

Nachweis von Ovalbuminrückständen im Wein mittels Elektrophorese und Western Blotting

ELSA FISCHERLEITNER und REINHARD EDER

Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
E-mail: Elsa.Fischerleitner@hblawo.bmlfuw.gv.at

Tierische Schönungsmittel rücken im Hinblick auf die zukünftige Allergenkennzeichnungspflicht (EU-Richtlinie 2003/89), die ab 2007 eine Deklaration von allen Zutaten und technischen Hilfsstoffen mit nachweisbarem allergenen Potenzial fordert, in den Mittelpunkt des Interesses. Deswegen soll geklärt werden, ob Rückstände der betroffenen Schönungsmittel nach der Schönung im Wein verbleiben und welche Folgen diese möglichen Rückstände auf den Konsumenten haben. In manchen Ländern ist es üblich, Wein mit frischem Eiklar zu schönern. Ein Hauptbestandteil des Eiklars ist das Glycoprotein Ovalbumin. Aus der Sicht der Allergologen folgt dieses Protein bezüglich seiner Allergenaktivität nach dem Ovomucoid an zweiter Stelle der Eiklarproteine. Aus diesem Grund wurde eine elektrophoretisch-immunologische Methode entwickelt, um Rückstände von Ovalbumin im Wein nachzuweisen. Untersucht wurden mit Hühnereiweiß einerseits im Labormaßstab, andererseits im kellertechnischen Maßstab geschönte Weiß- und Rotweine des Jahrganges 2004. Die Proteine wurden elektrophoretisch mittels SDS Gelelektrophorese getrennt und mit Coomassieblau angefärbt sowie einer Western Blot-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen Ovalbumin unterzogen. Im Labormaßstab geschönte Weine wiesen Rückstände auf, deren Menge und Vorkommen sowohl abhängig vom behandelten Volumen des Weines als auch von der Absetzzeit des Schönungsstrubs war. Bei den im kellertechnischen Maßstab behandelten Weinen wurden keine Rückstände gefunden. Mit dieser Methode ist es zweifelsfrei möglich, qualitativ Ovalbumin im Wein nachzuweisen, zur vollständigen Abklärung sind aber noch spezifische Untersuchungen mit Hühnereiweiß-sensibilisierten Personen durch eine autorisierte Stelle nötig.

Schlagwörter: Wein, Schönungsmittel, Allergie, Hühnereiweiß, Ovalbumin, Western Blot

Detection of residues of chicken ovalbumin in wine by means of electrophoresis and western blotting. Because of the future regulations of labelling (EU guideline 2003/89), declaration of animal proteins used as fining agents in wine should be reconsidered due to the possibility of allergenic reactions. Therefore it is necessary to find out if residues of these fining agents remain in wine and if they could have some allergic potential. In some countries fining of wines with fresh white of egg is permitted. The major part of the white of egg is the glycoprotein ovalbumin. Relating to its allergic potential this glycoprotein is the second important allergene directly after ovomucin. Therefore an electrophoretic-immunologic method was developed to detect fining residues of ovalbumin in wine. Experiments were carried out with various red and white wines of the vintage 2004, which were treated with the whole white of egg or with chicken ovalbumin in laboratory scale and in large scale experiments used in wineries. Proteins of the wines were separated electrophoretically by means of SDS-PAGE, followed by Coomassie Blue staining and analyses by means of Western Blotting with monoclonal antibodies to chicken ovalbumin antigene. Some protein residues were detected in the laboratory scale fined wines, depending on fined wines volume and precipitation time. No residues of ovalbumin were found in wines, which were fined in usual winery scale. It is undoubtedly possible to detect ovalbumin in wine qualitatively. To come to final results, specific analyses with persons sensitized to chickens white of egg must be done by an authorized laboratory.

Key words: wine, fining agent, allergy, chickens white of egg, Ovalbumin, western blot

L'identification de résidus d'ovalbumine dans le vin au moyen de l'électrophorèse et du Western Blotting. En considération de la future mention obligatoire d'allergènes (Directive de l'UE 2003/89), qui, à partir de 2007, demande l'indication de tous les ingrédients et adjuvants techniques présentant un potentiel allergène prouvable, les agents de collage d'origine animale suscitent un intérêt de plus en plus important. Il faudra donc éclaircir les questions de savoir si des résidus des agents de collage concernés restent dans le vin après le collage, et quels sont les effets de ces résidus éventuels sur le consommateur. Dans certains pays, il est courant de coller le vin avec du blanc d'œuf frais. Un des principaux composants du blanc d'œuf est la glycoprotéine ovalbumine. Du point de vue des allergologues, cette protéine vient en deuxième position parmi les protéines du blanc d'œuf, suivant l'ovomucoïde, en termes d'activité allergénique. Pour cette raison, une méthode électrophorétique-immunologique a été développée afin de détecter des résidus d'ovalbumine dans le vin. Des vins blancs et rouges du millésime 2004, collés au blanc d'œuf de poule, ont été examinés tant à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle des soins de cave. Les protéines ont été séparées électrophorétiquement par voie d'électrophorèse sur gel SDS, puis colorées au bleu de Coomassie et enfin soumises à une analyse Western Blot avec un anticorps monoclonal anti-ovalbumine. Les vins collés à l'échelle du laboratoire ont présenté des résidus dont la quantité et l'apparition dépendaient tant du volume du vin traité que du temps de sédimentation des troubles de collage. On n'a pas trouvé de résidus dans les vins traités à l'échelle des soins de cave. Cette méthode permet incontestablement la détection qualitative de l'ovalbumine dans le vin ; pour une clarification définitive de la situation, il sera cependant encore nécessaire qu'un organisme autorisé effectue des examens spécifiques sur des personnes sensibilisées au blanc d'œuf de poule.

