

Haloanisole und neue Fässer: die Rolle von Schimmelpilzen

>>> Das Reifen von Wein in Eichenfässern erfreut sich seit Beginn der modernen Önologie und seit sich gezeigt hat, wie es dazu beiträgt, den erlesensten Weinen Ausdruck zu verleihen, wieder eines stärkeren Interesses. Bei einem Standardvolumen von 225 L, was potentiell 300 Flaschen von 75 cl entspricht, kann jeder unerwünschte Zwischenfall dem Produzenten großen Schaden zufügen. Aus diesem Grund ist es für Winzergenossenschaften seit Jahren eine wichtige technische und ökonomische Herausforderung, das versehentliche Vorhandensein von 2,4,6-Trichloroanisol (TCA) in Fässern zu verhindern. <<<



Das Unternehmen LEC Laboratory hat umfassende Erfahrung in diesem Bereich und bietet seit 2012 ein Haloanisole-Überwachungssystem für neue Fässer an, das auf dem Prinzip der dynamischen Beprobung flüchtiger organischer Verbindungen (VOCs) beruht¹. 2015 wies ein in den Vereinigten Staaten untersuchter Wein, der in einem französischen Eichenfass gereift war, eine TCA (2,4,6-Trichloroanisole)-Konzentration von 11 ng/L auf, während der Test nach der Herstellung noch negativ ausgefallen war. Außerdem enthielt der Wein 82 ng/L TCP (2,4,6-Trichlorophenol), was eine TCA-Vorstufe ist. Diese sehr ungewöhnliche Konzentration wies auf eine mögliche natürliche Umsetzung von TCP zu TCA hin, entweder während der Weinherstellung oder während des Transports des Behälters. Bei Versuchen mit malolaktischer Gärung in Anwesenheit von Halophenolen ließ sich die Umwandlung in ihre entsprechenden Haloanisole während der MLF nicht bestätigen. Es wurde vermutet, dass es Schimmelpilze gibt, die sich mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit im Inneren neuer Fässer entwickeln. Dieses Phänomen ist gut untersucht an Gebäuden, die aus mit Pentachlorophenol-haltigen Produkten behandelten Holzbaustoffen gebaut sind, was im Lauf der Zeit und unter dem Einfluss von Schimmelpilzen dazu führt, dass die Raumluft mit Haloanisolen kontaminiert wird^{2, 3, 4, 5}.

Nach 12 Stunden Trocknung wurden 10 g kontaminierter Späne in 100 mL Kolben gefüllt und nach drei verschiedenen Verfahren behandelt:

- Nr. 1: Kontrolle.
- Nr. 2: Zugabe von 10 mL Reinstwasser, um ein für mikrobielles Wachstum förderliches Milieu aufrecht zu erhalten.
- Nr. 3: Zugabe von 10 mL Reinstwasser und 100 mg Weizenmehl: dies wird in Genossenschaften dafür verwendet, eine Paste herzustellen, um die Fassböden abzudichten.

Bei jedem Verfahren gab es drei Ansätze. Die Kolben wurden hermetisch verschlossen und bei 20 °C in einem Raum mit kontrollierter Temperatur gehalten, und dann analysiert mithilfe eines thermalen Desorptionssystems für die Konzentrierung und Injektion der VOCs, eines Gaschromatographen, der mit einer zu ihrer Trennung geeigneten Säule ausgestattet ist und eines universellen Detektionssystems mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einem Massenspektrometer (MS).

Das Ziel dieser Studie

Die Fähigkeit verbreiteter Schimmelpilze zu untersuchen, Halophenole in neuen Fässern in Haloanisole umzuwandeln. Die Beobachtungen haben LEC Laboratory dazu veranlasst, sein Überwachungssystem für Fässer zu entwickeln, um das Vorhandensein all dieser Verbindungen festzustellen.

Die erste Phase des Experiments

Eine Mischung von 20 % ungerösteten Eichenspänen und 80 % Spänen mittlerer Röstung wurde durch Mazeration in einer die wichtigsten Halophenole (TeCP, TCP, PCP, TBP) enthaltenden Ethanolösung kontaminiert. Die Mazeration wurde 24 Stunden in einer Lösung durchgeführt, die von jeder Verbindung 5 µg/L enthält, mit einem Verhältnis von 100 g Eiche auf einen Liter Lösung.

