

## Nachweis, Isolation und Charakterisierung nachtrübungsrelevanter Weinproteine sowie Verfahren zur Vermeidung von Eiweißtrübungen in Weinen und Traubensäften

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Hochschule Geisenheim Zentrum für Analytische Chemie und Mikrobiologie Institut für Weinanalytik und Getränkeforschung Prof. Dr. Helmut Dietrich/Prof. Dr. Frank Will
<b>Forschungsstelle II:</b>	Johannes-Gutenberg Universität Mainz Institut für Molekulare Biophysik Prof. Dr. Heinz Decker/Dr. Petra Fronk
<b>Industriegruppe:</b>	Verband Deutscher Sektkellereien, Wiesbaden  Projektkoordinator: Bernhard Idler, Württembergische Weingärtner-Zentral- genossenschaft eG, Möglingen
<b>Laufzeit:</b>	2011 – 2015
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 257.550,-- (Förderung durch BMWi via AiF)

### Ausgangssituation:

Das Auftreten von Eiweißtrübungen gehört zu den wirtschaftlich bedeutendsten Problemen der Wein- und Sektwirtschaft. Trotz vieler Anstrengungen ist die Ursache für diese Phänomene nicht vollständig geklärt. Bedingt durch die Klimaveränderung und wärmere Jahrgänge seit den 90er Jahren hat in Deutschland die Häufigkeit von Nachtrübungen zugenommen, was sich in einem deutlich erhöhten Bentonitbedarf und wirtschaftlichen Verlusten ausdrückt. In Most und Wein machen sich Trockenstress und Fäulnis u.a. durch steigende Kolloid- und Eiweißgehalte bemerkbar. Bisher gelingt der Abbau von Eiweißstoffen durch Proteasen nicht, was auf ungewöhnliche Eiweißstrukturen hindeutet.

Betroffen von einer Qualitätsminderung durch hohe Bentonitmengen sind v.a. Steillagen deutscher Anbaugebiete, in denen hohe Qualitäten geerntet werden. Momentan steht zur Entfernung von gelöstem Eiweiß aus Wein außer der Bentonitschönung keine technisch und rechtlich geeignete Alternative zur Verfügung. In Verbindung mit den von der insgesamt wärmeren Wit-

terung verursachten niedrigeren Gesamtsäurewerten und damit höheren pH-Werten resultieren daraus zurzeit ein erhöhter Schönungsbedarf speziell für Bentonit, denn dessen Wirksamkeit nimmt bei höheren pH-Werten ab. Die Bentonitschönung mit erhöhten Dosagen führt durch die gleichzeitige Abreicherung wertgebender Inhaltsstoffe zu sensorischen Qualitätsverlusten. In Rot- und Roséweinen führt dies hauptsächlich zum Farbverlust durch die Adsorption von Anthocyanen; in Weißweinen sind ebenfalls adsorptionsbedingt hauptsächlich Aromastoffe betroffen.

Die Aussagekraft der üblichen zur Bedarfsermittlung eingesetzten Stabilitätstests ist begrenzt. Die mangelnde Verlässlichkeit der Tests sowie die mangelnde Spezifität führt in der betrieblichen Praxis dazu, dass aus Sicherheitsgründen überschönt wird und Qualitätsminderungen für die Stabilität akzeptiert werden; oder es wird nicht geschönt und das Nachtrübungsrisiko in Kauf genommen. Eiweißtrübungen sind nach Untersuchungen der Forschungsstelle 1 die häufigsten Ursachen für die Instabilität von Weinen. Nachgetrübte Weine werden vom Verbraucher

generell abgelehnt und können den Kellereien enorme wirtschaftliche Probleme bereiten. Dazu gehören Rücksendungen privater Kunden bzw. Rückrufaktionen des Handels, die dann meist auch mit schwerwiegenden Imageschädigungen für den betroffenen Hersteller einhergehen.

