

Nachweisbarkeit von Ovalbumin, Casein und Lysozym nach Zugabe in Most und Wein in Abhängigkeit von Filtration und Bentonitschönung

CHRISTINA SCHÜMANN, ELSA PATZL-FISCHERLEITNER, MARTIN SCHMUCKENSCHLAGER und REINHARD EDER

Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
E-Mail: reinhard.eder@weinobst.at

In dieser Untersuchung wurden milchcasein- und hühnereiklarhaltige Weinbehandlungsmittel zur Schönung von weißem Most, Weißwein und Rotwein verwendet. Es wurde überprüft, ob nach der Zugabe der vom Hersteller maximal empfohlenen Mengen und zweifach höherer Dosis an Schönungsmitteln direkt beziehungsweise nach verschiedenen Filtrationen die Allergene Casein, Ovalbumin und Lysozym im Wein noch nachweisbar sind. Der Nachweis erfolgte mittels kommerziell erhältlicher ELISA Testsets. Lediglich Casein konnte problemlos durch eine grobe Filtration restlos entfernt werden. Das im Eiklar enthaltene Ovalbumin konnte noch nach vier Wochen Lagerung im Wein nachgewiesen werden, durch eine zusätzliche Bentonitschönung konnte in fast allen Proben der Gehalt unter die gesetzlich vorgeschriebene Menge reduziert werden. Hohe Gehalte an Lysozym waren nach der Schichten- beziehungsweise Membranfiltration im Wein nachweisbar und konnten selbst nach Zugabe von Bentonit und Metaweinsäure nicht vollständig entfernt werden.

Schlagwörter: Wein, Allergen, Ovalbumin, Casein, Lysozym, ELISA, Kennzeichnungspflicht

Detectability of ovalbumin, casein and lysozyme after addition to must and wine in dependency of filtration and bentonite fining. *In this study, milk casein and ovalbumin containing wine fining agents were used with must, white wine and red wine. It was investigated, whether after addition of the maximum recommended amounts or a two times higher dose of fining agents immediately or after various filtrations the allergens casein, ovalbumin and lysozyme are still detectable in the wine. The detection was performed using commercially available ELISA kits. Only casein could easily completely removed by a coarse filtration. Ovalbumin could still be detected in the wine after four weeks of storage, it could be reduced below the statutory amount in almost all samples by an additional bentonite fining. High levels of lysozyme were detected after the layer or membrane filtration in wine and could not be completely removed even after the addition of bentonite and metatartaric acid.*

Keywords: wine, allergen, ovalbumin, casein, lysozyme, ELISA, labelling

La traçabilité de l'ovalbumine, de la caséine et de la lysozyme après adjonction dans le moût et dans le vin en fonction de la filtration et du collage à la bentonite. *Dans le présent essai, des agents de traitement du vin contenant de la caséine de lait et du blanc d'œuf ont été utilisés pour le collage du moût blanc, du vin blanc et du vin rouge. Il a été vérifié si, après l'adjonction de la quantité maximale recommandée par le fabricant et d'une dose deux fois plus élevée d'agents de collage, les allergènes caséine, ovalbumine et lysozyme sont encore décelables dans le vin, directement ou bien après différentes filtrations. La preuve a été administrée à l'aide de kits de test ELISA en vente dans le commerce. Seule la caséine a pu être totalement éliminée sans problèmes par voie de filtration grossière. L'ovalbumine contenue dans le blanc d'œuf a encore pu être détectée dans le vin après quatre semaines de stockage. Dans presque tous les échantillons, le collage supplémentaire à la bentonite a permis de réduire la teneur au-dessous de la quantité prescrite par la loi. Des teneurs élevées en lysozyme ont pu être détectées dans le vin après la filtration en couches et/ou membranaire et n'ont pas pu être complètement éliminées, même après l'adjonction de bentonite et d'acide métatartrique.*

Mots clés : Vin, allergène, ovalbumine, caséine, lysozyme, ELISA, obligation d'étiquetage

