



Hochschule Neubrandenburg  
University of Applied Sciences

Fachbereich: Agrarwirtschaft und Lebensmitteltechnologie

Studiengang: Lebensmitteltechnologie

WS 2013/14

**“Mikrobiologische und fermentative  
Untersuchungen am Aceto Balsamico  
Traditionale”  
Bachelorarbeit**

urn:nbn:de:gbv:519-thesis2014-0426-0

Verfasser: Hannes Damro

Betreuer: Herr Prof. Dr. Klaus Zimmer

Herr Prof. Dr. Karl Steffens

Frau Gabriele Kulik

Neubrandenburg, den 22.02.2014

## **Abstract**

The subject of this student research project was to create transparency during the production of Aceto Balsamico Tradizionale. This claim was successfully met during this project. A vinegar mother from a balsamic traditional vinegar has been grown and used in a modified and highly accelerated process for producing a balsamic vinegar. The involved microorganisms have been investigated. Here it was possible to classify microorganisms by metabolic activity and morphological characteristics in 5 categories. During the process, the development of the substances involved in the acidogenic fermentation like sugar, ethanol and acetic acid was investigated with refractometer and enzymatic testkits. Because of measured values the development of the concentration of the soluted substances while the first fermentation procedure cycle could be clarified. It turned out that initially a sugar fermentation phase occurs, which then changes to an acidogenic fermentation. Those phases occur simultaneously over a certain period of time. Particularly, the focus was to compare "Poesia" with science. It turned out that the "Poesia" and science are compatible in many areas. A mother of vinegar which was made from an ABT, shows a much more pronounced acidogenic fermentation behavior. It was also determined that a spontaneously fermented grape juice concentrate houses microorganisms that are better adapted to the stressful environmental conditions of grape juice concentrate than those which are available in pure culture slide. This shows that the uncontrolled inoculation of the substrate, despite low control, is justified. It also turned out that the sugar concentration does not bring to a halt to fermentation of sugar, but the acidogenic fermentation. However, no limits of acidogenic fermentation could be determined, as these showed no changes until the end of the experiment. In addition, numerous other data have been generated to explain the actual fermentation process and the flow arrangements especially in the initial phase of ABT-making.

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	8
1.1 Produktbeschreibung und Zielsetzung .....	8
1.2 Unterscheidung der Produktkategorien .....	9
1.2.1 Aceto Balsamico .....	9
1.2.2 Acteto Balsamico di Modena (GIP) .....	10
1.2.3 Acteo Balsamico Traditionale (DOP) .....	12
2. Stand der Wissenschaft und Technik .....	13
2.1 Herstellung des ABT .....	13
2.1.1 Prinzip des Herstellungsprozesses .....	13
2.1.2 Tätigkeiten des Essigwinzers während der Acetification .....	15
2.1.3 „Poesia“ .....	16
2.1.4 Komplikationen bei der Herstellung von ABT .....	17
2.1.5 Einfluss der Fässer auf den ABT .....	18
2.1.6 Die Acetaia .....	19
2.2 Beteiligte Mikroorganismen .....	19
2.2.1 Fermentation durch undefinierte Mischkulturen .....	19
2.2.2 <i>Saccharomycetaceae</i> .....	20
2.2.3 <i>Acetobacteriaceae</i> .....	21
2.3 Einführung in die biochemischen Prozesse bei der Essigherstellung .....	22
2.3.1 Orleansverfahren .....	22
2.3.2 Die Alkoholische Gärung .....	22
2.3.3 Fructosegärung .....	23
2.3.4 Aerobe acidogene Fermentation .....	23
2.4 Vegetative Dormanz im ABT .....	24
2.5 Nährmedien .....	25
2.5.1 Flüssige Nährmedien .....	25
2.5.2 Feste Medien .....	25
2.6 Verfahren zur Bestimmung der Konzentration der Stoffwechselprodukte .....	27
2.6.1 Photometrische Bestimmung der Essigsäurekonzentration .....	27
2.6.2 Photometrische Bestimmung der Alkoholkonzentration .....	27
3. Material .....	28
4. Methoden .....	29
4.1. Anreicherung der überlebenden Mikroorganismen im ABT .....	29

4.2 Überprüfung des Anreicherungs Erfolges .....	31
4.3 Mikroskopie der gewachsenen Kolonien .....	31
4.4 Vorvergärung .....	32
4.5 Herstellung einer Essigmutter aus ABT .....	33
4.6 Herstellung einer Essigmutter aus konventionellen Essigsäurebakterien .....	33
4.7 Nachstellung der ABT-Produktion.....	34
4.8 Prozessbegleitenden Untersuchungen .....	36
4.8.1 Probenziehung .....	36
4.8.2 Plattenausstriche.....	36
4.8.3 Chemisch-physikalische Untersuchungen.....	36
4.8.4 Enzymatische Analysen .....	37
5. Ergebnisse der mikrobiologischen und fermentativen Untersuchungen.....	40
5.1 Anreicherung der Mikroorganismen aus dem ABT .....	40
5.2 Prozessbegleitende mikrobiologische Untersuchungen .....	42
5.3 Morphologische Untersuchungen mithilfe der Mikroskopie .....	44
6. Diskussion .....	55
7. Zusammenfassung .....	60
8. Literaturverzeichnis.....	61

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorgeschriebene Parameter des Aceto Balsamico di Modena (GIP) (Rat zum Schutz von geografischen Angaben und Ursprungsbezeichnungen, 2006) .....	11
Tabelle 2: Vorgeschriebene Parameter zum Aceto Balsamico Traditionale (DOP) (Kommission der europäischen Gemeinschaft: Verordnung, 2009) .....	13
Tabelle 3: Grenzwerte für Stoffwechselaktivität von <i>Saccaromyces cerevisiae</i> (Baumgart, 2009).....	20
Tabelle 4: Testreihe mit Zugabe von Alkohol .....	30
Tabelle 5: Testreihe mit Zugabe von Essigsäure .....	30
Tabelle 6: Testreihe mit Zugabe von Glucose .....	30
Tabelle 7: Variationsparameter beim Plattenausstrich.....	31
Tabelle 8: Variierende Parameter der Versuchsstände .....	35
Tabelle 9: Verdünnungsstufen des Ethanoltests.....	37
Tabelle 10: Verdünnungsstufen des Acetattests.....	39
Tabelle 11: Wachstum auf Sabouraud-Agar-Platten.....	41
Tabelle 12: Wachstum auf Kreide-Agar-Platten.....	42
Tabelle 13: Prozessbegleitende Keimzahlbestimmungen .....	42
Tabelle 14: Übersicht der gebildeten Kolonieformen .....	43

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flacon des Aceto Balsamico Tradizionale della Emilia (Merkle, 2002) .....	12
Abbildung 2: Flacon des Aceto Balsamico Tradizionale di Modena (Merkle, 2002) .....	12
Abbildung 3: Beispiel einer Batteria (Reade, 2012) .....	14
Abbildung 4: Abnehmendes Füllvolumen in der Batteria (Gregorio, 2014) .....	14
Abbildung 5: Aceto Balsamico Tradizionale di Modena als Probematerial.....	28
Abbildung 6: Apparatur der Vorvergärung.....	32
Abbildung 7: ABT Essigmutter.....	33
Abbildung 8: Versuchsstände unterschiedlicher Zusammensetzung .....	33
Abbildung 9: 4 gebildete Kolonieförmungen auf Sabouraud-Agar .....	40
Abbildung 10: Hauptkeim der nachgestellten ABT-Herstellung .....	43
Abbildung 11: Organismus 1 .....	44
Abbildung 12: Organismus 2 .....	44
Abbildung 13: Organismus 3 .....	44
Abbildung 14: Organismus 4 .....	45
Abbildung 15: Organismus 5 .....	45
Abbildung 16: Kahmhaut der ABT-Essigmutter .....	46
Abbildung 17: Kahmhaut der Arauner-Essigmutter .....	46
Abbildung 18: Fermentationsgefäß ohne Kahmhaut .....	47
Abbildung 19: Fermentationsgefäß mit Kahmhaut .....	47
Abbildung 20: Entwicklung verstoffwechselbarer Stoffe Versuch 1.....	49
Abbildung 21: Entwicklung verstoffwechselbarer Stoffe Versuch 4.....	49
Abbildung 22: Entwicklung verstoffwechselbarer Stoffe Versuch 6.....	49
Abbildung 23: Entwicklung verstoffwechselbarer Stoffe Versuch 2.....	50
Abbildung 24: Fermentationsverlauf von Versuch 1 .....	52
Abbildung 25: Fermentationsverlauf von Versuch 4 .....	52
Abbildung 26: Fermentationsverlauf von Versuch 6 .....	52
Abbildung 27: Fermentationsverlauf von Versuch 2 .....	53
Abbildung 28: Fermentationsverlauf von Versuch 3 .....	54
Abbildung 29: Fermentationsverlauf von Versuch 5 .....	54

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>	
AB	Aceto Balsamico	[ITL]
ABT	Aceto Balsamico Traditionale	[ITL]
ABM	Aceto Balsamico di Modena	[ITL]
ADP	Adenosindiphosphat	-
ATP	Adenosintriphosphat	-
DOP	Denominazione d'Origine Protetta	[ITL]
IGP	Indicazioni Geografiche Protette	[ITL]
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid	-
PCR	Polymerase Chain Reaction	[Eng.]
PQQ	Pyrrolo-chinolin-chinon	-
<b>Symbol</b>	<b>Erläuterung</b>	<b>Einheit</b>
A	Ethanolgehalt der Probe	[g/l]
d	Schichtdicke	[mm]
F	Verdünnungsfaktor	-
hPa	Hektopascal	100 [kg·m <sup>-1</sup> ·s <sup>-2</sup> ]
Kbe	Kolonie bildende Einheit	[KbE/ml]
MG	Molekulargewicht	[g/Mol]
S	Essigsäuregehalt der Probe	[g/l]
V	Testvolumen	[ml]
v	Probevolumen	[ml]
ε	Extinktionskoeffizient von NADPH	-
ΔE	Differenzbetrag der Extinktionsmessungen	-

## **1. Einleitung**

### **1.1 Produktbeschreibung und Zielsetzung**

Aceto Balsamico Tradizionale ist eine Delikatesse Italiens, von der jeder denkt, er würde sie kennen, denn Aceto Balsamico ist ein Massenprodukt, das schon für 2 Euro in jedem Supermarkt erhältlich ist. Was jedoch fehlt, ist der Wortanhang Tradizionale, welcher dieses Produkt so einzigartig macht. Es handelt sich hierbei um einen Balsamessig von sehr hoher Qualität. Aceto Balsamico Tradizionale (kurz: ABT) ist ein aus konzentriertem Traubenmost hergestellter Essig, der mindestens 12 Jahre gereift ist. Er ist hochviskos und ähnelt in seinen rheologischen Eigenschaften dem flüssigen Honig. Der Geschmack unterscheidet sich stark von normalem Balsamicoessig und ganz besonders vom Tafellessig. Er schmeckt süßlich, säuerlich, würzig und leicht nach Lakritz. Diese Geschmackskomposition ist äußerst intensiv und sehr anhaltend. So verbleibt der Geschmack mitunter mehrere Minuten in Mund.

Aufgrund seines besonderen Geschmacks und der Intensität wird der ABT oft als Würzmittel eingesetzt. Er findet Anwendung beim Würzen von gegrilltem Gemüse, Parfümieren von edlen Meeresfrüchten, Marinieren von Gänseleber oder beim Glasieren von Entenbrust. Der Vielfalt der Einsatzmöglichkeiten wären eigentlich keine Grenzen gesetzt, wenn der Preis nicht so exorbitant hoch wäre. Aufgrund der langen Herstellungsdauer und aufgrund der Tatsache, dass der ABT als geographisch geschütztes Produkt nur in den Provinzen Modena und Reggio Emilia in Italien hergestellt werden darf, gelangen jährlich lediglich 10.000 Liter ABT auf den freien Markt, welche weltweit vertrieben werden. Aufgrund sehr großer Nachfrage und des geringen Angebotes entstehen Preise von 70 bis 150 Euro pro 100ml Flakon.

Eine weitere treibende Kraft, die die Einzigartigkeit des ABT ausmacht ist die „Poesia“. Fragt man einige Essigwinzer, wie sie ihren ABT herstellen und welche Prozesse im Einzelnen ablaufen, so werden sie vielfältigste Antworten geben, die wissenschaftlich betrachtet in ihrem Informationsgehalt fragwürdig sind. Die „Poesia“ führt dazu, dass bis heute keine ausreichende Transparenz in Bezug auf die Herstellung des ABT erreicht wurde. Dies hat einerseits den Hintergrund, dass die Herstellung in privaten Kreisen stattfindet, von Leuten, die keine technologische Ausbildung erhalten haben. Andererseits ist die „Poesia“ eine Form des Schutzes vor Nachahmerprodukten. Die Hersteller haben sich in lokalen Konsortien zusammengeschlossen und sorgen dafür, dass durch Unwissenheit Außenstehender so wenig

Wissen wie möglich über den Herstellungsprozess nach außen gelangt. Weiterhin verzerren sie Informationen durch Mystifizierung des Produktes.

Ziel dieser Arbeit ist die Schaffung von Transparenz in der Herstellung des ABT und die Verifizierung der in der Literatur auffindbaren Informationen. Dies geschieht durch eine nachgestellte, stark beschleunigte ABT-Herstellung im Labormaßstab. Die Leitfragen deren Beantwortung in dieser Arbeit erfolgen soll, sind mikrobiologischer und technologischer Natur. Es gilt einen Überblick drüber zu schaffen, welcher Art jene Mikroorganismen sind, die in einem Milieu derart hoher Zuckerkonzentration und niedrigem pH-Wert aktive Stoffwechselprozesse durchführen können und in welchem Stadium des Herstellungsprozesses ihre Grenzen erreicht sind. Ferner soll geprüft werden, ob diese Spezialisten auch noch am Ende der Herstellung zumindest in vegetativer Dormanz im Endprodukt vorhanden sind und somit der ABT zur Anzucht einer neuen Essigmutter verwendet werden kann. Ebenso gilt es in diesem Projekt den Herstellungsprozess an sich zu beleuchten und zu ergründen, zu welchen Zeitpunkten welche Stoffänderungsprozesse ablaufen und in welcher Intensität sie ausgeprägt sind. Schließlich wird anhand der erhaltenen Ergebnisse die Übereinstimmung von „Poesia“ und Wissenschaft in Frage gestellt.

## **1.2 Unterscheidung der Produktkategorien**

### **1.2.1 Aceto Balsamico**

Der Unterschied zwischen den Produkten, die sich hinter dem Namen Aceto Balsamico verbergen, ist kaum jemandem bekannt. Dieser ist jedoch enorm. Man unterscheidet in groben Zügen zwischen 3 Produktkategorien. Jene Kategorie, die das höchste Ansehen erhält, ist der Aceto Balsamico Tradizionale (D.O.P), welche nur zu exorbitanten Preisen erhältlich ist. Deutlich günstiger, aber dennoch kostenintensiv, ist der Aceto Balsamico di Modena (I.G.P). Jener Balsamessig mit dem geringsten Wert ist der Aceto Balsamico. Für dieses Produkt gibt es kein einheitlich vorgeschriebenes Herstellungsverfahren, weshalb er auch aus einer Vielzahl von Zutaten und Zusatzstoffen hergestellt werden darf. Er wird aus Wasser, Glucose-Fruktose-Sirup, Rapsöl, Salz, Zucker, Traubensaftkonzentrat, Olivenöl, Zusatzstoffen wie Natriumacetat und Verdickungsmitteln, wie Johannesbrotkernmehl hergestellt (Irmscher, 2005). Des Weiteren wird ihm oft ein Teil Aceto Balsamico di Modene I.G.P. hinzugefügt, um das Produkt sensorisch aufzuwerten. Schon aufgrund der Zusammensetzung unterscheidet er sich deutlich vom ABT oder dem ABM. Dennoch ist er wohl, aufgrund des geringen

Preises und der hohen Verfügbarkeit die bekannteste Variante Produktgruppe Balsamessig. Zur Identifizierung des Aceto Balsamico ist die Zutatenliste zu betrachten. Sind die genannten Stoffe zu lesen, handelt es sich in jedem Fall nicht um eines der hochwertigen Produkte, die nachfolgend beschrieben sind (Irmischer, 2005).

### **1.2.2 Acteto Balsamico di Modena (GIP)**

Im Gegensatz zum Aceto Balsamico sind eindeutige Regulationen für den Aceto Balsamico di Modena (kurz:ABM) getroffen worden. ABM wird als Hauptzutat aus konzentriertem Traubenmost hergestellt, welchem Weinessig und Karamell zugesetzt werden dürfen. Das Gemisch wird einer Reifephase von 60 Tagen in Holzfässern unterzogen. Aufgrund der kurzen Reifephase kann dieser eher einfache Prozess in industriellem Maßstab betrieben werden. Dennoch erzielt der ABM Preise von bis zu 40 Euro pro 100ml. Für die Herstellung des ABM wurde 2009 eine Verordnung erlassen, die dazu dienen sollte, den großen Konkurrenzdruck, der von Nachahmerprodukten ausging, einzudämmen. Ferner ist ABM seit Sommer 2009 eine gesetzlich geschützte Bezeichnung. Es gibt staatlich festgelegte Bestimmungen dafür, wann sich ein Balsamessig ABM nennen darf. Anbau, Herstellungs- und Reifungsprozess unterliegen strengen Kontrollen. Nach bestandener Prüfung erhält das Produkt das Echtheitssiegel „I.G.P.“ („Indicazioni Geografiche Protette“), was dem deutschen Zeichen „g.g.A.“ (geschützte geographische Angabe) entspricht.

Die Produktion der Rohstoffe und die Herstellung des Produktes dürfen seitdem nur noch in den Provinzen Modene und Regio Emilia stattfinden. Jede Stufe des Herstellungsprozesses wird vom Anbau der Weintrauben bis zur Abfüllung des ABM durch Kontrolleinrichtungen überwacht und protokolliert. Auch der Herstellungsprozess ist in groben Zügen geregelt. So ist vorgeschrieben, dass ABM aus mindestens 20 % eingedicktem und teilvergorenem Traubenmost hergestellt werden muss, welcher nur aus den Traubensorten Lambruschi, Sangiovese, Trebbiani, Albana, Ancellotta, Fortana oder Montuni gewonnen wurde. Zusätzlich muss ein 10 %iger Anteil von mindestens zehn Jahre altem Essig zugefügt werden. Nach der Eindickung muss der Most eine Dichte von mindestens 1,240 g/ml bei 20 °C haben. Des Weiteren ist ein Gesamtsäuregehalt von mindestens 8 g/kg und ein Trockenextraktgehalt von mindestens 55 g/kg vorgeschrieben. Zur Stabilisierung der Farbe können dem Fertigerzeugnis bis zu 2 Vol.-% Karamell zugefügt werden. Das Zufügen anderer Stoffe ist verboten. Die Herstellung von ABM kann durch Verwendung von Bakterienkulturen im langsamen Orleansverfahren oder mittels Holzspänen und nachfolgender Veredelung

erfolgen. Die Veressigung und Veredelung muss jedoch in Holzfässern aus Eiche, Kastanie, Maulbeere oder Wacholder über einen Zeitraum von mindestens 60 Tagen nach Zusammenstellung der zu verarbeitenden Rohstoffe geschehen. Auf den Verpackungen muss neben der Bezeichnung „Aceto Balsamico di Modena“ (ausgeschrieben oder abgekürzt) in italienischer Sprache und/oder in der Sprache des Bestimmungslands der Hinweis „Indicazione Geografica Protetta“ erscheinen. Zu der Bezeichnung „Aceto Balsamico di Modena“ dürfen keinerlei weitere Zusätze, als die in dieser Produktspezifikation ausdrücklich vorgesehenen Zusätze hinzugefügt werden (Rat zum Schutz von geografischen Angaben und Ursprungsbezeichnungen, 2006). Die nachfolgende Tabelle zeigt jene Parameter, die im Rahmen der Qualitätsprüfung bestimmt werden und deren einzuhaltende Werte.

