



## RESOLUTION OIV-OENO 576A-2017

### MONOGRAPHIE ÜBER *SACCHAROMYCES*-HEFEN

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

GESTÜTZT auf Artikel 2 Absatz 2 IV des Übereinkommens vom 3. April 2001 zur Gründung der Internationalen Organisation für Rebe und Wein,

IN ANBETRACHT dessen, dass Nicht-*Saccharomyces*-Hefen zur Beimpfung von Mosten und Weinen verwendet werden können und dass nach einer solchen Beimpfung eine sequentielle oder gleichzeitige Beimpfung mit *Saccharomyces* spp. vorgenommen werden kann,

BESCHLIESST, die Monographie „Aktive Trockenhefen (ATH) *Saccharomyces* spp.“ (COEI-1-LESEAC, Oeno 329/2009) durch die Monographie über selektionierte Hefen der Spezies *Saccharomyces* spp. zu ersetzen.

*Beglaubigte Ausführung*  
*Sofia, den 2. Juni 2017*  
*Der Generaldirektor der OIV*  
*Sekretär der Generalversammlung*

*Jean-Marie AURAND*

## ***Selektionierte Saccharomyces spp.-Hefen***

### **1. GEGENSTAND, URSPRUNG UND ANWENDUNGSBEREICH**

Selektionierte *Saccharomyces* spp.-Hefen können nach der Resolution OENO-MICRO 14-546 zur Beimpfung von Trauben, Mosten und Weinen verwendet werden, um die alkoholische Gärung einzuleiten und/oder zu beenden sowie zur Herstellung von Spezialweinen.

Die verwendeten Hefen müssen aus Trauben, Mosten oder Weinen isoliert werden oder aus der Hybridisierung von Trauben-/Most-/Weinhefestämmen hervorgehen bzw. aus anderen Weinhefen gewonnen werden. Für die Verwendung von in der Kellerwirtschaft eingesetzten, gentechnisch veränderten Hefen ist die Zulassung durch die zuständigen Behörden erforderlich.

### **2. KENNZEICHNUNG**

Auf der Verpackung müssen folgende Angaben erfolgen:

- Name der Gattung (*Saccharomyces*), Name der Art, Name des Stamms/der Stämme und alle Elemente, die die Rückverfolgbarkeit des Erzeugnisses gewährleisten,
- physikalische Form des Erzeugnisses wie unter Ziffer 3 beschreiben,
- Name des Züchters,
- Name und Anschrift des Herstellers oder des Händlers oder des Distributors,
- Gebrauchsanleitung des Herstellers,
- empfohlene Zugabemenge zur Beimpfung,
- Mindestanzahl lebensfähiger Zellen pro Gramm Produkt (KBE wie unter Ziffer 4.6 festgelegt), die vom Hersteller gewährleistet wird und empfohlene Lagertemperatur,
- Nummer der Herstellungspartie, Verfalldatum und Lagerbedingungen,
- ggf., dass der Hefestamm/die Hefestämme gentechnisch verändert wurde(n) und die veränderte(n) Eigenschaft(en),
- alle vorhandenen Zusatzstoffe.

### **3. EIGENSCHAFTEN**

Es handelt sich um Reinkulturen oder eine Mischung von *Saccharomyces*-Stämmen oder eine Mischung von *Saccharomyces*- und Nicht-*Saccharomyces*-Stämmen.

Selektionierte *Saccharomyces*-Hefen können in folgenden Formen verwendet werden:

- Aktive Trockenhefe (ATH) mit einem Mindestgehalt an Trockenmasse von 92 % und einem Gehalt an lebensfähiger Hefe von mindestens  $10^{10}$  KBE/g Trockenmasse,
- aktive Gefrierhefe (AGH) mit einem Gehalt an Trockenmasse von 40 bis 85 % und einem Gehalt an lebensfähiger Hefe von mindestens  $10^{10}$  KBE/g Trockenmasse,

*Beglaubigte Ausführung  
Sofia, den 2. Juni 2017  
Der Generaldirektor der OIV  
Sekretär der Generalversammlung*

*Jean-Marie AURAND*

- Presshefe (PH) mit einem Gehalt an Trockenmasse von 30 bis 35 % und einem Gehalt an lebensfähiger Hefe von mindestens  $10^{10}$  KBE/g Trockenmasse,
- cremige Hefe (CH) mit einem Gehalt an Trockenmasse von 18 bis 25 % und einem Gehalt an lebensfähiger Hefe von mindestens  $10^{10}$  KBE/g Trockenmasse,
- mit Alginat oder anderen von der OIV zugelassenen Produkten verkapselte (Kugeln) oder immobilisierte Hefen (IH) mit einem Mindestgehalt an Trockenmasse von 86 % und einem Gehalt an lebensfähiger Hefe von mindestens  $10^9$  KBE/g Trockenmasse,
- „Levain de tirage“ bei Schaumweinen mit mehr als  $50 \times 10^6$  lebensfähigen Zellen/mL.

