

# Weinproteine

## Allergenität & Trubbildung

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie  
der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Nadine Jäckels  
geb. am 28.07.1983, Trier

Mainz, 2014



---

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

---

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden in den angegebenen Publikationen veröffentlicht:

Jaeckels N., Tenzer S., Rosfa S., Schild H., Decker H., Wigand P. (2013): Purification and structural characterisation of lipid transfer protein from red wine and grapes. *Food Chem* 138: 263-269

Jäckels N., Fronk P., Decker H.: Einfluss der Bentonitschönung auf die Proteinzusammensetzung im Wein. *Deutsches Weinbaujahrbuch 2016* (eds. Schulz H.R., Stoll M.), angenommen

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IX</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 WEIN</b>	<b>1</b>
1.1.1 WEINHERSTELLUNG	1
<b>1.2 BESTANDTEILE DES WEINS UND IHRE HERKUNFT</b>	<b>3</b>
1.2.1 PHENOLE	3
1.2.2 POLYSACCHARIDE	4
1.2.3 PROTEINE	7
<b>1.3 WEINUNVERTRÄGLICHKEIT</b>	<b>11</b>
1.3.1 ALLERGIE	12
1.3.2 KREUZALLERGENITÄT	13
1.3.3 URSACHEN FÜR WEINUNVERTRÄGLICHKEITEN	14
<b>1.4 MAßNAHMEN ZUR ENTFERNUNG VON PROTEINEN AUS DEM WEIN</b>	<b>15</b>
1.4.1 TRÜBUNG UND IHRE URSACHEN	16
1.4.2 SCHÖNUNG	17
1.4.3 BENTONIT	17
<b>1.5 ZIELSETZUNG</b>	<b>20</b>
<b>2 MATERIALIEN</b>	<b>21</b>
<b>2.1 GERÄTE</b>	<b>21</b>
<b>2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN</b>	<b>24</b>
<b>2.3 CHEMIKALIEN</b>	<b>25</b>
2.3.1 PUFFER	25
2.3.2 BRADFORD ASSAY	25
2.3.3 GELELEKTROPHORESE	26
2.3.4 PROTEINFÄRBUNGEN	26
2.3.5 GLYKOPROTEINFÄRBUNGEN	27
2.3.6 WESTERN BLOT	27
<b>2.4 PUFFERLÖSUNGEN</b>	<b>28</b>
2.4.1 PROTEINAUFREINIGUNG	28

2.4.2	GELELEKTROPHORESE	28
2.4.3	FÄRBEMETHODEN	30
2.4.4	WESTERN BLOT	32
<b>2.5</b>	<b>VERWENDETE WEINE</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>BRADFORD ASSAY</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>DIALYSE</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>LYOPHILISATION</b>	<b>38</b>
<b>3.4</b>	<b>PVP-FÄLLUNG</b>	<b>38</b>
<b>3.5</b>	<b>POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE</b>	<b>38</b>
3.5.1	SDS-PAGE	39
3.5.2	NATIVE PAGE	39
<b>3.6</b>	<b>ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE</b>	<b>40</b>
<b>3.7</b>	<b>COOMASSIE-FÄRBUNG</b>	<b>40</b>
<b>3.8</b>	<b>SILBERFÄRBUNG</b>	<b>41</b>
<b>3.9</b>	<b>GLYKOPROTEINFÄRBUNG</b>	<b>41</b>
3.9.1	ALCIAN BLAU FÄRBUNG	41
3.9.2	PERJODSÄURE-SCHIFF-FÄRBUNG	42
<b>3.10</b>	<b>CHROMATOGRAPHIE</b>	<b>43</b>
3.10.1	GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE	43
3.10.2	KATIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE	43
3.10.3	HYDROPHOBE INTERAKTIONSCHROMATOGRAPHIE	44
<b>3.11</b>	<b>WESTERN BLOT</b>	<b>44</b>
<b>3.12</b>	<b>MASSENSPEKTROMETRIE</b>	<b>46</b>
<b>3.13</b>	<b>HOMOLOGY MODELLING</b>	<b>46</b>
<b>3.14</b>	<b>CIRKULARDICHROISMUS SPEKTROSKOPIE</b>	<b>47</b>
<b>3.15</b>	<b>FLUORESZENZ</b>	<b>47</b>
<b>3.16</b>	<b>DYNAMISCHE DIFFERENZKALORIMETRIE</b>	<b>48</b>
<b>3.17</b>	<b>DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG</b>	<b>48</b>
<b>3.18</b>	<b>HALO-TEST</b>	<b>49</b>
<b>3.19</b>	<b>KLINISCHE STUDIE ZUR UNTERSUCHUNG DER RELEVANZ DES LTP ALS TRAUBEN-ALLERGEN</b>	<b>49</b>
3.19.1	PRICKTEST	50
3.19.2	IMMUNOCAP	51
3.19.3	CELLULAR ALLERGEN STIMULATION TEST	51
3.19.4	IMMUNOBLOTS MIT HUMANEM SERUM	52
<b>3.20</b>	<b>VERWENDETE SOFTWARE</b>	<b>52</b>

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES LIPID TRANSFER PROTEINS</b>	<b>53</b>
4.1.1	PROBENVORBEREITUNG	53
4.1.2	ISOLIERUNG DES LIPID TRANSFER PROTEINS AUS DORNFELDER TRAUBEN UND WEIN	54
4.1.3	CHARAKTERISIERUNG DER LIPID TRANSFER PROTEINE	56
<b>4.2</b>	<b>KLINISCHE STUDIE ZUR UNTERSUCHUNG EINER WEINUNVERTRÄGLICHKEIT</b>	<b>58</b>
4.2.1	PROBANDEN REKRUTIERUNG	59
4.2.2	ALLGEMEINE INFORMATIONEN ÜBER DIE UNTERSUCHTEN PROBANDEN	59
4.2.3	KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN	62
4.2.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE AUS DEN KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN	64
<b>4.3</b>	<b>EINFLUSS VON REBSORTE, LAGE UND KLIMA AUF DIE PROTEINZUSAMMENSETZUNG IN WEINEN</b>	<b>66</b>
4.3.1	VERGLEICH DER PROTEINZUSAMMENSETZUNG VERSCHIEDENER REBSORTEN	66
4.3.2	VERGLEICH DER PROTEINZUSAMMENSETZUNG VERSCHIEDENER JAHRGÄNGE UND LAGEN	68
4.3.3	UNTERSUCHUNG DER DENATURIERUNGSEIGENSCHAFTEN DER PROTEINE IN WEINEN VERSCHIEDENER REBSORTEN	70
<b>4.4</b>	<b>UNTERSUCHUNG VON OENOLOGISCHEN UND WEINBAULICHEN EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE PROTEINZUSAMMENSETZUNG IN MOST UND WEIN</b>	<b>71</b>
4.4.1	EINFLUSS DER OENOLOGISCHEN BEHANDLUNGSMÄßNAHMEN	72
4.4.2	EINFLUSS DER WEINBAULICHEN VARIANTE TROCKENSTRESS	75
4.4.3	EINFLUSS DER SCHÖNUNG AUF DER PROTEINZUSAMMENSETZUNG	80
<b>4.5</b>	<b>WIRKUNGSWEISE VON BENTONIT</b>	<b>84</b>
4.5.1	CHARAKTERISIERUNG DER B-GLUCOSIDASE	87
4.5.2	UNTERSUCHUNG VERSCHIEDENER BENTONITE	89
<b>4.6</b>	<b>AUFREINIGUNG TRÜBUNGSRELEVANTER WEINPROTEINE</b>	<b>92</b>
<b>4.7</b>	<b>VERSUCHE ZUR STABILITÄT VON WEIN</b>	<b>95</b>
4.7.1	EINFLUSS VON POLYSACCHARIDEN AUF DIE TRÜBUNG IM PUFFERSYSTEM	96
4.7.2	EINFLUSS VON POLYSACCHARIDEN AUF DIE TRÜBUNG IM ECHTWEINSYSTEM	107
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>115</b>
<b>5.1</b>	<b>LIPID TRANSFER PROTEIN ALS TRAUBENALLERGEN</b>	<b>115</b>
5.1.1	AUFREINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES LIPID TRANSFER PROTEINS	116
5.1.2	ZUSAMMENFASSUNG DER KLINISCHEN STUDIE	116
5.1.3	TATSÄCHLICHE GEFÄHRDUNG DURCH TRAUBENEIGENE PROTEINE	118
<b>5.2</b>	<b>PROTEINZUSAMMENSETZUNG IM WEIN</b>	<b>119</b>
5.2.1	EINFLÜSSE VON WEINBAULICHEN MAßNAHMEN	119
5.2.2	EINFLÜSSE VON OENOLOGISCHEN MAßNAHMEN	121
<b>5.3</b>	<b>TRÜBUNG</b>	<b>121</b>
5.3.1	WECHSELWIRKUNGEN VON BENTONIT BEI DER WEINSCHÖNUNG	122
5.3.2	PROTEINAUFREINIGUNG	124

---

<b>5.4 WEINSTABILISIERUNG</b>	<b>125</b>
5.4.1 TRÜBUNG UND POLYSACCHARIDE	126
5.4.2 BETRACHTUNG POTENTIELL TRÜBUNGSRELEVANTER EINFLUSSFAKTOREN	128
<b>6 FAZIT</b>	<b>131</b>
<b>7 LITERATUR</b>	<b>132</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>148</b>
8.1 CHROMATOGRAPHIEPROTOKOLLE	148
8.2 VERGLEICH DER LIPID TRANSFER PROTEINE	150
8.3 DERIVED COUNT RATE DER PERMEAT KONTROLLE	150
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>XV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>XXII</b>
<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>XXV</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>XXVII</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>XXIX</b>
<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>XXXI</b>



## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	Da	Dalton, 1Da = 1,6605*10 <sup>-27</sup> kg
&	und	DAO	Diaminooxidase
(v/v)	volume per volume	dest.	destilliert
(w/v)	weight per volume	DHI	5,6-Dihydroxyindol
<	kleiner als	DHICA	5,6-Dihydroxyindol-2-carboxylsäure
>	größer als	DLR	Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum
°C	Grad Celsius	DLS	Dynamische Lichtstreuung
µg	Mikrogramm	DMF	Dimethylformamid
µl	Mikroliter	dn/dc	Brechungsindexinkrement
µm	Mikrometer	DSC	Differential Scanning Calorimetry
2D	zweidimensional	EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
AB	Alcian Blau	engl.	englisch
Abb.	Abbildung	<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
ADH	Alkohol-Dehydrogenase	FNU	Formazine Nephelometric Units
AG	Arabinogalactan	FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat	Fra a 3	Lipid Transfer Protein der Erdbeere <i>Fragaria ananassa</i>
AiF	Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen	g	Gramm
ALDH-2	Aldehyd-Dehydrogenase	GA	Gummi arabicum
AP	Arbeitspaket	GPC	Gelpermeationschromatographie
APS	Ammoniumpersulfat	h	Stunde
AS	Aminosäure	H <sub>2</sub> O	Wasser
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	HCl	Salzsäure
bidest.	zweifach destilliert	Hev b 12	Lipid Transfer Protein aus Latex <i>Hevea brasiliensis</i>
BMWi	Bundesministerium für Wirtschaft und Energie	HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
BPB	Bromphenolblau	hl	Hektoliter
BSA	Bovines Serumalbumin	HPAEC	High Performance Anion Exchange Chromatography
bzw.	beziehungsweise	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ca.	circa	HRP	Meerrettichperoxidase
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid	IEF	Isoelektrische Fokussierung
cal	Kalorie	IgE	Immunglobulin E
CAST	Cellular Antigen Stimulation Test	IgG	Immunglobulin G/Y
CCD	kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten	IL-3	Interleukin 3
CMC	Carboxymethylcellulose	kDa	Kilo-Dalton
Cor a 8	Lipid Transfer Protein der Haselnuss <i>Corylus avellana</i>		
Cp	Wärmekapazität		
d.h.	das heißt		

KEC	Kationenaustausch- chromatographie	pos.	positiv
kg	Kilogramm	Pru av 3	Lipid Transfer Protein der Kirsche <i>Prunus avium</i>
konz.	konzentriert	Pru d 3	Lipid Transfer Protein der Pflaume <i>Prunus domestica</i>
KZE	Kurzzeiterhitzung	Pru p 3	Lipid Transfer Protein des Pfirsichs <i>Prunus persica</i>
l	Liter	PVDF	Polyvinylidenfluorid
LS	Lichtstreuung	PVP	Polyvinylpyrrolidon
LTP	Lipid Transfer Protein	Pyr c 3	Lipid Transfer Protein der Erbse <i>Pyrus communis</i>
m <sup>2</sup>	Quadratmeter	QbA	Qualitätswein bestimmter Anbaugebiete
Mal d 3	Lipid Transfer Protein des Apfels <i>Malus domestica</i>	RG	Rhamnogalacturonan
MAO	Monoaminoxidase	RI	Brechungsindex
max.	maximal	rpm	rounds per minute
MBTH	3-Methyl-2-Benzothiazolinon- Hydrazon	s	Sekunde
mdeg	millidegree	SDS	Natriumdodecylsulfat
mg	Milligramm	SEC	Größenausschlusschromato- graphie
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid	sog.	sogenannte
min	Minute	sLT	Sulfidoleukotrien
ml	Milliliter	Tab.	Tabelle
MS	Massenspektrometrie	TBS	Tris buffered saline
Mus a 3	Lipid Transfer Protein der Banane <i>Musa acuminata</i>	TBST	Tris buffered saline + Tween
MWCO	molekulare Ausschlussgröße	TCA	Trichloressigsäure
N <sub>2</sub>	Stickstoff	TEMED	Tetramethylethyldiamin
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat	TLP	Thaumatococcus-ähnliche Proteine
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Natriumthiosulfat	Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
NaCl	Natrumchlorid	U	Umdrehungen
NBT	p-Nitrobluetetrazolium	u.a.	unter anderem
neg.	negativ	UF	Ultrafiltration
ng	Nanogramm	UV	Ultra violett
nm	Nanometer	vgl.	vergleiche
Nr.	Nummer	Vit	Vitamin
∅	Durchmesser	Vit v 1	Lipid Transfer Protein der Weintraube <i>Vitis vinifera</i>
o-	Ortho	WP	Modellweinproteine
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	z.B.	zum Beispiel
PAS	Perjodsäurefärbung	λ	Wellenlänge
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration		
pI	isoelektrischer Punkt		
pNPP	p-Nitrophenylphosphat		

## Zusammenfassung

Wein ist eine komplexe Lösung bestehend aus verschiedensten Komponenten wie Alkohol, Polyphenolen, Polysacchariden, Sulfiten und auch Proteinen. Auch wenn Proteine nur in geringen Mengen im Wein enthalten sind, beeinflussen sie die Qualität maßgeblich. Hier ist zum einen deren potentielle Unverträglichkeit bis hin zur Allergie zu nennen, und zum anderen der Einfluss der Weinproteine auf die Trübung.

Im Rahmen einer epidemiologischen Studie der Arbeitsgruppe Fronk/Decker wurde festgestellt, dass es in der Weinregion Mainz ein starkes Interesse gibt die Ursache einer Weinunverträglichkeit zu untersuchen. Für weiterführende Untersuchungen wurde im Rahmen meiner Arbeit das Lipid Transfer Protein (LTP), welches als einziges Allergen der Traube bekannt ist, aus Trauben und Wein in hohem Reinheitsgrad isoliert. Es konnte gezeigt werden, dass dessen Struktur bei der Weinherstellung nicht maßgeblich verändert wurde. In einer klinischen Studie mit 29 Probanden wurde die potentielle Allergenität von Weinproteinen, im Besonderen des LTPs untersucht. Allerdings konnte bei den untersuchten Probanden keine echte IgE-Antikörper-vermittelte Allergie auf das LTP nachgewiesen werden. Daher wird die Ursache der beschriebenen Unverträglichkeiten bei anderen Weinhaltstoffen oder auch auf pollenassoziierten Kreuzreaktionen vermutet.

Bei der Entstehung einer Weintrübung sind zahlreiche Inhaltstoffe beteiligt. Die Rolle der Proteine ist in diesem Zusammenhang noch nicht abschließend geklärt. In dieser Arbeit wurde die Komplexität der Proteinzusammensetzung in Abhängigkeit von Lage, Jahrgang, Rebsorte sowie Behandlungsmaßnahmen gezeigt. Hinsichtlich der Stabilisierung und Trübungsrelevanz der Weinproteine konnte mittels biochemischer, bioinformatischer und biophysikalischer Methoden gezeigt werden, dass nur ein Teil der im Wein enthaltenen Thaumatin-ähnlichen Proteine und Chitinasen an der Trubbildung beteiligt sind. Die Invertase hingegen denaturiert erst ab einer Temperatur von ca. 83 °C und aggregiert in der Trübung. Somit führt dieses Protein bei Wärmetests zu Bentonitbedarfsermittlung in diesem Temperaturbereich zu einer Überschätzung. Die Versuche zur temperaturabhängigen Aggregation von Proteinen zeigen, wie wichtig die Berücksichtigung der Umgebungsfaktoren bei der Trubbildung ist. So konnten unterschiedliche Wechselwirkungen im Puffer- und realen Weinsystem von potentiell trübungsstabilisierenden Polysacchariden mit den Weinproteinen detektiert werden. Für das Arabinogalactan beispielsweise wurde in den Versuchen im Weinsystem eine destabilisierende Wirkung gefunden, während es bei den Versuchen im Puffersystem eine positive Wirkung auf die Stabilisierung der Probe zeigte.

Es zeigte sich, dass die verschiedenen Weinhaltstoffe in einer komplexen Wechselwirkung zueinander stehen und somit eine molekulare Interpretation erschweren.



**Abstract**

Wine is a complex solution of various components such as: alcohol, polyphenols, polysaccharides, sulfites, and proteins. Although proteins are present in only small amounts in wine, they can influence the quality significantly. Not only can wine proteins trigger allergic reactions, they can also influence turbidity.

Within the framework of an epidemiological study conducted by the Fronk/Decker working group, it was discovered it would be of great interest to examine the causes of wine intolerances within the wine region of Mainz. In further studies, I was able to purify the lipid transfer protein (LTP), considered as the single grape allergen, from grapes and wine of high degree. Its structural stability during the vinification process could be demonstrated. In a clinical study of 29 participants, the potential for an allergic reaction to the wine proteins, particularly LTP, was examined. The members of the subject group exhibited no true IgE-mediated allergy to the LTP. Therefore, the cause of the described intolerance reactions is suspected to be either other wine components or pollen-associated cross-reactions.

Numerous components are likely to influence haze formation in wine. In this context, the role of proteins is not fully understood. I was able to show the complexity of the protein composition is a function of the growing region, vintage, grape variety, and oenological practices. In regard to the stabilization and turbidity relevance of wine proteins, it could be shown that only part of the thaumatin-like proteins and chitinases are involved in the turbidity using biochemical, bioinformatics, and biophysical methods. In contrast, the invertase denatured above a temperature of 83 °C and then affected the haze formation. Thus, this protein increases the bentonite dosage rate in the heat test using that range of temperature. The experiments for the temperature-dependent aggregation of proteins show the importance of taking into account the environmental factors of haze formation. Therefore, different interactions in the buffer and real wine system could be detected by potential haze stabilizing polysaccharides with wine proteins. For example, arabinogalactan shows a destabilizing effect in the experiments within the real wine system, while there is a positive effect on the haze stabilization using the experiments within the buffer system.

It was found that the various components of wine interact in a complex manner and complicate the molecular behavior.



# 1 Einleitung

## 1.1 Wein

Seit Hunderten von Jahren beschäftigen sich die Menschen mit dem Anbau, der Kultivierung und dem Ausbau von Wein. Auch heutzutage ist die Weinrebe *Vitis vinifera* eine der bedeutendsten landwirtschaftlichen Nutzpflanzen weltweit. Nicht nur Wein wird aus den Rebfrüchten produziert, sie werden auch als Tafeltrauben oder Rosinen in den Handel gebracht. Gerade bei der Produktion von Wein zählen Spanien, Italien und Frankreich weltweit zu den größten Anbaugebieten [1].

Es wird seit der frühesten Geschichte daran gearbeitet Wein in jeglicher Hinsicht zu optimieren und zu verbessern. Auch heutzutage besteht großes Interesse an den unterschiedlichsten den Wein betreffenden Themengebieten zu forschen. Viele Arbeitsgruppen sind damit beschäftigt neueste Erkenntnisse zum Thema Wein zu publizieren. Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene den Wein betreffende Aspekte näher betrachtet. Dabei liegt der Fokus auf den im Wein enthaltenen Proteinen und deren Einfluss auf die Verträglichkeit und die Trubentstehung.

Wein ist eine sehr komplexe Lösung. Um sie zu verstehen, ist es wichtig, die Herstellungsschritte von der Traube bis zum fertigen Wein zu kennen. Durch diese Schritte gelangen Proteine unterschiedlicher Quellen in den Wein, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Qualität der Weine nehmen. Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte bei der Weinherstellung kurz erläutert.

### 1.1.1 Weinherstellung

Von der Traube bis zum verzehrfertigen Wein wird eine Reihe von Maßnahmen getroffen. Dabei gibt es einige Unterschiede gerade bei der Herstellung von Rot- und Weißwein.

Der erste Schritt nach der Lese ist die Pressung der Trauben zur Gewinnung des Mostes. Hier gibt es bereits zwei verschiedene Verfahren: die Ganztraubenpressung und die Maischepressung. Während bei der Ganztraubenpressung die Stiele und Stängel der Trauben noch vorhanden sind, werden diese zuvor bei der Maischepressung entfernt. Durch die Ganztraubenpressung wird sich erhofft weniger Gerb- (Tannine) und Bitterstoffe im Wein zu erhalten. Der Vorteil der Maischepressung ist, dass mehr farb- und aromagebende Phenole aus den Beerenschalen in den Most übertragen werden. Aus beiden Varianten wird die sogenannte Maische gewonnen, die noch alle festen Rückstände der Trauben enthält. Während beim Rotwein die Gärung bereits in der Maische gestartet wird, müssen die festen

Bestandteile der Trauben (Trester) für die Produktion von Weißweinen vor der Gärung von dem Most entfernt werden. Bei diesen Schritten lösen sich die traubeneigenen Proteine, Phenole und Polysaccharide teilweise aus den Schalen, dem Fruchtfleisch und auch aus den Stängeln und Kernen und gelangen in den Most.

Die weitere Behandlung der Weine ist annähernd gleich. Den Weinen wird Schwefel in Form von Schwefeldioxid oder schwefliger Säure zugefügt, um das Wachstum unerwünschter Mikroorganismen, die zur Entwicklung von Fehltonen führen können, zu unterbinden. Durch die Schwefelung werden auch Oxidationen der farbgebenden Phenole verhindert und so einer unerwünschten Braunfärbung vorgebeugt [2-4]. Zur Gärung können verschiedene Hefestämme von *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt werden, die das natürliche Aroma der verschiedenen Rebsorten besser zum Ausdruck bringen. Es wird unterschieden zwischen der Reinzucht- und der Spontangärung. Bei der Reinzuchtgärung werden zuvor mittels Kurzzeiterhitzung des Mostes oder der Schwefelung die Mikroorganismen abgetötet, die durch die Oberfläche der Trauben in den Most gelangten [5]. Erst dann werden speziell charakterisierte und gezüchtete Hefestämme von *Saccharomyces cerevisiae* für die Fermentation eingesetzt. Für die alkoholische Gärung werden speziell gezüchtete Hefestämme kultiviert, die die im Most enthaltenen Zucker zu Alkohol verarbeiten. Bei der Spontangärung hingegen wird der Most durch die Mikroorganismen bzw. Hefen der Umgebung und denen auf den Trauben vergoren. Nach Beendigung der Gärung werden die abgestorbenen Hefen durch Filtration entfernt und der Wein wird in Fässern oder Tanks aufbewahrt, wobei Heferückstände den Wein reifen lassen. Während der Reifung kann der Wein Aroma- und Farbstoffe aus den Holzfässern aufnehmen und so zu einem charakteristischen Geschmack führen.

Bevor es zur Flaschenabfüllung der Weine kommt, ist die Schönung als weiterer Schritt durchzuführen. Hierbei werden dem Most oder auch dem fertigen Wein Substanzen zugefügt, welche aufgrund ihrer Ladungs- bzw. Bindungseigenschaften unerwünschte Inhaltsstoffe adsorbieren und dann durch Filtration oder Sedimentation aus dem Wein entfernt werden [6, 7]. Durch diese Schönung kann sowohl eine Verbesserung des Geschmacks und des Mundgefühls erfolgen [7]. Gerade Rosé- und Weißweine werden entsprechend behandelt.

Um das Mundgefühl zu verbessern, werden vorwiegend Tannine aus den Weinen entfernt. Tannine lassen den Wein bitter schmecken und führen zu einem pelzigen Gefühl auf der Zunge, der Adstringenz [8]. Da dies eher unerwünscht ist, erfolgt eine Schönung mit natürlichen Bestandteilen wie Hausenblase, Kasein, Hühnereiweiß oder auch Gelatine [9]. Um Trübungen in dem Wein zu vermeiden, wird bevorzugt das Tonmineral Bentonit eingesetzt. Das Mineral entfernt aufgrund seiner Kationenaustauscheigenschaften sehr



effektiv kationische Bestandteile (z.B. Proteine, Polyphenole) aus dem Wein [10]. Eine weitere Maßnahme zur Schönung bzw. Stabilisierung des Weins ist der Einsatz von Polysacchariden wie Carboxymethylcellulose, die unter anderem die Bildung von Weinstein verhindern sollen oder auch in der Sektherstellung bei der Schaumstabilisierung eingesetzt werden [11, 12].

Bei diesem Prozess ist eine Vielzahl von variablen Komponenten daran beteiligt, dass der Konsument einen ihn ansprechenden Wein erhält. Nicht nur durch die verschiedenen Rebsorten, sondern auch durch den Ausbau der Weine durch den Winzer ist es möglich eine große Vielfalt an Weinen zu produzieren. Dies macht das Forschungsgebiet „Wein“ interessant und vielfältig. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stehen die enthaltenen Proteine im Fokus. Es wird betrachtet, wie sie in den Wein gelangen und welche Auswirkungen sie im Wein haben können.

## **1.2 Bestandteile des Weins und ihre Herkunft**

Wein enthält eine Vielzahl von verschiedensten Inhaltsstoffen. Die größten Anteile nehmen Wasser mit bis zu 90 % und Ethanol mit 9 - 16 % ein. Bei den restlichen Bestandteilen handelt es sich um verschiedene Säuren, wie Wein- oder Äpfelsäure, Farb- und Aromastoffe, Kohlenhydrate, Mineralstoffe sowie Proteine [13].

Auf einige wichtige Stoffgruppen wird hier näher eingegangen. Bei den im Folgenden beschriebenen Gruppen handelt es sich um Phenole als sekundäre Pflanzenstoffe der Trauben und verschiedene Polysaccharide, die zum einen in der Traube vorkommen oder zur Verbesserung des Mundgefühls eingesetzt werden [13, 14]. Im Besonderen wird auf die Proteine und ihre Herkunft eingegangen.

### **1.2.1 Phenole**

Die im Wein enthaltenen Phenole bzw. Polyphenole sind maßgeblich für die Farb- und Aromavielfalt verantwortlich. Die zumeist wasserlöslichen Flavonoide gelangen vorwiegend durch die Traubenbeeren in den Wein, die bei der Pressung in den Most diffundieren können. Nur wenige der Polyphenole befinden sich im Fruchtfleisch, die meisten dieser Stoffe sich in der Schale lokalisiert. Basierend auf der Herstellungsweise von Rot- und Weißwein gelangen durch die Maischegärung mehr dieser Flavonoide in den Rotwein. Im Weißwein sind zu viele dieser Polyphenole meist nicht erwünscht, da bei der Reifung die Flavonoide oxidieren und zu Farbveränderungen führen können [2].

Polyphenole wird eine gesundheitsfördernde Wirkung nachgesagt. Hier ist vor allem das in Rotweinen enthaltene Resveratrol oder Quercetin zu nennen [15-18].

Viele der für das Aroma relevanten Phenole liegen zum Teil in ihrer glycosylierten Form vor. Erst durch enzymatische Abspaltung der Zuckerreste wird das volle Aroma entfaltet [19-22]. Dadurch ist auch die Wahl des Hefestamms für die Gärung entscheidend. Diese Stämme enthalten Enzyme, die spezialisiert auf solche Reaktionen und so für die Ausprägung des Weinaromas maßgeblich sind [23]. Im Besonderen ist dies bei aromaintensiven Sorten wie Riesling, Gewürztraminer und Muskat relevant [24]. Eines der hier eingesetzten Enzyme ist die  $\beta$ -Glucosidase. Dieses Enzym hydrolysiert verschiedene 1,4- $\beta$ -D-glykosidische Bindungen [24-28]. Es wird auch von der Traube selbst gebildet, allerdings nur mit geringer Aktivität. Daher ist hier der Einsatz von speziellen Enzympräparaten bevorzugt.

### 1.2.2 Polysaccharide

Weitere sehr wichtige Komponenten sind die Kohlenhydrate der Trauben, wobei es sich sowohl um Monosaccharide als auch Polysaccharide handelt. Die häufigsten Polysaccharide sind das Arabinogalactan und die Pektinbestandteile Rhamnogalacturonan I und II [29-31]. Zusätzlich sind im Wein noch Mannoproteine enthalten, die einen großen Bestandteil der Polysaccharide im Wein ausmachen [29, 32].

In der Oenologie werden auch verschiedene Polysaccharide als Zusatzstoffe eingesetzt. Dabei handelt es sich um das Gummi arabicum und die Carboxymethylcellulose. Beide werden bevorzugt zur Verbesserung des Mundgefühls oder zu Vermeidung von Metalltrübungen verwendet [11, 33, 34].

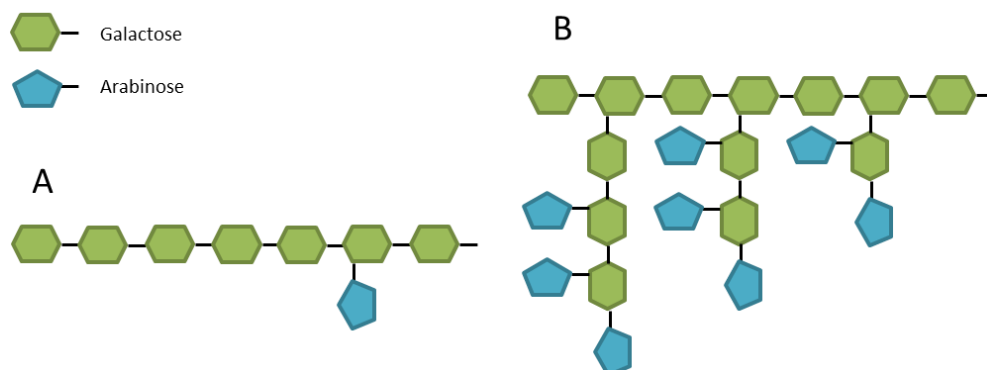
Diese vier Polysaccharide werden im Folgenden näher beschrieben.

#### **Arabinogalactan**

Arabinogalactan ist das am meisten in der Traube gebildete Polysaccharid [35]. Es ist aus einem Rückgrat aus Galactankomponenten mit verzweigten Anhängen aus den Monosacchariden Arabinose und Galactose aufgebaut [29]. In Abbildung 1 ist eine vereinfachte Darstellung einer möglichen Zusammensetzung von Arabinogalactanen aufgeführt.

Es gehört zu der Gruppe der neutralen Carbohydrate und weist nur eine geringe Affinität zu Polyphenolen auf [36]. Generell ist über die Verwendung von Polysacchariden zur Stabilisierung von Weinen nur sehr wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass

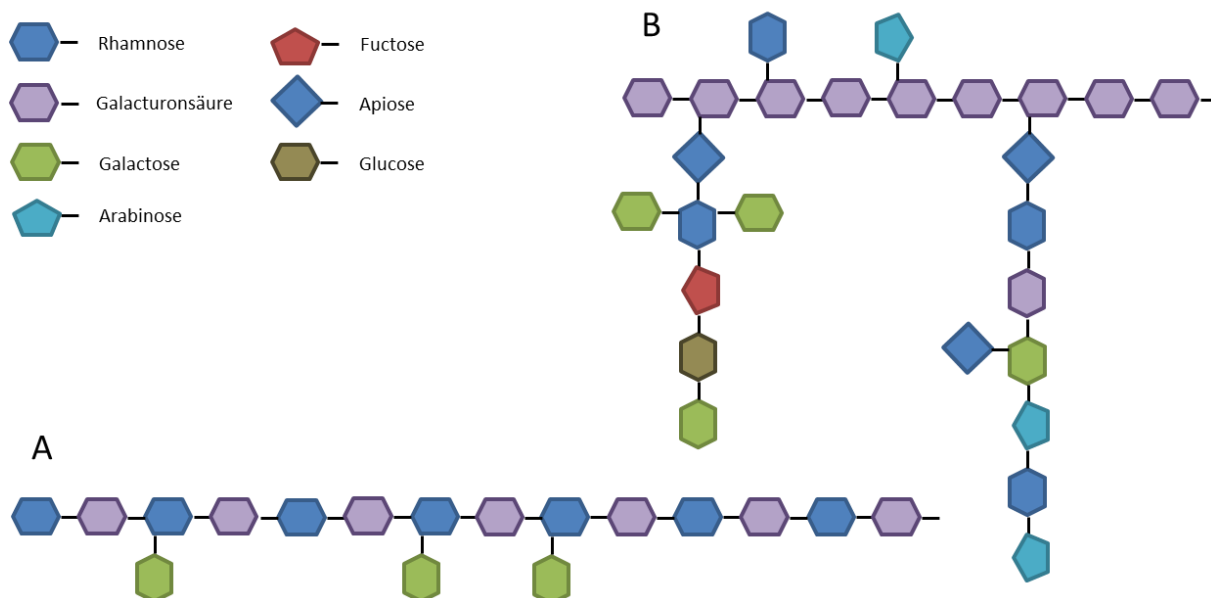
Arabinogalactan Trub reduziert [37]. Hierzu zählen auch die Arabinogalactan-Proteine die sich in einem Molekulargewichtsbereich von 48 -192 kDa finden [29].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung von Arabinogalactan I und II.** Vereinfachte Darstellung zweier Arabinogalactane in Anlehnung an die Arbeit von Vincken *et al.* 2003 [38]. A: Arabinogalactan I; B: Arabinogalactan II.

### Rhamnogalacturonane

Von diesen Pektinbestandteilen sind zwei Isoformen Rhamnogalacturonan I und II bekannt (Abbildung 2), die sich in der Zuckerszusammensetzung unterscheiden [29]. Sie enthalten verschiedene Verhältnisse von Arabinose und Galactose zu Rhamnose [32].



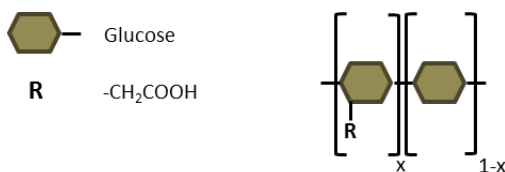
**Abbildung 2: Schematische Darstellung von Rhamnogalacturonan I und II.** Vereinfachte Darstellung der Pektinbestandteile in Anlehnung an die Arbeit von Vincken *et al.* 2003 [38]. A: Rhamnogalacturonan I; B: Rhamnogalacturonan II.

Rhamnogalacturonan findet Einsatz bei der Weinstabilisierung, bei der Verbesserung des Mundgefühls und der Aromaverbesserung [39]. Aufgrund des ionischen Charakters und dem Gehalt an Urnsäuren wie der Galacturonsäure ist Rhamnogalacturonan effektiv bei der

Vermeidung der Weinsteinkristallisierung [40]. Um dies zu erklären wird das sogenannte „Egg-Box-Model“ herangezogen. Dies geht davon aus, dass im Besonderen bei der Dimerisierung von Rhamnogalacturonan I  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen umschlossen werden, so dass Chelatkomplexe entstehen [40]. Die Kationen können nicht mehr mit der Weinsäure reagieren und die Weinsteinausfällung bleibt aus.

### Carboxymethylcellulose

Das Derivat der Cellulose Carboxymethylcellulose (CMC) ist auch als Lebensmittelzusatzstoff E466 bekannt. Hierbei handelt es sich um ein langkettiges Polymer aus modifizierten Glucosebausteinen (Abbildung 3) [41]. Dieser Zusatzstoff wird unter anderem zur Schaum- und Weinsteinstabilisierung eingesetzt [11, 34]. Hier wird davon ausgegangen, dass die negativen Ladungen des CMC mit den Kationen der Lösung reagieren und so die Komplexbildung der Kationen mit der Weinsäure verhindern. Ein Ausfall von Weinstein bleibt aus [42].

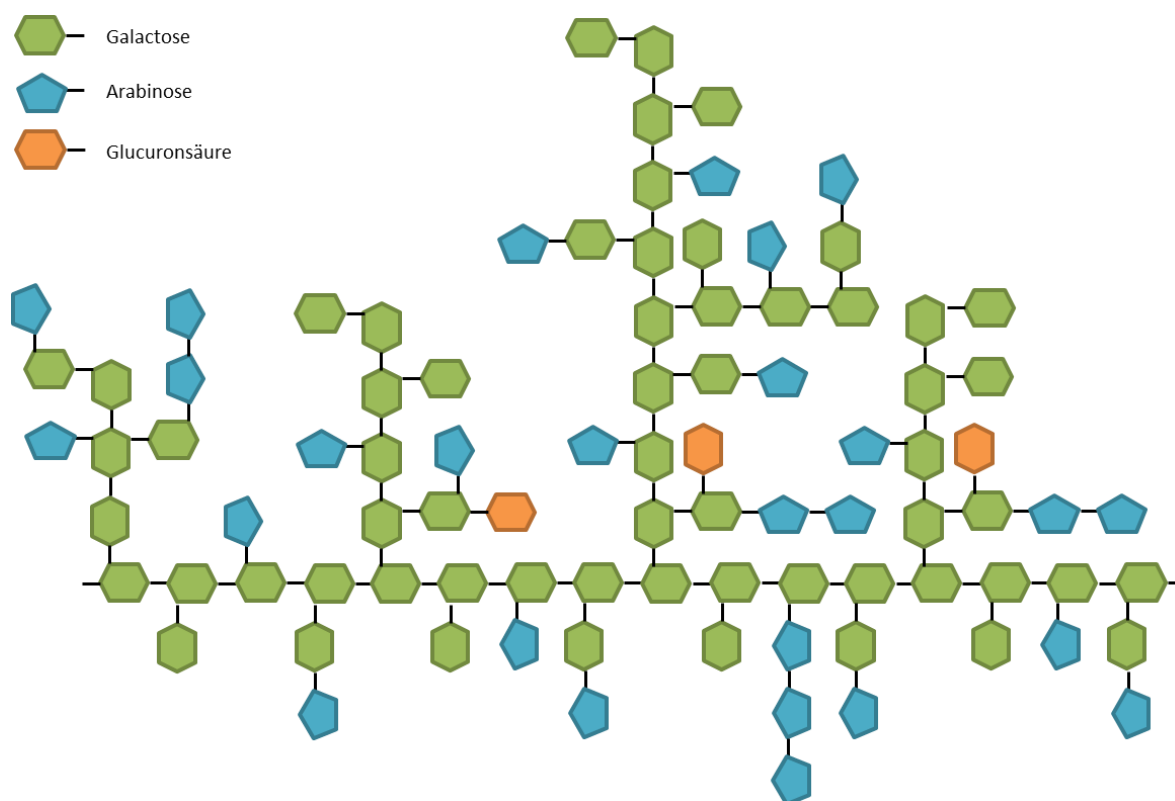


**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Cellulosederivates Carboxymethylcellulose.** Verändert nach Su *et al.* 2010 [43].

### Gummi arabicum

Aus dem Pflanzensaft von Akaziengewächsen wird das ebenfalls als Lebensmittelzusatzstoff E414 verwendete Polysaccharid Gummi arabicum gewonnen. Es besteht aus den Monosacchariden Arabinose, Galactose, Rhamnose und Glucuronsäure im Verhältnis 3:3:1:1, womit es in den Hauptbestandteilen dem Arabinogalactan ähnelt [8]. Bei Untersuchungen des Naturstoffs Gummi arabicum wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen Unterschiede in dessen Zusammensetzung gefunden [44, 45]. Eine mögliche Struktur des Gummi arabicums ist in Abbildung 4 dargestellt.

Im Gegensatz zu Arabinogalactan ist Gummi arabicum negativ geladen. Es können sich Kationen anlagern und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Polyphenolen ist möglich. Daher wird es bei der Stabilisierung von Kupfer- oder Eisentrübung, Weinsteinausfall, Gerbstoffausflockung und zur Verbesserung des Geschmacks und des Mundgefühls eingesetzt [46].



**Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Gummi arabicum Moleküls.** Vereinfachte Darstellung eines Strukturvorschlages in Anlehnung an die Arbeit von Street *et al.* 1983 [47].

### 1.2.3 Proteine

Proteine gelangen durch verschiedene Quellen in den Wein. Zum einen wird durch die Traube selbst ein Großteil der Proteine in den Wein eingetragen [7, 48]. Zum anderen werden durch die eingesetzten Hefen bzw. deren Lysate Mannoproteine oder auch Enzyme freigesetzt [7, 49]. Eine weitere zurzeit stark diskutierte Quelle für Proteine sind diverse Schönungsmittel, wie Hausenblase, Ovalbumin und Kasein [9, 50, 51]. Diese Mittel werden zur Verbesserung des Mundgefühls bzw. zur Reduzierung der enthaltenen Tannine eingesetzt [9]. Sie komplexieren mit den Tanninen, fallen aus und können mittels Filtration wieder aus dem Wein entfernt werden. Da diese Bestandteile als Allergene bekannt sind, müssen sie sobald der Grenzwert von 0,25 mg/l im Wein überschritten wird nach der EU-Richtlinie 2000/13/EC auf den entsprechenden Flaschen deklariert werden [52].

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben zu den Proteinkonzentrationen in Weinen. Im Schnitt werden Mengen von 20 - 300 mg/l nachgewiesen [53, 54]. Es gibt eine Vielzahl von Faktoren, die den Anteil an Proteinen im Wein beeinflussen, wie die Lage und das Klima, aber auch die Art der Weinherstellung (Vinifikation). Viele dieser im Wein befindlichen Proteine werden diskutiert, an der Entstehung der Trübung beteiligt zu sein. Darunter fallen die Invertasen, die Chitinasen und die Thaumatin-ähnlichen Proteine, die den Großteil der

Proteine im Wein ausmachen [7, 55-57]. Aber auch die protektive Wirkung der Glykoproteine auf die Trubentstehung wird diskutiert [58, 59].

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Proteinzusammensetzung im Wein ist die Schönung. Durch den Einsatz des Schönungsmittels Bentonit werden erhebliche Mengen der Proteine aus dem Wein entfernt. Allerdings ist im Einzelnen nicht bekannt, welche Proteine und auch andere Inhaltsstoffe an das Mineral adsorbieren. Daher ist es von großem Interesse, die Eigenschaften der Proteine im Wein zu untersuchen. Es müssen die Wechselwirkungen der Proteine mit dem Mineral besser verstanden werden, um eventuell neue Strategien zu deren Entfernung zu entwickeln.

### **Glykoproteine**

Es gibt verschiedene glykosylierte Proteine im Wein. Das sind zum einen die traubeneigenen Glykoproteine und zum anderen die durch die Hefen frei werdenden Mannoproteine.

Der Großteil dieser Proteine gelangt durch die Hefen während der alkoholischen Gärung in den Wein. Mannoproteine konnten in verschiedenen Weinsorten nachgewiesen werden [48, 49, 54]. Für die in dieser Arbeit untersuchten Weine wurde zur Vergärung die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Aus der Zellmembran dieser Hefen werden die Mannoproteine während der Gärung freigesetzt. Hierbei weisen sie Molekulargewichte von 51 - 527 kDa auf, der Proteinanteil liegt zwischen 1 - 9 % [29]. Die Autoren geben keine genaue Erklärung für die große Bandbreite der ermittelten Proteine an. Da Mannoproteine Zellwandbestandteile der Hefen sind, könnten diese unterschiedlich großen Moleküle bei der Zellyse entstanden sein und es sich somit zum Teil auch um Fragmente der Mannoproteine handeln. Der Großteil des Glykoproteins wird durch verzweigte Mannosereste gebildet [60, 61]. Im Wein bewirken sie sowohl eine Aroma- als auch eine Farbstabilität, ebenso sind sie in der Lage Trübungen im Wein zu reduzieren [62].

### **Invertase**

Bei der Invertase handelt es sich um ein ca. 70 kDa großes Protein [63]. Dieses Enzym spaltet Saccharose in den Traubenbeeren hydrolytisch in Fructose und Glucose und erleichtert somit deren Transport in die Zellen. Dadurch trägt die Invertase einen wichtigen Teil bei der Reifung und der Energieversorgung (Metabolite der Glykolyse) der Traubenbeeren bei. Sie wird vermehrt kurz vor der Veraison, dem Beginn der Reifung, exprimiert [64].

### **Chitinase**

Dieses Protein gehört zu der Gruppe der PR-Proteine (pathogenesis-related proteins, Familie 4) [65]. Es ist in der Lage Chitin zu hydrolysieren, welches in den Zellmembranen verschiedener Pilze vorkommt. Hierbei ist es von Vorteil, dass das Enzym nicht nur in den Blättern, sondern auch den Wurzeln, Stängeln oder auch Beeren der Pflanze exprimiert wird [66]. Dort ist sie sowohl im Apoplast und den Vakuolen der Pflanzenbestandteile lokalisiert [67]. Chitinasen befinden sich im Molekulargewichtsbereich von 28 – 32 kDa [68, 69]. Sie machen neben den Thaumatin-ähnlichen Proteinen einen Großteil der Weinproteine aus [70].

Man unterscheidet bei den Chitinasen verschiedene Klassen [71]. Besonders während der Reifung werden vermehrt Chitinasen exprimiert. Die Klasse VI Chitinase macht mit ca. 40 % den größten Anteil an aktiven Chitinasen in der reifen Traube aus [72]. Dabei handelt es sich um ein ca. 31 kDa großes Enzym, das die Keimfähigkeit der Gonaden des Pathogens *Botrytis cinerea* inhibiert [72].

### **Thaumatin-ähnliche Proteine**

Die Thaumatin-ähnlichen Proteine (TLP) gehören zu der Familie 5 der RP-Proteine [65, 73]. Sie werden zum Beispiel bei Pathogenbefall als Abwehrstoffe, als Antwort auf diese Stressreaktionen, von der Pflanze gebildet [65, 73-78]. Sie sind in der Lage das Wachstum von Pathogenen zu inhibieren, indem sie fungale Membranen lysieren oder zumindest deren Permeabilität erhöhen [73, 74, 77].

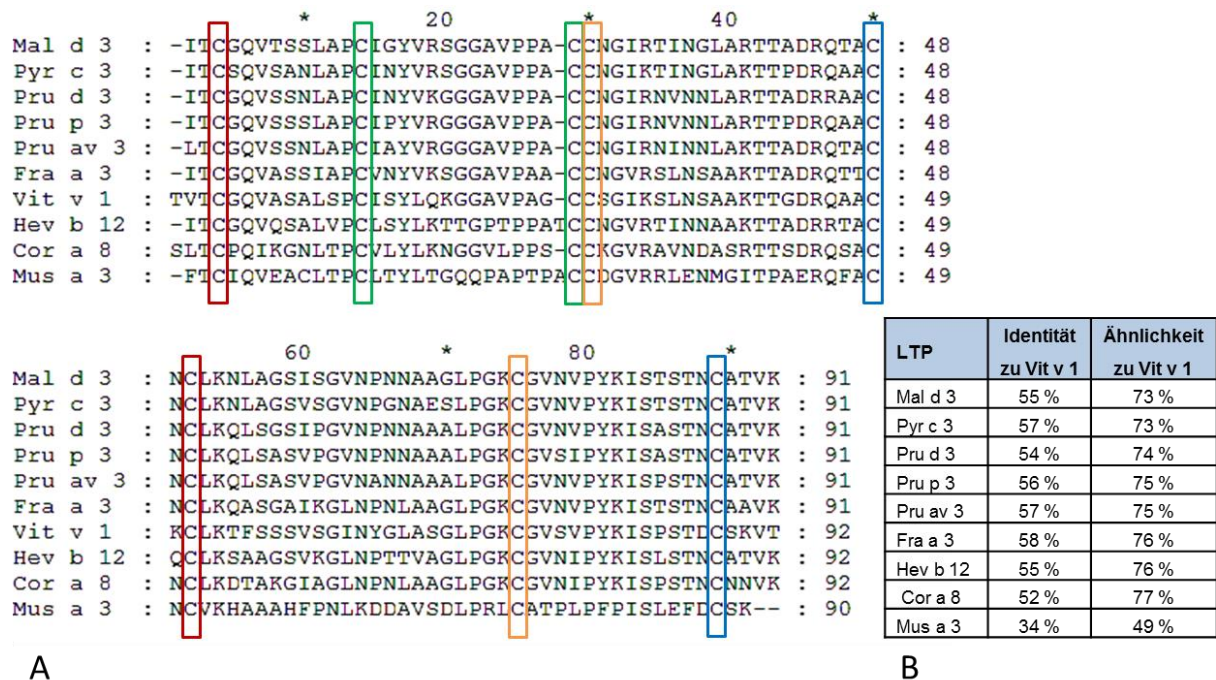
Die TLPs erhielten ihren Namen aufgrund der Sequenzhomologie zu dem süß schmeckenden Protein Thaumatin aus der Katamfe *Thaumatococcus daniellii*, einer tropischen Staude [79].

Sie machen einen Großteil der in der Traube bzw. im Wein enthaltenen Proteine aus [80]. Man findet diese Proteine mit einem Molekulargewichtsbereich von 20 - 24 kDa im Fruchtfleisch, der Beerenschale sowie in den Kernen der Weintraube [73]. Des Weiteren werden die TLPs in Zusammenhang mit der Entstehung von Weintrübung gebracht [57, 81].

**Lipid Transfer Protein**

Das Lipid Transfer Protein (LTP) ist mit ca. 9 – 12 kDa ein kleines Protein mit einem hohen isoelektrischen Punkt (pI) von ca. 9 [82], für *Vitis vinifera* (GenBank ID: AAO33394) kalkuliert mit ProtParam [83]. Es zählt zu der Familie 14 der PR-Proteine und dient somit unter anderem dem pflanzlichen Abwehrsystem bei biotischem und abiotischem Stress [84-86]. Hierzu gibt es verschiedene Ansätze wie das LTP bei der Abwehr eingesetzt wird. Da bei Pathogenbefall Cutin, als Komponente der Cutikula, verstärkt gebildet wird, ist auch die Expression von LTP zum Transport von dafür benötigten Carbonylkomponenten angeregt [87]. Zusätzlich wird für das LTP eine inhibierende Wirkung auf das Pathogenwachstum beschrieben, da es die Permeabilität der Zellmembranen erhöhen soll [85].

Die Aminosäuresequenzen verschiedener LTPs weisen eine hohe Identität auf, was auf eine ähnliche Struktur hindeutet [85]. An einer Auswahl von LTPs ist dies in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Alignment verschiedener pflanzlicher LTPs.** A: Sequenzalignment der Aminosäurezusammensetzung verschiedener LTPs (Signalpeptide wurden zuvor mittels Signal P 4.1 Server detektiert und entfernt [88]); B: Tabelle der Identitäten und Ähnlichkeiten der Aminosäuren zu denen von Vit v 1. Die konservierten Cysteine in dem Alignment wurden passend zu ihren jeweiligen Bindungspartnern farblich markiert. Mal d 3: Apfel *Malus domestica* (GenBank: AAV64878.1); Pyr c 3: Erbse *Pyrus communis* (GenBank: AAF26451.1); Pru p 3: Pfirsich *Prunus persica* (GenBank: AAV64877.1); Pru av 3: Kirsche *Prunus avium* (GenBank: AAF26449.1); Pru d 3: Pflaume *Prunus domestica* (UniProtKB/Swiss-Prot: P82534.1); Fra a 3: Erdbeere *Fragaria ananassa* (GenBank: AAY83343.1); Vit v 1: Traube *Vitis vinifera* (GenBank ID: AAO33394); Cor a 8: Haselnuss *Corylus avellana* (GenBank: AAK28533.1); Hev b 12: Latex *Hevea brasiliensis* (GenBank: AAL25839.1); Mus a 3: Banane *Musa acuminata* (GenBank: ABF69976.1). Verwendete Programme: ClustelX 1.8, GeneDoc 2.6.

Durch Kristallstrukturaufklärung konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem LTP um ein Protein bestehend aus vier  $\alpha$ -Helices handelt, die durch vier Disulfidbrücken stabilisiert



werden [86, 89-94]. Diese Proteine zeigen Resistenzen gegenüber sauren und proteolytischen Bedingungen sowie Hitzeeinwirkung [95-97]. Aufgrund dieser Eigenschaften handelt es sich hierbei um Hauptallergene in Steinobstgewächsen wie Pfirsich und Kirsche [93, 98, 99]. Auch in anderen Früchten, wie auch in der Traube oder in Pollen ist es als Allergen bekannt [98-101]. Hier ist bislang das LTP Vit v 1 als einziges Allergen der Traube beschrieben (www.allergen.org, Stand Oktober 2014).

Dieses Protein ist vor allem in Rotweinen auf Grund der Herstellungsweise zu finden [48], da durch die Maischegärung mehr Proteine aus den Schalen, wie das LTP, in den Most gelangen können. Allerdings lassen sich auch in Weißweinen LTPs oder dessen Hydrolyseprodukte nachweisen [102, 103].

### **1.3 Weinunverträglichkeit**

In den letzten Jahren sind vermehrt Allergien nachgewiesen worden. Als Gründe hierfür werden die vermehrte Luftverschmutzung und der Anstieg an Hygiene- bzw. Sterilisationsprodukten angebracht [104, 105]. Daher wurde 2007 die Deklarierungspflicht für Allergene auf Lebensmitteln eingeführt (laut Richtlinie 2007/68/EG der Kommission vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten). Hierzu zählen Produkte wie Eier, Fische, Milch, Schwefeldioxid und die daraus gewonnenen Erzeugnisse.

Da diese Produkte auch zum Teil bei der Weinherstellung eingesetzt werden, ist es von großem Interesse auch deren Relevanz als Allergen im Wein zu untersuchen. Ergänzend kommt hinzu, dass auch durch die Traube selbst potentiell allergenwirkende Proteine eingetragen werden. Allerdings ist über deren Allergenität wenig bekannt.

Für die deklarierungspflichtigen Auslöser von Unverträglichkeitsreaktionen wurden Testverfahren eingeführt. Erst bei der Überschreitung von festgelegten Grenzwerten müssen diese Stoffe auf Lebensmitteln kenntlich gemacht werden [106]. Ein Beispiel hierfür ist der Aufdruck „Enthält Sulfite“ bei den meisten Weinen.

Wie bereits erwähnt besteht Wein aus einer Vielzahl verschiedener Inhaltsstoffe, welche zu Aroma, Qualität und somit zur Vielfältigkeit der Weine beitragen. Allerdings kann diese Vielfalt sich in Unverträglichkeiten auswirken [107-110]. Besonders im mediterranen Raum wurden einige Untersuchungen hinsichtlich des allergenen Potentials von Weinproteinen durchgeführt [101, 111-118]. Gerade im Zusammenhang mit einer Weinunverträglichkeit wurden auch in Deutschland zwei Fallstudien publiziert [119, 120].

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im Jahr 2010 unter der Leitung von Dr. Petra Fronk und Univ.-Prof. Dr. Heinz Decker (Institut für Molekulare Biophysik, Mainz) eine Fragebogenerhebung in der Stadt Mainz durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie wurden den Teilnehmern verschiedene Fragen zu ihrem Weinkonsum und dem möglichen Auftreten von Überempfindlichkeitsreaktionen nach Weinkonsum gestellt. Von den 948 befragten Personen gaben 7,2 % nach eigener Einschätzung an, eine Weinunverträglichkeit zu besitzen [110]. Allerdings war es nicht möglich aus diesen Daten Ursachen der Überreaktionen einzugrenzen.

Im Wein sind viele Stoffe enthalten, die Überempfindlichkeitsreaktionen hervorzurufen. Dazu zählen unter anderem biogene Amine [121], Alkohol [116, 122] oder der Zusatz von Schwefel, der bereits deklarierungspflichtig ist [108, 123]. Eine weitere wichtige Quelle dieser unerwünschten Reaktionen sind die im Wein befindlichen Proteine, die bereits als Allergene in anderen Pflanzen beschrieben wurden [124-130]. Besonders sollte das LTP in den Fokus rücken, da es sich hierbei um das einzige bislang gelistete Traubenallergen handelt (www.allergen.org, Stand Oktober 2014).

Diese Inhaltsstoffe lösen verschiedene Reaktionen im Körper der Konsumenten aus. Das Auftreten von Unverträglichkeitsreaktionen reicht von Brennen im Hals bis hin zu einem Kreislaufzusammenbruch (Anaphylaktischer Schock). Man unterscheidet medizinisch zwischen einer Allergie und einer Unverträglichkeitsreaktion.

### **1.3.1 Allergie**

Allergien sind Überempfindlichkeitsreaktionen des Körpers, die durch das Immunsystem reguliert werden. Allergien werden je nach Mechanismus und Auslöser in vier Typen unterteilt [131]:

Bei einer Typ I oder auch Soforttyp Allergie handelt es sich um das Auslösen von Überempfindlichkeitsreaktionen des Körpers unmittelbar nach dem Kontakt mit dem Allergen. Die auftretenden Reaktionen werden durch die körpereigenen IgE-Antikörper ausgelöst. Diese induzieren bei den Mastzellen eine Histaminausschüttung, die sich in Symptomen, wie Hautausschlägen, Juckreiz der Haut, Brennen im Hals bis hin zu einem Kreislaufzusammenbruch auswirken kann.

Die Allergietypen II und III werden durch IgG-Antikörper vermittelt und treten erst Stunden nach dem Kontakt mit dem Allergen auf.

Auch die Typ IV Allergie tritt erst nach Stunden bis Tagen auf, daher auch der Name Spättyp Allergie. Es handelt sich hierbei um eine T-Lymphozyten vermittelte Reaktion.

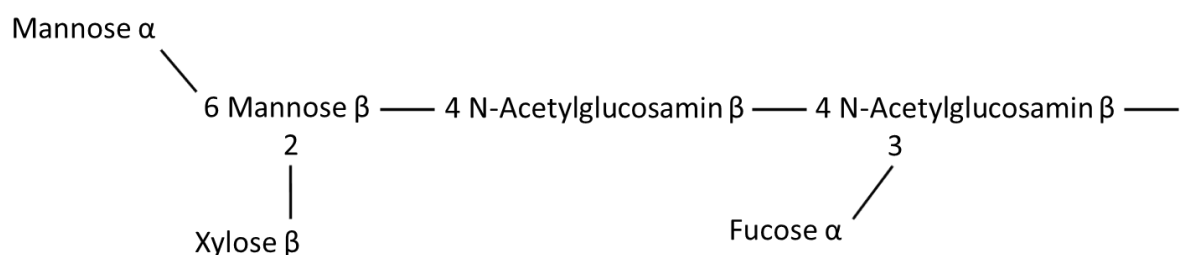
Bei den Untersuchungen in dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob es sich bei den nach moderatem Weinkonsum auftretenden Unverträglichkeitsreaktionen um eine Allergie des Soforttyps handelt.

### 1.3.2 Kreuzallergenität

Bei den meisten Allergenen handelt es sich um Proteine. Da sich gerade die exprimierten Proteine bei Pflanzen von ihrer Struktur und Aminosäurezusammensetzung stark ähneln, kommt es bei Allergikern häufig zu den sogenannten Kreuzreaktionen. Hier ist das LTP zu nennen, welches als Panallergen bezeichnet wird [132, 133]. Panallergene zeichnen sich durch ihre hohe Hitzestabilität und Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau aus.

Bei einer Kreuzallergie erkennen die IgE-Antikörper einer bereits vorliegenden Allergie auch Bindungsmotive (Epitope) von Allergenen anderen Ursprungs [134]. Auch hier treten die allergieähnlichen Symptome kurz nach dem Verzehr oder dem Kontakt mit diesen Proteinen auf. Ein sehr bekanntes Beispiel hierfür ist die pollenassoziierte Nahrungsmittel-Allergie (OAS) [135]. Bei dem Vorliegen einer Pollenallergie, wie auf Birkenpollen, ist es wahrscheinlich auch eine Nahrungsmittelallergie auf Äpfel, Kirschen oder Pfirsiche zu ermitteln [136-138].

Nicht nur die strukturelle Ähnlichkeit von Proteinen ist eine mögliche Ursache für das Auftreten der Kreuzallergenität, sondern auch die sogenannten kreuzreaktiven Kohlenhydratdeterminanten (CCD) [139-142]. Bei dieser Art der Wechselwirkung werden auch IgE-Antikörper gebildet, die spezielle Oligosaccharidstrukturen erkennen [141]. Diese Antikörper lassen sich mittels immunologischer Testverfahren, wie dem ImmunoCAP (Phadia AB, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), im Allergikerserum nachweisen.



**Abbildung 6: Struktureller Aufbau des Oligosaccharidepitops MUXF3.** Die N-glykosidischen Bindungen verlaufen über die in der Graphik angegebenen Positionen. Verändert nach Altmann (2007) [141].

Als Bindungspartner der CCD-spezifischen IgE-Antikörper wird u.a. das Oligosaccharidepitop MUXF3 (vgl. Abbildung 6) des Ananaszyms Bromelain eingesetzt, da es eine für pflanzliche N-Glykane typische Struktur aufweist [141-143]. Die meisten

Kohlenhydratdeterminanten basieren auf Fucose oder Xylose, die für die Bindung der IgE-Antikörper verantwortlich sind [144]. Die Testung auf CCD-spezifische IgE-Antikörper wird bevorzugt bei Bienengift-, Wespengift- und Nahrungsmittelsensibilisierung eingesetzt aufgrund der Glykosylierung vieler dieser Allergene [141, 145-147].

### **1.3.3 Ursachen für Weinunverträglichkeiten**

Bei Weinunverträglichkeitsreaktionen handelt es sich nur in den seltensten Fällen um echte IgE-Antikörper vermittelte Typ I Allergien. Viel häufiger finden sich sogenannte nichtimmunologische Reaktionen, die von Ethanol, Sulfiten oder biogenen Aminen ausgelöst werden können [109, 148]. Diese Stoffe führen bei einer Unverträglichkeit auch zu allergieähnlichen Symptomen.

#### **Alkohol**

Bei der Verstoffwechslung der Weinhaltstoffe sind verschiedene Enzyme beteiligt. Ethanol wird durch das Enzym Alkohol-Dehydrogenase (ADH) in Azetaldehyd umgewandelt. Dieses toxische Produkt wird durch die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH-2) zu Azetat, das im Citratzyklus abgebaut wird. Wenn diese beiden Enzyme in ihrer Aktivität beeinträchtigt sind (ADH hochreguliert und/ oder ALDH-2 runterreguliert), kommt es zu einer Anreicherung des Azetaldehyds im Körper. Die entstehende Vergiftung wird auch als Flush-Syndrom bezeichnet. Dies spiegelt sich in Rötungen der Haut wieder [109, 149].

#### **Sulfite**

Bei der Weinherstellung werden Weine durch den Zusatz von Schwefeldioxid mikrobiell stabilisiert. Durch die Deklarierungspflicht von Unverträglichkeiten-hervorrufenden Zusätzen müssen Sulfite ab einer Konzentration von 10 mg/l auf den Produkten vermerkt werden (Richtlinie 2007/68/EG der Kommission vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments). Gerade bei Asthmatikern besteht eine erhöhte Neigung zu Unverträglichkeitsreaktionen nach Verzehr von sulfithaltigen Lebensmitteln, wobei auch hier die genaue Ursache für das Auftreten der Symptome nicht klar ist [108, 123]. Diese Reaktionen weisen allergieähnliche Symptome, wie z.B. Atemnot und Hautrötungen, auf sind aber nicht über Antikörper vermittelt. Hier handelt es sich um pseudoallergische Reaktionen [109].

## **Biogene Amine**

Das bekannteste biogene Amin, das im Zusammenhang mit Weinunverträglichkeit genannt wird, ist das Histamin. Die biogenen Amine werden in Mikroorganismen durch die Decarboxylierung von Aminosäuren produziert und freigesetzt [150]. Sie entstehen bei der Fermentation, der Lagerung und dem Verderb von Lebensmitteln. Dabei können die Gehalte an biogenen Aminen und im Speziellen an Histamin stark variieren [151]. In Wein werden viele dieser biogenen Amine während des biologischen Säureabbaus durch die dabei verwendeten Bakterien (z.B. *Oenococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*) produziert [109, 152]. Dadurch ergeben sich Konzentrationsschwankungen der biogenen Amine in den Weinen, wobei sich meistens in Rotweinen höhere Gehalte nachweisen lassen als in Weißweinen [152, 153].

Nach Verzehr von histaminhaltigen Lebensmitteln wird Histamin durch die Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und Diaminoxidase (DAO) im Dünndarm abgebaut. Liegt nun bei diesen Enzymen, im Besonderen bei der DAO, eine Fehlfunktion vor, führt dies aufgrund der Anreicherung des Amins und dessen Transfers in die Blutbahn zu allergieähnlichen Symptomen. Gerade bei der DAO ist bekannt, dass diese Funktionsstörung auch genetischen Ursprunges sein kann [154].

Die Vielzahl der unterschiedlichen Komponenten im Wein erschwert die Suche nach dem eigentlichen Auslöser einer Unverträglichkeitsreaktion. Gerade weil sich diese Komponenten auch gegenseitig beeinflussen und miteinander in Wechselwirkungen treten [17]. Die bei dem Abbau der einzelnen Komponenten beteiligten Enzyme werden vielseitig beeinflusst, auch durch die Weinhaltstoffe selbst. Hier ist als Beispiel der inhibierende Einfluss von Alkohol auf die DAO zu nennen [155]. Ebenfalls sollte die gefäßerweiternde Wirkung von Alkohol berücksichtigt werden, wodurch die Zugänglichkeit der Pseudoallergene in die Blutbahn erhöht wird [16, 156, 157]. Auch durch genetische Veränderungen an den Stoffwechsellenzymen ist eine reduzierte Aktivität dieser Enzyme möglich. Die Stoffwechselprodukte werden nicht in ausreichendem Maße abgebaut und lösen durch ihre Anreicherung Unverträglichkeitsreaktionen aus [149, 154, 158].

## **1.4 Maßnahmen zur Entfernung von Proteinen aus dem Wein**

Es gibt verschiedene Gründe für die Entfernung von Proteinen aus dem Wein. Zum einen sollten die zu Unverträglichkeiten führenden Komponenten nach Möglichkeit nicht mehr in nachweisbaren Konzentrationen im Wein enthalten sein. Hierzu zählen auch einige Schönungsmittel wie Gelatine, Hühnereiweiß und Lysozym [9, 50, 51]. Durch deren

Entfernung soll die Deklaration dieser Stoffe vermieden werden. Zum anderen können andere Proteine im Wein zu Trübungen führen. Da ein trüber Wein von den Konsumenten bislang nicht akzeptiert wird, kann dies zu massiven Verlusten für den Winzer führen. Aus diesen Gründen müssen Maßnahmen zur Trubvermeidung ergriffen werden.

Um effektive Methoden zu entwickeln, müssen die Ursache und die beteiligten Faktoren der Trubentstehung verstanden werden.

#### **1.4.1 Trübung und ihre Ursachen**

Bei der Trübung handelt es sich um eine Aggregation verschiedener Partikel in einer sonst klaren Flüssigkeit. Es gibt viele Ursachen für die Bildung von Trübung. Sie kann durch Mikroorganismen, aber auch durch Rückstände von Filtermaterialien, Korken oder anderen Feststoffen eintreten [159]. Wobei eine häufigere Ursache der Trubentstehung die durch Wechselwirkungen der verschiedenen Inhaltstoffe im Wein ist. Hier sind Proteine und Metalle wie Eisen und Kupfer zu nennen, aber auch durch Tannine ist dies möglich [37, 160-163].

Besonders die im Wein enthaltenen Proteine bieten ein breites Feld deren Relevanz bei der Trubentstehung zu untersuchen [70, 164-166]. Es werden verschiedene Proteine diskutiert daran beteiligt zu sein, wie die Invertase,  $\beta$ -Glucosidase, Chitinasen und auch die TLPs [55-57, 167-169]. Allerdings finden sich über die Beteiligung der Proteine und deren molekulare Wechselwirkungen keine einheitlichen Aussagen.

Es gibt verschiedenste Faktoren, die die Entstehung der Trübung beeinflussen. Zu diesen Faktoren zählen der pH-Wert, der Ethanolgehalt, Phenole sowie Polysaccharide [37, 58, 59, 61, 161, 162, 169-177]. Hier ist zu erwähnen, dass einige Polysaccharide, wie auch Mannoproteine eine protektive Wirkung auf die Trubentstehung zeigen [58, 59, 61, 178].

Zu der Vermeidung bzw. Vorbeugung der Trübung sind bereits einige Strategien entwickelt worden. Viele dieser Maßnahmen basieren auf Erfahrungswerten der Anwender [179, 180]. Dadurch ist es zwar möglich Trübungen vorzubeugen, allerdings werden dadurch Verluste in der Qualität bzw. auch Quantität in Kauf genommen.

Im Folgenden wird näher auf die Schönung und ihre Folgen für das Produkt eingegangen. Es wird sich beschränkt auf die gängigsten Methoden zur Vermeidung und Entfernung der Trübung.

### 1.4.2 Schönung

Durch die Schönung wird Wein, aber auch andere Getränke wie Bier und Saft optimiert. Es werden nicht nur die Trubstoffe aus dem Wein entfernt, sondern auch der Geschmack und das Mundgefühl (z.B. Adstringenz) verfeinert [12, 181-184]. Bislang gibt es verschiedene Möglichkeiten dies zu erzielen. Zu diesen Möglichkeiten zählen Filtrationen oder auch der Zusatz spezieller Substanzen.

Bei der Verfeinerung des Mundgefühls und der Reduktion der Tannine im Wein werden Hausenblase, Eiweiß, Gelatine oder auch Kasein eingesetzt [9, 155, 185, 186]. Es soll vermieden werden die festgelegten Grenzwerte dieser Stoffe zu überschreiten und somit Hinweise auf dessen Vorhandensein auf den Flaschen kenntlich zu machen [52, 187]. Zurzeit würden Verbraucher Weine mit Angaben wie „Enthält Hühnerlei“ nicht akzeptieren, daher sind andere Materialien gefordert die Trübung zu reduzieren.

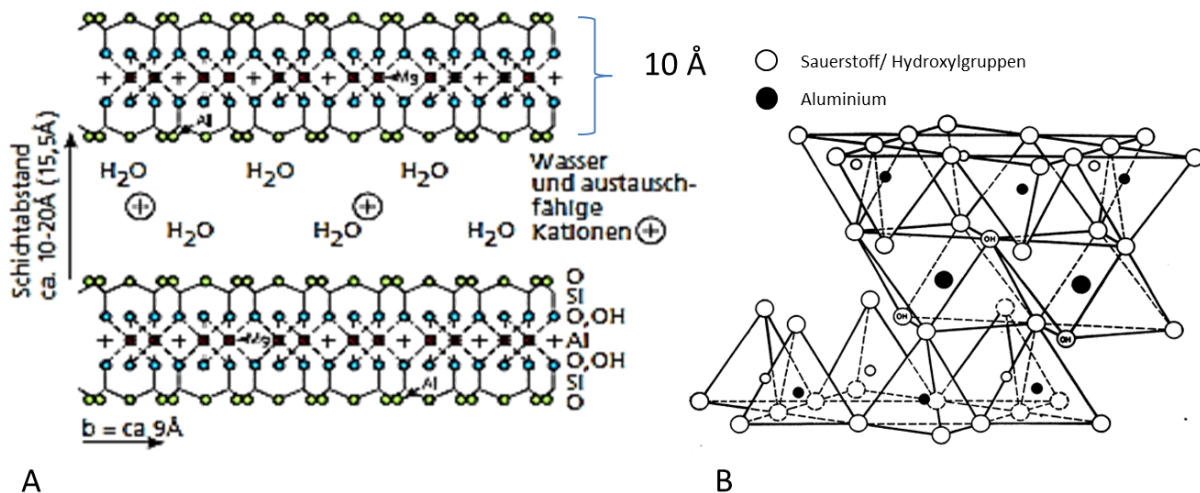
Zur Vermeidung der Trubentstehung auch nach der Abfüllung des Weins werden bevorzugt Bentonite eingesetzt [188]. Dies sind sehr zuverlässige aber unspezifische Adsorber, die nicht nur die trübungverursachenden Teilchen entfernen sondern auch Farb- und Aromastoffe dem Wein entziehen. Im Folgenden wird im Einzelnen auf die Beschaffenheit und Eigenschaften des Bentonits eingegangen.

### 1.4.3 Bentonit

Bei Bentonit handelt es sich um ein tonhaltiges Gestein, das durch Verwitterung vulkanischer Aschen vor etwa 12 - 14 Millionen Jahren entstanden ist. Seinen Namen erhielt Bentonit nach der ersten Fundstätte bei Fort Benton in Montana (USA). Der Hauptanteil von 75 – 85 % bildet das Montmorillonit, einem Dreischicht-Silikat der Smektitgruppe [189]. Durch dieses Mineral erhält das Bentonit seine Eigenschaften bezüglich der Quellfähigkeit und Adsorbierbarkeit [190]. In unterschiedlichen Anteilen enthält Bentonit auch Quarz, Glimmer, Feldspat und Kalk [189].

Montmorillonit ist ein Aluminiumhydroxysilikat, das in einer Blätterstruktur aufgebaut ist. Dieses sogenannte Dreischichtsilikat ist aus einer Schicht aus  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Oktaedern und zwei diese umschließenden Schichten  $\text{SiO}_2$ -Tetraedern aufgebaut (Abbildung 7) [191-193].

Die Aluminium-Ionen können durch andere, wie  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  ersetzt werden [191, 194]. In die Zwischenräume der Tetraederschichten lagern sich weitere Kationen ein ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ), die entscheidend die Eigenschaften des Minerals beeinflussen [193, 195-198]. Dadurch erhält es sein Kationenaustauschvermögen [193, 199].



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der molekularen Struktur des Montmorillonits.** A: Darstellung der Lammellenstruktur verändert nach Erbslöh Bentonit Informationen – holzeis: Bentonit Kompendium, Erbslöh Geisenheim Getränketechnologie GmbH & Co. KG, Geisenheim (2004); B: Vergrößerte Darstellung der Kristallstruktur einer Lamelle aus Grim (1962) [200].

Die innerkristalline oder osmotische Quellung des Montmorillonit wird durch verschiedene Umgebungsparameter beeinflusst, wie die umgebenden Elektrolyte in der Lösung oder Alkohol [188, 190, 201, 202]. Damit geht auch die Beeinflussung der Adsorbierbarkeit einher. Denn ein hoher Gehalt an Ca<sup>2+</sup>- oder Mg<sup>2+</sup>-Ionen in der Lösung wirkt inhibierend auf die Adsorption. Diese Ionen komplexieren stärker mit den Tetraedern, wodurch die mögliche Austauschfläche reduziert wird [193].

### Wechselwirkung mit Proteinen

Bentonit wird bevorzugt für die Entfernung der trübungsverursachenden Weinbestandteile eingesetzt. Gerade bei der Protein Entfernung erweist sich Bentonit als eine sehr effektive Methode. Es ist noch nicht abschließend bekannt welche Proteine von dem Bentonit entfernt werden und wie diese mit dem Mineral in Wechselwirkung treten. Verschiedene Faktoren können die Adsorption der Proteine beeinflussen. Der pH-Wert der Lösung ist dabei ein sehr entscheidender Faktor. Durch den pH-Wert wird entsprechend die Eigenladung der Proteine beeinflusst und somit auch deren Wechselwirkung mit dem Kationenaustauschmaterial. Die meisten Weinproteine weisen einen pI zwischen 4,0 und 5,0 auf [10, 164, 171, 203]. Somit liegen bei einem Wein pH-Wert von 3,5 – 4,0 die meisten dieser Proteine vorwiegend mit einer positiven Ladung vor und binden an das Montmorillonit. Wie sich die Proteine an das Mineral anlagern ist nicht genau bekannt. Hierzu boten Rodriguez *et al.* (1977) bereits einige Vorschläge zur Bindung der unterschiedlich großen Proteine an die Austauschoberfläche [198]. Nach dieser Arbeitsgruppe dringen kleine, flexible Proteine in den Interlamellarraum des Montmorillonit ein und besonders große Proteine lagern sich ausschließlich an der



Oberfläche der Schichten an [198]. Hier sollte auch darauf hingewiesen werden, dass sich die Struktur des Bentonits in Lösung unterscheiden kann. Wie bereits erwähnt wird Bentonit durch Elektrolyte beeinflusst. Dadurch ist es möglich, dass sich die Montmorillonitschichten in sogenannte Taktoiden stapeln (10 - 15 Schichten gestapelt) oder sich in einer sogenannten Kartenhausstruktur anordnen [193, 204]. Dementsprechend ergeben sich verschiedenen Zwischenstufen mit variierender Zugänglichkeit der Kationenaustauschoberfläche für die Proteine.

### **Bentonitbedarf**

Es ist schwierig, den benötigten Bedarf des Minerals zu ermitteln, um den Wein zu stabilisieren. Daher wurden verschiedene Testverfahren entwickelt mit denen sich der Bentonitbedarf einschätzen lässt. So soll eine Über- oder Unterschätzung des benötigten Bentonits vermieden werden.

Einige der Tests erzeugen durch Säuredenaturierung der Proteine eine Trübung, die einen Hinweis über den Bentonitbedarf geben soll (Bentotest<sup>®</sup> Richard Wagner Kellereibedarf, Alzey; ProtoCheck, Esseco Group, San Martino, Italien) [184].

Bei einem anderen Test wird sich die Interaktion von Tanninen mit den Weinproteinen zu nutzen gemacht. Die Proteine komplexieren mit den Tanninen und fallen aus (Proteotest<sup>®</sup>, Enologica Vason, Verona, Italien) [7, 175]. Neben diesen Tests ist der Wärmetest der verbreitetste und zuverlässigste. Hier wird der Wein bei einer bestimmten Temperatur inkubiert und die entstehende Trübung kann wie bei den anderen Tests auch mittels Trübungsphotometrie (Nephelometrie) bestimmt werden [184, 205]. Bei dem Wärmetest handelt es sich nicht um eine standardisierte Methode, da jedes Testlabor andere Temperaturen und Inkubationszeiten einsetzt. Das DLR Mosel empfiehlt basierend auf den Ergebnissen von Sauvage *et al.* (2010) in einer Arbeit von Achim Rosch eine Inkubation von 4 h bei 70°C [10, 206].

Allerdings ermitteln diese Testverfahren eine Überschätzung der Bentonitbedarfs, dessen Einsatz zu Qualitäts- und Quantitätsverlusten führt.

## 1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des allergenen Potentials von Weinproteinen sowie die Entstehung und die Vermeidung von Trübung im Wein. In beiden Bereichen wird der Fokus auf die Untersuchung und die Charakterisierung der beteiligten Proteine gelegt.

Unverträglichkeitsreaktionen nach dem Konsum von Wein sind nach einer Umfrage unter der Mainzer Bevölkerung relativ verbreitet. Eine mögliche Ursache könnte das im Wein vorhandene LTP sein. Dies ist bislang das einzig gelistete Traubenallergen. In einer klinischen Studie soll es als Auslöser der Unverträglichkeiten untersucht werden.

Da auch bei der Weintrübung die enthaltenen Proteine eine große Rolle spielen, wird der Einfluss oenologischer und weinbaulicher Maßnahmen auf die Proteinzusammensetzung untersucht. Aufbauend werden Untersuchungen zur Weinstabilisierung unter Verwendung von verschiedenen Polysacchariden vorgenommen. Ihre Wirkung bei der Weinstabilisierung soll demonstriert werden. Diese Versuche tragen dazu bei die Trübung und dessen Bildung besser zu verstehen. Erst mit diesen Erkenntnissen und einem besseren Verständnis über die Adsorptionseigenschaften des Bentonits, lassen sich neue Strategien zur Trubvermeidung entwickeln. Die Spezifität und Adsorption des Schönungsmittels Bentonit wird an zwei Weißweinen charakterisiert.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit soll ein umfassendes Bild über Wein als biologisches System erstellt werden. Es handelt sich bei Wein um ein Gemisch verschiedenster Komponenten, die unterschiedliche Wirkungen aufweisen, auch auf den Konsumenten. Durch diese Betrachtungen wird sich erhofft einen weiteren Einblick in die Wechselwirkungen des komplexen Systems Wein zu erlangen.

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte

Gerät	Produktname	Hersteller
2D Apparaturen	IEF-Gelelektrophoreseapparatur IPGphor Hofer Electrophorese Unit SE600	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Blot-Apparatur	Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, München
CD	J-810 Spectropolarimeter Spectrometer	Jasco GmbH Germany, Paris, France
DSC	VP-DSC Microcalorimeter	MicroCal, Northampton, USA
Dynamische Lichtstreuung	Zetasizer Nano S Size, He-Ne-Laser 633 nm	Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdome
Eismaschine	ZBE 30-10	Ziegra-Eismaschinen, Isernhagen
Fluorimeter	Hitachi F-4500 Fluorescence Spectrophotometer	Uwe Benninger Analytik, Schwäbisch Gmünd
FPLC	BioLogic DuoFlow Workstation Auto-Injection Valve AV 7-3 Fraction Collector BioFrac Software: Biologic DuoFlow 5.0 BioLogic HR Workstation Auto-Injection Valve AV 7-3 Fraction Collector Model 2128 Software: BioLogic HR 2.1	Bio-Rad, München
Gefriertrocknung	ALPHA 1-4 LSC Inklusive Vakuumpumpe RZ-2	Martin CHRIST Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode

Geldokumentation	Scanner: GS-800 Calibrated Densitometer Software: Quantity One v4.5.2 Scanner: ChemiDoc™ MP Imaging System Software: Image Lab 4.1 Scanner: EPSON PERFECTION V750 PRO Software: EPSON Scan V 3.2	Bio-Rad, München      Suwa, NGN, Japan
Geltrocknungsanlage	Vakuum-Geltrockner	von Keutz Laborgeräte, Reiskirchen
Heizblock	TK 10	HLC BioTech, Bovenden
Kältebad	Kältebad mit Umwälzthermostat F34- ED	JULABO Labortechnik, Seelbach
KZE	Kurzzeiterhitzungsanlage mit Plattenwärmeaustauscher	Holstein & Kappert, Dortmund
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mixer	MX 32	Braun AG, Frankfurt a. M.
Nephelometer	Trübungsfotometer Nephla, Type LPG 239.52	Dr. Lange, Düsseldorf
pH-Meter	766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co KG, Berlin
Photometer	Cary 300 Bio Uv-Visible Spectrophotometer Hitachi U-3000 Spectrophotometer	Varian, Darmstadt Uwe Benninger Analytik, Schwäbisch Gmünd
Polyacrylamid- Gelelektrophorese	Minigel-Laufkammer	Keutz Laborgeräte, Reiskirchen
Pressanlage	Europress Px3	Euro Machines USA
Reagenzglasschüttler	VM3	IKA Labortechnik, Staufen
Reinstwasseranlage	Milli-Q Plus PF Milli-Q Advantage A 10 Systems	Millipore, Eschborn
Rotationsverdampfer	RE-11	Büchi Laboratoriums- Technik AG, Flawil, Schweiz

Schüttler	Mini Rocking Platform Schüttler Duomax 1030	Biometra GmbH, Göttingen Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelheim
Spannungsquellen	Power Supply Model 200/2.0 Power-Pac 3000 Serva BluePower 300 Netzgerät	Bio-Rad, München  Serva, Heidelberg
Taumelrollenmischer	RM5-30V	neoLab, Heidelberg
Ultrafiltrationsanlagen	Sartorius Slice System, Pumpe: SartoJet Taumelkolbenmembranpumpe, Sartorius Slice Flachmembran Hydrosart , Cutoff 5 & 10 kDa, 0,1 m <sup>2</sup> Filtrationsfläche Sartorius Sartocan beta System, Sartocan Flachmembran Hydrosart, Cutoff 10 kDa, 0,6 m <sup>2</sup> Filtrationsfläche	Sartorius, Goettingen
Vakuumpumpe	MZ 2C	Vakuubrand GmbH, Wertheim
Waagen	A 200S MJ 3000	Sartorius GmbH, Göttingen YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan
Wärmeschrank	Heraeus B 6120	Heraeus instruments GmbH, Hanau
Zentrifugen	Universal 16R Universal 32R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Produktname	Hersteller
Antikörper	Anti-Thaumatococcus (Plant), Polyclonal IgY Antibodies Anti-Chicken IgG (AP)  Gt Anti-Human IgE ( $\epsilon$ ), HRP Conjugate	GenWay Biotech, San Diego CA, USA Acris Antibodies, Hiddenhausen Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Arabinogalactan	103,89 g, 50 mM Fraktion, 1-3-6 Arabinogalactan	Hochschule Geisenheim, Geisenheim
Blotting Filterpapier	Blotting Papers BG002	Schleicher und Schuell, Dassel
Calcium-Bentonit	SIHA Bentonit G	Eaton Technologies GmbH, Langenlonsheim
Carboxymethylcellulose	Cellulose Gum Charge 6 K 531	Dow Wolff Cellulosics, Bomlitz
Cover Fluid	plusone DryStrip Cover Fluid	Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden
Dialyseschlauch	Regenerierte Cellulose; MWCO 3,5 kDa; Spectra/Por®	Roth, Karlsruhe
FPLC Säulen	Kationentauscher UNO S-1 % S-6 Anionenaustauscher UNO™ Q-12 HiTrap™ HIC Selection Kit : Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (low sub) Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (high sub)	Bio-Rad, München  Amersham Pharmacia Biotech
Glasplatten	SE6102 Glass Plates (PR)	GE Healthcare, Uppsala
Gummi arabicum	SIHA Gummi Arabicum Granulat	Eaton Technologies GmbH, Langenlonsheim
IEF-Strips	Immobiline™ DryStrip pH 3-10, 11 cm	GE Healthcare, Freiburg
Kalium-Bentonit	Plusgran Juice K	Enologica Vason S.p.A., Verona, Italia
Keramikschieferchen	Strip holder, 11 cm	Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden

Membran Filter	Supor®-200; 0,2 µm	Pall GmbH, Dreieich
Natrium-Bentonit	Plusgran® V	Enologica Vason S.p.A., Verona, Italia
Natrium-Calcium-Bentonit	Na-Calit	Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim
Paraffin	Paraffin, dickflüssig	Merck, Darmstadt
Reinigungslösung	IPGphor Stripholder Cleaning Solution	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Rhamnogalacturonan	247,20 g, 500 mM Fraction, Rhamnogalacturonan-Fraction	Hochschule Geisenheim, Geisenheim
Spritzenfilter	Rotilabo®-Spritzenfilter, steril; 0,22µm; Polyethersulfon (PES), Ø 33 mm	Roth, Karlsruhe

## 2.3 Chemikalien

Alle Chemikalien werden *pro analysis* Qualität bezogen.

### 2.3.1 Puffer

Chemikalie	Hersteller
Citronensäure Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Na-Citrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Natrium Azid	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, Steinheim

### 2.3.2 Bradford Assay

Chemikalie	Hersteller
BioRad Protein assay nach Bradford	Biorad, München
Trypsin-Inhibitor	Sigma Aldrich, Steinheim

### 2.3.3 Gelelektrophorese

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Roth, Karlsruhe
APS	Roth, Karlsruhe
BPB	Roth, Karlsruhe
CHAPS	Roth, Karlsruhe
Coverfluid	Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
DTT	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
IPG-Puffer	GE Healthcare, Uppsala
Kaleidoskop Prestained Standard Marker	Biorad, München
Nativ Marker Liquid Mix for BN/CN	Serva, Heidelberg
Precision Plus Protein Unstained Standard 161-0363	Biorad, München
Precision Protein Plus Dual Xtra Standard, Prestained	Biorad, München
Rotiphorese 30	Roth, Karlsruhe
RunBlue Dual Color SDS Marker	Expedeon, Harston, Cambridgeshire, United Kingdom
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg

### 2.3.4 Proteinfärbungen

Chemikalie	Hersteller
AgNO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Aluminiumsulfat-Hydrat	Roth, Karlsruhe
Citronensäure Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Coomassie G 250	Roth, Karlsruhe
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethanol (99 %)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe



Methanol	Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
o-Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe

### 2.3.5 Glykoproteinfärbungen

Chemikalie	Hersteller
Alcian Blau	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumbisulfit	Sigma Aldrich, Steinheim
Perjodsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Schiff's Reagenz	Roth, Karlsruhe

### 2.3.6 Western Blot

Chemikalie	Hersteller
BCIP	Roth, Karlsruhe
Bromelain	Sigma Aldrich, Steinheim
BSA	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NBT	Roth, Karlsruhe
Pierce <sup>®</sup> ECL Plus Western Blotting Substrate Detection Solution A & B	ThermoScientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Sulfosalicylsäure	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Serva, Heidelberg
TRIS	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

## 2.4 Pufferlösungen

Alle Lösungen wurden mit Wasser aus der Milli-Q Advantage A 10 Systems-Anlage angesetzt.

### 2.4.1 Proteinaufreinigung

Die verwendeten Puffer wurden nach der Methode nach Holzhauer (1997) bei Raumtemperatur hergestellt.

Niedrigsalzpuffer	Hochsalzpuffer
0,01 M Phosphatpuffer pH 7	0,01 M Phosphatpuffer pH 7 + 1M NaCl
0,1 M Phosphatpuffer pH 7	0,1 M Phosphatpuffer pH 7 + 1 M NaCl
0,1 M Citratpuffer pH 3,5	
0,1 M Citratpuffer pH 3	0,1 M Citratpuffer pH 3 + 1 M NaCl
0,03 M Citratpuffer pH 3,5	
0,05 M Citratpuffer pH 4	0,05 M Citratpuffer pH 4 + 1,25M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>
0,05 M Citratpuffer pH 5	0,05 M Citratpuffer pH 5 + 1,25M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>

Bezeichnung	Zusammensetzung
Traubenextraktionspuffer	0,1 M Phosphatpuffer pH 7 0,02 M EDTA 0,003 M Natrium Azid 0,5 % TWEEN 20 Proteaseinhibitor

### 2.4.2 Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung
Acrylamidlösung	Rotphorese Gel 30; 37,5:1
Agaroselösung	0,5 % Agarose in SDS-Laufpuffer
APS	2 % APS in Wasser
Denaturierungspuffer	5 ml Sammelgelpuffer 8 ml einer 10 %igen SDS-Lösung 1 ml Wasser 4 ml Glyzerin 2ml β-Mercaptoethanol 1 Spartelspitze BPB

Nativer Laufpuffer	0,1 M Tris 0,75 M Glycin 1:4 mit Wasser verdünnt
Nativer Probenpuffer	50 % Glycerin 0,1 % BPB in Wasser
Rehydrationspuffer	8 M Harnstoff 2 % CHAPS vor Gebrauch Zugabe von 5.6 mg DTT und 10 µl IEF-Puffer je 2 ml (entsprechend dem pH-Bereich des IEF-Strips, Pharmacia)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (22 °C)
SDS-Äquilibriumspuffer pH=6.8	50 mM Tris 6 M Harnstoff 2 % SDS 30 % Glycerin Vor Gebrauch Zugabe von 100 mM DTT
SDS-Laufpuffer	0,1 M Tris 0,75 M Glycin 0,4 % SDS 1:4 mit Wasser verdünnt
SDS-Lösung	10 % SDS in Wasser
TEMED	unverdünnt verwenden
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (22 °C)

## Pipettierschema SDS-Gele (Angabe für 2 Gele)

<b>Trenngel</b>	<b>Angaben für 2 Gele</b>		<b>Sammelgel</b>	<b>Angaben für 2 Gele</b>
Prozentigkeit	12,5 %	15 %	Prozentigkeit	3 % Minigel
Rotiphorese 30	5,83 ml	7 ml	Rotiphorese 30	1 ml
Trenngelpuffer	3,5 ml	3,5 ml	Sammelgelpuffer	2,5 ml
Wasser	4,18 ml	3,01 ml	Wasser	6,15 ml
SDS (10 %)	280 µl	280 µl	SDS (10 %)	200 µl
TEMED	28 µl	28 µl	TEMED	40 µl
APS (2 %)	420 µl	420 µl	APS (2 %)	300 µl

Pipettierschema native Gele (Angabe für 2 Gele)

Trenngel	Angaben für 2 Gele	Sammelgel	Angaben für 2 Gele
Prozentigkeit	10 %	Prozentigkeit	3 % Minigel
Rotiphorese 30	4, 67 ml	Rotiphorese 30	1 ml
Trenngelpuffer	3,5 ml	Sammelgelpuffer	2,5 ml
Wasser	5,62 ml	Wasser	6,35 ml
TEMED	28 µl	TEMED	40 µl
APS (2 %)	420 µl	APS (2 %)	300 µl

Pipettierschema 2D-SDS-Gele (Angabe für 1 Gel)

Trenngel	Angaben für 1 Gel	Sammelgel	Angaben für 1 Gel
Prozentigkeit	15 %	Prozentigkeit	3 % Minigel
Rotiphorese	20 ml	Rotiphorese	1,67 ml
Trenngelpuffer	10 ml	Sammelgelpuffer	2,5 ml
SDS, 10 %	0,4 ml	SDS, 10 %	0,1 ml
H <sub>2</sub> O	9,3 ml	H <sub>2</sub> O	5,34 ml
TEMED	15 µl	TEMED	4 µl
APS (10 %)	300 µl	APS (10 %)	75 µl
gesamt:	40 ml	gesamt:	10 ml

2.4.3 Färbemethoden

2.4.3.1 Coomassie nach Kang

Bezeichnung	Zusammensetzung
Färbelösung	0,2 g Coomassie G 250 50 g Aluminiumsulfat-Hydrat 100 ml Ethanol (99 %) 20 ml o-Phosphorsäure 830 ml Wasser
Entfärber	100 ml Ethanol (99 %) 20 ml o-Phosphorsäure 880 ml Wasser

**2.4.3.2 Silberfärbung**

Bezeichnung	Zusammensetzung
50 %ige Methanol-Lösung	500 ml Methanol 100 ml Essigsäure 400 ml H <sub>2</sub> O
5% Methanol-Lösung	50 ml Methanol 70 ml Eisessig 880 ml Wasser
Enhancer	0,2 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O 1000 ml Wasser
Färbelösung: frisch ansetzen	0,4 g AgNO <sub>3</sub> 150 µl Formaldehyd Wasser auf 200 ml auffüllen
Entwickler	60 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 40 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O 500 µl Formaldehyd Wasser auf 1000 ml auffüllen
Stopp-Lösung	420 g Citronensäure Wasser auf 1000 ml auffüllen

**2.4.3.3 Glykoproteinfärbung**

Bezeichnung	Zusammensetzung
50 %ige Methanol-Lösung	50 % Methanol 10 % Essigsäure 40 % H <sub>2</sub> O
Waschlösung	7,5 % Essigsäure
1 %ige Perjodsäure	1 g Perjodsäure 100 ml H <sub>2</sub> O
Schiff`s Reagenz	1 % (w/v) basisches Fuchsin 1,9 % Natriumbisulfit 0,15 N HCl
Badlösung	1% Natriumbisulfit 1 N HCl
0,01 % Alcian Blau-Lösung	10 mg Alcian Blau 8 Gx 3 ml Essigsäure (konz.) 97 ml H <sub>2</sub> O

## 2.4.4 Western Blot

Bezeichnung	Zusammensetzung
Transferpuffer	2,9 g Glycin 5,8 g TRIS 0,37 g SDS 200 ml Methanol Wasser auf 1000 ml auffüllen
Ponceau S Lösung	7,5 g Trichloressigsäure 7,5 g Sulfosalicylsäure 0,5 g Ponceau S Wasser auf 250 ml auffüllen
TBS: TRIS buffered saline	12,1 g TRIS 81,8 g NaCl Wasser auf 1000 ml auffüllen
TBST: TRIS buffered saline + Tween	100 ml TBS 3 ml Tween 20 900 ml Wasser
Magermilchpulver (5 %)	5 g Milchpulver 100 ml TBST
BSA (3 %)	3 g BSA 100 ml TBST
Entwicklungspuffer (10x)	12,1 g TRIS 58,4 g NaCl 10,2 g MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O Wasser auf 1000 ml auffüllen
Entwicklungslösung für die Alkalische Phosphatase	1 ml Entwicklungspuffer (10x) 33 µl BCIP (50 mg/ml Bromchloroindolyphosphat (BCIP) in DMF) 66 µl NBT (50 mg/ml p-Nitrobluetetrazolium (NBT) in 70 % (v/v) DMF) 9 ml Wasser
Entwicklungslösung für die Meerrettichperoxidase	Pierce® ECL Plus Staining Solution: 1 ml Lösung A 25 µl Lösung B

**Angaben zur Verwendung der Antikörper**

Chemikalie	Menge für 10 ml
Anti-Thaumatin (Plant), Polyclonal IgY Antibodies	1:20000 mit 5 % Milchpulver in TBST
Anti-Chicken IgG	1:20000 mit 5 % Milchpulver in TBST
Anti-Human IgE (ε)	1: 5000 mit 3 % BSA in TBST
Humanes Serum	Unverdünnt

**2.5 Verwendete Weine**

Nr.	Wein	Produktinformationen	Bemerkungen
	Auxerrois	Auxerrois, D. Endt (2009) [207]	frak. UF >10kDa
	Rhein Riesling Classic	Nr. 43750200409, 2008, Weingut der Stadt Mainz, Weingut Fleischer, Rheinhessen	
	Dornfelder	Weingut der Stadt Mainz, Mainz, 13,5 %vol, 2009, Weingut Fleischer, Rheinhessen	
	Riesling	Weingut der Stadt Mainz, Mainz, 12,5 %vol, 2009, Weingut Fleischer, Rheinhessen	
	Avelsbacher Hammerstein Spätburgunder	Staatliche Weinbaudomäne Trier, 12 %vol, 2009	
	Grauburgunder	Staatliche Weinbaudomäne Trier, 12,5 %vol, 2009	
	Mosel Riesling: Bernkasteller Badstube	Staatsweingut Mosel, Bernkastel-Kues, 2009, 11 %vol	
MM_0	Riesling	Mosel St. Michael Riesling QbA, 2011 >200 g/hl Bentonit, Moselland eG Manuel Brixius	

MM_2	Portugieser mit Bento	Rheinhessen Qualitätswein Portugieser Weißherbst, 2011 Halbtrocken, 400 g/hl Bentonit, Moselland eG Manuel Brixius	bereits mit Bentonit geschönt
MM_3	Portugieser	Rheinhessen Qualitätswein Portugieser Weißherbst, 2011 Halbtrocken, Moselland eG Manuel Brixius	
MM_5	Blanc de Noir	Blanc de Noir, 2011 120 g/hl Bentonit, WZG Möglingen	
MM_6	2008 OB Riesling	Riesling, Lage: Ehrenfels (Rüdesheimer Berg) Versuchswein Forschungsanstalt Geisenheim, mit Restzucker,	2008er: Weinnr. 08612, <b>ohne</b> Bewässerung
MM_7	2008 MB Riesling	Riesling, Lage: Ehrenfels (Rüdesheimer Berg) Versuchswein Forschungsanstalt Geisenheim, mit Restzucker,	2008er: Weinnr. 08613, <b>mit</b> Bewässerung, 5 Bewässerungstermine
MM_4 T7	Weißburgunder	Weingut U. Lützkendorf, Bad Kösen; 2011 z. Hd. Sobe (Erbslöh), 450 g/hl Bentonit	
MM_4 T9	Traminer	Weingut U. Lützkendorf, Bad Kösen; 2011 z. Hd. Sobe (Erbslöh), > 450 g/hl Bentonit	
MM_8	Riesling	Most Einfluss Trockenstress, 2012	Bewässert, UF >10 kDa
MM_9	Riesling	Most Einfluss Trockenstress, 2012	Unbewässert, UF >10 kDa
MM_10	Riesling	Most Ausbauvarianten, 2012	UF >10 kDa
MM_11	Riesling	Most Entsaftungsvarianten, 2012	Maischepressung, UF >10 kDa



MM_12	Riesling	Most Entsaffungsvarianten, 2012	Ganztraubenpressung, UF > 10 kDa
MM_13	Riesling	MM_4_T10 Weingut, Bad Kösen, Riesling, 2011	Sephadex G25 >5 kDa
MM_14	Riesling	MM_4_T10 Weingut, Bad Kösen, Riesling, 2011	Ultrafiltration, Retentat >5 kDa
MM_21	Riesling	Wein Kontrolle a	+ Hefe, UF >10 kDa
MM_22	Riesling	Wein Kontrolle b	+ Hefe, UF >10 kDa
MM_23	Riesling	Wein Ausbauvariante V 1a, 2012	+ Hefe + Vit B 1, UF >10 kDa
MM_24	Riesling	Wein Ausbauvariante V 1b, 2012	+ Hefe + Vit B 1, UF >10 kDa
MM_25	Riesling	Wein Ausbauvariante V 2a, 2012	+ Hefe + Vitamin Combi, Erbslöh, UF >10 kDa
MM_26	Riesling	Wein Ausbauvariante V 2b, 2012	+ Hefe + Vitamin Combi, Erbslöh, UF >10 kDa
MM_27	Riesling	Wein Ausbauvariante V 3a, 2012	+ Hefe + SIHA Proferm H+2, Begerow, UF >10 kDa
MM_28	Riesling	Wein Ausbauvariante V 3b, 2012	+ Hefe + SIHA Proferm H+2, Begerow, UF >10 kDa
MM_29	Riesling	Wein Ausbauvariante V 4a, 2012	+ Hefe + SIHA Proferm Fit, Begerow, UF >10 kDa
MM_30	Riesling	Wein Ausbauvariante V 4b, 2012	+ Hefe + SIHA Proferm Fit, Begerow, UF >10 kDa
MM_31	Riesling	Wein Ausbauvariante V 5a, 2012	+ Hefe + VitaFerm Ultra F3, Erbslöh, UF >10 kDa
MM_32	Riesling	Wein Ausbauvariante V 5b, 2012	+ Hefe + VitaFerm Ultra F3, Erbslöh, UF >10 kDa
MM_33	Riesling	Wein Ausbauvariante V 6a, 2012	+ Hefe + Hefacell, Erbslöh, UF >10 kDa

MM_34	Riesling	Wein Ausbauvariante V 6b, 2012	+ Hefe + Hefacell, Erbslöh, UF >10 kDa
MM_37	Riesling	Wein Entsaftungsvarianten	Maischepressung, UF >10 kDa
MM_38	Riesling	Wein Entsaftungsvarianten	Ganztraubenpressung, UF >10 kDa
W7044	Portugieser	unbehandelt	

## 3 Methoden

### 3.1 Bradford Assay

Der Bradford Assay ist eine photometrische Methode zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration [208-210]. Hierbei wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums des verwendeten Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G250 von 465 nm zu 595 nm bei Bindung an basische und hydrophobe Aminosäuren der Proteine ausgenutzt [211]. Der Farbstoff komplexiert mit den entsprechenden Seitenketten und geht in eine stabile unprotonierte, anionische Sulfat-Form über. Die Ermittlung der Gesamtproteinkonzentration der Probenlösung erfolgt mittels einer Eichgerade [208-210]. Als Standardprotein hierfür wird der Trypsin-Inhibitor aufgrund der ähnlichen Zusammensetzung an basischen Aminosäuren zu den Weinproteinen verwendet.

Die Messlösungen enthalten jeweils 100 µl der zu bestimmenden Probe und 900 µl des 1:4 verdünnten Reagenzes (BioRad Protein Assay nach Bradford, Biorad München). Nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Absorption bei 595 nm gemessen (Einmalküvetten, Schichtdicke von 1 cm) und entsprechend der Eichgerade ausgewertet. Alle Messungen erfolgen in 3fach-Bestimmung.

### 3.2 Dialyse

Zur Vorbereitung für die Gefriertrocknung müssen aus den Most- und Weinproben Salze, Zucker, Farbstoffe und auch Alkohol möglichst entfernt werden. Dazu wird die Probe gegen Wasser in einem semipermeablen Celluloseschlauch mit einer molekularen Ausschlussgröße von 3,5 kDa dialysiert.

Der Dialyseschlauch muss vor seiner Verwendung in Wasser eingeweicht werden und wird erst dann mit der Probe befüllt. Hier werden ca. 100 ml Probe gegen 4,5 l Aqua dest. bei 4 °C unter ständigem Rühren dialysiert. Nach mehreren Stunden stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der Salzkonzentration im Dialyseschlauch und der Umgebung ein. Um einen möglichst niedrigen Gehalt der zu entfernenden Molekülen zu erhalten, wird das Dialysewasser über den gesamten Zeitraum täglich zweimal gewechselt.

Die Dauer der Dialyse ist abhängig von der Probe. Weißweine werden ca. 3 Tage, Rotweine und Moste 6 bis 7 Tage dialysiert.

### 3.3 Lyophilisation

Bei der Lyophilisation wird dem zuvor dialysierten Most bzw. Wein Wasser per Sublimation entzogen. Dazu wird die Probe in einem Rundkolben gleichmäßig und vollständig bei -25 °C eingefroren und anschließend an die Gefriertrocknungsanlage unter Vakuum (Druck: 0,94 mbar, T= -56 °C) angeschlossen. Die Proben bleiben bis zur vollständigen Trocknung (ca. 24 h) an der Anlage angeschlossen. Mit dieser für die Proteine schonenden Methode erhält man das sog. Lyophilisat, das für die weiteren Proteinanalysen eingesetzt wird.

### 3.4 PVP-Fällung

Da vor allem bei Rotwein nicht alle Polyphenole durch die Dialyse entfernt werden können, wird die PVP (Polyvinylpyrrolidon) Fällung eingesetzt um für weitere Analysen störende Polyphenole aus der Probenlösung zu entfernen [212, 213]. Die stark polaren Pyrrolidoneinheiten sind in der Lage mit den Polyphenolen Wasserstoffbrücken auszubilden [213]. Da es sich bei PVP um ein sehr schwer lösliches Polymer handelt, ist es möglich die komplexierten Polyphenole mit dem PVP durch Zentrifugation von der Probenlösung abzutrennen.

Dazu werden 300 mg Lyophilisat in 30 ml Puffer (hier 0,01 M Phosphatpuffer pH 7) gelöst, mit 5 % (1,5 g) des schlecht wasserlöslichen PVPs versetzt und über Nacht unter ständigem Rühren bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4 °C) wird der verbleibende Überstand erneut mit 10 % PVP versetzt und wieder für ca. 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernung des PVP und vor weiteren chromatographischen Reinigungsschritten wird die Probe mittels 0,22 µm Spritzenfilter steril filtriert, um auch die letzten Reste des PVP zu entfernen.

### 3.5 Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wird ein Verfahren nach Laemmli (1970) durchgeführt, das Modifikationen nach See und Jackowski (1989) beinhaltet [214, 215]. Die Basis der PAGE bilden die Polyacrylamidgele, welche durch die Quervernetzungen von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (Verhältnis 37,5:1) ein Molekularsieb bilden, in dem Proteine ihrer Größe, Form und Ladung nach aufgetrennt werden können. Die radikalische Polymerisierung dieser beiden Acrylamide wird durch Ammoniumpersulfat (APS) initiiert und durch Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) katalysiert.

Man bezeichnet dieses Gelsystem als diskontinuierlich, da es aus einem Trenn- und einem Sammelgel zusammengesetzt ist. Nach Auftragung der Proben in die dafür vorgesehenen

Probentaschen im Sammelgel wird eine Spannung an das Gel angelegt. Die Proben konzentrieren sich an der Front zum Trenngel. Das in den Laufpuffern enthaltene Glycin liegt im Sammelgel (pH 6,8) als Zwitterion vor und ist so nur schlecht in der Lage bei der angelegten Spannung in Richtung Anode zu wandern. Die ebenfalls enthaltenen Chlorid-Ionen weisen dagegen eine hohe Mobilität auf. Im Bereich zwischen diesen Ionen wandern die Proteine. Beim Wechsel in das alkalische Trenngel (pH 8,8) liegt Glycin als Anion vor, welches nun zusammen mit den Chlorid-Ionen stärker als die Proteine von der Anode angezogen werden. Dadurch wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode und die positiv geladenen Proteine zur Kathode entsprechend ihrer Ladung und Masse im elektrischen Feld.

Zur Visualisierung der Proteinbanden nach der PAGE in den Gelen werden verschiedene Färbungen eingesetzt (vgl. 3.7, 3.8, 3.9).

### **3.5.1 SDS-PAGE**

Bei den SDS-Gelen werden die Proteine vor der Auftragung auf das Gel für etwa 10 min bei 95 °C mit Denaturierungspuffer inkubiert. Das im Denaturierungspuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an das Proteinrückrad an und verleiht dem Protein somit eine negative Eigenladung (pro 1 g Protein lagern sich ca. 1,4 g SDS an). Das ebenfalls im Denaturierungspuffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol unterstützt die Denaturierung, indem es für die Spaltung der Disulfidbrücken innerhalb der Peptidkette sorgt. Nach dieser Behandlung liegen die Proteine in ihrer Primärstruktur mit gleichem Masse-zu-Ladungsverhältnis vor, so dass sie ausschließlich entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Unter Verwendung der Molekulargewichtsmarker lassen sich im SDS-Gel die Molekulargewichte der Proteinbanden abschätzen.

Die hierfür verwendeten Puffer sind unter 2.4.2 aufgelistet.

### **3.5.2 Native PAGE**

Im Gegensatz zu der SDS-PAGE werden bei der nativen PAGE die Proben nicht vor der Beladung auf das Gel denaturiert. Hier werden die Proteine nach ihrer Eigenladung und ihrer molekularen Struktur aufgetrennt.

Die für diese Variante verwendeten Lösungen befinden sich im Kapitel 2.4.2.

### 3.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) ist eine Kombination aus zwei Methoden. In der ersten Dimension wird eine isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt. Bei der IEF wird ein auf einem Applikatorstreifen befindlicher pH Gradient (pH 3 – 10, 11 cm) eingesetzt. Die Rehydratation des sog. IPG-Streifens erfolgt mit der Probe (200 µl, gemischt mit Rehydratationspuffer) in einem Strip-Holder, der für mindestens 16 h an eine Spannungsquelle (IEF-Gelelektrophoreseapparat IPGphor) angeschlossen ist. Dies beinhaltet eine 10-stündige Rehydratation der Strips in der Probenlösung, gefolgt von der Fokussierung (1. 500 V 1h; 2. 1000 V 1h und 3. 8000 V 4h bei 50 µA/Strip, 20 °C). Um den Streifen für diese Zeit vor der Austrocknung zu schützen, wird er mit einem Cover Fluid überschichtet (max. 150 µl).

Anschließend erfolgt in der zweiten Dimension eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes in einer 15 %igen SDS-PAGE (vgl. 3.5.1). Dazu wird der Applikatorstreifen nach Ende der IEF für 15 bis 20 min in SDS-Äquilibriumspuffer inkubiert. Auch hier wird ein Molekulargewichtsmarker (20 µl) aufgetragen und wie der auf dem Sammelgel platzierte IPG-Streifen mit der Agaroselösung luftblasenfrei überschichtet. Das Gel wird mit 45 mA pro Gel in der Hoefer Electrophorese Unit SE600 Apparatur an das Serva BluePower 300 Netzgerät angeschlossen. Die Elektrophorese wird während ihrer Dauer von ca. 4 h mit Eis gekühlt. Anschließend kann das Gel mittels Coomassie (vgl. 3.7) oder Silberfärbung (vgl. 3.8) behandelt werden.

Die verwendete Zusammensetzung der Gele und der Lösungen sind in Kapitel 2.4.2 aufgelistet.

### 3.7 Coomassie-Färbung

Die kolloidale Coomassie-Färbung nach Kang *et al.* (2002) ist eine sensitive Methode um Proteine in einem Polyacrylamidgel anzufärben. Die Untergrenze liegt bei ca. 10 ng Protein pro Bande [216].

Bei der Coomassie-Färbung werden die zu färbenden SDS-Gele für mindestens eine Stunde unter Schütteln in die Färbelösung gelegt (vgl. 2.4.3.1), wobei zuvor bei den denaturierenden Gelen das SDS vollständig durch Wässern entfernt werden muss. Dabei bindet das Coomassie Brilliantblau G250 vorwiegend an die basischen Seitenketten der Aminosäuren und die Proteinbanden färben sich blau an. Um das ungebundene Coomassie zu entfernen, legt man die Gele in den Entfärber bis die Banden deutlich zu erkennen sind (vgl. 2.4.3.1).

### 3.8 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) handelt es sich um eine sensitive, aber unspezifischere Methode Proteine anzufärben [217]. Die untere Nachweisgrenze für Proteine pro Bande liegt bei dieser Methode bei 0,1 bis 1ng. Der Nachteil der Silberfärbung ist, dass sie nicht nur Proteine sondern auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide anfärben kann.

Silberionen lagern sich an Aminosäurereste (Glutamat, Aspartat, Cystein) der Proteine an. Die Entwicklung der braunen Farbe erfolgt über die Reduktion des Silberions zu molekularem Silber, ausgelöst durch die Inkubation mit einer alkalischen Formaldehydlösung (vgl. 2.4.3.2). Das Färbeprotokoll ist im Folgenden aufgeführt (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Versuchsprotokoll zur Silberfärbung.** Die Zeitangaben entsprechen der Färbung eines Minigels.

Dauer	Arbeitsschritt	Lösung
60 min/über Nacht	Fixierung	50 % Methanol-Lösung
20 min	Spülen	5 % Methanol-Lösung
20 min	Spülen	Wasser
1 min	Vorbehandlung	Enhancer
3x 20 s	Spülen	Wasser
20 min	Färben	Färbelösung
3x 20 s	Spülen	Wasser
Gel beobachten	Entwicklung	Entwickler
einige Sekunden	Stoppen	Stopp-Lösung

### 3.9 Glykoproteinfärbung

Zur Identifizierung von Glykoproteinen können verschiedene Färbungen herangezogen werden, die unterschiedliche Eigenschaften der Zuckerkomponenten ausnutzen. In dieser Arbeit werden zwei Methoden verwendet, zum einen die Alcian Blau Färbung und zum andern die Perjodsäure-Schiff-Färbung. Beide Färbungen sind kombinierbar und werden nach einer PAGE durchgeführt.

#### 3.9.1 Alcian Blau Färbung

Bei der Alcian Blau Färbung (AB-Färbung) werden saure Zuckerkomponenten detektiert. Der kationische Farbstoff Alcian blau 8 GS ist ein kupferhaltiges Phthalocyanin, welches saure Polysaccharide wie Mucopolysaccharide anfärbt [218-221]. Dieser Farbstoff reagiert mit den Säuregruppen der Zucker und bildet einen blauen Komplex mit diesen aus. Das Protokoll der

Färbung ist in Tabelle 2 dargestellt und die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Kapitel 0 aufgelistet.

**Tabelle 2: Versuchsprotokoll der Alcian Blau Färbung.** Die Zeitangaben sind an ein Minigel angepasst.

Dauer	Arbeitsschritt	Lösung
60 min	Fixierung	50 % Methanol-Lösung
2x 1 min	Waschen	H <sub>2</sub> O
60 min	AB-Färbung	AB-Färbelösung
2x 1 min	Waschen	H <sub>2</sub> O
60 min	Hintergrundentfärbung	Waschlösung

### 3.9.2 Perjodsäure-Schiff-Färbung

Die Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbung) reagiert mit den 1,2-Diolgruppen neutraler Zuckerkomponenten von glykosylierten Proteinen [219, 221]. Durch die Inkubation mit Perjodsäure werden die Diole zu Aldehyden oxidiert. In einem nächsten Schritt bilden diese mit dem schwefelsauren Fuchsin (farblos, Schiff's Reagenz) durch Abspaltung eines Sulfonat-Ions einen basischen magentafarbenen Komplex aus. Das in der Badlösung enthaltene Natriumbisulfit überführt ungebundenes basisches Fuchsin wieder in seine transparente Form, und verhindert somit ein Nachfärben des Gels [222]. In Tabelle 3 ist das Versuchsprotokoll der PAS-Färbung dargestellt.

**Tabelle 3: Versuchsprotokoll der Perjodsäure-Schiff-Färbung.** Die Zeitangaben sind an ein Minigel angepasst.

Dauer	Arbeitsschritt	Lösung
60 min	Fixierung	50% Methanol-Lösung
2x 1 min	Waschen	Waschlösung
20 min	Oxidation	1 %ige Perjodsäure
2x 1 min	Waschen	Waschlösung
10 min	Färbung	Schiff's Reagenz
2x 1 min	Waschen	Wasser
2x 5 min	Waschen	Badlösung
2x 1 min	Waschen	Wasser



### 3.10 Chromatographie

Die chromatographische Aufreinigung verschiedener Weinproteine erfolgt mittels einer FPLC-Anlage. Diese besteht aus einer Pumpe, einem Injektionssystem, einem Fraktionssammler und einem UV-Detektor. Die Pumpe sorgt für einen konstanten Fluss der Puffer zur entsprechenden Säule, wobei man beachten sollte, dass der Laufpuffer vor der eigentlichen Verwendung vakuumfiltriert (Membranporengröße: 0,22 µm) und entgast ist, um Schäden an den Säulen zu vermeiden. Vor der Injektion der Probe in das FPLC-System wird diese steril filtriert (Rotilabo®-Spritzenfilter, steril; 0,22 µm; Polyethersulfon), um unerwünschte Rückstände (z.B. PVP) zu entfernen. Mit Hilfe des Injektionssystems gelangt die Probe luftblasenfrei auf die Säule und kann über das entsprechende Trennprinzip aufgereinigt werden. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 3.10.1 Größenausschlusschromatographie

Bei der SEC (Größenausschlusschromatographie, engl.: Size Exclusion Chromatography) erfolgt die Auftrennung nach der Größe der Moleküle. Dabei eluieren große Moleküle vor den kleineren, da diese mit dem Säulenmaterial in Wechselwirkung treten und die Elution so verzögert wird. Für diese Methode wird eine Sephacryl S-200 XK 16/60 Säule mit einem Volumen von 120 ml verwendet. Das Säulenmaterial besteht aus Dextran und N,N-Methylenbisacrylamid-Komponenten. Durch den großen Trennbereich von 5 bis 250 kDa eignet sich diese Säule zur Vorreinigung der Gesamtproteinfraktionen aus dem Wein.

Die Aufreinigung erfolgt mit einem 100 mM Phosphatpuffer pH 7. Die Elution wird mittels UV-Detektion bei 280 nm verfolgt (Protokoll siehe Tabelle 15).

#### 3.10.2 Kationenaustauschchromatographie

Die Kationenaustauschmaterialien der eingesetzten Säulen (UNO S-6 & S-1) enthalten terminale quartäre Ammoniumgruppen ( $-N^+(CH_3)_3$ ). Diese stark basischen Gruppen binden anionische Substanzen, die durch einen ansteigenden Salzkonzentrationsgradienten wieder von der Säule eluieren.

Die verwendeten Puffer sind unter 2.4.1 aufgelistet. Angaben zu den Versuchsprotokollen sind im Anhang abgebildet (vgl. 8.1). Die Elution des LTP wird bei 214 nm und die der TLP bei 280 nm detektiert.

Bei der LTP Aufreinigung werden je Lauf 4 ml der PVP-gefällten Most- bzw. Weinproben (vgl. 3.4) auf die S-6 Säule (6 ml Säulenvolumen) injiziert und mit einem 10 mM Phosphatpuffer bei pH 7 eluiert. Die Detektion der Elution erfolgt bei 214 nm (vgl. Tabelle 16). Bei der

Chromatographie der TLPs werden 2 ml auf die kleinere S-1 Säule (1,3 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Für diese Aufreinigung wird ein 100 mM Citratpuffer-System bei pH 3 verwendet und die Elution wird bei 280 nm verfolgt (vgl. Tabelle 17).

### 3.10.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Bei der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) werden hydrophobe Wechselwirkungen der Proteine mit den Salzen der verwendeten Puffer ausgenutzt. Durch die Inkubation der Proteine in einem Hochsalzpuffer wird die Hydrathülle der Proteine reduziert, die dabei freigelegten hydrophoben Reste interagieren mit der Gelmatrix aus Phenylsepharose. Erst wenn die Salzkonzentration im Elutionspuffer erniedrigt wird, bilden die Proteine wieder eine Hydrathülle aus und lösen sich von dem Säulenmaterial.

Bei dieser Methode wird ein Gradient aus Hoch- und Niedrigsalzpuffer verwendet. Der eingesetzte Puffer ist ein 50 mM Citratpuffer, der mit Ammoniumsulfat angereichert wird. Die Elution wird bei 280 nm aufgezeichnet. Das vollständige Versuchsprotokoll ist im Anhang aufgeführt (vgl. Tabelle 18).

## 3.11 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum spezifischen Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Dazu werden die zu untersuchenden Proteine nach der PAGE auf eine Nitrocellulosemembran (Protran® BA 83; 0,2 µm, Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen. Das angewendete Verfahren ist der Semi-Dry-Blot [223], bei dem ein sog. Sandwich aus Filterpapieren, Membran und dem Gel (alles getränkt in Transferpuffer) in die Blotapparatur eingespannt wird und durch Anlegen einer Spannung die Proteine in Richtung Membran (Anodenseite) wandern. Nach dem Blotten wird der Transfer durch eine reversible Färbung mit dem Azofarbstoff Ponceau S überprüft.

Bevor die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert wird, müssen die unspezifischen Proteinbindestellen der Membran geblockt werden. Dadurch wird eine Steigerung der Empfindlichkeit für die Bindung des Primärantikörpers an das gewünschte Protein erzielt. Zu beachten ist die Wahl der Blocklösung, da diese mit der Detektionsreaktion in Wechselwirkung treten und das Ergebnis verfälschen kann. Gerade im Hinblick auf immunologische Versuche mit humanem Serum eignet sich das sonst übliche Milchpulver nicht als Blocklösung. In diesem Fall wird BSA (Bovines Serumalbumin) eingesetzt.

Nach dem Blocken wird die Membran über Nacht mit dem Primärantikörper behandelt, der spezifisch an das zu detektierende Protein bindet. Nach einigen Waschschr

(TRIS buffered saline + Tween) kann die Membran mit dem Sekundärantikörper inkubieren, der durch ein gekoppeltes Enzym für die eigentliche Detektion der Proteinbanden zuständig ist. Man unterscheidet zwei Arten der Detektion, zum einem eine colorimetrische Reaktion mittels der alkalischen Phosphatase und zum anderen eine Detektion mittels Chemilumineszenz, bei der die Meerrettichperoxidase (HRP) an den Antikörper gekoppelt ist.

**Tabelle 4: Versuchsprotokoll für den Western Blot.**

Dauer	Arbeitsschritt	Lösung
ca. 90 min, 100 V	PAGE	Laufpuffer
30 min	Inkubation des Gels und der Nitrocellulosemembran unter Schütteln	Transferpuffer
2-4 h bei RT; 0,8 mA x cm <sup>2</sup>	Semi Dry Blotten	Transferpuffer
1 min, RT	Anfärben	Ponceau S-Lösung
1 min, RT	Waschen	TBST
1,5 h, 4 °C	Blocken	Blocklösungen
über Nacht, 4 °C	Inkubation mit Primärantikörper	Primärantikörper in Blocklösung
3x 10 min, 4 °C	Waschen	TBST
2 h, 4 °C	Inkubation mit Sekundärantikörper	Sekundärantikörper in Blocklösung
3x 10 min, 4 °C	Waschen	TBST
bis Banden sichtbar	Entwicklung	Entwicklungslösung
2x 30 s	Waschen	Wasser
	Trocknen	

Die alkalische Phosphatase spaltet Phosphatgruppen der zugefügten Substrate BCIP (Bromchloroindolylphosphat) und NBT (p-Nitrobluetetrazolium) ab. Das BCIP wird nach der enzymatischen Abspaltung des Phosphats mit dem Luftsauerstoff zu einem Indigo-Farbstoff oxidiert, während NBT zum Formazanfarbstoff reduziert wird. Die detektierten Banden werden blau-violett angefärbt. Die HRP oxidiert das in der Pierce<sup>®</sup> ECL Plus Western Blotting Lösung enthaltene Luminol, die dabei entstehende Chemilumineszenz ist mittels Röntgenfilm oder auch speziellen Aufnahmegegeräten detektierbar. Diese beiden Reaktionen ermöglichen es, die von den Antikörpern erkannten Proteinbanden zu identifizieren. Der Vorteil dieser

indirekten Proteindetektion liegt darin, dass durch die Markierung mit einem zweiten Antikörper das Signal verstärkt werden kann.

Die verwendeten Lösungen für den Versuchsablauf (Tabelle 4) sind in Kapitel 2.4.4 aufgelistet.

### **3.12 Massenspektrometrie**

Die massenspektrometrischen Analysen zur Proteinidentifizierung werden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schild/Tenzer des Institutes für Immunologie an der Universitätsmedizin Mainz durch Dr. Stefan Tenzer durchgeführt.

Bei der Elektronenspray Ionisations Massenspektrometrie (Waters Q-TOF Premier API system) müssen die Proteine zuerst tryptisch in Gel oder in Lösung verdaut werden. Vor der eigentlichen massenspektrometrischen Untersuchung werden die Proben mit einer an die kapillare HPLC (Waters NanoAcquity UPLC system) gekoppelten 75 µm x 150 mm BEH C18 Umkehrphasensäule vorgereinigt.

Die ermittelten Daten werden mit Hilfe des PROTEINLYNX GLOBAL SERVER, Ver. 2.3. (Waters) und einer dafür erstellten Datenbank, die alle bekannten Proteinsequenzen aus *Vitis*, *Saccharomyces cerevisiae* und möglichen Kontaminationen (Trypsin, humanes Keratin) enthält, abgeglichen und zusammengestellt.

### **3.13 Homology Modelling**

Zur Erstellung von Homologie-Modellen der Weinproteine wird das Internet Tool Swiss Modell eingesetzt [224-226]. Basierend auf der bekannten Aminosäuresequenz eines Traubenproteins und einer bereits bekannten Proteinstruktur mit hoher Sequenzidentität wird eine dreidimensionale Proteinstruktur berechnet. Diese Struktur lässt sich anschließend durch das Programm UCSF Chimera [227] visualisieren und bearbeiten. Dies ermöglicht Eigenschaften der Proteine und Wechselwirkungen mit anderen Komponenten zu analysieren.

### 3.14 Cirkulardichroismus Spektroskopie

Bei der Cirkulardichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie) wird der Anteil an rechts und links polarisiertem Licht von chiralen Substanzen betrachtet. Bei einer Messung im Fern-UV Bereich (170 bis 250 nm) wird die Sekundärstrukturzusammensetzung von Proteinen betrachtet, während im Nah-UV Bereich (250 bis 300 nm) die Tertiärstruktur analysiert wird. Die dabei gemessene Größe ist die sog. Elliptizität  $\theta_\lambda$ :

$$\tan \theta_\lambda = (I_R - I_L)/(I_R + I_L) \quad I_R/I_L: \text{ Intensität des rechts bzw. links polarisierten Lichtes}$$

Verknüpft man diese Formel mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz erhält man für die Beschreibung der Elliptizität folgende Formel:

$$\theta_\lambda = \ln 10 \cdot (180^\circ / 4\pi) \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot d$$

$\epsilon$ : Extinktionskoeffizient für rechts bzw. links polarisiertes Licht  
 $c$ : Konzentration [ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ]  
 $d$ : Schichtdicke [dm]

Bei der Messung wurde die Elliptizität (angegeben in millidegree) gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 195 bis 260 nm bei 22 °C an dem J-810 Spectropolarimeter Spectrometer (Jasco GmbH Germany, Paris, Frankreich) aufgezeichnet. Die Proben befanden sich in einem 10 mM Phosphatpuffer bei pH 7. Die Messungen wurden mit Hilfe von Dr. Stephan Hobe im Institut für Allgemeine Botanik der Uni Mainz durchgeführt.

### 3.15 Fluoreszenz

Mittels der Fluoreszenzspektroskopie werden Emissionsspektren von Proteinlösungen aufgezeichnet. Die Detektion erfolgt im 90 ° Winkel zu Anrichtungsrichtung. Durch diese Messungen kann man einen Hinweis auf die Reinheit der Probenlösung erhalten. Im Besonderen bei LTP sollte aufgrund des Fehlens von Tryptophanen in der Aminosäuresequenz keine Emission bei 320 - 350 nm nach Anregung bei 295 nm auftreten.

Die Emissionsspektren werden bei Anregungswellenlängen von 280 und 295 nm mit dem Hitachi F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (Uwe Binniger Analytik, Schwäbisch-Gmünd, Germany) in einem Bereich von 290 bis 410 nm aufgezeichnet. Die Excitationsspektren werden in einem Bereich von 250 bis 300 nm bei verschiedenen Emissionswellenlängen (310, 320 & 350 nm) gemessen. Alle Versuche erfolgen in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 7 und bei 20 °C.

### 3.16 Dynamische Differenzkalorimetrie

Bei der Dynamischen Differenzkalorimetrie (engl.: Difference Scanning Calorimetry, DSC) kann die Enthalpieänderung beim Übergang des nativen Proteins in den denaturierten Zustand ermittelt werden [228]. Das Messprinzip der DSC erfordert, dass die Temperatur in der Referenzzelle (R) und der Probenzelle (P) gleich ist. Dazu wird eine adiabatische Betriebsart benötigt, d.h. es darf kein Wärmeaustausch mit der Umgebung stattfinden. Aus diesem Prinzip resultiert die Messgröße als Änderung der Heizleistung  $\Delta P$  von Referenz zu Probe:  $\Delta P = P_P - P_R$

Daraus lässt sich die Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C(T)$  bei bekannter Heizrate  $\beta$  ermitteln:

$$\Delta C(T) = C_P - C_R = \Delta P(T)/\beta$$

C: Wärmekapazität  
 $\beta$ : Heizrate  $\Delta T/\Delta t$

Wenn man bei einer untergrundkorrigierten Messung den Bereich von der Anfangs- ( $T_1$ ) bis zur Endtemperatur ( $T_2$ ) des Ereignisses integriert, berechnet sich aus dieser Fläche die Enthalpieänderung  $\Delta H$  bei der Denaturierung:

$$\int_{T_1}^{T_2} C(T) * dT = \Delta H$$

Die Messungen an dem VP-DSC Microcalorimeter (MicroCal, Northampton, USA) erfolgten mit einer Heizrate von 60 °C/h. Bei allen Versuchen wurde zusätzlich die Reversibilität der Proteindenaturierung untersucht. Dazu wurde in einem ersten Lauf die Probe von 20 °C auf 120 °C erhitzt, daraufhin wieder auf 20 °C abgekühlt und erneut auf 120 °C erhitzt.

### 3.17 Dynamische Lichtstreuung

Bei der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) wird die Brown'sche Molekularbewegung von Partikeln gemessen. Die in Lösung befindlichen Partikel werden in dem Zetasizer Nano S Size (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom) durch einen Helium-Neon-Laser (633 nm) angeregt und die Intensitätsänderungen des Streulichtes in einem Winkel von 173° (Back Scatter Detection) aufgezeichnet. Aus der Änderung der Photonenzahl des Streulichtes pro Zeiteinheit kann der Diffusionskoeffizient der Teilchen ermittelt werden. Ist die Viskosität der Lösung bekannt, lässt sich der hydrodynamische Radius der Partikel mittels der Stokes-Einstein-Gleichung berechnen und man kann die Größe der Partikel abschätzen:

$$R_S = k_B T / 6 \pi \eta D$$

D: Diffusionskoeffizient

$k_B$ : Boltzmann Konstante

$\eta$ : Viskosität des Lösungsmittels

$R_S$ : Stokes Radius od. Hydrodynamischer Radius

Für die hier dargestellten Versuche wurde eine Trendmessung zur Untersuchung der temperaturabhängigen Aggregation der Partikel im Wein durchgeführt. Dazu wurde die Streuung der Probe von 26 °C bis 82 °C in 2 °C Schritten gemessen. Bei jeder Temperaturstufe äquilibrierte die Probe für 3 min. Damit wurde gewährleistet, dass auch in der Küvette die zu untersuchende Temperatur erreicht wird. Jeweils 100 µl der entsprechenden Proben wurden in Dreifachbestimmung untersucht. Da es bei den im Echtweinsystem untersuchten Proben zu vermehrter Verdunstung während der Messung kam, wurden diese Proben mit 100 µl Paraffin überschichtet.

### 3.18 Halo-Test

Der Halo-Test wird zur Untersuchung der Kationenaustauschkapazität von Tonmineralien eingesetzt. Bei neutralem pH-Wert lässt sich durch das adsorbierte Methyleneblau die Oberfläche der Bentonite berechnen. Dabei wird angenommen, dass ein Methyleneblaumolekül eine Fläche von 1,3 nm<sup>2</sup> besitzt, bei einem millimol Teilchen entspricht dies einer Fläche von 782,86 m<sup>2</sup> [229, 230]. Dieser Wert wird mit der entsprechend titrierten Menge der 10 mg/ml Methyleneblaulösung multipliziert und man erhält eine Einschätzung für die austauschfähige Oberfläche. Die optische Bestimmung erfolgt durch Auftropfen der Suspension auf ein Filterpapier. Bei der Ausdehnung der Flüssigkeit auf dem Papier erscheint am Endpunkt der Titration ein hellblauer Halo um das blaugefärbte Bentonit.

Um den genauen Gehalt an verwendetem Methyleneblau zu berechnen, wird die Suspension filtriert, der noch in der Lösung befindliche Farbstoff photometrisch bestimmt (664 nm) und von der eingesetzten Menge an Methyleneblau abgezogen. Der Versuch erfolgt bei Raumtemperatur. Vor der eigentlichen Titration werden 0,5 g Bentonit in 100 ml Wasser unter Rühren für 2 h vorgequollen.

### 3.19 Klinische Studie zur Untersuchung der Relevanz des LTP als Trauben-Allergen

Das allergene Potential von Traubenproteinen, im speziellen des LTP, sollte im Rahmen einer klinischen Studie untersucht werden. Die Untersuchungen fanden in der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. med. Joachim Saloga und Frau

PD Dr. rer. nat. Iris Bellinghausen statt. Bei diesen Untersuchungen wurde ein Pricktest bei den Probanden durchgeführt und Blut für weitere Testungen entnommen. Teilnehmen konnten Probanden, die an einer Wein- oder Traubenunverträglichkeit leiden. Jeder untersuchte Proband unterschrieb eine Einwilligungserklärung zur Teilnahme an den Untersuchungen.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Mainz und des Landes Rheinland-Pfalz genehmigt.

### 3.19.1 Pricktest

Für den Pricktest wurden verschiedene Traubenprodukte ausgewählt. Neben der Positiv- und Negativkontrolle (Histamin & NaCl) wurden einheimische Weine (Tabelle 5), rote und weiße Trauben sowie Traubensaft aus dem Supermarkt untersucht. Bei dieser Methode wird die Reaktivität der Haut auf die Stimulation durch mögliche Allergene getestet. Dazu werden Tropfen der zu testenden Lösungen auf den Unterarm aufgetragen, anschließend wird die Haut mit einer Pricktest-Lanzette durch den Tropfen oberflächlich eingestochen. Nach einer 30 minütigen Beobachtungsphase wird das Ergebnis der Prickung abgelesen. Hierbei werden die Quaddelbildung und die umgebende Hautrötung betrachtet und als Durchmesser in mm abgelesen. Man spricht von einer positiven Reaktion ab einem Quaddeldurchmesser von 3 mm.

Diese Untersuchung wurde an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz unter ärztlicher Aufsicht durchgeführt.

**Tabelle 5: Liste der getesteten Weine.**

Wein	Produktinformationen
Dornfelder	Weingut der Stadt Mainz, Mainz, 13,5 %vol, 2009, Weingut Fleischer, Rheinhessen
Riesling	Weingut der Stadt Mainz, Mainz, 12,5 %vol, 2009, Weingut Fleischer, Rheinhessen
Avelsbacher Hammerstein Spätburgunder	Staatliche Weinbaudomäne Trier, 12 %vol, 2009
Grauburgunder	Staatliche Weinbaudomäne Trier, 12,5 %vol, 2009
Bernkasteller Badstube, Riesling	Staatsweingut Mosel, Bernkastel-Kues, 11 %vol, 2009



### 3.19.2 ImmunoCAP

Im Rahmen der allergologischen Untersuchungen wurden auch die Gesamt-IgE-Antikörper und die Menge an spezifischen IgE-Antikörpern (Weintraube, Produktcode: f259; rPru p 3: f420) mit dem ImmunoCAP System der Firma Phadia AB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) untersucht. Zur Untersuchung der Relevanz von kreuzreaktiven Kohlenhydratdeterminanten (CCD) wird auch das Phadia System (CCD/MUXF3, Produktcode: o214) verwendet.

Diese standardisierte Methode wird mit dem humanen Serum an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen sog. Fluoroenzymimmunoassay, bei dem durch indirekte Detektion der spezifischen IgE-Antikörper (ähnlich dem Western Blot) deren Konzentration anhand der Fluoreszenzintensität über eine Eichkurve bestimmt wird. Das Ergebnis der Untersuchungen wird in verschiedene CAP Klassen unterteilt, die einen Hinweis auf das Vorliegen einer Sensibilisierung geben (Tabelle 6). Auch der Gesamt-IgE-Antikörper-Spiegel liefert einen Hinweis auf das Vorhandensein einer Allergie (<20 kU/l: Allergie unwahrscheinlich; 20 – 100 kU/l: Allergie möglich; >100 kU/l: Allergie wahrscheinlich).

**Tabelle 6: Einteilung und Beurteilung der CAP Klassen nach Angaben des Herstellers Phadia AB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).**

CAP Klasse	Konzentration des spezifischen IgE	Beurteilung
0	<0,35 kU/l	negativ
1	0,35 – 0,70 kU/l	grenzwertig positiv
2	0,70 – 3,50 kU/l	schwach positiv
3	3,50 – 17,5 kU/l	positiv
4	7,50 – 50,0 kU/l	stark positiv
5	50,0 – 100 kU/l	sehr stark positiv
6	>100 kU/l	sehr stark positiv

### 3.19.3 Cellular Allergen Stimulation Test

Der CAST (Cellular Allergen Stimulation Test) ist ein sehr empfindliches Testverfahren zur Untersuchung der Sensibilität von Leukozyten auf Allergene. Er ist sensitiver als die Hauttestung oder die Betrachtung der spezifischen IgE-Antikörper.

Der BÜHLMANN CAST®-2000 ELISA (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz) ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Sulfidoleukotrienen (sLT). Der Test ist unterteilt in drei Abschnitte: der Leukozytenisolation, deren Stimulation mit dem Antigen und der Messung der Leukotrienausschüttung. Die isolierten Leukozyten der Probanden werden durch die Zugabe des Interleukin 3 (IL-3) für die anschließende

Inkubation mit dem Antigen vorbereitet. Als Allergen diente das gereinigte LTP aus Dornfelder Wein [231]. Nach einer Inkubationszeit von 40 min bei 37 °C wird der Gehalt an sLT im Zellüberstand mit enzymgekoppelten Antikörpern untersucht. Dabei wird die enzymatische Umsetzung des Substrates pNPP (p-Nitrophenylphosphat) photometrisch bei 405 nm quantifiziert. Daraus ergibt sich eine Korrelation zu den freigesetzten sLT. Ab einer sLT-Konzentration von 200 pg/ml spricht man von einer positiven Reaktion. Der Test wurde an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

### **3.19.4 ImmunoBlots mit humanem Serum**

Der ImmunoBlot folgt dem Prinzip des Western Blots (vgl. 3.11). In diesem Fall wird als Primärantikörper das humane Serum verwendet. Ein zusätzlicher Punkt der hier getestet wird ist der Einfluss der kreuzreaktiven Kohlenhydardeterminanten (CCD). Dazu wird zuvor ein Teil des Serums mit Bromelain (Sigma Aldrich, Steinheim) oder mit 20 µg/ml CCD-Blocker (ProGlycAn, Wien, Österreich) inkubiert (1 h, 4 °C) und erst dann erfolgen die weiteren Schritte des Western Blots. Zur Detektion der bindenden IgE-Antikörper wird ein Anti-Human IgE Antikörper (Gt Anti-Human IgE (ε) HRP Conjugate, Invitrogen) eingesetzt, der mit einer Meerrettichperoxidase für die Visualisierung gekoppelt ist. Die zu untersuchenden Proben wurden in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt und entsprechend dem Versuchsprotokoll des Western Blots weiterverarbeitet (Tabelle 4). Das Blotting der Proteine auf die Nitrocellulosemembran dauerte 4 h bei einer Stromstärke von 0,05 A pro Minigel.

Die Visualisierung der gebundenen IgE-Antikörper erfolgte mittels Chemilumineszenz (vgl. 3.11).

### **3.20 Verwendete Software**

Zur Erstellung der Diagramme und einzelner Graphiken wurde Origin 7 verwendet. Zur Darstellung der Sequenzalignments wurden die Programme ClustelX 1.8 [232] und GeneDoc 2.6 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>) eingesetzt.