**Tabelle 1: Vorgeschriebene Parameter des Aceto Balsamico di Modena (GIP) (Rat zum Schutz von geografischen Angaben und Ursprungsbezeichnungen, 2006)**

<b>Parameter</b>	<b>Wert</b>
Dichte bei 20°C	Mindestens 1,06 g/ml
Alkoholgehalt	1,5 in Vol.-%
Säuregehalt	Mindestens 6 g/ml
Schwefelanzhydrid	Höchstens 100 mg/l
Asche	Mindestens 2,5%
Netto Trockenextrakt	Mindestens 30g/l
Reduzierende Zucker	110g/l
<b>Eigenschaft</b>	<b>Attribut</b>
Klarkeit	Klar und leuchtend
Farbe	Tiefbraun
Geruch	Anhaltend, zart, leicht nach Essig, Holznote
Geschmack	Süßsauer, ausgewogen

### 1.2.3 Aceto Balsamico Tradizionale (DOP)

Die kostintensivsten zwei Arten des Balsamessigs sind Aceto Balsamico Tradizionale di Modena und Aceto Balsamico Tradizionale di Emilia. Dies sind zwei Produkte, die ebenfalls nur in den Provinzen Modena und Emilia hergestellt werden dürfen. Der Anhang DOP steht für die italienische geschützte Ursprungsbezeichnung „Denominazione d’Origine Protetta“ und versichert, dass dieses Produkt laut italienischem Recht nur aus den genannten Regionen stammen darf. Sie werden nach einem traditionellen Verfahren hergestellt, welches als einzige Zutat konzentrierten Traubenmost zulässt. Andere Zusatzstoffe und Animpfkulturen sind verboten. Die Reifezeit beträgt 12, 18 (nur „di Emilia“) oder 25 Jahre. Sie werden nur in zwei charakteristischen Flaschenformen gehandelt, welche nur 100ml fassen.



Abbildung 1: Flacon des Aceto Balsamico Tradizionale di Emilia (Merkle, 2002)



Abbildung 2: Flacon des Aceto Balsamico Tradizionale di Modena (Merkle, 2002)

Das Design der Etiketten steht für die Reifezeit. So zeigt eine rötliche Aufmachung, dass es sich um einen 12-jährigen ABT handelt, ein silbernes Design steht für den über 18 Jahre alten ABT di Emilia. Für den 25-jährigen ABT steht das goldene Etikett. Jeder Flakon ist zusätzlich mit einer Serien- und Prüfnummer versehen, die die Rückverfolgbarkeit eines jeden Flakons sicherstellen (Irmischer, 2005). Die Regelungen sind im Vergleich zum ABM deutlich ungenauer, denn der ABT ist gesetzlich nur als geographisch geschütztes Produkt eingetragen. Das heißt er darf zwar nur in den Provinzen Modena und Emilia in Italien produziert werden, wie er jedoch hergestellt wird, ist im EU-Recht nicht festgelegt. Diese Kontrolle obliegt den ortsansässigen Konsortien, die unter strengen Kontrollen die Produktion des ABT überwachen. So muss der Herstellungsprozess des ABT genau protokolliert werden. Erst nach einer sensorischen Prüfung, die vom Konsortium durchgeführt wird, wird entschieden, ob das Produkt als ABT zugelassen werden darf. Auch die Abfüllung wird vom Konsortium übernommen und darf nicht durch den Erzeuger durchgeführt werden. Aus

diesem Grund ist die Integrität trotz gering geregelter Gesetzeslage gewährleistet. Die wenigen vom Konsortium festgelegten Produktparameter, die eingehalten werden müssen, zeigte Tabelle 2.

**Tabelle 2: Vorgeschriebene Parameter zum Aceto Balsamico Tradizionale (DOP) (Kommission der europäischen Gemeinschaft: Verordnung, 2009)**

Parameter	ABTM	ABTE
Dichte	1,24 g/ml	1,2g/ml
Essigsäuregehalt	4,5g/100g	5g/100g

## **2. Stand der Wissenschaft und Technik**

### **2.1 Herstellung des ABT**

#### **2.1.1 Prinzip des Herstellungsprozesses**

Die Herstellung des originalen ABT findet heute immer noch nach dem traditionellen Verfahren statt. Dieses hat sich seit Jahrhunderten nicht geändert und zeichnet sich besonders durch den extremen Zeitaufwand aus. Die Herstellung von ABT ist in den meisten Fällen eine Freizeitaktivität einheimischer Familien. Oft wird er dort in geringen Mengen für den familiären Bedarf erzeugt. Diese Familien hüten nicht nur den ABT, sondern auch das Wissen über das Herstellungsverfahren, welches teilweise mit deutlichen Unterschieden betrieben wird. Aus diesem Grunde gelangen die besten Produkte erst gar nicht auf den freien Markt (Merkle, 2002). Der Herstellungsprozess beginnt mit der Auswahl bestimmter traditioneller Traubensorten. Ein ABT darf nur als ABT bezeichnet werden, wenn er aus weißen Trebiano und Sauvignon Trauben hergestellt wurde, welche eine gute Verwendungsmöglichkeit wegen des hohen Zuckergehalts und wegen guter Anfälligkeit für Hefen und Essigsäurebakterien aufweisen. So nehmen diese Trauben einen Verwendungsanteil von 80-90% ein. Aber auch Weinbeeren der roten Lambrusco Trauben dürfen verwendet werden. Diese werden mit einem Gesamtanteil von 10-20% verwendet (Merkle, 2002).

Die Traubenlese findet erst zwischen September und Oktober statt, sodass hohe Zuckergehalte von 16-18% erreicht werden können. Nach der Ernte werden die Trauben entrappt und die Beeren schonend gepresst, um das Auspressen von Tanninen und

Farbpigmenten aus Schalen und Kernen zu vermeiden. Nach dem Pressen wird umgehend die Cottura durchgeführt. Dies muss schnell erfolgen, da enzymatische Bräunungsreaktionen sonst zu Farb- und Geschmacksfehlern führen würden. Bei der Cottura wird der Most in einem offenen Behälter eingekocht. Dieser Verfahrensschritt hat zwei Zweckmäßigkeiten. Zum ersten wird der Most durch die lange thermische Behandlung stark pasteurisiert, sodass keine fermentativen Fremdkeime vom Rohstoff im Substrat verbleiben. Zum zweiten wird der Wasseranteil stark reduziert, sodass das Gesamtvolumen um 50% - 70% -variiert nach Hersteller- reduziert wird. Die Cottura findet in großen Kupfer-oder Inox-Kesseln statt. Die Temperatur wird zwischen 90-95°C gehalten, damit eine ausreichende Keimreduktion zum tragen kommt, jedoch keine Karamellisationsreaktionen auftreten, die zu Geschmacksfehlern führen. Während der Cottura werden auch die entstehenden Schäume abgetrennt. Diese enthalten unerwünschte Phenole, Proteine und Fremdkörper (Merkle, 2002).

Die Dauer der Cottura liegt meist zwischen 10-24 Stunden. Sie richtet sich nach der Zuckerkonzentration der Trauben, welcher je nach Erntesaison schwankt. Die Cottura ist beendet, wenn der gewünschte Zuckergehalt des Mosts von 28 bis 33% erreicht ist. Nach der Cottura wird der Most in große Glasbehälter gefüllt, in welchen er bis zum Frühjahr gelagert wird. In dieser Zeit setzen sich die Trübstoffe ab, welche vor der Verwendung angezogen werden.

Im Frühjahr wird der Most aus den Ballons in das Botte Madre (Mutterfass) umgefüllt. Das Mutterfass fasst, je nach Größe der Acetaia, bis zu 1000 Liter. In diesem Fass beginnt die Fermentation des im Most enthaltenen Zuckers zu Alkohol, welcher anschließend zu Essig oxidiert wird. Aus diesem Fass heraus werden die Fässer der Batteria befüllt.



Abbildung 3: Beispiel einer Batteria (Reade, 2012)

Unter der Batteria versteht man eine Reihe von Fässern unterschiedlicher Größe, die aus verschiedenen Holzarten gefertigt sind. Die Batteria umfasst 5-12 Fässer, welche oben eine Öffnung haben, die für eine gute Sauerstoffzufuhr sorgt.

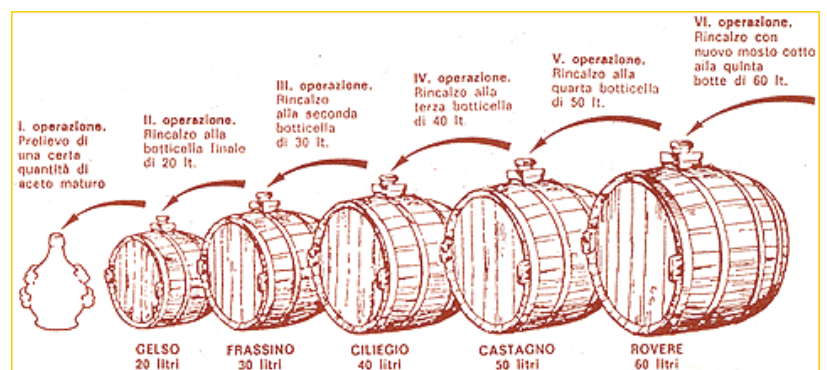


Abbildung 4: Abnehmendes Füllvolumen in der Batteria (Gregorio, 2014)

Diese Öffnung ist mit Leinenstoff abgedeckt, um Staub und Insekten fern zu halten (Reade, 2012).

Die Fässer der Batteria sind in absteigender Größe angeordnet. Das größte Fass hat ein Fassungsvermögen von 60-75 Litern. Das nächst kleinere hat ein Fassungsvermögen, das je um 25-30% geringer ist, als das vorherige Fass, sodass das letzte Fass nur noch ein Volumen von 10-15 Litern fassen kann.

In der Batteria erfüllt jedes Fass eine spezifische Aufgabe. In den ersten Fässern findet die Acetification statt. Hier wird simultan Zucker durch Hefen zu Alkohol verstoffwechselt und Alkohol durch Essigsäurebakterien zu Essig oxidiert. In den nächsten Fässern stellen die Mikroorganismen ihre Stoffwechsellätigkeiten nach und nach ein. Vermutlich stirbt dabei ein Großteil der Mikroorganismenflora ab, besonders die extremophilen Mikroorganismen, könnten jedoch zumindest in vegetativer Dormanz überdauern. Während der Autolyse der sterbenden Zellen werden Enzyme freigesetzt, die wiederum andere biochemische Prozesse initiieren. In den letzten Fässern findet nur noch die Alterung und Reifung des ABT statt. Welche Prozesse jedoch genau durch die Autolyse und die Alterung ablaufen, konnte bisher nicht wissenschaftlich entschlüsselt werden (Reade, 2012).

### **2.1.2 Tätigkeiten des Essigwinzers während der Acetification**

Der Essigwinzer muss lediglich in den kälteren Monaten des Jahres aktive Handlungen ausführen. Im Sommer wird es sehr warm in den Acetaias. In dieser Zeit finden die fermentativen Prozesse der Mikroorganismen statt. Hier sind nur überwachende Maßnahmen nötig. Mit sinkenden Temperaturen stellen die Hefen und Essigsäurebakterien ihre biologische Aktivität ein. Der Essigwinzer spricht dann von der Ruhezeit. Während dieser Phase finden Reifeprozesse statt, sowie das Absetzen der Trübstoffe und der entstandenen Biomasse. Weiterhin werden drei Handlungsschritte ausgeführt, die *Prelievo*, *Travaso* und *Rincalzo* genannt werden (Merkle, 2002).

#### **Preliveo**

Unter *Preliveo* versteht man die Entnahme von maximal 10-20% des fertigen ABT aus dem letzten Fass der Batteria. Es darf kein größeres Volumen entnommen werden, da sonst die Qualität des ABT des Folgejahres schlechter werden würde. Die Abfüllung und Vermarktung geschieht dann durch das *Conorzio*, sofern der ABT die Qualitätsprüfungen bestanden hat. Die Entnahme darf erst nach 12 Jahren erfolgen, wenn das Produkt als ABT bezeichnet werden soll (Merkle, 2002).

## **Travaso**

Mit Travaso betitelt man das Umfüllen der Fässer. Dieses Umfüllen schließt sich an das Preliveo an. Dabei wird der Verdunstungsverlust, der über den Sommer aufgetreten ist, durch den Inhalt vorheriger Fässer ausgeglichen. Dieser Vorgang beginnt mit dem letzten Fass der Batteria, welches mit dem Inhalt des nächst größeren Fasses wieder aufgefüllt wird. Das nächst größere Fass wird wiederum mit dem größeren Fass befüllt. Das stetige Ausgleichen des Verdunstungsverlustes mit ebenfalls bereits konzentriertem Most sorgt dafür, dass die Zuckerkonzentration und somit auch der osmotische Druck in der Batteria fortlaufend steigt (Merkle, 2002).

## **Rincalzo**

Am Ende des Travaso erfolgt das Rincalzo. Hier wird das größte Fass mit dem Inhalt des bereits erwähnten Mutterfasses befüllt. Beim Travaso und der Rincalzo ist es wichtig, dass die Fässer nur zu 75% aufgefüllt werden, um optimale Verdunstungs- und Fermentationsbedingungen zu schaffen (Merkle, 2002).

### **2.1.3 „Poesia“**

Das Problem, das der wissenschaftlichen Darstellung der Herstellung des ABT entgegensteht, ist die „Poesia“. So wird die Herstellung des ABT durch die Essigwinzer gezielt so dargestellt, als würde es sich hier um einen Prozess handeln, der auf übernatürliche Weise geschieht, die durch Wissenschaft nicht erklärt werden kann. Da sich in dieser Beziehung alle erfahrenen Essigwinzer einig sind, ist es kaum möglich, als Außenstehender zwischen Tatsachen und „Poesia“ zu unterscheiden. Dazu kommt die ausgesprochene Heterogenität, mit der die Essigwinzer ihr eigenes Herstellungsverfahren darstellen. Dies beginnt schon mit der Cottura. So schwanken die Angaben zur Temperaturführung zwischen 80 und 100°C. Auch die Zeit, die für die Cottura aufgewendet wird schwankt scheinbar zwischen 12 und 48 Stunden. Einige Winzer lassen den eingekochten Traubenmost wenige Monate ruhen, anderer wiederum bis zu 2 Jahren. Diese Heterogenität in der Herstellung bezieht sich ebenso auf die Reihenfolge der verwendeten Holzarten, die Anzahl der verwendeten Fässer und Mengen an zu entnehmendem ABT aus dem kleinsten Fass. Einige Essigwinzer behaupten sogar, dass alle Tätigkeiten nur an einem Freitag oder Dienstag nach Vollmond ausgeführt werden dürfen. Ebenso ist die gängige Aussage fraglich, dass in den Regionen, wo ABT hergestellt wird, ganz besondere Mikroorganismen in der Luft vorhanden sind, die dann den Most animpfen. Es ist nicht möglich, ein einheitliches Verfahren darzustellen, denn all diese

unterschiedlichen Verfahren kommen tatsächlich zum Einsatz. Deshalb besitzen auch die fertigen ABT unterschiedliche Produkteigenschaften. Diese künstliche Verzerrung der Herstellung hat aber den Vorteil, dass ein solches Produkt das Interesse der Konsumenten weckt. Die „Poesia“ ist also ein äußerst wirkungsvolles Marketinginstrument (Merkle, 2002).

#### **2.1.4 Komplikationen bei der Herstellung von ABT**

Die Herstellung des ABT dauert 12-25 Jahre. In dieser Zeit kann es zu einer Vielzahl von Komplikationen kommen, deshalb muss der Essigwinzer stets den Verlauf der Acetifikation überwachen. Es müssen regelmäßig Überwachungsmaßnahmen durchgeführt werden, um sicher zu stellen, dass die Mikroorganismen nicht inaktiviert wurden. Auch die Umgebungstemperatur in der Acetaia spielt eine große Rolle. So kann es bei zu hohen Temperaturen zum Absterben der Mikroorganismen oder einer zu stark ausgeprägten Verdunstung kommen, die zum Auskristallisieren des Zuckers führt. Die Überwachungsmaßnahmen beinhalten auch die Schädlingsüberwachung. Die vorkommenden Schädlinge können Schimmelpilze, unerwünschte Fremdhefen, Essigfliegen und deren Maden, sowie Fadenwürmer sein. Diese Schädlinge können Fehlgeschmäcker hervorrufen oder gar den gesamten ABT verzehrsunfähig machen. Vor allem aber wird die Entwicklung von Zucker-, Ethanol- und Essigsäurekonzentration in jedem Fass überprüft. Bei Abweichungen von Normkonzentrationen kann der Essigwinzer eingreifen, indem er bei der Travaso einen Verschnitt mit anderen Batterias durchführt, die gegenteilig eine Über- oder Unterkonzentration aufweisen. Somit kann der Winzer beide ABT`s durch Verschnitt ausgleichen (Reade, 2012).

Ein weiteres Problem stellt der eingekochte Most selbst dar. Dieser Most hat einen extrem hohen Gehalt an Zucker, was in einigen Fällen dazu führt, dass die Fermentation nicht wie erwartet stattfindet. In solchen Fällen wird dem Most ein in Gärung befindlicher Weinessig hinzugeführt, was laut Consortio eigentlich nicht erlaubt ist, jedoch trotzdem oft gemacht wird (Reade, 2012).

Auch die Fässer können zu fehlerhaften Produkten führen, indem durch schadhaftes Holz Stoffe in den ABT gelangen, die zu Fehlgeschmack und Fehltönen führen. Ebenso kann es in sehr warmen Sommern zu einer zu starken Verdunstung kommen. Diese kann einerseits dazu führen, dass der Most so stark konzentriert wird, dass die Mikroorganismen absterben oder dass die Essigmutter, die sich an der Oberfläche befindet, mit absinkendem Flüssigkeitsspiegel an der Innenwandung hängen bleibt und dort vertrocknet oder sich auf ihr

Schimmelpilze bilden. In solchen Fällen muss der in Reifung befindliche ATB abgezogen und das Fass einer gründlichen Reinigung unterzogen werden. Ebenso können auch die Essigsäurebakterien selbst die gebildete Essigsäure zu CO<sub>2</sub> und Wasser verstoffwechseln. Man spricht dann von Überoxidation (Reade, 2012).

