

Entwicklung eines immunologischen Schnelltests zur Bewertung der Hefeflora in Most und Wein

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz Institut für Weinbau und Oenologie, Neustadt/Weinstraße Prof. Dr. Ulrich Fischer/Prof. Dr. Maren Scharfenberger-Schmeer
Forschungsstelle II:	Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie, Bereich Angewandte Oekologie, Schmallenberg Prof. Dr. Christoph Schäfers/Dr. Mark Bücking/Dr. Cecilia Diaz
Industriegruppe:	Deutscher Weinbauverband e.V., Bonn Projektkoordinator: Walter Brahner, Vier Jahreszeiten Winzer eG, Bad Dürkheim
Laufzeit:	2015 - 2017
Zuwendungssumme:	€ 311.780,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Bei der Weinbereitung spielen Mikroorganismen eine zentrale Rolle, sei es bei der alkoholischen Gärung durch Hefen oder bei der malolaktischen Fermentation durch Milchsäurebakterien. Gleichzeitig können diverse Schadhefen und -bakterien die Inhaltsstoffe des Weins in fast allen Phasen der Herstellung negativ beeinflussen. Daher wird die Mikroflora während der Gärphase, außer bei Spontangärungen, aktiv durch Beimpfen mit Reinzuchtheferen bzw. Bakterien-Starterkulturen gelenkt. Nach der Gärung wird versucht, die mikrobielle Aktivität durch mechanische, physikalische und chemische Maßnahmen zur Keimreduktion zu steuern und spätestens zur Abfüllung ganz zu unterbinden. Kenntnisse über die Zusammensetzung der Hefe- und Bakterienflora sind somit in allen Produktionsabschnitten der Weinbereitung essentiell: einerseits zur Sicherzustellung einer zuverlässigen und zügigen alkoholischen bzw. malolaktischen Fermentation, andererseits zur frühzeitigen Erkennung mikrobiell belasteter Moste bzw. Weine. Entsprechende Gegenmaßnahmen, wie Schwefeln, Filtrieren oder Pasteurisie-

ren, können ergriffen werden, bevor Fehltonen sensorisch bemerkbar werden. Gleichzeitig wird die Sicherheit bei der Filtration und Abfüllung sowie dem globalen Transport nicht steril abgefüllter Fassweine deutlich erhöht. Dies reduziert die Ausfallkosten der Hersteller und steigert die Weinqualität und den Vermarktungserfolg der Produkte.

Zur Analyse der Hefe- und Bakterienflora existieren in der Praxis bisher ausschließlich Verfahren, die aufgrund der benötigten technischen Expertise mit einem hohen Kostenaufwand verbunden sind. Zudem liegt das Analyseergebnis meist erst nach Tagen vor und kommt damit für eine Entscheidungsfindung zu spät. Daher besteht insbesondere in den kleineren Unternehmen der Weinwirtschaft ein großer Bedarf für ein einfaches und preisgünstiges Verfahren zur raschen Detektion von Mikroorganismen vor Ort, das aufgrund eines breiten Anwendungsspektrums in allen Abschnitten der Produktion eingesetzt werden kann. Immunologische Schnelltests in Form von Teststreifen erfüllen diese Anforderungen. Diese können ohne besonderen technischen und fachpersonellen Aufwand direkt in einer

Most- oder Weinprobe durch Eintauchen des Teststreifens angewendet werden und liefern das Testergebnis innerhalb von 30 Minuten.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, ein derartiges Nachweisverfahren für Schadhefen bzw. für den Nachweis von *Saccharomyces cerevisiae* zu entwickeln.

Forschungsergebnis:

Für die Antikörpergenerierung wurden mithilfe zuvor auf Reinheit geprüfter Zellkulturen polyklonale Seren generiert, aufgereinigt und auf Spezifität, Sensitivität und Matrixabhängigkeit getestet. Dazu wurde ein ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) durchgeführt. Hierbei wird das nachzuweisende Antigen über einen Erstantikörper an eine Mikrotiterplatte adsorptiv gebunden und angereichert, ein Enzym-gekoppelter Zweitantikörper führt zur Reaktion eines Farbstoffsubstrates. Die Farbtintensität wird bei einer bestimmten Wellenlänge quantitativ vermessen.

