

Einfluss von Sauerstoff auf Gärverhalten und Jungwein

In Gärversuchen mit *Saccharomyces cerevisiae* in Pinot noir Traubenmost (Federweiss) konnte gezeigt werden, dass unter Sauerstoffmangel die Gärung langsamer verläuft und zu erhöhten Restzuckergehalten führt. Nach Zufuhr von Sauerstoff durch Einblasen von Pressluft ins Gärgut zu einem frühen Zeitpunkt kann die Gärung beschleunigt und der Restzuckergehalt erniedrigt werden. Mikroskopische Untersuchungen liessen erkennen, dass die Hefevermehrung markant stimuliert wird. Je später die Zufuhr von O₂ erfolgt, desto geringer sind die positiven Effekte. Nachdem mehr als 70 °Oechsle vergoren sind, ist eine O₂-Zufuhr praktisch wirkungslos. Bei frühzeitiger Sauerstoffzufuhr wird im Gegensatz zur Reduktion des Restzuckers (Fructose) die Glycerin- und Bernsteinsäure-Konzentration erhöht.

KASPAR VON MEYENBURG, SCHIPFGUT, HERRLIBERG
www.schopf.ch

Sauerstoffmangel in Traubenmosten ist neben der begrenzten Stickstoffversorgung bereits im Jahr 1985 von Ingledew und Kunkee als eine der wichtigsten Ursache für Gärstockungen beschrieben worden, die zu hohen Restzuckergehalten führen. In den IN-RA-Labors in Montpellier, Frankreich, wird seit einiger Zeit mit eleganten Gärversuchen der Sauerstoffbedarf der Weinhefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht (Bely et al. 1990, Sablayrolles et al. 1996, Julien et al. 2000). Auf Grund der Resultate wird vorgeschlagen, nach der Hefevermehrungsphase neben 10

bis 30 g (NH₄)₂HPO₄ pro 100 L Most – je nach N-Gehalt – O₂ im Rahmen von 5 mg/L zuzuführen. Diese Empfehlung ist jedoch in der Praxis in unserem Umfeld kaum beachtet worden.

Nach der frühen Traubenernte 2003 ergab sich für mich die Möglichkeit, auf unserem Schipfgut mit einem Praktikanten den Einfluss von Sauerstoff auf die Vergärung durch *Saccharomyces cerevisiae* unter Praxisbedingungen in kleinem Massstab zu studieren. Die Resultate bestätigen die eingangs erwähnten Befunde aus Frankreich und erweitern sie, indem der Einfluss des Zeitpunkts der Sauerstoffgabe auf die Gärungskinetik und auf die Zusammensetzung der Jungweine systematisch untersucht wurde.

Aerobe und anaerobe Gäransätze

Die Versuche wurden in 6 L-Glasflaschen, enthaltend 3.5 bis 4.5 L Traubenmost (Pinot noir, 105 °Oechsle, Ganztraubenpressung, 5 g/L Gesamtsäure; geklärt), durch Impfung mit einem Ansteller von *Saccharomyces cerevisiae* MI 16 (MiTech Inc. Lafayette) gestartet (Anfangszellzahl 2-3 × 10⁶/ml; Temperatur 23–25 °C). Gärtrichter (Schwanenhäule) erlaubten die Registrierung der CO₂-Bildung (Anzahl Gasblasen/min).

- **Aerobe Gärbedingungen** wurden durch Belüftung alle zwölf Stunden während zehn Minuten mit Druckluft durch ein Messingrohr (ø 2 mm) erreicht, was einen Eintrag von 5 bis 6 mg O₂/L ergab (gemessen mit O₂-Messgerät oxi 325 mit einer Elektrode Cell Ox 325, Gerber Instruments, Effretikon).
- **Anaerobe Bedingungen** wurden durch Begasung mit CO₂ (Actigal > 99.9% CO₂) durch ein Messingrohr beim Animpfen und nach drei und sechs Stunden jeweils während 15 Minuten etabliert. Die für die Oechslemessungen entnommenen Proben wurden nicht zurückgeführt, um einen unkontrollierten Eintrag von O₂ zu vermeiden.



Matthias Morandi bei den Gärversuchen im Schopf-«Labor».

Stimulation der Gärung

Die Zucker-Abnahmekurven (Abb. 1a) zeigen, dass die Gärungsgeschwindigkeit unter O₂-Ausschluss wesentlich tiefer liegt (ca. 30%) als mit Belüftung. Ausserdem findet man am Schluss nach 17 Tagen Gärdauer im anaeroben Ansatz noch 20g/L Fructose, im belüfteten nur 3 g/L. Bei Teilmengen anaerober Gäransätze wurde dann zu verschiedenen Zeitpunkten mit der Belüftung begonnen. Der Zuckerverlauf in Abb. 1 b zeigt, dass eine frühe (nach 48 bzw. 69 Stunden) Luftzufuhr zu einer ausgeprägten Stimulation der Gärungsgeschwindigkeit führte. Eine Sauerstoffzufuhr 94 Stunden nach Gärstart bewirkte hingegen kaum noch eine Stimulation. Die Ankurbelung der Gärung durch Sauerstoff ist auch am erhöhten CO₂-Ausstoss nach Belüftung erkennbar (Abb. 1c).

Nach Zusatz von Stickstoff (0.2 g (NH₄)₂HPO₄ + 0.2 g Fermaid/L beim Animpfen: Abb. 2a) zeigte sich zudem, dass unter anaeroben Bedingungen die Gärungsgeschwindigkeit durch die N-Gabe stark erhöht wurde (ca. 70%). Durch Belüftung (Abb. 2b) wird eine zusätzliche Stimulation erreicht. Der Restzuckergehalt war in diesem Fall anaerob 10 g/L und belüftet 1 g/L. Auch in diesem Fall nimmt die Stimulation durch die Belüftung ab, je später damit begonnen wird.

Die Werte der Gärstimulation nach Belüftung aus vier unabhängigen Versuchen sind in Abb. 3a zusammengefasst. Der Befund, dass bei anaeroben Bedingungen die Stimulation durch Belüftung zu einem frühen Zeitpunkt sehr ausgeprägt ist und später stark abnimmt, ist sehr klar ersichtlich: Durch Belüftung zu einem Zeitpunkt, bei dem 20 °Oe der anfänglichen 105 °Oe vergoren sind, wird eine zirka 60%ige Stimulation erreicht (mit oder ohne N-Zusatz). Nachdem bereits zwei Drittel der anfänglichen 105 °Oe vergoren waren, trat praktisch keine Stimulation mehr auf.

Analysen des Restzuckers sowie der Bernsteinsäure und des Glycerin bei Abschluss der Versuchsgärungen nach 16 bis 19 Tagen sind in Abb. 3b und 3c dargestellt. Parallel zur abnehmenden Stimulation der anaeroben Gärungsansätze durch O₂ finden wir - je später belüftet wurde - ohne N-Gabe eine markante Erhöhung des Restzuckers von 3 g bis auf 22g/L (Fructose) und mit N-Zusatz eine Zunahme von 1 g bis 10 g/L. Umgekehrt verhält es sich mit den Gärungsprodukten Bernsteinsäure und Glycerin, für die in beiden Fällen umso höhere Konzentrationen im Jungwein gefunden wurden, je früher der Sauerstoffmangel durch Belüftung aufgehoben wurde (Abb. 3c). Nach früher Belüftung liegen die Werte für Glycerin bei 11 bis 12 g/L und für Bernsteinsäure bei 1.5 g/L, unter anaeroben Bedingungen bei 7 bis 8 g/L beziehungsweise 0.7 bis 0.8 g/L. Der überraschende Befund, dass die Essigsäure-Konzentration unter von Anfang an aeroben Bedingungen um 0.5 g/L lag, ohne O₂ oder bei später Zufuhr (< 75 °Oe) aber um 1 g/L, bedarf der Überprüfung, da rückblickend eine Acetatbildung in den restzuckerhaltigen Jungweinen vor der HPLC-Analyse nicht ausgeschlossen werden kann.