### **2.1.5 Einfluss der Fässer auf den ABT**

Die Funktionsfähigkeit der Fässer ist von essentieller Bedeutung für die Herstellung des ABT. Dazu gehört auch eine akribische Vorbereitung, wenn ein neues Fass in Betrieb genommen werden soll. Zuerst wird das Fass mit Wasser gefüllt, damit das Holz quellen kann. Sollten dabei Risse oder Leckstellen auftreten, ist ein Fassbinder mit der Reparatur zu beauftragen. Ist diese Vorsichtsmaßnahme erfolgreich abgeschlossen, muss das Fass für die ABT-Produktion vorbereitet werden. Dazu wird das Fass mit starkem nicht pasteurisiertem Essig befüllt, der mehr als 6% Essigsäure enthält. Dieser verweilt dann 6 Monate im neuen Fass. Anschließend wird das Fass mit einer 1:1 Mixtur aus starkem Essig und auf 33% reduzierten Most gefüllt. Diese Mixtur verweilt weitere 6 Monate im Fass. Erst wenn diese Prozedur abgeschlossen ist, kann das Fass zur Herstellung von ATB genutzt werden (Reade, 2012).

In den Fässern kann der zukünftige ABT atmen, das heißt, dass das Wasser durch die Poren des Holzes diffundieren und verdunsten kann. Die Menge des verdunstenden Wassers richtet sich nach der Art des Holzes. Es gibt poröse Hölzer, wie Kastanie, Maulbeere und Esche, die die Verdunstung stark fördern und wiederum andere Holzarten, wie Wacholder, in denen nur geringe Mengen Wasser entweichen.

Bezüglich der verwendeten Holzarten gibt es keine vorgeschriebenen Richtlinien. Die Art des Holzes, aus welchem das Fass besteht und zu welchem Zeitpunkt es eingesetzt wird, hat jedoch großen Einfluss auf die Eigenschaften des Endproduktes. Mit welchem System diese Fässer eingesetzt werden variiert stark und ist meist das charakteristische Geheimnis der einzelnen Vinzer. Die meist verwendeten Hölzer sind Eiche (quercia), Kastanie (castagno), Maulbeere (mora), Wacholder (ginepro), Kirsche (ciliegia), Esche (frassino), und Robinie (robinia). Des Weiteren hat die Auswahl der Holzart einen essentiellen Einfluss auf das spätere Aroma und die Farbe des ABT. So sorgt ein Fass aus Wacholderholz für einen sehr kräftigen Geschmack, während Kirschholz eine charakteristische Süßnote hervorbringt (Read, 2012).

### **2.1.6 Die Acetaia**

Ein Großer Teil der gesamten ATB-Produktion geschieht durch private Kleinhersteller, diese besitzen kleine Acetaias auf ihren Dachböden. Diese Dachböden sind stark von den Jahreszeiten beeinflusst, sodass der ATB im Sommer heißen Temperaturen bis zu 60°C und im Winter Temperaturen unter Null ausgesetzt ist. Die Temperaturschwankungen haben eine wichtige Funktion. Im Sommer findet bei hohen Temperaturen die Essigsäureproduktion durch die Essigsäurebakterien statt. Im Winter dagegen tritt eine Ruhephase ein, die der Klärung des Produktes dient. Diese Phasen sind wichtig für die Ausbildung des charakteristischen Aromas. Die Dachböden zeichnen sich zusätzlich durch eine gute Luftzirkulation aus, die dafür sorgt, dass ausreichend Sauerstoff für die Fermentation vorhanden ist. Eine hohe Luftfeuchtigkeit ist jedoch nicht erwünscht, weshalb in den meisten Acetaias Luftentfeuchter zu finden sind. Dies soll die Bildung von Schimmel vermeiden (Merkle, 2002).

## **2.2 Beteiligte Mikroorganismen**

### **2.2.1 Fermentation durch undefinierte Mischkulturen**

Der ABT ist ein fermentiertes Produkt. Bei seiner Herstellung spielen Mikroorganismen also die tragende Rolle. Aufgrund dessen, dass sich die Fertigprodukte je nach Hersteller auch aus mikrobiologischer Sicht stark unterscheiden, ist es nicht möglich klar zu definieren, welche Mikroorganismen tatsächlich die tragende Rolle bei der Produktion des ABT spielen. Bisher ist klar, dass es sich nicht um eine monoseptische Fermentation handelt. Dies ist weder bei den Ethanol bildenden Mikroorganismen, noch bei den Säure bildenden Mikroorganismen der Fall. Da unterschiedliche Mischkulturen bei verschiedenen Herstellern zu finden waren ist die Aussage über die Wichtigkeit der einzelnen Organismen noch schwerer zu treffen. Es ist zudem wahrscheinlich, dass es sich nicht um einen Leitkeim handelt, der durchgehend eine tragende Rolle spielt, sondern, dass je nach Veränderung der Milieubedingungen im Produkt sich auch der dominante Mikroorganismus ändert. Bis heute konnte keine einheitliche Kultur für die Produktion eines einheitlichen Produktes isoliert werden (Giudici, 2008).

Dies stünde jedoch auch nicht im Interesse der Hersteller, denn gerade aufgrund der variierenden Eigenschaften der Produkte, kann jeder Hersteller ein einzigartiges Produkt kreieren (Reade, 2012).

Fest steht jedoch, dass die beteiligten Mikroorganismen in Ethanol bildende Mikroorganismen und Säure bildende Mikroorganismen einzuteilen sind. Aufgrund der

extremen Milieubedingungen, die sich durch einen hohen Zucker- und Säuregehalt auszeichnen, können hier vermutlich nur extremophile Mikroorganismen überleben. Die beiden beteiligten Familien sind grundsätzlich in Saccharomycetaceae und Acetobacteriaceae einzuteilen.

### 2.2.2 Saccharomycetaceae

Die Einordnung der *Saccharomycetaceae* beruht vorwiegend auf phänotypischen Merkmalen, wie Zellteilung, Sprossung, Bildung von Hyphen, generativer und asexueller Vermehrung, dem Nachweis biochemischer Merkmale und dem Wachstum auf bestimmten C- und N-Quellen (Baumgart, 2009). Im ABT wurden die Gattungen *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Candida* und *Hanseniaspora* nachgewiesen. Die Gattungen sind ubiquitär zu finden und haben sich an eine Vielzahl von Habitaten angepasst, welche sich durch Anwesenheit von Kohlehydratquellen auszeichnen. Zahlreiche Arten dieser Gattungen zeichnen sich durch stark ausgeprägte Toleranzen aus. Die Gattung *Saccharomyces* ist sehr gut an das Milieu ABT angepasst. Erst bei der Unterschreitung der Grenzwerte jener Parameter, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind, zeigt sich eine Hemmung oder Inaktivierung. Da nur wenige Werte für andere Arten bekannt sind, werden hier beispielhaft die Daten von *Saccharomyces cerevisiae*, die für den ABT relevant sind, angegeben.

**Tabelle 3: Grenzwerte für Stoffwechselaktivität von *Saccharomyces cerevisiae* (Baumgart, 2009)**

Parameter	Grenzwert
Zuckerkonzentration	>50 Gew.-%
pH-Wert	1,5-2,5
Essigsäurekonzentration	10g/l
Ethanolkonzentration	20 Vol.-%

Die Gattung *Zygosaccharomyces* ist ein bekannter Schädling in der Lebensmittelindustrie, der jedoch während der ABT-Herstellung erwünscht ist. Diese Gattung ist auch unter extremen Bedingungen zur Vermehrung fähig. *Z. bailii* und *rouxxi* gehören mit zu jenen Mikroorganismen die das höchste Maß an Osmotoleranz und Halotoleranz ausgebildet haben, das bekannt ist. Sie sind sehr tolerant gegen hohe Zuckerkonzentrationen. So ist bei 50-60%iger Zuckerkonzentration noch Wachstums möglich. Auch hohe Alkoholkonzentrationen von bis zu 18% führen nicht zur Abtötung. Auch bei einem pH-Wert von 1,8 findet Vermehrung statt. Somit ist diese Mikroorganismengattung dazu in der Lage in einem

extremen Medium wie dem ABT zu überleben (Solieri et al., 2005). Die Gattung *Candida* ist dagegen weit weniger tolerant gegen die extremen Milieubedingungen des ABT. Mit einer aW-Wertgrenze von 0,9-0,95 und einer unteren pH Wertgrenze von 4,5 kann dieser Mikroorganismus nur in der Anfangsphase des Herstellungsprozesses überleben (Baumgart, 2009). Die Mikroorganismenarten die bisher mithilfe der PCR im ABT nachgewiesen wurden lauten: *candida stellata*, *haseniaspora valbyensis*, *saccharomyces cerevisiae*, *zygosaccaromyces bailii*, *zygosaccaromyces bisporus*, *zygosaccaromyces mellis* und *zygosaccaromyces rouxxi* (Solieri et al., 2005).

### **2.2.3 Acetobacteriaceae**

Der zweite beteiligte Familienstamm sind die *Acetobacteriaceae*. Bei ihnen handelt es sich um gramnegative, obligat aerobe, stäbchenförmige und oft bewegliche Bakterien. Der optimale pH-Wert für diese Mikroorganismen liegt meist im sauren Bereich, oft zwischen 5,3 bis 6,3. Einige wachsen noch bei erheblich niedrigeren pH-Werten. Mitglieder dieser Familie sind auch als Essigsäurebakterien bekannt. Sie gewinnen Energie durch die Oxidation von Ethanol zu Essigsäure. Einige Gattungen, wie z.B. *Acetobacter*, können mit Hilfe von Enzymen des Citratzyklus (Zitronensäurezyklus) Essigsäure weiter zu Kohlendioxid und Wasser abbauen. Andere, wie zum Beispiel *Gluconobacter*, sind mangels entsprechender Enzyme dazu nicht in der Lage. In der Natur kommen Essigsäurebakterien überall da vor, wo Hefen Zucker oder pflanzliche Kohlenhydrate zu Ethanol vergären. Sie bilden während des Wachstums eine Kahlhaut auf der Oberfläche, wo die Sauerstoffversorgung gewährleistet ist (Baumgart, 2009).

Als Mitglieder der Familie der *Acetobacteriaceae* wurden *acetobacter pasteurians*, *acetobacter aceti*, *acetobacter malorum*, *gluconobakter europans* im ABT mithilfe der PCR identifiziert (Solieri, 2005).

## **2.3 Einführung in die biochemischen Prozesse bei der Essigherstellung**

### **2.3.1 Orleansverfahren**

Die ABT-Produktion geschieht im traditionellen Orleansverfahren. Dabei bildet sich auf der Flüssigkeitsoberfläche eine Kahlhaut, welche einen Biofilm aus aeroben Essigsäurebakterien darstellt. Dieser Biofilm wandelt den in der Flüssigkeit unter der Kahlhaut gelösten Alkohol in Essigsäure um. Simultan findet im unteren Teil des Gefäßes ein weiterer Prozess statt. Durch die aerobe Aktivität der Essigsäurebakterien gelangt kein Sauerstoff in die unteren Regionen des Gefäßes. Hier liegt also ein anaerobes Milieu vor. Hier vergären die fakultativ anaeroben Saccharomycetaceae den in der Flüssigkeit gelösten Zucker zu Ethanol, welcher wiederum die Essigsäurebakterien speist. Tatsächlich finden aufgrund der polyseptischen Mikroorganismenpopulation eine Vielzahl von Stoffwechselaktivitäten statt. Die mengenmäßig dominanten Stoffwechselprozesse sind hier die Glucosegärung, Fructosegärung und Essigsäuregärung. Als Emersverfahren ist das Orleansverfahren in seiner Produktivität stark veraltet und findet meist nur noch Anwendung bei traditionellen Produkten (San Chiang Tan, 2005)

### **2.3.2 Die Alkoholische Gärung**

Der Sinn der alkoholischen Gärung ist, wie in der Atmungskette, die Synthese von ATP. Da Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor fehlt, läuft hier ein alternativer Stoffwechselweg ab. Dieser beginnt mit der Glykolyse, wobei ein Molekül D-Glucose zu zwei Molekülen Pyruvat umgesetzt wird. Da es sich hier um eine exotherme Reaktion handelt, kann ein Teil der frei werdenden Energie zur Synthese von zwei Molekülen Adenosintriphosphat (ATP) aus zwei Molekülen Adenosindiphosphat (ADP) und zwei Phosphatresten ( $P_i$ ) verwendet werden. Dieser Vorgang wird Substratkettenphosphorylierung genannt. Zusätzlich werden zwei Moleküle  $NAD^+$  (Nicotinamidadeninucleotid), welches als Coenzym fungiert, zu zwei Molekülen  $NADH_2^+$  reduziert. In diesem Stadium ist der Prozess der Energiegewinnung abgeschlossen.  $NAD^+$  ist jedoch hier der limitierende Faktor und muss regeneriert werden, damit die Glykolyse erneut ablaufen kann. Die folgenden Schritte dienen nur der  $NAD^+$ -Regeneration. (Beyer, 2009)

Von jedem Molekül Pyruvat wird ein Molekül Kohlenstoffdioxid durch das Enzym Pyruvatdecarboxylase abgespalten. Das in diesem Schritt entstehende Acetaldehyd ist für den

Organismus sehr toxisch und wird im folgenden Schritt durch Alkoholdehydrogenase weiter umgesetzt. Dieses Enzym enthält als Zentralatom ein Zinkion ( $\text{Zn}^{2+}$ ), welches die Carbonylgruppe am Acetaldehyd polarisiert. Dadurch können zwei Elektronen und ein Proton vom  $\text{NADH}+\text{H}^+$  auf das Acetaldehyd übertragen werden, wodurch es zu Ethanol reduziert und  $\text{NAD}^+$  regeneriert wird. (Beyer, 2009)

Die Netto-Reaktionsgleichung lautet:



(Beyer, 2009)

### 2.3.3 Fructosegärung

Fructose kann über zwei Wege in die Glykolyse eingespeist werden. Auf dem ersten Weg wird ein Molekül D-Fructose mithilfe des Enzyms Hexokinase phosphoryliert und damit in die Glykolyse eingeschleust. Die Folgereaktionen sind dieselben, wie die im Punkt 2.4.1 Beschriebenen.

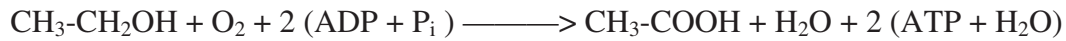
Auf dem zweiten Weg wird die Fructose zuerst durch das Enzym Fructokinase zu Fructose-1-Phosphat umgesetzt. Dieses wird anschließend durch Fructose-1-Phosphataldolase zu Dihydroxyacetonphosphat dissimiliert. Dieser Stoff wird dann im üblichen Weg der Glykolyse verwendet (Beyer, 2009). Die meisten Hefestämme sind zur Fructosegärung in der Lage. Ist jedoch Glucose als C-Quelle vorhanden, wird diese bevorzugt. Eine Ausnahme stellen die Zygosaccharomycesstämme dar (Read, 2012).

### 2.3.4 Aerobe acidogene Fermentation

Die aerobe acidogene Fermentation ist allgemein als Essigsäuregärung bekannt. Da es jedoch einen externen Elektronenakzeptor ( $\text{O}_2$ ) gibt, ist der Begriff der Gärung hier nicht korrekt. Bei dieser Form der Fermentation handelt es sich um eine von Mikroorganismen durchgeführte enzymkatalysierte Oxidation von Ethanol zu Essigsäure, welche im aeroben Milieu abläuft. Diese exotherme Reaktion dient den Mikroorganismen der Energiegewinnung zur Synthese von ATP. Zu Beginn wird Ethanol dehydriert, wobei Acetaldehyd entsteht. Die Wasserstoffabspaltung erfolgt enzymatisch durch Alkohol-Dehydrogenase. Das Coenzym ist nicht, wie bei der Glycolyse  $\text{NAD}^+$ , sondern Pyrrolo-chinolin-chinon. Bei der Reaktion bildet sich  $\text{PQQH}+\text{H}^+$ . Wie  $\text{NAD}^+$  hat PQQ die Funktion eines Oxidationsmittels. Da es in der Zelle nur begrenzt vorhanden ist, muss es ebenfalls regeneriert werden. Dies geschieht mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor unter Mitwirkung von Enzymen der

Atmungskette. Das entstandene Acetaldehyd wird mit Wasser hydratisiert und anschließend durch Aldehydehydrogenase nochmals dehydriert. Es entsteht Essigsäure. Auch hier wirkt wieder PQQ als Oxidationsmittel (Wiechoczek, 2005).

Die Gesamtreaktionsgleichung der Essigsäurebildung lautet:



Aus einem Molekül Ethanol entsteht also ein Molekül Essigsäure.

## **2.4 Vegetative Dormanz im ABT**

Aufgrund der Tatsache, dass der fertige ABT einen sehr hohen Zuckergehalt hat, der potentiell als Substrat für weiteres mikrobiologisches Wachstum dienen könnte, ist die Vermutung naheliegend, dass die Mikroorganismen in Verlauf der sich verändernden Milieubedingungen ihre Stoffwechselaktivität einstellen. Aufgrund des stetig steigenden Zuckergehaltes und der steigenden Essigsäurekonzentration stirbt demnach ein großer Teil der enthaltenen Mikroorganismen ab. Der überlebende Teil würde dann in eine vegetative Dormanz verfallen. In diesem Ruhezustand findet keine DNA-Replikation und auch keine Zellteilung statt. Der gesamte Stoffwechsel ist auf ein Minimum reduziert und ist lediglich darauf ausgerichtet, das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Dies beinhaltet die Regulation des intrazellulären pH-Wertes, des osmotischen Druckes und die Erhaltung der Funktionsfähigkeit der Zellmembran. Dieser Zustand ist in der Natur weit verbreitet, da generell natürliche Habitate meist suboptimale Milieubedingungen aufweisen, welche sich meist durch mangelhafte Nährstoffquellen oder durch Anreicherung von hemmenden Stoffwechselprodukten auszeichnen. Kommt es jedoch zur Verbesserung der Milieubedingungen, so wird der Stoffwechsel wieder aktiviert. Die Zellen gehen in die Lag-Phase über, in der Schäden repariert werden und der Stoffwechsel aktiviert wird. Die Dauer dieser Phase richtet sich nach Art des Organismus und Schwere der Schäden. Anschließend erfolgt die Log-Phase, die sich durch besonders starke Vermehrung und Stoffwechselaktivität auszeichnet (Steinbüchel, 2003).

## **2.5 Nährmedien**

### **2.5.1 Flüssige Nährmedien**

Nährmedien werden in der Lebensmittelmikrobiologie in vielfältigster Form mit verschiedensten Absichten angewendet. Meist sind Nährmedien so hergestellt, dass ein Mikroorganismus oder eine Gruppe von Mikroorganismen gesondert kultiviert werden können. Für die vorliegende Thematik sind flüssige und feste Selektivmedien von Bedeutung. Flüssige Nährmedien werden meist zur Revitalisierung und Anreicherung von Kulturen verwendet. Da im ABT nur tote und subletal geschädigte Mikroorganismen vermutet werden, ist eine Revitalisierung durchzuführen. Es ist also nötig, eine ABT-Probe in eine Nährlösung zu geben, die eine Matrix bietet, die den Optimalbedingungen der enthaltenen Mikroorganismen entspricht. Der Sinn ist es, den im ABT vorhandenen Stress zu beseitigen um ein erneutes Wachstum zu initiieren. Die Auswahl der Bestandteile des Nährmediums ist von entscheidender Bedeutung für den Anreicherungs-erfolg. Mikroorganismen haben unterschiedliche Ansprüche an die sie umgebenden Substrate. So können Kohlenhydrate, Säuren oder Alkohole benötigt werden. Auch die essentiellen Inhaltstoffe, wie Mineralstoffe und Spurenelemente müssen in ausreichender Menge vorhanden sein. Sind nicht ausreichend Informationen über die enthaltene Flora gegeben, ist es sinnvoll, Komplexmedien zu nutzen. Diese enthalten eine Vielzahl verschiedener Nährsubstrate und Nährstoffe, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Anforderungen der Mikroorganismen erfüllt sind (Klein, 2007).

### **2.5.2 Feste Medien**

Um den Erfolg der Anreicherung mit flüssigen Nährmedien zu überprüfen, können feste Nährmedien zum Einsatz gebracht werden. Sie zeichnen sich ebenfalls durch optimale Wachstumsbedingungen für den entsprechenden Organismus aus. Der Unterschied zu flüssigen Nährmedien ist hier die Zugabe von Agar-Agar. Dadurch werden die Mikroorganismen auf der Agarplatte immobilisiert. Jeder Mikroorganismus, der auf der Platte wächst, erzeugt durch Vermehrung eine Kolonie, die mit dem Auge sichtbar wird. So ist durch Einberechnung der Verdünnungsstufe sowohl die Keimzahl der Ausgangslösung bestimmbar, als auch erkennbar, ob die Mikroorganismen vorhanden sind. Selektive Nährmedien erlauben zusätzlich eine Differenzierung. Die Berechnung der Keimzahl erfolgt über den gewichteten Mittelwert der gebildeten Kolonien auf den Platten mit anschließender Berechnung der Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter. Die folgende Formel zeigt die

Berechnung der Keimzahl bei einer 6-fachen Verdünnungsreihe. Nicht auszählbare Platten entfallen bei der Berechnung (Klein, 2007).

$$KbE/ml = \frac{K_1 * 10^1 + K_2 * 10^2 + K_3 * 10^3 + K_4 * 10^4 + K_5 * 10^5 + K_6 * 10^6}{6} * 10$$

$K_n$  = gezählte Kolonien auf der Platte der entsprechenden Verdünnungsstufe.

### **Sabouraud-Agar**

Sabouraud-Agar dient dem Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen. Er enthält als Nährstoffquelle Pepton und als Nährsubstrat Dextrose. Er gehört aufgrund des hohen Glucosegehaltes von 4% und der niedrigen pH-Wertes, welcher meist bei 5,6 liegt, zu den Selektivmedien. Durch weitere Zugabe von Hemmstoffen, wie Chloramphenicol kann die Selektivität erhöht werden (Klein, 2007).

Da gerade die Hefen, also die Saccaromycetaceae, im ABT in großer Vielfalt vermutet werden, könnte dies ein geeigneter Nährboden sein, um diese Keime zu kultivieren.

### **Kreideagar**

Kreide-Agar ist ein festes Nährmedium, mit dem Säure bildende Mikroorganismen spezifisch nachgewiesen werden können. Als Nährsubstrate sind Ethanol und Glucose gegeben. Der Nährstoffbedarf wird durch das enthaltene Hefeextrakt gedeckt. Von besonderer Bedeutung ist die Zugabe von Calciumcarbonat. Wird während der Ausbildung einer Kolonie ein transparenter Hof gebildet, so kann die sichere Aussagen getroffen werden, dass es sich um einen Säure bildenden Organismus handelt. Da die meisten Hefen als Ethanol bildende Mikroorganismen eine hohe Toleranz gegenüber diesen Stoffes haben und Glucose als C-Quelle nutzen können, sind auch sie in der Lage auf diesem Nährmedium zu wachsen. Deshalb ist Kreideagar ein optimales festes Medium, um beide Stämme zu kultivieren (Janke, 1945).

## **2.6 Verfahren zur Bestimmung der Konzentration der Stoffwechselprodukte**

### **2.6.1 Photometrische Bestimmung der Essigsäurekonzentration**

Der photometrischen Bestimmung der Essigsäurekonzentration liegt eine enzymkatalysierte Abbaureaktion zugrunde, bei der  $\text{NADH}_2^+$  gebildet wird, welches in seiner Konzentration proportional zur Essigsäurekonzentration ist. Die enzymkatalysierte Reaktion gliedert sich in drei Schritte. Im ersten Schritt wird Essigsäure durch Zugabe von ATP und Coenzym A in Anwesenheit des Enzyms Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetyl-CoA umgesetzt. Dieses wiederum wird im zweiten Schritt mit Oxalacetat und Wasser durch das Enzym Citratsynthase zu Citrat umgesetzt. Das für diese Reaktion benötigte Oxalacetat wird in einer Sekundärreaktion aus L-Maltat und  $\text{NAD}^+$  in Anwesenheit des Enzyms L-Maltat-Dehydrogenase gebildet. Bei dieser Reaktion liegt ein Gleichgewicht vor, was dazu führt, dass je nach dem, wie viel Oxalacetat umgesetzt wird, entsprechend die Konzentration an  $\text{NADH}_2^+$  steigt. Anhand der  $\text{NADH}_2^+$  Konzentration, welche mit einem Photometer bei 340 nm indirekt bestimmt werden kann, ist die Berechnung der Essigsäurekonzentration möglich (Biopharm, 2014)

### **2.6.2 Photometrische Bestimmung der Alkoholkonzentration**

Der photometrischen Bestimmung der Ethanolkonzentration liegt ebenfalls eine enzymkatalysierte Abbaureaktion zugrunde, bei der  $\text{NADH}_2^+$  gebildet wird, welches in seiner Konzentration proportional zur Ethanolkonzentration ist. Ethanol wird durch  $\text{NAD}^+$  in Gegenwart des Enzyms Alkohol-Dehydrogenase zu Acetaldehyd oxidiert. Diese Gleichgewichtsreaktion ist zur Seite von Ethanol und  $\text{NAD}^+$  gerichtet. Im alkalischen Milieu und durch weiteres Umsetzen des Acetaldehyds zu Essigsäure durch das Enzym Aldehyd-Dehydrogenase wird das Gleichgewicht auf die Seite von Acetaldehyd und  $\text{NADH}_2^+$  verschoben, sodass das Ethanol vollständig umgesetzt werden kann. Das bei der ersten Reaktion entstehende  $\text{NADH}_2^+$  dient als proportionale Messgröße zur Bestimmung der Ethanolkonzentration. Über den Extinktionswert bei 340nm lässt sich die Ethanolkonzentration bestimmen (Biopharm, 2014)

### 3. Material

#### Herstellung des Balsamessigs

Als Original Probe wurde ein Aceto Balsamico Tradizionale di Modena verwendet.

Herkunft: Acetaia Malpighi, Siegelnummer: A 153954.

Zur Anreicherung der Mikroorganismen im ABT und als Rohstoff für die Versuche wurde roter Traubendirektsaft der Albi GmbH & Co. KG genutzt. Vino Rosso D'Italia (11,5 Vol.%) der Tavernello GmbH wurde ebenfalls zur Anreicherung eingesetzt. Reines Ethanol und reine Essigsäure wurden aus dem Laborbestand verwendet.

Die Durchführung der Cottura erfolgte mit einem Satzkocher IFF TCH. 91/033 in einem 20l Edelstahlbehälter. Die Vorvergärung erfolgte in 5l Glasbehältern, welche mit Gähröhrchen versehen wurden, in einer Wärmekammer. Die



**Abbildung 5: Aceto Balsamico Tradizionale di Modena als Probematerial**

Beimpfung der gesteuerten Vorvergärung erfolgte mit *saccharomyces cerevisiae* S-189 als Trockenpräparat der Saftlager GmbH. Die Acetifikation fand in skalierten Kunststoffbehältern statt. Zur gesteuerten Acetifikation wurde mit Essigmutter der Paul Arauner GmbH & Co. KG (Charge:H13) angeimpft.

#### Bestimmung Prozess begleitender Parameter

Die Bestimmung der Zuckerkonzentration während der Cottura und während der Fermentation erfolgte durch refraktometrische Messungen mit einem Küble Master Refraktometer. Die Bestimmung der Trockensubstanz erfolgte mithilfe des Moisture Analysers Sartorius MA 40. Die pH-Wert-Messungen erfolgten mit einem pH-Meter WTW pH 330i. Die photometrische Bestimmung der Ethanolkonzentration wurde mit einem Ethanol-UV-Testkit der Firma Biopharm (Charge: 14869300) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der Essigsäure wurde mittels Essigsäure-UV-Testkit von Biopharm (Charge:1478000) bestimmt. Die photometrische Messung wurde jeweils in einem Photometer Thermo Spectronic Genesys 20 durchgeführt.

## **Mikrobiologische Untersuchungen**

Zur Herstellung der Agar-Platten wurde Sabouraud-Glucose Agar als Fertigpräparat der Firma Carl Roth GmbH bezogen (Charge 322189891). Der Kreide-Agar wurde aus den folgenden Reagenzien hergestellt: D+-Glucose wasserfrei Carl Roth GmbH (Charge: 122184280), Hefeextrakt Oxoid (Charge: 80847), Agar-Agar Carl Roth GmbH (Charge: 40789919), Calciumcarbonat Sigma Aldrich. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank. Die morphologische Untersuchung erfolgte mit einem Nikon Eclipse E200 Labormikroskop.

## **Kleingeräte**

Im Allgemeinen wurden Kleingeräte, wie Messpipetten, Bechergläser, Petrischalen, Eppendorfgefäße, Küvetten (1,5 ml), Reagenzgläser, Plattenauszahlgerät, Drigalski-Spartel, Drehtisch, Schüttler, Bunsenbrenner, Rührfisch, Heizplatte, Messzylinder verwendet.

## **4. Methoden**

### **4.1. Anreicherung der überlebenden Mikroorganismen im ABT**

Die grundlegende Hypothese war, dass im ABT Mikroorganismen, zumindest in vegetativer Dormanz, zu finden sind, die durch Überführung einer ABT-Probe in ein Nährmedium mit idealer Milieueigenschaften wieder in die vegetative Form überführt und anschließend angereichert werden können. Da es sich bei Bestätigung dieser Hypothese um Mischkultur handeln würde, deren ideales Nährmedium nicht bekannt war, wurde Traubensaft mit biologischer Konzentration verwendet, da dieser in Bezug auf Säure und osmotischen Druck deutlich geringeren Stress auf die enthaltenen Mikroorganismen ausüben würde, als der ABT. 1 Liter dieses Traubendirektsaftes wurde in ein Becherglas gefüllt. Unter stetigem Rühren wurde der Traubensaft mit einer Heizplatte auf 90°C erhitzt und für 15 Minuten temperiert, um das Risiko der Fremdverkeimung mit anderen Organismen zu minimieren. Der Verdunstungsverlust von 150ml wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der Traubensaft auf Zimmertemperatur gekühlt. Da die optimalen Bedingungen in Bezug auf Substratquellen nicht bekannt waren, wurden nachfolgend 3 Testreihen angesetzt. Sie unterschieden sich in der Zugabe von 96%igem Alkohol, Glucose und Essigsäure in unterschiedlichen Konzentrationen. Dies hatte den Hintergrund, dass zumindest eines der Medien auf optimale Anreicherungsbedingungen eingestellt werden würde, um die

Anreicherung der Mikroorganismen zu gewährleisten. Bei der Herstellung der drei Testreihen wurden die Supplemente in Reagenzgläser gegeben und anschließend mit dem vorbehandelten Traubendirektsaft auf 9,5 ml aufgefüllt. Des Weiteren wurden 0,5ml unverdünntem ABT zugegeben und das Reagenzglas mit einem Deckel verschlossen. Es erfolgt eine starke Durchmischung mittels Schüttler, da der ABT aufgrund der hohen Viskosität sehr schlecht löslich ist. Es schloss sich die Inkubation bei 30° im Brutschrank an.

Tabelle 4 zeigt, welche Mengen Ethanol dem entsprechenden Reagenzglas appliziert wurden und welche Alkoholgehalte sich draus ergaben.

**Tabelle 4: Testreihe mit Zugabe von Alkohol**

<b>Alkoholreihe</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>
Zugabe von Ethanol 96 Vol.% in ml	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Alkoholgehalt der Lösung in Vol.%	0,192	0,288	0,384	0,48	0,576

Tabelle 5 zeigt die zugegebene Menge an reiner Essigsäure und die dadurch entstehenden Essigsäuregehalte.

**Tabelle 5: Testreihe mit Zugabe von Essigsäure**

<b>Essigsäurereihe</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>
Zugabe von Essig(100%) in ml	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Essigsäuregehalt in g/ml	0,1005	0,2010	0,3015	0,4020	0,5025

Tabelle 6 zeigt die Mengen an Glucose, die dem entsprechenden Reagenzglas zugegeben wurden. Bei der Berechnung der entstehenden Zuckergehalte wurde der bereits enthaltene Zucker im Direktsaft addiert.

**Tabelle 6: Testreihe mit Zugabe von Glucose**

<b>Glucosereihe</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>	<b>G6</b>
Glucosezugabe in g	0	2	2,5	3	3,5	4
Zuckergehalt	1,6	3,6	4,1	4,6	5,1	5,6

## 4.2 Überprüfung des Anreicherungs Erfolges

Zur Überprüfung, ob Wachstum in den entsprechenden Reagenzgläsern stattgefunden hat, wurden 0,1ml Probe aus jedem Reagenzglas entnommen und auf dem Nährmedium Sabouraud-Agar ausgestrichen. Dies erfolgte nach 2, 5 und 10 Tagen Bebrütungszeit der Reagenzglasproben. Die Petrischalen wurden wiederum für 5 Tage im Brutschrank bei 30°C inkubiert. Dieser Test war rein qualitativ. Hier war von Interesse, ob Wachstum feststellbar ist. Es wurde demnach keine Verdünnungsreihe angestellt.

Zusätzlich wurde Kreide-Agar als weiteres Nährmedium zum Einsatz gebracht. Neben den gebildeten Kolonien war hier auch von Bedeutung, ob transparente Vorhöfe gebildet werden, die auf Säurebildner hinweisen würden. Da in den Vorversuchen der Sabouraud-Agar im Fokus stand, wurde je Testreihe eine Probe ausgestrichen, um zu testen, in wie fern Wachstum auf diesem Nährmedium stattfindet. Die folgende faktorielle Matrix zeigt die variierenden Parameter des Plattenausstrichs.

**Tabelle 7: Variationsparameter beim Plattenausstrich**

<b>Probe</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Agar1</b>	<b>Agar2</b>	<b>Verdünnung</b>
ABT-Verdünnungsreihe	2, 5, 10	Sabouraud-Agar	Kreide-Agar	1:10 1:100 1:1000
Alkoholreihe	2, 5, 10	Sabouraud-Agar	Kreide-Agar	Keine
Essigsäurereihe	2, 5, 10	Sabouraud-Agar	Kreide-Agar	Keine
Zuckerreihe	2, 5, 10	Sabouraud-Agar	Kreide-Agar	Keine

## 4.3 Mikroskopie der gewachsenen Kolonien

Um die morphologischen Eigenschaften der in Form von Kolonien herangewachsenen Mikroorganismen zu ermitteln, wurden die Kolonien unter dem Mikroskop betrachtet. Dazu wurden Kolonien gleicher optischer Eigenschaften, das heißt gleicher Farbe und Form mithilfe der flachen Seite eines Spatels vorsichtig abgetragen, ohne dass dabei der Agar mit abgetragen wurde. Diese Biomasse wurde anschließend zusammen mit 50µl destilliertem Wasser in ein Becherglas gegeben und dort stark dispergiert. Die entstehende Suspension diente als Mikroskopiermaterial. Von der Suspension wurden 10 µl auf einen Objektträger gegeben und anschließend mit einem Deckgläschen ausgebreitet. Es schloss sich die Mikroskopie bei 1000-facher Vergrößerung an.

#### 4.4 Vorvergärung

Mit diesem Verfahrensschritt wurde die Cottura und die Lagerung über den Zeitraum bis zur Zuführung des Traubenmostes in den Herstellungsprozess des ABT initiiert. 18 Liter Traubendirektsaft wurden in einem entsprechend großen Edelstahlbehälter über drei Stunden thermisch reduziert. Dabei erhöhte sich der Zuckergehalt, welcher eingangs 175g/l (17,5°Brix) betrug, auf 310g/l (31°Brix). Die Überwachung des Zuckergehaltes erfolgt mittels Handrefraktometer. Da Zucker der Hauptinhaltsstoff von Traubensaft ist, kann der Zuckergehalt direkt von °Brix in g/l umgerechnet werden. Anschließend wurde der konzentrierte Most über Nacht auf 30 °C abgekühlt. Nach einer ausreichenden Abkühlung wurde der Most in Gärballons abgefüllt. Die Gärballons hatten ein Füllvolumen von 5 Litern. Diese wurden jedoch nur mit 2 Litern gefüllt, um zu vermeiden, dass durch Schaumbildung das Substrat nach außen gelangt und somit die Gefahr einer Produktkontamination bestünde. Die Animpfung geschah mit 4 g *saccharomyces cerevisiae* in Granulatform pro Liter konzentriertem Most. Dieses starke Überdosieren sollte eine schnelle Gärung gewährleisten. Die Gärbehälter wurden anschließend mit Gummistopfen verschlossen, welche vorher in heißem Wasser erweicht wurden. An den Gummistopfen wurden anschließend Gärröhrchen angebracht. Somit konnte das bei der Gärung



**Abbildung 6: Apparatur der Vorvergärung**

gebildete CO<sub>2</sub> entweichen. Das Gärröhrchen wurde mit einer mit Zitronensäure versetzten Wasserlösung befüllt. Somit war der Gärballon vor Fremdverkeimung geschützt, jedoch konnte mit dem Überdruck das CO<sub>2</sub> entweichen. Die Gärung fand in der Wärmekammer bei 32°C statt. Abbildung 1 zeigt die fertig aufgestellten Gärbehälter in der Wärmekammer. Jener Gärbehälter, der im Vordergrund zu sehen ist, stellt den Vinifikationsversuch dar. Dieser Gärballon wurde nicht mit Hefekultur beimpft, um die Hypothese zu verifizieren, dass ein ABT, ohne Steuerung der Fermentation durch Zugabe von Kulturen, hergestellt werden kann.

#### 4.5 Herstellung einer Essigmutter aus ABT

Die in den Vorversuchen verwendeten Reagenzgläser wurden 3 Wochen bei 30°C inkubiert. Aufgrund der durchgeführten Plattenausstriche (Siehe Punkt 5.1) konnte beobachtet werden, dass in dieser Zeit die Keimzahl in den Reagenzgläsern zunahm. Damit war der Anreicherungsversuch erfolgreich. Die nach den Vorversuchen überschüssige Teilmenge aller



Abbildung 7: ABT Essigmutter

Reagenzgläser wurde in einem 2l Becherglas vereint. Als Nährmedium wurden 300ml Rotwein und 400 ml Traubendirektsaft hinzugegeben. Anschließend wurde das Becherglas mit Cellulosefaser abgedeckt und bei 30°C bebrütet. Es erfolgte eine Anreicherung für weitere 3 Wochen. Im Anschluss wurde die entstandene ABT-Essigmutter mit den nun regenerierten Mikroorganismen aus dem Aceto Balsamico Tradizionale genutzt, um die folgenden Versuchsansätze zu beimpfen.

#### 4.6 Herstellung einer Essigmutter aus konventionellen Essigsäurebakterien

Um die Stoffwechsellistung der aus dem ABT gewonnenen Essigmutter mit einer Reinzuchtessigmutter zu vergleichen, wurde als Vergleichsbasis eine aus dem Handel bezogene Reinzuchtessigmutter zum Einsatz gebracht. Diese Essigmutter war sofort einsatzbereit und benötigte keine weitere Vorbehandlung. Sie wird im Folgenden als Arauner-Essigmutter bezeichnet.

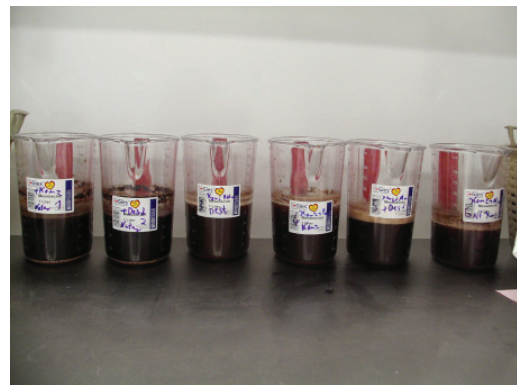


Abbildung 8: Versuchsstände unterschiedlicher Zusammensetzung

#### 4.7 Nachstellung der ABT-Produktion

In der folgenden Versuchsphase wurden das Rincalzo und das Travaso nachvollzogen. Die Versuche gliederten sich in 6 Versuchsstände, die sich entweder durch die zugegebenen Animpfkulturen oder durch das Travasomaterial unterschieden. Jeder Versuchsstand wurde mit 600ml Flüssigkeit befüllt welche sie aus Essigmutterimpfkultur und dem zu oxidierendem Substrat zusammensetzte. Zuerst wurden die Gefäße mit Substrat gefüllt, dann wurde die Essigmutter tropfenweise auf die Flüssigkeitsoberfläche pipettiert. Aufgrund der begrenzt zur Verfügung stehenden Zeit und musste der Herstellungsprozess stark beschleunigt werden. Deshalb fand die Acetifikation, wie die Vorvergärung in der Wärmekammer bei 30°C statt. Um auch die Verdunstung zu beschleunigen fand die Fermentation in offenen Behältern statt. Die Frequenz der nachgestellten Travaso war bei allen Versuchen gleich und betrug 7 Tage. Dieser Vorgang erstreckte sich über 3 Wochen. Hintergrund war es, zu ergründen, ob durch Beimischung von vergorenem Traubensaftkonzentrat mit der hergestellten ABT-Essigmutter der übliche Prozess der Acetifikation initiiert werden kann. Dies würde die Ausbildung einer Kahlhaut und die Umwandlung des Alkohols in Essigsäure beinhalten. Weiterhin galt es die Stoffwechsellistung der ABT-Essigmutter mit der Leistung der konventionellen Essigmutter zu vergleichen. Besonders stand dabei die Entwicklung der Stoffwechsellistung bei sich erhöhendem Stress durch zunehmende Zucker- und Essigsäurekonzentration im Fokus, um mögliche Unterschiede festzustellen, die die Hypothese bestätigen, dass eine Mischkultur aus dem ABT andere spezielle Eigenschaften zeigt, die sie der konventionellen Essigmutter gegenüber als überlegen manifestieren. Neben dem Variationsparameter Essigmutter wurde auch das Traubenmostkonzentrat variiert. So galt es zu verifizieren, ob eine spontane Gärung, wie sie im Originalverfahren angewendet wird, einer gesteuerten Gärung aufgrund einer anderen Mikroorganismenflora in Bezug auf die sich ändernden Milieubedingungen überlegen sein könnte. Jede Versuchsvariante wurde mit einem Referenzversuchsstand begleitet, der sich dadurch auszeichnete, dass das Travasomaterial nicht aus weiterem vergorenem Substrat bestand, sondern aus destilliertem Wasser. Damit wurde der Verlauf einer Fermentation untersucht, die in einem Milieu stattfindet, das keine Aufkonzentrierung der gelösten Stoffe erfährt. Am Tag der Travaso wurde also eine Konzentration eingestellt, die, wenn kein mikrobiologischer Abbau aufgetreten wäre, der Eingangskonzentration gleich wäre. Weiterhin zeichnete sich die Zugabe von destilliertem Wasser dadurch aus, dass der Inhalt der Fermentationsgefäße nicht durch das Travasomaterial in Bezug auf Ethanol und Zuckerkonzentration beeinflusst wurde. Im Prinzip handelt es sich bei diesen Versuchen also

um eine normale Weinessigherstellung, deren Verdunstungsverlust aufgefüllt wird. Tabelle 8 stellte die Eigenschaften dar, in denen sich die 6 Versuchsstände unterschieden.

**Tabelle 8: Variierende Parameter der Versuchsstände**

<b>Versuch</b>	<b>Impfkultur</b>	<b>erste Füllung</b>	<b>Travasomaterial</b>
1	ABT-Essigmutter 100ml	spontan vergorenes Konzentrat 500ml	spontan vergorenes Konzentrat
2	ABT-Essigmutter 100ml	spontan vergorenes Konzentrat 500ml	destilliertes Wasser
3	ABT-Essigmutter 100ml	gesteuert vergorenes Konzentrat 500ml	destilliertes Wasser
4	ABT-Essigmutter 100ml	gesteuert vergorenes Konzentrat 500ml	gesteuert vergorenes Konzentrat
5	konventionelle Essigmutter 4ml	gesteuert vergorenes Konzentrat 600ml	destilliertes Wasser
6	konventionelle Essigmutter 4ml	gesteuert vergorenes Konzentrat 600ml	gesteuert vergorenes Konzentrat

## **4.8 Prozessbegleitenden Untersuchungen**

### **4.8.1 Probenziehung**

Alle 3 Tage wurden Proben mit einem Volumen von 5 ml gezogen. Die Probenziehung wurde ca. 2 cm unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche ausgeführt. Sowohl das Probenmaterial, als auch alle Ausgangsmaterialien wurden einer chemisch-physikalischen Analyse unterzogen. Hintergrund war die Betrachtung der Veränderung aller wesentlichen Attribute der Materialien, um Vergleiche möglich zu machen. Es wurden die Parameter pH-Wert, Ethanolkonzentration, Essigsäurekonzentration, Zucker und Trockenmasse bestimmt.

### **4.8.2 Plattenausstriche**

Zu Anfang, Mitte und Ende der Versuchsphase wurden nach dem Oberflächenausstrichverfahren mikrobiologische Untersuchungen auf Kreide-Agar durchgeführt (siehe dazu 4.2). Hintergrund war es einen Überblick über die mikrobiologische Flora zu erhalten und zu erfahren, wie sich die Keimzahl der einzelnen Versuche über die Versuchsphase entwickelt. Von Bedeutung war ebenfalls eine grobe Einordnung der enthaltenen Mikroorganismen nach Säurebildungsverhalten und Erscheinungsbild der Kolonien. Anhand dieser Untersuchung sollte auch geklärt werden, wie viele verschiedene Mikroorganismenfamilien in den Ansätzen zu finden sind.

### **4.8.3 Chemisch-physikalische Untersuchungen**

Die Untersuchung der Materialien auf den pH-Wert erfolgte durch Eintauchen eines mobilen pH-Meters in die Probengefäße zur Bestimmung des pH-Wertes, durch Aufgabe von ca. 0,6g Probe auf ein Sample-Pad des Moisture-Analysers zur Ermittlung des Trockensubstanzgehaltes und durch Aufgabe einer geringen Probenmenge auf das Prisma eines Refraktometers zur Bestimmung der Brixgrade. Die Bestimmung der Trockenmasse und die refraktometrische Bestimmung des Zuckergehaltes unterscheiden sich im Informationsgehalt kaum, da Zucker die mengenmäßig dominierende Substanz ist. Jedoch kann durch Benutzung zweier Methoden zur Bestimmung eines Parameters die Richtigkeit der Messung bekräftigt werden. Ferner diente die Trockensubstanzbestimmung dazu, die Verzerrung der Ergebnisse der Refraktometrie durch enthaltenes Ethanol auszugleichen.

#### 4.8.4 Enzymatische Analysen

##### Alkoholgehalt

Die Entwicklung der Ethanolkonzentration wurde mit dem enzymatischen Ethanoltestkit durchgeführt. Dieser Test wird unwirksam, wenn die Ethanolkonzentration zu hoch wird, da dann die anschließende photometrische Messung nicht mehr auswertbar ist. Deshalb muss vor der Durchführung des Tests eine Verdünnung erfolgen, die sich nach der vermuteten Ethanolkonzentration richtet. Welches Verdünnungsverhältnis erforderlich ist, gibt die folgende Tabelle an. Je nach Versuchsstand wurden Verdünnungen von 1:100 oder 1:1000 vorgenommen. Dazu wurden je 0,1ml/ 0,01ml Probe mit 9,9ml/ 9,99ml destilliertem Wasser verdünnt.

**Tabelle 9: Verdünnungsstufen des Ethanoltests**

Geschätzte Menge Ethanol [g/l]	Verdünnung mit A.dest.	Verdünnungsfaktor F
< 0,06g	-----	1
0,06g-0,6g	9	10
0,6g-6,0g	99	100
6g-60g	999	1000
>60g	9999	10000

Zu jeder Bestimmungsreihe wurden Küvetten mit der jeweiligen Probe und einem Leerwert mit destilliertem Wasser gemessen. Zur Durchführung der optischen Messung wurden Küvetten mit 1 ml des Reaktionsgemisches 2 (enthält  $\text{NAD}^+$  und Aldehydehydrogenase in Natriumdiphosphatpuffer) und 0,033ml Probe befüllt. Nach anschließendem Rühren und 3 Minuten Wartezeit wurde die erste Extinktion bei 340 nm gemessen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Suspension 3 (enthält Alkoholdehydrogenase) mit einem Volumen von 0,017ml. Nach einer 15-minütigen Wartezeit wurde die zweite Extinktion bei 340 nm durchgeführt. Die Messung des Leerwertes wurde analog durchgeführt, jedoch wurden anstatt der 0,33 ml Probe 0,033 ml destilliertes Wasser zugegeben.

Die Ethanolkonzentration wird mit den folgenden Formeln berechnet:

<p>1. <math>\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}</math></p> <p>2. <math>c \approx \frac{V * MG}{\epsilon * d * v * 2 * 1000} * \Delta E [g/l]</math></p> <p>3. <math>A \approx c * F</math></p> <p>4. <math>A_{\text{Vol.}\%} = A * 0,1267</math></p>	<p>E= Extinktionswert bei 340 nm  V = Testvolumen [ml]  v = Probevolumen  MG = Molekulargewicht  d = Schichtdicke  ε = Extinktionskoeffizient von NADPH  ΔE= Differenzbetrag der Extinktionsmessungen  A= Ethanolgehalt der Probe [g/l]  F= Verdünnungsfaktor</p>
--	---

## Essigsäurebestimmung

Auch vor der Essigsäurebestimmung musste eine Verdünnung vorgenommen werden. Die Höhe der Verdünnung richtete sich nach der geschätzten enthaltenen Menge an Essigsäure. Die Proben bis zum 7. Fermentationstag wurden auf eine 10-fach-Verdünnung eingestellt. Alle Proben, deren Ziehung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte, wurden 100-fach verdünnt. Es wurde je 1ml/ 0,1ml Probe mit 9ml/ 9,9ml destilliertem Wasser verdünnt.

**Tabelle 10: Verdünnungsstufen des Acetattests**

geschätzte Menge Essigsäure [g/l]	Verdünnung mit dest. Wasser	Verdünnungsfaktor F
<0,15g	-----	1
0,15-1,5g	1+9	10
1,5-15g	1+99	100
>15g	1+999	1000

Zur enzymatischen Bestimmung wurden 0,333ml Lösung 1 (enthält Triethanolaminpuffer, Apfelsäure und Magnesiumchlorid), 0,066ml Lösung 2 (enthält ATP und  $\text{NAD}^+$ ); 0,033ml Probe (bzw. dest. Wasser); und 0,633ml destilliertes Wasser in eine Küvette gegeben. Anschließend wurde die erste Messung bei 340nm durchgeführt, um damit den Extinktionswert  $E_0$  zu ermitteln. Anschließend wurde Suspension 3 (enthält L-Maltat-Dehydrogenase und Citratsynthase) mit einem Applikationsvolumen von 0,0033ml zugegeben. Nach ausreichender Durchmischung mit einem Plastikspatel wurde eine Reaktionszeit von 3 Minuten abgewartet und anschließend die zweite Extinktion  $E_1$  bei 340nm gemessen. Anschließend wurden 0,0066ml Lösung 4 (enthält Acetyl-CoA-Synthetase) zugegeben. Es erfolgte eine weitere Reaktionszeit von 10-15 Minuten mit der abschließenden Messung bei 340nm, um  $E_2$  zu erhalten. Die Berechnung der Konzentration ergibt sich aus folgender Formel.

$1. \Delta E = \left[ (E_2 - E_0)_{\text{Probe}} - \frac{(E_1 - E_0)_{\text{Probe}}^2}{(E_2 - E_0)_{\text{Probe}}} \right] - \left[ (E_2 - E_0)_{\text{Leerwert}} - \frac{(E_1 - E_0)_{\text{Leerwert}}^2}{(E_2 - E_0)_{\text{Leerwert}}} \right]$	<p>V = Testvolumen [ml]  v = Probevolumen  MG = Molekulargewicht  d = Schichtdicke  <math>\epsilon</math> = Extinktionskoeffizient von NADPH  <math>\Delta E</math> = Differenzbetrag der beiden Extinktionsmessungen  S = Essigsäuregehalt der Probe [g/l]  F = Verdünnungsfaktor</p>
$2. c \approx \frac{V * MG}{\epsilon * d * v * 2 * 1000} * \Delta E [g / l]$	
$3. S \approx c * F$	
$4. E_{\text{gew.}\%} = S * 0,995$	

## 5. Ergebnisse der mikrobiologischen und fermentativen Untersuchungen

### 5.1 Anreicherung der Mikroorganismen aus dem ABT

Zur Überführung jener Mikroorganismen, deren Anwesenheit im ABT vermutet wurde, war eine Bebrütungszeit von 10 Tagen nötig. Tabelle 11 zeigt, dass die Überprüfungen der Zellzahlentwicklung nach 2 und 5 Tagen ergaben, dass nur wenige Mikroorganismen mittels Sabouraud-Agar in den Anzuchtmedien nachzuweisen waren. Erst nach einer Bebrütungszeit von 10 Tagen konnte eine signifikant erhöhte Zelldichte beobachtet werden. Deutlich zu sehen ist, dass die Anzuchtmedien deren Variationsparameter die Verdünnungsstufe des ABT, die Konzentration von Essigsäure oder die Konzentration von Glucose waren, eine deutliche Zunahme der Zelldichte zeigten. Dies war bei der mit Alkohol versetzten Testreihe jedoch nicht der Fall. Grundsätzlich ist bei den angesetzten Testreihen jedoch eine Tendenz zur Anreicherung zu erkennen. In Bezug auf die Morphologie der auf Sabouraud-Agar gebildeten Kolonien ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Anzuchtmedien. Sie konnten optisch in 4 verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Zum einen wuchsen großflächige weiß-cremefarbene und gelb-bräunliche Kolonien, zum anderen wuchsen sehr kleine rote und gelbe Kolonien, die ein deutlich langsames Wachstum zeigten.

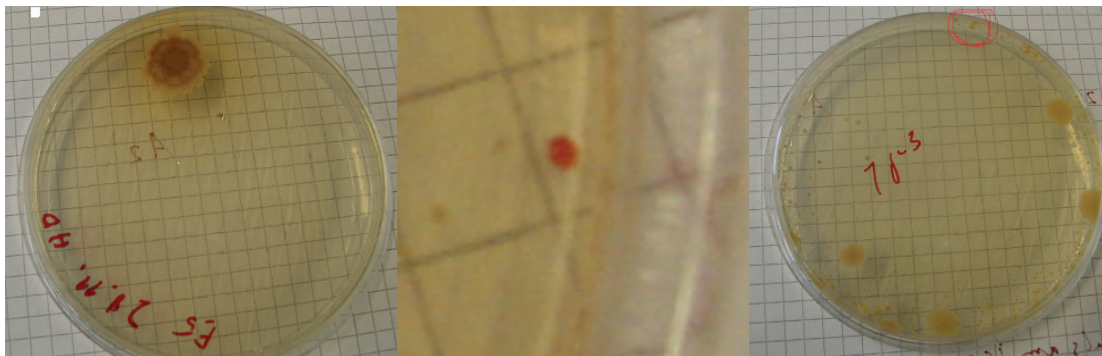


Abbildung 9: 4 gebildete Koloniefornen auf Sabouraud-Agar

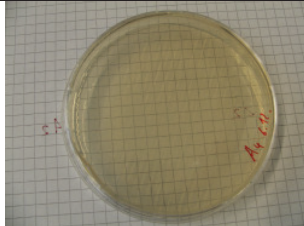
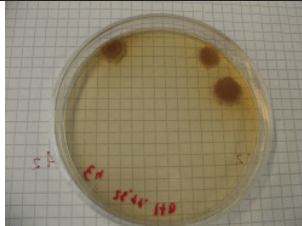
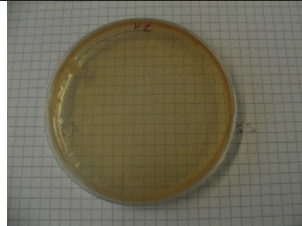
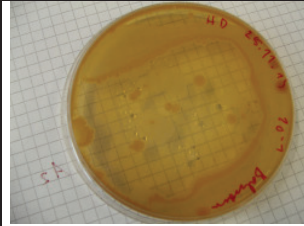
Auf den Kreide-Agar-Platten war ein deutlich stärkeres Wachstum zu beobachten, als es bei den Sabouraud-Agar-Platten der Fall war. Das Erscheinungsbild der gebildeten Kolonien unterschied sich zwischen Kreide-Agar und Sabouraud-Agar jedoch nicht. Auf allen ausgestrichenen Platten war nach 5 Tagen Bebrütungszeit der Reagenzglasproben das Wachstum eines Bakterienrasens zu sehen. Besonders bei dem Ausstrich von Probe G2 wurde gut erkennbar, dass sich ein transparenter Vorhof bildete, der auf Säurebildner hinwies (siehe dazu Tabelle 12). Auch die Alkoholreihe zeigte hier ein deutliches Wachstum. Es ergab sich, dass sowohl Säurebildner - mit Vorhof - wuchsen und jene Organismen, die keine Säure

bildeten -ohne Vorhof-. Da das Wachstum der angezüchteten Mikroorganismen auf dem Kreide-Agar deutlich stärker als auf Sabouraud-Agar gefördert wurde und zusätzlich eine Diskriminierung der Stoffwechselaktivität möglich war, wurde bei den weiteren Platten-Ausstrichen auf den Sabouraud-Agar verzichtet.

