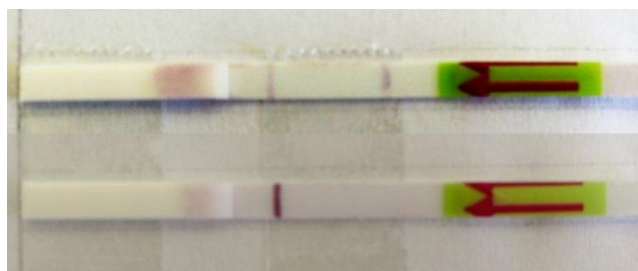


Entwicklung eines immunologischen Schnelltests zur Detektion von Schadbakterien in Most und Wein



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz (DLR), Neustadt/Weinstraße Institut für Weinbau und Oenologie Prof. Dr. Ulrich Fischer/Prof. Dr. Maren Scharfenberger-Schmeer/ Dr. Friederike Rex AgroScience GmbH AIPlanta - Institut für Pflanzenforschung, Neustadt/Weinstraße Prof. Dr. Gabriele Krczal/Dr. KaJohn Boonrod
Industriegruppe(n):	Deutscher Weinbauverband e.V. (dvw), Bonn
Projektkoordinator:	Steffan Haub Reh Kendermann GmbH Weinkellerei, Bingen/Rhein
Laufzeit:	2019 – 2022
Zuwendungssumme:	€ 442.370,--

Ausgangssituation

Bei der Weinbereitung nimmt die Mikroflora eine zentrale Rolle ein und beeinflusst Produktionsschritte vom Lesegut bis zur Flasche. Im Vordergrund steht vor allem die durch Hefen vermittelte alkoholische Gärung, aber auch die Bedeutung der durch Milchsäurebakterien vermittelten malolaktischen Fermentation (MLF) geht mittlerweile über das reine Säuremanagement bei Rotwein hinaus. Zahlreiche Stoffwechselwege und damit Stoffwechselprodukte beider Fermentationen sind letztlich ausschlaggebend für die Zusammensetzung und Beschaffenheit des Endproduktes Wein; gleichzeitig können diverse Schadbakterien die Inhaltsstoffe des Weins negativ beeinflussen. Es liegt vor allem im Geschick der Kellermeister, die Gärprozesse zugunsten des gewünschten Produktes zu beeinflussen. Während die Beschaffenheit des Mostes teilweise durch die Verarbeitung des Leseguts steuerbar ist, kann die Zusammensetzung der Mikroflora direkt durch Beimpfungen mit gewünschten Kulturen sowie durch Sterilisations- und Hygienemaßnahmen beeinflusst werden. Während der Gärung erfolgt die Beeinflussung des mikrobiellen Stoffwechsels durch die Steuerung von Parametern, wie Gärvolumen, Temperatur, Zeit, Umwälzung oder Luftkontakt. Durch das finale Abschwefeln können unerwünschte mikrobielle Aktivitäten auf der Flasche weitgehend vermieden werden.

Es existieren zwar diverse Methoden zur Bewertung der mikrobiellen Situation während und nach der Gärung, bei denen z.B. über mikroskopische Verfahren die Mikroorganismen selbst oder durch sensorische Kontrollen sowie durch verschiedene technische Hilfsmittel ihre Stoffwechselprodukte erfasst werden, viele dieser Parameter verändern sich allerdings erst dann signifikant, wenn eine mikrobielle Entgleisung nur noch schwer aufzuhalten und zu steuern ist.