Neben dem Auftreten von Trübungen ist auch der Verlust von Wein im Bentonittrub beachtlich. Nach einer Schätzung des australischen Weinforschungsinstitutes AWRI beträgt der globale Verlust an Weinvolumen durch Bentonitschönung mehr als 1 Mrd. US-Dollar pro Jahr. Die Kosten für den Anbau, die Ernte und Verarbeitung dieses „verlorenen Weines“ werden auf 80 - 250 Mio KWH und 36.000 - 225.000 Tonnen CO<sub>2</sub> geschätzt. Diese Zahl kann nicht ohne Weiteres anhand der Anbaufläche auf Deutschland umgerechnet werden, da in Deutschland der Bentonitbedarf höher ist als in vielen anderen Ländern.

Auch die Sektindustrie ist von dieser Problematik betroffen. Das bedeutet in der Praxis, dass die Grundweine vor der Versektung auf einen Bentonitbedarf von unter 50 g/hl geschönt werden. Die durch die Klimaerwärmung hervorgerufene Veränderung der Proteine in den Trauben hat einen sehr bedeutenden Einfluss auf die Sektherstellung: In trockenen Jahren nimmt der Proteingehalt stark zu, aber der Gehalt an für die Sektheferung zur zweiten Gärung notwendigen Aminosäuren stark ab. In der Tat gibt es in trockenen Jahren, insbesondere bei Weinen, welche von Trockenstandorten gewonnen werden, vermehrt Gärstörungen. Teilweise gären die Sekte aufgrund mangelnder Aminosäuregehalte nicht mehr durch. Gleichzeitig bilden sich Fehlgerüche, hervorgerufen durch den Hefestress unter mangelnder Aminosäureversorgung. Der wirtschaftliche Schaden ist hoch, insbesondere bei der klassischen Flaschengärung, da die Flaschen bei einer Gärstockung wieder entleert werden müssen und der Wein entwertet wird. Grund hierfür ist, dass der Wein durch die Saccharosezugabe weinrechtlich anschließend nur noch zur Versektung verwendet werden darf, wofür er aber nicht mehr dafür geeignet ist.

Ziele des Forschungsvorhabens waren, durch die Etablierung von präparativen Isolierungsmethoden für Proteine und die analytische Charakterisierung der nachtrübungsrelevanten Weinproteine die Struktur nachtrübungsrelevanter Weinproteine aufzuklären und Eiweißtrübungen zu vermeiden. Den Wein und Sekt herstellenden Betrieben sollten standardisierte und idealer-

weise automatisierbare Tests zur Ermittlung der Eiweißstabilität und des Bentonitbedarfs zur Verfügung gestellt werden, damit diese ihre Produkte optimal stabilisieren können. Der Einfluss verschiedener kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf die Eiweißstabilität sollte geklärt werden. Ferner sollten sowohl Weine aus authentischem Traubenmaterial als auch instabile Weine aus Import-/Exportkellereien untersucht werden, um mögliche Unterschiede der Proteinfractionen zu charakterisieren und auch die Sortenfrage zu klären.

#### Forschungsergebnis:

Im Rahmen der Untersuchungen zur Eiweißtrübung konnten in Zusammenarbeit mit dem Projektbegleitenden Ausschuss zahlreiche Aspekte, die Einfluss auf die Trübung nehmen können, überprüft und näher analysiert werden.

Seitens der Firmen des Projektbegleitenden Ausschusses wurden verschiedene Weine mit einem hohen Bentonitbedarf (bis zu 450 g/hL) zur Verfügung gestellt. Bei dem Vergleich der verschiedenen Isolationsmethoden mit diesen Proben zeigte sich die Verwendung der Ultrafiltration (UF) mit einem Membran-Cutoff von 10 kDa als beste Isolationsmethode der proteinhaltigen Kolloide. Der Vorteil dieser Isolationsmethode liegt in der Verarbeitung eines größeren Probenvolumens in kürzerer Zeit sowie der höheren Ausbeute im Vergleich zur Gelfiltration und Alkoholfällung. Die Überprüfung der Proteinzusammensetzung der mit verschiedenen Membrangrenzen (> 5 kDa und >10 kDa) ultrafiltrierten Proben wies keine Unterschiede im niedermolekularen Bereich um ca. 10 kDa auf.