Sofern weitere Software verwendet wurde, ist dies bei den jeweiligen Ergebnissen angegeben.

## 4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Schwerpunkte hinsichtlich der Proteine im Wein betrachtet. Zum einen wurde das allergene Potential des einzig gelisteten Traubenallergens, das Lipid Transfer Protein (LTP), untersucht. Dazu konnte das LTP chromatographisch aufgereinigt und physiko-chemisch charakterisiert werden. Anschließend wurde eine klinische Studie mit dem Ziel durchgeführt, die Relevanz des LTPs als Traubenallergen in der Region Mainz zu untersuchen. Die klinischen Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz (Arbeitsgruppe Saloga/Bellinghausen).

Der zweite große Themenbereich befasste sich mit der Untersuchung der Weintrübung, ihrer Entstehung, Vermeidung und der Identifizierung der dabei beteiligten Komponenten. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem DLR Mosel (Achim Rosch) sowie der Hochschule Geisenheim (Arbeitsgruppe Dietrich/Will) durchgeführt.

### 4.1 Isolierung und Charakterisierung des Lipid Transfer Proteins

Um das LTP hinsichtlich seines allergenen Potentials zu untersuchen, musste dieses in einem ersten Schritt aufgereinigt werden. Da das LTP aus der Traube bereits als Allergen beschrieben ist (IUIS Allergen Nomenclature Home Page, [www.allergen.org](http://www.allergen.org), Stand Oktober 2014), stellte sich ergänzend die Frage, ob dieses Protein auch nach der Weinbereitung noch als Allergen wirken kann. Daher wurde nicht nur das LTP aus Trauben, sondern auch das aus dem entsprechenden Wein chromatographisch isoliert.

Als Probenmaterial dienten hierfür Dornfelder Trauben aus dem Jahr 2010 und Dornfelder Wein aus dem Jahr 2009 (13,5 %vol Alkohol, Gesamt-Säureanteil: 4,8 g/l, Zuckergehalt: 0,1 g/l, Gesamt-Schwefelsäure: 74 mg/l, pH 3,8). Die Trauben sowie der Wein wurden freundlicherweise von dem Weingut der Stadt Mainz (Familie Fleischer, Hechtsheim) zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.1 Probenvorbereitung

Um für die weiteren Untersuchungen störende Substanzen aus dem Probenmaterial zu entfernen, müssen diese entsprechend vorbehandelt werden. Ein wichtiger Schritt bei diesen Behandlungen ist zum einen die Dialyse (vgl. 3.2) oder auch die PVP Fällung (vgl. 3.4), die unter anderem dazu dient, Polyphenole aus der Probenlösung zu entfernen. Polyphenole stören die verschiedenen Untersuchungen zur Proteinbetrachtung. Durch ihre Entfernung

aus den Proben ist es möglich ein klares Bandenmuster in den SDS-Gelen darzustellen. Andernfalls könnte man nur einen Schmier erkennen, der den Vergleich der Proteinbanden erschwert. Dazu wurden die Dornfelder Trauben mit einem Extraktionspuffer püriert und mit PVP behandelt (vgl. 3.4). Der Dornfelder Rotwein musste zuvor gegen das zwanzigfache Volumen an Wasser dialysiert werden (vgl. 3.2), um für die weiteren Analysen störende Komponenten wie Alkohol und Zuckerreste zu entfernen. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet (vgl. 3.3), bevor auch mit diesen Proben eine PVP-Fällung durchgeführt werden konnte. Erst nach diesen Behandlungen erfolgte die chromatographische Auftrennung der Proben nach dem Protokoll in Tabelle 16 (vgl. 3.10.2).

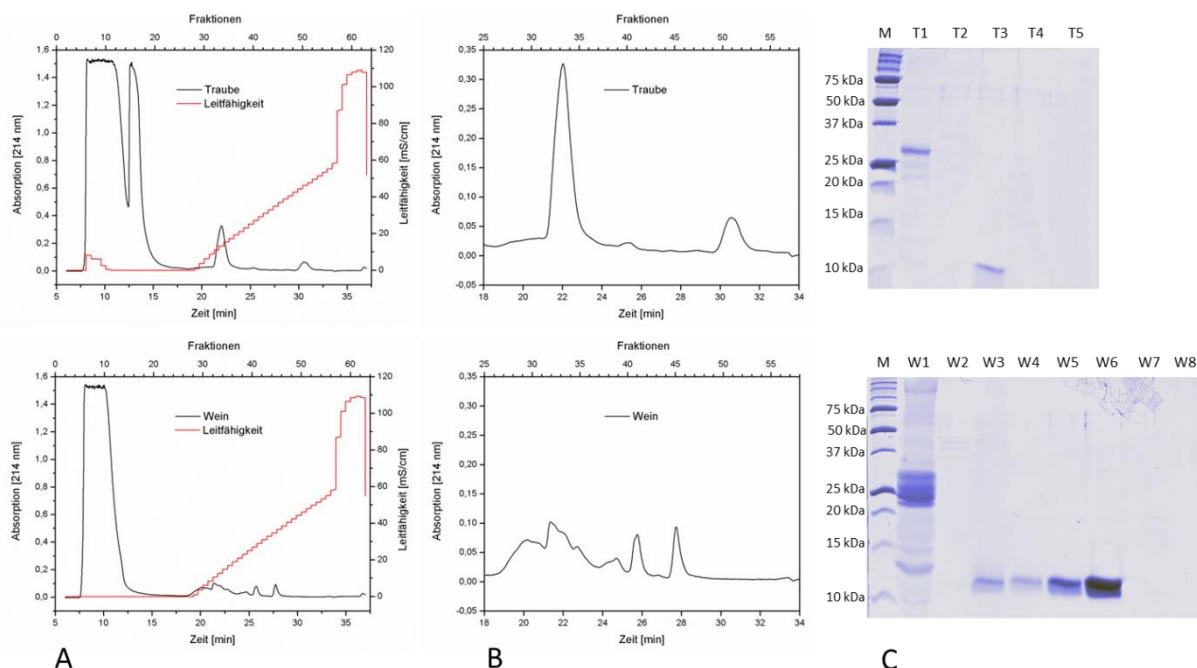
#### **4.1.2 Isolierung des Lipid Transfer Proteins aus Dornfelder Trauben und Wein**

Charakteristisch für das LTP (GenBank ID: AAO33394) ist ein hoher isoelektrischer Punkt (pI) von ca. 9 (kalkuliert mit ExPASy ProtParam Tool [83]). Da es sich durch den pI bereits stark von anderen in Trauben und Wein enthaltenen Proteinen unterscheidet, war es möglich, das LTP mittels entsprechend angepasster Kationenaustauschchromatographie (pH-Wert 7) in hoher Reinheit zu isolieren. Das zugrundeliegende Aufreinigungsprotokoll ist im Anhang aufgeführt (vgl. 8.1). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem NaCl-Gradienten.

In Abbildung 8 sind die Elutionsprofile der Trauben- und Weinproben dargestellt. Der erste Peak eluierte nach ca. 6 min und enthielt alle Proteine, die nicht an die Säule gebunden haben (Traube: T1: Fraktionen 5 – 20; Wein: W1: Fraktionen 5 - 14). Erst mit der Erhöhung der Salzkonzentration im Elutionspuffer wurden auch die übrigen Proteine von der Säule gewaschen. Hier ließen sich Unterschiede in der Elution der beiden Proben erkennen. Während bei der Traube im Verlauf der ansteigenden Salzkonzentration von 0 - 50 % 1 M NaCl drei Peaks detektiert wurden, ließen sich bei dem Wein sechs Bereiche eingrenzen und miteinander vereinigen (Traube: T2: Fraktionen 31 - 35; T3: Fraktionen 39 - 41; T4: Fraktionen 49 - 52; Wein: W2: Fraktionen 25 - 31; W3: Fraktionen 32 - 34; W4: Fraktionen 35 - 36; W5: Fraktionen 38 - 39; W6: Fraktionen 40 - 42; W7: Fraktionen 44 - 46).

Nach Aufkonzentration aller Fraktionen (Traube: T1: Fraktionen 5 – 20, T2: Fraktionen 31 - 35; T3: Fraktionen 39 - 41; T4: Fraktionen 49 - 52; T5: Fraktionen 62 - 63; Wein: W1: Fraktionen 5 – 14, W2: Fraktionen 25 - 31; W3: Fraktionen 32 - 34; W4: Fraktionen 35 - 36; W5: Fraktionen 38 - 39; W6: Fraktionen 40 - 42; W7: Fraktionen 44 - 46; W8: Fraktionen 62 - 63) mittels Zentrifugalkonzentratoren (MWCO: 3 kDa) wurden die Proben auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen und hinsichtlich ihres Molekulargewichts und ihrer Reinheit untersucht.

Durch den Vergleich dieser Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass nach ca. 25 min Proteine eluierten, die die gleiche molekulare Masse von ca. 11 kDa aufwiesen (T3, W6).



**Abbildung 8: Isolation des LTP aus der Dornfelder Traube und dem Wein mittels Kationenaustauschchromatographie.** Dargestellt sind die Ergebnisse der Elution der Traubenproben (oben) und der Weinproben (unten). A: Elutionsprofil der LTP Aufreinigung; B: Vergrößerter Ausschnitt (Minute 18 - 34) des Elutionsprofils der LTPs. Die Elution erfolgte mit einem 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 und 1 M NaCl. Die Flussrate betrug 2 ml/min (vgl. Tabelle 16). C: 15 %ige SDS-Gele zur Überprüfung der Fraktionen (Coomassie Färbung). T1: Fraktionen 5 - 20; T2: Fraktionen 31 - 35; T3: Fraktionen 39 - 41; T4: Fraktionen 49 - 52; T5: Fraktionen 62 - 63; W1: Fraktionen 5 - 14; W2: Fraktionen 25 - 31; W3: Fraktionen 32 - 34; W4: Fraktionen 35 - 36; W5: Fraktionen 38 - 39; W6: Fraktionen 40 - 42; W7: Fraktionen 44 - 46; W8: Fraktionen 62 - 63; M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad [231].

Die aufgetragenen Proteine wurden massenspektrometrisch analysiert. In den Proben T3 und W3 - W6 wurden das LTP Isoform 4 aus *Vitis vinifera* (GenBank ID: AAO33394) und das LTP aus *Vitis aestivalis* (GenBank ID: AAQ96338) identifiziert (Abbildung 9). Diese beiden Proteine weisen eine Sequenzidentität von 89 % auf (vgl. 0). Bei den MS Ergebnissen zeigte die Probe W6 die höchste Übereinstimmung mit dem LTP Isoform 4 aus *V. vinifera* mit 77,2 % und 34,8 % mit dem LTP aus *Vitis aestivalis* (Abbildung 9). Die detektierten Peptide dieser beiden Untergattungen unterschieden sich nur in einer Position (S116T) voneinander. Es ist denkbar, dass es sich hierbei auch um eine weitere Isoform des LTP von *V. vinifera* mit einem Einzel-Aminosäure-Austausch am C-Terminus handeln könnte, da der Ursprung für das LTP aus *V. aestivalis* nicht bekannt ist.

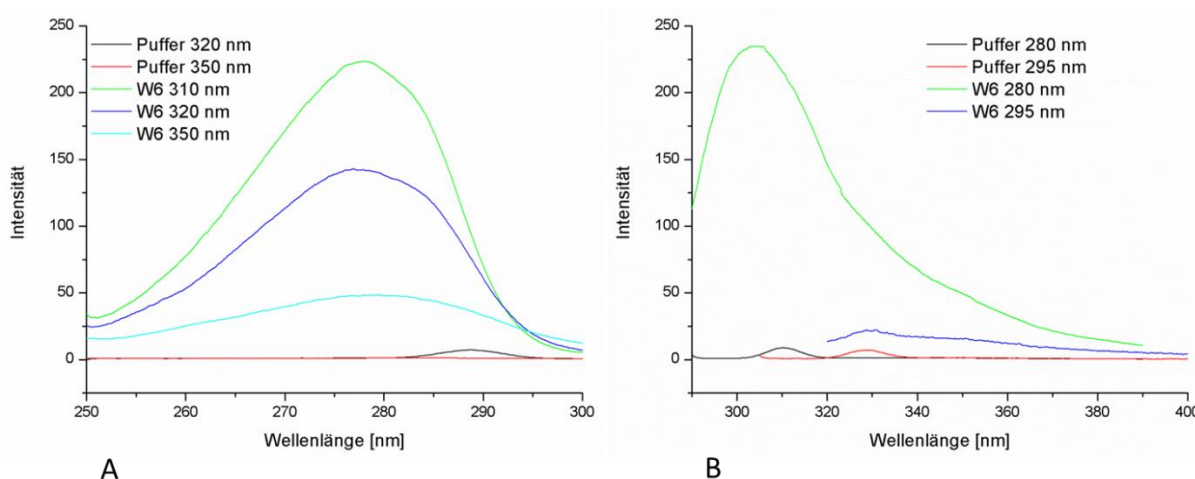
Die beiden Proben T3 und W6 enthielten die gleichen LTPs und wiesen zusätzlich die gleichen Eigenschaften bei der Elution mittels Kationenaustauschchromatographie (KEC) auf, weshalb im Folgenden diese beiden Proben näher betrachtet wurden.

	Mapping of the detected peptides	AAO33394 Coverage	AAQ96338 Coverage
G4	<pre> *           20           *           40           *           60 AAO33394 : MGSSGAVK LACVMVICMVVAAPAVVEATVTCGQVASALSPCISYLQKGGAVPAGCCSGIK : 60 AAQ96338 : MGSSGAVK LACVMVICMVMAAPAAVEAAITCGQVASALSPCISYLQKGGAVPPACCSGIK : 60           MGSSGAVK LACVMVICMV AAPA VEA TCGQVASALSPCISYLQKGGAVP CCSGIK  *           80           *           100          * AAO33394 : SLNSAAKTTGDRQAACKCLKTFSSSVSGINYLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCSKVT : 119 AAQ96338 : SLNSSAKTTADRQAACKCLKNFSSTVSGINLSLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCSKVT : 119           SLNS AKTT DRQAACKCLK FSS VSGIN LASGLPGKCGVSVPYKISPSTDC KVT </pre>	62.0%	30.4%
W3	<pre> *           20           *           40           *           60 AAO33394 : MGSSGAVK LACVMVICMVVAAPAVVEATVTCGQVASALSPCISYLQKGGAVPAGCCSGIK : 60 AAQ96338 : MGSSGAVK LACVMVICMVMAAPAAVEAAITCGQVASALSPCISYLQKGGAVPPACCSGIK : 60           MGSSGAVK LACVMVICMV AAPA VEA TCGQVASALSPCISYLQKGGAVP CCSGIK  *           80           *           100          * AAO33394 : SLNSAAKTTGDRQAACKCLKTFSSSVSGINYLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCSKVT : 119 AAQ96338 : SLNSSAKTTADRQAACKCLKNFSSTVSGINLSLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCSKVT : 119           SLNS AKTT DRQAACKCLK FSS VSGIN LASGLPGKCGVSVPYKISPSTDC KVT </pre>	63.0%	18.5%
W4	<pre> *           20           *           40           *           60 AAO33394 : MGSSGAVK LACVMVICMVVAAPAVVEATVTCGQVASALSPCISYLQKGGAVPAGCCSGIK : 60 AAQ96338 : MGSSGAVK LACVMVICMVMAAPAAVEAAITCGQVASALSPCISYLQKGGAVPPACCSGIK : 60           MGSSGAVK LACVMVICMV AAPA VEA TCGQVASALSPCISYLQKGGAVP CCSGIK  *           80           *           100          * AAO33394 : SLNSAAKTTGDRQAACKCLKTFSSSVSGINYLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCSKVT : 119 AAQ96338 : SLNSSAKTTADRQAACKCLKNFSSTVSGINLSLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCSKVT : 119           SLNS AKTT DRQAACKCLK FSS VSGIN LASGLPGKCGVSVPYKISPSTDC KVT </pre>	54.4%	9.8%
W5	<pre> *           20           *           40           *           60 AAO33394 : MGSSGAVK LACVMVICMVVAAPAVVEATVTCGQVASALSPCISYLQKGGAVPAGCCSGIK : 60 AAQ96338 : MGSSGAVK LACVMVICMVMAAPAAVEAAITCGQVASALSPCISYLQKGGAVPPACCSGIK : 60           MGSSGAVK LACVMVICMV AAPA VEA TCGQVASALSPCISYLQKGGAVP CCSGIK  *           80           *           100          * AAO33394 : SLNSAAKTTGDRQAACKCLKTFSSSVSGINYLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCSKVT : 119 AAQ96338 : SLNSSAKTTADRQAACKCLKNFSSTVSGINLSLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCSKVT : 119           SLNS AKTT DRQAACKCLK FSS VSGIN LASGLPGKCGVSVPYKISPSTDC KVT </pre>	70.7%	34.8%
W6	<pre> *           20           *           40           *           60 AAO33394 : MGSSGAVK LACVMVICMVVAAPAVVEATVTCGQVASALSPCISYLQKGGAVPAGCCSGIK : 60 AAQ96338 : MGSSGAVK LACVMVICMVMAAPAAVEAAITCGQVASALSPCISYLQKGGAVPPACCSGIK : 60           MGSSGAVK LACVMVICMV AAPA VEA TCGQVASALSPCISYLQKGGAVP CCSGIK  *           80           *           100          * AAO33394 : SLNSAAKTTGDRQAACKCLKTFSSSVSGINYLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCSKVT : 119 AAQ96338 : SLNSSAKTTADRQAACKCLKNFSSTVSGINLSLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCSKVT : 119           SLNS AKTT DRQAACKCLK FSS VSGIN LASGLPGKCGVSVPYKISPSTDC KVT </pre>	77.2%	34.8%

**Abbildung 9: Zuordnung der detektierten Peptide der LTP Proben nach der massenspektrometrischen Analyse.** Anteilig wird die Übereinstimmung mit den identifizierten LTP Isoformen angegeben: LTP Isoform 4 aus *Vitis vinifera* (GenBank ID: AAO33394); LTP aus *Vitis aestivalis* (GenBank ID: AAQ96338). Grau hinterlegt sind die detektierten Peptidbereiche [231].

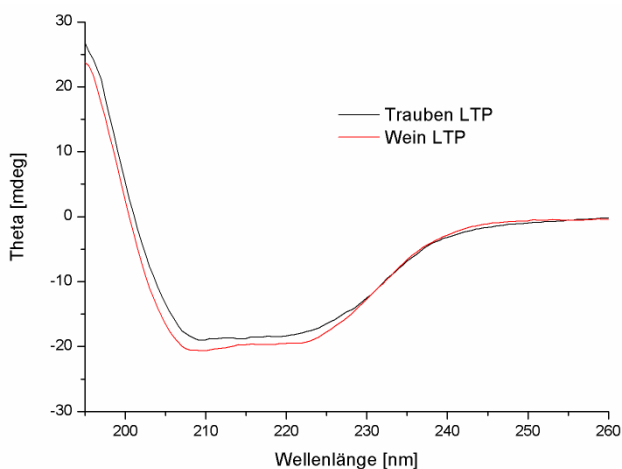
#### 4.1.3 Charakterisierung der Lipid Transfer Proteine

Zur Untersuchung der Reinheit der Proben wurden verschiedene Emissions- und Excitationsspektren aufgezeichnet (Abbildung 10). Hierbei kann ausgenutzt werden, dass das LTP keine Tryptophane enthält. Daraus folgt, dass bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm kein Fluoreszenzsignal vorliegen dürfte.



**Abbildung 10: Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Reinheit der W6 LTP-Lösung.** A: Excitation; B: Emission. Die Anregungen erfolgten bei den entsprechend in den Graphiken angegebenen Wellenlängen.

Anhand dieser Spektren konnte gezeigt werden, dass die Proben nicht durch andere Proteine verunreinigt wurden. Ein Signal bei 320 nm nach Anregung bei 295 nm war nicht zu sehen. Dieses deutete darauf hin, dass die Proben eine hohe Reinheit aufwiesen und sich keine Proteine in der Lösung befanden, die Tryptophane enthielten. Daraufhin wurden CD-Spektren der Proben aufgenommen (Abbildung 11).



**Abbildung 11: CD-Spektren der beiden LTP-Proben aus der Dornfelder Traube und dem Dornfelder Wein.** Aufgezeichnet bei 20 °C. Die Konzentrationen der Proben betragen für das Trauben LTP T3: 0,48 mg/ml und für das Wein LTP W6: 0,52 mg/ml.

Durch diese Analyse sollte herausgefunden werden, ob sich das LTP während der Weinbereitung strukturell veränderte. Anhand der Spektren ist die  $\alpha$ -helikale Struktur der beiden Proteine zu erkennen, wie es bereits für weitere LTPs dokumentiert wurde [89-91, 94, 233]. Zwischen den beiden Spektren in Abbildung 11 sind nur kleinere Unterschiede zu erkennen. Die Minima bei 208 nm und 222 nm sind bei dem Wein LTP stärker ausgeprägt und der Winkel bei 195 nm beginnt um ca. 3 mdeg tiefer. Diese Änderungen sind nicht

ausschließlich auf die unterschiedlichen Konzentrationen zurückzuführen. Dennoch kann basierend auf diesen Daten die Aussage getroffen werden, dass die Weinbereitung keine massiven Veränderungen an der Sekundärstruktur des Proteins verursachte.

## **4.2 Klinische Studie zur Untersuchung einer Weinunverträglichkeit**

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Charakterisierung des LTP wiesen keine gravierenden Unterschiede zwischen dem LTP aus der Traube und dem aus dem Wein auf. Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass das LTP auch nach der Weinbereitung als Allergen wirksam sein könnte. Um das allergene Potential dieser Proteine und deren Relevanz als Allergen zu untersuchen, wurde darauf aufbauend eine klinische Studie gestartet.

Bereits im Vorfeld wurde am Institut für Molekularer Biophysik eine epidemiologische Studie zur Untersuchung des Vorkommens einer Weinunverträglichkeit in Mainz durchgeführt [110]. In dieser Studie gaben 7,2 % von 948 Teilnehmern aus der Mainzer Bevölkerung an, dass der moderate Konsum von Trauben bzw. Wein bei ihnen zu Unverträglichkeitsreaktionen führt. Da es sich gerade bei Wein um ein Genussmittel mit einer sehr komplexen Zusammensetzung handelt, sollte mittels klinischer Untersuchungen auch die Relevanz der übrigen traubeneigenen Proteine als potentielle Auslöser dieser Unverträglichkeiten getestet werden.

Die Untersuchungen, wie die Testung der Reaktivität der Haut, die Blutentnahme und die damit durchgeführten Tests, wie der ImmunoCAP oder die Messung der Leukotrienausschüttung, wurden an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Joachim Saloga und PD Dr. Iris Bellinghausen durchgeführt. Bei den Probanden wurden mit verschiedenen Trauben (rote & weiße Trauben), Traubensaft und Weinen (Riesling, Grauburgunder, Spätburgunder, Dornfelder) Prick-Tests an der Haut durchgeführt (vgl. 3.19.1). Zusätzlich wurde das Gesamt-IgE und die Menge an spezifischen IgE-Antikörpern auf Weintraube (f259) mit dem ImmunoCAP System der Firma Phadia AB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) im Serum der Probanden untersucht (vgl. 3.19.2). Die Freisetzung der Sulfidoleukotriene nach Stimulation mit spezifischen Antigenen wurde mit dem CAST (Cellular Allergen Stimulation Test) der Firma Bühlmann Laboratories AG (Schönenbuch, Schweiz) quantitativ ermittelt (vgl. 3.19.3). Als Allergen diente das gereinigte LTP aus Dornfelder Wein (vgl. 4.1). Zusätzlich wurde die Reaktion der Serum IgE-Antikörper einzelner Probanden auf die verschiedenen Trauben- und Weinproteine mittels ImmunoBlots betrachtet (vgl. 3.19.4). Dabei wurden das gereinigte LTP aus der Traube und dem Wein eingesetzt [231].



#### 4.2.1 Probanden Rekrutierung

Im Rahmen der epidemiologischen Studie wurden die Teilnehmer nach Symptomen befragt, die nach dem moderaten Konsum von Wein (1 Glas à 0,2 l) bei ihnen auftreten. Basierend auf diesen Daten und einem zugrundeliegenden Allergie Score zur Priorisierung der Schwere der Unverträglichkeiten wurden 68 Personen ermittelt, bei denen eine klinische Testung von Interesse wäre. Davon gaben 65 Personen an für eine weitere Kontaktaufnahme zur Verfügung zu stehen und wurden schriftlich kontaktiert mit der Bitte um die Teilnahme an den klinischen Untersuchungen. Zusätzlich wurde ein zweiter Fragebogen konzipiert mit dessen Hilfe die Ursache der Unverträglichkeiten genauer erfasst werden sollten. Diese 65 Personen wurden insgesamt zweimal angeschrieben, da es nur wenige Rückmeldungen bzw. freiwillige Teilnahmen an den Untersuchungen gab. Von den angeschriebenen Personen konnten 10 Personen aufgrund von Umzug nicht mehr erreicht werden. Insgesamt erschienen vier Personen dieser 65 angeschriebenen Personen zu den klinischen Untersuchungen.

Die epidemiologische Studie erweckte weiteres Interesse in der Region Mainz, so dass sich weitere 41 Personen meldeten um eine mögliche Weinallergie klinisch abzuklären. Allerdings erschienen auch aus dieser Gruppe nur 12 Personen tatsächlich in der Hautklinik.

Nach einer weiteren willkürlichen Rekrutierung von zusätzlichen Teilnehmern ohne Unverträglichkeitsreaktionen nach dem Konsum von Trauben bzw. Wein, konnten insgesamt 29 Personen untersucht werden. Diese 29 Personen (6 Männer, 23 Frauen) waren im Alter von 22 - 63 Jahren (Mittelwert: 40; Median: 39 Jahre). Davon gaben 19 Personen an, an einer Weinunverträglichkeit zu leiden (Tabelle 7, Nr. 1-16, Nr. 20, 22, 29).

#### 4.2.2 Allgemeine Informationen über die untersuchten Probanden

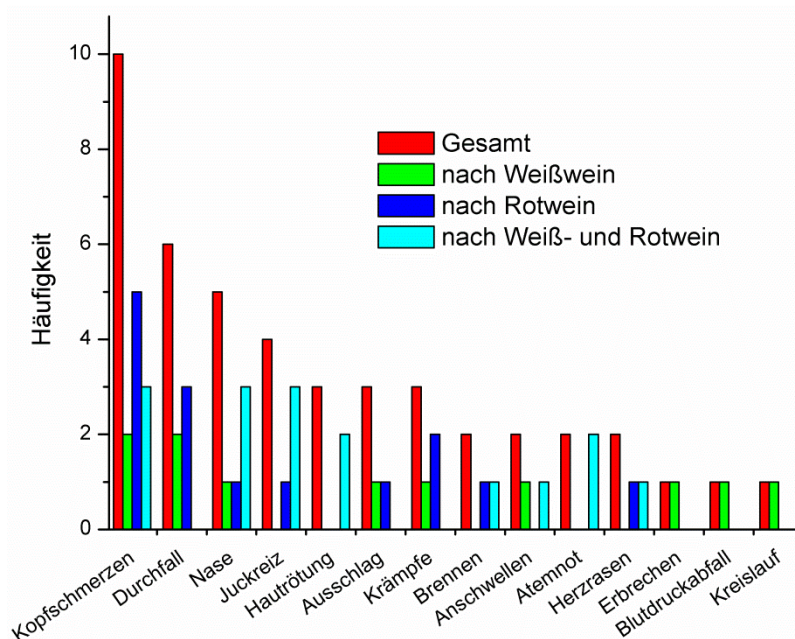
##### Weinkonsum

Nach Angaben der Probanden tranken die Frauen dieser Gruppe (n=22; n=1 keine Angaben)  $3,4 \pm 3,2$  Gläser Wein à 0,2 l pro Woche und die Männer (n=6)  $2,5 \pm 2,9$  Gläser à 0,2 l pro Woche. Zudem gaben 12 Personen an ausschließlich Wein zu trinken. Ein Teilnehmer erklärte keinen Alkohol zu trinken.

##### Symptome der Probanden nach Weinkonsum

Ähnlich wie in der epidemiologischen Studie [110] wurden den Probanden Fragen zu ihren Symptomen nach dem Verzehr von Wein gestellt. Auch bei den klinisch untersuchten Probanden wurden als auftretende Symptome eine verstopfte Nase, Juckreiz an der Haut

und Durchfall am häufigsten angegeben. In Abbildung 12 sind die angegebenen Symptome mit der entsprechenden Häufigkeit dargestellt. Zu erwähnen ist, dass 10 (2 Männer, 8 Frauen) von den 19 untersuchten Personen mit einer Weinunverträglichkeit angaben die Produkte zu meiden, welche Auslöser dieser Reaktionen zu sein scheinen. Bei weiterer Nachfrage, um welche Produkte es sich im Speziellen handelte, gaben sieben (1 Mann, 6 Frauen) dieser 10 Personen an vor allem den Verzehr von Rotweinen zu vermeiden. Diese Tendenz konnte in den Daten über die Menge und die Art des konsumierten Weines nicht konkret gezeigt werden. Im Durchschnitt gaben von allen Probanden (n=28; n=1 keine Angaben) an etwas mehr Weiß- als Rotwein zu verzehren (Weißwein:  $1,6 \pm 2,0$  Gläser à 0,2 l pro Woche; Rotwein:  $1,3 \pm 1,8$  Gläser à 0,2 l pro Woche; Roséwein:  $0,3 \pm 0,9$  Gläser à 0,2 l pro Woche).



**Abbildung 12: Übersicht der Häufigkeiten der auftretenden Symptome nach Weinkonsum.** Die Daten basieren auf den Eigenangaben der Probanden (n=29).

### Bekannte Allergien

Um eventuell vorliegende Kreuzreaktionen zu anderen Allergenen zu berücksichtigen, wurden die Probanden nach dem Vorhandensein von Allergien bzw. nach weiteren Auslösern von Unverträglichkeiten befragt. Nach deren subjektiven Angaben wurden hauptsächlich Pollen (n=10) und Hausstaub (n=7) als weitere Auslöser genannt (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Übersicht der Teilnehmer an den klinischen Untersuchungen.** w: weiblich; m: männlich; k.A.: keine Angaben

Proband	Alter	Geschlecht	Weitere Unverträglichkeiten
1	58	m	Histamin-Intoleranz, Schimmelpilz
2	39	m	Pollen, Hausstaub, Apfel, Wein, Katze
3	56	w	Hausstaub, Medikamente, Nüsse, Trauben, Wein
4	60	w	Medikamente
5	35	m	Hausstaub
6	41	w	Milchzucker, Pollen, Gräser, Roggen
7	23	w	Pollen, Hausstaub, Erdbeeren, Apfel, Pflaume, Pfirsich, Kiwi, Möhre, Wein
8	60	w	Pollen, Trauben, Wein
9	42	w	Nickel in Nahrungsmitteln
10	58	w	Alkohol, Wein, Bier
11	41	w	k.A.
12	54	w	/
13	24	w	Pollen
14	30	w	/
15	30	w	Pollen, Hausstaub, Nüsse, Kiwi, Paprika, Meeresfrüchte
16	50	w	Wein
17	45	w	Pollen, Hausstaub, Austern
18	34	w	/
19	63	m	Dosenpilze
20	41	w	/
21	30	w	/
22	28	w	Fructoseintoleranz, Hausstaub, Tierhaare
23	60	w	Pollen, Nüsse, Äpfel
24	29	w	Pollen
25	27	w	/
26	28	m	/
27	22	w	/
28	28	w	/
29	24	m	Pollen

### **4.2.3 Klinische Untersuchungen**

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen zur Ursache der Weinunverträglichkeit sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

#### **Pricktest**

Verschiedene Lösungen wurden an den Unterarmen der Probanden getestet, nach einer 15 minütigen Inkubationszeit wurden die Werte an den Prickstellen abgelesen. So konnte ein Maß für die Reaktivität der Haut erhalten werden.

Bei 26 der 29 Personen wurde ein Pricktest durchgeführt. Von diesen reagierten sieben Probanden auf die verschiedenen Produkte positiv (Quaddelbildung von > 2 mm). Drei (Nr. 2, 8, 16) dieser sieben Probanden reagierten auf Trauben- und Weinprodukte, eine nur auf Weine (Nr. 4). Zwei weitere Personen reagierten ausschließlich auf rote bzw. weiße Trauben (Nr. 7: hier wurde auch positiv auf Pfirsich und Kiwi getestet, Nr. 23), eine weitere Person (Nr.15) auf roten Traubensaft (Tabelle 8). Bei der Probandin Nr. 7 sind alle weiteren Testungen ebenfalls positiv (Gesamt IgE 910 kU/l, CAP Klasse 2 für Weintraube (f259), CAP Klasse 6 für Gräser, CAP Klasse 3 für MUXF3).

#### **ImmunoCAP**

Dieser standardisierte Test gibt einen weiteren Hinweis über das Vorliegen einer Allergie anhand der Messung der im Blutserum vorliegenden IgE-Antikörper und ist somit bereits spezifischer als der Pricktest.

Insgesamt wiesen 11 Probanden (Nr. 2, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 16, 19, 26, 27) einen Gesamt-IgE-Antikörper Wert über 100 kU/l auf, was auf eine mögliche Allergiebereitschaft (atopische Diathese) hindeutet. Von diesen Personen reagierten vier positiv im Pricktest (Nr. 2, 7, 15, 16). Nur bei einer Probandin konnte zusätzlich eine Reaktion im ImmunoCAP auf Weintrauben (CAP Klasse 2) ermittelt werden. Diese Probandin Nr. 7 ist auch eine starke Pollenallergikerin (Gräser: CAP Klasse 6; Birke CAP Klasse 5), die ebenfalls auf kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten (CCD/MUXF3: CAP Klasse 3) reagierte.

#### **CAST**

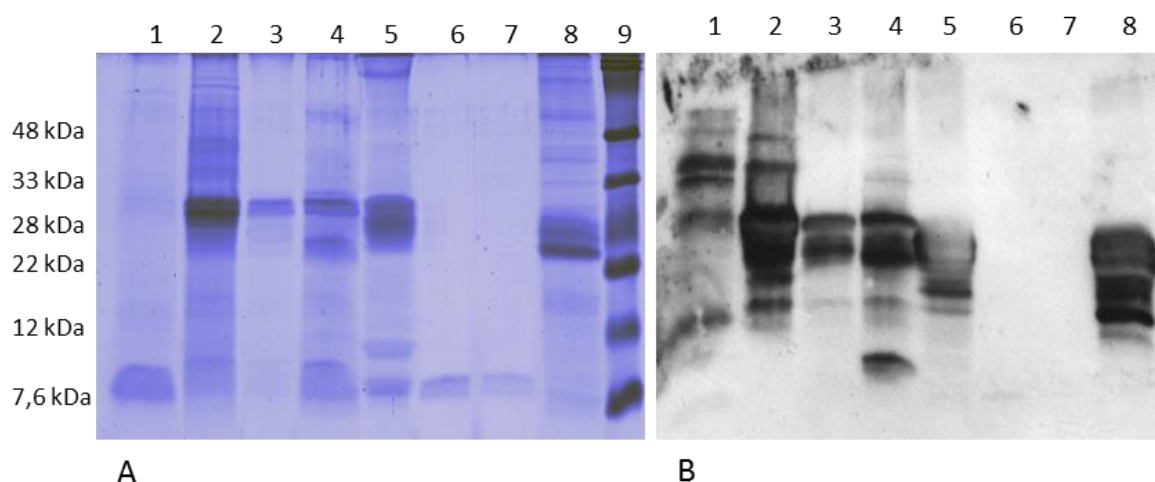
Zusätzlich zu diesen Standardtestungen zur Abklärung einer Allergie wurde mittels CAST an isolierten Leukozyten von 25 Probanden die Freisetzung der Sulfidoleukotriene nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des gereinigten LTPs (576 ng/ml - 10 µg/ml) aus dem Wein bestimmt. Insgesamt reagierten die basophilen Granulozyten von vier dieser

Probanden auf das gereinigte LTP mit einer vermehrten Ausschüttung der Leukotriene (Sulfidoleukotrien > 200 pg/ml). Hier konnte eine Korrelation zwischen dem Ergebnis des CAST und dem Pricktest hergestellt werden, da von zwei (Nr. 7, 15) dieser vier Personen (Nr. 7, 13, 15, 29; Nr. 13 ließ keinen Pricktest durchführen) ein positiver Pricktest vorlag. Im Gegensatz dazu wiesen drei weitere Personen (Nr. 4, 8, 16) mit positivem Ergebnis im Pricktest keine vermehrte Leukotrienausschüttung auf das LTP auf.

