

# Früherkennung unerwünschter Mikroorganismen im Wein: *Brettanomyces bruxellensis*

An der Agroscope FAW Wädenswil wurde in Zusammenarbeit mit den Hochschulen Wallis (HEVs) und Wädenswil (HSW) ein System zum qualitativen und quantitativen Nachweis unerwünschter Mikroorganismen im Wein entwickelt. Die Hefeart *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) und die Milchsäurebakterien *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus parvulus* sowie *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus plantarum* können schnell, eindeutig und mit einer tiefen Nachweisgrenze erfasst werden. Das Projekt wird von der Kommission für Technologie und Innovation (KTI) mitfinanziert. Im Folgenden stellen wir das System zum Nachweis von *Brettanomyces bruxellensis* vor.

NAOMI AZUR PORRET, KATHARINA SCHNEIDER, FRANCIS HESFORD  
UND JÜRIG GAFNER, AGROSCOPE FAW WÄDENSWIL

In der Weinbereitung ist es äusserst wichtig, Risikofaktoren wie das Auftreten unerwünschter Mikroorganismen möglichst früh zu erkennen und auszuschalten, bevor Qualitätseinbussen eintreten. All diese unerwünschten Mikroorganismen produzieren nämlich Stoffwechselprodukte, die entweder überhaupt nicht oder nur mit grossem zeitlichen und damit finanziellem Aufwand aus dem Wein entfernt werden können. Ausserdem leidet bei diesen Behandlungen erfahrungsgemäss die Qualität. Wir haben gemeinsam ein System entwickelt, das spezifisch und empfindlich genug ist, um in nur zwei bis – in seltenen Fällen – zehn Millilitern Wein den Nachweis unerwünschter Mikroorganismen zu ermöglichen.

Bei den herkömmlichen mikroskopischen Methoden zur Identifizierung von Mikroorganismen ist die Nachweisgrenze in der Grössenordnung von 1'000 bis 10'000 Zellen pro Milliliter. Das heisst, es muss im Saft, Most oder Wein mindestens die genannte Zahl Hefe- und/oder Bakterienzellen vorhanden sein, damit man sie unter dem Mikroskop überhaupt entdecken und identifizieren kann. Eine solche Ansammlung von Mikroorganismen produziert aber meist eine schon weit über dem sensorisch tolerierbaren Schwellenwert liegende Menge an unerwünschten Stoffwechselprodukten. Mit dem neuen System kann man die Übeltäter bereits beim Vorhandensein von tausend- bis zehntausendmal geringerer Zelldichte zweifelsfrei entdecken und sogar bestimmen.

Damit ergeben sich weitere Vorteile:

- Eine für den mikroskopischen Nachweis meist notwendige Anreicherung der zu untersuchenden Mikroorganismen wird wegen der tiefen Nachweisgrenze überflüssig.
- Die einzelnen Hefe- und Bakterienarten können auch in Mischungen identifiziert werden.
- Geringer Zeitaufwand: Das System liefert innerhalb von 20 Minuten die ersten Resultate.

Auch die Nachteile sollen nicht verschwiegen werden:

- Es kostet etwas: Der Preis der apparativen Ausstattung liegt bei Fr. 55'000.– und die Verbrauchsmaterialien sind auch nicht gerade billig.
- Fachliche Beratung: Zur fehlerfreien Inbetriebnahme und Durchführung der Messungen ist die Begleitung durch eine molekularbiologisch ausgebildete Fachperson nötig.

In der heutigen Anwendung bestimmt das System alle toten wie auch lebenden Mikroorganismen der Arten, auf die es ausgelegt wurde. Es liegen viel versprechende neue Resultate vor, die uns hoffen lassen, dass in Zukunft eine Differenzierung zwischen toten und lebenden Mikroorganismen möglich sein sollte. Das würde bedeuten, dass auch der Vitalitätsnachweis bald in der Praxis angewendet werden kann.

