

Bildung von Zuckersäuren durch Essigsäurebakterien auf Trauben und im Wein

WOLF-RÜDIGER SPONHOLZ¹, MARTIN BRENDEL² und PERIADNADI^{1*}

¹ Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie
D-65366 Geisenheim, Von-Lade-Straße 1
E-mail: Sponholz@fa-gm.de

² Johann Wolfgang Goethe-Universität, Institut für Mikrobiologie
D-60439 Frankfurt am Main, Marie-Curie-Str. 9

* Name vollständig

Essigsäurebakterien sind auf Trauben weit verbreitet, besonders auf verletzten. Dort verändern sie gemeinsam mit ebenfalls anderen vorkommenden Mikroorganismen (Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen) das Medium Most in seiner Zusammensetzung. Nach bisherigen Untersuchungen wurden alle Veränderungen dem Stoffwechsel von Botrytis cinerea zugeschrieben. So kommt es zu der Annahme, dass Gluconsäure und Glycerin in Mosten allein dem Stoffwechsel des Pilzes zuzuschreiben sind. Alle nicht dieser Norm entsprechenden Zusammensetzungen der Inhaltsstoffe werden deshalb als Fälschungen angesehen. Untersuchungen an Essigsäurebakterien haben gezeigt, dass sie spezifische Inhaltsstoffe, die Ketozuckersäuren, unter aeroben Verhältnissen aus Glucose bilden. Diese Substanzen werden von Botrytis nicht gebildet und sind daher allein den Essigsäurebakterien zuzuschreiben. Besonders 2,5-Diketogluconsäure erscheint in dieser Beziehung wichtig. Ihr Vorkommen in tunesischen Rotweinen beweist, dass Acetobacter liquefaciens auf diesen Trauben vorhanden war. Die hohen Gluconsäuregehalte in diesen Mosten und Weinen entstammen somit dem aeroben Stoffwechsel von Essigsäurebakterien, da Botrytis cinerea auf Rotweinträuben unerwünscht und in heißen Klimaten äußerst selten ist. Auch die Herkunft des Glycerins wäre unter diesen klimatischen Umständen dann eher der begleitenden Hefeflora zuzuschreiben, da in diesen Weinen der Glyceringehalt nicht wesentlich erhöht ist und Mostglycerin fehlt.

Schlagwörter: Rotwein, Essigsäurebakterien, Ketozuckersäuren, Gluconsäure, Glycerin, 2,5-Diketogluconsäure

Formation of saccharide acids by acetic acid bacteria on grapes and in wine. Acetic acid bacteria are often found on grapes, mainly on damaged ones. There together with other microorganisms (bacteria, yeasts and moulds) they alter the composition of the must. All these alterations have been attributed to the metabolism of Botrytis cinerea up to now. Therefore the formation of gluconic acid and glycerol in the must is considered a product of the metabolic activity of this mould. All wines with another composition than this were seen as altered wines. Experiments with acetic acid bacteria have shown unique substances formed from glucose under aerobic conditions only by these bacteria. These substances are not produced by Botrytis cinerea but only by acetic acid bacteria. Especially 2,5-diketogluconic acid seems to be very important. The presence of 2,5-diketogluconic acid in Tunisian red wines shows for the first time the occurrence of Acetobacter liquefaciens on these grapes. The high concentrations of gluconic acid in these musts and wines are products of Acetobacter, because Botrytis cinerea is unwanted on grapes for red wine production and also very rare in hot climates. Also glycerol seems more likely to be a product of the accompanying yeasts under these climatic conditions, because of the absence of high glycerol levels and the so-called "must glycerol".

Key words: Red wine, acetic acid bacteria, saccharide acids, gluconic acid, glycerol, 2,5-diketogluconic acid

La formation d'acides sacchariques à l'aide de bactéries acétiques sur les raisins et dans le vin. Les bactéries acétiques sont largement répandues sur les raisins, notamment sur les grains de raisin endommagés. Ils y modifient la

composition de l'agent moût en commun avec d'autres microorganismes qui y sont également présents (bactéries, lies et champignons de moisissure). Dans le cadre des recherches faites jusqu'à présent, toutes les modifications ont été attribuées au métabolisme du *Botrytis cinerea*. Il en résulte l'hypothèse que la présence d'acide gluconique et du glycérol dans les moûts est uniquement le résultat du métabolisme du champignon. Toutes les compositions des substances non conformes à cette norme sont donc considérées comme falsifications. Des essais effectués sur des bactéries acétiques ont eu pour résultat qu'elles produisent des substances spécifiques, les cétoacides sacchariques, dans des conditions aérobies à partir de la glucose. Ces substances ne sont pas produites par le botrytis et doivent donc être attribuées aux bactéries acétiques. L'acide dicéto2,5-gluconique semble être particulièrement important dans ce contexte. Sa présence dans des vins rouges tunisiens prouve que l'*Acetobacter liquefaciens* était présent sur ces raisins. Les teneurs élevées en acide gluconique dans ces moûts sont donc dues au métabolisme aérobie des bactéries acétiques, étant donné que le *Botrytis cinerea* est indésirable sur les raisins à vin rouge et qu'il est extrêmement rare dans les zones à climat chaud. Dans ces conditions climatiques, la provenance du glycérol devrait également être attribuée à la présence des lies, puisque la teneur en glycérol n'est pas sensiblement élevée et que le moût manque de glycérol.

Mots clés : vin rouge, bactéries acétiques, cétoacides sacchariques, acide gluconique, glycérol, acide dicéto2,5-gluconique

Essigsäurebakterien werden in ihrer Gesamtheit im Umfeld der Weinbereitung stets als Verderber angesehen, da sie in der Lage sind, vorhandenes Ethanol durch ihren oxidativen Stoffwechsel in Essigsäure umzusetzen. Essigsäure in Weinen hat jedoch in den meisten Fällen andere Ursachen als diese offensichtliche Bildung durch den aeroben Stoffwechsel dieser Bakterien, die in der Weinbereitung durch die normalerweise anaeroben Bedingungen keine Entwicklungsmöglichkeiten haben.