Mots clés: vin, agent de collage, allergie, blanc d'œuf de poule, ovalbumine, Western Blot

Lebensmittelallergien werden immer mehr zum Problem, da die Zahl der Personen mit echten allergischen Reaktionen auf bestimmte Nahrungsproteine ständig zunimmt. Schon seit sehr langer Zeit sind potenziell Allergie auslösende Stoffe im Wein, wie zum Beispiel Schwefeldioxid, Gegenstand der Diskussion. Im Hinblick auf die zukünftige Allergenkennzeichnungspflicht (EU, 2003), die ab dem Jahr 2007 eine Deklaration von allen Zutaten und technischen Hilfsstoffen mit nachweisbarem allergenem Potenzial fordert, rücken tierische Schönungsmittel, wie Hühnereiweiß, Casein, Molkenprotein und Hausenblase, in den Mittelpunkt des Interesses. Aus diesem Grund besteht ein großer Bedarf an der Klärung der Frage, ob Rückstände der betroffenen Schönungsmittel nach der Schönung im Wein verbleiben und welche Folgen diese möglichen Rückstände auf den Konsumenten haben.

Mit wenigen Ausnahmen sind Allergene wasserlösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 5 bis 100kD. Für eine Sensibilisierung reichen schon sehr niedrige Dosen aus (JÄGER und WÜTHRICH, 1998).

Laut Weinverordnung der Europäischen Union (EU, 1999) ist zur Klärung und Behandlung von Most und Wein Eialbumin zugelassen, in Österreich (Weinverordnung, Anhang V) wie auch in anderen Ländern (z.B. Frankreich) ist es außerdem üblich, mit frischem Eiklar zu schön.

Frisches beziehungsweise getrocknetes Hühnereiweiß ist ein sehr oft eingesetztes Schönungsmittel zur Reduzierung überschüssiger Phenole und zur Klärung des

Weines. Nach TROOST (1988) ist das Eiklar von Hühnereiern das älteste Schönungsmittel. Es besteht zu 86,6% aus Wasser und 16,6% aus Protein (WÜRDIG und WOLLER, 1989).

Beim Hühnereiklar konnten mindestens 24 antigene Komponenten nachgewiesen werden. Der Hauptbestandteil des Eiklars ist mit 54% das Glycoprotein Ovalbumin. Ovalbumin ist leicht denaturierbar und hat eine relative Molmasse von 43kD. Aus der Sicht der Allergologen liegt dieses Protein bezüglich seiner Allergenaktivität an zweiter Stelle der Eiklarproteine (die Sensibilisierungsrate bei Ei-Allergikern beträgt 60%) und wird lediglich vom stark allergenen Ovomucoïd (11% der Eiklarproteine) übertroffen (JÄGER und WÜTHRICH, 1998). Infolge oraler Zufuhr treten bei Hühnerei-sensibilisierten Personen Hauterscheinungen, gastrointestinale Beschwerden, respiratorische Symptome oder Kreislaufreaktionen auf, wobei hochgradige Sensibilisierungen nicht selten sind und zu äußerst heftigen Reaktionen bis zum anaphylaktischen Schock führen können (RING, 1996).

Da das Ovalbumin eine geringe Thermostabilität besitzt (RÖMPF, 1995), kann von Hühnereiallergikern erhitztes Eiklar vertragen werden, sofern keine Sensibilisierung gegen das hitzestabile Ovomucoïd vorliegt. Aus diesem Grund ist zu bedenken, dass die Verwendung von frischem Hühnereiweiß ein größeres Risiko für allergische Reaktionen beim Weinkonsumenten darstellt als die Verwendung von getrockneten oder pasteurisierten Hühnereiweißprodukten.

Untersuchungen von WENINGER und GÖRTGES (2005) zeigten, dass mit getrocknetem Albumin geschönte Weine keine Reaktion im Blut von hühnerei-sensibilisierten Allergikern hervorriefen. Frisches Hühnereiweiß wurde dabei nicht untersucht.

Material und Methoden

Wein

Untersucht wurden authentische Rot- und Weißweine aus dem Jahrgang 2004, die an der Höheren Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau vinifiziert wurden. Diese Weine waren im Zuge der Vinifizierung weder angereichert, noch entsäuert oder geschönt worden.

