschrieben.

hefen beschrieben, die verschiedene Fehl-Aromen im Wein, bei der Sektbereitung und der Sherrysierung verursachen können. Durch die vergleichsweise höheren Gehalte der phenolischen „Präkursoren“ (Vorläufer-Verbindungen) ist Rotwein gegenüber Weißwein stärker betroffen. Das Vorkommen von *Brettanomyces* ist nahezu weltweit und so wurden Stämme aus Afrika, Amerika, Australien und Europa isoliert. Der sensorische Eindruck des „Brett“-Aromas, verursacht durch 4-Ethylphenol und andere flüchtige Verbindungen (Abb. 3), die aus Präkursoren von *Brettanomyces* freigesetzt werden können, wird bei Wein häufig als „Pferdeschweiß“ (Abb. 2) und „Mäusen“ beschrieben. Hat sich die Hefe während der Weinbereitung etabliert, kann sich ebenfalls die Bildung von flüchtiger Säure und dem entsprechenden Ethylester (Lösungsmittelton) bemerkbar machen.

### Hohe Alkoholtoleranz vorhanden

Des Weiteren ist die Hefe für die Bildung biogener Amine wie, Phenylethylamin, bekannt und vermag selbst bei einem Alkohol-Gehalt von über 15 % noch zu überleben. Die, im Vergleich zu *Saccharomyces cerevisiae*, geringere Gärfähigkeit führt zu verlangsamttem Wachstum, während die hohe Alkoholtoleranz, bei nicht zu hohem Essigsäuregehalt, eine lange Lebensdauer im infizierten Most oder Wein gewährt. Darum sind Lagerungen von ungeklärten Wein-Chargen auf Barrique- und Holzfässern besonders betroffen, selbst wenn die Zellzahlen im Vergleich zur Weinhefe nur sehr klein sind. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang häufig mangelnde Kellerhygiene und im scheinbaren Widerspruch dazu auch die Anfälligkeit neuer Barriquefässer, die durch die Verbrennungsprozesse für diese Mikroorganismen verwertbare Holzabbauprodukte bereitstellen. Die Fähigkeit des „Lebenskünstlers“ aus Holz generierte Oligo- und Disaccharide, wie Cellobiose verstoffwechseln zu können, ist dabei besonders vorteilhaft. Selbst vor

Ethanol machen verschiedene Stämme der Hefe nicht halt, ähnlich den nahverwandten Kahlhefen. Gelegentlich findet man verschiedene *Brettanomyces*-Stämme miteinander vergesellschaftet vor oder in Kombination mit Schimmelpilzen (Moststadium; vergleiche Abb. 1) und Milchsäurebakterien, wie Oenokokken, Pediokokken und Laktobazillen. Diese unterscheiden sich teilweise beträchtlich in ihren Stoffwechsellösungen und können somit flexibler auf sich ändernde Nährstoffangebote reagieren und sich gegenseitig helfen schwerverdauliche Nährstoffquellen zu erschließen. Die Bildung von Biofilmen ist ebenfalls bekannt und mitunter eine Ursache dafür, dass eine moderate Schwefelung (<40 mg SO<sub>2</sub>/l) nicht zum Absterben der Zellen führt, sondern lediglich das Wachstum beeinträchtigt (Tab.1). Die Zugänglichkeit für bestimmte Präkursoren ist, wie erwähnt, an die Stoffwechsellösung anderer Mikroorganismen gebunden. Solange die phenolischen Vorläuferverbindungen mit Hydroxycarbonsäuren, wie Wein- oder Chinasäure zu sogenannten Depsiden verestert sind (Abb. 3) werden sie von *Brettanomyces* nicht weiter umgesetzt.

