



RESOLUTION OIV-OENO 497-2013

HEFERINDENZUBEREITUNG – Kodex (Hefezellwände)

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

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

auf Vorschlag der Sachverständigengruppen „Mikrobiologie“ und „Spezifikationen önologischer Erzeugnisse“,

in Anbetracht der in der aktuellen veröffentlichten Monographie über "Hefezellwände" im Internationalen Önologischen Kodex,

BESCHLIESST, die im Internationalen Kodex angeführte Monographie bzgl. Heferinden durch folgende Monographie zu ersetzen:

HEFERINDENZUBEREITUNG (Hefezellwände)

1. GEGENSTAND, URSPRUNG UND ANWENDUNGSGBIET

Heferindenzubereitungen werden aus *Saccharomyces ssp*-Hefen gewonnen. Beim Herstellungsverfahren werden ihre Oberfläche und folglich ihr Adsorptionsvermögen berücksichtigt.

Heferindenzubereitungen sind als feines Pulver oder Mikrogranulate erhältlich; sie sind nicht hygroskopisch, cremefarben und weisen einen leichten Geruch auf. Sie hinterlassen in Traubenmosten und Weinen keine schädlichen Rückstände. Bei der Herstellung werden keine Antibiotika zugegeben, sondern lediglich Stoffe, die für das Wachstum der Hefe erforderlich sind.

Heferindenzubereitungen sind so zu verpacken, dass eine Oxydation verhindert wird.

Sie werden zur Vorbeugung und Behebung von Gärstockungen eingesetzt. Sie besitzen die Fähigkeit, bestimmte Fettsäuren (Octan- und Decansäure) zu binden, die die Permeabilität von Hefemembranen negativ beeinflussen.

Wenn Heferindenzubereitung aus gentechnisch veränderten Hefen stammt, müssen diese durch die zuständigen Behörden zugelassen worden sein.

Die Verwendung von Heferindenzubereitungen unterliegt einer Mengenbegrenzung.

*Beglaubigte Ausführung
Bukarest, den 7. Juni 2013
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

2. ETIKETTIERUNG

Das Etikett muss folgende Angaben enthalten:

- Name der Gattung und der Art
- Gebrauchsanleitung
- ggf. Zusatzstoffe
- Reinheit, Losnummer, Verfallsdatum, Aufbewahrungsbedingungen mit Angaben zu Temperatur, Feuchtigkeit und Belüftungsbedingungen
- Angabe, wenn die Heferindenzubereitung aus gentechnisch veränderten Hefen stammt und in diesem Fall Angabe der veränderten Eigenschaft

3. ZUSAMMENSETZUNG VON HEFERINDENZUBEREITUNG (WERTE)

Trockenmasse ≥ 94 % m/m gemäß der Methode in Anlage 2

Kohlenhydrate > 40 % m/m

Kohlenhydrate:

Der Gesamtgehalt an Glucanen und Mannanen muss gemäß der in der Anlage 1 beschriebenen Methode mehr als 60 % der Gesamtkohlenhydrate betragen.

Löslichkeit < 10 % m/v

4. ZUSATZ- UND INHALTSSTOFFE

nach den geltenden Rechtsvorschriften

5. GRENZWERTE UND UNTERSUCHUNGSVERFAHREN

5.1 Blei

Analyse gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode
Der Gehalt muss weniger als 2 mg/Kg betragen.

5.2 Quecksilber

Analyse gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode
Der Gehalt muss weniger als 1 mg/Kg betragen.

5.3 Arsen

Analyse gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode
Der Gehalt muss weniger als 3 mg/Kg betragen.

5.4 Cadmium

Analyse gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode
Der Gehalt muss weniger als 1 mg/Kg betragen.

*Beglaubigte Ausführung
Bukarest, den 7. Juni 2013
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

6. MIKROBIOLOGISCHE ANALYSEN

6.1 Lebensfähige Hefen

Auszählung gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode

Weniger als 100 pro g

6.2 Milchsäurebakterien

Auszählung gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode

Weniger als 10E3 KBE/g

6.3 Essigsäurebakterien

Auszählung gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode

Weniger als 10E3 KBE/g

6.4 Schimmelsporen

Auszählung gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode

Weniger als 10E3/g

6.5 Salmonellen

Auszählung gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode

Prüfung des Nichtvorhandenseins mit 20 g Probe

6.6 Escherichia coli

Auszählung gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode

Prüfung des Nichtvorhandenseins mit 1 g Probe

6.7 Staphylokokken

Auszählung gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode

Prüfung des Nichtvorhandenseins mit 1 g Probe

6.8 Coliforme Bakterien

Auszählung gemäß der in Kapitel II des Internationalen Önologischen Kodex beschriebenen Methode

Weniger als 100 KBE/g

7. HYGIENE

Die Herstellung von Heferinden erfolgt gemäß der guten Herstellungspraxis.

Heferinden dürfen keinen ranzigen Geruch aufweisen oder dem Wein ein anormales Aroma verleihen (Hefegeschmack).