Schönung

Zur Schönung verwendet wurden frisches Hühnereiweiß (Größe M; Fa. Tonis Freilandier, Knittelfeld, Österreich) in der Menge von 1 bis 5 Eier/hl, getrocknetes Albumin (Keller Albumin; Fa. Keller, Mannheim, Deutschland) in der vom Hersteller empfohlenen Menge von 5g/hl und pasteurisiertes Eiklar (Albucoll; Fa. Thonhauser, Perchtoldsdorf, Österreich) in der Menge von 60ml/hl. Vom getrockneten Präparat wurde vorher eine 10%ige Lösung hergestellt, alle anderen Präparate wurden pur dem Wein zugesetzt. Die Umgebungstemperatur und die Temperatur des Weines betragen zum Zeitpunkt der Schönung 17 bis 20°C. Die Präparate wurden mit Pipetten unter ständigem Rühren in jeweils 200 ml Wein eingebracht, größere Mengen an Eiklar wurden vorher mit einem Schneebesen aufgeschlagen. Nach Zugabe der Schönungsmittel wurden die Flaschen verschlossen und kräftig geschüttelt. Die Ansätze wurden 24 Stunden ruhig stehen gelassen. Anschließend wurde der Wein vom Schönungstrub abgezogen. Es wurden außerdem 100 Liter Rotweincuvee mit Eiklar in der Menge von zwei Eiern pro Hektoliter geschönt und nach einer Woche filtriert (Faltenfilter 602 H, ca. 2 µm; Fa. Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland).

Um den Einfluss der Faktoren Weinmenge, Einwirkdauer und Klärung durch Filtration zu bestimmen, wurden Eiklarschönungen in der Menge von 3 Eiern/hl mit Weinvolumina von 0,1, 0,2, 0,5, 1, 5, 10 und 20 Litern bei einer Umgebungstemperatur von 12°C angesetzt. Proben wurden nach einem Tag und nach sieben Tagen gezogen und mit verschiedenen Filtern zur Analyse vorbereitet.

Probenvorbereitung

Die Weinproben wurden filtriert (Spritzenfilter 0,45 µm; Fa. Roth; Karlsruhe, Deutschland, bzw. Faltenfilter 602 H, ca. 2 µm; Fa. Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) und anschließend durch Acetonfällung aufkonzentriert. Dazu wurden 2 ml Wein mit 8 ml Aceton (Fa. Merck, Nr. 1.00012) bei -18°C versetzt und 10 min mit 10000 Upm bei -18°C zentrifugiert (JC-H2 Kühlzentrifuge, Fa. Beckman, Nyon, Schweiz). Danach wurde der Überstand abgegossen, der Niederschlag mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 200 µl SDS Ladepuffer (4,2 ml Wasser; 1,0 ml 0,5M Tris-HCl, pH-Wert 6,8; 800 µl Glycerin; 1,6 ml 10% (w/v) SDS; 400 µl 2-Mercaptoethanol; 20 µl 10% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Die Lösung wurde sofort für die Elektrophorese verwendet oder einige Tage bei -18°C aufbewahrt.

Das frische Eiklar wurde in einer Konzentration von 1 g/l in H₂O oder in Kunstwein (100 g Ethanol und 40 g Weinsäure auf 1l H₂O) gelöst. Nach oben beschriebenen Schema wurde 1ml Eiklarlösung mit 4ml Aceton gefällt, in 1ml SDS Ladepuffer aufgelöst und als Positivkontrolle zur Analyse verwendet.

Elektrophorese

Vor der Analyse wurde die Probe 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend bei 10000 Upm 5 Minuten zentrifugiert, um eventuell unlösliche Bestandteile zu entfernen.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte im Zuge einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). Da die relevanten Proteine des Eiklars zwischen 15 kD und 80 kD liegen, wurde mit Tris-HCl-Fertiggelen (Ready Gel 8,6 cm x 6,8 cm, Fa. Bio-Rad) mit einem Acrylamidgehalt von 12% gearbeitet.

Die Trennung wurde mit einem System der Firma Bio-Rad (Mini Protean 3 Electrophoresis Cell) mit dazugehöriger Steuereinheit (PowerPac 3000 Power Supply) bei einer Stromstärke von 50 mA durchgeführt. Anschließend wurden die Gele einerseits einer Coomassie-Färbung (SERVA, 2005), andererseits einer Western Blot-Analyse unterzogen.

Western Blotting

Der Transfer auf die Nitrocellulosemembran (0,2 µm) wurde ebenfalls mit einem System der Firma Bio-Rad (Mini Protean 3 Electrophoresis Cell mit dazugehörigem Tank Blot Modul) bei einer Spannung von 100 V für die Dauer von einer Stunde in Anwesenheit eines Transferpuffers (1000 ml: 3 g Trishydroxyaminome-

than, 14,4 g Glycin, 200 ml Methanol, auffüllen mit Wasser) durchgeführt. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen mit Magermilchlösung (5%) über Nacht bei 4°C blockiert. Das Waschen der Membran erfolgte dreimal 10 Minuten lang mit TBS Tween (1000 ml: 20 ml 1M Tris-HCl; pH-Wert 7,6; 8 g NaCl, Wasser und 1 ml Tween 20). Danach wurde die Membran wieder dreimal 10 Minuten mit TBS Tween gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Monoclonal Anti Ovalbumin in Mouse, HYB049-05, Fa. Szabo Scandic, Wien, Österreich) erfolgte in einer 1:2500-Verdünnung durch langsames Schwenken eine Stunde lang bei Raumtemperatur.

Danach wurde die Membran wieder dreimal 10 Minuten lang mit TBS Tween gewaschen.

Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti-Mouse IgG HRP in Rat, ZYM04-6020, Fa. Szabo Scandic, Wien, Österreich) erfolgte in einer 1:2500-Verdünnung durch langsames Schwenken eine Stunde lang bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran wieder dreimal 10 Minuten lang mit TBS Tween und anschließend zweimal 5 Minuten lang mit Wasser gewaschen. Die Inkubation mit der DAB-Färbelösung, (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, (Fa. Szabo Scandic, Wien, Österreich), 1:1 verdünnt mit 0,5% H₂O₂, wiederum 1:50 verdünnt mit 100 mM TrisHCl), wurde unter Lichtschutz durchgeführt.

Die Entwicklung der Membran wurde mit PBS-EDTA (200 ml: 1,48 g EDTA x 2H₂O, 1,78 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2H₂O; pH-Wert 7,5; 1,754 g NaCl; Wasser) gestoppt. Nach dem zweimaligen Waschen mit Wasser wurde die Membran auf Zellstoff an der Luft getrocknet.

Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Die Bestimmung von Proteinrückständen im Wein wurde nach BRADFORD (1976) durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Gesamtproteingehalt nach BRADFORD (1976)

Nach der Schönung stieg der Gesamtproteingehalt besonders bei den Weißweinsorten stark an, bei den Rotweinsorten war der Anstieg geringer (Tab.1). Das liegt wahrscheinlich daran, dass im Weißwein der Phenolgehalt eher niedrig ist und die bevorzugten Reaktionspartner der Eiweißstoffe, die polymeren Phenole, auch nur in sehr geringer Konzentration vorkommen. Das führt dazu, dass Proteine, denen die Reaktionspartner fehlen, im Wein zurückbleiben.

Coomassie-Färbung

Bei den Weinen der Sorten 'Welschriesling', 'Zweigelt' und 'Blaufränkisch' sind deutliche Rückstände des Eiklars sowohl nach der Schönung mit pasteurisiertem oder getrocknetem Hühnereiweiß als auch nach der Schönung mit frischem Hühnereiweiß auf den Elektrophorese-Gelen sichtbar, wobei die Menge dieser von der Menge des Zusatzes des Behandlungsmittels abhängig ist. Nach dem Zusatz von nur 1 Ei/hl sind die zusätzlichen Proteinbanden (ca. bei 35 und 45 kD) am SDS Gel viel schwächer ausgeprägt als nach der Zugabe von 3 Eiern/hl (Abb. 1 und 2).

Im kellertechnischen Maßstab geschönte Weine (100 Liter) zeigen nach der Schönung mit 2 Eiern/hl keinerlei Reste der Eiklarproteine auf dem Gel, was mit den Ergebnissen von WENINGER und GÖRTGES (2005) übereinstimmt (Abb. 2).

Auf Abbildung 4 ist gut erkennbar, dass bei 'Sankt Laurent' sowie im geringen Maße bei 'Zweigelt' bei den behandelten Weinen jeweils eine dicke Bande mit einem Molekulargewicht von 35 kD und 50 kD auftritt, die weder im unbehandelten Wein, noch in dem im Wasser gelösten reinen Eiklar auftaucht. Hierbei handelt es sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um ein Protein des Eiklars, dessen Molekulargewicht durch eine Wech-

Tab. 1: Gesamtproteingehalt vor und nach der Schönung

Sorte	unbehandelt	Eiklar pasteurisiert	Eiklar pasteur. nach 3 Monaten	1 Ei/hl	3 Eier/hl	3 Eier/hl nach 2 Monaten	Albumin getrocknet
Welschriesling	26	35	32	33	47	-	-
Grüner Veltliner	38	38	-	38	39	37	-
Müller-Thurgau	26	-	-	-	48	28	-
Zweigelt	41	45	-	45	46	-	-
Blaufränkisch	46	49	-	-	48	-	46
Sankt Laurent	61	65	61	-	65	-	-

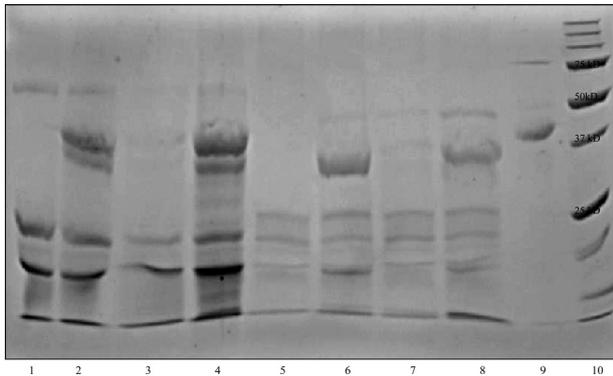


Abb. 1: Coomassie-Färbung der Weinsorten 'Welschriesling' (WR) und 'Zweigelt' (ZW).
 1: WR unbehandelt, 2: WR Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl, 3: WR 1 Ei/hl, 4: WR 3 Eier/hl, 5: ZW unbehandelt, 6: ZW Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl, 7: ZWL 1 Ei/hl, 8: ZW 3 Eier/hl, 9: Eiklar in Wasser, 10: Molekulargewichtsstandard