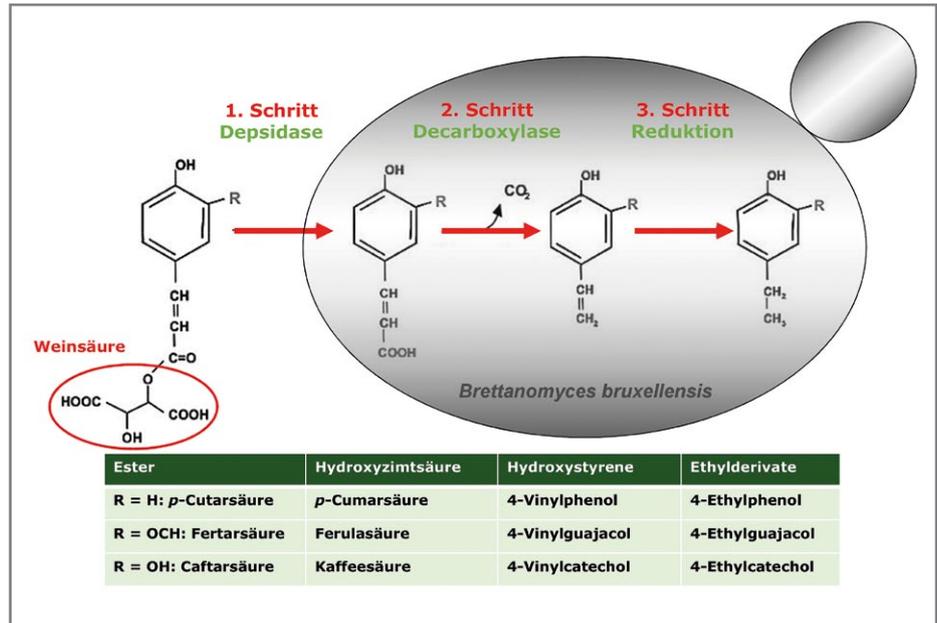


Abb. 3: Depsidi und die Freisetzung der Phenolcarbonsäuren durch Depsidasen, sowie die weitere Umsetzung durch *Brettanomyces* zu flüchtigen Phenolen; modifiziert nach Oelofse et al. (2008).

**Unbehandelte Weinenzyme unterstützen Bildung von „Brett“-Aromen durch Depsidase**  
 Das Enzym Cinnamoylsterase, auch „Depsidase“ genannt, katalysiert diesen ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Reaktionsabfolge der Freisetzung flüchtiger Phenole (Abb. 3).

Nur wenige weinrelevante Mikroorganismen, wie Milchsäurebakterien, weisen diese Aktivität auf. Jedoch kann Depsidase in Weinenzymen als unerwünschte Nebenaktivität

enthalten sein und so in den Wein gelangen. Vor allem Pektinasen, die mit Schimmelpilz-Produktionsstämmen, vor allem *Aspergillus niger*, hergestellt werden, können dieses Enzym natürlicherweise enthalten (Burkhardt, 1976; Barbe und Dubourdiou, 1998).

Der Begriff Depsidase bezieht sich auf verschiedene Enzyme der Kategorien Chlorogensäurehydrolase (EC 3.1.1.42) und Ferulasäureesterase (EC 3.1.1.73), die die Wirkung auf Weinsäureester-Vorstufen der Hydroxyzimtsäuren gemeinsam haben.

Für *Aspergillus niger* stellt Depsidase ein „Hilfsenzym“ zur besseren Verwertung von pflanzlichen Nahrungsstoffen wie Pektin, Xylan oder Lignocellulose dar (de Vries et al., 2002) – im Wein jedoch führt das Enzym zu dem beschriebenen negativen sensorischen Effekten (Hasselbeck, 1997).

Aus diesem Grund ist Depsidase-Freiheit ein wichtiges Qualitätsmerkmal von Weinenzymen. Die Internationale Organisation für Rebe und Wein (OIV) hat diese Problematik seit vielen Jahren thematisiert und es wurden aufgrund von Empfehlungen der Sachverständigengruppe „Spezifikationen oenologischer Erzeugnisse“ Resolutionen zur Bestimmung der Cinnamoylsterase-Aktivität in Enzympräparaten veröffentlicht.

Erbslöh stellt durch einen aufwendigen Aufreinigungsprozess sicher, dass Depsidase von den gewünschten Enzymaktivitäten wie Pektinase effektiv abgetrennt wird und somit im Endprodukt nicht vorliegt. Der Grenzwert liegt mit 15 Depsidase-Einheiten pro Milliliter oder Gramm sehr niedrig. Wie ein Vergleich verschiedener kommerzieller Wettbewerberprodukte zeigt (Abb. 4), kann nicht jeder Anbieter von Weinenzymen geringe Gehalte an Depsidase sicherstellen.

In vielen der untersuchten Fälle ist die Depsidaseaktivität bedenklich, da bereits Werte ab circa 30 bis 50 Einheiten/ml zu sensorischen Auffälligkeiten führen können. Dies liegt einerseits an der niedrigen sensorischen Schwellenkonzentration der flüchtigen Phenole von einigen hundert µg/l, als auch an der Tatsache, dass bereits unterhalb der Schwellenkonzentration die Fruchtigkeit von vor allem Weißweinen vermindert werden kann und die Weinqualität somit beeinträchtigt wird (Chattonet et al., 1993).

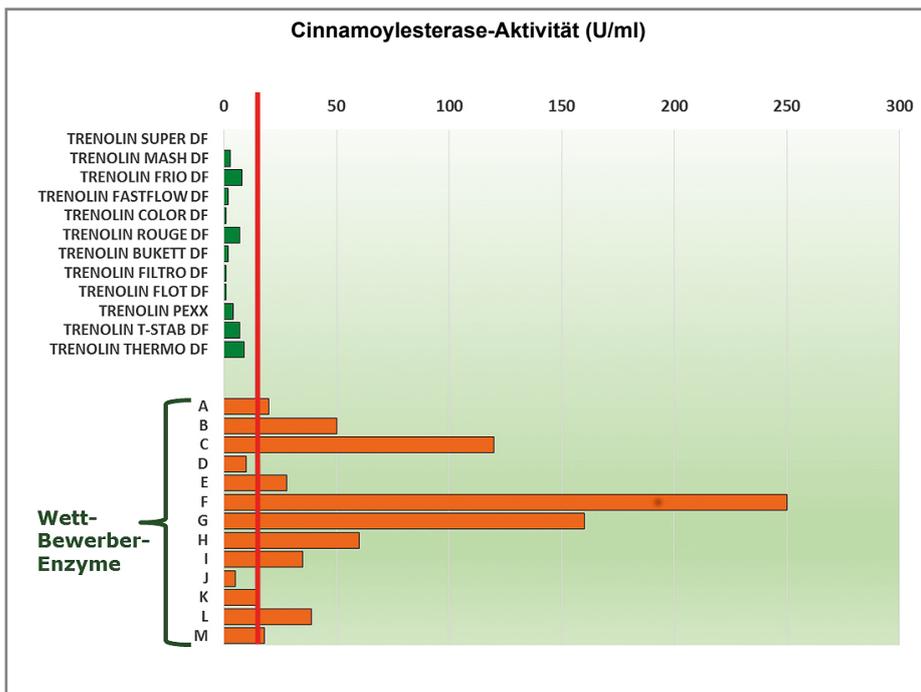


Abb. 4: Depsidase/Cinnamoylsterase-Aktivität verschiedener Erbslöh-Weinenzyme (Trenolin®-Produkte) sowie Wettbewerberprodukte. Der Erbslöh-Grenzwert ist durch eine rote Linie gekennzeichnet: 15 Depsidase-Einheiten/ml.