Massenspektrometrische Analysen lieferten Erkenntnisse zur Proteinzusammensetzung verschiedener Weine, insbesondere zur Änderung der Proteinzusammensetzung nach der Schönung und in trockenem Wein im Vergleich zur unbehandelten Probe. Dabei wurden vorwiegend verschiedene Thaumatin-ähnliche Proteine (TLP) und Chitinasen aus der Traube gefunden, die bei der Schönung nahezu vollständig entfernt bzw. bei Trockenstress verstärkt exprimiert wurden. Durch die Betrachtung der molekularen Struktur einzelner dieser Proteine konnte die kompakte Struktur und die Stabilisierung über Disulfidbrücken dargestellt werden, was zusätzlich Hinweise auf deren Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau gibt. Die Aufreinigung einzelner Weinproteine mit Molekulargewichten von 20–25 kDa konnte erreicht werden.

In Weinen ist der Gehalt an Polysacchariden deutlich höher als der Proteingehalt, was das Trübungsverhalten der Proteine beeinflussen kann. Zur Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen mit Polysacchariden erfolgten Tests im Modell- und Echtweinsystem. Verschiedene Polysaccharide (Arabinogalactan, Rhamnogalacturonan, Gummi arabicum, Carboxymethylcellulose (CMC), Hefemannan) wurden diesen Systemen (Weinkolloid gelöst in Citratpuffer oder Weinpermeat aus der Ultrafiltration) in verschiedenen Verhältnissen zugesetzt. Die Ergebnisse der Untersuchungen im Modell- und Echtweinsystem zeigten deutliche Unterschiede. Während das Rhamnogalacturonan im Modellsystem zu einer Stabilisierung des Weins führte, was auch die Trübungsmessungen bestätigten, zeigte sich eher das Gummi arabicum im Echtweinsystem schützend vor verstärkter Aggregation. Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht mit den weiteren Testungen bestätigt werden. Generell bewirkte das Echtweinsystem eine vermehrte Trubentstehung und dies bereits bei niedrigeren Temperaturen (Modellsystem: vermehrt ab ca. 45 °C; Echtweinsystem: vermehrt ab ca. 30 °C). Die Überprüfung des Einflusses der Polysaccharide auf die Auffaltungsprozesse der Proteine ermöglichte letztlich die Einschränkung des Wärmetests auf eine maximale Temperatur von 80 °C, um so eine Überschönung zu vermeiden. Es muss betont werden, dass Polysaccharide zwar Wechselwirkungen mit Proteinen eingehen und die Bildungsgeschwindigkeit der Eiweißtrübung beeinflussen, dass aber durch diese Substanzen keine eiweißstabilen Weine zu erreichen sind.

In den hier dargestellten Experimenten wies der Wärmetest im Vergleich zu anderen „Eiweißtests“ die zuverlässigsten Daten auf. In diesem Zusammenhang wurde auch Na-Bentonit als das Bentonit mit der höchsten Wirksamkeit ermittelt.

Die Untersuchungen zum enzymatischen Abbau der Proteine mittels Proteasen zeigten eine Abnahme der Proteine im Bereich von 20-25 kDa (Inkubation 1 bis 72 h), während bei den Proteinen bei 30 und 70 kDa ein Abbau über diesen Zeitraum nicht zu sehen war. Die Bentonitbedarfsbestimmung (80 °C, 3 h) zeigte keine erhebliche Minimierung des Bedarfes durch den Einsatz der Enzyme. Weitere Untersuchungen zu der Wirkung der Proteasen auch auf den Bentonitbedarf müssen noch folgen.