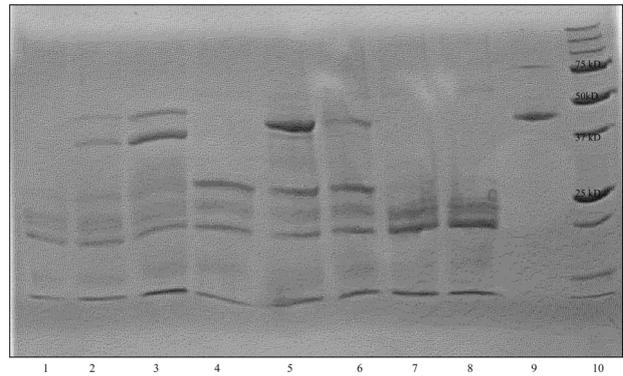


Abb. 2: Coomassie-Färbung der Weinsorten 'Zweigelt' (ZW), 'Blaufränkisch' (BF) und des Rotweincuvee (RW).
 1: ZW unbehandelt, 2: ZW 1 Ei/hl, 3: ZW 3 Eier/hl, 4: BF unbehandelt, 5: BF 2 Eier/hl, 6: BF Albumin getrocknet 10 g/hl, 7: RW 2 Eier/hl, 8: RW unbehandelt, 9: Eiklar in Wasser, 10: Molekulargewichtsstandard

selwirkung mit den Inhaltsstoffen des Weines verändert wurde und das offensichtlich in sehr großen Mengen im Wein zurückbleibt. Die Möglichkeit, dass die Matrix des Weines Einfluss auf die Proteine des Eiklars hat, schließt auch den „Einsalz-Effekt“ (RÖMPP, 1995) mit ein, wodurch eventuell manche Proteine des Hühnereiwisses erst im Wein in Lösung gehen.

Während der Lagerungszeit von 1 bis 3 Monaten werden die Rückstandsmengen abgebaut und somit die Banden unsichtbar (Abb. 3 und 4).

Western Blots

Bezugnehmend auf Abbildung 6 ist anzumerken, dass bei dem mit frischem Eiklar behandelten 'Sankt Laurent' abhängig von der zugesetzten Menge eindeutig Rückstände von Ovalbumin nachgewiesen werden konnten. Bei den auf die gleiche Weise geschönten 'Grünen Veltliner'-Weinen sind keine Behandlungsreste zu erkennen. Dieser Tatsache steht gegenüber, dass sowohl der 'Sankt Laurent' als auch der 'Grüne Veltliner' nach einer Coomassie-Färbung (Abb. 5) mehrere Ban-

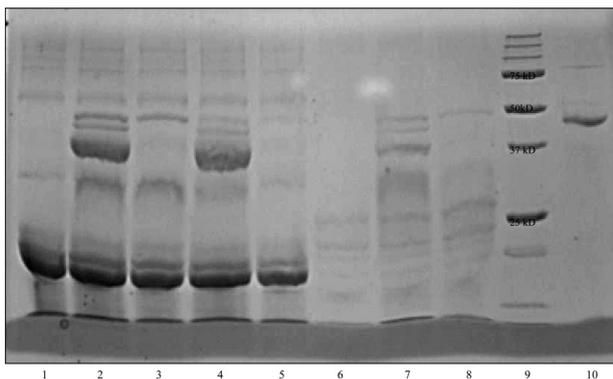


Abb. 3: Coomassie-Färbung der Weinsorten 'Sankt Laurent' (SL) und 'Zweigelt' (ZW).
 1: SL unbehandelt, 2: SL 3 Eier/hl, 3: SL 3 Eier/hl nach 1 Monat, 4: SL Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl, 5: SL Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl nach 1 Monat, 6: ZW unbehandelt, 7: ZW 5 Eier/hl, 8: ZW 5 Eier/hl nach 1 Monat, 9: Standard, 10: Eiklar in Wasser

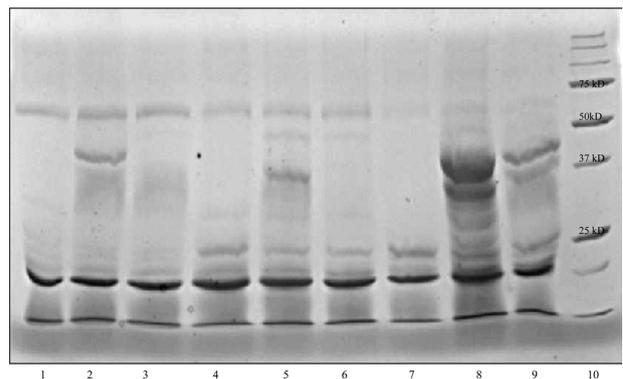


Abb. 4: Coomassie-Färbung der Weinsorten 'Chardonnay' (CH), 'Grüner Veltliner' (GV) und 'Müller-Thurgau' (MT).
 1: CH unbehandelt, 2: CH 3 Eier/hl, 3: CH 3 Eier/hl nach 3 Monaten, 4: GV unbehandelt, 5: GV 3 Eier/hl, 6: GV 3 Eier/hl nach 3 Monaten, 7: MT unbehandelt, 8: MT 3 Eier/hl, 9: MT 3 Eier/hl nach 3 Monaten, 10: Molekulargewichtsstandard

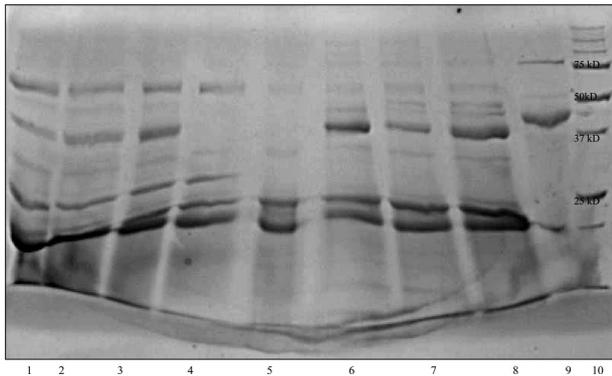


Abb. 5: Coomassie-Färbung der Weinsorten 'Sankt Laurent' (SL) und 'Grüner Veltliner' (GV).