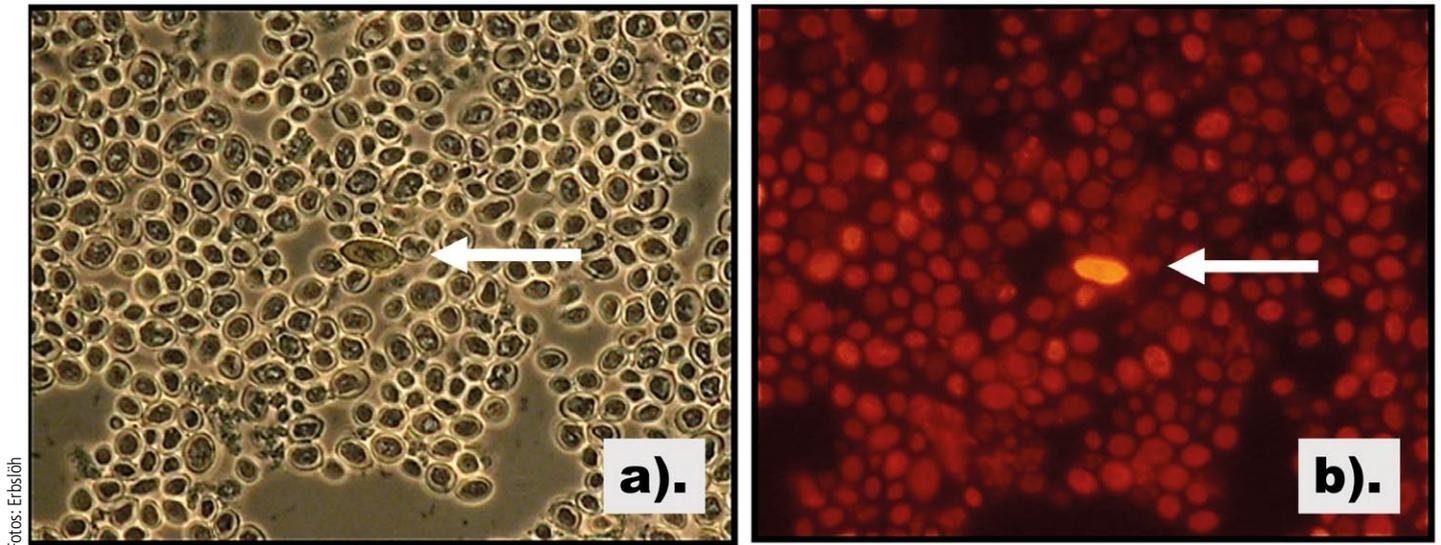


Abb. 5 a, b: Mikroskopische Aufnahme einer Barriquefass-Probe Pinot noir 2014. Vergrößerung 1 000 x a) Phasenkontrast: Geringe Kontamination mit überwiegender Mehrheit an Weinhefen; b) Ergebnis nach Hybridisierung mit fluoreszenz-markierten DNA-Sonden nach Röder und Fröhlich. Berechneter Zelltitel von *Brettanomyces* =  $1 \times 10^3$  Zellen/ml. *Saccharomyces* =  $6 \times 10^7$  Zellen/ml.

### Analyse von *Brettanomyces* durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Für den mikroskopischen Nachweis von verschiedenen *Brettanomyces* Arten hat sich die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) als geeignete Simultan-Methode zur schnellen und sicheren Identifizierung von Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung erwiesen. Eine bedeutende Verbesserung der Technik gelang durch die Entwicklung von DNA-Gemeinschafts-Sonden („side“ probes) nach Röder et al. (2007) und führte zur Optimierung des Hybridisierungssignals im FISH-Assay (Abb. 5 a und b).

### Können „Brett“-Aromen kuriert werden?

Die meisten Empfehlungen zur Beseitigung der Brett-Aromen beziehen sich auf die Reduzierung der flüchtigen phenolischen Verbindungen. Bei anderen flüchtigen Verbindungen, wie Essigsäure helfen zum einen kaum Maßnahmen und zum anderen liegen hier gesetzliche Grenzwerte bezüglich der Verkehrsfähigkeit vor. Auch Lösungsmittel-Ton und Mäuseln sind kaum zu kurieren, wobei hier mit geringem Erfolg Schönungsmittel wie Kasein zum Einsatz kommen können.

