IVES Technical Reviews
rebe & wein

https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2023.7743

Die Bewertung der Auswirkungen von Chitosan auf önologische Mikroorganismen

Cécile Miot-Sertier[1], Margot Paulin[1], Lucie Dutilh[2], Marine Lucas[2], Patricia Ballestra[1], Warren Albertin[1], Isabelle Masneuf-Pomarede[1], Joana Coulon[3], Virginie Moine[3], Amélie Vallet-Courbin[2], Julie Maupeu[2], Marguerite Dols-Lafargue[1]

[1] Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISVV, F-33140 Villenave d'Ornon, France
[2] Microflora-ADERA, Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISVV, F33882 Villenave d'Ornon, France.
[3] BioLaffort, 11 rue Aristide Berges, 33700 FLOIRAC, France.

Im Zusammenhang mit der Reduzierung von SO_2 bei der Weinherstellung, wird Chitosan immer häufiger als Alternative zur Bekämpfung der Schadhefe *Brettanomyces bruxellensis* eingesetzt. Chitosan kann gegen eine Reihe von Mikroorganismen eingesetzt werden. Der Effekt ist allerdings oft nicht von langer Dauer und kann innerhalb von Arten und Stämmen stark variieren. Darüber hinaus ist die Wirksamkeit von Chitosan stark von den physikalisch-chemischen Parametern des Weins abhängig. In Fällen, in welchen die Chitosan-Behandlung jedoch effektiv ist, scheint diese Wirkung auch langanhaltend zu sein.

Chitosan in der Önologie

Das durch die Agence Nationale de la Recherche (ANR, Französische Forschungsgesellschaft) finanzierte Projekt Chitowine (2018 - 2022), zielte darauf ab, den Wirkungsmechanismus von Chitosan in der Weinherstellung zu erforschen. Eine detaillierte Bewertung der Wirksamkeit für verschiedene önologische Anwendungen basierend auf wissenschaftlichen Erkenntnissen zu den wichtigsten Gruppen önologischer Mikroorganismen, wurde durchgeführt.
Chitosan wird seit 2009 (OIV/Oeno 338A/2008 und europäische Verordnung EC/53/2011) auch im ökologischen Landbau (Verordnung EU 1584/2018) zur Behandlung von Weinen verwendet, die mit der Schadhefe *Brettanomyces bruxellensis* kontaminiert sind. Dieses aus Chitin gewonnene Polysaccharid ist beim pH-Wert des Weins positiv geladen, was Interaktionen mit negativ geladenen Partikeln, und insbesondere mit Mikroorganismen, ermöglicht. Dennoch sind verschiedene Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Wirksamkeit von Chitosan gegenüber *B. bruxellensis* und anderen önologischen Mikroorganismen gekommen. Darüber hinaus werden im Handel neuerdings Produkte insbesondere für den Einsatz in der Vorfermentationsphase angeboten, welche eigentlich für spätere Phasen der Weinherstellung vorgesehen sind.

Welche Auswirkungen hat die Chitosan-Behandlung auf Weinmikroorganismen?

206 Stämme von 27 önologischen Hefe- und Bakterienarten wurden in dieser groß angelegten Studie unter standardisierten Bedingungen untersucht[1]. Für einige Arten, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *B. bruxellensis* und *Oenococcus oeni*, wurden die Stämme nach ihrer Repräsentativität innerhalb ihrer genetischen Gruppen ausgewählt[2 3 4]. Die Stämme wurden nach einer Anpassungsphase im Labor in fermentierten Wein inokuliert und mit 0 (Kontrolle), 4 und 10 g/hL Chitosan behandelt. Die Analyse der Überlebensraten erfolgte nach 3 bzw. 10 Tagen, wobei die behandelten Proben mit den Kontrollproben verglichen wurden.

Nach der Zugabe von Chitosan findet man drei unterschiedliche Reaktionsmuster unter *Brettanomyces bruxellensis* Stämmen

Nach der Behandlung mit Chitosan konnten die *B. bruxellensis* Stämme im Rahmen dieser Studie in drei Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 1):

- **SENSIBLE** Stämme, welche ab dem 3. Tag der Chitosanbehandlung sowohl im Hefesatz als auch in der entnommenen Weinfraktion nur eine sehr geringe Anzahl (oder unterhalb der Nachweisschwelle der Methode) an lebensfähigen und kultivierbaren Zellen aufwiesen.
- **INTERMEDIÄRE** Stämme, bei denen in der entnommenen Weinfraktion nur wenige lebensfähige und kultivierbare Zellen nachgewiesen wurden, wohingegen im Hefesatz eine nicht zu vernachlässigende Population vorhanden war.
- **TOLERANTE** Stämme, die zwar anfänglich auf die Behandlung reagierten, aber nach 10 Tagen sowohl in der entnommenen Weinfraktion als auch im Hefesatz eine erhebliche Anzahl an lebensfähigen und kultivierbaren Zellen aufwiesen.