So bilden Hefen aller Gattungen, die bei der Weinbereitung Relevanz haben, meist deutliche Konzentrationen von Essigsäure. *Saccharomyces cerevisiae* bildet während der Vergärung von Zucker abhängig von der zu vergärenden Konzentration erhöhte Mengen zwischen 0,2 und 0,8 g/l (DITTRICH, 1987). Die „wilden“ Hefen, vor allem *Kloeckera apiculata*, sind in der Lage sehr stark erhöhte Konzentrationen und zusätzlich Essigsäureethylester zu bilden (SPONHOLZ et al., 1990; SPONHOLZ, 1992). Diese unerwünschten Erscheinungen sind umso gravierender, je länger man diesen kryophilen Hefen Gelegenheit zu ihrer Entwicklung lässt und nichts dagegen unternimmt. So sind extreme Kaltgärungen, Vermeidung von SO₂-Zugabe und fehlende Animpfung mit geeigneten Hefekulturen und besonders Kombinationen davon mit geeigneter Sorgfalt zu betrachten - zumal von Stämmen berichtet wird, die durch höhere Alkoholkonzentrationen als 4 %vol. nicht gehemmt werden und außerdem als Killerstämme bekannt sind (RADLER und KNOLL, 1988; SPONHOLZ, 1992).

Ebenso ist eine Essigsäurebildung durch heterofermentative Milchsäurebakterien nicht zu vernachlässigen. Diese Bakterien, einschließlich *Oenococcus oeni*, leben

normalerweise von Glucose, die sie über den Pentosephosphatweg zu CO₂, Lactat und einem C2-Körper abbauen. Der biologische Säureabbau erhöht den pH-Wert, was diesen Bakterien günstigere Vermehrungsbedingungen bietet. Normalerweise verringern sie jedoch den pH-Wert durch ihren Glucosstoffwechsel und werden deshalb auch häufig zur Konservierung von Lebensmitteln eingesetzt. In Weinen kommt eine Besonderheit hinzu, die durch die gleichzeitige Anwesenheit von Fructose bedingt ist. Dadurch, dass die Affinität der Enzyme zu ihren Substraten unterschiedlich ist, werden die gebildeten Reduktionsäquivalente aus dem Glucoseabbau in Weinen nicht zur Reduktion von Acetylphosphat über Essigsäure zu Ethanol verbraucht wie in reinen Glucosemedien, sondern zwei Fructose-Moleküle werden zu zwei Mannit-Molekülen reduziert und Essigsäure wird frei. Die Konzentration an Essigsäure ist somit der Menge umgesetzter Glucose durch diese heterofermentativen Milchsäurebakterien äquivalent (DITTRICH, 1987).

Die Essigsäurebildung auf Trauben setzt immer das Vorhandensein von Ethanol und damit auch die Anwesenheit von Ethanol bildenden Mikroorganismen voraus. Auf Trauben werden diese in der Regel Hefen sein. Essigsäurebakterien bilden aus Zucker keine Essigsäure und kein Ethanol (DE LAY et al., 1984; ESCHENBRUCH und DITTRICH, 1986). Sie bauen Zucker über den Glucosemonophosphatweg ab (KING et al., 1956). Die Glykolyse ist nur schwach ausgeprägt, da die Phosphofruktokinase fehlt (STOUTHAMER, 1960). Der Entner-Doudoroff-Weg ist nur bei Cellulose bildenden Stämmen ausgeprägt, die als *Acetobacter aceti* subspecies *xylinum* beschrieben wurden (LEISINGER, 1965; KERSTERS und DE LAY, 1968). *Acetobacter* und Gluco-

nobacter sind bemerkenswert durch ihre direkte Oxidation von Zuckern, Alkoholen und Steroiden (DE LAY und KERSTERS, 1964; ASAI, 1968; SWINGS, 1992). Nach der Bertrand-Hudson-Regel werden Polyole mit einer cis-Stellung zweier benachbarter sekundärer Hydroxylgruppen in D-Konfiguration zur primären alkoholischen Gruppe zu der korrespondierenden Ketose durch Acetobacter-Arten umgewandelt. Auch *Gluconobacter oxidans* verfügt über diesen Stoffwechselweg. Primäre alkoholische Gruppen, auch solche von Zuckern, werden bevorzugt oxidiert, wie Glucose zu Gluconsäure. Acetobacter bevorzugt alkoholreiche Nischen im Gegensatz zu den Zucker liebenden Gluconobacter (SWINGS und DE LAY, 1981). Durch die weitere Oxidation von Gluconsäure kann man zwischen den Stoffwechselwegen von Acetobacter bzw. Gluconobacter und *Botrytis cinerea* unterscheiden, welche zu dieser Stoffwechselleistung nicht in der Lage ist (SPONHOLZ und DITTRICH, 1984 und 1985).

Eine Unterscheidung erscheint aber notwendig, da in der einschlägigen Literatur Gluconsäure stets als Produkt von *Botrytis cinerea* angesehen wird und sie mit dem diesem Schimmelpilz zugeschriebenen Glycerin in Deutschland zur Beurteilung von Weinen herangezogen wird (HOLBACH und WOLLER, 1976). Gluconsäure wird als beweisender Stoff bei Verdacht auf unerlaubten Zucker- oder Glycerinzusatz gewertet (HOLBACH und WOLLER, 1978). So gelten weniger als 0,3 g/l als Indiz, dass bei Mostgewichten über 110 g/l das Ausgangsmostgewicht von 110 °Oe noch nicht erreicht wurde. Dies gilt als unerlaubte Zuckeringung. Neben Schimmelpilzen bilden aber auch Essigsäurebakterien sehr viel Gluconsäure, aber kein Glycerin. Dieses, neben etwas Ethanol, entsteht jedoch durch die stets mitinfizierenden Hefen. Der Gluconsäuregehalt wird auch als Grenzwert dafür angesehen, dass eine Bildung von im Most bereits vorhandenem Glycerin („Mostglycerin“) durch *Botrytis* noch nicht eingetreten sein kann (DITTRICH, 1987). Gluconsäure- und Glyceringehalt in Mosten und Weinen werden somit stets verknüpft und *Botrytis cinerea* zugeschrieben.

Ein Einfluss anderer Mikroorganismen auf den Trauben wird dabei nicht mitberücksichtigt. Auf gesunden Trauben werden Hefe-Zellzahlen von 100.000 pro Gramm Beerengewicht festgestellt (BARNETT et al., 1972). In Japan wurden in aus gesunden Beeren gewonnenen Mosten 0,02 bis $68 \cdot 10^3$ Zellen pro Milliliter, in botrytisfaulen Beeren jedoch $9,3 \cdot 10^6$ Zellen gefunden (GOTO et al., 1984). Bei Untersuchungen in Bordeaux fiel das häufige Vorkommen der osmotoleranten Hefe *Candida*

stellata in einer Konzentration von 10^7 Zellen pro Milliliter auf (FLEET et al., 1984). Die Polyolbildung dieser und anderer Hefen ist beträchtlich (SPONHOLZ et al., 1986; SPONHOLZ, 1989 und 1992). Daneben wurden auf solchen Beeren ebenfalls Milchsäurebakterien verschiedener Gattungen gefunden (FLEET et al., 1984). Vor allem werden aber auch Essigsäurebakterien festgestellt. In Mosten aus gesundem roten Traubenmaterial wurden 10^4 Zellen pro Milliliter gefunden, davon 80 % Gluconobacter, aber auch *Acetobacter aceti* und *A. pasteurianus*. Bei verletzten Beeren kann die Zellzahl bei 10^5 bis 10^6 /ml liegen. Bei *Botrytis*-infiziertem Lesegut können $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter vorkommen (LAFON-LAFOURCADE und JOYEUX, 1981; LAFON-LAFOURCADE und RIBEREAU-GAYON, 1984). Bei all diesen Mikroorganismen, wie sie auf gesunden und vor allem auf verletzten Beeren (*Botrytis*, Hagelschlag, Vogelfraß, Aufplatzen am Stielansatz) vorkommen, ist die Herkunft von einem und die Zuordnung zu einem bestimmten Mikroorganismus schon bei einem einzigen Inhaltsstoff zweifelhaft. Es soll trotzdem versucht werden, die Herkunft der Gluconsäure anhand typischer Stoffwechselprodukte von Essigsäurebakterien zu klären. Dies sollen ihre Oxidationsprodukte, die Ketogluconsäuren, ermöglichen.

Material und Methoden

Mikroorganismen

Es wurden 13 Stämme von Acetobacter und zwei Stämme von Gluconobacter untersucht. Folgende Stämme entstammen der Sammlung des Fachgebietes Mikrobiologie und Biochemie der Forschungsanstalt Geisenheim: *Acetobacter aceti* var. *aceti*, *Acetobacter aceti* var. *xylinum*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter rancens*, *Gluconobacter oxydans* var. *suboxydans*.

Folgende Stämme wurden ursprünglich von der Czech Collection of Microorganisms (CCM) bezogen: *Acetobacter liquefaciens* Stamm 1347, *Acetobacter liquefaciens* Stamm 1348-1, *Acetobacter liquefaciens* Stamm

Tabelle 1:
Zusammensetzung des Acetobacter-Mediums (CCM)

Substanzen	Konzentration
Glucose bzw. Fructose	100 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
Agar	25 g/l
Calciumcarbonat	20 g/l

Tabelle 2:
Zusammensetzung des synthetischen Mediums

Substanzen	Konzentration
Glucose bzw. Fructose	100 g/l
Na-Acetat . 3 H ₂ O	5 g/l
L-Ascorbinsäure	5 g/l
Diammoniumhydrogencitrat	2 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
K ₂ HPO ₄	1,5 g/l
Tween 80	1 g/l
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,5 g/l
NaCl	20 mg/l
MnSO ₄ . 1 H ₂ O	20 mg/l
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	20 mg/l
L-Asparaginsäure	0,3 g/l
L-Glutaminsäure	0,3 g/l
DL- α -Alanin	0,2 g/l
L-Arginin.HCl	0,2 g/l
Glycin	0,2 g/l
L-Histidin.HCl	0,2 g/l
L-Leucin	0,2 g/l
L-Lysin.HCl	0,2 g/l
L-Prolin	0,2 g/l
DL- α -Aminobuttersäure	0,1 g/l
L-Asparagin	0,1 g/l
L-Cystein	0,1 g/l
L-Isoleucin	0,1 g/l
L-Methionin	0,1 g/l
L-Phenylalanin	0,1 g/l
L-Serin	0,1 g/l
L-Threonin	0,1 g/l
L-Tryptophan	0,1 g/l
L-Tyrosin	0,1 g/l
L-Valin	0,1 g/l
Guanin	10 mg/l
Adenin	10 mg/l
Uracil	10 mg/l
Xanthin	10 mg/l
meso-Inosit	10 mg/l
Pyridoxolhydrochlorid	10 mg/l
Nikotinsäure	10 mg/l
Ca-D(+)-Pantothenat	10 mg/l
Riboflavin	10 mg/l
Thyaminiumdichlorid	0,5 mg/l
Folsäure	0,2 mg/l
4-Aminobenzoesäure	0,1 mg/l
Cyanocobalamin	0,01 mg/l
D(+)-Biotin	0,01 mg/l

1348-2, *Acetobacter acetigenum* Stamm 296, *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-1, *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-2, *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-3, *Acetobacter peroxydans* Stamm 691-4, *Acetobacter peroxydans* Stamm 8, *Gluconobacter oxydans* Stamm B-548.