Die oenologischen Varianten aus den Jahren 2008 (Trockenstress) und 2012 bis 2014 wurden miteinander verglichen. Generell konnte gezeigt werden, dass sich im Most mindestens 50 % mehr Proteine befinden als in den entsprechenden Wei-

nen. Ebenso waren Unterschiede im Proteingehalt und zum Teil in dessen Zusammensetzung in den Jahrgängen erkennbar. Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Trockenstress zeigte die gestresste Variante in allen drei Jahren einen höheren Proteingehalt und auch Bentonitbedarf. Die Entsaftungsvarianten (Ganztraubenpressung im Vergleich zur Maischepressung) zeigten in allen drei Jahrgängen keine Unterschiede. Auch die mit diesen Proben durchgeführte Variante „Elevage sur Lie“ (Ausbau auf der Hefe) wies keine Auffälligkeiten auf. Bei den oenologischen Varianten zeigte die Kurzzeiterhitzungsvariante einen höheren Bentonitbedarf als die Kontrolle, während die ultrafiltrierte Variante keinen Bedarf zeigte. Der Einsatz verschiedener Hefezellwandpräparate hatte keinen Einfluss auf den Proteingehalt.

Das konkrete Ziel des Vorhabens, einen Stabilitätstest zu entwickeln, konnte nicht erreicht werden. Allerdings konnten zahlreiche Anknüpfungspunkte ermittelt werden, um dieses Ziel in aufbauenden Forschungsvorhaben weiterverfolgen zu können.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Wein- und Sektwirtschaft besteht überwiegend aus kleinen und mittelständischen Betrieben, die keine eigene Forschungsressourcen besitzen. Deutsche Weine müssen sich aber gegen eine starke Auslandskonkurrenz durch ihre Sortenspezifität und ihre Qualität am Markt behaupten. Jeder Beitrag zur Qualität und Stabilität dieser Weine ist daher ein Beitrag zur Wettbewerbsfähigkeit der produzierenden bzw. vermarktenden Unternehmen. Eiweißtrübungen führen zu Imageschäden und wirtschaftlich bedeutenden Einbußen. Der Ersatz von Bentonit durch alternative Stabilisierungsmaßnahmen oder die Reduzierung der Einsatzmengen von Bentonit auf den wirklichen Bedarf, bedingt durch zuverlässige, praxisrelevante Verfahren und Eiweißtests, würde durch eine sichere Stabilisierung zur Qualität und damit zur Erhöhung der Wettbewerbsfähigkeit beitragen.

Nutzungsmöglichkeiten für die Ergebnisse ergeben sich sowohl für Fassweinerzeuger, direktvermarktende Betriebe und Genossenschaften als auch für Import-/Export- und Abfüllkellereien. Weiterhin können die Zulieferer der Wein- und Sektbranche, vor allem Schönungsmittel-, Filter- und Enzymhersteller von den Ergebnissen profitieren. Da das Problem der Eiweißtrübung auch bei Traubensäften existiert, profitiert auch die Fruchtsaftindustrie von diesen Erkenntnissen.

**Publikationen (Auswahl):**

1. FEI-Schlussbericht 2015.
2. Esteruelas, M., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M.F., Canals, J.M. und Zamora, F.: Comparison of methods for protein stability in white wines. Am. J. Enol. Vitic. 60, 302-311 (2009).

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei den Forschungsstellen abzurufen.

**Weiteres Informationsmaterial:**

Hochschule Geisenheim  
Zentrum für Analytische Chemie und Mikrobiologie  
Institut für Weinanalytik und Getränkeforschung  
Von-Lade-Str. 1, 65366 Geisenheim  
Tel.: +49 6722 502-311  
Fax: +49 6722 502-310  
E-Mail: [helmut.dietrich@hs-gm.de](mailto:helmut.dietrich@hs-gm.de)

Universität Mainz  
Institut für Molekulare Biophysik  
Jakob-Welder-Weg 26, 55128 Mainz  
Tel: +49 6131 392-3570  
Fax: +49 6131 392-3557  
E-Mail: [hdecker@uni-mainz.de](mailto:hdecker@uni-mainz.de)

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: +49 228 3079699-0  
Fax: +49 228 9079699-9  
E-Mail: [fei@fei-bonn.de](mailto:fei@fei-bonn.de)

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.