1: GV 1 Ei/hl, 2: GV 3 Eier/hl, 3: GV Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl, 4: GV unbehandelt, 5: SL unbehandelt, 6: SL Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl, 7: SL 1 Ei/hl, 8: SL 3 Eier/hl, 9: Eiklar in Wasser, 10: Molekulargewichtsstandard

den zwischen 45 kD und 75 kD aufweisen. Diese sind nur bei den behandelten Weinen sichtbar, woraus man schließen kann, dass es sich um Proteine des Hühnereiwisses handelt. Die hier verwendete Methode des Western Blottings auf colorimetrischer Basis (DAB-HRP-System) ist hochspezifisch und sollte tausendmal sensitiver als die Färbung mit Coomassieblau sein. Daraus geht hervor, dass in den Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' kein Ovalbumin vorhanden ist und keine dieser Banden am gefärbten Gel dem Ovalbumin zuzuordnen ist. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass am selben Gel

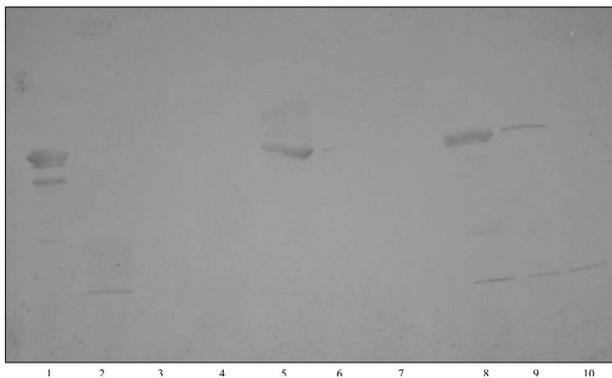


Abb. 7: Western Blot der Weinsorten 'Grüner Veltliner' (GV), 'Blaufränkisch' (BF) und 'Zweigelt' (ZW).

1: Eiklar in Wasser, 2: GV 5 Eier/hl, 3: GV 1 Ei/hl, 4: GV unbehandelt, 5: BF 5 Eier/hl, 6: BF 1 Ei/hl, 7: BF unbehandelt, 8: ZW 5 Eier/hl, 9: ZW 1 Ei/hl, 10: ZW unbehandelt

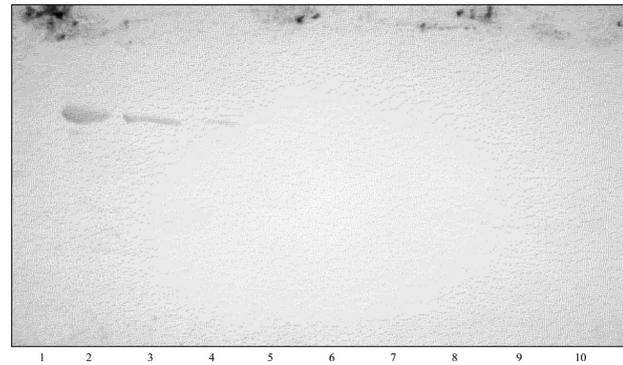


Abb. 6: Western Blots der Weinsorten 'Sankt Laurent' (SL) und 'Grüner Veltliner' (GV).

1: Standard, 2: Eiklar in Wasser, 3: SL 3 Eier/hl, 4: SL 1 Ei/hl, 5: SL Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl, 6: SL unbehandelt, 7: GV unbehandelt, 8: GV Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl, 9: GV 3 Eier/hl, 10: GV 1 Ei/hl

im geschönten 'Sankt Laurent' die Bande um 45 kD das Ovalbumin darstellt. Abbildung 7 zeigt deutlich, dass die Rückstandsmenge, also die Stärke der Banden des Ovalbumins auf der Blotmembran, sehr stark von der zugesetzten Menge an Hühnereiwiss abhängig. In Abbildung 8 wurde bei 'Blaufränkisch' nach der Behandlung mit pasteurisiertem Hühnereiwiss Ovalbumin detektiert, bei 'Zweigelt' jedoch nicht. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich im unterschiedlichen Phenolmuster der Weine zu finden, da diese eiweißhaltigen Schönungsmittel, die ja mit Gerbstoffen koagulieren,

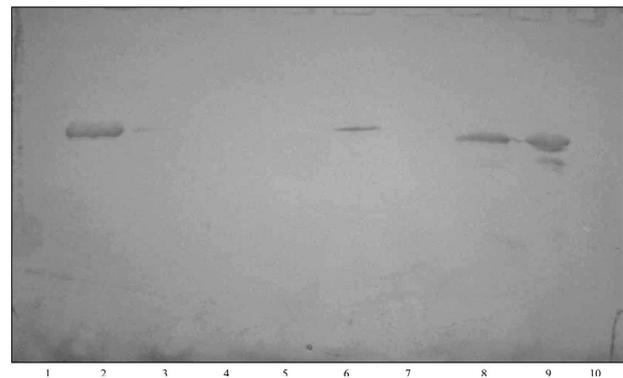


Abb. 8: Western Blot der Weinsorten 'Zweigelt' (ZW) und 'Blaufränkisch' (BF).