Ergebnisse der ersten Phase

Nach drei Wochen wurde die Eiche aus den drei Ansätzen jedes Verfahrens gewonnen, über Nacht an der Luft getrocknet und dann entsprechend einer internen COFRAC-zertifizierten Methode analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Ergebnisse der Eiche-Analysen, angegeben in µg/kg. *negativ = negativ, d. h. unterhalb der Nachweisgrenze der Methode.

	Verfahren Nr. 1			Verfahren Nr. 2			Verfahren Nr. 3		
	Versuch 1/3	Versuch 2/3	Versuch 3/3	Versuch 1/3	Versuch 2/3	Versuch 3/3	Versuch 1/3	Versuch 2/3	Versuch 3/3
TeCA	negativ*	negativ	negativ	0,8	0,9	0,6	2,2	1,7	2,2
TeCP	17,9	18,5	17,1	13,1	12,8	13,5	9,7	7,7	8,2
TCA	negativ	negativ	negativ	2,2	2,6	1,8	3,7	2,6	1,8
TCP	10,2	10,5	9,5	5,7	4,6	6,5	2,7	2,5	3,2
PCA	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	< 0,3	< 0,3
PCP	15,9	16,5	15,6	11,7	11,8	12,8	11,0	10,0	9,6
TBA	negativ	negativ	negativ	1,8	2,3	1,4	4,3	3,3	2,9
TBP	14,5	14,6	13,9	10,4	9,8	10,9	6,1	5,1	6,2

In feuchter Eiche wird im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Abnahme der Halophenol-Konzentrationen beobachtet. Gleichzeitig kommt es zu einem beträchtlichen Konzentrationsanstieg der Haloanisole. Bei Vorhandensein von Mehl sind diese Ergebnisse sogar noch deutlicher.

Die Anwesenheit einschlägig bekannter Schimmelpilze

Die Identifizierung der Mikroorganismen in der feuchten Eiche durch ein Speziallabor ermöglichte es, das Vorhandensein von *Aspergillus flavus* und *Aspergillus oryzae* nachzuweisen. Diese beiden einschlägig bekannten Schimmelpilze sind in der Lebensmittelindustrie verbreitet⁶ (Abbildung 2). Es erschien sinnvoll, zu überprüfen, ob dieses Phänomen auch in Fässern unter Exportbedingungen auftreten kann.

■ Zweite Phase des Experiments

Drei kleine neue Fässer von 28 L wurden nach folgendem Verfahren gewässert: Zugabe von 200 ml Reinstwasser, eine Stunde auf jedem Fassboden stehengelassen und eine Stunde auf jeder Seite. Dann wurden die Fässer über Nacht verkehrt herum durch das Spundloch abgelassen. Dann wurden sie drei verschiedenen Prozeduren mit den folgenden Merkmalen unterzogen:

- Nr. 1: Spülen mit Reinstwasser, unter Zugabe von 1 g Mehl nach dem Ablassen.
- Nr. 2: Spülen mit Wasser, unter Zugabe von Halophenolen.
- Nr. 3: Spülen mit Wasser, unter Zugabe von Halophenolen und Zugabe von 1 g Mehl nach dem Ablassen.

Dann wurden die Fässer eingeschweißt und aufrecht 4 Wochen unter gemäßigten Bedingungen (10 bis 15 °C, relative Feuchte etwa 40 %) gelagert.

■ Ergebnisse der zweiten Phase

Dies waren die ersten Beobachtungen:

- Aufgrund der kontinuierlichen Überwachung des Inneren eines der Fässer konnte ermittelt werden, dass die Feuchtigkeit stabil um 90 % blieb (im Fall der sechsmonatigen Überwachung eines 225 L Standardfasses, das zuvor gespült und abgelassen worden war, fiel die Feuchtigkeit im Inneren nie unter 80 %).
- Nach zwei Wochen war im Luftraum in den Fässern 2 und 3 das Vorhandensein von Haloanisolen festzustellen.
- Nach vier Wochen waren auf dem Fassboden von Fass 2 deutliche Schimmelflecken zu sehen (Abbildung 1). Es war daher notwendig, die Fässer 2 und 3 zur Inaugenscheinnahme und Analyse der Eiche auseinander zu nehmen.