Verschiedene Produkte tierischen Ursprungs sind in der Europäischen Union zur Schönung von Most und Wein zugelassen (VO(EU) 606/09), darunter Milchcasein zur Klärung von Weißwein und Hühnereiklar zur Klärung und Reduzierung des Phenolgehaltes im Rotwein (LACORN et al., 2011). Ein weiteres Protein des Hühnereiklars, das Lysozym, wird zur Vermeidung des ungewollten biologischen Säureabbaus angewendet. Aufgrund der möglicherweise Allergien auslösenden Wirkung dieser Proteine wurde eine Deklarationspflicht erlassen (RL 2003/89/EG), wobei aber ein tolerierbarer Grenzwert von 0,25 mg/l festgelegt wurde. Aus diesem Grund ist es dringend erforderlich zu wissen, welche Restmengen dieser Weinbehandlungsmittel nach der Schönung und verschiedenen Behandlungsmaßnahmen im Wein verbleiben.

Zum sensitiven Nachweis der Allergene konnten spezifische Nachweisverfahren entwickelt werden, mit denen auch geringe Konzentrationen der Hauptallergene im Hühnereiklar, Ovalbumin, Ovotransferrin, Ovomukoid und Lysozym, und der verschiedenen Caseine aus Milch bestimmt werden können (PATZL-FISCHERLEITNER UND EDER, 2012).

Mit dem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kann eine Nachweisgrenze von 0,25 mg/l

Der entstehende Komplex kann anschließend mit einem weiteren Antikörper, der eine Farbreaktion ermöglicht, im Photometer quantifiziert werden. Dies ermöglicht eine einfache und schnelle Analyse vieler Proben auf Gesetzeskonformität hinsichtlich der Deklarationsverpflichtung.

In dieser Arbeit wurden häufig verwendete Weinbehandlungsmittel ausgewählt, die Ovalbumin, Casein und Lysozym enthalten, um festzustellen, ob diese während der weiteren Verarbeitung, insbesondere nach Klärung und Filtration sowie nach Lagerung, noch nachweisbar sind.

Material und Methoden

Zugabe der Weinbehandlungsmittel

Es wurden verschiedene handelsübliche Weinbehandlungsmittel ausgewählt (Tab. 1) und die Konzentration des Allergens zu verschiedenen Zeitpunkten, nach Absetzen, Filtrieren (Schichten- und Membranfiltration) und Lagern, gemessen. Dazu wurden die vom Hersteller angegebenen Maximalmengen und die

Tab. 1: Verwendete Weinbehandlungsmittel und Zugabemengen

Produkt	Hersteller	Allergen	Zugabe	Anwendung
Albufine	Lallemand, Montreal, Kanada	Ovalbumin	110 bzw. 220 ml/hl	Weiß- und Rotwein
AlbuVin	Erbslöh, Geisenheim, Deutschland	Ovalbumin	16 bzw. 32 g/hl	Weiß- und Rotwein
Vinpur Spezial	Erbslöh, Geisenheim, Deutschland	Casein	60 bzw. 120 g/hl	Weiß- und Rotwein
Filtra Casein	Lallemand, Montreal, Kanada	Casein	80 bzw. 160 g/hl	Weiß- und Rotwein
SIHAZYM Lyso	Begerow/Eaton, Langenloinsheim, Deutschland	Lysozym	50 bzw. 100 g/hl	Weißwein
Mostgelatine	Erbslöh, Geisenheim, Deutschland	Casein	200 bzw. 400 ml/hl	Most
Mostkasilat	Lallemand, Montreal, Kanada	Casein	50 bzw. 100 g/hl	Most

und eine Bestimmungsgrenze von 0,5 mg/l gewährleistet werden. Dieses Verfahren beruht auf der spezifischen Reaktion des Allergens mit dem Antikörper.

doppelte empfohlene Menge in unbehandelten Weißwein (Sortenverschnitt 2011, 13,0 %vol., 1,2 g/l Restzucker, 6,2 g/l titr. Säure), Rotwein ('Rathay' 2009,

13,8 %vol., 2,5 g/l Restzucker, 5,3 g/l titr. Säure) sowie frisch gepressten Most ('Bouvier' 2012, 17 °KMW, 6,2 g/l titr. Säure) laut Herstellerangaben eingerührt (Tab. 1). Alle Ansätze wurden in je zwei 10 l-Glasballons angesetzt. Die Versuche wurden im Duplikat angesetzt und die Analyse einmal wiederholt.