Medien und Probematerialien

Das Überimpfen der Bakterien erfolgte in zweiwöchigen Abständen. Das Impfmateriale wurde einer drei Tage alten Kultur entnommen. Die Anzucht der Starterkulturen erfolgte in synthetischen Medien sowie Mosten und Weinen. Die Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien ist in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

Trauben, Moste und Weine

Die Untersuchungen erfolgten mit Trauben der Sorten 'Riesling', 'Rotberger', 'Portugieser blau' und 'Reichensteiner', mit Mosten der Weißweinsorten 'Riesling' und 'Rotberger', mit Weißweinen der Sorten 'Riesling', 'Müller-Thurgau' und mit dem Rotwein eines Sortengemisches aus Deutschland. Zusätzlich wurden Weiß- und Rotweine sowie Konzentrate verschiedener Jahrgänge aus tunesischen Weinanbaugebieten untersucht.

Chemische Analysen

Die Reinsubstanzen wurden einzeln oder zu mehreren in bidestilliertem Wasser gelöst. Bei der Herstellung der synthetischen Medien wurden alle Substanzen außer Tryptophan, Cystein und Ascorbinsäure zusammengegeben, in 200 ml Erlenmeyerkolben (100 ml) abgefüllt und 15 Minuten bei 120 °C autoklaviert. Die Lösung von Tryptophan, Cystein und Ascorbinsäure wurde steriltfiltriert und dem autoklavierten Medium vor dem Ansatz zugegeben.

Die Bestimmung der zu untersuchenden Substanzen erfolgte nach folgenden Methoden:

- Dünnschichtchromatographie nach GOSSELE et al. (1980)
- Ketozuckersäuren nach SPONHOLZ und DITTRICH (1984)
- Organische Säuren, Zucker und Alkohole mittels HPLC (WÜRDIG und WOLLER, 1989)
- Gluconsäure, Essigsäure, Glucose, Fructose enzymatisch (Fa. Boehringer Mannheim)
- Ethanol nach REBELEIN (1973)

Tabelle 3:
Farbentwicklung der Ketozuckersäuren

Substanzen	Farbe unter Tageslicht nach:		Farbe unter UV-Licht nach:	
	3 Minuten	16 Stunden	3 Minuten	16 Stunden
2-Ketogluconsäure	gelb	lila	gelb-fluoreszenz	blau-fluoreszenz
5-Ketogluconsäure	leichtblau	blaugrün	dunkelblau	grün
2,5-Diketogluconsäure	grün	gelb	gelb-fluoreszenz	gelb-fluoreszenz

- Dihydroxyaceton nach SPONHOLZ und WÜNSCH (1980)
- Die Probenvorbereitung zur chromatographischen Analyse erfolgte nach SPONHOLZ und DITTRICH (1984).

Das Wachstum der Bakterien wurde durch Trübungsmessung im Photometer bei 546 nm gemessen. Die Lebendkeimzahl wurde mit dem Plattengussverfahren bestimmt. Als Vergleichswerte wurden die Extinktionen unbebrüteter Medien sowie von Mosten und Weinen verwendet.

Eine Tüpfelmethode auf Cellulose-DC-Platten gab in den Kulturlösungen einen schnellen Aufschluss darüber, wann die Kulturen geerntet werden müssen und wo sich die Hauptfraktionen der gesuchten Säure befanden. Die Bestimmung der einzelnen Ketozuckersäuren erfolgte dann chromatographisch (SPONHOLZ, 1990). Die Dünnschichtchromatogramme wurden unter Tages- und UV-Licht nach drei Minuten und nach 16 Stunden untersucht (GOSSELE et al., 1980). Die sich entwickelnden Farben der einzelnen Substanzen auf den Dünnschichtplatten sind zeitabhängig und können Tabelle 3 entnommen werden.

Animpfung der Essigsäurebakterien auf Traubenbeeren

Um die Kontamination durch Schimmelpilze, Hefen sowie andere Bakterien zu vermeiden, wurden die Traubenbeeren vor der Animpfung oberflächlich sterilisiert. Dafür wurden die ganzen Trauben in einer 70%igen ethanolschen Lösung für 30 Sekunden untergetaucht. Der ethanolsche Rest wurde dann mit einem sterilen Papiertuch abgetupft, bevor die Trauben unter einer Sterilbank über Nacht mit steriler Luft überblasen wurden, um sie zu trocknen. Die oberflächlich sterilisierten Trauben wurden in sterile Weckgläser (Einsiedelgläser) gelegt und mit homogener Bakterienmasse (5 ml/kg Trauben) mittels einer Sprühflasche beimpft. Anschließend wurden die Weckgläser mit einer luftdurchlässigen Kappe verschlossen. Zur Kontrolle wurden sterile Trauben von gleichem Volumen mit sterilem bidestillierten Wasser besprüht. Die Bildung von Essigsäure aus dem zur Sterilisation benutzten Ethanol wurde dabei in Kauf genommen.