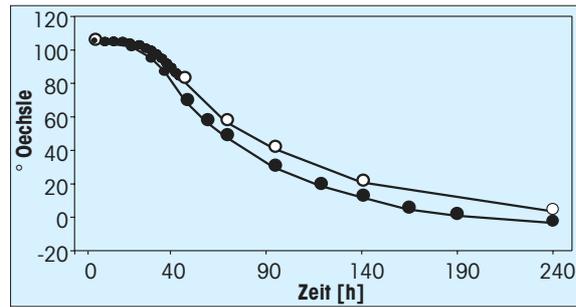


Abb. 1a: Belüftete aerobe (●) und anaerobe (○) Gärung von süss gepresstem Pinot noir Traubenmost (105 °Oe). Der anaerobe Gärungsverlauf bis 48 h ist angenommen.

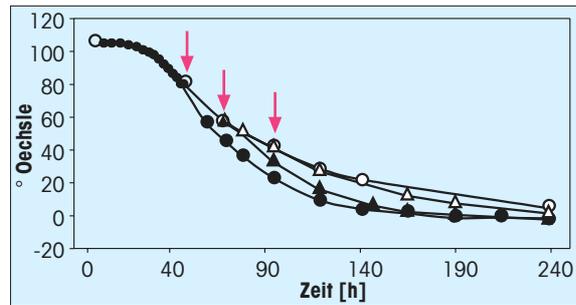


Abb. 1b: Einfluss der Zufuhr von Luft zu anaerob gärendem Most (○) auf den Gärungsverlauf. Beginn der Belüftung (Pfeile) nach 48 h (●), 69 h (△) bzw. 94 h (▲).

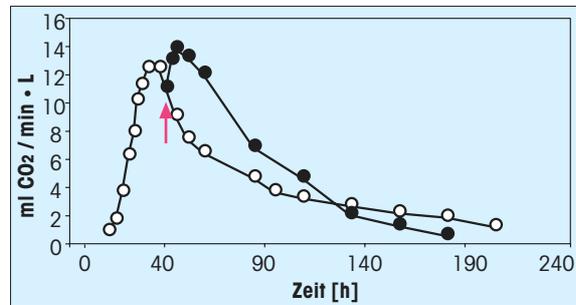


Abb. 1c: CO₂-Bildung bei anaerob Gärung (○) und bei Belüftung des Mosts nach 48 h (●).

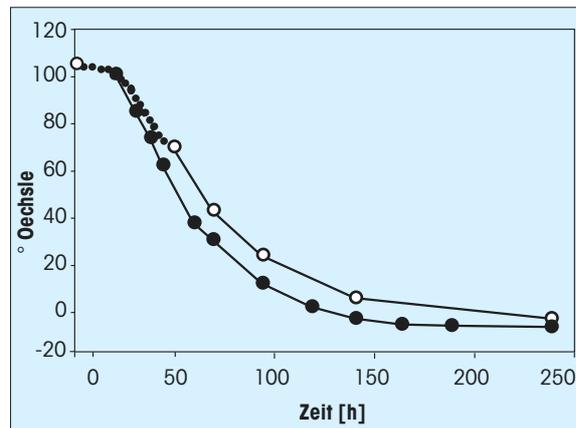


Abb. 2a: Belüftete (●) und anaerobe Gärung (○) des gleichen Traubenmosts wie in Abb. 1, jedoch mit Zugabe von 0.2 g/L (NH₄)₂HPO₄ und 0.2 g/L Fermaid. Der anaerobe Gärungsverlauf bis 47 h ist angenommen.