Filtration der Proben

Die natürlich vorgeklärten Weine wurden nach 16 Stunden von den Kaseinpräzipitaten bzw. nach ca. 40 Stunden von dem Ovalbumin- und Lysozymtrub abgezogen und anschließend mit Schichten grob (K300) und EK-filtriert. Weiters wurden im Labor noch 5 ml EK-filtrierter Wein über einen Membranfilter (0,45 µm, Cellulose) filtriert.

Vinifikation des Mostes

Der Most wurde nach dem Abziehen mit 30 g/hl Oenoferm Klosterneuburg F3 (Erbslöh, Geisenheim, Deutschland) vergoren und nach vollständiger Vergärung der Hexosen (Kontrolle: Oenofoss, Foss, Hillerod, Dänemark) der trockene Wein vom Geläger abgezogen.

Bentonitschönung

50 ml der mit Ovalbumin geschönten Weißweinproben (EK-filtriert) wurden mit 50 g/hl Bentonit behandelt. Der mit 50 g/hl Lysozym versetzte Weißwein wurde mit 100 g/hl Bentonit und ein Ansatz zusätzlich mit 10 g/hl Metaweinsäure behandelt. Zum zweiten Lysozymansatz (100 g/hl) wurden 300 g/hl Bentonit und 20 g/hl Metaweinsäure zugegeben. Alle Weine wurden nach etwa 16 Stunden abgezogen.

ELISA

Die Proben der verschieden behandelten Weine bzw. der Most wurden nach dem Absetzen und den einzelnen Filtrationsschritten sowie nach der Bentonitschönung abgefüllt. Danach erfolgte entweder am folgenden Tag oder nach mehrtägiger Lagerung bei 10 °C die Allergenanalyse mittels ELISA: RIDASCREEN®FAST Ei/Egg Protein, RIDASCREEN®FAST Casein und RIDASCREEN®FAST Lysozym (r-Biopharm, Darmstadt, Deutschland) Wenn erforderlich, wurden die Weinproben vorher mit destilliertem Wasser vorverdünnt.

Ergebnisse und Diskussion

Caseinhaltige Schönungsmittel

In den mit caseinhaltigen Präparaten (Vinpur spezial und Filtracasein) behandelten Weiß- und Rotweinen konnten in fünf der 16 Proben (abzogener Wein) mehr als 0,5 mg/kg Casein nachgewiesen werden. Der positive Nachweis ist wohl darauf zurückzuführen, dass die Caseinpräparate sich nicht vollständig absetzen und kleine Partikel in den abgezogenen Wein gelangten. Aber schon bei der Grobfiltration blieben die caseinhaltigen Schönungsmittel vollständig am Filter zurück, und es konnte in allen filtrierten Proben kein Casein mehr nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden von FISCHERLEITNER und EDER (2007), PATZL-FISCHERLEITNER und EDER (2012) und RESTANI et al. (2012) gezeigt.

Das in den beiden Mostcaseinprodukten (Mostgelatine und Mostkasilat) enthaltene Casein konnte bereits am nächsten Tag nach dem Abziehen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Analyse der einzelnen Proben nach der Gärung verlief ebenfalls negativ.

Ovalbuminhaltige Schönungsmittel

Die dem Weiß- und Rotwein zugegebenen Eiklarprodukte (Albufine und Albuvin) entsprachen jeweils einer Menge von etwa 4 bzw. 8 Eiklar/hl und setzten sich nach zwei Tagen nicht vollständig ab. Die Trübungen wurden aber bei der Grobfiltration bereits entfernt. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, wirkte sich das aber nur beim Rotwein in einer wesentlich verringerten Konzentration aus. Da aber die Anwendung auf Rotwein und die Reduktion von überschüssigen Phenolen ausgelegt ist, sind diese Ergebnisse nicht ganz unerwartet (FISCHERLEITNER und EDER, 2006). Die hier gezeigten Resultate konnten von anderen Arbeiten bestätigt werden (LACORN et al., 2011; FISCHERLEITNER und EDER, 2012). Auch in der hier vorliegenden Arbeit bestätigte sich wieder, dass bereits eine Lagerdauer von drei bis vier Wochen einen signifikanten Einfluss auf den Eiklarproteingehalt hat. Durch die zusätzliche Schönung mit Bentonit (50 g/hl) wurde eine fast vollständige Entfernung im Weißwein erzielt. Lediglich bei der doppelten empfohlenen Anwendungsmenge an Albufine (220 ml/hl) wurden noch 0,8 mg/kg Eiklarprotein nachgewiesen.

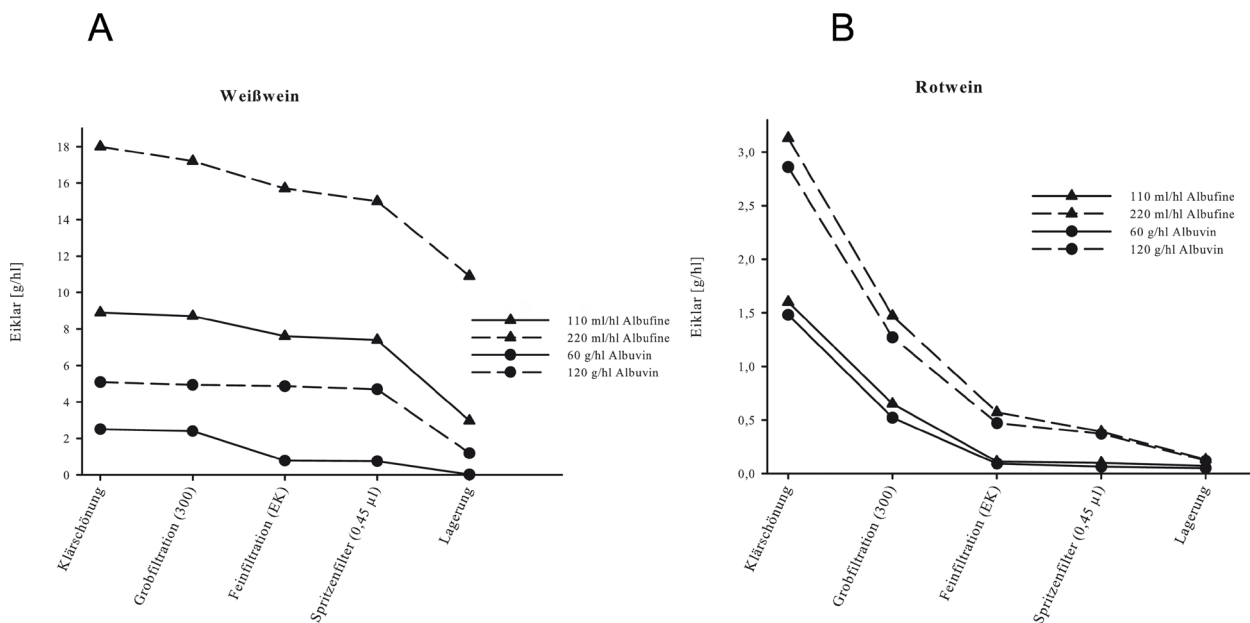


Abb. 1: Ovalbuminkonzentrationen im Weißwein (A) und Rotwein (B)