In Fass 3 (Abbildung 2), besiedelten die Schimmelpilze vollständig den unteren Fassboden, auf dem das Mehl aufgetragen worden war.



Abbildung 1. Schimmelflecken auf dem Boden von Fass 2.

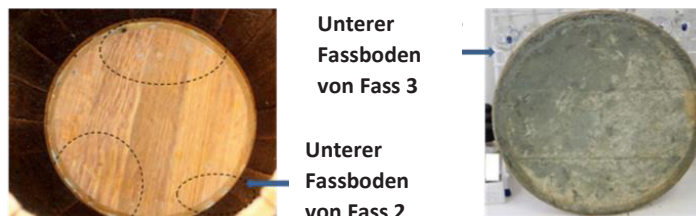


Abbildung 2. Zustand der Fassböden der Fässer 2 und 3 nach dem Auseinandernehmen.

Probenentnahmen aus der Eiche erfolgten aus den oberen und unteren Fassböden und den Dauben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Abbildung 2. Zustand der Fassböden der Fässer 2 und 3 nach dem Auseinandernehmen.

	FASS 2 (+ HALOPHENOLE)			FASS 3 (+ HALOPHENOLE UND MEHL)		
	Oberer Fassboden	Unterer Fassboden	Dauben	Oberer Fassboden	Unterer Fassboden	Dauben
TeCA	< 0,3	0,5	0,8	1,7	26,1	2,3
TeCP	2,5	9,7	5,1	2,7	12,9	1,7
TCA	< 0,3	< 0,3	0,5	0,0	6,6	1,0
TCP	0,8	2,2	2,0	0,9	3,1	0,5
PCA	negativ	0,6	< 0,3	0,3	negativ	0,6
PCP	3,3	21,7	9,4	3,4	79,6	3,4
TBA	0,5	0,8	1,4	1,9	41,0	3,1
TBP	2,9	7,9	7,7	1,9	4,7	0,7

■ Fazit

- Feuchte Eiche ist ein potentielles Substrat für verbreitete Schimmelpilze, was durch das Vorhandensein der Reste von Mehl begünstigt wird, das zum Abdichten der Fassböden verwendet wurde.
- Diese Studie hat bewiesen, dass diese Mikroorganismen in der Lage sind, Halophenol-Vorstufen innerhalb weniger Tage zu unangenehm riechenden Haloanisolen umzusetzen.
- Es wird daher ausdrücklich empfohlen, zu gewährleisten, dass in Fässern keine dieser Vorstufen vorhanden sind, insbesondere wenn sie für den Export bestimmt sind. ■

Bertrand Léauté

Laboratoire Expertises et Conseils (LEC), 130 rue Jules Brisson, Cognac, France.

1 Liste von Haloanisolen/Phenolen, die Gegenstand von Routineanalysen sind: TCA (2,4,6-Trichloroanisol), TCP (2,4,6-Trichlorophenol), TBA (2,4,6-Tribromoanisole), TBP (2,4,6-Tribromophenol), TeCA (2,3,4,6-Tetrachloroanisole), TeCP (2,3,4,6-Tetrachlorophenol), PCA (Pentachloroanisole), PCP (Pentachlorophenol).

2 McAllister, K.A., Lee, H. & Trevors, J.T. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* <https://doi.org/10.1007/BF00056556>

3 Allard, A. S., Remberger, M., & Neilson, A. H. (1987). Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Applied and environmental microbiology*, 53(4), 839–845.

4 Chatonnet, P., Fleury, A., and Boutou, S. (2010). Identification of a New Source of Contamination of *Quercus* sp. Oak Wood by 2,4,6-Trichloroanisole and Its Impact on the Contamination of Barrel-Aged Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (19), pp 10528–10538. <https://doi.org/10.1021/jf102571v>

5 McNally, K.J., and Harper, D.B. (1991). Methylation of phenol by chloromethane in the fungus *Phellinus pomaceus*. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-5-1029>

6 Tindale, C. R., Whitfield, F. B., Levingston, S. D. and Nguyen, TH. (1989). Fungi isolated from packaging materials: Their role in the production of 2, 4, 6-trichloroanisole. *J. Sci. Food Agric.*, 49: 437-447. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740490406>