Im Allgemeinen reagiert *B. bruxellensis* auf eine Chitosanbehandlung[2]. Unter Laborbedingungen mit standardisierten Weinen fallen 41 % aller getesteter *B. bruxellensis* Stämme in die Kategorie „sensibel", und 38 % zeigten eine „intermediäre" Reaktion auf Chitosan.
Versuche mit 50 Rotweinen haben zudem gezeigt, dass eine Chitosanbehandlung nach dem Abstich fast 80 % aller getesteter Stämme beseitigt. Stämme, welche gegenüber einer Behandlung unempfindlich sind, können allerdings in einem behandelten Wein wachsen und somit flüchtige Phenole produzieren.
Die verwendete Dosis von 4 oder 10 g/hL (wie von der OIV empfohlen) wirkte sich zwar wenig auf das Gesamtverhalten eines Stammes in einem bestimmten Wein aus; das Ausmaß der Reaktion konnte jedoch stark variieren.

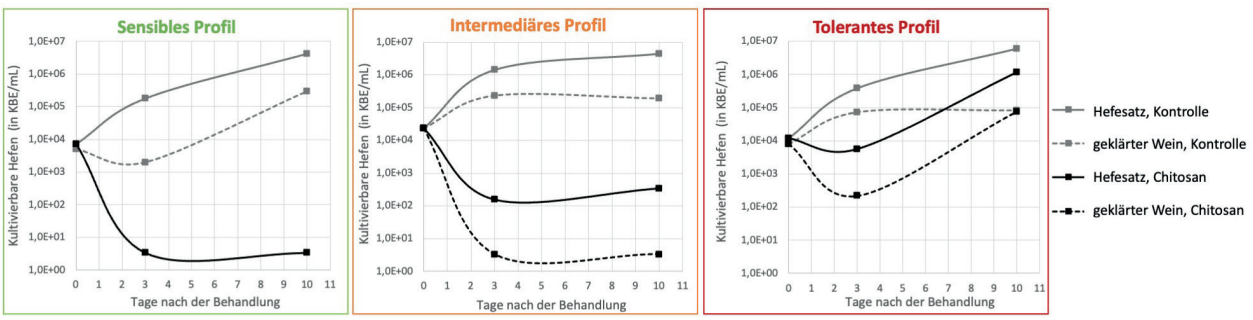

ABBILDUNG 1. Die Trendkurven zeigen das unterschiedliche Verhalten von *B. bruxellensis* Stämmen nach einer Behandlung mit 10 g/hL Chitosan in Rotwein. Die Daten für die Hefesätze entsprechen den durchgezogenen Linien, die für die Weinfraktionen den gestrichelten Linien. Chitosan-behandelte Proben sind mit schwarzen Linien und Kontrollproben mit grauen Linien dargestellt.

Dieses Werk steht unter der Lizenz Creative Commons Namensnennung 4.0 International.

Gibt es einen Zusammenhang zwischen der genetischen Gruppe und der Reaktion eines *B. bruxellensis* Stammes auf Chitosan?

2018 wurde in einer Studie nachgewiesen, dass ein Zusammenhang zwischen der SO_2-Empfindlichkeit von *B. bruxellensis* und der Zugehörigkeit zu einer bestimmten genetischen Gruppe besteht[5]. Im Rahmen des CHITOWINE-Projekts wurde eine mögliche Beziehung zwischen der genetischen Gruppe und dem Verhalten gegenüber Chitosan bei etwa fünfzig Stämmen untersucht[6]. Für jede der sechs großen genetischen Gruppen wurde das Verhalten von *B. bruxellensis* Isolaten gegenüber einer Chitosan-Behandlung ermittelt.

In dieser Studie war es nicht möglich, mit denen für die Önologie empfohlenen Chitosan-Dosen (4 bis 10 g/hL) einen klaren, belastbaren Zusammenhang zwischen der genetischen Gruppe und dem Verhalten eines Stammes herzustellen (Abbildung 2). Allerdings reagierte ein großer Teil der SO_2-resistenten Stämme (AWRI-1499 Gruppe) empfindlich auf Chitosan.