1: ZW unbehandelt, 2: ZW 3 Eier/hl, 3: ZW Albumin getrocknet 5 g/hl, 4: ZW Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl, 5: BF unbehandelt, 6: BF 3 Eier/hl, 7: BF Albumin getrocknet 5 g/hl, 8: BF Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl, 9: Eiklar in Wasser, 10: Standard

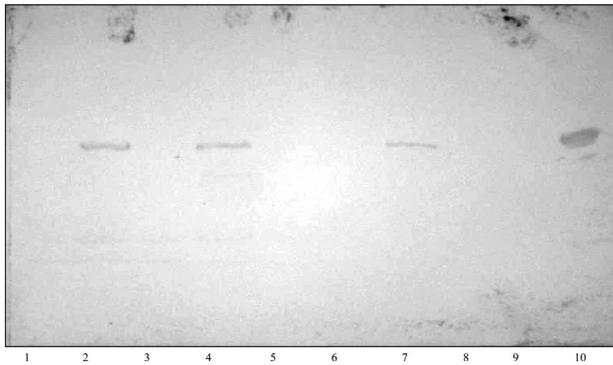


Abb. 9: Western Blot der Weinsorten 'Sankt Laurent' (SL) und 'Zweigelt' (ZW).
 1: SL unbehandelt, 2: SL 3 Eier/hl, 3: SL 3 Eier/hl nach 1 Monat, 4: SL Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl, 5: SL Eiklar pasteurisiert 60 ml/hl nach 1 Monat, 6: ZW unbehandelt, 7: ZW 5 Eier/hl, 8: ZW 5 Eier/hl nach 2 Monaten, 9: Standard, 10: Eiklar in Wasser

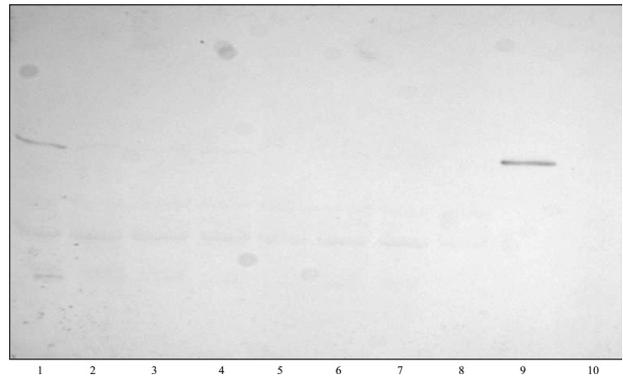


Abb. 10: Western Blot des Weißweins einen Tag nach der Schönung mit 3 Eiern/hl.
 >1: 0,1 Liter, 2: 0,2 Liter, 3: 0,5 Liter, 4: 1 Liter, 5: 5 Liter, 6: 10 Liter, 7: 20 Liter, 8: Weißwein unbehandelt, 9: Eiklar in Kunstwein, 10: Molekulargewichtsstandard

abhängig von der Weinsorte unterschiedlich reagieren. Während einer Lagerungszeit von 1 bis 3 Monaten wird das nach der Schönung im Wein noch vorhandene Ovalbumin allmählich abgebaut und ist mittels Western Blot-Analyse nicht mehr nachweisbar (Abb. 9). Die Untersuchungen des Einflusses der Parameter Weinvolumen, Einwirkzeit und Filterporengröße auf das Schönungsverhalten des Eiklars haben Folgendes ergeben: Bezüglich des Ovalbumins ist anzumerken, dass das kleinste geschönte Volumen des Weißweins (0,1 Liter) sowohl nach einem Tag als auch nach sieben Tagen ein-

wirkt Rückstände aufweist, die mittels Western Blot detektiert wurden (Abb. 10). Grund dafür könnte eine mengenabhängige Sedimentation sein, wodurch bei geringen Volumina die Protein-Phenol-Komplexe kleiner bleiben und auch langsamer sedimentieren. Allerdings sind die Rückstände sieben Tage nach der Schönung schon viel geringer, was bedeutet, dass die Dauer der Einwirkzeit großen Einfluss hat. Bestätigt wird dies auch durch die Tatsache, dass auf den mit Coomassieblau gefärbten Gelen beim Weißwein die vom Eiklar stammende Bande um 35 kD einen Tag nach der Schö-

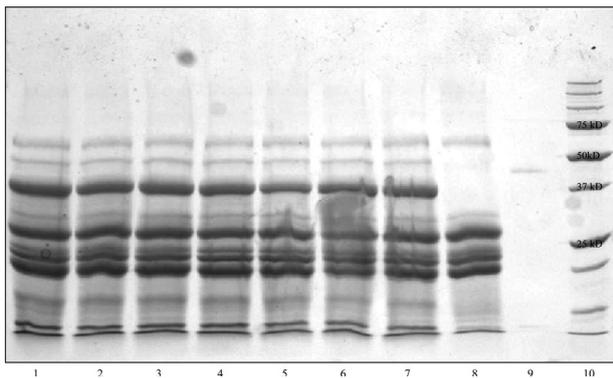


Abb. 11: Coomassie-Färbung des Weißweins einen Tag nach der Schönung mit 3 Eiern/hl.
 1: 0,1 Liter, 2: 0,2 Liter, 3: 0,5 Liter, 4: 1 Liter, 5: 5 Liter, 6: 10 Liter, 7: 20 Liter, 8: Weißwein unbehandelt, 9: Eiklar in Kunstwein, 10: Molekulargewichtsstandard