Die Animpfung erfolgte auf:

1. den oberflächlich sterilen Trauben, die mit einer sterilen Impfnadel angestochen wurden, um die Verletzung der Beerenhaut zu imitieren;



Abb. 1: Wachstumsvergleiche von *Acetobacter xylinum* bei unterschiedlicher Art der Animpfung auf den Traubenbeeren. (links: 'Rotberger', intakt; rechts: 'Riesling', angestochen)

Tabelle 4:

Vorkommen von Glucose, Fructose, und Gluconsäure (g/l) in Traubenbeeren 15 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien

Bakterien	Glucose		Fructose		Gluconsäure	
	rot	weiß	rot	weiß	rot	weiß
<i>A. aceti aceti</i>	34,3	37,5	37,0	47,0	4,5	5,1
<i>A. liquefaciens</i>	33,3	37,0	33,7	48,3	7,9	4,1
<i>A. xylinum</i>	49,4	39,7	53,5	47,4	5,6	7,2
<i>G. oxidans</i>	46,0	33,3	44,7	36,9	2,7	5,9

Tabelle 5:

Konzentrationen von 2-Keto-, 5-Keto- und 2,5-Diketogluconsäure (mg/l) in Traubenbeeren 15 Tage nach Beimpfung mit verschiedenen Essigsäurebakterien

Bakterien	5-Ketogluconsäure		2-Ketogluconsäure		2,5-Diketogluconsäure	
	rot	weiß	rot	weiß	rot	weiß
<i>A. aceti aceti</i>	1866	1468	439	839	0	0
<i>A. liquefaciens</i>	1563	774	218	349	186	293
<i>A. xylinum</i>	1956	1225	621	541	0	0
<i>G. oxidans</i>	194	372	364	382	0	0

2. beziehungsweise auf den normalen intakten oberflächig sterilen Trauben.

Für die Analyse wurden die Trauben nach unterschiedlichen Zeiten entnommen und gepresst. Die Analyse der Moste erfolgte entweder direkt oder nach Tiefrieren.

Ergebnisse und Diskussion

In der Natur erfolgen die Verletzungen der Beerenhaut meist durch Insekten, Vögel oder Schimmelpilze. Auch natürliche Risse und ein teilweises Abtrennen der Stielchen werden beobachtet. Hier erfolgt die Infektion durch die Mikroorganismen. Durch das Anstechen der Beeren tritt der zuckerhaltige Saft aus und ermöglicht die Vermehrung der angeimpften Essigsäurebakterien. Bei diesen Beeren ist das Bakterienwachstum ausgehend von den verletzten Teilen bereits nach drei Tagen zu beobachten (Abb. 1).

Die ausgetretenen Säfte und aerobe Bedingungen erfüllen alle Bedingungen für das Wachstum der Bakterien. Glucose wurde zu Gluconsäure oxidiert und je nach den Fähigkeiten der Stämme zu 5-Ketogluconsäure, 2-Ketogluconsäure oder zu 2,5-Diketogluconsäure weiter oxidiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Essigsäurebakterien-Stämme große Mengen von Zuckersäuren gebildet haben (Tab. 4). Sowohl auf verletzten roten als auch auf weißen Trauben wurden dann aus der Gluconsäure auch ihre Oxidationsprodukte gebildet, wobei al-

lein *A. liquefaciens* in der Lage war, auch eine weitere Oxidation zu 2,5-Diketogluconsäure durchzuführen (Tab. 5). Bei Untersuchungen der Bildung dieser Substanzen durch *Botrytis cinerea* zeigte sich, dass ein auf Most herangezogener Pilz aus Glucose zwar Gluconsäure zu bilden vermag, dass aber die weiteren Oxidationsstufen, 2- und 5-Ketogluconsäure, lediglich in äußerst geringen Konzentrationen gefunden wurden (SPONHOLZ und DITTRICH, 1985). Diese geringen Mengen sind auf den verwendeten Most zurückzuführen. Kultivierungen auf synthetischen Medien zeigten nie weitere Oxidationsprodukte der Gluconsäure.

Auf Trauben kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Zellzahlen von Essigsäurebakterien. Ausgehend von der Animpfmengung mit 10^5 Zellen pro Milliliter steigt die Bakterienzahl in 15 Tagen auf 10^7 Zellen pro Milliliter an. Dabei vermindert sich durch die Bildung der Säuren der pH-Wert der Moste deutlich, er sinkt in Rotmost von 3,4 auf 2,8 und in Rieslingmost von 3,1 auf 2,9 ab. In sortenreinen Weinen nimmt die angeimpfte Zellzahl dagegen mit der Zeit zunächst deutlich ab, um sich später wieder zu erhöhen. Die ursprüngliche Zellzahl wird auch bei intensiver Essigsäurebildung (bis 85 g/l) nie wieder erreicht. Eine Bildung von Gluconsäure und ihrer Oxidationsprodukte konnte in den trockenen, glucosefreien Weinen nicht beobachtet werden. Die Bildung von Ketozuckersäuren ist von der Anwesenheit von Glucose abhängig. *A. liquefaciens* bildet bei Abwesenheit von Glucose aus 200 g/l Gluconsäure lediglich 1,59 g/l 5-Ketogluconsäure. Bei An-

