RESOLUTION OIV-OENO 686-2022

ÜBERABEITUNG DES KODEX DER GUTEN WEINBAULICHEN PRAXIS ZUR VERHINDERUNG ODER EINSCHRÄNKUNG VON KONTAMINATIONEN DURCH *BRETTANOMYCES*

HINWEIS: Folgende Resolution wird durch den vorliegenden Resolutionsentwurf ersetzt:
OIV-OENO 462-2014

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

GESTÜTZT auf Artikel 2 Absatz 2 iv des Übereinkommens vom 3. April zur Gründung der Internationalen Organisation für Rebe und Wein,

GESTÜTZT auf die Arbeiten der Sachverständigengruppe „Mikrobiologie“,

IN DER ERWÄGUNG, dass dieser Kodex die Maßnahmen festlegt, die im Weinberg und in Kellereien durchzuführen sind, um zur Verringerung der Risiken in Verbindung mit *Brettanomyces* beizutragen,

BESCHLIESST, die Resolution OIV-OENO 462-2014 des Kodex der guten weinbaulichen Praxis zur Verhinderung oder Einschränkung von Kontaminationen durch *Brettanomyces* durch folgenden Text zu ersetzen:

KODEX DER GUTEN WEINBAULICHEN PRAXIS ZUR VERHINDERUNG ODER EINSCHRÄNKUNG DES VERDERBS VON WEINEN DURCH *BRETTANOMYCES Bruxellensis*

1. VORWORT

- Die Bildung flüchtiger Phenole durch *Brettanomyces* bruxellensis, die die Weinqualität beeinträchtigt, ist weit verbreitet und zunehmend problematisch. Diese Verbindungen zeichnen sich insbesondere durch einen Fehlgeruch und -geschmack nach Tinte oder Klebstoff, nach Pferdeschweiß, Leder oder Stall aus und können den fruchtigen Charakter der Weine überdecken.
- Flüchtige Phenole, insbesondere 4-Ethylphenol und 4-Ethylguajacol werden von

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

p-Cumar- und Ferulasäure nach enzymatischer Decarboxylierung (Cinnamat-Decarboxylase, PAD) und Reduzierung (Vinylphenolreduktase, VRP) gebildet. Diese Vorstufen kommen in Traubenmost natürlicherweise vor. Die durch die Cinnamat-Decarboxylase-Aktivität hervorgerufene Decarboxylierung wurde im Zusammenhang mit vielen Bakterien-, Hefe- und Pilzarten beschrieben. Die durch die Vinylphenolreduktase-Aktivität hervorgerufene Reduktase (VPR) ist hingegen eher für *Brettanomyces* -Arten spezifisch.

- Da Trauben und die Ausrüstung für die Weinbereitung von *Brettanomyces* befallen sein können, können sich die Hefen im Laufe oder nach der alkoholischen und/oder malolaktischen Gärung, während des Ausbaus des Weins oder nach dem Verpacken im Wein vermehren.

2. MASSNAHMEN IM WEINBERG

Nicht anwendbar (es liegen uns keine Studien vor). Jedoch wurden *Brettanomyces*-Hefen nach Anreicherungsphasen auf Traubenhäuten schon in frühen Stadien der Beerenentwicklung nachgewiesen. Die mikrobielle Diversität an Traubenoberflächen ist hoch, wobei jede Art nur eine kleine Population besitzt.

Ein erster präventiver Ansatz könnte in der strengen Selektion gesunder Trauben bestehen, wodurch das Risiko eines Befalls mit *Brettanomyces*, der eher bei verdorbenen Trauben zu beobachten ist, verringert werden könnte.

3. MASSNAHMEN BEI DER TRAUBENLESE

Traubenmanagement:

Brettanomyces-Hefen sind auf Trauben vorhanden, sie gehören jedoch nicht zu den wichtigsten Hefearten (kleine Population). Dennoch kann durch Entfernung von beschädigten oder botrytisierten Trauben der Befall mit *Brettanomyces* eingeschränkt werden.

