

Vermeidung von Eiweißtrübungen in Weinen und Traubensäften durch den Einsatz proteolytischer Enzyme als Alternative zu Bentonit



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	Hochschule Geisenheim Institut für Getränkeforschung Analytik & Technologie pflanzl. Lebensmittel – Schwerpunkt Getränke Prof. Dr. Ralf Schweiggert/Prof. Dr. Frank Will Universität Gießen Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie Prof. Dr. Holger Zorn/Dr. Martin Gand
Industriegruppe(n):	Verband deutscher Sektkellereien e. V., Wiesbaden
Projektkoordinator:	Christian Schätzle Badischer Winzerkeller eG, Breisach
Laufzeit:	2019 - 2022
Zuwendungssumme:	€ 250.274,--

Ausgangssituation

Das Auftreten von Eiweißtrübungen gehört zu den wirtschaftlich bedeutendsten Problemen der Wein- und Sektwirtschaft. Bedingt durch die Klimaveränderung und wärmere Jahrgänge hat die Häufigkeit von Nachtrübungen in Deutschland zugenommen, was sich in einem deutlich erhöhten Bentonitbedarf und wirtschaftlichen Verlusten ausdrückt. In Most und Wein machen sich Trockenstress und Fäulnis durch steigende Proteingehalte bemerkbar. Steillagen sind aufgrund der Hangneigung und der Bodenbeschaffenheit in überdurchschnittlich warmen Jahren besonders von Trockenstress betroffen. Hier konnte Trockenstress mit signifikant höheren Proteingehalten und damit einem höheren Bentonitbedarf korreliert werden.

Zu Beginn des Projektes stand zur Entfernung von gelöstem Eiweiß aus Wein außer der Bentonitschönung keine technisch und rechtlich geeignete Alternative zur Verfügung. In Verbindung mit der von der insgesamt wärmeren Witterung verursachten niedrigeren Gesamtsäure und den damit höheren pH-Werten resultiert ein erhöhter Schönungsbedarf, da die Wirksamkeit von Bentonit bei höheren pH-Werten abnimmt. Die Bentonitschönung mit erhöhten Dosagen führt gleichzeitig zu einer Abreicherung wertgebender Inhaltsstoffe und zu sensorischen Qualitätsverlusten. Hier stehen Verluste durch die Adsorption von Aromastoffen und Anthocyanen im Vordergrund.

In der Vergangenheit gestaltete sich der Abbau von Eiweißstoffen durch kommerziell verfügbare Peptidasen (Proteasen) als schwierig, was auf ungewöhnlich stabile Proteinstrukturen hindeutet (protease resistant proteins). Neben den stabilen Strukturen der trübungsrelevanten Proteine wirken sich die nativen Bedingungen im Wein (pH 2,8 – 4,0, SO₂, Phenole, Temperaturen um 15 °C und Alkoholkonzentrationen bis 10 %) sehr negativ auf die enzymatische Aktivität der meisten Proteasen aus. Lediglich in Kombination mit einer

Kurzzeiterhitzung konnten die Eiweiße erfolgreich mit Hilfe von Aspergillopepsin abgebaut werden. Ein Einsatz von Aspergillopepsin in Kombination mit einer Kurzzeiterhitzung wurde 2021 durch die OIV (Internationale Organisation für Rebe und Wein, Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) als Verfahren zugelassen (OIV-OENO 541A-2021 und OIV-OENO 541B-2021).

Ziel des Forschungsvorhabens war es, die Struktur nachtrübungsrelevanter Weinproteine aufzuklären und enzymatische Verfahren zur Vermeidung von Eiweißtrübungen zu entwickeln. Die spezifische Entfernung trübungsverursachender Proteine mittels Peptidasen (Proteasen) sollte als mögliche Alternative zu Bentonit untersucht werden. Hierzu erfolgte ein umfassendes Screening von Peptidasen aus Insekten. Der Schwerpunkt der Untersuchungen wurde dabei auf solche Insekten fokussiert, die an Trauben saugen, da bei diesen Insekten wahrscheinlich ein proteolytischer Abbau von Weinproteinen als Nahrungsverwertung durchgeführt wird. Ein Enzymeinsatz im Most und Wein sollte im technischen Maßstab getestet werden. Es sollte geprüft werden, ob durch den Enzymeinsatz eine teilweise oder vollständige Reduktion des Bentonitbedarfs möglich ist. Die durch enzymatische Hydrolyse entstandenen Spaltprodukte (Peptide, Aminosäuren) sollten analytisch charakterisiert und ihre sensorischen Eigenschaften im Wein untersucht werden.