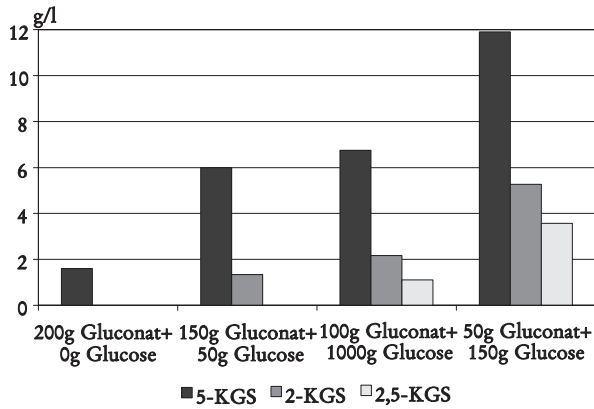


Abb. 2: Bildung von Ketozuckersäuren aus Gluconsäure in Abhängigkeit von der vorhandenen Glucosekonzentration durch *A. liquefaciens*

wesenheit von 50 g/l Glucose und 150g/l Gluconsäure werden 6 g/l 5-Ketogluconsäure und 1,34 g/l 2-Ketogluconsäure gebildet, aber noch keine 2,5-Diketogluconsäure. Erst bei höherem Glucoseanteil werden auch 1,1 g/l 2,5-Diketogluconsäure neben 6,75g/l 5-Ketogluconsäure und 2,16 g/l 2-Ketogluconsäure detektiert. Eine weitere Erhöhung des Glucoseanteils und Verminderung der Gluconsäure auf 50 g/l bewirken, dass nach sieben Tagen in diesem synthetischen Medium 11,9 g/l 5-Ketogluconsäure, 5,27 g/l 2-Ketogluconsäure und 3,57 g/l 2,5-Diketogluconsäure nachzuweisen sind. Dies zeigt, dass Glucose für die Bildung dieser die Essigsäurebakterien charakterisierenden Substanzen benötigt wird und dass sie bei deren Zugänglichkeit für die Bakterien bereits in ganz kurzer Zeit synthetisiert werden können. Gleiches gilt für 2,5-Diketogluconsäure, die erst bei vorhandener 2-Ketogluconsäure synthetisiert wird.

Die bisher gängige Praxis, Rotweine wegen unerlaubten Gluconsäurezusatzes zu beanstanden, weil diese zu

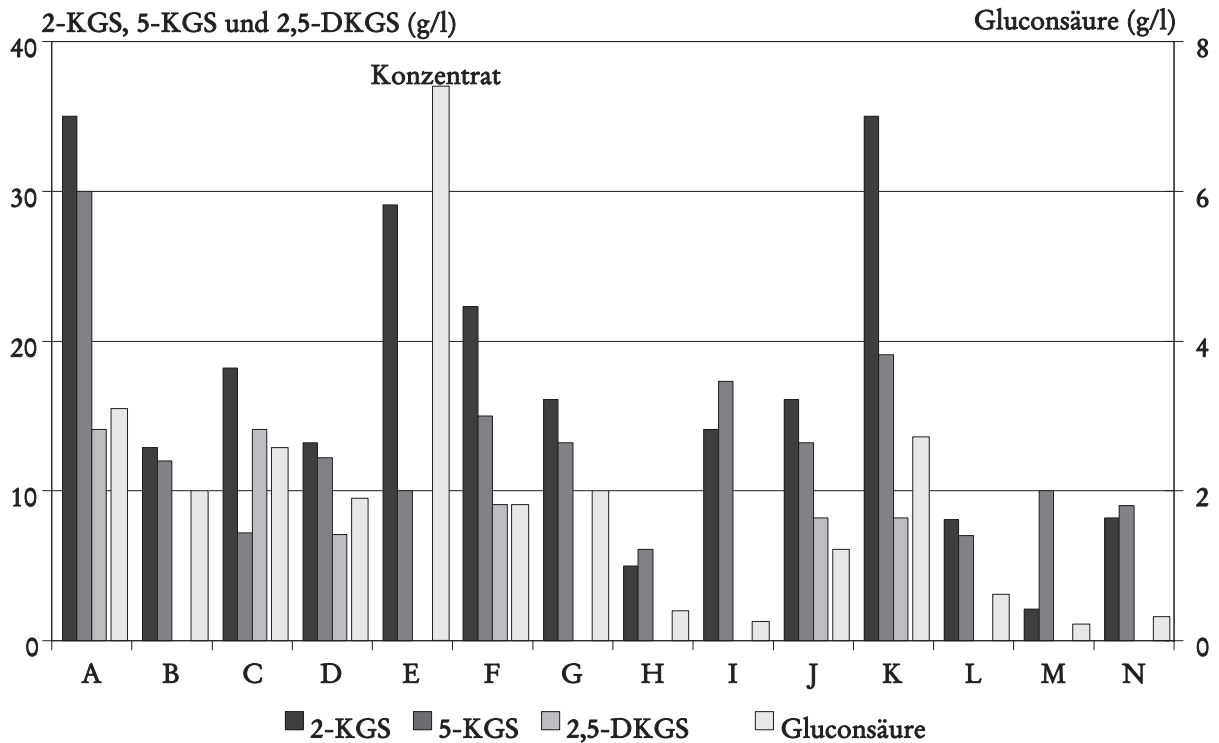


Abb. 3: Ketogluconsäurewerte in tunesischen Rosé- und Rotweinen

A = Edler von Mornag 1990; B = Château de Mornag 1990; C = 50483 rosé; D = 50487 rot; E = Edler von Mornag, Konzentrat; F = Edler von Mornag 1990 rosé; G = Château de Mornag 1990 rot; H = Château de Hammamet 1979; I = Haute Mornag 1979; J = Château de Mornag 1983 rosé; K = Sidi Saad 1990 süß; L = Château de Mornag 1983; M = Domaine de Charme Mornag 1983; N = Edler von Mornag 1983