Es werden immer häufiger überreife Beeren geerntet, was ggf. besondere Vorsichtsmaßnahmen erfordert. Vom organoleptischen Standpunkt ist dies interessant, es besteht jedoch ein erhöhtes Risiko der Bildung flüchtiger Phenole, da überreife Beeren mehr Vorstufen flüchtiger Phenole enthalten. Dadurch kommt es zwar nicht unbedingt zu einem verstärkten Auftreten von *Brettanomyces,* jedoch zu einem erhöhten Vermehrungsrisiko (geringere Gesamtsäure, höherer pH-Wert, was sich direkt auf den Gehalt an molekularem SO_2 und somit auf die Aktivität von

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

Brettanomyces auswirkt).

4. MASSNAHMEN IM WEINKELLER

Die Abnahme der mikrobiellen Diversität während der alkoholischen Gärung ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen, einer davon ist der Anstieg des Alkoholgehalts. Da *Brettanomyces* eine hohe Resistenz gegen Ethanol aufweisen, werden sie jedoch nicht reduziert. Daher ist Hygiene bei der Weinbereitung von großer Bedeutung (gesunde Trauben, Ausrüstung für die Weinbereitung und Lagerung usw.).

Maßnahmen und Behandlungen vor der Gärung

- Es wird empfohlen, im Weinkeller geeignete Hygienemaßnahmen zu treffen:
- Die wichtigsten Faktoren sind die Schwefelung und die Temperatur.
    - Zur Einschränkung der Entwicklung von Brettanomyces-Populationen ist die Schwefelung die wichtigste Vorbeugungsmaßnahme vor der Gärung. Es wird jedoch empfohlen, übermäßige Schwefelungen (> 8 g/hl), die die malolaktische Gärung verzögern können, zu vermeiden.
    - Durch eine präfermentative Mazeration bei hoher Temperatur (über 65°C) werden *Brettanomyces* inaktiviert, jedoch auch andere Mikroorganismen in der Weinbereitung. Eine Kaltmazeration bei ca. 10° C verhindert ihre Vermehrung, ohne sie abzutöten.
- Durch die Verwendung bestimmter Enzyme, die eine Cynnamoyl-Esterase-Aktivität aufweisen, kann das Risiko der Bildung von flüchtigen Phenolen erhöht werden. Spätere Kontaminationen können jedoch immer noch auftreten.

Maßnahmen bei der Gärung

Alkoholische Gärung:

- Während der alkoholischen Gärung nimmt die mikrobielle Diversität ab und *Saccharomyces cerevisiae* sind die vorherrschende Art. *Brettanomyces* können sich aufgrund ihrer Resistenz gegen Ethanol und ihres geringeren Nährstoffbedarfs entwickeln, wenn sich die alkoholische Gärung verlangsamt oder wenn sie unterbrochen wird. Es sind die önologischen Verfahren anzuwenden, die zur Steuerung der Gärung gewöhnlich empfohlen werden.
- Durch Beimpfung von Most mit ausgewählten Hefen wird eine zuverlässigere

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

alkoholische Gärung erzielt.

- Die Vermehrung von *Brettanomyces* kann durch die Verlangsamung oder das Stoppen der alkoholischen Gärung begünstigt werden. In letzterem Fall wird empfohlen, die alkoholische Gärung wieder so schnell wie möglich in Gang zu setzen.
- Restzucker (insbesondere Glucose und Fructose) sind Wachstumssubstrate für *Brettanomyces*. Wein mit einem Gehalt an Glucose + Fructose von weniger als 4 g/L wird üblicherweise als trocken bezeichnet. Eine Konzentration von 0,3 g Glucose + Fructose/L reicht aus, um Biomasse von *Brettanomyces* zu bilden, die mehr als 1000 µg flüchtige Phenole pro Liter bilden kann.
- Hefenährstoffe (die auch für *Brettanomyces* von Nutzen sein können) sollten zur Vermeidung von Gärstockungen nur zugesetzt werden, wenn es unbedingt erforderlich ist.