Forschungsergebnis

Im Rahmen des Projektes wurden 20 Kolloide aus sieben Mosten und 13 Weinen verschiedener Sorten, Jahrgänge und Anbauregionen im repräsentativen, technischen Maßstab isoliert und charakterisiert. Pro Kilogramm Kolloidtrockenmasse wurden zwischen 281 und 806 g Kohlenhydrate und zwischen 88 und 669 g Protein gefunden. Dies entsprach Kohlenhydrat- und Proteinkonzentrationen von 87 bis 645 mg/L beziehungsweise 33 bis 397 mg/L in den Ausgangsmosten und -weinen. Mittels Bottom-up-Proteomics konnten massenspektrometrisch insgesamt 126 Proteine in den Kolloiden eines Rieslingmosts (neun Gruppen identifizierter Proteine) und eines Traminermosts (35) sowie eines Rieslingweins (vier), eines Traminerweins (neun) und eines Silvanerweins (96) identifiziert werden. Die Größenausschlusschromatographie mit Mehrwinkellichtstreuungs-, Refraktions- und UV-Detektion zeigte zwei kohlenhydratreiche (424 – 33.390 und 47,8 – 462,0 kg/mol) und eine proteinreiche (13,6 – 121,1 kg/mol) Fraktion in den Kolloiden. Die Zeta-Potentiale der Kolloide lagen im Most und im Wein in einem schwach negativen Bereich zwischen -11,7 und -1,1 mV, vor allem in den Weinen jedoch lediglich bei -3.1 bis -1.1 mV. Die dadurch äußerst geringe elektrostatische Abstoßung der Kolloide begünstigt deren Agglomeration, da zur elektrostatischen Agglomerationsinhibition in der Regel Zeta-Potentiale von mindestens -10 mV nötig sind. Das Zeta-Potential der Kolloide zeigte zudem eine starke pH-Abhängigkeit, insbesondere in dem für Wein relevanten Bereich zwischen pH 3 und pH 4. Hierdurch ergab sich die Frage, inwieweit pH-Wertänderungen relevant für das Aggregations- und damit das Trübungsverhalten der Kolloide sein könnten.

Für die Suche nach neuen Peptidasen wurden zunächst Extrakte aus Kirschessigfliegen (adulte Fliegen und Larven), Mittelmeerfruchtfliegen (adulte Fliegen) und Pandur (adulte Käfer) gewonnen. Bei verschiedenen Screenings zeigten die Larvenextrakte der Kirschessigfliege die besten Aktivitäten. Die Kultivierungsbedingungen für die Larven wurden optimiert und aus einer größeren Menge Larven (70 g) wurden die potentiellen Peptidasen extrahiert und aufgereinigt. Die aufgereinigten Extrakte zeigten im Gel bei 37 °C eine Aktivität gegenüber isolierten Weinkolloiden und rekombinant hergestellten Weinproteinen (Chitinase und thaumatinsähnliches Protein). In einem Screening bei Raumtemperatur in einem Citrat-Puffer konnte für die Extrakte sowie für 19 kommerzielle Enzyme kein Abbau von Most- und Weinproteinen beobachtet werden. In Kombination mit einer kurzzeitigen Erwärmung (75 °C für 5 min) konnten acht Enzympräparate, darunter vier Aspergillopepsinpräparate, Most- und Weinproteine zumindest teilweise abbauen.

Aufgrund der derzeit noch geringen Ausbeute an Insektenenzymen erfolgten die technischen Versuche mit zwei kommerziellen Aspergillopepsinpräparaten. Der Enzymeinsatz erfolgte in Kombination mit einer Kurzzeiterhitzung auf 80 °C für 2 min im Most und für 1,8 min im Wein, welche jeweils mit Kolloiden künstlich angereichert wurden. Für die Moste wurde im Vergleich zur Kontrolle eine erfolgreiche Reduktion der Proteinkonzentration und damit eine Stabilisierung der daraus hergestellten Weine ohne den Einsatz von Bentonit

erzielt. Unerwarteterweise wurde bei Enzymbehandlung direkt im Wein keine ausreichende Reduktion der Proteinkonzentration bzw. Stabilisierung beobachtet.

Mittels verschiedener sensorischer Tests (26 ungeschulte Prüfer) konnte weder für die behandelten Moste noch für die Weine aus den behandelten Mosten noch für die direkt behandelten Weine ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den mit Enzym behandelten Proben und der unbehandelten Kontrolle gefunden werden. In Übereinstimmung hiermit wurden mittels Top-Down-Massenspektroskopie nach dem Abbau von zwei trübungsrelevanten Proteinen in Weinmodelllösungen durch die gereinigten Insektenpeptidasen im Labormaßstab keine potenziell bitteren Peptide gefunden.