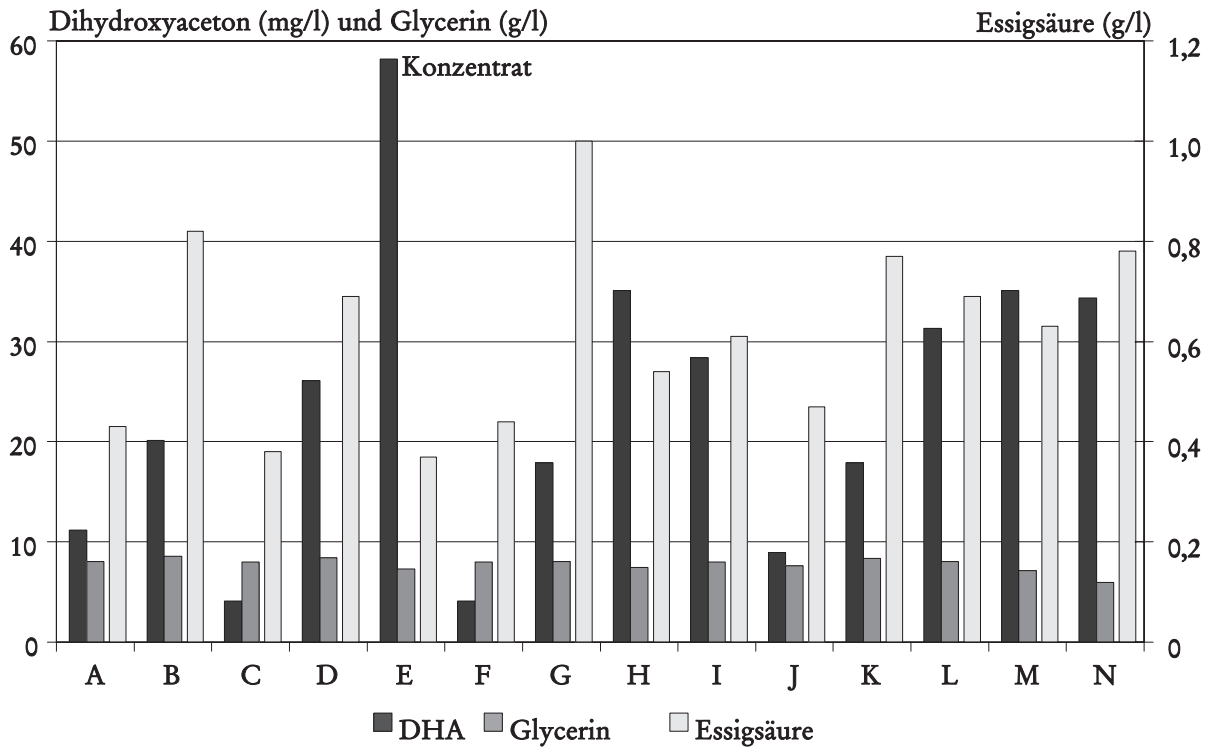


Abb. 4: Dihydroxyaceton-, Glycerin- und Essigsäurekonzentrationen in tunesischen Rosé- und Rotweinen
 A = Edler von Mornag 1990; B = Château de Mornag 1990; C = 50483 rosé; D = 50487 rot; E = Edler von Mornag, Konzentrat; F = Edler von Mornag 1990 rosé; G = Château de Mornag 1990 rot; H = Château de Hammamet 1979; I = Haute Mornag 1979; J = Château de Mornag 1983 rosé; K = Sidi Saad 1990 süß; L = Château de Mornag 1983; M = Domaine de Charme Mornag 1983; N = Edler von Mornag 1983

hohe Gluconsäuregehalte und zu geringe Glyceringehalte aufweisen, sollte hinterfragt werden. Üblicherweise werden Rotweine aus nicht von *Botrytis* befallenen Trauben hergestellt, da die dann vorhandene Laccase die Anthocyane und damit die Farbe der Weine sehr stark negativ beeinflusst (WÜRDIG und WOLLER, 1989). Zusätzlich ist Schimmelpilzbefall, besonders mit *Botrytis*, in den tunesischen Anbaugebieten für rote Trauben, aus denen die untersuchten Proben stammen, weitgehend unbekannt. Daher können die in den tunesischen Proben gefundenen erhöhten Gehalte von Gluconsäure nicht auf *Botrytis*infektion zurückgeführt werden. Diese müssen somit eine andere Herkunft haben. Untersucht man diese Weine genauer, so stellt man fest, dass manche von ihnen neben erhöhten Mengen an Gluconsäure auch weitere Oxidationsprodukte der Gluconsäure aufweisen; wie Abbildung 3 zeigt, sind dies 2- bzw. 5-Ketogluconsäure und auch 2,5-Diketogluconsäure in nicht zu vernachlässigenden Mengen.

Selbst das Konzentrat E ist nicht frei von 2- und 5-Ketogluconsäure (Abb. 3). Durch die Anwesenheit von 2,5-Diketogluconsäure wird indirekt auch die Beteiligung von *A. liquefaciens* an der Bildung dieser Weininhaltsstoffe und seine Anwesenheit auf Trauben bewiesen. Es gibt keinen dieser Weine, der nicht irgendwie diese Stoffwechselprodukte der Essigsäurebakterien aufweist.

Auch das Vorkommen von Dihydroxyacetone, sogar im Mostkonzentrat, zeigt die Anwesenheit von Essigsäurebakterien an, die dieses aus dem auch schon vorhandenen Glycerin gebildet haben (Abb. 4). Ein Befall mit Essigsäurebakterien im Moststadium ist daher bei diesen Weinen wahrscheinlich. Das Vorkommen von Dihydroxyacetone zeigt das Vorhandensein von Glycerin in einem aeroben Stadium der Weinbereitung an. In den Weinen kann es nur nach der Gärung gebildet worden sein, da während dieser das Dihydroxyacetone zu Glycerin reduziert wird. Da aber auch das Konzentrat Glycerin und Dihydroxyacetone enthält, muss dieses

und damit auch die Gluconsäure und ihre Oxidationsprodukte auf den Trauben entstanden sein.