8. WIRKUNG

Die stimulierende Wirkung von Heferinden beruht auf ihrer Fähigkeit, Substanzen zu adsorbieren, die die Hefe in ihrer Wachstumsphase bildet und die für sie toxisch sind. Decansäure ist der stärkste Wachstumshemmer.

*Beglaubigte Ausführung
Bukarest, den 7. Juni 2013
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

Die technologische Wirksamkeit (TA) ausgedrückt in Gramm (g) Produkt kann daher durch die Adsorption von Decansäure bewertet werden:

1 g Hefezellrindenzubereitung, die in 100 ml alkoholischer Lösung (10 % vol.) mit einem pH-Wert = 3,5 gelöst wurde und 2 mg/l Decansäure enthält sollte nach 24 Stunden die zugesetzte Decansäure bei 18-22°C zu 50 % adsorbieren.

Die Prüfung kann durch Bestimmung von Decansäure mittels Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (FID) wie nachfolgend z.B. beschrieben:

- Gaschromatograph
 - polare Kapillarsäule z.B. FFAP, Länge 50 m, Innendurchmesser 0.2 mm
 - Träger, Fused Silica
 - Temperatur von 60 °C mit 4 °C/min auf 180 °C aufheizen
 - Injektionsvolumen 1 µl
- Injektion einer Lösung einer Heferindenzubereitung, die in Wasser/ Alkohol (10 % vol.) gelöst und mit 2 mg/l Decansäure behandelt wurde und als
- Interner Standard 2 mg/l Heptansäure enthält.
 - Standardlösung: Wasser-Alkohol-Lösung (10 % vol.) mit 2 mg/l Decansäure

9. AUFBEWAHRUNG

Heferindenzubereitungen sind in luftdicht verschweißten Beuteln in temperierter Umgebung aufzubewahren.

*Beglaubigte Ausführung
Bukarest, den 7. Juni 2013
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

Anlage 1

Bestimmung von Glucanen und Mannanen in Heferinden

Heferinden werden vor der Hydrolyse mit H_2SO_4 bei 128°C im Ofen durch Hydrolyse mit konzentrierter H_2SO_4 vorgelöst. Durch die vollständige Hydrolyse der Glucane und Mannane entstehen entsprechende Mengen Glucose und Mannose, die durch Ionenchromatographie bestimmt werden.

Zur Beseitigung des Glycogens muss die Probe mit NaOH-Lösung (0,5 mol/l) 1 Stunde bei Umgebungstemperatur vorgespült und anschließend zentrifugiert und mit Wasser gespült werden.

1. Material

- 100 ml Messkolben mit Verschluss (Schott Duran Glas)
- Reagenzglas
- Polyethersulfon Filter mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von $0.45\ \mu\text{m}$
- Ofen
- H_2SO_4 (72 %)
- Ionenchromatograph mit gepulst-amprometrischem Detektor und Goldelektrode
- Vortex- Mixer
- NaOH (32%)
- 100 ml und 50 ml Messkolben
- destilliertes Wasser
- Wasser, HPLC-Qualität
- Säule für die Ionenchromatographie (Metrosep Carb1 Metrohm oder gleichwertig)

2. Methode

• 2.1. Vorbereitung des Standards

- 50 mg Glucose und 50 mg Mannose abwiegen (das genaue Gewicht W_{glu} und W_{man} notieren),
- zu Punkt 3.3 übergehen.

• 2.2. Vorbereitung der Probe

- 50 mg Heferinde abwiegen (das genaue Gewicht W_y notieren),
- zu Punkt 3.3 übergehen.

• 2.3. Aufschluss mit H_2SO_4 konz

- 3,3 ml H_2SO_4 (72%) zugeben,
- den Inhalt des geschlossenen Reagenzglases auf einem Vortex-Mixer mischen,
- 1 Stunde bei Umgebungstemperatur ruhen lassen und alle 10 Minuten rühren.

*Beglaubigte Ausführung
Bukarest, den 7. Juni 2013
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

- **2.4. Saure Hydrolyse**
 - Den Inhalt des Reagenzglases in einen 100 ml Messkolben füllen,
 - 40 ml destilliertes Wasser zugeben,
 - den Messkolben verschließen,
 - den verschlossenen Messkolben in einen Ofen (128°C) stellen und 3 Stunden inkubieren,
 - den Messkolben herausnehmen und abkühlen lassen,
 - mit 8,112 ml NaOH (32%) neutralisieren,
 - den Inhalt des Messkolbens in 100 ml Messkolben dekantieren,
 - mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen,
 - die Lösung durch Acrodisc IC-Filter filtrieren.