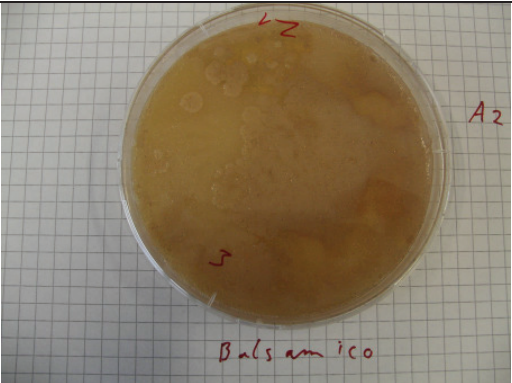
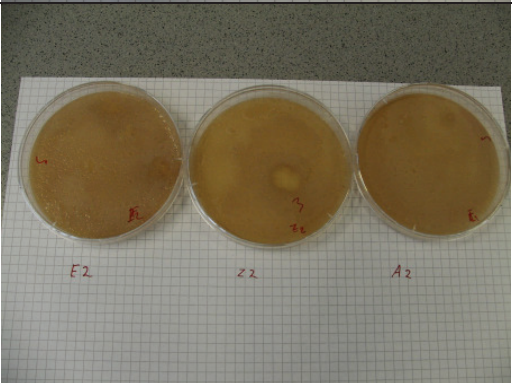
**Tabelle 11: Wachstum auf Sabouraud-Agar-Platten**

Probe	2 Tage	5 Tage	10 Tage
ABT 10 <sup>-1</sup>	1	Einzelne Kolonien	Rasen
ABT 10 <sup>-2</sup>	0	Einzelne Kolonien	Rasen
ABT 10 <sup>-3</sup>	0	Einzelne Kolonien	Rasen
A1	0	1	Rasenring
A2	0	0	0
A3	0	0	0
A4	0	0	0
A5	0	0	0
E1	0	0	Rasen
E2	0	Rasenring	Rasenring
E3	0	3	Rasenring
E4	0	2	3
E5	0	2	Rasen
G1	0	0	Rasenring
G2	0	0	Rasenring
G3	0	0	2
G4	0	0	4
G5	0	0	0
G6	0	0	Rasen

			
0	Einzelne Kolonien	Rasenring	Rasen

**Tabelle 12: Wachstum auf Kreide-Agar-Platten**

Probe	10 Tage	
Balsamico 10 <sup>-2</sup>	Rasen	
A 2	Rasen	
E 2	Rasen	
G/Z 2	Rasen	

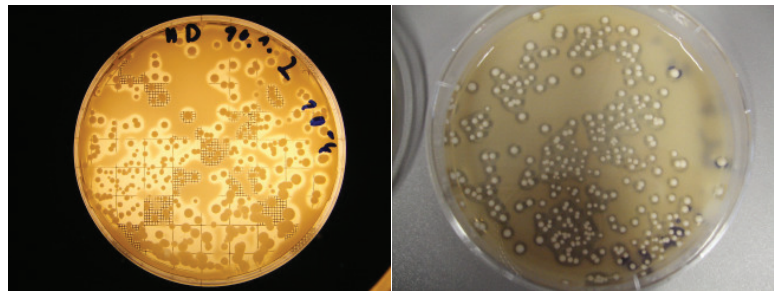
### 5.2 Prozessbegleitende mikrobiologische Untersuchungen

Zur quantitativen und qualitativen Überprüfung der Entwicklung der Mikroorganismenflora in den verschiedenen Versuchsständen wurden nach 7, 14 und 21 Tagen Probenziehungen mit anschließendem Oberflächenausstrich auf Kreide-Agar-Platten durchgeführt. Bereits der erste Plattenausstrich zeigte, dass die Zelldichte jener Versuchsstände, die mit spontan vergorenem Traubensaftkonzentrat angesetzt wurden, deutlich größer war, als die Zelldichte jener Versuchsstände, die mit kontrolliert vergorenem Konzentrat angesetzt wurden. Die Ergebnisse der Plattenausstriche gibt Tabelle 13 wieder. Die erwartete Abnahme der Zellzahl durch Anreicherung von Stoffwechselprodukten und Steigen der Zuckerkonzentration blieb jedoch aus.

**Tabelle 13: Prozessbegleitende Keimzahlbestimmungen**

Versuchsstand	KbE nach 7 Tagen	KbE nach 14 Tagen	KbE nach 21 Tagen
1	2,18*10 <sup>-6</sup>	5,44*10 <sup>-7</sup>	4,38*10 <sup>-7</sup>
2	1,46*10 <sup>-8</sup>	3,38*10 <sup>-8</sup>	2,21*10 <sup>-6</sup>
3	7,15*10 <sup>-5</sup>	2,26*10 <sup>-6</sup>	1,94*10 <sup>-6</sup>
4	8,23*10 <sup>-5</sup>	6,61*10 <sup>-5</sup>	5,99*10 <sup>-5</sup>
5	3,53*10 <sup>-5</sup>	4,23*10 <sup>-6</sup>	4,01*10 <sup>-5</sup>
6	5,11*10 <sup>-5</sup>	3,64*10 <sup>-6</sup>	1,82*10 <sup>-6</sup>

Des Weiteren zeigten die Platten, dass die dominante Mikroorganismengruppe die Säurebildner waren. Lediglich vereinzelt wuchsen auf den Platten Kolonien, die keinen Vorhof ausbildeten. Dabei wurden zwei unterschiedliche Formen der Koloniebildung festgestellt. Zum einen wurden großflächige weiße Kolonien gebildet, die in unregelmäßiger Form an Blüten erinnerten und einen Durchmesser von 5-10mm aufwiesen. Zum anderen wurden rötlich-braune Kolonien mit einem Durchmesser von 3-6mm gebildet. Die Säurebildner traten in 3 verschiedenen Erscheinungsbildern und mit sehr heterogener Häufigkeit auf. Der dominante Mikroorganismus bildete weiß-creme-farbene Kolonien aus. Sie bildeten einen Vorhof, der einen



**Abbildung 10: Hauptkeim der nachgestellten ABT-Herstellung**

Durchmesser hatte der circa doppelt so groß war, wie der Durchmesser der Kolonie selbst. Nach 3 Tagen Inkubationszeit waren diese Kolonien mit 1-4 mm Durchmesser gut sichtbar. Zu einer Vorhofbildung kam es erst bei höheren Verdünnungsstufen. Bei zu großer Kolonienzahl wurden sie nicht ausgebildet.

Der zweite Mikroorganismus bildete rote Kolonien aus, welche deutlich langsamer wuchsen und einen Durchmesser von 0,5-1mm aufwiesen. Sie wurden erst nach 5-7 Tagen Inkubationszeit sichtbar. Der gebildete Vorhof war im Verhältnis zur Koloniegröße deutlich größer, als jener des erstgenannten Mikroorganismus` und betrug das 4 bis 7-fache des Koloniedurchmessers. Mengenmäßig stand dieser Mikroorganismus an zweiter Stelle. So bildete er nur vereinzelt Kolonien aus.

Jener Mikroorganismus mit der geringsten Wachstumswahrscheinlichkeit bildete weiß-gelbe Kolonien von 0,5- 0,8mm aus. Der gebildete Vorhof dagegen war deutlich größer, als jener aller anderen Kolonien und betrug ca. das 20-fache des Koloniedurchmessers. Letztlich wurden anhand von Plattenausstrichen 5 verschiedene Kolonieformen und somit 5 verschiedene Mikroorganismenarten detektiert. Diese werden in Tabelle 14 wiedergegeben.

**Tabelle 14: Übersicht der gebildeten Kolonieformen**

Organismus	Größe (in mm)	Farbe	Säurebildner?
1	5-10	weiß	Nein
2	3-6	rötlich-braun	Nein
3	1-4	weiß-crem	Ja
4	0,5-2	rot	Ja
5	0,5-0,8	weiß-gelb	Ja

### 5.3 Morphologische Untersuchungen mithilfe der Mikroskopie

Durch Betrachtung der in Suspension gebrachten Kolonien konnten die Mikroorganismen als Zellen betrachtet werden. Dadurch konnte neben dem Erscheinungsbild als Kolonie und der Stoffwechsellistung auch die Morphologie der einzelnen Zellen zur weiteren Differenzierung herangezogen werden. Die großen dunklen Kolonien des **Organismus 1** erschienen unter dem Mikroskop überwiegend als kokkenförmige dunkle Mikroorganismen.



Abbildung 11: Organismus 1

**Organismus 2**, der große weiße Kolonien bildete, erschien unter dem Mikroskop ebenfalls kokkenförmig. In Bezug auf Größe und Form konnten diese beiden Organismen nicht unterschieden werden. Im Vergleich zu den 3 anderen Mikroorganismen unterschieden sie sich jedoch deutlich, da die Zellgröße deutlich geringer war und die Zelldichte deutlich höher.

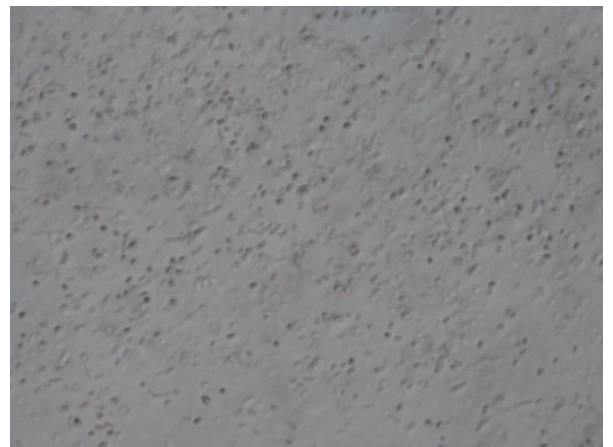


Abbildung 12: Organismus 2

**Organismus 3**, welcher den dominanten Organismus aller Versuchsansätze, welche mit ABT-Essigmutter angeimpft wurden, darstellte, zeigte sich unter dem Mikroskop ellipsenförmig. Es ist zu sehen, dass die Zellen bei gleichem Okular im Vergleich zu den oben beschriebenen Mikroorganismen deutlich größer sind und in ihrer Größe stark schwanken.

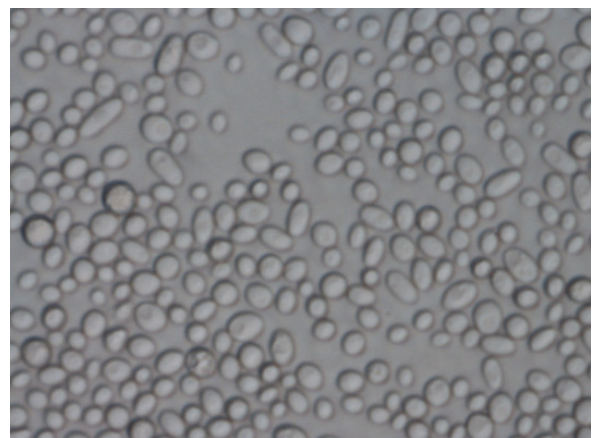


Abbildung 13: Organismus 3

**Organismus 4**, welcher kleine rote Kolonien bildete, erschien unter dem Mikroskop stäbchenförmig. Es ist zu sehen, dass auch diese Zellen bei gleichem Okular im Vergleich zu Organismus 1 und 2, als sehr groß zu bezeichnen sind. Zur besseren Differenzierung sind einige Zellen in Abbildung 3 rot markiert. Zusätzlich wurde unter dem Mikroskop ersichtlich, dass die Mikroorganismen zur Bewegung befähigt waren und sich unabhängig von der Kapillarströmung bewegten. Eine Begeißelung konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Zelldichte war im Vergleich zu den obigen Organismen, trotz gleicher Verdünnung mit destilliertem Wasser, deutlich geringer.



**Abbildung 14: Organismus 4**

**Organismus 5**, der die kleinsten Kolonien ausbildete und nur selten kultiviert werden konnte, zeigte sich unter dem Mikroskop wie Organismus 1 und 2 kokkenförmig und sehr klein. Die Zelldichte war ebenfalls sehr hoch.



**Abbildung 15: Organismus 5**

Neben den gewachsenen Kolonien wurde auch die Kahmhaut, welche sich als trüber Biofilm auf der Oberfläche des Flüssigkeitsspiegels der Fermentationsgefäße gebildet hatte, mikroskopiert. Dabei wurde ersichtlich, dass sich die Kahmhaut, die sich auf den Ansätzen, welche mit ABT-Essigmutter angeimpft wurden, gebildet hatte, anhand der Mikroorganismen, aus denen sie bestand, von der Arauner-Essigmutter stark unterschied. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen, dass beide Kahmhäute einen heterogenen Biofilm darstellen. Es sind Zellen unterschiedlicher Größe und unterschiedlichen Erscheinungsbildes zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass es sich nicht nur um einen Stamm handelt. Was jedoch auffällt, ist das die ABT-Kahmhaut keine stäbchenförmigen Mikroorganismen zeigt, was jedoch bei der Arauner-Essigmutter der Fall ist.



**Abbildung 16: Kahmhaut der ABT-Essigmutter**



**Abbildung 17: Kahmhaut der Arauner-Essigmutter**

### 5.3 Vorvergärung

Traditionell wird der konzentrierte Traubenmost, bevor er im Frühjahr in das Botte-Madre gefüllt wird, über den Winter in Glasballons gelagert. Dieser Verfahrensschritt wurde imitiert, indem das hergestellte Traubensaftkonzentrat über einen Zeitraum von 3 Wochen bei 30°C fermentiert wurde. Es zeigte sich, dass die mit *saccharomyces cereviceae* angeimpfte Teilmenge schon nach 24 Stunden in die Phase der stürmischen Gärung überführt war, was sich durch starkes Austreten von CO<sub>2</sub> –Blässchen manifestierte. So wurde zum Ende der Vorfermentation ein Alkoholgehalt von 7-8 Vol.% erreicht. Auch jene Teilmenge, die nicht mit Hefe versetzt wurde erfuhr eine Vorvergärung. Dieser Ansatz wurde einer Spontangärung unterzogen und erreichte einen Alkoholgehalt von 7 Vol.%. Es zeigte sich also, dass der erhöhte Zuckergehalt keine inhibierende Wirkung auf die enthaltenen Mikroorganismen zeigte und eine rege Stoffwechselaktivität sowohl von wilden Hefen, als auch von Reinzuchthefen möglich war. Des weitren ist mit diesem Verfahrensschritt belegt worden, dass in der Tat eine Zugabe von Reinzuchthefen nicht zwingend notwendig ist, um eine Vorvergärung durchzuführen.

### 5.4 Beobachtungen während der Herstellung

Nach der Zugabe von ABT-Essigmutter und Aurauner-Essigmutter konnte makroskopisch in der ersten Woche keine Aktivität beobachtet werden. Erst nach 6-9 Tagen hatte sich bei allen Fermentationsgefäßen eine Kahlhaut auf dem Flüssigkeitsspiegel der Fermentationsgefäße gebildet. Die Kahlhaut zeigte sich als trüber, faltiger Biofilm. Bei Zerstörung durch die Ausführung einer Travaso wurden die freiwerdenden Stellen wieder geschlossen. Die Kahlhaut verblieb bis zum 21. Tag ohne Veränderungen. Die sich ändernden Substratbedingungen, die sich bei Versuchsstand 1, 4 und 6 als stetige Zunahme der Zuckerkonzentration und bei Versuchsstand 2, 3 und 5 als stetige Substratverdünnung und eine Verknappung der Ethanolkonzentration manifestierten, hatten keinen



Abbildung 18: Fermentationsgefäß ohne Kahlhaut



Abbildung 19: Fermentationsgefäß mit Kahlhaut

Einfluss auf das Erscheinungsbild der Kahlhaut eines jeden Gefäßes. Erst bei der Durchführung der letzten Travaso am 21. Tag kam es zur Auflösung der Kahlhaut in allen Gefäßen. Auch nach mehreren Tagen der Ruhephase wurde sie nicht wieder ausgebildet. Neben der Stoffwechselaktivität der Säurebildner war die Verdunstung der zweite entscheidende Vorgang während des Herstellungsprozesses. So verdunsteten alle 3 Tage 100ml Flüssigkeit in den Fermentationsgefäßen. Diese Verdunstung trug zur Entstehung der charakteristischen Sinuskurve der folgenden Abbildungen bei.

## 5.5 Kondensations- und fermentationsbedingte Änderung der Zustandsgrößen

Anhand der Analyse der gezogenen Proben konnten die ablaufenden fermentativen Prozesse bei der Balsam-Essigherstellung betrachtet werden. Dabei wurde deutlich, dass der Herstellungsprozess im betrachteten Zeitraum in zwei Phasen unterteilt werden kann. Die Graphiken 16, 17 und 18 zeigen einstimmig, dass in der ersten Phase die Zuckerkonzentration des zugegebenen vergorenen

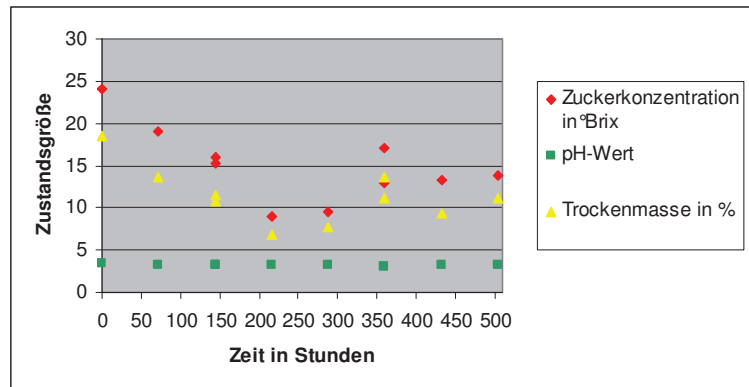


Abbildung 20: Entwicklung verstoffwechselbarer Stoffe Versuch 1

Traubensaftkonzentrates trotz Verdunstung sinkt. Die Zuckerkonzentration (in °Brix) sinkt stetig bis zum Zeitpunkt der Travaso und steigt durch erneute Konzentratzugabe wieder leicht an. Das Auffüllen der Fermentationsbehälter ist in den Diagrammen durch das Auftreten

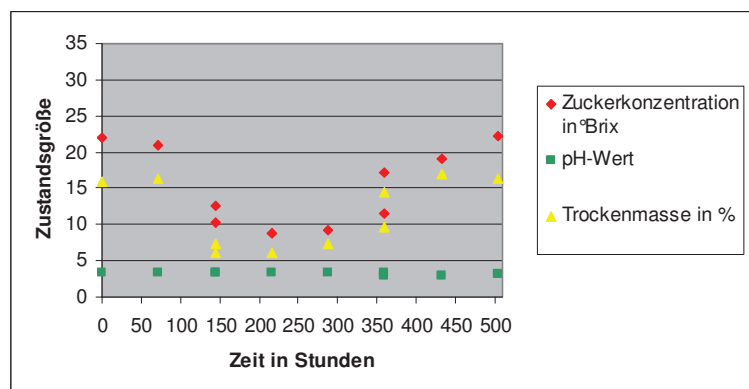


Abbildung 21: Entwicklung verstoffwechselbarer Stoffe Versuch 4

zweier Werte zum selben Zeitpunkt zu erkennen. Bei fortlaufender Fermentation sinken die gemessenen Parameter erneut bis zur Probenziehung vor der Durchführung der nächsten Travaso. In der ersten Phase, die bis zur 200. Fermentationsstunde andauert, steht die Zuckerfermentation im Fokus der mikrobiologischen Aktivität.