## Der von *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) erzeugte Fehlton im Wein

*Brettanomyces bruxellensis*-Hefen werden in allen Weinbauregionen der Welt gefunden, wenn auch in unterschiedlicher Häufigkeit. Untersuchungen haben gezeigt, dass sie mit einer gewissen Vorliebe in wärmeren Weinbauregionen vorkommen. Sie spielen eine grosse Rolle beim Weinausbau in Barriques, weil sie verschiedene Holzzucker verwerten können. Sie besiedeln bevorzugt neue Barriques. In diesen gibt die Holzoberfläche noch Zucker ab und ist noch nicht mit Weinstein belegt. Sobald *Brettanomyces* optimale Bedingungen für Wachstum und Vermehrung vorfindet, kann dies zum Verderben der Weine führen. Durch die pilzliche Stoffwechselaktivität werden chemische Substanzen gebildet, die durch folgende sensorische Ausdrücke beschrieben werden: Pferdeschweiss (in Südafrika spricht man auch von – sorry – «Affenscheisse», wie immer die riechen mag!), Kuhmist (feucht und trocken), feuchtes oder

nasses Leder, Schweißsocken, Hansaplast, medizinischer oder würziger Geruchseindruck usw.

Sobald die für dieses Geruchsbild verantwortlichen chemischen Substanzen im Wein sensorisch wahrgenommen und mit den bis heute zur Verfügung stehenden Methoden analytisch bestimmt werden können, kann man sie mit keiner technologischen Massnahme im Wein mehr reduzieren, geschweige denn entfernen. Zur Verringerung des Fehltons bleibt der Praxis dann nur der Verschnitt mit fehlerfreien Weinen. Deswegen ist es für die Weinproduktion sehr wichtig ein System zur Hand zu haben, das den Nachweis der unerwünschten *Brettanomyces*-Hefen ermöglicht, bevor bereits sensorische Veränderungen im Wein eingetreten sind.

Wir haben festgestellt, dass die Leitsubstanzen des *Brettanomyces*-Fehltons den menschlichen Geruchs- und Geschmacksschwellenwert erreichen, wenn wir zwischen 1'000 und 10'000 *Brettanomyces*-Hefezellen pro Milliliter Wein nachweisen können. Diese Zellkonzentrationen entsprechen gerade der Nachweisgrenze bei der mikroskopischen Untersuchung (s. oben). Solche Muster können deshalb optisch nicht zweifelsfrei zugeordnet werden. Die Empfindlichkeit des neuen Systems reicht weit unter den Wahrnehmbarkeits-Schwellenwert. Die Geruchsschwellenwerte für die verschiedenen Substanzen, die zum so genannten «Brett»-Fehlton führen, sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

**Tab. 1: Geruchsschwellenwerte für die drei Leitsubstanzen des *Brettanomyces* Fehlton.**

4-Ethylguaiacol	50 µg/L
4-Ethylphenol	300 – 600 µg/L
4-Ethylcatechol	50 µg/L*

\*Diese Substanz ist erst kürzlich an der Agroscope FAW im Wein entdeckt worden. Daher wurden die Schwellenwerte noch nicht validiert. Die angegebene Konzentration ist ein Erfahrungswert.

**Tab. 2: Degustation, Zellzahlbestimmung und Analyse der Leitsubstanzen verschiedener Barrique-Weine.**

Muster	«Brett-Aroma»	<i>B. brux.</i> Zellen/mL	4-Ethylguaiacol µg/L	4-Ethylphenol µg/L	4-Ethylcatechol µg/L
1	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>3</b>	<b>ja</b>	<b>3'330</b>	<b>147</b>	<b>831</b>	<b>177</b>
4	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>6</b>	<b>wenig</b>	<b>16</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>
7	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>12</b>	<b>unsicher</b>	<b>73</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>
<b>13</b>	<b>ja</b>	<b>38'400</b>	<b>49</b>	<b>169</b>	<b>27</b>
<b>14</b>	<b>unsicher</b>	<b>19</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>
15	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: weniger als 10 Zellen/mL bzw. unter der Nachweisgrenze

## Praxisnachweis von *Brettanomyces*-Hefen

Ein Beispiel aus einer Kellerei in der Ostschweiz kann die Aussagekraft unseres Systems in Bezug auf den Nachweis von *Brettanomyces bruxellensis*-Hefen verdeutlichen: Die Untersuchungen wurden in fünfzehn durchnummerierten Barriques durchgeführt. In Tabelle 2 sind die sensorischen Ergebnisse, die Zellzahlen und die Bestimmungen der Leitsubstanzen für den Brett-Fehlton zusammengestellt. Diese drei Erhebungen wurden unabhängig voneinander, also «blind» durchgeführt, das heisst die Personen kannten vor der Degustation beziehungsweise der Analyse weder Ursprung noch Benennung der verschiedenen Proben.