- **2.5. Chromatographie**
 - 2.5.1. Vorbereitung der Standards
 - 2,5 ml der gemäß Punkt 2.4 erhaltenen hydrolisierten Glucose- und Mannose-Lösungen entnehmen,
 - in einen 50 ml Messkolben überführen,
 - mit destilliertem Wasser auffüllen,
 - in ein Probenfläschchen für den Probengeber füllen.
 - 2.5.2. Vorbereitung der Probe
 - 7,5 ml der gemäß Punkt 2.4 erhaltenen hydrolisierten Stoffe entnehmen,
 - in einen 50 ml Messkolben überführen, mit destilliertem Wasser auffüllen, in ein Probenfläschchen für den Probengeber füllen.
 - 2.5.3. Vorbereitung der mobilen Phase
 - 1 Liter Wasser (HPLC-Qualität) abmessen,
 - durch Membran (0,45 µm) filtrieren,
 - 1,5 Stunden durch Vakuum entgasen,
 - 7,57 ml NaOH (51%) in einen Messkolben für die mobile Phase füllen
! *Es sind ausschließlich Polypropylen-Kolben für die mobile Phase zu verwenden.*
 - 1 Liter entgastes Wasser zugeben,
 - mit Magnetrührer rühren.
 - 2.5.4. Kalibrierlösung für die Chromatographie
 - Mit Wasser (HPLC-Qualität) Glucose- und Mannose-Lösungen (10 mg/l, 30 mg/l und 40 mg/l) herstellen
 - und diese zur Kalibrierung in der Chromatographie verwenden.
 - 2.5.5. Chromatographische Bedingungen
 - Die Säule anhand mit der mobilen Phase bei einer Flussrate von 1ml/min für 2 Stunden konditionieren,
 - 20 µl der folgenden Lösungen einspritzen:
 - der drei Kalibrierlösungen (2.5.4.)
 - der Standardlösung
 - der Probenlösung

das System mit der Kalibrierlösung kalibrieren, Kalibrierkurven erstellen
 $Zone = f(\text{Konzentration})$

*Beglaubigte Ausführung
 Bukarest, den 7. Juni 2013
 Der Generaldirektor der OIV
 Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

Anzeige der Konzentrationen in mg/l für:

die Standardlösung:

Mannose-Konzentration in mg/l: CmanSt (mg/l)

Glucose-Konzentration in mg/l: CgluSt (mg/l)

die Probelösung:

Mannose-Konzentration in mg/l: CmanY (mg/l)

Glucose-Konzentration in mg/l: CgluY (mg/l)

3. Berechnung

• 3.1. Ermittlung der Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate für die Mannose- und Glucose-Standardlösungen wird wie folgt ermittelt:

$$Y_{man} = C_{manSt} \text{ (mg/l)} / W_{man} \text{ (mg)} \times 10 \times (2,5/50)$$

$$Y_{glu} = C_{gluSt} \text{ (mg/l)} / W_{glu} \text{ (mg)} \times 10 \times (2,5/50)$$

W_{man} und W_{glu} entsprechen den ermittelten Mengen von Mannose und Glucose in mg (siehe Punkt 2.1).

4. Mannan- und Glucan-Konzentrationen in Heferinden

Mannan-Konzentration in g%g:

$$C_{mannans} = 0,9 * [(C_{manY} \times (50 / 7,5)) / (W_y \text{ (mg)} \times 10)] * (1 / Y_{man})$$

Glucankonzentration in g%g:

$$C_{glucans} = 0,9 * [(C_{gluY} \times (50 / 7,5)) / (W_y \text{ (mg)} \times 10)] * (1 / Y_{glu})$$

W_y : Gewicht der Heferinden (siehe Punkt 2.2.)

Y_{man} und Y_{glu} : Wiederfindung von Mannose und Glucose (siehe Punkt 4.1.)

*Beglaubigte Ausführung
Bukarest, den 7. Juni 2013
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

Anlage 2

BESTIMMUNG DES ANTEILS DER UNLÖSLICHEN TROCKENMASSE

1- Prinzip

Bei der Analyse wird die Gesamttrockenmasse (TM) der Heferindenzubereitung mit der verbleibenden Trockenmasse (unlösliche TM) nach Spülung mit Warmwasser verglichen.

2- Material

Zentrifuge 4200 U/min und Zubehör

Waage, Genauigkeit 1/10 mg

Wiegestation für TM (FST 350)

Wärmeschrank 105 °C +/- 1 °C

3- DURCHFÜHRUNG

Herstellung des unlöslichen Teils der Heferindenzubereitung:

In ein Zentrifugengefäß ca. 10 g Heferindenzubereitung einwiegen, die zuvor im Trockenschrank bei 105°C bis zum konstanten Gewicht getrocknet wurde.

Genau abwiegen (M1),

in heißem Wasser (70 - 80 °C) suspendieren,

gut durchmischen,

10 Minuten zentrifugieren (4200 U/min),

Überstand verwerfen, erneut in heißem Wasser suspendieren und 10 Minuten (4200 U/min) zentrifugieren,

Vorgang dreimal wiederholen.

Das Zentrifugengefäß mit dem Bodensatz im Trockenschrank bei 105°C bis zum konstanten Gewicht trocknen und abwiegen. Das Gewicht (M2) der gespülten und getrockneten Hefezubereitung entspricht der unlöslichen Trockenmasse.

4- Berechnungen

Anteil der unlöslichen Trockenmasse

% unlösliche TM = $(M2/M1) \times 100$

*Beglaubigte Ausführung
Bukarest, den 7. Juni 2013
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI