



Foto: Lallénard

Durch intensive Selektion wurde die IONYS-Hefe entwickelt, die weniger Alkohol bildet.

# Wenn weniger einfach besser ist

**Reinzuchtheife mit geringer Alkoholbildung** (Teil 1) Durch eine intensive Weinhefeselektion wurde der neue Reinzuchtheferstamm IONYS entwickelt, der deutlich weniger Alkohol bildet. Dr. Ilona Schneider, Eaton Technologies Langenlonsheim, erklärt die Hintergründe.

**W**enn im Herbst die reifen Trauben gelesen werden, hoffen Winzer auf viele gesunde und süße Früchte. Den Zucker dieser süßen Trauben wandelt die Hefe bei der Gärung in Alkohol und Kohlendioxid um. Diese Umwandlung gewährleistet, dass aus dem mikrobiologisch anfälligen Traubenmost ein stabiler Wein entsteht. Der Alkoholgehalt ist ausschlaggebend für die Stabilität des Weines, jedoch ist der kontinuierliche Anstieg der Gesamtalkoholkonzentrationen umstritten. Die Gesamtalkoholkonzentration der Weine ist innerhalb der letzten 30 Jahre um 2 Vol.-% weltweit angestiegen. Enthielten Weine vor einigen Jahrzehnten durchschnittlich noch 10 bis 12 Vol.-% Alkohol werden heute 12 bis 14 Vol.-% und mehr erreicht. Diese Erhöhung wirft verschiedene Diskussionspunkte auf.

Erstens hemmen hohe Gesamtalkoholkonzentrationen (> 13 Vol.-%) die Aktivität der Trockenreinzuchtheferen während der alkoholischen Gärung, was zu Gärstockungen oder schleppenden Gärungen führt. Zweitens werden Weine in einigen Ländern, wie Australien, mit einer Alkoholsteuer belegt, deren Höhe sich an der Gesamtalkoholkonzentration orientiert

und damit den Preis in die Höhe treibt. Drittens hat der hohe Alkoholgehalt gesundheitliche Auswirkung, und der Schutz des Verbrauchers vor hohem Alkoholkonsum rückt in das Zentrum der Diskussionen.

Gegenstand vieler wissenschaftlicher Studien der letzten Jahre war ein effektives Alkoholmanagement im Rahmen der weinbaulichen und kellerwirtschaftlichen Möglichkeiten. Zielsetzung ist die Zuckerproduktion der Trauben und damit die Alkoholbildung mit Hilfe von weinbaulichen, kellerwirtschaftlichen, mikrobiologischen und physikalischen Maßnahmen zu reduzieren. Die Projekte zur Reduktion der Zuckerproduktion durch weinbauliche Maßnahmen befinden sich in der Erprobung. Die kellerwirtschaftlichen, mikrobiologischen und physikalischen Verfahren sind bereits realisiert und zugelassen.

## Welche kellerwirtschaftlichen und mikrobiologischen Möglichkeiten gibt es?

Eine Möglichkeit zur Reduktion des Gesamtalkoholgehaltes ist der Einsatz einer Reinzuchtheife mit geringer Alkoholbildung. Bereits in den 1990er und 2000er Jahren wur-

de durch Kreuzungs-, Gen-Expressions- und Gen-Deletions-Experimente versucht die Stoffwechselwege von *Saccharomyces cerevisiae* zu beeinflussen. Das Ziel, anstelle von Alkohol vermehrt Glycerin zu bilden, wurde erreicht. Als Nebeneffekt bildeten die selektierten Hefestämme mehr negative Stoffwechselprodukte wie Acetaldehyd und flüchtige Säure (Essigsäure), was in der Mikroviniifikation (Weinausbau im kleinen Maßstab) zu extrem hohen Gesamt-SO<sub>2</sub>- und Essigsäurekonzentrationen führte. Damit konnten die manipulierten und unausgereiften Hefestämme die Qualitätsanforderungen nicht erfüllen und wurden nicht vermarktet.