Es fällt auf, dass in allen Weinen, die sensorisch nicht beanstandet wurden, weder *Brettanomyces*-Zellen noch die entsprechenden Leitsubstanzen gefunden wurden (Proben 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 15). In den Proben, deren sensorische Beurteilung unsicher oder undefiniert war (6, 12 und 14), wurden keine Leitsubstanzen gemessen, aber tiefe Zellzahlen bestimmt. Wir gehen davon aus, dass diese Proben, die zwar sensorisch (noch) nicht eindeutig dem *Brettanomyces*-Fehlton zugeordnet werden konnten, bei weiterer Vermehrung aber das Potenzial zur Ausbildung eines «Brett» haben. Solche Weine müssen auf jeden Fall behandelt (filtriert werden), damit sich die Hefen nicht weiter entwickeln können. Das Auffinden solch potenzieller Risikofälle ist die Stärke unseres Systems. Dies war bisher nicht möglich!

Die Zellzahl und die Konzentration der sensorisch relevanten Leitsubstanzen müssen übrigens nicht unbedingt übereinstimmen (Proben 3 und 13). Es gibt vermutlich unter den *Brettanomyces*-Hefen Stämme, die mehr oder weniger dieser Stoffe bilden und somit unterschiedlich sensorisch wirksam werden. Probe 13 enthielt mehr als zehnmal so viele Zellen wie Probe 3, aber die Konzentrationen der Leitsubstanzen waren in Probe 13 eher niedrig. Es kann sein, dass in Barrique 3 Hefestämme vorkamen, die sehr hohe Konzentrationen an Leitsubstanzen bilden. Zu erwähnen ist, dass vielleicht auch die Traubensorte einen Einfluss hatte: Mit Ausnahme des Barrique 13 enthielten alle Proben Pinot noir aus verschiedenen Barriques, Probe 13 enthielt eine so genannte «Bordeaux-Mischung» aus dem Cabernet/ Merlot-Sortenspiegel.

## Filtration von Weinen mit *Brettanomyces*-Fehlton

Durch eine angemessene Filtration mit 0,45 µm Filterschichten können alle *Brettanomyces*-Hefen aus Wein entfernt werden; dies zeigt Abbildung 1 für die Muster aus den Barriques 3 und 13. Die Zellzahl der Hefen geht beim filtrierten Wein (Filtrat) gegenüber dem Ausgangswein (Original) auf Null zurück. Die Filtration hat aber keinen Einfluss auf die Konzentration der Leitsubstanzen im Wein, da diese ja in gelöster Form vorliegen. Auffällig ist, dass im Spülwasser aus den Barriques immer noch eine beachtliche Zahl an *Brettanomyces*-Hefen zu finden ist. Wir können bis heute noch keine optimale Behandlung zur Entfernung solcher Hefen angeben, aber wir arbeiten da-

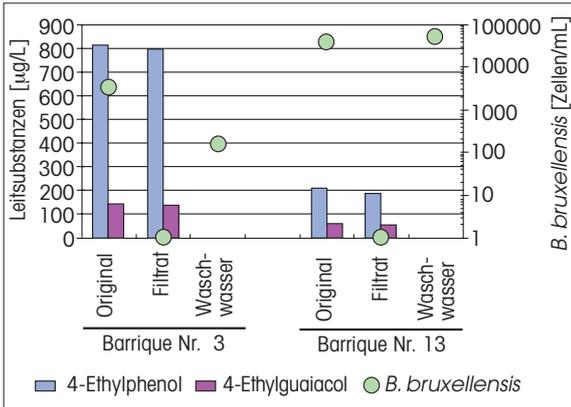


Abb. 1: Mit *Brettanomyces* belastete Weine vor (Original) und nach Filtration mit 0,45 µm Filterschichten (Filtrat).

ran. Es scheint aber, dass das Ausschweffeln der Barriques mit trockenen oder feuchten Schwefelschnitten nach wie vor am besten auch gegen die *Brettanomyces* wirkt.