Parallel hierzu wurde eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt, um die Zellzahlen vergleichend zu bestimmen. Zur Überwachung der Gärung und zur Bestimmung der Weinfehler wurden die FTIR-Spektroskopie, enzymatische Bestimmungen und deskriptive sensorische Analysen eingesetzt.

Die Kreuzreaktivitäten sind bei den meisten Antikörperpräparationen recht hoch. Daher wurden im Weiteren zwei Strategien verfolgt. Die erhaltenen Seren wurden mittels einer Säulenchromatographie aufgereinigt. Diese wurden auf Sensitivität und auf Kreuzreaktivitäten mittels ELISA untersucht. Die ELISA-Ergebnisse zeigten eine grundsätzlich verbesserte Spezifität, aber eine Neigung zur Kreuzreaktivität. Für die Gattung *Pichia sp.* steht ein polyklonaler Antikörper zur Verfügung, der kaum Kreuzreaktivität aufweist und somit für einen Schnelltest verwendet werden kann. Der Antikörper weist Zellzahlen ab 10^3 Zellen/ml im ELISA nach. Zudem ist er gattungsspezifisch und weist nicht nur den Stamm, der für die Immunisierung verwendet wurde, nach, sondern auch die Arten *Pichia anomala*, *Pichia fermentans* und *Pichia klyuveri*. Dies ist zur Anwendung in der Praxis positiv zu bewerten. Zudem wurden Gärungen im Versuchsmaßstab mit

Pichia sp. durchgeführt, um die vorgesehenen Methoden zur Evaluierung der Antikörper zu etablieren und Grenzen für die Menge an Zellzahlen festzulegen, die für die Entwicklung eines Weinfehlers nötig sind. Für die Gärungen mit *Pichia sp.* wurde eine Zunahme der Konzentration an Ethylacetat gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis durch den Antikörper auch mit fortschreitender Gärung, also mit zunehmendem Alkoholgehalt, funktioniert.

Gemeinsam mit der Firma Immundiagnostik AG, Bensheim, wurde ein Antikörper zur Detektion von *Hanseniaspora uvarum* entwickelt, der spezifisch für den Zielorganismus ist und keine Kreuzreaktivitäten aufweist. Die Ergebnisse konnten nicht nur mit den Zellwandpräparaten, sondern auch mit lebendem Zellmaterial in einer seriellen Verdünnung reproduziert werden. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 10^4 Zellen/ml und damit im praxisrelevanten Bereich. Auch die Anwendung auf einem Universalteststreifen war erfolgreich. Zusätzlich können mit diesem Antikörper *H. uvarum*-Stämme weltweit, auch aus Australien und den USA, detektiert werden. Auch dieser Antikörper wurde in Gärungen im Versuchsmaßstab erfolgreich eingesetzt. Es war möglich, während der Gärungen mit zunehmendem Alkoholgehalt schadhafte Proben mit dem ELISA nachzuweisen.

Letztendlich wurden mit den beiden Antikörpern auch Schritte hin zur Dipstick-Entwicklung unternommen. Die spezifischen Antikörper wurden mit Biotin und FITC markiert. So konnten Schadhefen auf einem Universalteststreifen der Firma Milenia Biotec, Gießen, innerhalb von 20 min nachgewiesen werden. Auch wurden von Forschungsstelle 1 verschiedene Methoden zur Zelllyse getestet. Eine Weiterentwicklung des Testsystems mit einer Auswertung mittels SmartphoneApp in Zusammenarbeit mit der Fa. Immundiagnostik ist geplant.