Wirtschaftliche Bedeutung

Proteintrübungen sind die häufigsten Ursachen für Weinstabilitäten. Nachgetrübte Weine werden abgelehnt und führen für Kellereien zu wirtschaftlichen Problemen aufgrund von Reklamationen bzw. Rückrufaktionen des Handels, die dann meist auch mit Imageschäden für die betroffenen Hersteller einhergehen. Neben dem Auftreten von Trübungen ist auch der Verlust von Wein im Bentonittrub beachtlich. Neben den Weinkellereien sind von dieser Problematik auch die Sektkellereien betroffen, da in trockenen Jahren der Proteingehalt stark zunimmt, aber der Gehalt an für die Sekthefe zur zweiten Gärung notwendigen freien Aminosäuren stark abnimmt. Folglich kommt es vermehrt zu Gärstörungen und daraus resultierenden Fehlparfums. Der wirtschaftliche Schaden für die Produzenten ist hoch.

Die Ergebnisse des Vorhabens leisten einen wesentlichen Beitrag zum besseren Verständnis der Ursachen und zur Lösung des Problems. Hierzu gehören Erkenntnisse zur Natur der trübungsrelevanten Proteine und die Aufklärung vieler bis dato unbekannter Proteinstrukturen, die Einsichten in die Ursachen der Proteaseresistenz (z. B. hoher Disulfidbrückenanteil) oder des Agglomerationsverhaltens erlauben (nicht ausreichende Zeta-Potenziale). Die Untersuchungen zum erfolgreichen Proteinabbau mittels Aspergillopepsin zeigen, dass ein enzymatischer Abbau der trübungsrelevanten Proteine ohne negative sensorische Auswirkungen, wie Bitterkeit, prinzipiell möglich ist. Derzeit ist bei diesem von der OIV als zulässig eingestuftem Verfahren (OIV-OENO 541A-2021 und OIV-OENO 541b-2021) jedoch noch ein ungewünschter Erhitzungsschritt notwendig, der die erfolgreiche Problemlösung auf Betriebe mit modernen Pasteurisationsanlagen limitiert. Sollte dieser Erhitzungsschritt im Ergebnis weiterer Forschungsarbeiten durch neue Peptidasen eliminiert werden können, wäre der Weg für eine vollständige Lösung des Problems geebnet.

Publikationen (Auswahl)

1. FEI-Schlussbericht 2022.
2. Seidel, L., Albuquerque, W., Happel, K., Ghezellou, P., Gand, M., Spengler, B., Zorn, H., Will, F. & Schweiggert, R.: Composition, ζ Potential, and Molar Mass Distribution of 20 Must and Wine Colloids from Five Different Cultivars Obtained during Four Consecutive Vintages. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c09048> (2023).
3. Albuquerque, W., Ghezellou, P., Seidel, L., Burkert, J., Will, F., Schweiggert, R., Spengler, B., Zorn, H. & Gand, M.: Mass Spectrometry-Based Proteomic Profiling of a Silvaner White Wine. *Biomol.* 13 (4), 650, <https://doi.org/10.3390/biom130406> (2023).
4. Albuquerque, W., Sturm, P., Schneider, Q., Ghezellou, P., Seidel, L., Bakonyi, D., Will, F., Spengler, B., Zorn, H. & Gand, M.: Recombinant Thaumatin-Like Protein (rTLP) and Chitinase (rCHI) from *Vitis vinifera* as Models for Wine Haze Formation. *Molec.* 27, 6409 (2022).
5. Albuquerque, W., Seidel, L., Zorn, H., Will, F. & Gand, M.: Haze formation and the challenges for peptidases in wine protein fining. *J. Agric. Food Chem.* 69, 14402–14414 (2021).
6. Albuquerque, W., Ghezellou, P., Li, B., Spengler, B., Will, F., Zorn, H. & Gand, M.: Identification of intact peptides by top-down peptidomics reveals cleavage spots in thermolabile wine proteins. *Food Chem.* 363, 130437 (2021).

Weiteres Informationsmaterial

Hochschule Geisenheim
Institut für Getränkeforschung
Analytik & Technologie pflanzl. Lebensmittel - Schwerpunkt Getränke
Von-Lade-Straße 1, 65358 Geisenheim
Tel.: +49 6722 502-312
Fax: +49 6722 502-212
E-Mail: ralf.schweiggert@hs-gm.de

Universität Gießen
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Heinrich-Buff-Ring 17-19, 35392 Gießen
Tel.: +49 641 99-34900
Fax: +49 641 99-34909
E-Mail: holger.zorn@lcb.chemie.uni-giessen.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Förderhinweis

... ein Projekt der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)

Gefördert durch:



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Bildnachweis - Seite 1: © Deutsches Weininstitut (DWI)

Stand: 19. Juni 2023