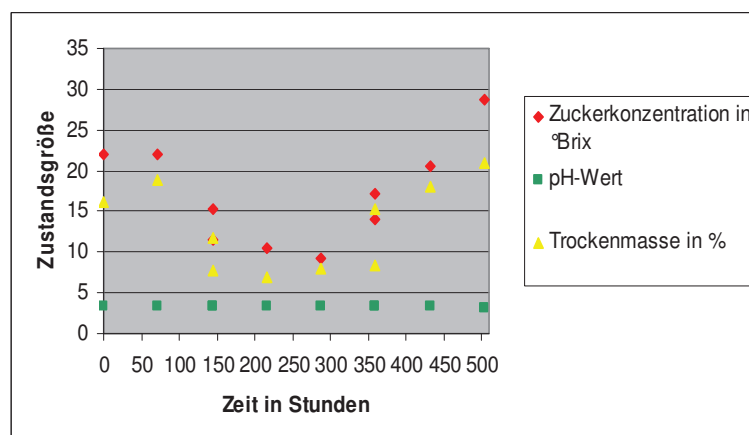
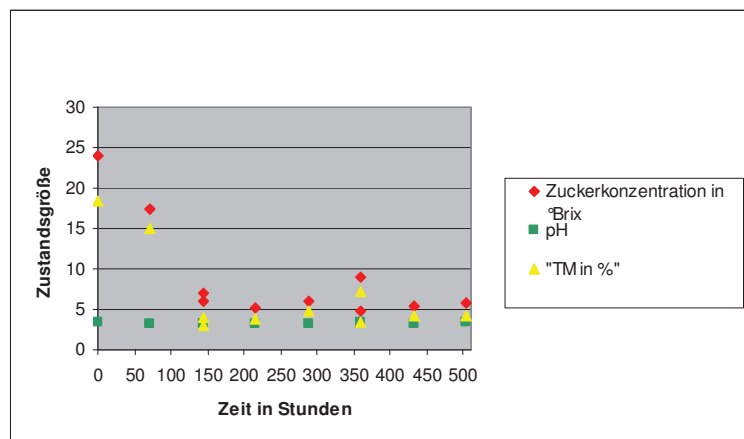


Abbildung 22: Entwicklung verstoffwechselbarer Stoffe Versuch 6

Zwischen Stunde 200 und 300 stagnieren diese Zustandsgrößen. Zuckerabbau und verdunstungsbedingte Zuckeranreicherung stehen in diesem Zeitraum also im Gleichgewicht.

Ab der 350. Stunde beginnt dann die Anreicherung der Zuckerkonzentration. Die Graphiken 16-18 zeigen deutlich, wie die Zuckerkonzentration stetig steigt. Wie im Punkt 5.4 beschrieben wurde, ist dies auch jener Zeitraum, in dem die Ausbildung der Kahmhaut stattfand und somit die acidogene Fermentation initiiert wurde. Hier ist die Phase der Zuckerfermentation abgeschlossen und die Phase der Zuckeranreicherung, welche den charakteristisch hohen Zuckergehalt und die hohe Viskosität des ABT ausmacht, beginnt. Dies lässt darauf schließen, dass zu diesem Zeitpunkt entweder die Zuckerkonzentration ein Niveau erreicht hat, das zu einem zu hohen osmotischen Druck führt oder, und das ist hier wahrscheinlicher, die einsetzende Essigsäurefermentation hat hier bereits eine Essigsäurekonzentration entstehen lassen, die den mikrobiologischen Zuckerabbau hemmt oder verhindert. Das Diagramm, das den Fermentationsprozess von Versuch 1 zeigt, weicht in Bezug auf diese Tendenz leicht ab, denn hier ist die Anfangszuckerkonzentration noch nicht überschritten. Auch in der dritten Fermentationswoche sinkt der Zuckergehalt noch leicht ab. Es findet also immer noch eine Fermentation des enthaltenen Zuckers statt. Da es sich hier um das spontan fermentierte Traubensaftkonzentrat handelt, ist zu vermuten, dass die enthaltenen Mikroorganismen auch unter erhöhtem Zucker- und Essigsäuregehalt ihren Stoffwechsel aufrecht erhalten können und damit der Reinzuchtheife überlegen sind.

Die Referenzversuche 2, 3 und 5, bei denen der Verdunstungsverlust mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde, zeigen alle das gleiche Verlaufprofil. Abbildung 19 zeigt den Verlauf der Änderung der Zustandsgrößen von Versuch 2, welcher repräsentativ für die Versuche 3 und 5 ist. Es ist zu beobachten, dass in der ersten



**Abbildung 23: Entwicklung verstoffwechselbarer Stoffe Versuch 2**

Fermentationswoche ein ausgeprägter Abbau des enthaltenen Zuckers stattfindet, welcher sich in der Abnahme der Brix-Grade und der Trockenmasse manifestiert. Dabei ist der Zuckerabbau stärker ausgeprägt, als die Zunahme, die durch die Verdunstung eingetreten wäre. Zusätzlich sorgt die Zugabe von destilliertem Wasser nach 150 und 300 Stunden für eine weitere Abnahme der Konzentration an gelösten Stoffen. Mit der Zugabe des destillierten Wassers wurde der Flüssigkeitsspiegel wieder auf das Ausgangsfüllvolumen erhöht. Dabei wurde deutlich, wie stark die Zuckerfermentation ausgeprägt ist. Denn mit der

Zuckerkonzentration des aufgefüllten Fermentationsgefäßes wird die tatsächliche Abnahme der Zuckerkonzentration im Vergleich zum Ausgangsrohstoff erst deutlich. Eine wichtige Information ist das Ansteigen der Zuckerkonzentration ab der 300. und 500. Fermentationstunde, denn dadurch wird klar, dass die Beendigung der Zuckerfermentationsphase auch hier, trotz geringer Zuckerkonzentration, eingetreten ist. Somit wurde die Zuckerfermentation nicht durch steigende Zuckerkonzentration inhibiert, sondern durch die Initiierung der acidogenen Fermentation.

In Bezug auf die Zustandsgrößen Ethanol- und Essigsäurekonzentration bestätigt sich ebenfalls die Zwei-Phasen-Hypothese. Die Zuckerfermentation ist in der ersten Woche nicht abgeschlossen. Dies ist daran zu erkennen, dass die Ethanolkonzentration in den ersten 72

Stunden leicht steigt. Dabei gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass das Maß an Zuckerfermentation nicht übereinstimmend mit der Zunahme der Ethanolkonzentration ist. Während die Zuckerkonzentration in der ersten Phase stark sinkt, steigt die Ethanolkonzentration nur unwesentlich. Es gilt also zu

vermuten, dass aufgrund der offenen Fermentation ein aerobes Milieu zu einer vollständigen Oxidation des Zuckers führte. Die Konzentration der Essigsäure beginnt ab der 150. Fermentationsstunde leicht zu

steigen. Diese Beobachtung bekräftigt die obige Aussage, dass die Zuckerfermentation mit einsetzender Essigsäuregärung zum Erliegen kommt. Mit der sichtbaren Ausbildung der Kahmhaut zwischen den Tagen 6 bis 9 beginnt die Ethanolkonzentration stark zu sinken. Entsprechend stark steigt die Essigsäurekonzentration. Es ist ferner zu sehen, dass die

Durchführung der zweiten Travaso bei den Versuchen, die mit vergorenem Konzentrat aufgefüllt wurden, zu einer kurzzeitigen Verminderung der Essigsäurekonzentration und einer Erhöhung der Ethanolkonzentration führt. Im Verlauf der folgenden Fermentationswoche kommt es dann wieder zu einer Abnahme der Ethanolkonzentration und einer noch stärkeren

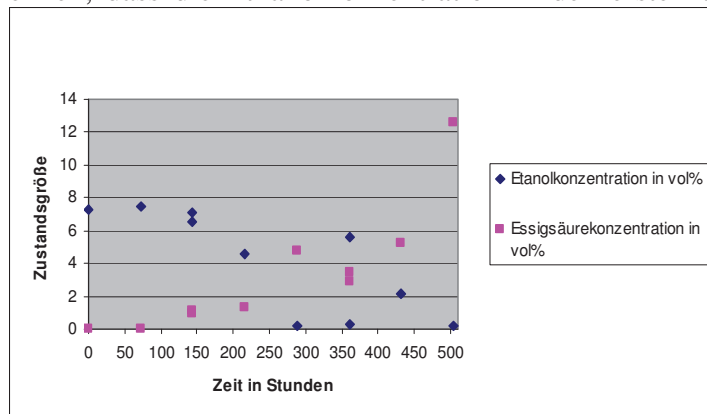


Abbildung 24: Fermentationsverlauf von Versuch 1

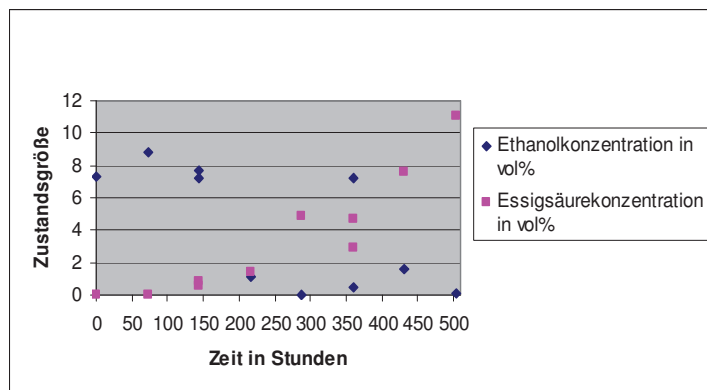


Abbildung 25: Fermentationsverlauf von Versuch 4

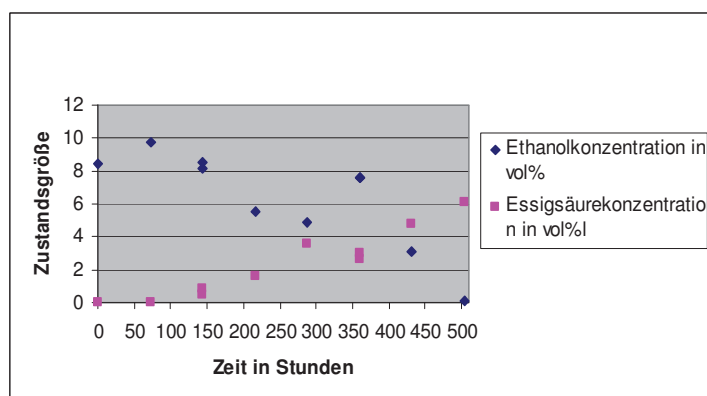


Abbildung 26: Fermentationsverlauf von Versuch 6

Zunahme der Essigsäurekonzentration. Dieses Verhalten ist nach der ersten Travaso nicht zu beobachten. Dies ist damit zu begründen, dass die Alkoholkonzentration des zugegebenen Konzentrates dem des Inhalt der Fermentationsgefäße gleich ist. Auch bei der Essigsäurekonzentration zeigen sich, aufgrund der ohnehin sehr geringen Konzentration, kaum Unterschiede. Es ist ferner festzustellen, dass die acidogene Fermentation des enthaltenen Ethanol zu Essigsäure bei vollständiger Ausbildung der Kahmhaut nicht länger als eine Woche benötigt. Des Weiteren ist zu beobachten, dass die Entwicklung der Essigsäurekonzentration aller drei Versuchsansätze recht ähnlich verläuft. Die Entwicklung der Ethanolkonzentration hat ebenfalls ein vergleichbares Entwicklungsprofil. Der Vergleich von Versuch 1 und 4 zeigt, dass die Entwicklung der Essigsäure sowohl in Bezug auf die Höhe der Essigsäurekonzentration, als auch in Bezug auf die Essigsäurebildungsrate starke Übereinstimmungen aufweist. Beide Gefäße wurden mit der angezüchteten ABT-Essigmutter angeimpft. Versuch 6 dagegen wurde mit der Arauner-Essigmutter angeimpft. Dieser Versuch zeigt ein abweichendes Fermentationsverhalten, welches sich in langsamerer Abnahme der Alkoholkonzentration und niedrigerer Essigsäureausbeute manifestiert. Es zeigt sich also, dass ein wild vergorenes Traubenmostkonzentrat eine längere Zuckerfermentation aufweist und die ABT-Essigmutter eine größere Geschwindigkeit in Bezug auf Ethanolabbau und Essigsäureaufbau zeigt.

Die Ethanolkonzentration jener Fermentationsbehälter, die mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurden, beträgt eingangs 8 Vol.% und steigt durch die anfängliche alkoholische Gärung auf über 10 Vol.% an. Mit Entstehung der Kahmhaut sinkt die Ethanolkonzentration dramatisch ab. Die Essigsäurekonzentration steigt analog; jedoch zeitlich versetzt. Die Fermentation

beginnt, wie auch in den oben beschriebenen Ansätzen, mit einer Zunahme der Ethanolkonzentration. Abbildung 19 zeigt, dass gleichzeitig die Zuckerkonzentration sinkt. Da bis zu diesem Zeitpunkt die

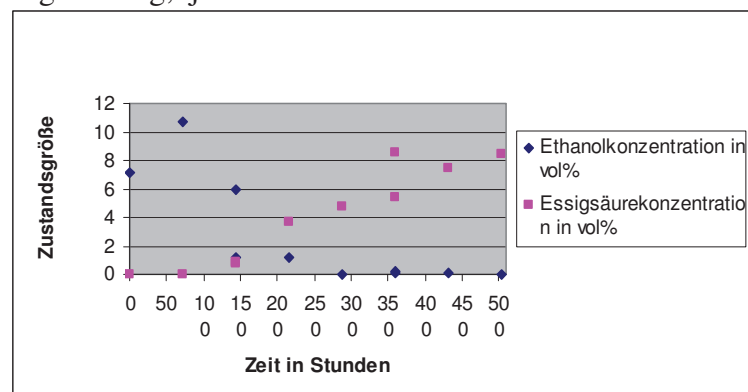


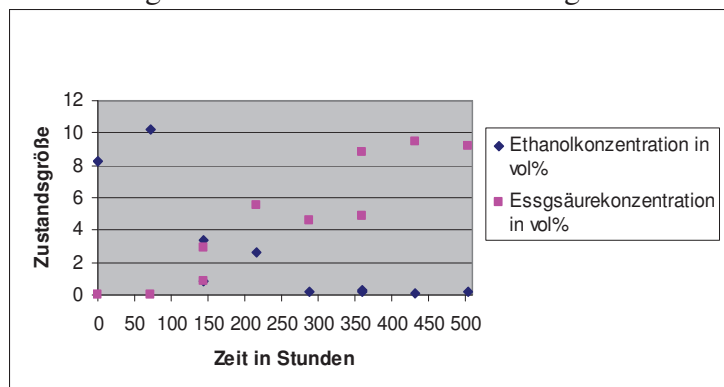
Abbildung 27: Fermentationsverlauf von Versuch 2

Prozessführung bei allen Versuchen gleich ist, war dieses Verhalten zu erwarten.

Es ist ferner zu beobachten, dass die Ethanolkonzentration durch die mit destilliertem Wasser durchgeführte Travaso deutlich absinkt und anschließend auch nicht mehr steigt. Auch die

Essigsäurekonzentration ist nach der Durchführung der zweiten Travaso, aufgrund von Verdünnung mit destilliertem Wasser, ebenfalls signifikant gesunken.

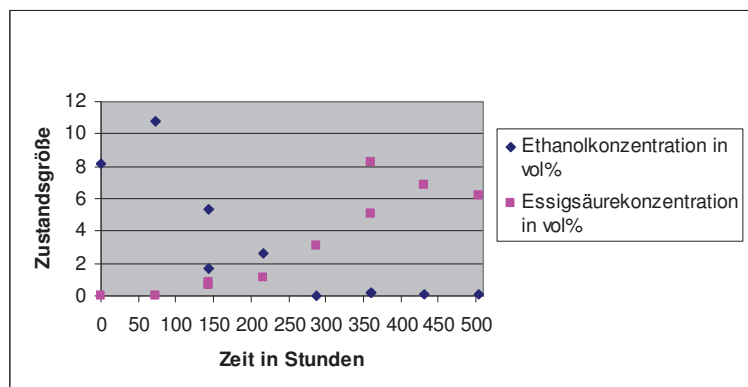
Paradox ist jedoch der Vergleich der Entwicklung der Konzentrationen von Essigsäure und Ethanol, die allen drei Versuchen gemein ist. So steigt die Essigsäurekonzentration erst, als die Alkoholkonzentration ihrem Tiefpunkt bereits sehr nahe gekommen ist und erreicht dennoch sehr hohe Werte. Da jedoch zu



**Abbildung 28: Fermentationsverlauf von Versuch 3**

als auch Zucker als mögliche Substrate bereits fast vollständig verzehrt sind, ist die Integrität dieser Messungen fraglich. Aus diesem Grund müssen diese Versuche als Fehlversuche gewertet werden und können keinen weiteren Aufschluss über die Prozesse, die ohne Konzentratzugabe ablaufen, geben.

Im Allgemeinen ist allen Versuchsansätzen gemein, dass die Essigsäuregärung und die alkoholische Gärung ineinander übergehen und sich teilweise überlagern. Es kommt anfangs zu einer starken Fermentation, während derer Hefen und Essigsäurebakterien tatsächlich simultane Fermentationsaktivitäten zeigen. Mit zunehmender



**Abbildung 29: Fermentationsverlauf von Versuch 5**

Essigsäurekonzentration wird dann die Hefeaktivität vermindert. Die Essigsäurefermentation zeigte gegen Versuchsende noch keine Veränderungen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass auch sie mit der Auflösung der Kahlhaut (siehe Punkt 5.4) zum Erliegen kam.

## 6. Diskussion

Der zentrale Leitfaden dieser Arbeit war es, Transparenz in den, durch die „Poesia“ stark verzerrten Herstellungsprozess des ABT zu schaffen und dabei die im Einleitungsteil beschriebenen Angaben zu verifizieren und dabei „Poesia“ und Wissenschaft in Einklang zu bringen. Besonders stand dabei im Fokus herauszufinden, welche Prozesse während der Balsamessigherstellung stattfinden und wann sie wiederum inhibiert werden. Die Hypothese war es, dass zu Beginn der Herstellung ein alkoholhaltiges Substrat in die Fässer gegeben wird, welches trotz großer Zuckerkonzentration einer Essigsäurefermentation unterzogen wird. Aus den durchgeführten Versuchen ging hervor, dass die hohe Zuckerkonzentration weder bei der Vorfermentation des Traubensaftkonzentrates, noch bei der acidogenen Fermentation im Hauptprozess, eine Hürde darstellt. Beide Biotransformationsprozesse konnten ohne Einschränkung durchgeführt werden. Damit wurde bereits die erste Angabe, die es zu verifizieren gab, bestätigt. Es gibt jedoch auch Angaben von Herstellern, die den Traubenmost während der Cottura noch deutlich stärker konzentrieren. Inwiefern bei einem noch stärker konzentrierten Most der Stress auf die Mikroorganismen derart hoch wird, dass die Stoffwechselaktivität zum Erliegen kommt, wurde in dieser Versuchsanordnung nicht verifiziert.