### Alterung der Weine mit *Brettanomyces*-Hefen

*Brettanomyces*-Hefen sind hinsichtlich ihres Nährstoffbedarfs (leider) sehr anspruchslos. Sie können sich auch noch während des bis zu einem Jahr oder länger dauernden Ausbaus der Weine im Barrique vermehren, nach unfiltrierter Abfüllung sogar in der Flasche. Abbildung 2 zeigt die Situation bei der Flaschenlagerung in einem Betrieb, der seine Rotweine unfiltriert abfüllt. Parallel zur Zellvermehrung nehmen die Leitsubstanzen mit höherem Alter der Weine zu. Es besteht die Gefahr von Problemen mit der langfristigen Kundenzufriedenheit, weil sich die Weine nach dem Kauf während der Lagerung stark verändern können. Die Kundschaft kauft einen Wein, der vielleicht (noch) sauber und sortentypisch ist und nur wenig *Brettanomyces*-Fehlton aufweist. Laut dem unter Weinkennern zirkulierenden Spruch «Ein bisschen «Brett» ist nett» kann ein Anflug der genannten Geruchskomponente durchaus noch Anklang finden. Der Wein wird sich aber während der Lagerung so verändern, dass er bereits nach drei Jahren (siehe Abb. 2) einen deutlichen *Brettanomyces*-Fehlton und fehlende Sortentypizität aufweist – und ein Riesens «Brett» ist eben nicht mehr nett!

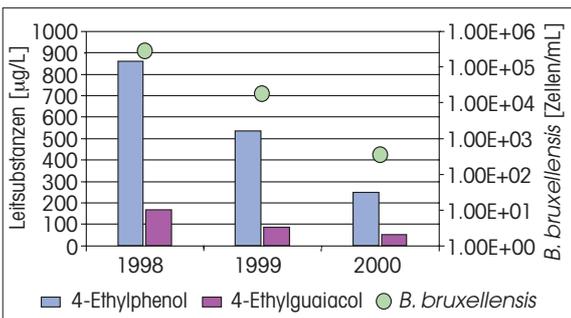


Abb. 2: Vorkommen von *Brettanomyces bruxellensis* und zwei unerwünschten Leitsubstanzen in drei unfiltrierten Jahrgangsweinen desselben Betriebs.

### Nutzen des Systems im Praxisalltag

Eine Analyse auf das Vorhandensein von *Brettanomyces*-Hefen mit unserem System ist in der Praxis vor allem als Prophylaxe sinnvoll. Wichtig wäre auch die Kontrolle, bevor Weine aus verschiedenen Gebinden zusammen gebracht und dann unfiltriert abgefüllt werden. Dabei besteht immer die Gefahr einer unbeabsichtigten «Impfung» von *Brettanomyces*-freien Weinen mit diesen unerwünschten Hefen. Werden sie mit unserem molekularbiologischen System erfasst, können problematische Weine vor der Assemblierung filtriert werden. Ausserdem ist die Anwendung des Nachweissystems angebracht, wenn aus einem grossen Gärgebilde Weine in Barriques umgefüllt werden. Weist der «Mutterwein» *Brettanomyces*-Hefen auf, werden diese unter (ungünstigen) Umständen auf Hunderte von Fässern verteilt und diese damit infiziert.

Ansprechperson: Prof. Jürg Gafner, Agroscope FAW Wädenswil, Postfach 185, 8820 Wädenswil. Tel. 01 783 63 50, E-Mail: juerg.gafner@faw.admin.ch

### RÉSUMÉ

#### Dépistage précoce de micro-organismes indésirables dans le vin: *Brettanomyces bruxellensis*

Dans la vinification, il est important de pouvoir dépister les micro-organismes avant que des métabolites indésirables aient eu le temps de se former. Exemples de liaisons indésirables dans le vin: l'acide acétique, les amines biogènes, des valeurs élevées d'acide lactique ou des substances qui conduisent au «défaut de goût Brettanomyces». Les maîtres de chai doivent pouvoir recourir à un système de dépistage capable de fournir des résultats rapidement, directement, avec une spécificité élevée et une grande sensibilité. Un système a été mis au point qui permet d'effectuer avec deux, exceptionnellement jusqu'à dix millimètres de vin, de moût ou de jus qu'il n'est pas nécessaire d'enrichir; le dépistage de *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*), *Pediococcus damnosus* et *Pediococcus parvulus*, ainsi que de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum*. Le nouveau système présente l'avantage, par rapport à la méthode microscopique, d'un seuil de dépistage mille à dix mille fois plus bas. Nous ne sommes pas encore capables, pour l'heure, de distinguer les cellules mortes des cellules vivantes, mais nous travaillons sur le système d'identification exclusive des micro-organismes vivants. Dans une première partie, nous présentons les avantages d'un dépistage de *Brettanomyces bruxellensis*.