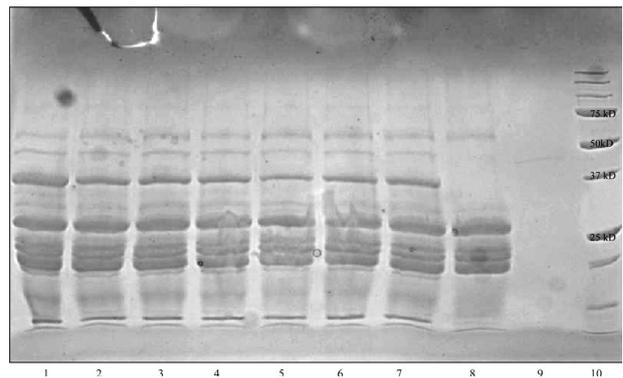


Abb. 12: Coomassie-Färbung des Weißweins sieben Tage nach der Schönung mit 3 Eiern/hl.
 1: 0,1 Liter, 2: 0,2 Liter, 3: 0,5 Liter, 4: 1 Liter, 5: 5 Liter, 6: 10 Liter, 7: 20 Liter, 8: Weißwein unbehandelt, 9: Eiklar in Kunstwein, 10: Molekulargewichtsstandard

nung viel deutlicher ausgeprägt ist als eine Woche danach (Abb. 11 und 12). Ob die Porengröße des Filters 2 µm oder 0,45 µm beträgt, hat keinen Einfluss auf die Rückstandsmengen des Eiklars im Wein.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Schönung mit frischem, pasteurisiertem oder getrocknetem Hühnereiweiß am ehesten Rückstände im Wein hinterlässt, wenn das Volumen des geschönten Weines gering, die Menge an Schönungsmitteln sehr hoch oder die Einwirkzeit kurz ist und wenn Weine mit niedrigem Gehalt an Gesamtphenolen (vor allem Weißweine) behandelt werden.

In den in kellertechnisch praxisrelevanten Mengen hergestellten Weinen konnten keine Rückstände nachgewiesen werden. Manchmal wird dem Wein (vor allem Weißwein) in der Praxis nach einer Behandlung mit eiweißhaltigen Schönungsmitteln noch Kieselsol (15% oder 30% kolloidale Kieselsäure) zugesetzt. Dadurch werden die positiv geladenen Proteinreste mit den zugesetzten negativ geladenen Teilchen gefällt und der Wein auf diese Weise von den Schönungsmittelrückständen befreit.

Weiters werden in der Praxis notwendige Bentonitbehandlungen des Weines nach den Gerbstoffschönungen durchgeführt und somit auch allfällige Eiweißreste entfernt.

Was vom Hühnereiweiß im Wein zurückbleibt, ist nicht immer das stark allergen wirkende Ovalbumin, sondern sind andere Proteine des Eiklars ohne oder mit geringerer Allergenität. Da aber schon ganz geringe Mengen eines Allergens eine Reaktion bei sensibilisierten Perso-

nen auslösen können, sind auf diesem Gebiet der Allergenität weiterführende Untersuchungen mit Hühnereisensibilisierten Probanden durch eine autorisierte Stelle dringend notwendig.

Literatur

- BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgramm utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- EU (1999): Verordnung (EG) Nr. 1493/1999 des Rates vom 17. Mai 1999 über die gemeinsame Marktorganisation für Wein. *Amtsblatt Nr. L 179 vom 14.7.1999*, S. 1-84
- EU (2003): Richtlinie 2003/89/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 10. November 2003 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG hinsichtlich der Angabe der in Lebensmitteln enthaltenen Zutaten. *Amtsblatt Nr. L 308 vom 25.11.2003*, S. 15
- JÄGER, L. und WÜTHRICH, B. (1998): Nahrungsmittelallergien und -intoleranzen. - Stuttgart: G. Fischer, 1998
- RING, J. (1996): Nahrungsmittelallergie - Stand der Wissenschaft und aktuelle Probleme in Forschung und Praxis. *Fortschritte der Allergologie und klinische Immunologie. Beiträge der 20. Tagung der DGAI*, pp. 172-185. - Freiburg: HMV Medien und Medizinverlag, 1996
- ROMPP (1995): *Chemielexikon*, S.1084 und S. 3157. - Stuttgart: Thieme, 1995
- SERVA (2005): BlueG Färbung, SERVA-Elektrophoresis Katalog S. 229. - Heidelberg, 2005
- WENINGER, H. und GÖRTGES, S. (2005): Allergenität und Rückverfolgbarkeit von Weinbehandlungsmitteln aus Sicht des Produzenten. *Tagungsbericht 60. ALVA-Tagung*; S. 43-46. - Wien, 2005
- WÜRDIG, G. und WOLLER, R. (1998): *Chemie des Weines*. - Stuttgart: Ulmer, 1998

Manuskript eingelangt am 18. April 2006