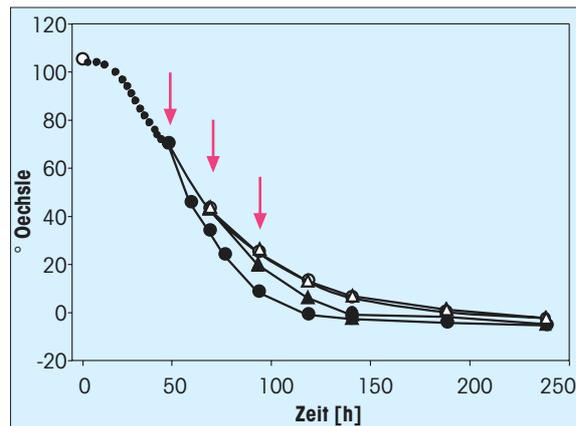


Abb. 2b: Einfluss der Belüftung auf einen mit Stickstoff angereicherten anaeroben Traubenmost (○); Start der Belüftung (Pfeile) nach 47.5 h (●), 67.5 h (△) bzw. 93 h (▲).

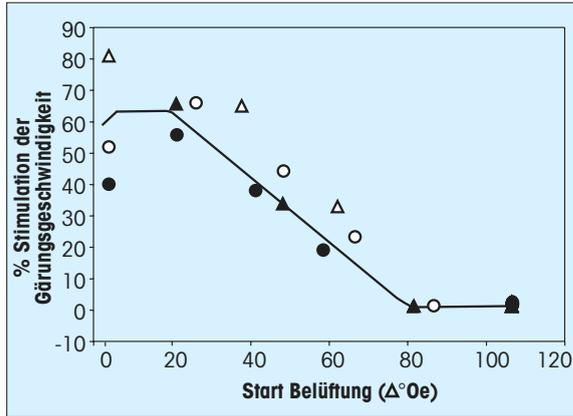


Abb. 3a: Stimulation der Gärung durch Belüftung von anaerobem Pinot noir Traubenmost in Abhängigkeit vom Zuckergehalt zum Zeitpunkt der O₂-Zufuhr. Die prozentuale Stimulation von 3 voneinander unabhängigen Ansätzen ohne N-Zugabe (●), (○), (▲) und einem Ansatz mit N-Zugabe (▲) sind als Funktion der beim Belüftungsbeginn bereits vergorenen Zuckermenge (Δ°Oe) aufgetragen.

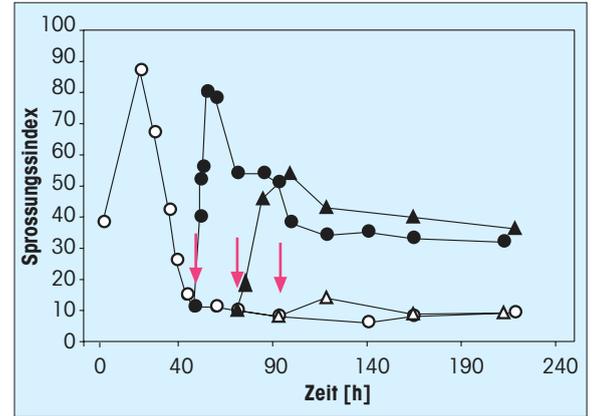


Abb. 4: Prozent sprossende Hefezellen während der anaeroben Gärung (○) und nach Belüftung zu verschiedenen Zeitpunkten (Pfeile): 48 h (●), 69 h (▲) bzw. 94 h (△).

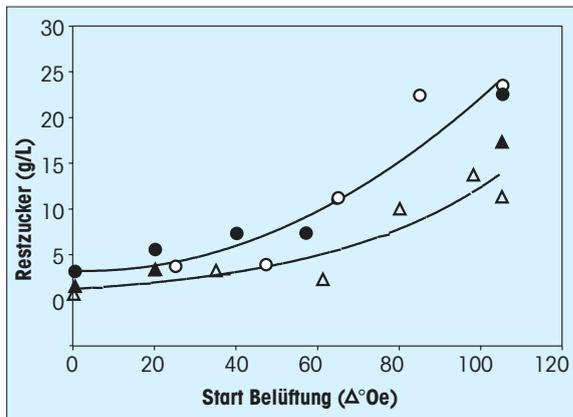


Abb. 3b: Restzuckergehalt (Fructose g/L) im Jungwein nach der Gärung in Abhängigkeit vom Belüftungszeitpunkt (s. Legende zu Abb. 3 a).

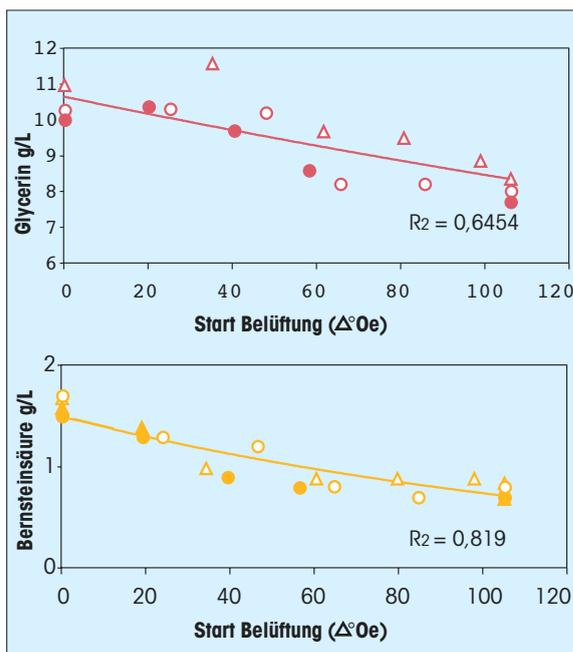


Abb. 3c: Glycerin- und Bernsteinsäure-Konzentration im Jungwein nach der Gärung (16-19 Tage) in Abhängigkeit vom Belüftungszeitpunkt.

Wie wirkt der Sauerstoff?

Die Hefezellzahl während der anaeroben und aeroben Gärung lag bei 0.7 beziehungsweise 1.5×10^8 /ml. Dies lässt vermuten, dass Sauerstoffmangel das Zellwachstum und die Zellvermehrung - das heisst die Sprossung - hemmt. Tatsächlich führte ein Wechsel von anaerober zu aerober Gärung durch Luftzufuhr innerhalb von zwölf Stunden zu einer Verdoppelung der Zellzahl. Die mikroskopische Beurteilung der Sprossungsaktivität (von Meyenburg 1968) liess erkennen, dass eine O₂-Zufuhr zum Zeitpunkt, an dem 20 °Oe abgebaut sind, zu einer deutlichen Induktion der Sprossbildung führt. Der Prozentsatz sprossender Zellen steigt innerhalb von drei Stunden von 20% auf 60% und erreicht nach fünf Stunden 80% (Abb. 4), wobei bei drei Stunden die Tochterzellen noch sehr klein sind und sich dann über die nächsten zehn Stunden zu ausgewachsenen Zellen entwickeln (Abb. 5a, b, c). Eine erst einen Tag später durchgeführte Belüftung führt zu einer geringeren (50%) Sprossungsinduktion, die nicht mehr zu Ende zu laufen scheint (Abb. 1d; Blockade in der Sprossungsphase wahrscheinlich wegen N-Mangels). Praktisch keine Induktion der Sprossbildung fand statt, wenn mit der Sauerstoffzufuhr ein weiterer Tag zugewartet wurde (Abb. 4).

Anaerob gärender Traubenmost wurde nach Abbau von 25 °Oe einmal für eine zunehmende Zeitdauer belüftet, was zu Sauerstoffkonzentrationen von zirka 1.5, 3 und 5 mg O₂/L führte. Die Sprossungsinduktion war immer praktisch dieselbe und die Restzuckerpegel lagen bei Versuchsende gleich tief wie nach repetitiver Belüftung mit je 5 mg O₂/L. Verschiedene Untersuchungen (Sablayrolles et al. 1996; Julien et al. 2000) zeigen denn auch, dass eine einmalige Gabe von 5 mg O₂/L nach Ende der Hefevermehrungsphase genügt, um die negativen Effekte des O₂-Mangels aufzuheben.