Welche Prozesse während der Herstellung stattfinden, konnte anhand des nachgestellten Herstellungsverfahrens ermittelt werden. So wurde der ablaufende Prozess im betrachteten Zeitraum in zwei Phasen unterteilt. Die erste Phase zeichnete sich durch ausgeprägte Zuckerfermentation aus, in der jedoch nur geringe Mengen Ethanol entstanden. Da es sich um Fermentationsgefäße mit niedrigem Flüssigkeitsspiegel handelte, die einer offenen Luftzirkulation ausgesetzt waren, ist es wahrscheinlich, dass hier keine alkoholische Gärung stattfand, sondern eine vollständige Oxidation des enthaltenen Zuckers. In der ersten Phase fand kaum eine acidogene Fermentation statt. Da diese erst in der zweiten Phase ein ausgeprägtes Maß annahm, befanden sich die entsprechenden Mikroorganismen in der ersten Phase vermutlich noch in der Adaptionphase, in der sie sich vermehrten und an die Milieubedingungen anpassten. Die erste Phase endete schließlich durch die Ausbildung der Kahlhaut auf der Flüssigkeitsoberfläche. Ab diesem Zeitpunkt begann die zweite Phase. Sie ist durch eine starke Zunahme der Essigsäurekonzentration und eine starke Abnahme der Ethanolkonzentration, sowie durch eine Anreicherung des Zuckers gekennzeichnet. Die Zuckeranreicherung ist mit der Inhibierung der Zucker abbauenden Mikroorganismen zu erklären, welche mit der einsetzenden acidogenen Fermentation ihre Stoffwechselaktivität

einstellen. Beide Phasen gingen ineinander über, sodass es im Anfangsstadium der Fermentation tatsächlich zu einer simultanen Umwandlung von Zucker zu Ethanol kam und einer Umwandlung von Ethanol zu Essigsäure. Diese zeitgleich ablaufende zweistufige Fermentation findet jedoch vermutlich nur in der Anfangsphase statt, da eine Abnahme der Zuckerkonzentration zu einem späteren Zeitpunkt nur noch in Versuch 1 nachgewiesen werden konnte. Eine vollständige Inaktivierung der Zucker fermentierenden Mikroorganismen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, da die Plattenausstriche vereinzelt Mikroorganismen zeigten, die keinen Vorhof bildeten. Besonders Versuch 1 deutete darauf hin, dass die Mikroorganismen des spontan vergorenen Konzentrates die erste Phase deutlich länger aufrecht erhalten konnten, denn hier ist auch zum Versuchsende noch ein signifikanter Abbau des enthaltenen Zuckers messbar gewesen. Zur weiteren Bestätigung hätten die Versuche einer längeren Betrachtung unterzogen werden müssen, um zu ermitteln, wie sich insbesondere die Population der Hefen in Versuch 1 nach deutlich längerer Zeit entwickelt. Vergleicht man das nachgestellte Verfahren, mit einer Fermentationszeit von 3 Wochen, mit dem traditionellen Verfahren, welches mindestens 12 Jahre benötigt, wird deutlich, dass anhand der Versuche nur auf die zu Beginn der Herstellung des ABT ablaufenden Prozesse geschlossen werden kann. In Bezug auf die im späteren Prozess ablaufenden Reaktionen und deren Kinetik konnten nur unvollständige Ergebnisse erzeugt werden. Bevor die Phase der Überkonzentrierung des Zuckers eintreten konnte, die vermutlich dazu geführt hätte, dass auch die Säurebildner in ihrer Stoffwechselaktivität nach und nach inaktiviert worden wären, musste der Versuch aus zeitlichen Gründen abgebrochen werden. Deshalb wurde zum Ende der Versuche nur eine Zuckerkonzentration erreicht, die unwesentlich höher war, als die Eingangszuckerkonzentration. Dennoch konnte vermutlich das Ablaufprofil der ersten Herstellungsphase des ABT nachgestellt werden. Es stellt sich dennoch die Frage, was nach der aktiven Fermentationsphase in den Fässern der Bacteria geschieht. Denn betrachtet man die durchgeführten Versuche, so ist zu sehen, dass nach einer Woche der enthaltene Alkohol annähernd vollständig verstoffwechselt ist. Im traditionellen Herstellungsverfahren finden jedoch nur jährlich Umfüllaktivitäten statt. Da auch in der Acetaia besonders in der warmen Jahreszeit hohe Temperaturen erreicht werden, ist vermutlich auch die Stoffwechselaktivität in den Fässern ähnlich stark ausgeprägt, wie in den Versuchen. Deshalb stellt sich die Frage, was nach der Beendigung der acidogenen Fermentation geschieht. Diese Frage bezieht sich auf den gesamten verbleibenden Prozess, denn das nachgestellte Verfahren unterscheidet sich in einem Punkt fundamental von dem angewendeten Verfahren. Hier wird nicht regelmäßig alkoholhaltiges Substrat zugegeben. Es

wird der Inhalt der vorherigen Fässer zugegeben, in denen ebenfalls bereits die acidogene Fermentation stattgefunden hat. Das bedeutet, sofern auch nur annähernd eine ähnliche Reaktionskinetik stattfindet, wie in den durchgeführten Versuchen, fehlt bereits im 2. Fass der Bateria der Alkohol als Substrat für die Essigsäuregärung. Deshalb stellt sich die Frage, wie dort eine weitere Fermentation stattfinden kann. Eine mögliche Erklärung ist, dass bei der traditionellen Herstellung in Italien weitere Mikroorganismen an der Herstellung beteiligt sind, deren Anzucht in den Vorversuchen missglückt ist. Während die Zucker fermentierenden Mikroorganismen in den Versuchansätzen durch die steigende Essigsäurekonzentration weitgehend inhibiert wurden, könnten diese „unbekannten“ Mikroorganismen in der Lage sein, fortfahrend Ethanol produzieren oder eine direkte Umwandlung von Zucker zu Säure durchführen. In diesem Fall würde es sich nicht um eine aerobe acidogene Fermentation handeln, sondern um eine anaerobe acidogene Fermentation. Es ist aber ebenfalls möglich, dass im weiteren Verlauf der Herstellung keine weitere Essigsäure mehr produziert wird und der Essigsäuregehalt des Endproduktes bereits im ersten Zyklus der Herstellung eingestellt wird. Reine Essigsäure besitzt einen Siedepunkt von 118°C und einen Dampfdruck bei 20°C von 16 hPa. Reines Wasser dagegen hat einen Siedepunkt von 100°C und einen Dampfdruck bei 20°C von 23,37 hPa (Cheung, 2005). Damit ist klar, dass bei fortfahrender Verdunstung keine Abnahme der Essigsäurekonzentration stattfindet, sondern eher eine Anreicherung. Dem entsprechend könnte die Hypothese zutreffen, dass die mikrobiologisch eingestellte Essigsäurekonzentration schon in der ersten Herstellungsphase abgeschlossen ist. Während der im weiteren Prozess stattfindenden Verdunstung verdunsten dann Essigsäure und Wasser in einem Verhältnis, das mehr Wasser als Essigsäure enthält und deshalb trotz steigender Zuckerkonzentration der relative Essigsäuregehalt aufgrund von Anreicherung nicht sinkt.

Auch die mikrobiologischen Untersuchungen führten zu einer vermehrten Transparenz während der ABT-Herstellung. Es hat sich gezeigt, dass tatsächlich eine Essigmutter aus fertigem ABT hergestellt werden kann. Die Plattenausstriche nach unterschiedlichen Zeitintervallen der Bebrütung zeigten deutlich, wie die Zellzahl im hergestellten Ansatz stetig stieg. So waren in der Anfangsphase in den angesetzten Reagenzglasproben (siehe dazu Punkt 4.1) keine vegetativen Mikroorganismen nachweisbar. Die Zellzahl stieg jedoch stetig mit vergehender Zeit. Die Prozess begleitenden Plattenausstriche zeigten, dass überwiegend *Acetobacteriaceae* nachweisbar waren, die auf Kreide-Agar zu transparenten Vorhöfen führten. Ferner konnte ergründet werden, dass es tatsächlich mehrere Mikroorganismenarten sind, die während der ABT-Herstellung die Fermentation des Ethanol zu Essigsäure

durchführen. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass bei den Säure bildenden Mikroorganismen ein Hauptkeim vorhanden ist, der zahlenmäßig den beiden anderen Mikroorganismenarten deutlich überlegen ist und somit vermutlich auch den größten Teil der Stoffwandlungsprozesse durchführt. Der Vergleich von Versuch 4 und 6, welche sich darin unterscheiden, dass Versuch 4 mit der ABT-Essigmutter angeimpft wurde und Versuch 6 mit der Arauner-Essigmutter angeimpft wurde, zeigt, dass tatsächlich aufgrund unterschiedlicher Essigmuttern auch ein unterschiedlicher Fermentationsverlauf stattfand. So zeigte Versuch 4 einen schnelleren Abbau der Ethanolkonzentration und eine höhere Essigsäureproduktion. Somit ist bestätigt, dass im ABT tatsächlich extremophile Mikroorganismen vorhanden sind, die deutlich besser an die extremen Milieubedingungen der Versuchsansätze angepasst sind. Die Mikroskopie bekräftigte die Unterschiede beider Essigmuttern dahingehend, dass andere Mikroorganismen zu beobachten waren. Auch die enthaltenen Mikroorganismen im vergorenen Traubensaftkonzentrat zeigten unterschiedliche Eigenschaften. So zeigte sich, dass die Zucker fermentierenden Mikroorganismen im spontan vergorenen Konzentrat deutlich besser an die Milieubedingungen angepasst sind, weshalb hier die erste Phase auch zum Ende der Versuche nicht vollständig abgeschlossen ist. Mit diesen Ergebnissen ist demnach bestätigt, dass durch die spontane Fermentation von Traubenmostkonzentrat und auch in der Bacteria eine Mikroorganismenflora entsteht, die einer gesteuerten Mikroorganismenflora überlegen ist. Eine verlässliche Identifikation der enthaltenen Mikroorganismen konnte jedoch mit den angewendeten Techniken nicht durchgeführt werden. Es konnte lediglich gezeigt werden, wie die ausgebildeten Kolonien aussehen und ob es sich um Säurebildner oder Nicht-Säurebildner handelt. Die Mikroskopie ermöglichte zusätzlich die Morphologie der Mikroorganismen auf zellulärer Ebene zu überprüfen und erbrachte dabei das Ergebnis, dass die enthaltenen Organismen sich zum Teil deutlich in Größe und Form unterscheiden. So war es möglich aufzuzeigen, dass große stäbchenförmige und ellipsenförmige Organismen zu finden sind und solche die um ein Vielfaches kleiner sind und eher kokkenförmige Erscheinungsbilder haben. Eine qualifizierte taxonomische Zuordnung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Dadurch ist ebenfalls die Möglichkeit nicht auszuschließen, dass während der langen Anzuchtphase und während des offenen Fermentationsprozesses Mikroorganismen aus der Luft in die Versuchsansätze gelangten und deshalb möglicherweise ein Teil der enthaltenen Mikroorganismen nicht aus dem ABT stammen, sondern aus der Umgebungsluft. Diese Form der Animpfung wird schließlich auch von den italienischen Essigwinzern als standardmäßige Beimischung ihres Traubenmostkonzentrates genannt.

Abschließend ist dieses Projekt als Teilerfolg zu betrachten. Es konnte ein hohes Maß an Transparenz in der ersten Phase der ABT-Herstellung geschaffen werden. Dennoch wurden viele weitere Unklarheiten aufgedeckt, die einer weiteren Prüfung unterzogen werden müssen. Für die erweiterte Schaffung von Transparenz kann bei erneuten Versuchen auf die Referenzversuche mit Reinzuchtessigmutter verzichtet werden, da die Anzuchtung einer ABT-Essigmutter uneingeschränkt funktioniert hat. Bei weiterer Forschung ist besonders in den Fokus zu stellen, was nach der aktiven Fermentationsphase, in der Essigsäure produziert wird, passiert. Wie bereits beschrieben, verläuft die Phase sehr schnell ab. Das in den Versuchen 1, 4 und 6 erhaltene Produkt ähnelte dem ABT geschmacklich sehr stark, weshalb es zu ergründen gilt, wie stark der Einfluss von weiterer Reifung ist. Ebenfalls kann der Einfluss der verschiedenen Hölzer betrachtet werden. Es wäre möglich, dass diese weiteren Versuche in Ergebnisse münden, die eine ABT-Herstellung ermöglichen, die bei weitem nicht so zeitaufwändig ist, wie das traditionelle Verfahren. Der Fokus kann auch auf die genaue Identifikation der enthaltenen Mikroorganismen gelegt werden, um zu klären welcher Gattung sie angehören. Für diesen Anspruch wäre eine DNA-Sequenzierung durchzuführen, welche eine exakte Zuordnung der Kolonien zu den entsprechenden Mikroorganismen möglich macht. In jedem Fall birgt der ABT einige ungeklärte Fragestellungen, deren wissenschaftliche Beantwortung bisher noch nicht erfolgt ist.

## 7. Zusammenfassung

Diese Ausarbeitung hatte zum Ziel mehr von Transparenz während der Herstellung des Aceto Balsamico Tradizionale zu schaffen. Diesem Anspruch konnte während dieses Projektes gerecht werden. Es wurde erfolgreich eine Essigmutter aus einem Aceto Balsamico Tradizionale angezüchtet und in einem abgewandelten und stark beschleunigt nachgestellten Verfahren zur Herstellung eines Balsamessigs verwendet. Dabei wurden die beteiligten Mikroorganismen untersucht. Hier war es möglich die Mikroorganismen grob durch Stoffwechsellistung und morphologische Eigenschaften in 5 Kategorien einzuteilen. Während der nachgestellten Herstellung wurde die Entwicklung der an der acidogenen Fermentation beteiligten Stoffe (Zucker, Ethanol, Essigsäure) refraktometrisch und mit Enzymtestkits nachvollzogen. Anhand der Entwicklung der gelösten Stoffe im Verlauf des Prozesses konnte ermittelt werden, wie sich deren Konzentration während der Herstellung im ersten Zyklus entwickelt. Es stellte sich heraus, dass anfangs eine Zuckerfermentationsphase eintritt, die dann in eine acidogene Fermentation übergeht. Beide Phasen verlaufen über einen gewissen Zeitraum simultan. Besonders stand im Fokus die „Poesia“ mit der Wissenschaft in Einklang zu bringen. Dabei stellte sich heraus, dass die „Poesia“ und Wissenschaft in vielen Bereichen vereinbar sind. Eine Essigmutter die aus einem ABT hergestellt wurde, zeigt ein deutlich stärker ausgeprägtes acidogenes Fermentationsverhalten. Es wurde auch ermittelt, dass ein spontan vergorenes Traubensaftkonzentrat Mikroorganismen beherbergt, die besser an die Milieubedingungen angepasst sind, als jene die in Reinzuchtpräparaten erhältlich sind. Damit ist die Anwendung ungesteuerter Substratbeimpfung, trotz geringer Kontrolle, gerechtfertigt. Es stellte sich ferner heraus, dass nicht die steigende Zuckerkonzentration die Zuckerfermentation zum Erliegen bringt, sondern die acidogene Fermentation. Es konnten jedoch keine Grenzen der acidogenen Fermentation festgestellt werden, da diese keine Veränderungen bis zum Versuchsende zeigte. Des Weiteren wurden zahlreiche weitere Daten erzeugt, die besonders in der Anfangsphase der ABT-Herstellung den eigentlichen Fermentationsprozess und die Ablaufmodalitäten erklären. Somit stellt diese Arbeit einen breit gefächerten ersten Versuch dar, die Mystifizierung des Aceto Balsamico Tradizionale, die durch „Poesia“ entstand zu entschlüsseln.

## 8. Literaturverzeichnis

- (1) Antonelli, A.; Zeppa, G.; Gerbi, V.; Carnacini, A.: Polyalcohols in vinegar as an origin discriminator. Bologna: Elsevier Science, 1997
- (2) Baumgart, Jürgen: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Hamburg: Behr, 2009
- (3) Beyer Irmtraut, Bickel Horst, Gropengießer Harald, Kluge Siegfried, Knauer Bernhard, Kronberg Inge, Krull Hans-Peter, Lichtner Hans-Dieter, Schneeweiß Horst, Ströhla Gerhard, Tischer Wolfgang: Natura Biologie für Gymnasien. 3.Aufl. Stuttgart, Leipzig: Ernst Klett Schulbuchverlag, 2009
- (4) Biopharm: Beipackzettel: Essigsäure (Acetat) UV-Test zur Bestimmung von Essigsäure in Lebensmitteln und anderen Probematerialien. Darmstadt: Roche, 2014.
- (5) Biopharm: Beipackzettel: Ethanol UV-Test zur Bestimmung von Ethanol in Lebensmitteln und anderen Probematerialien. Darmstadt: Roche, 2014.
- (6) Cypionka, Heribert: Grundlagen der Mikrobiologie.4.Aufl. Berlin : Springer, 2003
- (7) Guidici, Paolo; Gullo, Maria: Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. Reggio Emilia: Elsevier Science, 2008
- (8) Guidici, Paolo; Gullo, Maria, De Vero, Luciana: Succession of selected strains of acetobacter pasteurianus and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. Reggio Emilia: Elsevier Science, 2008
- (9) Guidici, P.; Landi,S.; De Vero, L.; Solieri, L.: molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vibegar. Reggio Emilia: Elsevier Science, 2006
- (10) Hosea Cheung, Robin S. Tanke, G. Paul Torrence: Acetic Acid. Wiley-VCH, Weinheim 2005.
- (11) Klein, Günther: Mikrothek : Bildatlas Mikrobiologie; Auswertung und Beurteilung. Hamburg: Behr, 2007
- (12) Leboffe, Michael J.; Pierce, Burton E.: A photographic atlas for the microbiology laboratory. 2. Englewood : Morton Publ. Comp, 1999
- (13) Merkle, Rolf: Aceto Balsamico Traditionale. Mannheim: PAL Verlagsgesellschaft, 2002
- (14) Montville J. Thomas, Matthews R. Karl, Kniel E. Kalmia: Food Microbiology an Introduction. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2005
- (15) San Chiang Tan: Vinegar Fermentation. Louisiana: University of Louisiana at Lafayette, 2005

(16) Steinbüchel, Alexander: Mikrobiologisches Praktikum. Berlin: Springer, 2003

(15) Tesfaye, W; Morales, M.L.; Garcia-Parilla, M.C.: Wine Vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. Sevilla: Elsevier Science, 2002

### **Internetquellen**

(1) Irmischer, Almut: Aus Most und Zeit: Balsamico. Sempre Italia GmbH, 2014. [www.sempre-italia.de/service/feuilleton/aus-most-und-zeit-balsamico-2005-2.xhtml](http://www.sempre-italia.de/service/feuilleton/aus-most-und-zeit-balsamico-2005-2.xhtml). 21.02.2014

(2) Kommission der europäischen Gemeinschaft: Verordnung (EG) Nr. 813/2000 des Rates zur Ergänzung des Anhangs der Verordnung (EG) Nr. 1107/96 der Kommission zur Eintragung geographischer Angaben und Ursprungsbezeichnungen gemäß dem Verfahren nach Artikel 17 der Verordnung (EWG) Nr. 2081/92. 17.04. 2000; <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:100:0005:jh0006:DE:PDF>. 21.02.2014

(3) Kommission der europäischen Gemeinschaft: Verordnung (EG) Nr. 583/2009 der Kommission zur Eintragung einer Bezeichnung in das Verzeichnis der geschützten Ursprungsbezeichnungen und der geschützten geografischen Angaben (Aceto Balsamico di Modena (g.g.A.)). 03.07.2009 <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:175:0007:0011:DE:PDF>. 21.02.2014

(4) Oliceto: Aceto Balsamico di Modena I.G.P. [www.oliceto.de/Warenkunde/Balsamici-di-Modena](http://www.oliceto.de/Warenkunde/Balsamici-di-Modena). 18.12.2013

(5) Reade Ben: Experimental Balsamic. 29.03.2012. [www.nordicfoodlab.org/blog/2012/03/experimental-balsamic](http://www.nordicfoodlab.org/blog/2012/03/experimental-balsamic). 21.02.2014

(6) Wiechoczek, Dagmar: Bildungsserver für Chemie. Die biochemischen Hintergründe der Essiggärung. 2005. [www.chemieunterricht.de/dc2/essig/hac-17.htm](http://www.chemieunterricht.de/dc2/essig/hac-17.htm). 14.01.2014

## Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum Unterschrift