Tab. 1: Bedingungen, die *Brettanomyces* fördern oder hemmen

Förderlich	Hinderlich
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rotwein</li> <li>• pH-Wert: &gt; 3.6</li> <li>• Freie SO<sub>2</sub>: &lt; 20 mg/l</li> <li>• Alkohol: &lt; 13 %</li> <li>• Restsüße: &gt; 0.2 g/l</li> <li>• Biotin und Thiamin</li> <li>• Aminosäuren</li> <li>• Hefegeläger</li> <li>• Sauerstoff</li> <li>• T: &gt; 16 °C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Weißwein</li> <li>• pH-Wert: &lt; 3.6</li> <li>• Freie SO<sub>2</sub>: &gt; 40 mg/l</li> <li>• Alkohol: &gt; 13 %</li> <li>• Restsüße: &lt; 0.2 g/l</li> <li>• Vitaminmangel</li> <li>• Klare Weine (abgesetzt)</li> <li>• Filtrierte Weine</li> <li>• Spundvoll</li> <li>• T: &lt; 16 °C</li> </ul>

Als kurative Maßnahmen vor allem für die Entfernung der Phenole eignen sich die Anwendung von Aktivkohle (Granocol® GE), technische Methoden, wie Umkehrosmose, sowie die Lagerung auf inaktiven *Saccharomyces cerevisiae* Kulturen beziehungsweise deren Rindenpräparate (PuroCell O). Die lipophilen Eigenschaften der Zytoplasmamembran begünstigen dabei die Bindung der flüchtigen Phenole. Falls noch vergärbare Restzucker vorhanden ist, kann mit noch besserem Erfolg eine Nachimpfung mit aktiven Bayanus-Weinhefe (Oenoferm® X-treme, Oenoferm® Freddo oder Oenoferm® Color) erfolgen. Bayanus Stämme zeichnen sich dadurch aus, dass sie auch bei geringen Nährstoffgehalten noch Restzucker verstoffwechseln können und dabei gleichzeitig die phenolischen Verbindungen aktiv aufnehmen. Generelle Maßnahmen sind hier aufgelistet.

Empfehlungen, die einer *Brettanomyces*-Infektion vorbeugen oder sensorische Beeinträchtigungen lindern können sind:

- Gesundes Lesegut verwenden
  - Depsidase-freie Enzyme einsetzen, alle Erbslöh Trenolin-Enzyme sind DF (= depsidasefrei)
  - Früher Einsatz von SO<sub>2</sub> (SO<sub>2</sub>-Toleranz der Starterkultur bei gewünschtem BSA berücksichtigen.)
  - Simultane BSA
  - Einsatz von Chitosan (nicht vor oder während der Gärung)
  - Kreuzkontaminationen vermeiden (befallene Fässer aussortieren, „Brett“-Wein nicht verschneiden und in Fässer zurückpumpen)
  - Gärstarke und in der Angärung schnelle Oenoferm-Bayanus-Hefen anwenden
- Beseitigung (teilweise) der „Brett“-Aromen kann erfolgen durch:
- Heferinde oder (inaktive) Hefe
  - Aktivkohle

### Literatur

Barbe C. und Dubourdieu D. 1998. Characterisation and purification of a cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation. *J Sci Food Agric* 78(4):471 - 478.

Burkhardt, R. 1976. Depsidspaltende Nebenwirkung von Enzympräparaten für die Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln, beobachtet bei der Aufbereitung von Obst und Traubenmaischn. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 72: 12.

Chatonnet P, Dubourdieu D, Boidron J-N and Lavigne V. 1993. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J Sci Food Agric* 62(2):191–202.

de Vries RP, van Kuyk PA, Kester HC, Visser J. 2002. The *Aspergillus niger* faeB gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochem J* 363(Pt 2):377-386.

Fröhlich, J., Röder, C., Pfannebecker, J. & Hirschhäuser, S. (2005): Nachweis eines Lebenskünstlers. *das deutsche weinmagazin* 21:26-28.

Hasselbeck G. 1997. Thema Depsidase: Alter Hut oder neues Gewand? *Die Winzer-Zeitschrift* 7:31.

Oelofse A, Pretorius IS and du Toit M. 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 29(2):128-144.

Röder C, König H, Fröhlich J 2007. Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labelled rDNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Res* 7: 1013-1026

### KONTAKT

Weitere Informationen zum Thema sind erhältlich bei:

Erbslöh Geisenheim AG  
Erbslöhstraße 1  
65366 Geisenheim  
☎ (0 67 22) 70 80  
[www.erbsloeh.com/de](http://www.erbsloeh.com/de)