Lag–Phase vor der malolaktischen Gärung (MLG):

- Nach Abschluss der alkoholischen Gärung sind die Bedingungen nicht nur für Milchsäurebakterien, sondern auch für *Brettanomyces* günstig, auch wenn sie sich nur langsam vermehren.
- Da das Milieu arm an Mikroorganismen ist, ist es wichtig, die *Brettanomyces*-Population zu überwachen.
- Folgende Faktoren begünstigen das Wachstum von Brettanomyces in dieser Phase: Warmmazerationen (40-45 °C), Mikrobelüftung, Freisetzung von Zuckern bei nicht eingemaischtem oder teilweise eingetrocknetem Lesegut.
- Eine Ko-Inokulation von Hefen und Milchsäurebakterien kann zur Reduzierung der Lag-Phase zwischen der alkoholischen und der malolaktischen Gärung und folglich der Entwicklung von *Brettanomyces* beitragen.

Malolaktische Gärung:

- Physikalisch-chemische Parameter (pH-Wert, Temperatur, Gesamt- SO_2) wirken sich auf das Fortschreiten der malolaktischen Gärung aus. Eine Verzögerung der malolaktischen Gärung erhöht das Risiko der Bildung flüchtiger Phenole, da sich *Brettanomyces* unterdessen vermehren können.

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

- Durch den Einsatz malolaktischer Starterkulturen kann die Entwicklung von Brettanomyces eingeschränkt werden.
- Nach der malolaktischen Gärung wird empfohlen, alle Mikroorganismen insbesondere durch Zugabe von SO2 zu beseitigen. Die Dosierung ist abhängig vom pH-Wert.
- Physikalische Verfahren (HHP oder UHPH) können ebenfalls angewendet werden.

Maßnahmen bei der Reifung und Klärung:

Als erste Vorsichtsmaßnahmen müssen eine regelmäßige Verkostung und eine vollständige mikrobiologische Analyse einschl. einer Auszählung von *Brettanomyces* und/oder einer Analyse der flüchtigen Phenole durchgeführt werden. Diese Analyse ist in der gesamten Ausbauphase zu wiederholen.

- Das SO_2-Management ist für die Einschränkung der Entwicklung von *Brettanomyces* von großer Bedeutung. Es wird eine Dosis von 0,5 bis 0,8 mg/L molekularem Schwefeldioxid[1] empfohlen. Im Fall von Brettanomyces-Stämmen, die gegenüber Ethanol oder SO2 tolerant/resistent sind, werden alternative Verfqhren (Chitosan, Filtration, Wärmebehandlung) empfohlen.
- Die Reifung auf der Hefe ist ein zusätzlicher Risikofaktor, da sich *Brettanomyces* im Trub (der Nährstoffe an den Wein abgibt) vermehren können.
- Klärung durch Abstich, Schönung und Filtration sind erforderlich, um lebensfähige *Brettanomyces*-Populationen und lebensfähige, aber nicht kultivierbare Populationen zu verringern, die sich durch Metabolisierung von Restzuckern vermehren können.
- Die Wirksamkeit von Schönungsmitteln ist unterschiedlich. Durch die Behandlung mit Schönungsproteinen können die Populationen um das 40 bis 2000-fache verringert werden. Durch Schönung mit Kasein oder Kaliumkaseinat kann der Ethylphenol-Gehalt reduziert werden, sofern dieser nicht zu hoch ist.
- Die Zugabe von Chitosan stellt für die Kontrolle des Wachstums unerwünschter Mikroorganismen, insbesondere *Brettanomyces,* und beim Umgang mit toleranten/alternativen Stämmen, die tolerant sind gegenüber SO2 und Ethanol,eine Alternative dar.
- Einige Verfahren der Weinbereitung (Abstich, Auffüllung, Filtration, Abfüllung, usw.) können zur Lösung von Sauerstoff in Wein führen, was die Vermehrung von

© OIV 2022

Brettanomyces begünstigt.

- Erfolgt eine Mikrobelüftung, ist durch geeignete Analysen vorab zu prüfen, ob keine *Brettanomyces* vorhanden sind.
- Die Temperatur im Weinkeller sollte vor allem in den Sommermonaten sorgfältig kontrolliert werden. Eine Temperatur von über 14 °C über einen längeren Zeitraum sollte vermieden werden, um das Wachstum von *Brettanomyces* zu verhindern.

Hinweis:

1. Nach Zugabe von SO_2 können *Brettanomyces*–Populationen lebensfähig bleiben, aber ganz oder teilweise in den nicht mehr kultivierbaren Zustand (VBNC - viable but not cultivatable) übergehen. Durch diese Veränderungen wird die Größe der Hefen verringert, so dass eine Anpassung der Filtration vorzunehmen ist.
2. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Auszählung von VBNC-Formen nicht durch Routineanalysen wie die Auszählung in Petri-Schalen durchgeführt werden kann, sondern eher mittels qPCR oder Durchflusszytometrie, durch die VBNC und lebensfähige Formen ausgezählt werden.
3. Zur Vorhersage der Toleranz/Resistenz von Brettanomyces gegenüber Sulfit ist ein PCR-Test verfügbar.

Ausbau im Holzfass:

Der Ausbau im Holzfass gilt hinsichtlich einer Verunreinigung durch *Brettanomyces* als die kritischste Phase, insbesondere bei Verwendung neuer Holzfässer.

Bei der Probenahme sind Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Zur Auffüllung verwendeter Wein darf keine mikrobiellen Verunreinigungen aufweisen. Holz begünstigt das Wachstum von *Brettanomyces*, die ein pseudohyphales Wachstum aufweisen können, Mikroporen des Holzes besiedeln und Cellobiose als Kohlenstoffquelle nutzen können.

Gebrauchte, schlecht gereinigte Fässer sind eine bekannte Quelle für Kontaminationen durch *Brettanomyces*. Aber auch neue Fässer begünstigen die Vermehrung von Hefen und die Bildung flüchtiger Phenole, da sie mehr Nährstoffe freisetzen. Zudem haben sie eine höhere O_2-Durchlässigkeit, was zu einem relativ

© OIV 2022

hohen potentiellen Redoxwert und einer Abnahme der SO_2-Konzentration (aktives oder molekulares SO_2) führen kann. Diese beiden Parameter begünstigen die Entwicklung von *Brettanomyces*.

Es wurden mehrere Ansätze zur Dekontaminierung von Fässern untersucht. Eine vollständige Beseitigung von *Brettanomyces* auf der Daubeninnenfläche oder im Zapfloch war jedoch nicht möglich. Aufgrund der natürlichen Mikroporosität von Holz ist eine vollständige Desinfektion schwierig, da die Mikroorganismen in den Hohlräumen der unteren Holzschichten verbleiben. Für eine dauerhafte Wirksamkeit ist eine Tiefenbehandlung erforderlich.

Einige Techniken ermöglichen jedoch eine deutliche Reduzierung der *Brettanomyces*–Populationen und können angewendet werden, sofern die geltenden Rechtsvorschriften dies gestatten, wie z.B.:

- Dampfbehandlung: für eine tiefgehende Desinfektion ist eine ausreichende Behandlungsdauer erforderlich (Spülungen mit Kaltwasser und Warmwasser bei 70°C und Niederdruckdampf, 10 Minuten). Eine Behandlung durch Eintauchen in 60°C heißes Wasser für eine Einwirkzeit von 19 min eliminierte Hefepopulationen bis zu einer logarithmischen Reduktion von 8.
- Ozonbehandlung: entweder mit gasförmigem Ozon in Verbindung mit einer Heißwasser-Behandlung bei 82°C, 20 Minuten oder mit Ozonwasser.
- Ozon reagiert mit stark organisch belastetem Material und dringt nicht tief ins Holz ein.
- Dekontaminierung mit SO2: zur Desinfektion leerer und trockener Fässer sind mindestens 5 g gasförmiges SO2 pro Fass zu verwenden. SO2 ist sowohl an der Oberfläche als auch in tieferen Schichten wirksam, da es einige Millimeter tief in Holz eindringt.
- Aushobeln und neues Toasten der Fässer: Diese Behandlung ermöglicht keine Desinfektion des Holzes, jedoch die Beseitigung der am stärksten kontaminierten Fraktionen. Gegenüber nicht behandelten Fässern können flüchtige Phenole um 80 % reduziert werden.
- Ultraschall: durch diese Technik werden über 90 % der lebensfähigen Brettanomyces (bis zu 2-4 mm unter der Daubeninnenfläche) entfernt.

<u>Maßnahmen vor dem Verpacken</u>

Das Risiko der Bildung flüchtiger Phenole ist vor dem Verpacken durch Analysen

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

(sowohl chemische als auch mikrobiologische Prüfungen) zu bewerten. Nach erfolgter Risikobewertung sind geeignete Maßnahmen festzulegen, um die Entwicklung von *Brettanomyces* nach dem Verpacken zu vermeiden:

- Sterilisation durch Membranfiltration (0,45 – 0,65 µm) oder Tangentialfiltration für eine wirksame Beseitigung von *Brettanomyces*-Hefen und anschließend sterile Abfüllung
- Verwendung von DMDC für einen nicht dauerhaften Schutz
- Verwendung von antimikrobiellen Mitteln für einen dauerhaften Schutz (Sorbinsäure nur bei vollständiger Beseitigung der Milchsäurebakterien, Kontrolle von SO_2 unter Berücksichtigung des pH-Werts, des vorhandenen Alkoholgehalts und der Temperatur). Ein Online-Rechner, der verschiedene Parameter (ph, Alkohol und Temperatur) berücksichtigt, kann verwendet werden.
- Wärmebehandlung
- Physikalische Verfahren (HHP oder UHPH) können ebenfalls angewendet werden.

Lagerbedingungen

Um die Vermehrung von *Brettanomyces* bei der Lagerung in Flaschen (und die Bildung flüchtiger Phenole) zu vermeiden, wird empfohlen, die Flaschen bei einer Temperatur von unter 12 °C aufzubewahren, insbesondere bei Weinen mit niedrigem Filtrationsgrad oder Weinen mit einem niedrigen SO_2-Gehalt.

5. SCHLUSSFOLGERUNGEN

- Um Kontaminationen mit *Brettanomyces* frühzeitig festzustellen, wird empfohlen, häufig Analysen durchzuführen. Bei der Probennahme ist sorgfältig darauf zu achten, dass Kreuzkontaminationen vermieden werden.
- Es wird zu äußerster Hygiene im Weinkeller geraten.
- Kontrolle der Schwefelung und des molekularen SO_2
- Temperaturkontrolle
- Präventive Maßnahmen sind Korrekturverfahren vorzuziehen.
- Die vorliegenden Empfehlungen beruhen auf den derzeitigen Kenntnissen und

Beglaubigte Ausführung Ensenada, 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

können mit voranschreitender Forschung aktualisiert werden.

Die Kontrolle von Brettanomyces beruht auf einem umfassenden präventiven Ansatz, der während des gesamten Prozesses der Weinbereitung zu verfolgen ist.

---

[1] Das Enderzeugnis muss den gültigen Vorschriften über Grenzwerte für den Gehalt an Gesamt-SO_2entsprechen.

© OIV 2022