Basierend auf diesen Erfahrungen wurde ein neuer Selektionsansatz entwickelt. Mit der adaptive laboratory evolution (ALE) Selektionsmethode, frei übersetzt „natürliche Adaption im Labormaßstab“, erfolgt die Selektion von Hefestämmen auf natürliche Weise. In der nachfolgenden Gen-Expressions-Analyse können die Veränderungen der metabolischen Vorgänge dann auf Genebene kontrolliert und stabilisiert werden.

Mit der ALE-Methode werden Hefestämme, mit dem Selektionsziel geringe Alkoholbildung, einem hohen osmotischen Stress ausgesetzt. Der osmotische Stress wird durch die steigende Zugabe von Kaliumchlorid (KCl) in das Nährmedium ausgelöst. Die sich verändernden Bedingungen zwingen die Hefe ihren Metabolismus auf natürliche Weise anzupassen. Mit Erreichen der maximalen KCl-Konzentration werden die vitalsten Hefe-Isolate selektiert und anschließend geprüft, ob die Alkoholbildung gering und die Glycerinbildung erhöht ist. Ist das Ergebnis positiv, erfolgt die Untersuchung auf Gen-Ebene (Gen-Expressions-Analyse). Sie gibt Aufschluss darüber, ob die selektierten Hefe-Isolate weitere Stoffwechselprodukte, wie Acetaldehyd oder flüchtige Säure, gebildet haben. Werden keine negativen Nebenaktivitäten festgestellt, werden die Isolate fortführend gekreuzt (hybridisiert) und ihre genetische Stabilität auf unterschiedlichen Selektionsmedien getestet. Ist die Selektion erfolgreich, weisen die Hefestämme, unter bestimmten Bedingungen (Gärtemperatur, Nährstoffversorgung), eine geringe Bildung von Alkohol, erhöhte Bildung von Glycerin, 2,3-Butandiol, Acetoin und Bernsteinsäure sowie eine sehr geringe Bildung von Acetaldehyd und flüchtiger Säure auf (Abbildung 1).

Die Kombination von ALE-Methode und Gen-Expressions-Analyse ermöglicht damit einen Gesamtüberblick über die Stoffwechselwege eines Hefestamms und unterstützt die zielgerichtete Hefeselektion.

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse einer Pilotfermentation im 1 hl Maßstab der Rebsorte Syrah. Es wurden drei Hefestämme getestet: Kontrollstamm (Alkoholbildung), Isolat I (reduzierte Alkoholbildung nach ALE-Prozess) und Isolat II (reduzierte Alkoholbildung nach ALE-Prozess, Gen-Expressions-Analyse und

Hybridisierungen). Die Gärtemperatur lag bei 28 °C. Die Rehydrierung der Hefestämme erfolgte nach Herstellerangaben. Beim Kontrollstamm und Isolat I handelt es sich um eine Trockenreinzuchtheefe, bei Isolat II um eine Flüssigkultur. Um Gärstockungen zu vermeiden, wurde der Rotmost mit Komplexhefenährstoffen versetzt. Die Ausgangszuckerkonzentration lag bei 255 g/l.