Literatur

- ASAI, T. (1968): Acetic Acid Bacteria, Classification und Biochemical Activities. - Tokyo: University of Tokyo Press, 1968
- BARNETT, J.A. et al. 1972: The numbers of yeasts associated with grapes of Bordeaux. Arch. Mikrobiol. 83: 52-55
- DE LAY, J. and KERSTERS, K. 1964: Oxidation of aliphatic glycols by acetic acid bacteria. Bacteriol. Rev. 28: 164-180
- DE LAY, J., GILLIS, M. and SWINGS, J. (1984): Family VI. Acetobacteraceae Gillis und De Ley 1980. In: KRIEG, N.R. (Ed.): Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. I. - New York: Springer, 1984
- DITTRICH, H.H. (1987): Mikrobiologie des Weines. - Stuttgart: Ulmer, 1987 (Handbuch der Getränke-Technologie)
- ESCHENBRUCH, B. und DITTRICH, H.H. 1986: Stoffbildung von Essigbakterien in Bezug auf ihre Bedeutung für die Weinqualität. Zentralbl. Mikrobiol. 141: 279-289
- FLEET, G.H., LAFON-LAFOURCADE, S. and RIBÉREAU-GAYON, P. 1984: Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1034-1038
- GOSSELE, F., SWINGS, J. and DE LAY, J. 1980: A rapid, simple und simultaneous detection of 2-keto-, 5-keto- und 2,5-diketogluconic acids by thin-layer chromatography in culture media of acetic acid bacteria. Zentralbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg., I. Abt. Originale C 1: 178-181
- HOLBACH, B. und WOLLER, R. 1976: Über den Zusammenhang zwischen Botrytisbefall von Trauben und dem Glycerin- und Gluconsäuregehalt von Wein. Wein-Wiss. 31: 202-214
- HOLBACH, B. und WOLLER, R. 1978: Der Gluconsäuregehalt von Wein und seine Beziehung zum Glycerin-gehalt. Wein-Wiss 33: 114-126
- KERSTERS, K. and DE LAY, J. 1968: The occurrence of the Enter-Doudoroff pathway in bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 34: 393-408
- KING, T.E., KAWASAKI, E.H. and CHELDELIN, V.H. 1956: Tricarboxylic acid cycle activity in *Acetobacter pasteurianum*. J. Bacteriol. 72: 418-421
- LAFON-LAFOURCADE, S. et JOYEUX, A. 1981: Les bacteries acetiques du vin. Bull. O.I.V. 54: 804-829
- LAFON-LAFOURCADE, S. et RIBÉREAU-GAYON, P. 1984: Les alterations des vins par les bacteries acetiques et les bacteries lactiques. Conn. Vigne Vin 18: 183-194
- LEISINGER, T. 1965: Untersuchungen zu Systematik und Stoffwechsel der Essigsäurebakterien. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II. 119: 329-376
- RADLER, F. und KNOLL, C. 1988: Die Bildung von Killertoxin und die Beeinflussung der Gärung durch *Apiculatus*-Hefen. Vitis 27: 111-132
- REBELEIN, H. 1973: Schnellverfahren zur Bestimmung des Alkohol-, Zucker- und Gesamt-SO₂-Gehaltes (durch Destillation) in Wein und Fruchtsäften sowie des Blutalkoholgehaltes. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 2: 112-121
- SPONHOLZ, W.R., DITTRICH, H.H. und HAN, K. 1990: Die Beeinflussung der Gärung und der Essigsäureethylesterbildung durch *Hanseniaspora uvarum*. Wein-Wiss. 45: 65-72
- SPONHOLZ, W.R., LACHER, M. und DITTRICH, H.H. 1986: Die Bildung von Alditolen durch die Hefen des Weines. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 10: 19-24
- SPONHOLZ, W.R. 1992: The influence of a killer-strain of *Hanseniaspora uvarum* on the formation of acetic acid ethyl ester during fermentation of grape must. Biologia oggi 6: 263-266
- SPONHOLZ, W.R. und DITTRICH, H.H. 1984: Über das Vorkommen von Galacturon- und Glucuronsäure, sowie 2- und 5- Ketogluconsäure in Weinen, Sherries, Obst- und Desertweinen. Vitis 23: 214-224
- SPONHOLZ, W.R. und DITTRICH, H.H. 1985: Über die Herkunft von Gluconsäure, 2- und 5-Oxogluconsäure sowie Glucuron- und Galacturonsäure in Mosten und Weinen. Vitis 24: 51-58
- SPONHOLZ, W.R. (1989): Der Traubenmost. In: WÜRDIG, G. und WOLLER, R.: Chemie des Weines. - Stuttgart: Ulmer, 1989
- SPONHOLZ, W.R. 1990: Analytik von Galacturonsäure und anderen Ketozuckersäuren in Pflanzenmaterial. GIT Fachz. Lab 2: 107-116
- SPONHOLZ, W.R. und WÜNSCH, B. 1980: Enzymatische Bestimmung von Dihydroxyaceton in Gegenwart von Glycerin. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 171: 178-197
- STOUTHAMER, A.H. (1960): Koolhydratenstofwisseling van de azijnzuurbacterien. - Thesis Utrecht, 1960
- SWINGS, J. (1992): The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: BALOWS, A., TRÜPER, H.G., DWORKIN, M., HARDER, W. and SCHLEIFER, K.H. (Eds.): The Prokaryotes, 2. Ed., p. 2268-2286. - Berlin: Springer, 1992
- SWINGS, J. and DE LAY, J. (1981): The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: STARR, P.M. et al. (Eds.): The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria, p. 771-778. - Berlin: Springer, 1981
- WÜRDIG, G. und WOLLER, R. (1989): Chemie des Weines. - Stuttgart: Ulmer, 1989 (Handbuch der Lebensmitteltechnologie)

Manuskript eingelangt am 18. März 2004