Seit dem Jahr 1953 ist bekannt, dass *S. cerevisiae* ohne Sauerstoff kein Ergosterol bilden kann, das für das Funktionieren der Zellmembranen und Mitochondrien (Andreasen und Stier 1953) unabdingbar ist. Eine Gabe von 0.1 mg Ergosterol/L anstelle von Luft (Abb. 4) resultierte in einer vergleichbaren

Sprossungsinduktion. Dies weist darauf hin, dass

1. O₂-Mangel einen Ergosterolmangel induziert (Andreasen und Stier 1953).
2. der anaerob induzierte Mangel den Beginn des Sprossungszyklus blockiert führt.
3. dass diese Blockierung durch Ergosterolzufuhr aufgehoben werden kann. Andererseits zeigte sich, dass die Hemmung der Endvergärung unter Sauerstoffmangel durch Ergosterol nicht aufgehoben wird. Die Restzuckerkonzentration lag unter diesen Bedingungen bei 18 g/L fast gleich hoch wie ohne Ergosterolzugabe.

Was heisst das für die Praxis?

Während der Vergärung durch *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt sich – abhängig von der Ausgangskonzentration – im Gärgut ein O₂-Mangel. Die Sauerstoffsättigung des Ausgangsmaterials hängt stark von der Kellertechnik (Abbeeren, Maischeförderung, Pressen und Mostklärung) ab. Der Mangel entsteht einerseits durch Verbrauch von O₂ durch die Weinhefen, wobei dieser Anteil eher klein ist, da durch Katabolit-Repression unterdrückt (Beck und von Meyenburg 1968). Andererseits führt die CO₂-Bildung zur Austreibung von O₂. Dies verhindert vor allem den Eintrag von Luftsauerstoff.

Um die negativen Effekte des Sauerstoffmangels aufzuheben, genügt eine relativ geringe Sauerstoffzufuhr von zirka 2 mg/L gelöstem O₂, allerdings unter der Bedingung, dass sie früh genug erfolgt. Ein guter Zeitpunkt scheint in Übereinstimmung mit den Empfehlungen französischer Forscher eine Belüftung kurz nach der Hefevermehrungsphase, in der Regel nach 15 bis 25 °Oe Zuckerabbau. Das ist der Zeitpunkt, zu dem der Sprossungsindex der Hefen von 80% auf unter 30% fällt (Abb. 4).

Aus technischer Sicht kommen für die Sauerstoffzufuhr bei der Gärung die Begasung mit O₂ durch eine Fritte, eine Belüftung mit Pressluft oder ein offener Umzug in Frage (Blateyron et al. 1998). Die letztgenannte Methode führt nach eigenen Messungen zu einem Sauerstoffeintrag von 3 bis 4 mg/L. Höhere O₂-Gaben (z.B. mehrfacher Eintrag von 5 mg O₂/L) zum Zeitpunkt der grössten Gärungsaktivität (siehe CO₂-Bildungsrate in Abb. 1c) oder kurz nachher haben keine negativen Effekte. Die zweimalige Zugabe von Sauerstoff zu diesem frühen Zeitpunkt mag in der Praxis das optimale Vorgehen sein. Die durch Begasung mit Luft während zehn Minuten eingetragene O₂-Menge von 5 bis 6 mg/L wurde in unseren Versuchen innerhalb von 20 bis 30 Minuten vollständig verbraucht. Es etablieren sich also sehr rasch wieder anaerobe Bedingungen. Es ist deshalb anzuraten, bei Belüftungsversuchen zur Behebung des Sauerstoffmangels die O₂-Konzentration mittels O₂-Elektrode laufend zu messen. In grossen Gärbehältern, in denen die Temperaturführung kritisch werden kann, wird empfohlen den Sauerstoffeintrag etwas zu verzögern, um die Bildung von Gärungswärme nicht zu forcieren.