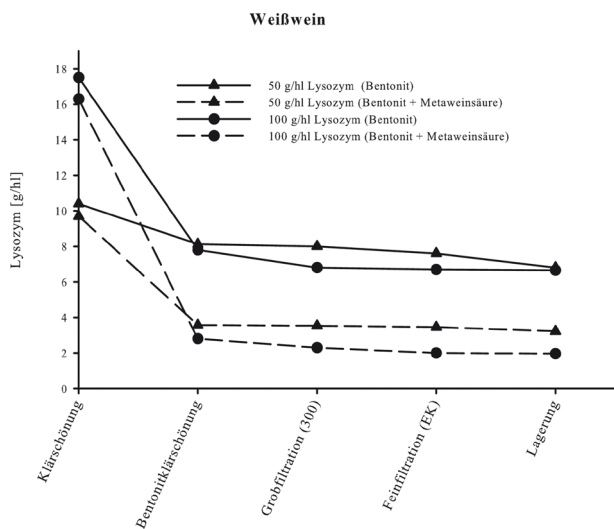


Abb. 2: Konzentrationen an Lysozym zu verschiedenen Zeitpunkten

Lysozymhaltige Schönungsmittel

Die Behandlung von Weißwein mit Lysozym (Siha-zym Lyso) zeigte, dass bereits nach zwei Tagen Absetzzeit nur noch etwa 20 % der zugegebenen Menge nachweisbar waren (Abb. 2). Ein etwas höheres, aber vergleichbares Ergebnis wurde von WEBER et al. (2009) berichtet. Es konnte nach einer Einwirkzeit von 14 bis 18 Tagen eine Lysozymmenge von 17 bis

32 g/hl, nach anfänglich 50 g/hl, in verschiedenen Weinen nachgewiesen werden. Allerdings wird in dieser Arbeit auch beschrieben, dass der Lysozymgehalt durch eine Filtration und Bentonitschönung (100 bis 700 g/hl) unter den deklarationspflichtigen Grenzwert von 0,25 mg/l gesenkt werden kann. Dies ist im Gegensatz zu den hier vorgestellten Resultaten, bei denen Metaweinsäure ausschlaggebend für den Wirkungsgrad war und die Lysozymkonzentration von mind. 20 mg/l noch weit über dem Grenzwert lag. Es ist also möglich, dass durch einen höheren Bentoniteinsatz und eine längere Einwirkzeit die Restkonzentration an Lysozym erheblich verringert werden kann. Hierzu sind aber noch weitere Versuche nötig. Die Filtration und Lagerung (drei Wochen) zeigten hingegen keinen wesentlichen Einfluss.

Literatur

- FISCHERLEITNER, E. und EDER, R. 2006: Nachweis von Ovalbuminrückständen im Wein mittels Elektrophorese und Western Blotting. Mitt. Klosterneuburg 56: 94-101
- FISCHERLEITNER, E. und EDER, R. 2007: Nachweis von Caseinrückständen im Wein mittels Elektrophorese und Western Blotting. Mitt. Klosterneuburg 57: 23-28
- LACORN, M., GÖßWEIN, C. und IMMER, U. 2011: Determination of residual egg white proteins in red wines during and after fining. Am. J. Enol. Vitic. 62(3): 382-385
- PATZL-FISCHERLEITNER, E. und EDER, R. 2012: Kurzmitteilung: Nachweis von Eiklar- und Caseinrückständen im Wein mittels Enzyme-linked-Immunsorbent Assay (ELISA) unmittelbar nach der Schönung und im Laufe der Lagerung. Mitt. Klosterneuburg 62: 10-12
- RESTANI, P., UBERTI, F., DANZI, R., BALLABIO, C., PAVANELLO, F. und TARANTINO, C. 2012: Absence of allergenic residues in experimental and commercial wines fined with caseinates. Food Chem. 134(3): 1438-1445
- WEBER, P., KRATZIN, H., BROCKOW, K., RING, J., STEINHART, H. und PASCHKE, A. 2009: Lysozyme in wine: A risk evaluation for consumers allergic to hen's egg. Mol. Nutr. Food Res. 53(11): 1469-1477

Eingelangt am 2. November 2012