#### **4. GRENZWERTE UND ANALYSEMETHODEN**

##### **4.1 - Feuchtigkeit**

Messung durch den Gewichtsverlust von 5 g Produkt, das bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wird. Der Gehalt muss dem Feuchtigkeits- oder Wassergehalt unter Ziffer 3 entsprechen.

##### **4.2 - Blei**

Die Bestimmung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex. Der Gehalt muss weniger als 2 mg/kg der jeweiligen unter Ziffer 3 aufgeführten Präparate betragen.

##### **4.3 - Quecksilber**

Die Bestimmung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex. Der Gehalt muss weniger als 1 mg/kg der jeweiligen unter Ziffer 3 aufgeführten Präparate betragen.

##### **4.4 - Arsen**

Die Bestimmung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex. Der Gehalt muss weniger als 3 mg/kg der jeweiligen unter Ziffer 3 aufgeführten Präparate betragen.

##### **4.5 - Cadmium**

Die Bestimmung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex. Der Gehalt muss weniger als 1 mg/kg der jeweiligen unter Ziffer 3 aufgeführten Präparate betragen.

##### **4.6 - Gesamtzahl lebensfähiger Hefen**

Die Auszählung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex. Der Gehalt muss den Anforderungen unter Ziffer 3 entsprechen.

##### **4.7 - Andere als auf dem Etikett angegebene Hefen**

Die Auszählung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex, um Kolonien für weitere Nachweise zu erhalten.

*Beglaubigte Ausführung  
Sofia, den 2. Juni 2017  
Der Generaldirektor der OIV  
Sekretär der Generalversammlung*

*Jean-Marie AURAND*

4.7a. Nachweis eines Kontaminanten auf Gattungsebene: Eine kontaminierende Population einer anderen Gattung als *Saccharomyces* muss 5 Log-Stufen weniger betragen als die auf dem Etikett angegebene Gesamtpopulation der Stämme und Eigenschaften, die unter Ziffer 3 definiert sind. Zur Unterscheidung zwischen *Saccharomyces* und Nicht-*Saccharomyces*-Hefen erfolgt die Auszählung nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex.

4.7b. Nachweis eines Kontaminanten auf Art- oder Stammebene: Die auf der Verpackung angegebenen Arten und Stämme müssen mindestens 95 % der Gesamtpopulation der Hefen ausmachen. Die Überprüfung erfolgt entsprechend den Angaben in Anhang I.

#### **4.8 - Schimmelpilze**

Die Auszählung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex. Der Gehalt muss weniger als  $10^3$  KBE/g der jeweiligen unter Ziffer 3 aufgeführten Präparate betragen.

#### **4.9 - Milchsäurebakterien**

Die Auszählung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex. Der Gehalt muss weniger als  $10^5$  KBE/g der jeweiligen unter Ziffer 3 aufgeführten Präparate betragen.

#### **4.10 - Essigsäurebakterien**

Die Auszählung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex. Der Gehalt muss weniger als  $10^4$  KBE/g der jeweiligen unter Ziffer 3 aufgeführten Präparate betragen.

#### **4.11 - Salmonellen**

Die Auszählung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex. Der Nachweis des Nichtvorhandenseins von Salmonellen erfolgt an einer Probe von 25 g.

#### **4.12 - *Escherichia coli***

Die Auszählung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex unter Verwendung eines selektiven Differenzialmediums für *Escherichia coli*. Der Nachweis des Nichtvorhandenseins von *Escherichia coli* erfolgt an einer Probe von 1 g.

#### **4.13 - Staphylokokken**

Die Auszählung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex. Die Prüfung auf das Vorhandensein von Staphylokokken erfolgt anhand einer Anreicherungskultur in einem flüssigen Nährmedium nach Giolitti und Cantoni und wird anschließend auf einem festen Nährboden nach Baird Parker bestätigt.

Sind die Testergebnisse mit dem Nährmedium nach Giolitti und Cantoni positiv, ist das Vorhandensein von Staphylokokken durch ihre Isolierung auf einem festen Nährmedium nach Baird Parker zu bestätigen. Zur Beimpfung der festen Baird Parker-Nährmedien wird eine Probe aus einem positiven Nährmedium verwendet, um isolierte Kolonien zu gewinnen.

Der Nachweis des Nichtvorhandenseins von Staphylokokken erfolgt an einer Probe von 1 g.

*Beglaubigte Ausführung*  
*Sofia, den 2. Juni 2017*  
*Der Generaldirektor der OIV*  
*Sekretär der Generalversammlung*

*Jean-Marie AURAND*

#### **4.14 - Coliforme Bakterien**

Die Auszählung erfolgt nach der Methode in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex unter Verwendung eines selektiven Differenzialmediums für coliforme Bakterien mittels Desoxycholat-Gelose.

Die Anzahl muss weniger als  $10^2$  KBE/g der jeweiligen unter Ziffer 3 aufgeführten Präparate betragen.

#### **5. ZUSATZSTOFFE**

Zusatzstoffe müssen den geltenden Vorschriften entsprechen.

#### **6. LAGERUNG**

Die Produkte sind unter Bedingungen zu lagern und zu vermehren, die ihrer genetischen Stabilität dient.

Es sind die Herstellerempfehlungen zu beachten.

#### **7. PRODUKTDOKUMENTATION**

Die Produktdokumentation sollte Richtlinien zur Lagerung, zum Transport, zur Handhabung und Anwendung (Temperatur, Aktivierung, ggf. Rehydratation evtl. in geeigneten Most- oder Weinsuspensionen, usw.) enthalten.

---

### **ANHANG 1**

#### **1. Gewinnung von Kolonien**

Eine Probe von 1g oder bei Verwendung von „Levain de tirage“ von 1 ml wird unter sterilen Bedingungen in 100 ml Saccharose (5 %) suspendiert und homogenisiert. 20 Minuten bei 25 - 30 °C stehenlassen.

Aus entsprechenden dezimalen Verdünnungsreihen wird 0,1 ml der verdünnten Probe auf einer YEPD Agar-Platte ausplattiert (20 g Glucose, 20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 100 mg Chloramphenicol zur Verhinderung des Bakterienwachstums und 150 mg Biphenyl zur Verhinderung der Schimmelbildung, 20 g Agar-Agar, 1000 ml Wasser q.s.p.). Unter aeroben Bedingungen 6 Tage bei 25 °C inkubieren. Es wird das Wachstum aller Hefen und sogar Nicht-Saccharomyces-Hefen ermöglicht, die kontaminieren oder Bestandteil des Gemischs mit Saccharomyces spp. im Präparat sein würden.

*Beglaubigte Ausführung  
Sofia, den 2. Juni 2017  
Der Generaldirektor der OIV  
Sekretär der Generalversammlung*

*Jean-Marie AURAND*

## 2. Nachweis von kontaminierenden Arten/Stämmen

Der Nachweis erfolgt anhand der auf Platten isolierten Kolonien.

Wie unter Ziffer 3 festgelegt, muss die kontaminierende Population (es handelt sich weder um die Reinkultur noch um verschiedene Stämme im Falle von gemischten Hefestämmen) 5 % weniger als die Gesamtpopulation betragen. Nachdem die zum Erhalt der einzelnen Kolonien notwendigen Verdünnungen vorgenommen wurden, beträgt der Kontaminant (5 %) idealerweise 1/20 der Kolonien, wenn 20 von 300 Kolonien nachgewiesen werden.

Der Kontaminant wird auf Artebene durch D1/D2-Sequenzierung bestimmt (siehe 2.1). Sind alle Kolonien der gleichen Art, kann anhand der Analyse von 20 Kolonien durch SSR oder PCR für die Art *S. cerevisiae* überprüft werden, ob ein kontaminierender Stamm weniger als 5 % beträgt (siehe 2.2).

Handelt es sich bei dem Präparat um ein Gemisch von 2 oder 3 Arten/Stämmen, macht die am wenigsten stark vertretene 15 % der Gesamtpopulation aus. Der Nachweis von Kolonien ist für die Überprüfung der Zusammensetzung des Gemischs nicht geeignet. Bei einem Gemisch von 2 Stämmen sollten nämlich von dem am wenigsten stark vertretenen Stamm 3 der 20 nachgewiesenen Kolonien gebildet werden, die einer Platte mit 400 Kolonien entnommen wurden.

Es wird daher empfohlen, für die Untersuchung eines Gemischs von 2 oder mehr **Arten (Anteil der verschiedenen Arten)** eine quantitative PCR-Analyse mit DNA-Sonden für die einzelnen erwarteten Arten durchzuführen. In diesem Fall wird zuvor keine Kultivierung auf Platten vorgenommen. Die DNA wird direkt aus der Probe extrahiert.

Die Untersuchung eines **Gemischs von Stämmen der gleichen Art (Anteil der verschiedenen Stämme)** kann derzeit nur durch den Nachweis der Kolonien auf Stammebene erfolgen und erfordert somit eine Kultivierung auf Platten. Das Ergebnis ist mit Vorsicht auszuwerten, da die Präsenz der einzelnen Stämme auf der Platte sowohl von der Wachstumsfähigkeit als auch von der zu geringen, ordentlich nachweisbaren Zahl der Kolonien beeinflusst wird.

### 2.1 Artennachweis

Der Artennachweis erfolgt durch DNA-Sequenzierung der variablen D1/D2-Domäne der ribosomalen 26S-Region und PCR-Amplifikation. Es handelt sich um die bevorzugte Methode für den Nachweis von Hefearten: Stämme, die mehr als 1 % Sequenzunterschiede in der D1/D2 Domäne (600 Nukleotide) aufweisen, gehören nicht der gleichen Art an.

1. Getrennt suspendieren, die Kolonien in das PCR-Gemisch oder zuvor in Wasser geben (ca. 50 µL je nach Größe der Kolonie) und die Probe zum PCR-Gemisch geben.
2. PCR-Gemisch (Endvolumen 50 µL): 10 mM Tris HCl pH8; 50 mM KCl; 0,1 % (v/v) Triton X100; 0,2 mg/ml BSA; 3,12 % (v/v) Glycerin; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTPs; 0,1 U/µL Taq Polymerase.
3. Primer: NL1/NL4. NL 1 (5'-GCATATCAATAA GCGGAGGAAAAG) und NL 4 (5'-GGTCCGTGTTCAA GACGG)
4. Die Amplifikation erfolgt 10 Minuten bei 95 °C, um die DNA zugänglich zu machen. Sie umfasst 30 Zyklen mit folgenden Stufen: 1 min bei 95°C, 45 s bei 55°C, 1 min bei 72°C und die Endstufe 7 min bei 72 °C.

*Beglaubigte Ausführung  
Sofia, den 2. Juni 2017  
Der Generaldirektor der OIV  
Sekretär der Generalversammlung*

*Jean-Marie AURAND*

5. Das PCR-Produkt wird mit einem PCR-Reinigungskit gereinigt und anhand der für die Amplifikation verwendeten Primer sequenziert.
6. Die erhaltenen Sequenzen werden mit den Sequenzen in der Gendatenbank ([www.ncbi.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nih.gov/genbank)) verglichen.

## 2.2. Bestimmung der Hefestämme

Nach erfolgtem Artennachweis kann die Bestimmung der Stämme vorgenommen werden. Bei den meisten Hefearten oder zumindest bei der wichtigsten als Starter verwendeten Art beruht die zuverlässigste und genaueste Nachweismethode auf der Analyse der wiederholten SSR-Sequenzen (Mikrosatelliten). Die Stämme unterscheiden sich durch die Anzahl der Wiederholungen von kurzen Sequenzen an bestimmten Punkten ihres Genoms. Diese Loci werden durch konservierte Regionen begrenzt, die als Primer für die PCR-Amplifikation ausgewählt werden. Die Analyse beruht auf der PCR-Amplifikation verschiedener Loci mit den für jede Hefeart geeigneten Primern und der Messung ihrer Länge mittels Kapillarelektrophorese mit Sequenzierungsauflösung (die eine Auflösung auf Nukleotidbasis ermöglicht).

Hinweis:

1. Die Stammtypisierung ist derzeit nicht bei allen Hefearten möglich.
2. Um die neuesten Erkenntnisse zu berücksichtigen, sind die für die einzelnen Arten geeigneten Primer unter Bezugnahme auf die Arbeiten auszuwählen, die in wissenschaftlichen Zeitschriften mit internationalem Peer-Review veröffentlicht werden.
3. Bei einigen Arten werden 9 – 12 Loci analysiert; die Diskriminanz der Loci ist unterschiedlich.
4. Die Analyse kann vereinfacht werden, indem zunächst eine geringere Zahl von Loci aufgrund ihrer höheren Unterscheidungskraft ausgewählt wird. Bei Unklarheiten kann die Analyse fortgesetzt werden.
5. Bei einigen Arten wie *S. cerevisiae* kann eine Multiplex-PCR mit bis zu 9 Primer-Paaren durchgeführt werden. Die Analyse wird dadurch verkürzt und vereinfacht.

Bei *Saccharomyces cerevisiae* kann das Profil „Interdelta PCR“ (siehe OIV-OENO 408-2011) verwendet werden. Bei Unklarheiten, d.h. wenn die Profile unterschiedlich erscheinen, aber immer noch sehr nah beieinander liegen, ist die SSR-Typisierung erforderlich.

*Beglaubigte Ausführung*  
*Sofia, den 2. Juni 2017*  
*Der Generaldirektor der OIV*  
*Sekretär der Generalversammlung*

*Jean-Marie AURAND*