In den letzten Jahrzehnten wurden Techniken und Verfahren entwickelt, die zwar eine Überwachung der mikrobiellen Situation erlauben, jedoch sind diese Verfahren wegen hoher Investitions- und Folgekosten sowie erforderlichen Fachpersonals großen Kellereien mit eigenen Labors vorbehalten und sind vor allem kleinen Unternehmen nicht zugänglich. Gleichzeitig steigen die Qualitätsanforderungen an den deutschen Wein unter wachsendem internationalen Wettbewerbsdruck stetig und damit auch die Anforderungen an die Winzer, die Gärungen stetig und schnell überwachen zu müssen. Für die Praxis fehlt bislang ein Verfahren, mit dem sicher, einfach und kostengünstig Schadbakterien in Most und Wein analysiert werden können.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, mittels Phage-Display-Technologie eine schnelle, zuverlässige und preiswerte Analysenmethode zu entwickeln, mit der in allen Abschnitten der Weinbereitung bis hin zur Reifung, Abfüllung und dem Transport Schadbakterien frühzeitig detektiert werden können, bevor ihr Einfluss sensorisch oder analytisch erkennbar wird.

Forschungsergebnis

Die in 2019 ausgewählten Stämme *Acetobacter aceti* (DSM 3508), *Pediococcus pentosaceus* (DSM 20336), *Lactobacillus brevis* (DSM 1268) und *Gluconobacter oxydans* (Isolierung aus Most, 2017) und weitere in der Stammsammlung des DLR Rheinpfalz vorhandenen Bakterienstämme der jeweiligen Art wurden beständig mittels 16S-Sequenzierung auf ihre Reinheit hin bestimmt und für die Entwicklung von Antikörpern bereitgestellt.

Zudem wurden eine Vielzahl an Mikrovinifikationen mit Milch- und Essigsäurebakterien sowie unter Einsatz verschiedener Bioprotektoren und weiterer Hilfsstoffe zur Bakterienunterdrückung durchgeführt. Dadurch konnten Zellkonzentrationsbereiche definiert werden, die oenologisch sinnvoll im Schnelltest abgebildet werden sollen. Zur Evaluierung der Zellzahlen, die mittels der Antikörper im ELISA detektiert werden, wurde ein qPCR-Nachweis etabliert, mit dem es möglich ist, drei der vier Zielorganismen und enge Verwandte spezifisch nachzuweisen.

Für die Antikörperentwicklung für den Schnelltest wurde zunächst versucht, mit Hilfe der Phage-Display-Technologie scFv-Antikörperfragmente zu generieren.

Zur Generierung des scFv für den Nachweis von Essigsäurebakterien wurde neben der Membranfraktion ein hochkonserviertes Protein der *Acetobacter*-Gattung, die Alkoholdehydrogenase (ADH) ausgewählt. Allerdings konnten die selektierten monoklonalen Phagen aufgrund ihrer Bindeeigenschaften nicht als gattungsspezifischer Antikörper für die Entwicklung des Testkits verwendet werden.

Für die Antikörperentwicklung gegen die Gattungen *Lactobacillus* wurde ein unter Milchsäurebakterien konserviertes Transmembranprotein (SplA) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die polyklonalen Phagen spezifisch an das Protein SplA von *L. brevis* und das SplA einiger weiterer Bakterien der Gattung *Lactobacillus* binden. Aufgrund technischer Probleme (das für den betreffenden scFv kodierende Gen enthielt ein Stoppcodon) konnte diese Entwicklung leider nicht fortgesetzt werden.

Darüber hinaus ist auch nicht gelungen, spezifische scFvs für Bakterien der Gattungen *Pediococcus* und *Gluconobacter* zu generieren.

Die Generierung von polyklonalen Antikörpern mit der Hilfe von Kaninchen erwies sich hingegen als vielversprechend: Mit den Antigenen der Forschungsstelle produzierte polyklonale Anti-ADH- und Anti-GroEl-Antikörper banden spezifisch an Bakterien der *Acetobacter*- und *Lactobacillus*-Gattungen, so dass sie zur Entwicklung eines Schnelltest-Kits verwendet werden können.

Für die Entwicklung eines Schnelltests-Kit sind nicht nur die hohe Affinität und Empfindlichkeit der Antikörper entscheidend, sondern auch die Methode zur Extraktion des Zielproteins aus den Bakterienzellen ist wichtig.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von TEG-Puffer und Hitze ausreicht, um das Zielprotein aus *Lactobacillus* Bakterien zu extrahieren, während Harnstoffpuffer verwendet werden kann, um das Zielprotein aus *Acetobacter*-Bakterien zu extrahieren.