### ImmunoBlot

Mittels ImmunoBlot wurde die Reaktivität der im Serum enthaltenen IgE-Antikörper auch auf weitere Trauben- und Weinproteine betrachtet. Durch diese Methode und den gezielten Einsatz von Inhibitoren lassen sich mögliche Kreuzreaktionen als Ursache der Symptome ausschließen bzw. bestätigen.

Der ImmunoBlot der Probandin Nr. 7 zeigte eine starke Reaktion der IgE-Antikörper mit den verschiedenen Trauben- und Weinproteinen (Abbildung 13 B), als Vergleich diente das dazugehörige SDS-Gel mit den getesteten Proteinproben (Abbildung 13 A).



**Abbildung 13: ImmunoBlots - Untersuchung der IgE-Antikörperreaktion mit verschiedenen Trauben- und Weinproteinen.** A) Comassie gefärbtes 15%-SDS-Gel, B) ImmunoBlot mit Serum der Probandin (Nr. 7). Proben: 1: Pfirsich; 2: Rote Traube (Supermarkt); 3: Dornfelder Traube (Weingut Fleischer, Mainz); 4: Weiße Traube (Supermarkt); 5: Dornfelder Wein (PVP-gefällt, Weingut Fleischer, Mainz); 6: LTP aus Dornfelder Wein (Weingut Fleischer, Mainz) [231]; 7: gereinigtes LTP aus der Dornfelder Traube (Weingut Fleischer, Mainz) (15); 8: Riesling (Lyophilisat); 9: RunBlue Dual Color SDS Marker, Expedeon. Aufgetragen wurden jeweils 30 µl des entsprechenden Extraktes, der zuvor 3:1 mit Denaturierungspuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert wurde (vgl. 3.19.4).

Es wurden verschiedene Trauben- und Weinsorten sowie gereinigte LTPs (aus Dornfelder Trauben und Wein) und ein Pfirsichextrakt auf das Gel aufgetragen. In dem ImmunoBlot (Abbildung 13 B) kann man neben der starken Reaktion der IgE-Antikörper mit diversen Trauben- und Weinproteinen auch die Reaktion mit Pfirsichproteinen deutlich erkennen. Es ist nur eine sehr schwache Reaktion auf das LTP aus dem Wein sichtbar. Die Seren der

übrigen Probanden wurden diesbezüglich auch getestet, zeigten allerdings keine Reaktionen im ImmunoBlot.

Zur Untersuchung der kreuzreaktiven Kohlenhydratdeterminanten (CCD) wurden entsprechende Produkte eingesetzt, um die IgE-Antikörper, die gegen diese CCDs gerichtet sind zu inhibieren. Die Versuche mit den entsprechenden CCD-Inhibitoren wiesen eine deutliche Reduktion der IgE-Antikörperbindung an die verschiedenen getesteten Proteine auf (vgl. 3.19.4). Auch ein zusätzlicher ImmunoCAP für die kreuzreaktiven Kohlenhydratdeterminanten (CCD/MUXF3) mit vorheriger Inkubation des Serums dieser Probandin mit 20 µg/ml CCD-Blocker reduzierte die gemessenen spezifischen IgE-Antikörper um ca. 82 % (von 18,9 kU/l auf 3,47 kU/l).

#### **4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den klinischen Untersuchungen**

Anhand der Daten, die dank der Teilnahme der 29 Personen generiert werden konnten, ist es möglich Erkenntnisse zur Ursache von Weinunverträglichkeiten zu erhalten. Besonders die Relevanz des LTP als Traubenallergen wurde hier untersucht.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte keine IgE-Antikörper vermittelte Allergie festgestellt werden. Somit scheint, zumindest bei diesen Probanden eine Allergie auf Traubenproteine, wie sie im mediterranen Raum häufiger auftritt [93, 101, 111, 112], keine Relevanz zu haben.

In diesem Zusammenhang sollten in zukünftigen Untersuchungen auch andere Weinhaltstoffe, die zu Unverträglichkeiten führen können, berücksichtigt werden, wie Histamin oder auch Sulfite.

**Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der klinisch untersuchten Probanden (n= 29).** m: männlich; w: weiblich; neg: negativ; pos: positiv; +++: sehr starke Reaktion; ++: starke Reaktion ; +: schwache Reaktion; -: keine Reaktion; /: es wurde kein Test durchgeführt; x: Test wurde durchgeführt, allerdings mit negativem Ergebnis; CAP Klassen (spezifisch für spezifisches IgE): 0 (<0,35 kU/l), 1 (0,35 – 0,70 kU/l), 2 (0,70 – 3,50 kU/l), 3 (3,50 – 17,5 kU/l), 4 (7,5 – 50,0 kU/l), 5 (50,0 – 100 kU/l), 6 (>100 kU/l). Die Pricktest-Ergebnisse werden dargestellt als Durchmesser der Quaddel und der Rötung, jeweils in Millimeter. Angaben zu den verwendeten Weinen siehe Tabelle 5 (vgl. 3.19.1).

Proband	Pricktest										Cap									
	NaCl	Histamin	Fleischer Dornfelder	Fleischer Riesling	Mosel	Grauburgunder	Mosel Spätburgunder	Mosel Riesling	rote Traube	weiße Traube	Traubensaft	Gesamt IgE [kU/l]	f259 Weintraube [kU/l]	Cap Klasse	Cast	Westernblot				
1	Kein Pricktest										Kein Pricktest									
2	-/-	5:10	-/-	-/-	-/-	4:12	2:2	4:12	3:6	-/-	-/-	0,01	0	0	neg	x				
3	1:2	8:30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	3:4	0,02	0	0	/	x				
4	-/-	5:7	5:6	1:2	2:3	2:2	5:7	0:1	0:1	2:3	5:38	0	0	neg	x					
5	-/-	5:8	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	286	0,05	0	0	neg	x				
6	-/-	5:20	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	22	0	0	neg	x					
7	-/-	5:20	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	3:3	1:1	-/-	910	1,26	2	pos	x					
8	-/-	+++	+	+	+	-/-	+	-/-	-/-	+	10,4	0	0	neg	x					
9	-/-	5:15	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	10,6	0	0	/	x					
10	-/-	5:20	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	222	0,02	0	neg	x					
11	-/-	5:20	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	10,7	0,01	0	neg	x					
12	-/-	10:30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	11,9	0,03	0	/	x					
13	Kein Pricktest										Kein Pricktest									
14	-/-	5:20	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	74,3	0	0	neg	x					
15	-/-	10:15	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+	109	0,05	0	pos	x					
16	-/-	10:30	2:3	2:3	2:3	3:5	3:4	2:3	1	8:15	359	0,01	0	neg	x					
17	Kein Pricktest										Kein Pricktest									
18	-/-	++	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	16,1	0	0	neg	x					
19	-/-	++	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	622	0,05	0	neg	x					
20	-/-	++	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	6,91	0,02	0	neg	x					
21	-/-	5:25	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	2,58	0	0	neg	+					
22	-/-	6:22	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	214	0	0	neg	/					
23	-/-	7:20	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	2:4	3:5	-/-	40,7	0	0	pos	/					
24	-/-	6:25	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	35,7	0	0	neg	/					
25	-/-	5:20	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	12,1	0	0	neg	/					
26	-/-	3:15	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	109	0	0	neg	/					
27	-/-	8:20	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	114	0	0	neg	/					
28	-/-	7:22	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	90,5	0	0	neg	/					
29	-/-	5:25	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	95,4	0	0	pos	/					

### **4.3 Einfluss von Rebsorte, Lage und Klima auf die Proteinzusammensetzung in Weinen**

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Trubentstehung. Nicht nur die Bildung des Trubs wurde untersucht, sondern auch deren Vermeidung. Zusätzlich wurde der Effekt der Schönung, als Stabilisierungsmaßnahme zur Trubvermeidung auf die Proteinzusammensetzung in Weinen betrachtet. Der Fokus dieser Untersuchungen lag bei den Proteinen im Wein. Es wurde ihre Funktion bei der Trubbildung und ihre Wechselwirkungen mit verschiedenen Weinhaltstoffen analysiert.

Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Mosel (Achim Rosch) und der Hochschule Geisenheim (Institut für Weinanalytik und Getränkeforschung, Prof. Dr. Helmut Dietrich, Prof. Dr. Frank Will, Miriam Meier) durchgeführt. Die verwendeten Proben, die von der Hochschule Geisenheim zur Verfügung gestellt wurden, konnten direkt für die weiteren Untersuchungen eingesetzt werden, da diese bereits entsprechend von Frau Miriam Meier (Hochschule Geisenheim) ultrafiltriert und gefriergetrocknet wurden. Die Proben des DLR Mosel mussten vor deren Analyse dialysiert und auch gefriergetrocknet werden (vgl. 3.2 & 3.3).

#### **4.3.1 Vergleich der Proteinzusammensetzung verschiedener Rebsorten**

Es wird diskutiert, dass die Zusammensetzung der exprimierten Proteine in Trauben stark von äußeren Faktoren abhängt. Zu diesen Faktoren gehören, neben dem Einfluss der Witterung und Temperatur, auch der Einfluss der Rebsorte, der Bodenbeschaffenheit und nicht zuletzt auch der Einfluss von Pathogenbefall [48, 78, 234-238]. Um dieses Phänomen näher zu betrachten, wurden mit Unterstützung des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie (BMWi, Projekt: AiF 17338N) verschiedene Weine hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung analysiert.

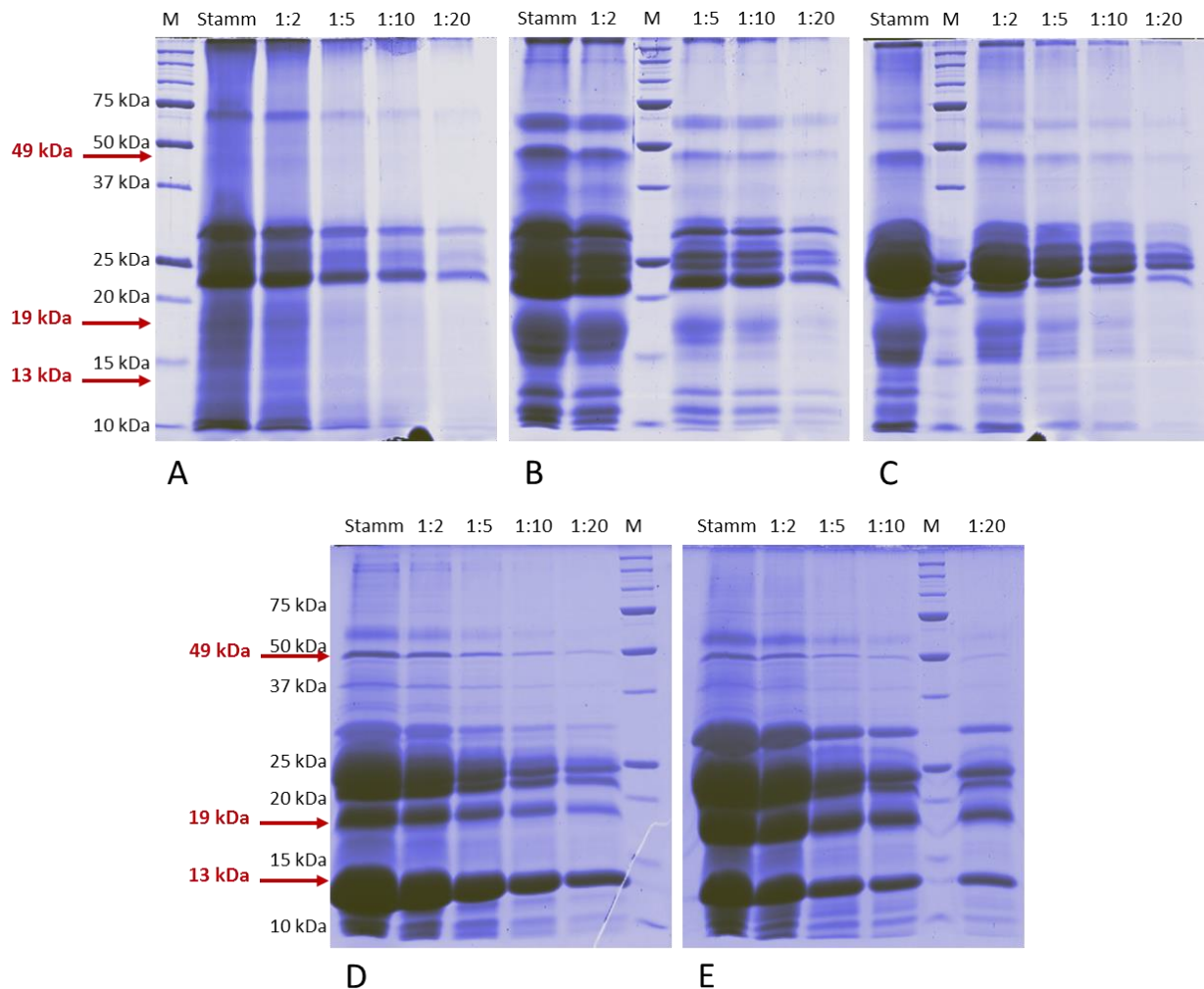
In der folgenden Abbildung wurden Verdünnungsreihen verschiedener Weinlyophilisate dargestellt (Abbildung 14). Es konnten fünf verschiedene Rebsorten miteinander verglichen werden: Riesling, Spätburgunder, Portugieser Weißherbst, Traminer und Weißburgunder.

In diesen Proben zeigten sich auch die häufig beschriebenen Proteinbanden bei 10 kDa, 20 - 30 kDa, 70 kDa sowie oberhalb von 250 kDa. Die angegebenen Bereiche lassen sich verschiedenen Proteinklassen zuordnen. Wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, findet sich auch in Weißweinen bei ca. 10 kDa das LTP. Im Molekulargewichtsbereich von 20 – 30 kDa werden vorwiegend die TLPs und die Chitinasen nachgewiesen. Bei der 70 kDa Bande könnte es sich um die Invertase handeln und in dem hohen Molekulargewichtsbereich



(>250 kDa) lassen sich Glyko- bzw. Mannoproteine anfärben (Glykoproteinfärbung hier nicht dargestellt).

Unterschiede finden sich im Bereich von 10 - 30 kDa und auch im Bereich von 45 - 70 kDa. Hier unterscheiden sich die Proteinbanden vorwiegend in ihrer Intensität, was gerade bei den Banden zwischen 20 und 30 kDa besonders auffällt.



**Abbildung 14: Betrachtung der Proteinzusammensetzung verschiedener Rebsorten.** A: Riesling (MM\_0); B: Spätburgunder, ausgebaut als Blanc de Noir (MM\_5); C: Portugieser Weißherbst (MM\_3); D: Traminer (MM\_4 T9); E: Weißburgunder (MM\_4 T7). Alle Weinproben stammen aus dem Jahrgang 2011 (vgl. Tabelle 5). Als Stamm wurde eine Lösung aus 20 mg Lyophilisat in 1000  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eingesetzt und entsprechend der Angaben an den Taschen verdünnt. Die rot markierten Molekulargewichtsbänder weisen auf die Bereiche mit den markantesten Unterschieden zwischen den Rebsorten. 12,5 % SDS-Gele, Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad.

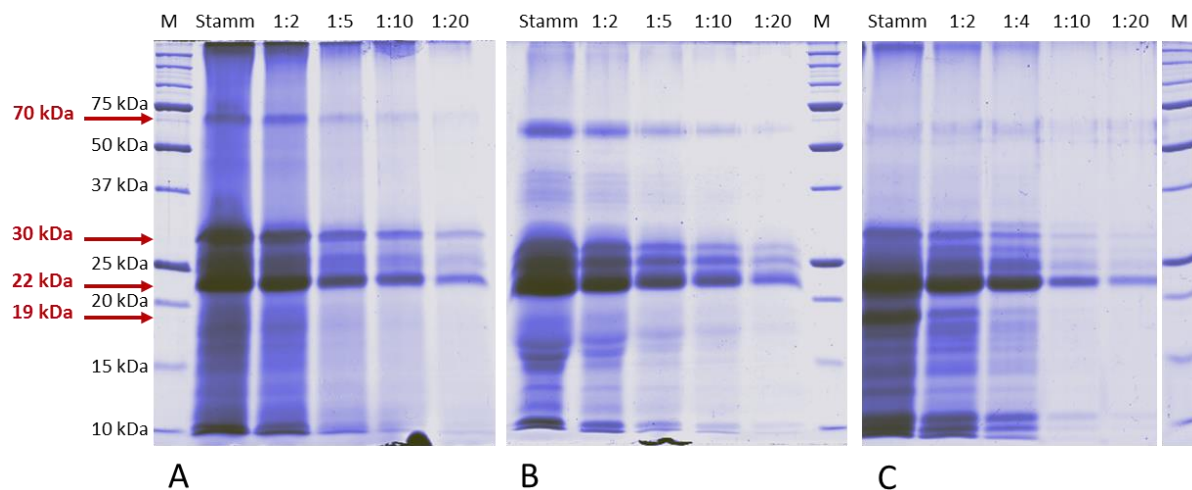
Außer bei dem Riesling (Abbildung 14 A) wurde eine Bande bei ca. 49 kDa bei den anderen Weinen detektiert. Auch in den Bereichen von 12 - 20 kDa sind Unterschiede bei den Proben zu erkennen. Die Proteinzusammensetzung des Traminers und des Weißburgunders (Abbildung 14 D & E) ähneln sich sehr. Beide weisen neben den bereits beschriebenen Banden auch eine intensiv gefärbte Bande bei ca. 13 kDa und bei ca. 19 kDa auf. Diese

Banden lassen sich auch bei den anderen Proben erkennen, allerdings nicht in vergleichbarer Intensität. Hier ist darauf hinzuweisen, dass diese beiden Weinproben aus der gleichen Region stammen (Weingut U. Lützkendorf, Bad Kösen). Auch der Riesling und der Spätburgunder wurden im gleichen Weingut an der Mosel produziert (Moselland eG Manuel Brixius, Bernkastel-Kues). An diesen Proben kann man bereits einen Eindruck von der Einflussnahme der Lage auf die Proteinzusammensetzung in den Weinen erlangen. Auch wenn es sich bei diesen beiden Weingütern jeweils um unterschiedliche Rebsorten handelt, scheint zumindest in den SDS-Gelen die Proteinzusammensetzung in den entsprechenden Proben relativ ähnlich zu sein. Genauere Aussagen darüber würden sich nur mit MS-Analysen treffen lassen.

#### **4.3.2 Vergleich der Proteinzusammensetzung verschiedener Jahrgänge und Lagen**

Bereits im vorherigen Abschnitt konnte die Einflussnahme der Lage auf die Proteinzusammensetzung in Weinen angedeutet werden (vgl. 4.3.1). Im Folgenden wird dies anhand der Rebsorte Riesling näher betrachtet (Abbildung 15). Hier ließ sich besser zeigen, welchen Einfluss der Jahrgang und auch die Lage der Gewächse auf die Proteinzusammensetzung haben. Aufgetragen wurden Verdünnungsreihen eines Rieslings aus dem Jahr 2011 von der Mosel (Moselland eG Manuel Brixius, Bernkastel-Kues, Abbildung 15 A) und Rieslinge von der Hochschule Geisenheim aus den Jahrgängen 2008 und 2012 (Abbildung 15 B & C). Letztere sind aus den Trauben der gleichen Lage (Rüdesheimer Berg, Geisenheim) hergestellt worden. Bei diesen Proben sind auch die prominenten Proteinbanden bei 10 kDa (LTP), 20 - 30 kDa (TLPs, Chitinasen), 70 kDa (Invertase) sowie oberhalb von 250 kDa (Mannoproteine) zu sehen. Auch hier lassen sich Unterschiede in den Bandenzusammensetzungen der Proben erkennen. Im Molekulargewichtsbereich von 20 - 30 kDa ähneln sich die Proben sehr. Allerdings ist ein Unterschied zu dem Riesling von der Mosel zu erkennen (Abbildung 15 A). Die Banden bei 22 kDa und 30 kDa (möglicherweise die  $\beta$ -Glucosidase, vgl. 4.5.1) weisen fast die gleiche Intensität auf, während die 30 kDa Bande bei den anderen Proben deutlich schwächer gefärbt ist. Ähnlich wie in Abbildung 14 sind auch hier deutliche Unterschiede im Bereich von 10 - 20 kDa zu sehen. Besonders ist der Unterschied der beiden Jahrgänge des Rieslings vom Rüdesheimer Berg zueinander. Bei der Probe aus dem Jahr 2012 ist zusätzlich eine intensiv gefärbte Bande bei ca. 19 kDa sichtbar, die im Jahr 2008 nicht so ausgeprägt erscheint (Abbildung 15 B & C). Ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden Proben ist auch die Bande bei ca. 70 kDa (vermutlich die Invertase), die im Jahr 2012 scheinbar weniger exprimiert wurde.

Es ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den hier untersuchten Proben um bereits fertige, mit Hefen vergorene Weine handelte (Abbildung 15). Dadurch sind einzelne Unterschiede in der Proteinzusammensetzung auch mit der Vergärung erklärbar. Zugefügte Hefen verwenden die in den Lösungen enthaltenen Proteine als Stickstoffquellen für ihren Stoffwechsel, sofern keine weiteren Quellen vorhanden sind [239, 240]. Dazu bilden sie Proteasen, die die Proteine zu kleineren Peptiden spalten und nutzen diese für ihr Wachstum. Hier können sich die unterschiedlichen Proteasen auf den Gehalt der Proteine auswirken.



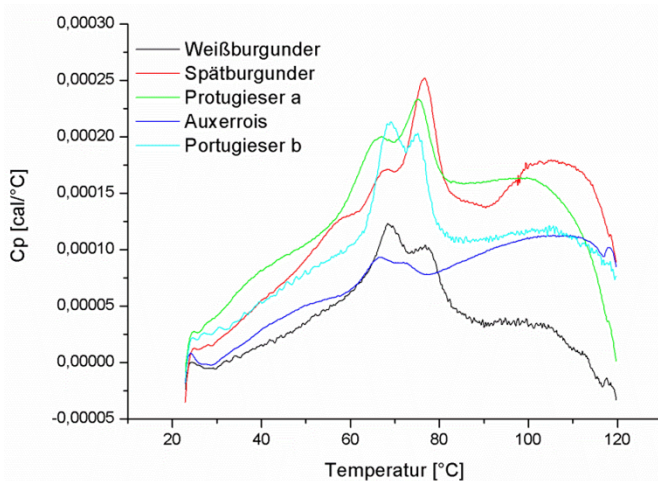
**Abbildung 15: Vergleich der Proteinzusammensetzung verschiedener Riesling Weine.** A: Riesling aus dem Jahr 2011 von der Mosel (MM\_0); B: Riesling aus dem Jahr 2008 aus Geisenheim (MM\_7); C: Riesling aus dem Jahr 2012 aus Geisenheim (MM\_21), dieses SDS-Gel wurde im Rahmen der von mir mitbetreuten Bachelorarbeit von J. Roth (2013) angefertigt (vgl. Tabelle 5). Als Stamm wurde eine Lösung aus 20 mg Lyophilisat in 1000  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eingesetzt und entsprechend der Angaben an den Taschen verdünnt. Die rot markierten Molekulargewichtsbänder weisen auf die Bereiche mit den markantesten Unterschieden. 12,5 % SDS-Gele, Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad.

Bei dem Riesling von der Mosel war es nicht mehr nachvollziehbar welche Hefe zur Vergärung eingesetzt wurde. Die Rieslinge aus Geisenheim wurden dagegen mit unterschiedlichen Hefen vergoren. Für den Wein aus 2008 wurde von der Firma Erbslöh Oenoferm® Klosterneuburg eingesetzt, eine Reinzuchtheife (*Saccharomyces cerevisiae*, Stamm: LW 415-58). Die SIHA® Aktivhefe 7 der Firma Eaton Begerow wurde für die Weine aus dem Jahr 2012 eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine aus deutschem Rieslingmost extrahierte Hefe, die speziell die typische Rieslingaromatik fördern soll. Laut der Produktangaben unterscheiden sich diese beiden Hefen nicht wesentlich voneinander und zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Bildung von Gärnebenprodukten bzw. das Wachstum wilder Hefen unterdrücken können. Um eine bessere Einschätzung über die Einflussnahme der Lage und der Jahrgänge durchführen zu können, hätten alle Proben gleich behandelt bzw. die entsprechenden Moste ergänzend betrachtet werden müssen.

Unabhängig von der Weinherstellung ließen sich die traubeneigenen Proteine im Wein betrachten, die Unterschiede in der Proteinzusammensetzung sind dann auf die Lage und Jahrgänge zurückzuführen.

#### 4.3.3 Untersuchung der Denaturierungseigenschaften der Proteine in Weinen verschiedener Rebsorten

Eine weitere Methode, die herangezogen wurde, um Weine miteinander zu vergleichen, ist die DSC (vgl. 3.16). Mit diesen Versuchen war es möglich temperaturinduzierte Denaturierungsprofile der in den Proben enthaltenen Proteine zu betrachten. Hierbei handelt es sich um eine sehr sensitive Methode bei der temperaturabhängige Entfaltungsprozesse über die freiwerdende Wärmekapazität gemessen werden. Bei diesem Versuch stellte sich die Frage, ob es möglich ist, einzelne Rebsorten anhand der DSC Ergebnisse zuordnen zu können. Die Versuchsbedingungen wurden in mehreren Ansätzen getestet, bis sich für diese Proben die geeigneten Voraussetzungen fanden (Daten hier nicht dargestellt). Es wurde eine einheitliche Proteinkonzentration von 0,13 mg/ml für die einzelnen Proben eingesetzt. Verschiedene Rebsorten wurden getestet und zusammen in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16: Vergleich der DSC Messungen von verschiedenen Weinen.** Bei jeder Messung wurden ca. 500 µl einer 0,13 mg/ml Proteinlösung von 20 °C bis 120 °C mit einer Scannrate von 60 °C/h untersucht. Die Proben wurden in H<sub>2</sub>O gelöst. Weißburgunder: MM\_4 T7; Spätburgunder: angebaut als Blanc de Noir (MM\_5); Portugieser a: Portugieser Weißherbst (MM\_3); Auxerrois: Modellweinproteine; Portugieser b: W7044, siehe Kapitel 2.5.

Bei den Messungen war ein Anstieg der Wärmekapazität zu erkennen für zwei Peaks zwischen 60 und 80 °C sowie ein anschließender Abfall der Messkurve. Die Peaks weisen auf Denaturierungsvorgänge ab einer Temperatur von ca. 60 °C hin und gehen ab ca. 80 °C in vermehrte Aggregation der Proben über (Abfall der Messkurven). Bei allen Weinen sind zwei Peaks besonders ausgeprägt, der erste erreicht sein Maximum bei ca. 67 °C und der zweite bei ca. 76 °C. Hier unterscheiden sich die verschiedenen Proben in der Ausprägung

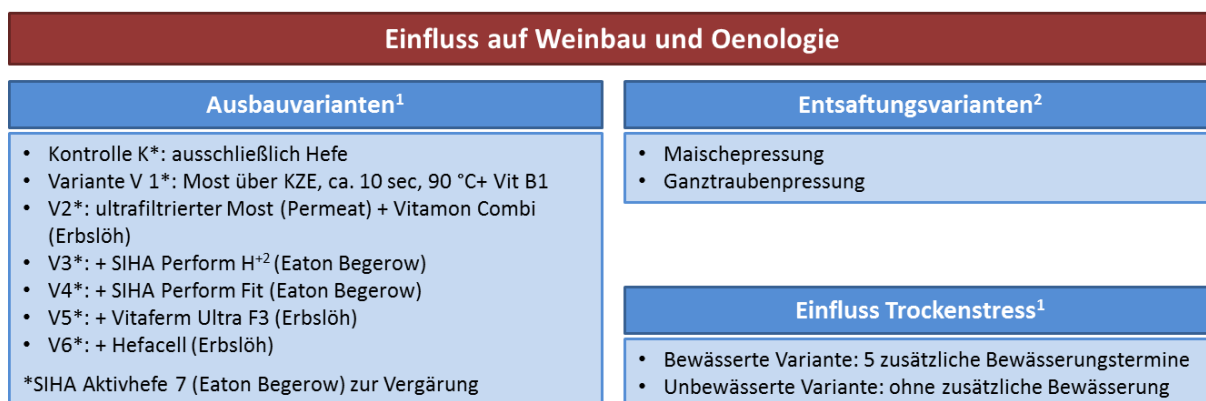
der Peaks voneinander. Der erste Peak bei dem Weißburgunder, dem Auxerrois und bei dem Portugieser (b) weist eine höhere relative Wärmekapazität auf als der zweite Peak. Bei den anderen Weinen (Spätburgunder, Portugieser (a)) sind die zweiten Peaks bei ca. 76 °C deutlich ausgeprägter. Bei diesen Proben wurde die Reversibilität der Entfaltungseignisse der Proteine untersucht (vgl. 3.16). Allerdings weisen diese Messverläufe keine weiteren Peaks auf, so dass scheinbar die Proteine vollständig in die Aggregation übergegangen sind. Auf die Betrachtung der Reversibilität wird in Kapitel 4.7.1 genauer eingegangen.

Aussagen über die denaturierten Proteine können an dieser Stelle nicht getroffen werden. Hierzu hätten bei den einzelnen Temperaturen Proben entnommen werden müssen, um diese auch massenspektrometrisch zu analysieren. Aufgrund der bisher gewonnenen Erkenntnisse ist es wichtig für die weiteren Versuche zur Untersuchung der Stabilität oder der Proteinisolierung ein einheitliches Modellsystem zu wählen. Dadurch lassen sich Unterschiede in den Messergebnissen nicht mit verschiedenen Proteinzusammensetzungen oder daraus folgenden Effekten erklären.

#### 4.4 Untersuchung von oenologischen und weinbaulichen

##### **Einflussfaktoren auf die Proteinzusammensetzung in Most und Wein**

Im Rahmen des Projektes zur Untersuchung der Trübung wurden auch verschiedene Behandlungsmaßnahmen und deren Einfluss auf die Proteinzusammensetzung untersucht. Zu diesem Zweck wurde im Jahr 2012 in den Versuchsweinbergen am Rüdesheimer Berg der Hochschule Geisenheim ein Riesling entsprechend kultiviert und ausgebaut.



**Abbildung 17: Aufstellung der oenologischen Ausbauvarianten zur Untersuchung des Einflusses von Weinbau und Oenologie auf die Proteinzusammensetzung in Most und Wein der Hochschule Geisenheim.** <sup>1</sup>: in Zusammenarbeit mit dem Institut für Weinbau (Herrn Dr. Manfred Stoll & Herrn Dr. Bernd Gruber), Hochschule Geisenheim; <sup>2</sup>: in Zusammenarbeit mit dem Institut für Oenologie (Herrn Dr. Maximilian Freund), Hochschule Geisenheim.

Verschiedene potentielle Einflussfaktoren wurden getestet, wie diverse Gärhilfsstoffe, Entsaftungsvarianten sowie der Einfluss von Trockenheit wurde näher betrachtet. Eine genaue Auflistung der untersuchten Varianten ist in Abbildung 17 dargestellt.

Die Ausbauvarianten wurden mit der gleichen Rieslinghefe (SIHA Aktivhefe 7, Eaton-Begerow, Langenlonsheim) vergoren. Für die Vergärung der Varianten zur Untersuchung der Entsaftung und den Trockenstress wurde von der Firma Erbslöh Oenoferm® Klosterneuburg eingesetzt. Die gewonnenen Moste und die entsprechenden Weine wurden durch Frau Miriam Meier (Hochschule Geisenheim) für weitere Analysen aufbereitet, d.h. die Proben wurden ultrafiltriert und gefriergetrocknet, um auch dort für weitere Untersuchungen wie Zucker-, Aminosäure- oder Polyphenolanalyse (Hochschule Geisenheim) und die Proteinbetrachtung eingesetzt zu werden. Die Ausbauvarianten wurden in Doppelbestimmungen hergestellt, d. h. separat voneinander wurde derselbe Ansatz in zwei verschiedenen Gärgefäßen (sog. Kegs) ausgebaut.

Im Folgenden werden nicht nur die beschriebenen oenologischen und weinbaulichen Varianten näher betrachtet, sondern es wird zusätzlich auf den Einfluss des Bentonits als Weinschönungsmittel näher eingegangen.

#### **4.4.1 Einfluss der oenologischen Behandlungsmaßnahmen**

Die Doppelbestimmungen der oenologischen Ausbauvarianten erwiesen sich als relativ identisch bei den Versuchen, daher wurde in den folgenden Abbildungen jeweils nur eine der Proben aufgetragen. Eine weitere Gemeinsamkeit war, dass sich generell im Most bis zu 90 % mehr Proteine als in dem entsprechenden Wein befanden (Bradford Assay, vgl. 3.1).

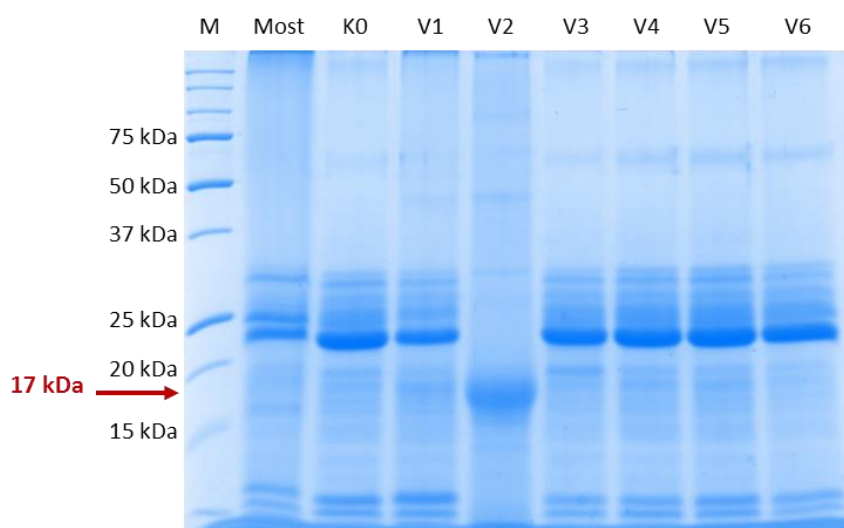
Der Ausbau der Entsaftungsvarianten erfolgte durch das Institut für Oenologie der Hochschule Geisenheim. Diese Proben wurden in Zusammenarbeit mit Frau Miriam Meier (Hochschule Geisenheim) für die weiteren Analysen aufbereitet.