Zur Machbarkeitsstudie zur Entwicklung von Antikörpern für den Nachweis von Bakterien wurden polyklonale Antiseren gegen *Oenococcus oeni*-Zellwandpräparate hergestellt. Die erhaltenen Antikörperseren sind ungeeignet für den Nachweis. Mit einer alternativen Antikörperentwicklung, dem rekombinanten Phage-Display, wurde in Zusammenarbeit mit der AIPlanta, Institut für

Pflanzenforschung, Neustadt a.d.W., ein scFv-Antikörperfragment gegen eine BSA-Starterkultur produziert. Dieses ist sehr spezifisch für die Zellen, die zur Erstellung des Antikörperfragments eingesetzt wurden. Damit steht für die Detektion von Schadbakterien ein alternatives Verfahren für ein Folgevorhaben zur Verfügung.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Durch den Klimawandel erhöhen sich die pH-Werte in Mosten und Weinen, was zu erhöhten Zellzahlen führt. Gleichzeitig nimmt bei höheren pH-Werten die mikrobiocidale Wirkung der SO₂ ab, so dass sich durch Schadmikroorganismen verursachte Schäden erhöhen. Während der Weinbereitung ist somit eine Kontrolle der Mikroflora wichtig, um Schäden zu vermeiden. Hier kann durch den Einsatz des entwickelten Schnelltests die wirtschaftliche Sicherheit der Weinproduzenten erhöht werden. Für Kellereien und Weinlabore ergibt sich ein großer wirtschaftlicher Nutzen, da aktuell keine andere zeitnahe Kontrolle der Mikroflora der Weine möglich ist. Durch den Schnelltest kann direkt in der Wein- bzw. Probenannahme der mikrobielle Status dokumentiert und ggf. Wein abgelehnt werden. Für den Weinimport und -export ist der Schnelltest eine große Bereicherung, da zusätzlich zur Detektion der Schadbakterien auch die Lokalisation des Infektionsherdes festgehalten werden kann und damit Streitigkeiten um die Ursache einer Verunreinigung ausgeschlossen werden können. Gerade bei längeren Transportwegen aufgrund der zunehmenden Globalisierung ist dies ein großes Problem. Zusätzlich ist es den KMU dadurch möglich, nach der Abfüllung Weine auf ihre Sterilität hin zu überprüfen und damit Ausfälle durch Schäden in den Flaschen zu vermeiden.

Für immunologische Labors und Hersteller immunologischer Teststreifen ergibt sich die Möglichkeit zur Herstellung und zum Vertrieb der Schnelltests, die im Rahmen des Projekts entwickelt werden. Zudem wurde gezeigt, in welchem Rahmen quantitative Aussagen zur Detektion von Mikroorganismen möglich sind. Dies ist bei medizinischen Fragestellungen bislang nicht die Re-

gel, da hier eine Positivdetektion ohne Quantifizierung ausreichend ist. Zudem werden durch die Entwicklung einer Smartphone-App neue Technologien erschlossen. Für die Hersteller von Mikroorganismen für die Weinindustrie ergibt sich durch den Einsatz der Schnelltests eine zusätzliche Kontrolle, um Verunreinigungen der Kulturen zu vermeiden und frühzeitig zu erkennen. Dadurch kann die Gefahr von Mischkulturen auf dem Markt gesenkt und die Qualität der Produkte erhöht werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2017.
2. Rex, F. & Scharfenberger-Schmeer, M.: Implementation of a rapid antibody based method to detect *Pichia sp.* and *Hanseniaspora uvarum* during the whole winemaking process. BIO Web Conf. 15, 02004, <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191502004> (2019).
3. Rex, F. & Scharfenberger-Schmeer, M.: Mikrobielle Störungen im Wein frühzeitig erkennen. DLR Rheinpfalz im Blick, 46-48 (2018).
4. Rex, F. & Scharfenberger-Schmeer, M.: Schnelltest auf Mikroorganismen. Dt. Weinmag. 19, 11-13 (2018).
5. Rex, F., Fischer, U. & Scharfenberger-Schmeer, M.: Entwicklung eines immunologischen Schnelltests zur Bewertung der Hefeflora in Wein. DLR Rheinpfalz aktuell, 31-33 (2016).

Weiteres Informationsmaterial:

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz
Institut für Weinbau und Oenologie
Breitenweg 71, 67435 Neustadt/Weinstraße
Tel.: +49 6321 671-359
Fax: +49 6321 671-222
E-Mail: maren.scharfenberger-schmeer@dlr.rlp.de

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME)
Bereich Angewandte Ökologie
Auf dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg
Tel.: +49 2972 302-304
Fax: +49 2972 302-319
E-Mail: mark.buecking@ime.fraunhofer.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

... ein Projekt der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



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 Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.