Nach der alkoholischen Gärung enthielten die Weine keinen Restzucker. Mit dem Kontrollstamm betrug die Alkoholbildung 118,4 g/l, mit Isolat I 113,6 g/l (- 4,6 g/l Alkohol im Vergleich zum Kontrollstamm) und mit Isolat II 107,8 g/l (-10,6 g/l Alkohol im Vergleich zum Kontrollstamm). Damit war die Alkoholkonzentration in den Weinen, die mit den Isolaten vergoren wurden, um 0,6 Vol.-% beziehungsweise 1,3 Vol.-% geringer als im Wein, der mit dem Kontrollstamm ausgebaut wurde. Die Isolate produzierten mit 14,1 g/l und 17,9 g/l mehr Glycerin als der Kontrollstamm mit 10,8 g/l. Der Bernsteinsäuregehalt war mit den Isolat-Vergärungen gegenüber der Kontrolle ebenfalls etwas erhöht. Die Essigsäurebildung war dagegen mit den Isolaten geringer als mit dem Kontrollstamm. Trotz dem, dass die Weine mit den Isolat-Vergärungen 0,004 beziehungsweise 0,005 g/l mehr Acetaldehyd enthielten, hatte die leichte Erhöhung keinen Einfluss auf die Schwefelbilanz. Die Konzentrationen von 2,3-Butandiol lagen mit Isolat I bei 1,98 g/l und Isolat II bei 3,93 g/l im Vergleich zu 1,11 g/l mit dem Kontrollstamm. Die Berechnung der Ausbeute zeigt, dass 17,71 g Glucose (Isolat I) und 18,66 g Glucose (Isolat II) benötigt werden, um 1 Vol.-% Alkohol zu bilden. Damit benötigen sie bis zu 1,67 g mehr Glucose als der Kontrollstamm.

**Fazit**

Kellerwirtschaftliche und mikrobiologische Verfahren beeinflussen den Alkoholgehalt der Weine. Entscheidend ist die Wahl der Reinzuchtheefe, denn sie setzt am zentralen Punkt der Vergärung vom Traubenmost zum Wein an – wenn die Hefezelle den Mostzucker aufnimmt, um ihn zu Alkohol zu verstoffwechseln. Die Erfahrungen haben gezeigt, dass mit der Entfernung oder Manipulation einzelner, intrazellulärer Stoffwechselwege keine effektiven und stabilen Hefestämme mit geringer Alkoholbildung selektioniert werden können. Die isolierten Adaptionen wirken sich auf den Gesamtmetabolismus aus und ziehen negative, sensorische Nebenaktivitäten nach sich.

Erst mit der Kombination ALE-Methode, die das gewünschte Verhalten der Hefe unter Stressbedingungen auf natürliche Weise forciert, Gen-Expressions-Analyse und Hybridisierung konnte die reduzierte Alkoholbildung im Metabolismus stabil und ohne negative Nebenaktivitäten umgesetzt werden. Charakteristisch für den neu entwickelten Reinzuchthefestamm IONYS\* sind die geringe Alkoholbildung und erhöhte Bildung von Glycerin, 2,3-Butandiol, Acetoin und Bernsteinsäure.

Tabelle: Ergebnisse der Gärversuche mit der Rebsorte Syrah im Pilotmaßstab von 1 hl <sup>(6)</sup> *			
Weinparameter	Kontrollstamm	Isolat I	Isolat II (IONYS)
Verbraucher Zucker (g/l)	254,6 ± 0,1	254,0 ± 0,0	254,7 ± 0,2
Alkohol (g/l)	118,4 ± 1,2	113,6 ± 0,9	107,8 ± 0,8
Glycerin (g/l)	10,8 ± 0,4	14,1 ± 0,4	17,9 ± 0,8
Bernsteinsäure (g/l)	1,3 ± 0,1	0,16 ± 0,01	1,5 ± 0,1
Pyruvat (g/l)	0,13 ± 0,01	0,1 ± 0,0	0,15 ± 0,01
Essigsäure (g/l)	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,0	nd*
Acetaldehyd (g/l)	0,016 ± 0,008	0,021 ± 0,001	0,020 ± 0,006
Acetoin (g/l)	nd	nd	0,024 ± 0,005
2,3-Butandiol (g/l)	1,11 ± 0,18	1,98 ± 0,38	3,93 ± 0,30
Ausbeute	Kontrollstamm	Isolat I	Isolat II (IONYS)
Benötigte Glucose (g) für 1 Vol.-%	16,99 ± 0,07	17,71 ± 0,07	18,66 ± 0,08

\*Bemerkung: nd = nicht nachweisbar, nd\* = nicht nachweisbar (< 10 mg/l)