Schließlich gelang es mit der Selektion des monoklonalen Nanokörpers A6 (ausgewählt aus einer Kamel-Nanokörper-Phagenbibliothek, die erst gegen Ende des Projekts zur Verfügung stand) die Generierung eines Kandidaten für die Entwicklung eines Schnelltests für den Nachweis von *Acetobacter*-Bakterien, der möglicherweise in Kombination mit dem polyklonalen Anti-ADH verwendet werden könnte.

Um zu demonstrieren, dass die o. g. polyklonalen Antikörper für die weitere Entwicklung eines Schnelltest-Kits verwendet werden können, wurde ein einfacher Dipstick-Test entwickelt, der zeigte, dass die beiden polyklonalen Antikörper die rekombinanten Antigene detektieren können. Dieser Prototyp zeigte auch mit Praxisproben aus dem Herbst 2021 erste vielversprechende Ergebnisse.

Wirtschaftliche Bedeutung

Die deutsche Weinwirtschaft besteht aus rd. 162.000 weinerzeugenden Betrieben, die fast ausschließlich zu den kleinen und mittelständischen Unternehmen gehören. Im Mittel der Jahre 2014 bis 2016 wurden in Deutschland ca. 900 Mio. Liter Wein erzeugt und ein Gesamtumsatz von über 1 Mrd. € erwirtschaftet; damit zählt Deutschland zu den zehn größten Weinproduzenten der Welt.

Schäden durch Bakterien oder Hefen sind nicht genau bezifferbar, da sie nicht meldepflichtig sind. Durch den Klimawandel erhöhen sich jedoch die pH-Werte, was zu erhöhten Zellzahlen führt; gleichzeitig nimmt bei höheren pH-Werten die mikrobiocide Wirkung der SO₂ ab, so dass sich die durch Schadmikroorganismen verursachten Schäden erhöhen. Während der Weinbereitung ist somit eine Kontrolle der Mikroflora wichtig, um Schäden zu vermeiden.

Die Projektergebnisse haben aufgrund verschiedener, nicht vorhersehbarer Schwierigkeiten zwar nicht unmittelbar zur Entwicklung des projektierten Schnelltests geführt, haben aber die Grundlage für dessen Etablierung gelegt. Die in der Folge des Vorhabens zu erwartenden Ergebnisse werden die Weinerzeuger bei der Sicherung der Weinqualität und damit der Vermarktungsfähigkeit ihrer Produkte durch rechtzeitiges Erfassen adäquater Maßnahmen bei mikrobiellen Entgleisungen unterstützen. Dazu gehören neben klassischen Kontaminationen auch ungewöhnliche Verläufe der malolaktischen Fermentation. Sollte es gelingen, auf Grundlage der Ergebnisse einen Schnelltest zu entwickeln, würde eine Möglichkeit geschaffen, eine prozessbegleitende Überwachung des mikrobiellen Status vor, während und nach der alkoholischen Gärung vorzunehmen.

Aufgrund der Unabhängigkeit von der Matrix könnten sowohl Moste und Weine als auch Spüllösungen oder resuspendierte Filtrerrückstände untersucht werden. Die Betriebe könnten mit dem Test eine schädliche Mikroflora frühzeitig erkennen und rechtzeitig mit geeigneten oenologischen Maßnahmen, wie Schwefeln, Absenkung des pH-Wertes, Filtration oder Flash-Pasteurisierung, reagieren. Somit könnte die Qualität der Weine gesteigert und gleichzeitig das wirtschaftliche Risiko minimiert werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2022.

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

Weiteres Informationsmaterial

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinland (DLR),
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

AgroScience GmbH
AIPlanta - Institut für Pflanzenforschung
Breitenweg 71, 67435 Neustadt/Weinstraße
Tel.: +49 6321 671-1301
Fax: +49 6321 671-1313
E-Mail: gabi.krczal@agrosience.rlp.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

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das IGF-Vorhaben **AiF 20292 N**
der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI),
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn,
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.