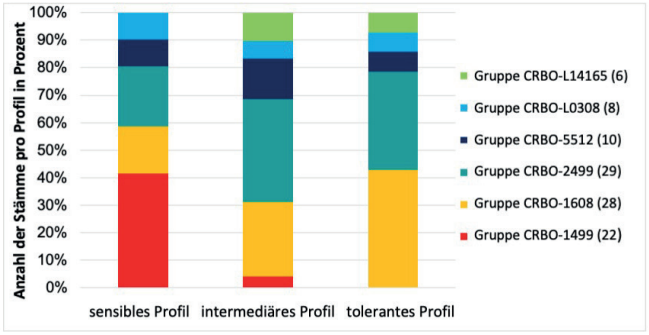

ABBILDUNG 2. Verteilung der *B. bruxellensis*-Stämme nach genetischer Gruppe (Anzahl der Versuche in Klammern) entsprechend ihrem Verhalten nach einer Behandlung mit 10 g/hL Chitosan in einem Rotwein.

Wie reagieren andere önologische Mikroorganismen?

Die Studie wurde auf 27 Arten önologischer Hefen und Bakterien ausgeweitet. Die drei Hauptverhaltensmuster in Bezug auf Chitosan wurden bei allen Arten und Artengruppen in unterschiedlichen Anteilen wiedergefunden (Abbildung 3).

Die meisten der untersuchten Mikroorganismen wurden zumindest vorübergehend durch die Behandlung mit 10 g/hL Chitosan in Rotwein beeinträchtigt. Von den getesteten *S. cerevisiae*-Hefen wurden mehr als die Hälfte wirksam durch Chitosan eliminiert. Variable Ergebnisse wurden für die sogenannten Nicht-*Saccharomyces*-Hefearten, die vor allem in der Vorfermentationsphase vorkommen, erhalten. Zum Beispiel wurden die meisten *Hanseniaspora uvarum* Stämme nicht durch eine frühe Behandlung mit Chitosan beeinträchtigt, während die Ergebnisse für *T. delbrueckii* oder *M. pulcherrima* sehr heterogen waren und die Reaktion deutlich vom betrachteten Stamm abhing.

Essigsäurebakterien werden durch eine Behandlung in Rotwein weder bei der Weinherstellung noch bei beim Ausbau beeinträchtigt, d. h. dass bei keinem der getesteten Stämme die Lebensfähigkeit durch Chitosan verändert wurde. Milchsäurebakterien zeigten sehr unterschiedliche Reaktionen auf eine Chitosanbehandlung, wohingegen die Stämme von *O. oeni* in mehr als 90 % der Fälle sensibel reagierten.

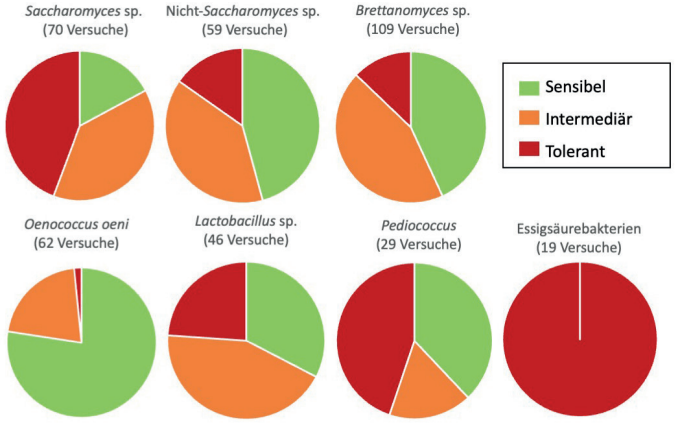

ABBILDUNG 3. Die Verhaltensprofile (sensibel, intermediär oder tolerant) der getesteten Stämme je nach Art oder mikrobieller Gruppe nach einer Behandlung mit 10 g/hL Chitosan in einem Rotwein.

Wird die Wirksamkeit von Chitosan durch die Phase der Weinherstellung beeinflusst?

Die Zusammensetzung des Weins bestimmt die Verfügbarkeit von Chitosan und dessen Auswirkungen auf Mikroorganismen.