Das Glycerin wird als Alternative zum Alkohol gebildet und reduziert damit die Gesamtalkoholkonzentration. Zusätzlich rundet es den Geschmack ab. 2,3-Butandiol und Acetoin sind neutrale Komponenten in der Gesamtbilanz. Mit der Erhöhung der Bernsteinsäurekonzentration senkt sich der pH-Wert von 0,04 bis 0,2 Einheiten und die mikrobiologische Stabilität steigt. Die Nebenaktivitäten, die Bildung von Acetaldehyd und flüchtiger Säure, sind sehr gering. Unter optimalen Gärbedingungen (Gärtemperatur: > 25 °C, hefeverfügbarer Stickstoff > 200 mg/l) werden im Weinausbau mit dieser Neuentwicklung zwischen

0,4 und 0,8 g/l weniger Alkohol gebildet. Diese Trendbremse, aufgrund der erwünschten „nicht-effektiven Umsetzung des Zuckers in Alkohol“, hilft Rotweine frisch und fruchtig auszubauen. Manchmal ist weniger einfach besser!

In Teil 2 geht es um die Glycerinbildung und deren Einfluss auf den Wein.

Literatur ist bei der Autorin zu erfragen.

\*Der neue Reinzuchthefestamm IONYS™ ist das Resultat einer Weinhefeselektion in Zusammenarbeit mit INRA (Institute National de la Recherche Agronomique) und Lallemand Inc. und zum Patent angemeldet. ■

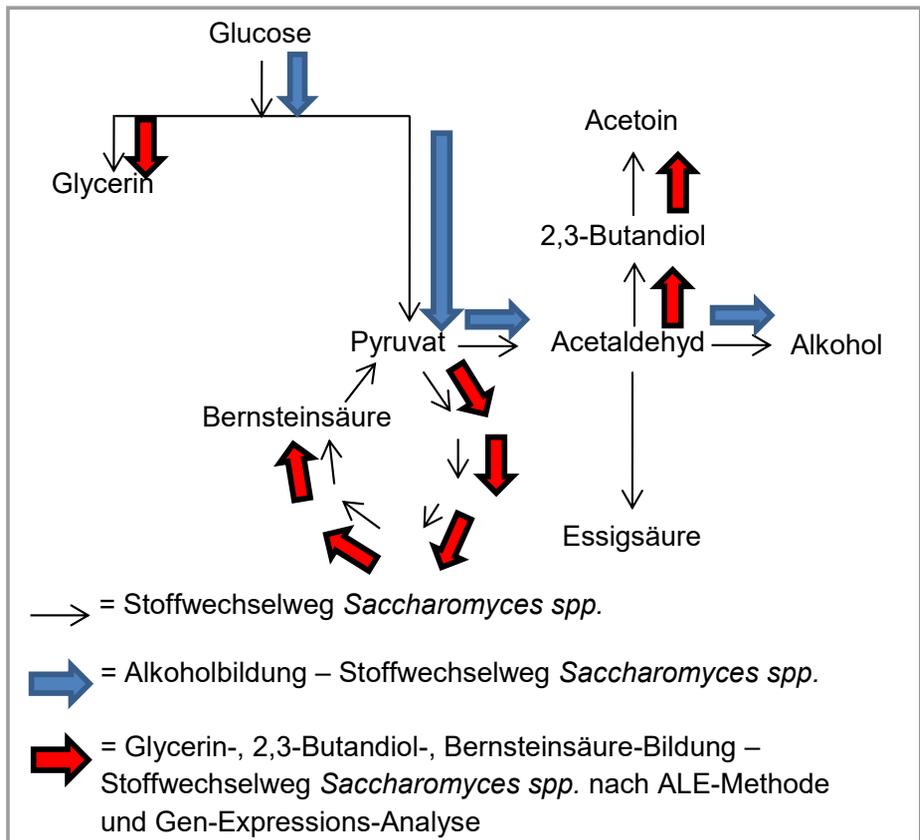


Abb. 1: Stoffwechselweg *Saccharomyces* spp. – Bildung von Alkohol ALE-Methode und Gen-Expressions-Analyse (vereinfachte Darstellung)