#### **Ausbauvarianten**

Die getesteten Ausbauvarianten (Abbildung 18) können in Behandlungen unterteilt werden, die bereits mit dem Most durchgeführt wurden und die, die erst bei der Vergärung eingesetzt wurden. Zu den Mostbehandlungsmaßnahmen zählen die Varianten 1 und 2. In Variante 1 (V1) wurde der Most vor der Vergärung mittels einer Kurzzeiterhitzungsanlage (Holstein & Kappert, Dortmund) für 10 - 15 sec auf 90 °C erhitzt und wieder mittels Rückverköhlung auf 20 °C abgekühlt. Dies ist eine Maßnahme, die eingesetzt wird um unerwünschte Milchsäurebakterien oder auch Hefen im Most abzutöten um eine Reinzuchtgärung

ermöglichen zu können und um somit einen Eintrag von Fehltonen durch Wildhefen, wie z.B. *Pichia* oder *Candida*, vorzubeugen [241]. Bei der zweiten Variante (V2) handelt es sich um einen Most, dem vor der Vergärung Bestandteile größer als 10 kDa mittels Ultrafiltration (Sartorius Sartocan beta System, Sartorius, Goettingen) entzogen wurden. Mit dieser Variante sollte die Relevanz der Traubenproteine auf die Trubentstehung demonstriert werden. Bei den übrigen Varianten (V3 - V6) wurde der Einfluss von verschiedenen Gärhilfsstoffen auf die Weinproteine getestet. Die Präparate wurden von der Firma Eaton Begerow (Langenlonsheim) und der Erbslöh GmbH (Geisenheim) zur Verfügung gestellt.

In Abbildung 18 sind die extrahierten Lyophilisate aus diesen Proben mit den entsprechenden Kontrollen, d. h. dem Most und dem Wein (Ausbau nur mit der Rieslinghefe (SIHA Aktivhefe 7, Eaton Begerow, Langenlonsheim) dargestellt. Auch hier sind die bereits beschriebenen Proteinbanden (vgl. 4.3) sowohl im Most als auch in den meisten Weinen ersichtlich. Die Proteinbanden sind vorwiegend im Bereich von 10 - 30 kDa zu erkennen, wobei bei dem Kontrollwein K0 und den Varianten 3 - 6 eine Bande bei ca. 70 kDa vorliegt. Tatsächlich unterschieden sich die Bandenmuster der Weine in der Regel nicht voneinander, außer im Vergleich zu Variante 2. Bei dieser Probe wurden bereits vor der Vergärung alle traubeneigenen Proteine aus dem Most entzogen. Hier sind nur die durch die Hefe eingetragenen Proteine zu erkennen, vor allem im Molekulargewichtsbereich von ca. 17 kDa. Es handelt sich vorwiegend um glykosylierte Proteine (Glykoproteinfärbung hier nicht dargestellt) bzw. Bruchstücke dieser [60, 62]. Glykosylierte Proteine oberhalb von 250 kDa ließen sich auch in den anderen Proben nachweisen.



**Abbildung 18: Übersicht der oenologischen Ausbauvarianten eines Rieslings (Jahrgang 2012) von dem Rudesheimer Berg (Geisenheim).** Die Bezeichnungen entsprechen den Abkürzungen aus Abbildung 17. Auszug aus der von mir mitbetreuten Bachelorarbeit von J. Roth (2013); 12,5 % SDS-PAGE, Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad.

Die Proteingehalte, bestimmt mittels Bradford Assay (vgl. 3.1), der untersuchten Varianten sind mit ca.  $13 \pm 4$  mg/l sehr ähnlich. Allerdings wurde dieser Wert auch bei der Variante 2 ermittelt, in Variante 1 beträgt dieser das Doppelte.

Bei der kurzzeiterhitzten Variante V1 lässt sich der erhöhte Proteingehalt mit der Auffaltung der enthaltenen Proteine bei 90 °C erklären. Es ist möglich, dass der Coomassie Farbstoff des Bradford Assay's eine bessere Zugänglichkeit zu den positiven und hydrophoben Aminosäuren (AS) der Proteine erhält, die zuvor im Inneren der Proteine abgeschirmt wurden als Konsequenz aus der Teildenaturierung der Proteine bei Hitzeeinwirkung. Durch diese zusätzlichen Bindungen wird eine Verstärkung des Absorptionssignals bei 595 nm erzeugt und führt bei der Berechnung mittels Eichgerade zu einem höheren Proteingehalt (vgl. 3.1). Auch die Variante 2 ist hinsichtlich ihrer Proteinkonzentration auffällig, da sich in dieser Probe der gleiche Proteingehalt messen ließ wie im Kontrollwein oder den anderen Varianten 3 - 6, obwohl dem Most vor der Vergärung die traubeneigenen Proteine entzogen wurden. Es scheint, als hätte durch die Hefe ein vermehrter Proteineintrag in den Wein stattgefunden trotz der Zugabe des Nährstoffpräparates, der in den übrigen Proben ausblieb. Ein möglicher Grund hierfür könnte ein Nährstoffmangel für die Hefen sein, der zu einer vermehrten Zelllyse führte. Massenspektrometrische Untersuchungen müssten angeschlossen werden, um hier eine genaue Aussage über die Herkunft der Proteine zu treffen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Behandlungsmaßnahmen, wie die Kurzzeiterhitzung (KZE) sowie die angegebenen Gärhilfsstoffe scheinbar keinen Einfluss auf die Proteinzusammensetzung der Ausbauvarianten nahmen. Allerdings führte die Ultrafiltration des Mostes vor der Vergärung zu einem vermehrten Eintrag an Hefeproteinen in den Wein.

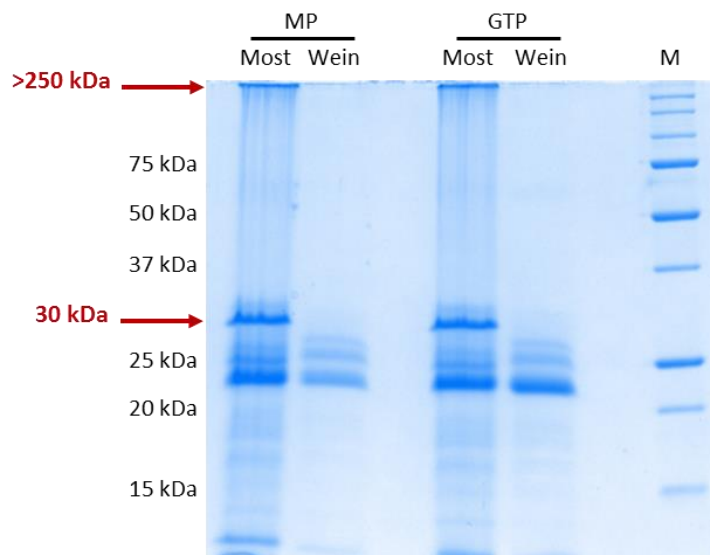
### **Entsaftungsvarianten**

Der Unterschied der Maische- (MP) und der Ganztraubenpressung (GTP) ist, dass bei der Ganztraubenpressung die Trauben nicht zuvor entrappt und so von den Stängeln und Stielen befreit werden. Vergleicht man nun die beiden Moste der unterschiedlichen Behandlungen dann zeigt sich, dass sich die Proteinbanden in der SDS-PAGE nicht unterscheiden (Abbildung 19).

Im Most befinden sich Proteine im Bereich von 10 – 30 kDa und oberhalb von 250 kDa. Die entsprechenden Weine weisen ein ähnliches Bandenmuster wie die Moste auf, auch wenn hier die Proteinbanden weniger intensiv angefärbt sind. Auch die Bande bei ca. 30 kDa sowie die oberhalb von 250 kDa sind nicht mehr mittels Comassiefärbung (vgl. 3.7)



darstellbar. Ansonsten ähneln sich auch die Weine untereinander in ihrer Bandenzusammensetzung sehr. Während der Vergärung wurden traubeneigene Proteine durch die Hefen abgebaut oder durch Trubbildung mit der Hefe sedimentiert. Mittels Filtration konnten sie so aus dem Wein entfernt werden.



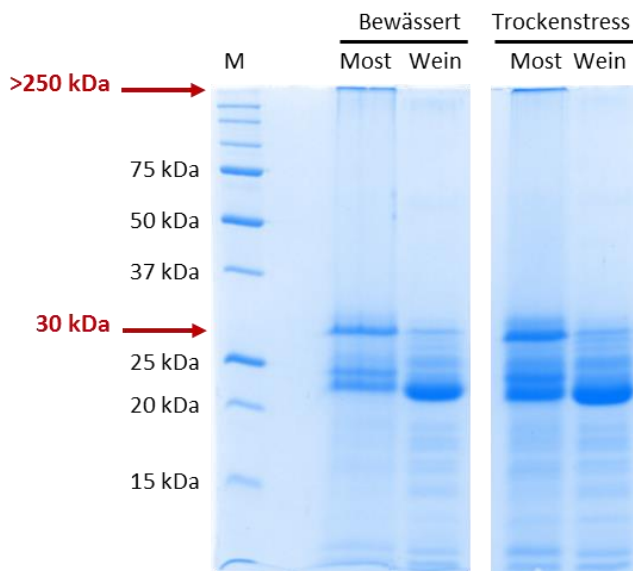
**Abbildung 19: Vergleich der Entsaftungsvarianten hinsichtlich der Proteinzusammensetzung in Most und Wein.** MP: Maischepressung; GTP: Ganztraubenpressung; 12,5 % SDS-PAGE, Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad.

Unterschiede in der Proteinzusammensetzung dieser beiden Varianten sind in der SDS-PAGE nicht zu sehen. Erst mit der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde eine Erhöhung der Proteingehalte bei der Ganztraubenpressung nachgewiesen. Durch die Ganztraubenpressung wurden in den Most ca. 36 % mehr Proteine (GTP: 82,5 mg/l) eingetragen als durch die Maischepressung (MP: 52,8 mg/l). Auch noch nach der Vergärung ist die Proteinkonzentration im fertigen Wein der GTP-Variante höher (MP: 2,9 mg/l; GTP: 5,1 mg/l). Massenspektrometrische Untersuchungen müssten angeschlossen werden, um die Proteine zu identifizieren und so auf ihren Ursprung aus den Pflanzenbestandteilen zu schließen.

#### 4.4.2 Einfluss der weinbaulichen Variante Trockenstress

Es wurde der Einfluss von Trockenstress auf die Rebe und somit auf den Proteingehalt untersucht. Dazu wurde in den Versuchsweinbergen der Hochschule Geisenheim ein Teil der Reben während der Beerenreife zusätzlich bewässert. Anschließend wurde der Most aus den Trauben mit zusätzlicher Bewässerung und denen ohne Bewässerung vergoren. Auch diese Most- und Weinproben wurden hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung betrachtet.

In der folgenden Abbildung kann man sehen, wie sich die Proben in der Proteinbandenzusammensetzung ähneln (Abbildung 20) auch im Vergleich zu den Proben aus dem vorherigen Kapitel (Abbildung 19). Es lassen sich vergleichbare Unterschiede zwischen dem Most und dem entsprechenden Wein, gerade bei der 30 kDa Bande und oberhalb von 250 kDa erkennen.

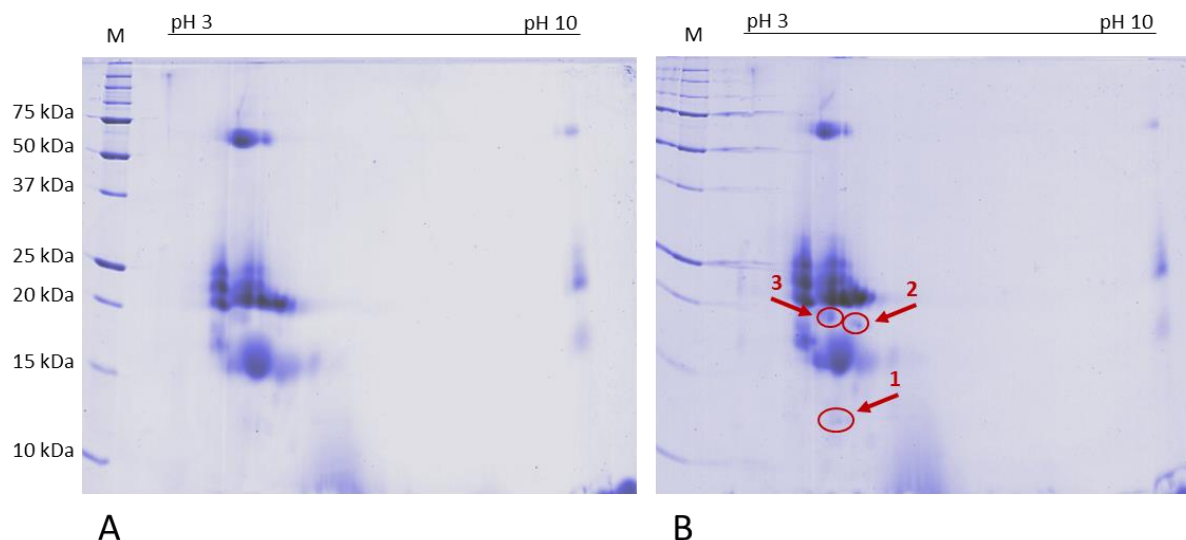


**Abbildung 20: Einfluss weinbaulicher Maßnahmen auf die Proteinzusammensetzung im Wein, Riesling von dem Rudesheimer Berg (Geisenheim, 2012).** Aufgetragen wurden Moste bzw. Weine von bewässerten und nicht zusätzlich bewässerten (Trockenstress) Trauben. 12,5 % SDS-PAGE, Coomassie Färbung; M: Precision Plus Protein Unstained Standard.

Auch hier ist der Unterschied erst mit der Messung der Proteinkonzentration ersichtlich. Die trockengestresste Probe wies im Most einen um ca. 44 % höheren Proteingehalt (Trockenstress: 106,3 mg/l; bewässert: 74,0 mg/l, vgl. 3.1) auf als die bewässerte Variante. Dies konnte ebenfalls in diesen Weinproben und denen eines früheren Jahrgangs beobachtet werden (Riesling 2008, Hochschule Geisenheim).

Um ein deutlicheres Bild von den Unterschieden der beiden Varianten zu gewinnen, wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese der Versuchsweinproben aus dem Jahr 2008 durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist die zusätzliche Untersuchung der Proteine hinsichtlich ihrer isoelektrischen Punkte (pI). Bei näherer Betrachtung der beiden Gele in Abbildung 21 lassen sich kleinere Unterschiede bei der Proteinzusammensetzung erkennen. Die meisten angefärbten Proteine befinden sich zwischen pH 3 - 6. In diesem Bereich lassen sich drei intensiv gefärbte Bereiche erkennen: bei 15 – 18 kDa, 20 – 25 kDa und bei ca. 70 kDa. Diese Bereiche setzten sich aus Spots verschiedener Durchmesser zusammen. Bei der trockengestressten Variante lassen sich zusätzlich kleine Spots bei ca. 12 kDa (Abbildung 21 B<sup>1</sup>) und zwei Spots bei ca. 19 kDa erkennen (Abbildung 21 B<sup>2+3</sup>, rot umkreist).

Bei dem Spot bei 12 kDa könnte es sich um ein LTP handeln, obwohl für dieses Protein der pI mit ca. 4 sehr niedrig wäre. Den beiden anderen Spots könnten TLPs zugeordnet werden.



**Abbildung 21: Vergleich einer bewässerten mit einer trockengestressten Riesling Wein Variante des Jahrgangs 2008.** Eingesetzt wurde jeweils 1 mg Lyophilisat der entsprechenden Probe. Erste Dimension: IEF im Bereich pH 3 - 10; 2. Dimension: 15 % SDS-PAGE. A: Riesling Wein mit zusätzlichen Bewässerungsterminen (MM\_7); B: Riesling Wein ohne weitere Bewässerung (trockengestresst, MM\_6). rot umkreist: Unterschiede in der Proteinzusammensetzung. Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad.

Um bessere Informationen über die genaue Zusammensetzung der Proteine in diesen Proben zu erhalten, erfolgte eine massenspektrometrische Untersuchung. Dazu wurden bei der MS-Analyse 20 µg Gesamtprotein tryptisch in Lösung verdaut und untersucht. Es konnten 25 verschiedene Proteine in den beiden Proben mit und ohne zusätzliche Bewässerung detektiert werden. Darunter befanden sich traubeneigene Proteine (15) und einige Proteine aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (10) (Tabelle 9).

An den Daten lässt sich erkennen, dass der Anteil der traubeneigenen Proteine in den Proben am stärksten beeinträchtigt wurde. Bemerkenswert sind hier die in zum Teil stark variierenden Anteilen vorliegen fünf TLPs (Accession Nummer: CAN66515.1, CAB85636.1, ABD64682.1, CAB85637.1, AAF82264.1). Dies wird vor allem bei dem TLP mit der Accession Nummer ABD64682.1 deutlich. Während das Protein in der bewässerten Probe noch mit einem Anteil von 0,795 mg/l nachweisbar war, befanden sich in der trockengestressten Probe nur noch ca. 0,009 mg/l davon. Insgesamt liegen drei dieser TLPs in der gestressten Probe zu einem höheren Anteil als entsprechend in der bewässerten Probe vor. Eine konkrete Zuordnung einzelner in der Massenspektrometrie ermittelten Proteine zu den Spots in den 2D-Gelen ist nur begrenzt möglich. Bei den MS Daten wurden vorwiegend Proteine mit einem pI von 4 - 5 detektiert, die auch zum Teil mit den entsprechenden Molekulargewichten den Bereichen im 2D-Gel zu zuordnen sind. Allerdings liegen die Spots in dem Gel zu nah beieinander um eine klare Zuordnung festlegen zu

können. Ebenfalls sind in den MS Daten Proteine mit pI's im alkalischen Bereich (pI 7 - 9) ermittelt worden, die nicht im Gel sichtbar sind. Es kann ausgeschlossen werden, dass diese Proteine durch eine Vorbehandlung der Weine aus den Proben entfernt wurden. Daher könnte dies zum einen auf eine zu geringe Konzentration für die Visualisierung mit Coomassie zurückzuführen sein. Oder es handelt sich bei den detektierten Proteinen lediglich um Bruchstücke dieser, die während der Weinbereitung entstanden sind und so nur bei der MS nachweisbar waren. Bei der MS handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, die Proteine im ng-Bereich nachweisen kann [80]. Generell sollte bei den MS Daten berücksichtigt werden, dass nur Peptide identifiziert wurden, die den vollständigen Aminosäuresequenzen der Proteine zugeordnet wurden. Diese werden als Ergebnisse verwendet.

**Tabelle 9: Ergebnisse der MS-Analyse der bewässerten und der entsprechend nicht bewässerten Riesling Weine.** Die Ergebnisse wurden anteilig auf die 20 µg Gesamtprotein in % bestimmt und auf den Gesamtproteingehalt umgerechnet. Die Werte für die pI's und die Molekulargewichte MW wurden über die Aminosäuresequenzen berechnet. hellblau hinterlegt: traubeneigene Proteine. MB: mit Bewässerung, 6,75 mg/l (MM\_7); OB ohne zusätzliche Bewässerung, 9,28 mg/l (MM\_6); MW: Molekulargewicht.

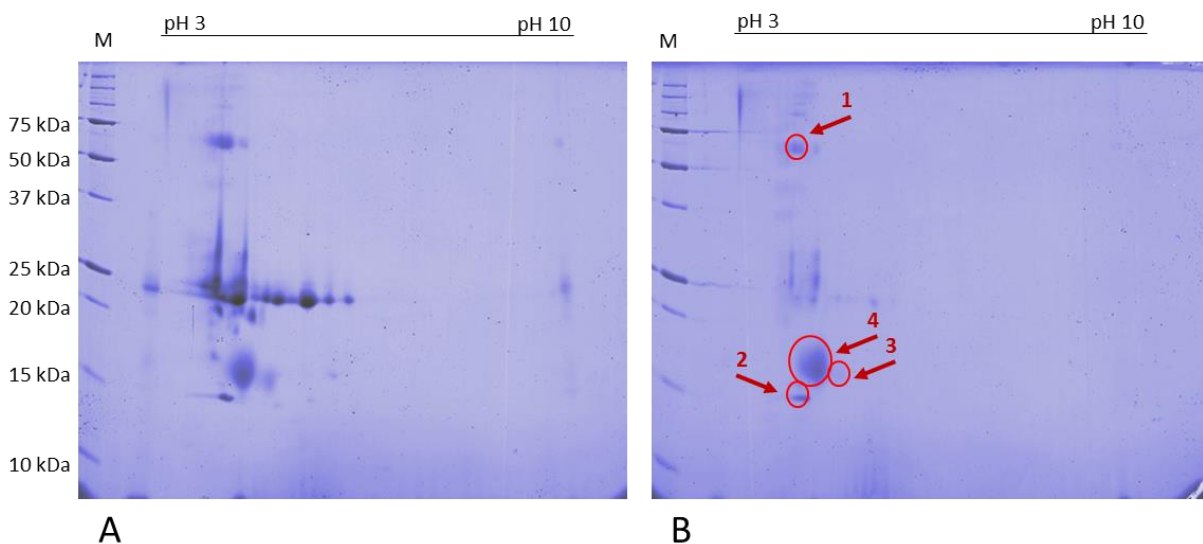
				MB	OB
Accession Nummer	Beschreibung	pI	MW [Da]	Gehalt [mg/l]	
CAN66515.1	hypothetical protein VITISV 021587 Vitis vinifera (TLP homolog)	4,4	24850	1,350	2,410
XP_002265534.1	PREDICTED: beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I-like [Vitis vinifera]	4,3	60784	1,098	0,788
XP_002282964.1	PREDICTED thaumatin like protein Vitis vinifera	4,5	24828	0,974	0,962
CAB85636.1	putative thaumatin like protein Vitis vinifera	4,3	20977	0,857	1,467
ABD64682.1	thaumatin like protein Vitis vinifera	4,3	24904	0,795	0,009
XP_002282910.1	PREDICTED pathogenesis related protein R major form Vitis vinifera	4,9	24915	0,740	1,830
AAB47171.1	vacuolar invertase 1 GIN1 Vitis vinifera grape berries Sultana berries Peptide 642 aa	4,4	71832	0,549	0,394
CAB85637.1	putative thaumatin like protein Vitis vinifera	4,8	24963	0,326	1,066
NP_012827.1	Cwp1p Saccharomyces cerevisiae Stamm S288c	4,3	24268	0,016	0,018

XP_002264720.1	PREDICTED pathogenesis related protein PR 4B Vitis vinifera	7,8	15569	0,015	0,048
NP_011770.3	Eno1p Saccharomyces cerevisiae Stamm S288c	6,2	46873	0,006	0,007
XP_002269916.2	PREDICTED aspartic proteinase like protein 1 like partial Vitis vinifera	4,0	31613	0,004	0,004
NP_014239.1	Ygp1p Saccharomyces cerevisiae Stamm S288c	5,1	37442	0,003	0,005
AAO33394.1	lipid transfer protein isoform 4 Vitis vinifera	8,6	12256	0,003	0,001
NP_013719.1	Plb2p Saccharomyces cerevisiae Stamm S288c	4,3	76026	0,003	0,006
P47033.1	PRY3 YEAST RecName Full Cell wall protein PRY3 AltName Full Pathogen related in Sc 3 Flags Prec	4,3	89780	0,002	0,003
XP_002277446.1	PREDICTED glucan endo 1 3 beta glucosidase Vitis vinifera	8,8	36734	0,002	0,007
XP_002266308.2	PREDICTED: oryzain alpha chain-like [Vitis vinifera]	4,0	42455	0,002	0,001
NP_014038.1	Gas1p Saccharomyces cerevisiae Stamm S288c	4,3	60381	0,002	0,001
P00925.2	ENO2 YEAST RecName Full Enolase 2 AltName Full 2 phospho D glycerate hydro lyase 2 AltName Full	5,6	46971	0,001	0,002
AAQ10093.1	class IV chitinase Vitis vinifera	5,3	28384	0,001	0,004
NP_011705.1	Crh1p Saccharomyces cerevisiae Stamm S288c	4,3	52872	0,3 µg/l	0,5 µg/l
P15703.1	BGL2 YEAST RecName Full Glucan 1 3 beta glucosidase AltName Full Exo 1 3 beta glucanase AltName	4,1	34347	0,1 µg/l	0,0 µg/l
P00724.1	INV2 YEAST RecName Full Invertase 2 AltName Full Beta fructofuranosidase 2 AltName Full Sacchar	4,4	60754	0,1 µg/l	0,2 µg/l
AAF82264.1	thaumatin like protein Vitis vinifera	8,1	25285	0,000	0,247

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass anhand beider Analysemethoden, MS und 2D-SDS-PAGE, zu erkennen ist, dass die Rebe auf Stress durch Trockenheit mit einer Anpassung der Proteinexpression reagierte und dies in den Weinen zu einer unterschiedlichen Proteinzusammensetzung führt [235-237].

#### 4.4.3 Einfluss der Schöpfung auf der Proteinzusammensetzung

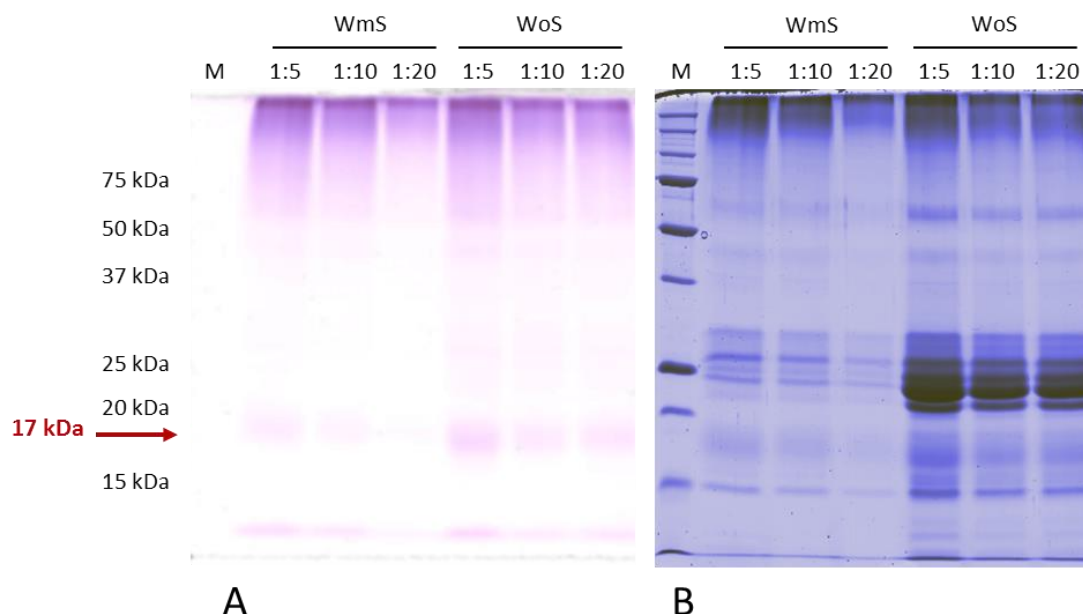
Die Schöpfung von Wein ist eine sehr wichtige oenologische Maßnahme um den Wein zu stabilisieren und so eine Nachtrübung in der Flasche zu verhindern. Im Folgenden ist die Proteinzusammensetzung in einem Portugieser Wein vor und nach der Schöpfung mit 400 g/hl Bentonit näher betrachtet worden.



**Abbildung 22: Vergleich eines unbehandelten und bentonitgeschönten Portugieser Weins.** Weine der Winzergenossenschaft Mosel (MM\_3 & MM\_2). Erste Dimension: IEF im Bereich pH 3 - 10; 2. Dimension: 15 % SDS-PAGE. A: un behandelter Wein; B: Wein geschönt mit 400 g/hl Bentonit. Rot umkreist: Nicht entfernte Proteinbereiche. Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard.

Zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung wurden von den Proben 2D-SDS-Gele angefertigt (Abbildung 22). Durch die Schöpfung wurden ca. 81 % der Gesamtproteine aus dem Wein entfernt (un behandelter Wein 22,63 mg/l (MM\_3); geschönter Wein, 4,27 mg/l (MM\_2)), was man anhand der Gele erkennen kann. Bei dem Vergleich der beiden Gele ist eine starke Reduktion der Proteinintensität vor allem im Molekulargewichtsbereich von 18 - 30 kDa zu erkennen (Abbildung 22 B). Auffällig sind drei kleinere (Abbildung 22 B<sup>1+2+3</sup>) und ein großer Spot (Abbildung 22 B<sup>4</sup>), die durch die Schöpfung nicht maßgeblich entfernt wurden. Unklar ist, um welche Proteine es sich hier tatsächlich handelt, allerdings kann man aufgrund der Molekulargewichte sowie der folgenden MS Daten (vgl. Tabelle 10) spekulieren, dass er sich bei dem Spot Nr. 1 um die Invertase (ca. 70 kDa) und bei dem Spot Nr. 2 um ein Profilin (PR-Protein, Familie 4, ca. 15 kDa) handeln könnte. Da bei der

Glykoproteinfärbung auf Höhe von ca. 17 kDa (Abbildung 23 A) eine Färbung nachweisbar war, kann daraus geschlossen werden, dass es sich bei dem großen Spot Nr. 4 bei ca. 17 kDa und dem kleineren Spot Nr. 3 (Abbildung 22 B) um Mannoproteine bzw. um Bruchstücke eines Mannoproteins handelt. Auch wenn dies hier nur in einem SDS-Gel (ohne vorherige IEF) durchgeführt wurde, sind die angefärbten Bereiche sehr ähnlich von ihrem Molekulargewicht.



**Abbildung 23: PAS-Färbung des bentonitgeschönten und des unbehandelten Portugieser Weins.** Winzergenossenschaft Mosel (MM\_3 & MM\_2). Als Stamm wurde eine Lösung aus 20 mg Lyophilisat in 1000  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eingesetzt und entsprechend der Angaben an den Taschen verdünnt. A: PAS- Färbung; B: PAS-Färbung mit Coomassie nachträglich eingefärbt. WmS: geschönter Wein; WoS: Wein ohne Schönung. 12,5 % SDS-PAGE, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad.

Auch diese Proben wurden hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung massenspektrometrisch untersucht. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dieser Analyse aufgeführt. Durch Korrelation dieser Daten mit der eingesetzten Gesamtproteinmenge konnte anteilig nachvollzogen werden, welche Proteine aus dem Wein entfernt wurden (Tabelle 10). In der unbehandelten Probe wurde mit 15,6 mg/l die Klasse IV Chitinase (Accession Nummer: AAQ10093.1) als Hauptbestandteil ermittelt. Auch verschiedene TLPs und eine Invertase (Accession Nummer: XP\_002265534.1) konnten in größeren Konzentrationen (0,2 - 2,7 mg/l) nachgewiesen werden (Tabelle 10) Die Invertase könnte dem Spot Nr. 1 in der Abbildung 22 B zugeordnet werden. Neben den insgesamt 14 verschiedenen Traubenproteinen wurden auch 11 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ermittelt. Durch die Behandlung mit Bentonit wurden einige dieser Proteine aus dem Wein entfernt. Am deutlichsten lässt sich dies am Beispiel der Klasse IV Chitinase (Accession Nummer: AAQ10093.1) zeigen. Dieses Protein macht einen Anteil von 69 % des Gesamtproteingehalts aus, davon wurden 96 % durch die Bentonitschönung aus der Lösung

entfernt. Es konnten sechs verschiedene TLPs nachgewiesen werden, von denen vier zum Teil stark durch die Schönung um bis zu 98 % reduziert wurden (Accession Nummer: ABD64682.1, XP\_002282964.1, CAB85637.1, AAF82264.1). Der Anteil der anderen Beiden stieg dagegen an. Gründe hierfür könnten sein, dass sich vermehrt Bruchstücke der anderen TLPs gebildet haben, die aufgrund ihrer ähnlichen Aminosäurezusammensetzungen diesen Proteinen zugeordnet wurden.

**Tabelle 10: Ergebnisse der MS-Analyse eines Portugieser Weins ohne und mit Bentonitschönung.** Der Wein wurde mit 400 g/hl Bentonit geschönt. Die Ergebnisse wurden anteilig auf die 20 µg Gesamtprotein in % bestimmt und auf die Gesamtproteinkonzentration im Wein umgerechnet. Die Werte für die pI's und die Molekulargewichte MW wurden über die Aminosäuresequenzen berechnet. hellblau hinterlegt: traubeneigene Proteine. WoS: Wein ohne Schönung, 22,63 mg/l (MM\_3); WmS: geschönter Wein, 4,27 mg/l (MM\_2); MW: Molekulargewicht.