Neben dem Sauerstoffbedarf ist bekanntlich auch der N-Versorgung Aufmerksamkeit zu schenken. Eine anfängliche Gabe von je 0.2 g/L (NH₄)₂HPO₄ und

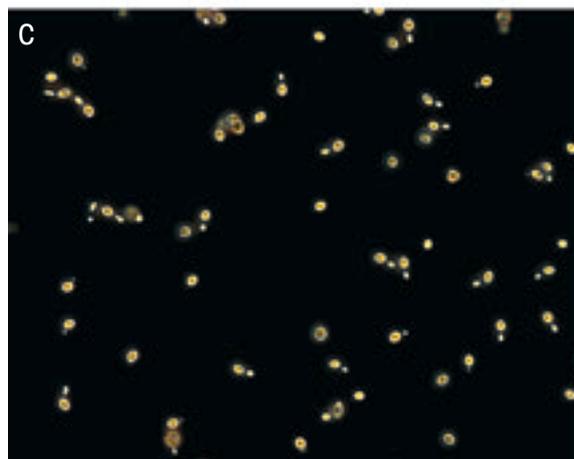
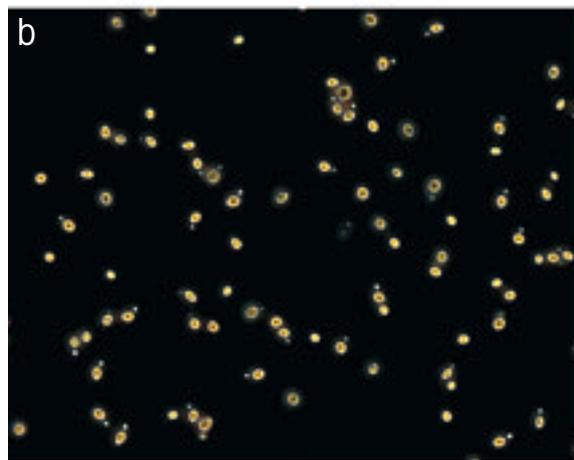
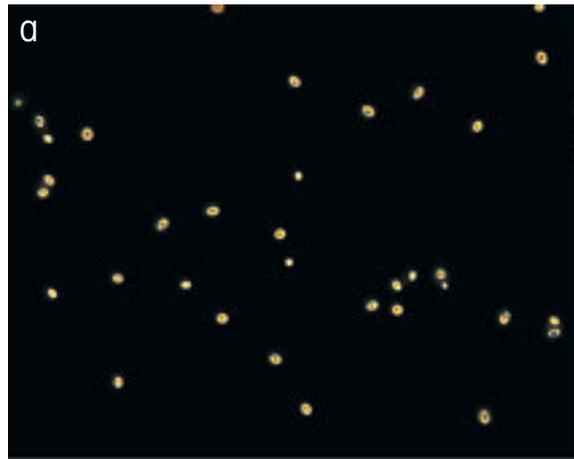


Abb. 5a-c: Mikroskopie der Hefezellen; a: bei anaerober Gärung bei 47 h vor Beginn der Luftzufuhr im Versuch in Abb. 1; b: 7 h und c: 9 h nach Belüftungsbeginn (s. Abb. 4).

Fermaid beschleunigte in federweissem Pinot noir-Most die Gärung (ca. +70%) und führte zusammen mit Sauerstoff zu einer raschen und vollständigen Endvergärung (Abb. 2a, b; Abb. 3a, b). Niedrigere anfängliche Stickstoffgaben resultierten in proportional geringerer Stimulation des Gärverlaufs. Versuche in Montpellier zeigten allerdings, dass eine Verzögerung der N-Gabe bis zur Mitte der Fermentation bei problematischen Traubenmosten ein Vorteil sein kann.