Eine frühzeitige Anwendung von Chitosan während der Befüllung der Gärbehälter ersetzt nicht die Schwefelung zur Kontrolle unerwünschter Hefen wie *H. uvarum*, was Labortests bestätigen (Abbildung 3). Der Verlauf der alkoholischen Gärung scheint durch eine solche frühe Anwendung nicht beeinträchtigt zu werden, wenn der Most mit einem ausgewählten *S. cerevisiae*-Stamm beimpft wird. Trotz ihrer Wirksamkeit kann eine frühe Anwendung zu Problemen bei der malolaktischen Gärung führen, da die meisten *O. oeni*-Stämme sehr sensibel auf Chitosan reagieren. Die Eliminierung von B. bruxellensis ist auf nachhaltige Weise möglich, sofern ein wirksamer Abstich erfolgt (Publikation im Druck). Eine Behandlung zur Bekämpfung von Essigsäurebakterien zeigte jedoch keine Wirksamkeit.

Fazit

Die Reaktion önologischer Mikroorganismen auf eine Chitosanbehandlung im Wein kann in drei Verhaltensprofile eingestuft werden: sensibel, intermediär oder tolerant. 80 % der in dieser Studie getesteten *B. bruxellensis* Stämme konnten eliminiert werden, vorausgesetzt der Behandlung folgt ein effektiver Abstich. Interessanterweise reagieren die meisten der in dieser Studie getesteten Stämme der sulfitresistenten genetischen Gruppe AWRI-1499[5] empfindlich auf Chitosan. Darüber hinaus scheint eine Behandlung in einem frühen Stadium der Weinherstellung keinen Einfluss auf den reibungslosen Ablauf der alkoholischen Gärung zu haben. Dies ist jedoch nur von begrenztem Interesse für die Bekämpfung von Nicht-*Saccharomyces*-Hefen oder Essigsäurebakterien, da die Behandlung nur einen geringen oder keinen Einfluss hat. Im Gegenteil dazu kann sich eine zu frühe Zugabe von Chitosan negativ auf die malolaktische Gärung auswirken und ist deshalb nicht zu empfehlen. ■

Die Autoren danken der Französischen Forschungsgesellschaft ANR für die Finanzierung des CHITOWINE-Projekts: ANR-17-CE21-0006.

Basiert auf dem wissenschaftlichen Artikel "Brettanomyces bruxellensis displays variable susceptibility to chitosan treatment in wine." (Front. Microbio, 2021) und "Assessment of chitosan antimicrobial effect on wine microbes" (Int. Journal of Food Microbiol., 2022).

1 Miot-Sertier C., Paulin M., Dutilh L., Ballestra P., Albertin W., Masneuf-Pomarède I., Coulon J., Moine V., Vallet-Courbin A., Maupeu J. and Dols-Lafargue M. (2022). Assessment of chitosan antimicrobial effect on wine microbes. Int. Journal of Food Microbiol. (381). https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109907

2 Da Silva T, Albertin W, Dillmann C, Bely M, la Guerche S, Giraud C, Huet S., Sicard D., Masneuf-Pomarede I., De Vienne D. and Marullo P. (2015). Hybridization within Saccharomyces genus results in homoeostasis and phenotypic novelty in winemaking conditions. PLoS One. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123834

3 Avramova M., Cibrario A., Peltier E., Coton M., Coton E., Schacherer J., Spano G ., Capozzi V., Bmaiotta G., Salin F., Dols-Lafargue M., Grbin P., Curtin C., Albertin W. and Masneuf-Pomarede I. (2018a). Brettanomyces bruxellensis population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. Sci. Rep. (8) 4136. http://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7

4 Campbell-Sills H., El Khoury M., Favier M., Romano A., Biasioli F., Spano G., Sherman D.J., Bouchez O., Coton E., Coton M., Okada S., Tanaka N., Dols-Lafargue M. and Lucas P.M. (2015). Phylogenomic analysis of Oenococcus oeni reveals specific domestication of strains to cider and wines. Genome Biol Evol 7, 1506–1518. https://doi.org/10.1093/gbe/evv084

5 Avramova M., Vallet-Courbin A., Maupeu J., Masneuf-Pomarède I. and Albertin W. (2018b). Molecular diagnosis of Brettanomyces bruxellensis's sulfur dioxide sensitivity through genotype specific method. Front. Microbiol. (9)1260. http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01260

6 Paulin M., Miot-Sertier C., Dutilh L., Brasselet C., Delattre C., Pierre G., Dubessay P., Michaud P., Doco T., Ballestra P., Albertin W., Masneuf-Pomarède I., Moine V., Coulon J., Vallet-Courbin A., Maupeu J. and Dols-Lafargue M. (2020). Brettanomyces bruxellensis displays variable susceptibility to chitosan treatment in wine. Front Microbiol. (11)571067. http://doi.org/ 10.3389/fmicb.2020.571067