Besonders wichtig für die Praxis scheint die durch frühe Sauerstoffzufuhr ausgelöste Erniedrigung der



Mattias Morandi am Mikroskop: Bestimmung des Sprossungsindex.

Restzuckermenge nach der Gärung und die Erhöhung der Glycerin- und Bernsteinsäure-Gehalte (Abb. 3c): Alle drei Effekte sind wünschenswert, vor allem auch die Bildung von Bernsteinsäure in säurearmen Jahren wie 2003.

Dank

Mattias Morandi gebührt der erste Dank für die sorgfältige Versuchsüberwachung und die Analysen während seines Praktikums in unserem Betrieb. Mein Dank geht auch an Prof. Peter Lüthy (ETH Zürich) für mannigfache praktische Unterstützung, an Petra Hofmann für die HPLC-Analysen der Jungweine, an Prof. Jürg Gafner und Daniel Pulver (alle Agroscope FAW Wädenswil) für zahlreiche fruchtbare Diskussionen.

Anne Marie von Euw (Bibliothek FAW) sowie Sibylle Krieger (Danstar Ferment AG, Renningen) danke ich für ihre Hilfe bei der Literatursuche, Fritz Rudnicki (Rheineck) für die leihweise Überlassung des Sauerstoffmessgeräts und Prof. Terry Leighton für die Weinhefe MI 16.

Literatur

- Andreasen A. A. and Stier T.J.B.: Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*: Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* 41: 23–35, 1953.
- Beck C. and Meyenburg K. von: Enzyme pattern and aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various degrees of glucose limitation. *J. Bacteriol.* 96: 479–486, 1968.
- Bely M., Sablayrolles J.M. and Barre P.: Description of alcoholic fermentation kinetics: Its variability and significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 319–324, 1990.
- Blateyron L., Aguera E., Dubois C., Gerland C. and Sablayrolles J.M.: Control of oxygen additions during alcoholic fermentations. *Vitic. Enol. Sci.* 53: 13–35, 1998.
- Ingledew W.M. and Kunkel R.E.: Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 65–76, 1985.
- Julien A., Roustan J.L., Dulau L. and Sablayrolles J.M.: Comparisons of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological consequences. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 215–222, 2000.
- Meyenburg K. von: Der Sprossungszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*. *Path. Microbiol.* 31: 117–127, 1968.
- Meyenburg, K. von: Energetics of the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae* during glucose limited growth. *Arch. Mikrobiol.* 66: 289–303, 1969.
- Sablayrolles J.M., Dubois C., Maginot C., Roustan J.L. and Barre P.: Effectiveness of combined ammoniacal and oxygen additions for completion of sluggish and stuck fermentations. *J. Ferm. Bioeng.* 82: 377–381, 1996.

RÉSUMÉ

Influence de l'oxygène sur le comportement de fermentation du jeune vin

Des essais de fermentation entrepris avec Saccharomyces cerevisiae dans le moût de raisin pinot noir ont permis de montrer qu'un manque d'oxygène ralentissait la fermentation et aboutissait à des teneurs plus élevées en sucre résiduel. Un apport d'assez faibles quantités d'oxygène par insufflation d'air comprimé dans le moût à un stade relativement précoce de la fermentation alcoolique, c'est-à-dire, lorsqu'on est encore descendu de moins de 25 °Oe, peut accélérer la fermentation et faire baisser la teneur en sucre résiduel. Les observations au microscope ont révélé que la multiplication des cellules de levure était stimulée de façon significative. Plus l'apport d'O₂ est retardé, plus la stimulation de la fermentation est faible et plus la quantité de sucre résiduel sera élevée. Une fois que la fermentation a dépassé les 70 °Oe, un apport d'O₂ reste pratiquement sans effet. Tandis que le sucre résiduel (fructose) diminue lors d'un apport précoce d'oxygène, on assiste au contraire à une augmentation considérable de la concentration en acide glycérique et succinique.