				WoS	WmS
Accession Nummer	Beschreibung	pI	MW [Da]	Gehalt [mg/l]	
AAQ10093.1	class IV chitinase <i>Vitis vinifera</i>	5,3	28384	15,628	0,572
ABD64682.1	thaumatin like protein <i>Vitis vinifera</i>	4,3	24904	2,682	1,553
XP_002265534.1	PREDICTED: beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]	4,3	60784	1,584	0,334
XP_002282964.1	PREDICTED thaumatin like protein <i>Vitis vinifera</i>	4,5	24828	1,439	0,093
XP_002282988.1	PREDICTED: thaumatin-like protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	4,4	24850	0,314	0,656
CAB85637.1	putative thaumatin like protein <i>Vitis vinifera</i>	4,8	24963	0,240	0,004
AAB47171.1	vacuolar invertase 1 GIN1 <i>Vitis vinifera</i> grape berries Sultana berries Peptide 642 aa	4,4	71832	0,234	0,289
NP_014239.1	Ygp1p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm S288c	5,1	37442	0,074	0,194
NP_011705.1	Crh1p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm S288c	4,3	52872	0,050	0,084
P15703.1	BGL2 YEAST RecName Full Glucan 1 3 beta glucosidase AltName Full Exo 1 3 beta glucanase AltName	4,1	34347	0,045	0,031
NP_014038.1	Gas1p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm S288c	4,3	60381	0,043	0,054
AAF82264.1	thaumatin like protein <i>Vitis vinifera</i>	8,1	25285	0,039	0,001
NP_011770.3	Eno1p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	6,2	46873	0,038	0,020



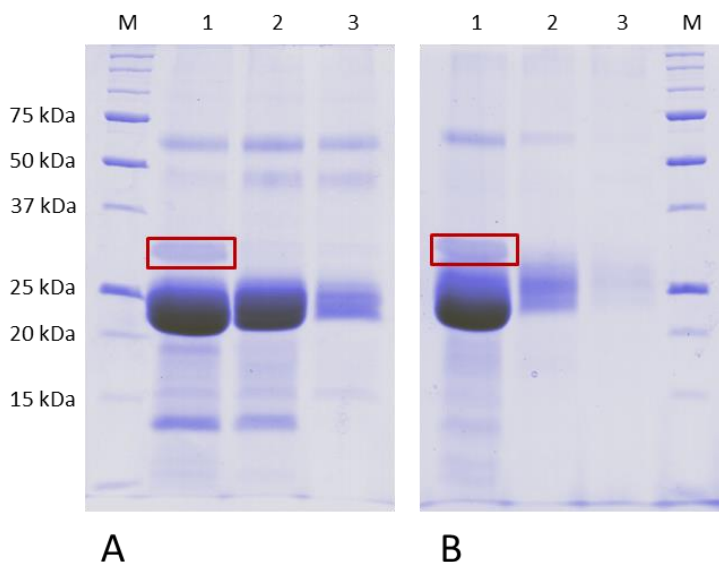
NP_009720.1	Tos1p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm S288c	4,3	48679	0,037	0,026
XP_002266308.2	PREDICTED: oryzain alpha chain-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]	4,0	42455	0,033	0,082
P47033.1	PRY3 YEAST RecName Full Cell wall protein PRY3 AltName Full Pathogen related in Sc 3 Flags Prec	4,3	89780	0,022	0,042
NP_013719.1	Plb2p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm S288c	4,3	76026	0,022	0,053
AAO33394.1	AF467946 1 lipid transfer protein isoform 4 <i>Vitis vinifera</i>	8,6	12256	0,020	0,001
P00925.2	ENO2 YEAST RecName Full Enolase 2 AltName Full 2 phospho D glycerate hydro lyase 2 AltName Full	5,6	46971	0,016	0,006
CAB85636.1	putative thaumatin like protein <i>Vitis</i> <i>vinifera</i>	4,3	20977	0,015	0,101
XP_002264720.1	PREDICTED pathogenesis related protein PR 4B <i>Vitis vinifera</i>	7,8	15569	0,013	0,000
XP_002271843.2	PREDICTED: chitotriosidase-1-like [ <i>Vitis</i> <i>vinifera</i> ]	8,6	39739	0,013	0,010
NP_014465.1	Dse4p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm S288c	4,2	121179	0,010	0,030
AAB61590.1	VVTL1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	4,9	24915	0,006	0,007
NP_012827.1	Cwp1p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm S288c	4,3	24268	0,005	0,005

Die detektierten Proteine weisen vorwiegend  $pI$ 's im Bereich von 4 – 5 auf, was auch bei den Daten im vorherigen Kapitel der Fall war (vgl. 4.4.3). An dieser Stelle kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass die Proteine mit einem höheren  $pI$  zumindest aus der Probe ohne vorherige Schönung nicht anderweitig aus dem Wein entfernt wurden. Hier scheinen zu geringe Konzentrationen oder auch nur der Nachweis einzelner Peptide dieser Proteine ein Grund für deren Abwesenheit in der 2D-PAGE (Abbildung 22 A) zu sein. Auch hier ist eine eindeutige Zuordnung einzelner Spots nicht exakt möglich. Dies zeigt sich auch am Beispiel des Spots bei ca. 17 kDa (Abbildung 22 B<sup>4</sup>). Durch den Vergleich der Glykoproteinfärbung (Abbildung 23) mit dem 2D-Gel könnte es sich bei diesem Spot um ein glykosyliertes Protein handeln. Allerdings lassen sich dem Molekulargewicht von ca. 17 kDa und dem  $pI$  von ca. 4

eindeutig keine MS Daten zuordnen. Dies bekräftigt die Vermutung, dass es sich um ein Bruchstück eines entsprechenden Glykoproteins handeln könnte.

#### 4.5 Wirkungsweise von Bentonit

Da es sich bei Bentonit um einen unspezifischen Adsorber handelt, ist es für das Verständnis um dessen Wechselwirkungen mit der Weinumgebung von großem Interesse dies näher zu betrachten. Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit dem DLR Mosel wurden Weine mit verschiedenen Bentoniten behandelt. Diese Proben wurden anschließend dialysiert und gefriergetrocknet, bevor sich weitere Analysen anschlossen. Bei diesen Versuchen wurde die Effektivität verschiedener Typen von Bentonit betrachtet sowie deren Einfluss auf die Proteinzusammensetzung in den Weinen.



**Abbildung 24: Betrachtung der Wirkung von  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Bentonit auf die Proteinzusammensetzung zweier Weine: Grauburgunder und Riesling.** A: Grauburgunder aus dem Jahr 2011; B: Riesling aus dem Jahr 2011. Es wurden jeweils 150 ml jeder Probe dialysiert und gefriergetrocknet. Das resultierende Lyophilisat von den entsprechenden Kontrollen ohne Behandlung im Vergleich mit der Behandlung mit  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Bentonit, wurde in 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und anschließend für die Gele 1:2 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt bevor sie aufgetragen wurden. Die rot umrandeten Banden wurden mittels MS analysiert. 1: Kontrolle 1:2 verd.; 2:  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Bentonit 200 g/hl 1:2 verd.; 3:  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Bentonit 400 g/hl 1:2 verd.; 12,5 %ige SDS-PAGE, Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard.

Hierzu wurden zwei Rebsorten von der Mosel aus dem Jahr 2011 eingesetzt. Ein Riesling und ein Grauburgunder wurden mit unterschiedlichen Mengen (200 & 400 g/hl) und unterschiedlichen Bentoniten ( $\text{NaCalit}^{\text{®}}$  PORE-TEC, Ca-Granulat, GranuBent $^{\text{®}}$  PORE-TEC, von der Erbslöh Geisenheim AG, Rüdesheim) behandelt. Nach Gefrier Trocknung von jeweils 150 ml der entsprechenden Proben wurden die Lyophilisate je in 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und anschließend mittels SDS-PAGE näher betrachtet. Zur besseren Übersicht wurde in Abbildung 24 nur ein Teil der Behandlungen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen

aufgetragen. Dabei fiel auf, dass bei einer Bentonitdosage von 200 g/hl NaCalit® PORE-TEC eine Proteinbande bei ca. 30 kDa im Grauburgunder sowie im Riesling vollständig entfernt wurde. Die übrigen Banden wiesen lediglich einen leichten Rückgang in ihrer Intensität auf. Dies konnte auch bei den anderen Bentoniten beobachtet werden (Daten hier nicht dargestellt).

**Tabelle 11: Ergebnisse der MS-Analyse der markierten Proteinbande aus dem Grauburgunder Wein (vgl. Abbildung 24 A).** Die Werte für die pI's und die Molekulargewichte MW wurden über die Aminosäuresequenzen berechnet. hellblau hinterlegt: traubeneigene Proteine.

Accession Nummer	Beschreibung	pI	MW [Da]	Gehalt [ng]	Anteil [%]
XP_002277446.1	PREDICTED glucan endo 1 3 beta glucosidase Vitis vinifera	8,8	36653	347,5	91,65
NP_011798.1	Bgl2p Saccharomyces cerevisiae Stamm S288c	4,1	34097	7,1	1,89
AAQ10093.1	class IV chitinase Vitis vinifera	5,3	27510	6,9	1,82
XP_002282988.1	PREDICTED thaumatin like protein Vitis vinifera	4,4	23864	5,3	1,39
NP_011770.3	Eno1p Saccharomyces cerevisiae Stamm S288c	6,2	46787	3,1	0,82
P00925.2	ENO2 YEAST RecName Full Enolase 2 AltName Full 2 phospho D glycerate hydro lyase 2 AltName Full	5,6	46885	2,4	0,63
CAB85637.1	putative thaumatin like protein Vitis vinifera	4,7	24035	2,3	0,61
AAB61590.1	VVTL1 Vitis vinifera	4,9	23953	2,3	0,61
CAN79256.1	hypothetical protein VITISV009139 Vitis vinifera	4,7	28127	0,8	0,21
P39005.1	KRE9 YEAST RecName Full Cell wall synthesis protein KRE9 Flags Precursor	9,4	29969	0,6	0,16
XP_002277511.1	PREDICTED glucan endo 1 3 beta glucosidase basic isoform Vitis vinifera	9,6	37478	0,5	0,14
CBI19479.3	unnamed protein product Vitis vinifera	4,8	42575	0,4	0,10

**Tabelle 12: Ergebnisse der MS-Analyse der markierten Proteinbande aus dem Riesling Wein (vgl. Abbildung 24 B).** Die Werte für die pI's und die Molekulargewichte MW wurden über die Aminosäuresequenzen berechnet. hellblau hinterlegt: traubeneigene Proteine.

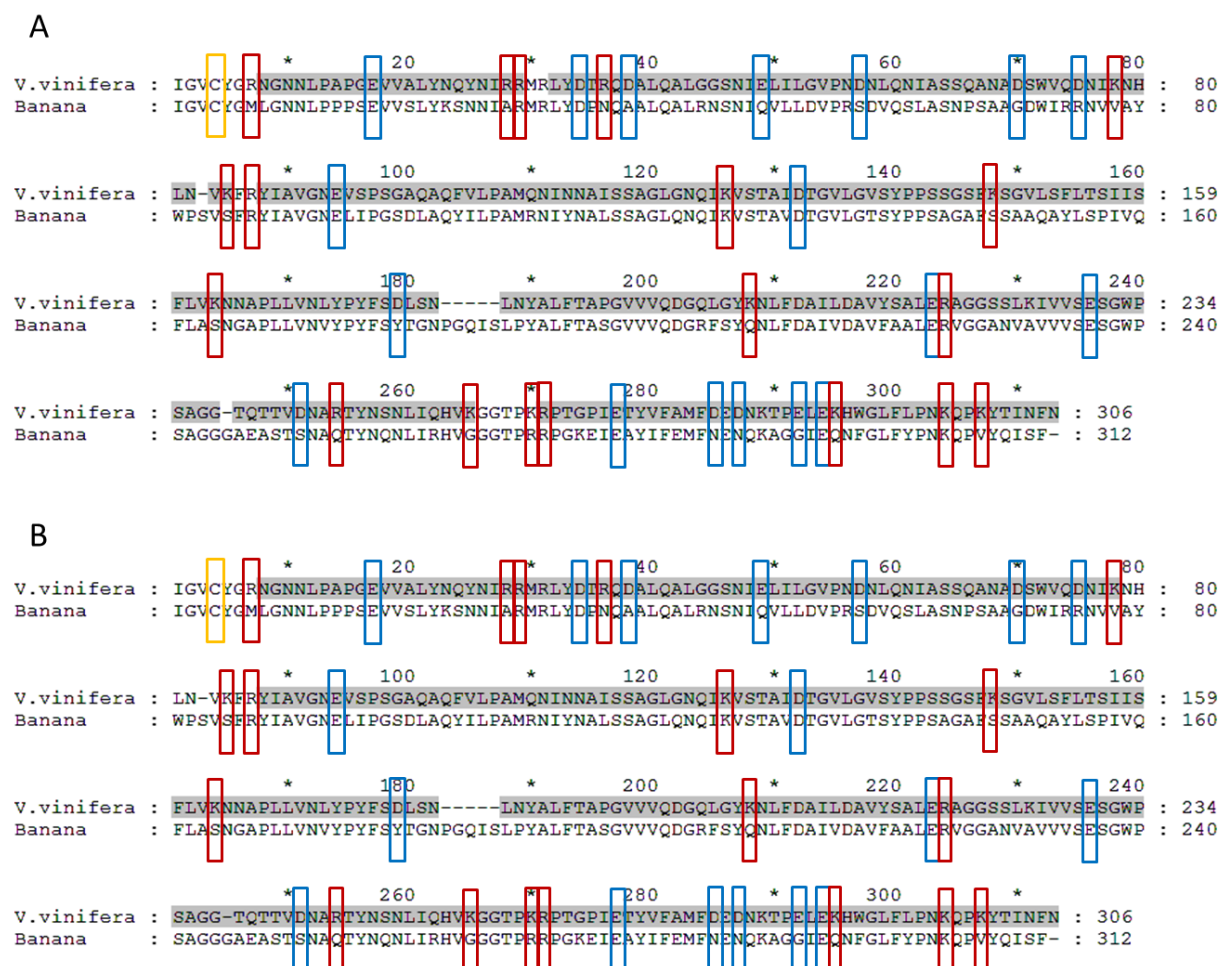
Accession Nummer	Beschreibung	pI	MW [Da]	Gehalt [ng]	Anteil [%]
XP_002277446.1	PREDICTED glucan endo 1 3 beta glucosidase <i>Vitis vinifera</i>	8,8	36653	248,49	84,87
XP_002282988.1	PREDICTED thaumatin like protein <i>Vitis vinifera</i>	4,4	23864	26,46	9,04
NP_011770.3	Eno1p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm S288c	6,2	46787	3,27	1,12
CAN71350.1	hypothetical protein VITISV023813 <i>Vitis vinifera</i>	11,0	11490	3,10	1,06
AAB61590.1	VVTL1 <i>Vitis vinifera</i>	4,9	23953	2,27	0,77
AAB65776.1	class IV endochitinase <i>Vitis vinifera</i>	5,3	27224	2,12	0,73
CAB85637.1	putative thaumatin like protein <i>Vitis vinifera</i>	4,7	24035	1,99	0,68
AAB65777.1	class IV endochitinase <i>Vitis vinifera</i>	5,3	27519	1,77	0,61
NP_012044.1	Eno2p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm S288c	5,6	46885	1,18	0,40
P15703.1	BGL2 YEAST RecName Full Glucan 1 3 beta glucosidase AltName Full Exo 1 3 beta glucanase AltName	4,1	34097	0,81	0,28
XP_002283042.1	PREDICTED thaumatin like protein <i>Vitis vinifera</i>	7,7	24139	0,69	0,24
XP_002282964.1	PREDICTED thaumatin like protein <i>Vitis vinifera</i>	4,5	23842	0,64	0,22

Die in Abbildung 24 rot markierten Banden wurden mittels MS analysiert. Sowohl für den Grauburgunder als auch für den Riesling Wein wurde in dieser Bande die PREDICTED glucan endo 1-3 beta glucosidase aus *Vitis vinifera* (Accession Nummer: XP\_002277446.1) mit einem Anteil von mindestens 85 % identifiziert (vgl. Tabelle 11, Tabelle 12). Die  $\beta$ -Glucosidase hydrolysiert 1-3- $\beta$ -D-glycosidische Bindungen zu 1-3- $\beta$ -D-Glycanen. Dadurch spielt sie eine Rolle bei der Abwehr gegen fungale Pathogene [242, 243].

#### 4.5.1 Charakterisierung der $\beta$ -Glucosidase

Bei der  $\beta$ -Glucosidase handelt es sich um ein ca. 36676 Da großes Molekül, bestehend aus 340 Aminosäuren (AS) und einem theoretischen  $pI$  von 8,45 (Daten wurden mittels ExPASy ProtParam ermittelt [83]). Bei näherer Betrachtung der AS-Sequenz fällt auf, dass dieses Enzym nur ein Cystein enthält und somit auch keine Disulfidbrücken zur Stabilisierung ausbilden kann. Die Anzahl an negativ und positiv geladenen AS ist mit 23 und 25 annähernd gleich (Abbildung 25).

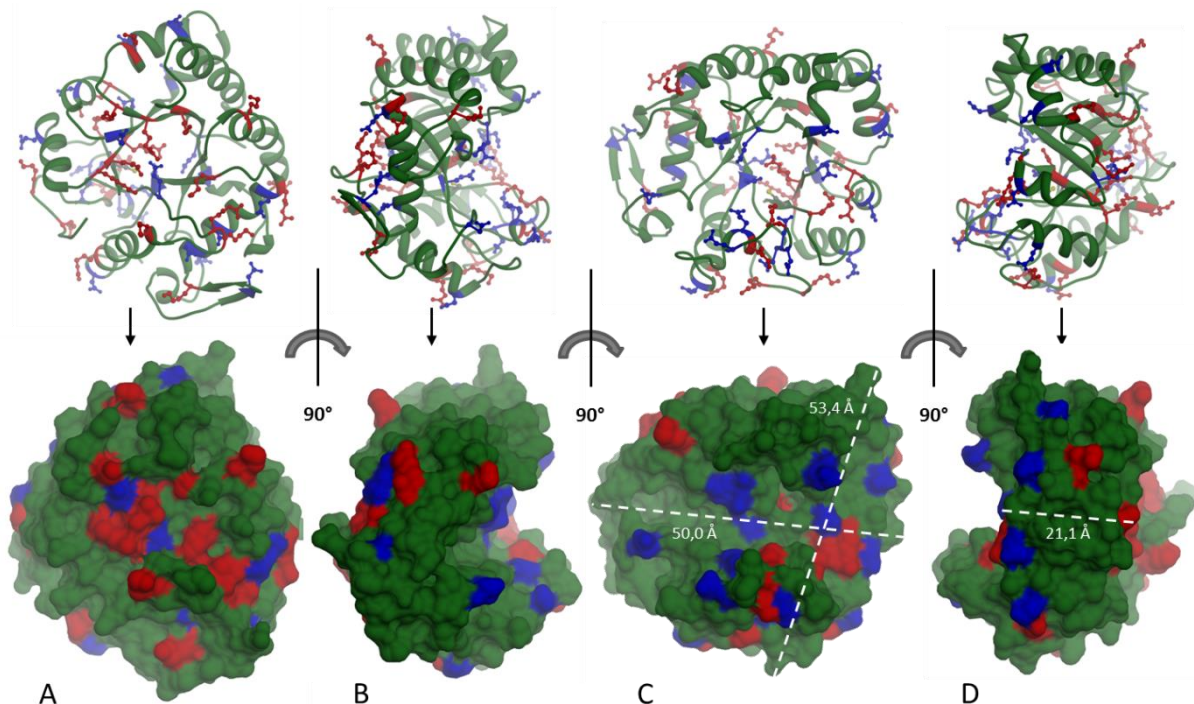
Im Folgenden ist mittels des Programms SwissModel [224-226] eine Raumstruktur der  $\beta$ -Glucosidase erstellt worden. Dabei diente die  $\beta$ -Glucosidase aus der Banane (PDB: 2cyg) als Template [128]. Beide Enzyme haben eine Sequenzidentität von 59 % und eine 75 %ige Ähnlichkeit in den physiko-chemischen Eigenschaften der AS. Bereits im Vorfeld wurde der AS-Bereich des Signalpeptids mit dem SignalP 4.1 Server [88] berechnet und für das Alignment entfernt.



**Abbildung 25: Sequenzalignment der  $\beta$ -Glucosidase (Accession Nummer: XP\_002277446.1) aus *Vitis vinifera* und Banane (PDB: 2CYG) von den AS 35 - 339. A: Grauburgunder; B: Riesling. Die durch MS identifizierte AS sind grau hinterlegt, gelb umrandet: das einzige Cystein der Sequenzen; rot umrandet: positiv geladene AS (Arg, Lys); blau umrandet: negativ geladene AS (Asp, Glu). Verwendete Programme: ClustelX 1.8, GeneDoc 2.6.**

Anhand des Modells wurden mit Hilfe von UCSF Chimera [227] Grafiken erstellt, die die Tertiärstruktur sowie deren entsprechende Oberfläche zeigen (Abbildung 26). Dabei scheint sich die Struktur aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern zusammensetzen. Basierend auf dem zugrundeliegenden Template bezeichnet man diese Struktur als  $\alpha/\beta$  - TIM-barrel Motiv [128]. Während die Faltblätter eher einen Tunnel durch das Protein bilden, sind die Helices um die Faltblätter herum nach außen ausgerichtet angeordnet.

Um eine Erklärung dafür zu finden, warum dieses Protein in solch einem Ausmaß aus dem Wein entfernt wurde, wurden mit Hilfe von UCSF Chimera die Verteilung der positiv und negativ geladenen AS im Molekül betrachtet. In Abbildung 26 sind diese Grafiken dargestellt.



**Abbildung 26:** Darstellung der Tertiärstruktur mit den entsprechenden Oberflächen des mit Hilfe von SwissModel erstellten Modell der  $\beta$ -Glucosidase aus *Vitis vinifera* (Accession Nummer: XP\_002277446.1). Oben: Tertiärstruktur; unten: Oberfläche des Modells. Bilder wurden mit UCSF Chimera 1.6.2 erstellt. Modelldarstellung der positiven (Arg, Lys) und negativen (Asp, Glu) AS am Proteinrückrad und an der Oberfläche. rot: positiv geladene AS (Arg, Lys); blau: negativ geladenen AS (Asp, Glu); grün: sonstige AS.

Bei genauer Betrachtung der Abbildung fällt auf, dass sich viele der positiv geladenen AS an der leicht nach außen gewölbten Seite des Proteins befinden (vgl. Abbildung 26 A & D). Dagegen sind viele der negativ geladenen AS-Reste in der Nähe der von dem Protein gebildeten Tasche lokalisiert (vgl. Abbildung 26 B & C). Dies zeigt sich vor allem in Abbildung 26 D. Auf Grund der Ladungsverteilung ist es denkbar, dass sich das Protein mit der gewölbten, positiv geladenen Seite an die Bentonit-Lamellen, die als Kationenaustauscher fungieren, anlagern könnte. Da die negativen Ladungen vorwiegend im inneren Bereich der Tasche lokalisiert sind, könnte es sein, dass die abstoßenden Kräfte der

Ladungen von Bentonit und der Tasche nicht ausgeprägt genug sind um eine stabile Anlagerung des Proteins zu verhindern. Des Weiteren handelt es sich bei der  $\beta$ -Glucosidase um ein sehr flexibles Protein, das im Gegensatz zu den meisten anderen Traubenproteinen keine stabilisierenden Disulfidbrücken ausbilden kann. Auch diese Flexibilität ist vorteilhaft für das Eindringen des Proteins zwischen die Lamellen des Bentonits.

Die Oberflächenladungsverteilung der  $\beta$ -Glucosidase und ihre hohe Flexibilität begünstigen die besondere Adsorbierbarkeit durch das Bentonit.

In diesem Zusammenhang wird die Beschaffenheit der Bentonite näher betrachtet, da diese aufgrund der molekularen Zusammensetzung in ihrer Wirksamkeit durch viele Faktoren beeinflusst werden.

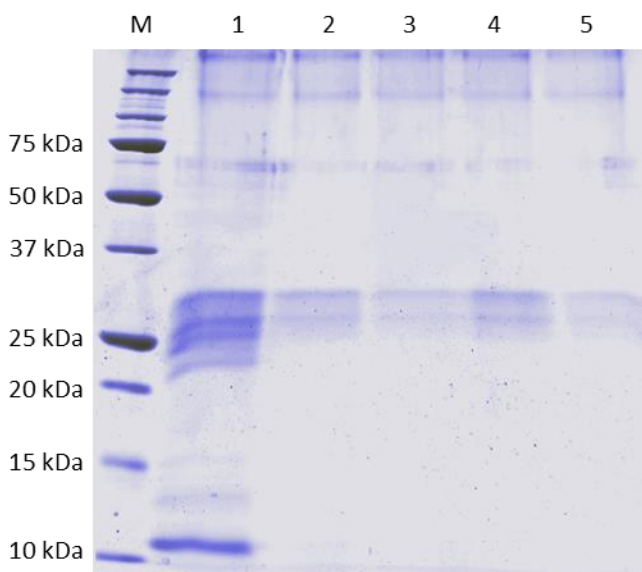
#### 4.5.2 Untersuchung verschiedener Bentonite

Bentonit besteht zum überwiegenden Teil aus Montmorillonit, einem stark quellfähigen Tonmineral, das bei der Quellung schichtförmige Hohlräume bildet. Dieses Mineral wirkt als unspezifischer Adsorber für positiv geladene Teilchen. Die meisten Weinproteine liegen im sauren pH-Wert des Weins (pH 3 - 4) positiv geladen vor [7]. Diese Eigenschaft begünstigt die Bindung an die negativ geladene Oberfläche der Bentonitpartikel. Der Nachteil des Bentonits ist, dass es unspezifisch auch Farb- und Aromastoffe aus dem Wein adsorbiert und somit die Qualität des Weins maßgeblich beeinflussen kann [182, 244]. Deshalb wird es insbesondere bei Rotweinen nicht gerne eingesetzt.

Es gibt verschiedene Typen von Bentonit. Dazu gehören die natürlich vorkommenden Natrium- oder Calcium-Bentonite sowie Mischbentonite. Aufgrund ihres besseren Quellvermögens sind  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Bentonite wirksamer als  $\text{Ca}^{2+}$ -Bentonite [188, 193], wobei die Wirksamkeit besonders bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bentonit mit der Senkung des pH-Wertes steigt. Im Folgenden werden vier verschiedene Bentonittypen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit miteinander verglichen:  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Mischbentonit,  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -Bentonit. Bei diesen Untersuchungen steht der Vergleich des Einflusses der verschiedenen Bentonite auf die Proteinzusammensetzung eines einheimischen Rotweines im Fokus, da nur wenige Untersuchungen zu diesem Thema vorliegen. Außerdem ist besonders bei Rotwein auch die Frage nach der Entfernung der LTPs als potentielle Traubenallergene von Interesse (vgl. 4.1 & 4.2). Vorwiegend wird die Bentonitschönung jedoch bei Weiß- und Roséweinen eingesetzt. Die bekannte Literatur zur Rotweinschönung betrachtet dagegen vorwiegend den Einfluss auf die Farb- und Aromastoffe [181, 245]; der Einfluss auf die Proteine wird nur beiläufig in diesem Zusammenhang erwähnt [246].

Für die Versuche wurde ein Dornfelder Wein aus dem Jahr 2009 (Weingut der Stadt Mainz, Rheinhessen) sowie ein Dornfelder Most aus dem Folgejahr verwendet. Die zu untersuchenden Bentonite wurden vom Weingut Gres (Appenheim, Rheinhessen) zur Verfügung gestellt (Calcium-Bentonit, SIHA Bentonit G, Eaton Technologies GmbH, Langenlonsheim; Natrium-Bentonit, Plusgran® V, Enologica Vason S.p.A., Verona, Italien; Natrium-Calcium-Bentonit, Na-Calit, Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim; Kalium-Bentonit, Plusgran Juice K, Enologica Vason S.p.A., Verona, Italien). Die Proben wurden mit 50 g/hl Bentonit behandelt und anschließend für die weiteren Analysen aufbereitet (vgl. 3.2, 3.3, 3.4).

Zur besseren Übersicht wurden diese Behandlungen mit der entsprechenden Kontrolle in einer SDS-PAGE aufgetragen und in Abbildung 27 dargestellt. Vorwiegend wurden die Proteine in einem Molekulargewichtsbereich von 10 - 12 kDa und im Bereich von 20 - 30 kDa reduziert. Bei diesen Größen werden Proteine wie das LTP (ca. 11 kDa) und auch die potentiell trübungsrelevanten Proteine wie die TLPs und Chitinasen vermutet [48, 231]. Vor allem im Molekulargewichtsbereich von 20 - 30 kDa kann man die Unterschiede der Bentonitbehandlungen im Vergleich zu der unbehandelten Weinprobe erkennen. Abbildung 27 zeigt, dass die Intensitäten der Proteinbanden bei Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Bentonit nur noch schwach ausgeprägt sind, gefolgt von der Behandlung mit Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Mischbentonit. Am intensivsten lassen sich noch die Banden bei der Behandlung mit Ca<sup>2+</sup>-Bentonit erkennen. Auffällig ist, dass gerade die Banden am oberen Bereich der Gele kaum durch die Bentonitbehandlung beeinflusst werden. Hierbei handelt es sich um Glykoproteine, die dafür bekannt sind, dass sie die Entstehung von Trübungen reduzieren können [39, 62].



**Abbildung 27: Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Bentonite im Dornfelder Rotwein.** Die Konzentration der Bentonite betrug je 50 g/hl. 1: unbehandelter Rotwein; 2: Behandlung mit Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Bentonit; 3: Behandlung mit Na<sup>+</sup>-Bentonit; 4: Behandlung mit Ca<sup>2+</sup>-Bentonit; 5: Behandlung mit K<sup>+</sup>-Bentonit; 12,5 % SDS-Gel. Coomassie-Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard. (von mir mitbetreute Bachelorarbeit von Isabell Piroth, 2012)



Zusätzlich zu der Betrachtung in dem Gel wurde die Proteinkonzentration bestimmt (vgl. 3.1). K-Bentonit reduziert die Proteinkonzentration um ca. 40 % (Kontrolle:  $88,9 \pm 5,0$  mg/l, K<sup>+</sup>-Bentonit:  $53,4 \pm 5,4$  mg/l, n=3 Messungen) während bei den anderen Bentoniten eine Reduktion um ca. 30 % zu beobachten ist (Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Bentonit:  $66,5 \pm 5,0$  mg/l; Na<sup>+</sup>-Bentonit:  $67,6 \pm 2,9$  mg/l; Ca<sup>2+</sup>-Bentonit:  $64,4 \pm 3,4$  mg/l, n=3 Messungen).

Bei dieser Untersuchung war die Betrachtung der Kationenaustauschkapazität der Bentonite von Interesse, da man über diese eine definierte Größe zum besseren Vergleich der Bentonite erhält. Die Kationenaustauschkapazität lässt sich mit dem Halo-Test über die relative Oberfläche des eingesetzten Adsorbers Methylenblau bestimmen (vgl. 3.18). Dadurch ließ sich unter standardisierten Bedingungen die austauschfähige Oberfläche der Tonmineralien ermitteln und miteinander vergleichen. Bei diesen Untersuchungen wies Ca<sup>2+</sup>-Bentonit die geringste Oberfläche mit  $415 \text{ m}^2/\text{g}$  auf, während bei der gleichen Menge Na<sup>+</sup>-Bentonit die 2,5-fache Oberfläche ( $997 \text{ m}^2/\text{g}$ ) ermittelt wurde, gefolgt von K<sup>+</sup>-Bentonit (1,4-fache Oberfläche,  $586 \text{ m}^2/\text{g}$ ) und Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Mischbentonit (1,2-fache Oberfläche,  $511 \text{ m}^2/\text{g}$ ).

Bei diesem Test wurde für Ca<sup>2+</sup>-Bentonit die kleinste austauschfähige Oberfläche ermittelt. Dies bestätigt, dass es sich bei Ca<sup>2+</sup>-Bentonit um einen weniger effektiven Adsorber handelt als bei den übrigen getesteten Mineralen. Im Gegensatz dazu müsste Na<sup>+</sup>-Bentonit, aufgrund der sehr großen austauschfähigen Oberfläche die beste Wirksamkeit aufzuweisen. Allerdings sollte hier berücksichtigt werden, dass verschiedene Faktoren, wie Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke, die Quellfähigkeit und somit auch die mögliche Kationenaustauschkapazität der Bentonite beeinflussen [191]. Gerade bei Ca<sup>2+</sup>-Bentonit wird die Wirksamkeit durch den pH-Wert beeinflusst und kann durch eine Erniedrigung des pH-Wertes unter 3,5 zur Effektivitätssteigerung führen [193].

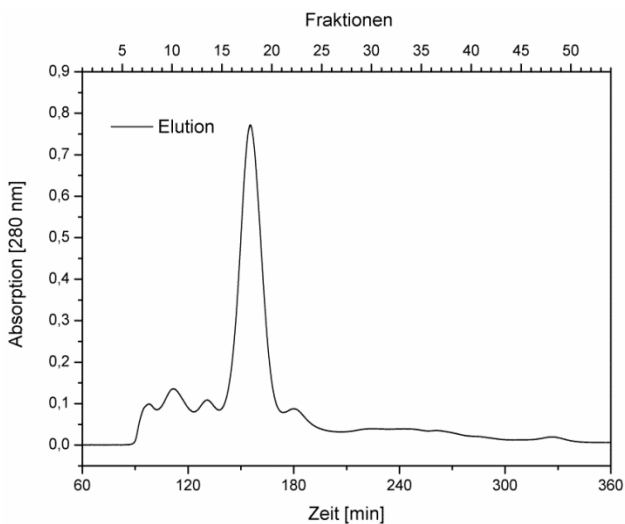
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Glykoproteine kaum durch die Bentonitbehandlung aus dem Wein entfernt wurden. Hier wurden vor allem die zur Diskussion stehenden Proteine der Trubbildung sowie das potentielle Allergen LTP entfernt. Diese Wirkung könnte durch eine Erniedrigung des pH-Wertes des Weines noch verbessert werden (Daten hier nicht dargestellt). Bei diesen Untersuchungen erwiesen sich besonders die hierzulande nicht zugelassenen Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Bentonite als sehr effektiv bei der Reduzierung des Proteingehalts. Der Einfluss des Bentonits auf die Farbe und den Geschmack bei diesem Rotwein müsste ergänzend untersucht werden.

Auszüge dieses Kapitels werden im Deutschen Weinbaujahrbuch 2016 publiziert [247].

## 4.6 Aufreinigung trübungsrelevanter Weinproteine

Verschiedene Proteine sind an der Entstehung von Trübung im Wein beteiligt. Dabei scheinen vor allem die TLPs eine große Rolle zu spielen. Und zwar nicht zuletzt da sie mit den Chitinasen den größten Anteil an Proteinen im Wein einnehmen [167]. Für die Charakterisierung dieser Proteine werden davon erhebliche Mengen benötigt, darum wurden die folgenden Versuche mit einem Modellwein von der Hochschule Geisenheim durchgeführt. Hierbei handelt es sich um das Lyophilisat eines Weines der Rebsorte Auxerrois. Diese Probe wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit von Daniela Endt (2009) an der Forschungsanstalt Geisenheim isoliert und untersucht. Im Folgenden wird diese Probe als Basis für die Proteinaufreinigung und weitere Untersuchungen zur Trubentstehung verwendet, da sie in ausreichenden Mengen zur Verfügung stand.

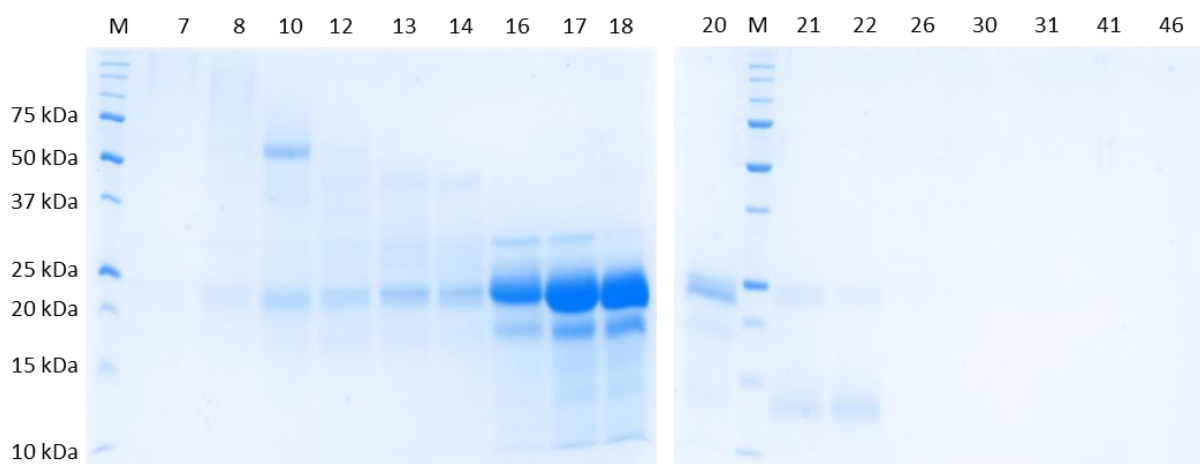
Das Ziel der Proteinaufreinigung sollte sein, verschiedene TLPs aus diesem Lyophilisat zu isolieren. Dazu wurden verschiedene chromatographische Trennprinzipien angewendet. In einem ersten Schritt wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt, um die enthaltenen Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. In Abbildung 28 ist das Elutionsprofil des Modellweinyophilisats dargestellt (vgl. 3.10.1). Hier wurden 25 mg des Lyophilisats (720 mg/l wurden extrahiert [207]) in Phosphatpuffer gelöst und auf die Säule aufgetragen.



**Abbildung 28: Elutionsprofil nach Größenausschlusschromatographie des Modellweinsystems als Basis für die Aufreinigung verschiedener Weinproteine.** Die Elution erfolgte mit einem 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 über die Sephacryl S-200 XK 16/60 Säule. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min (vgl. 3.10.1 & Tabelle 15).

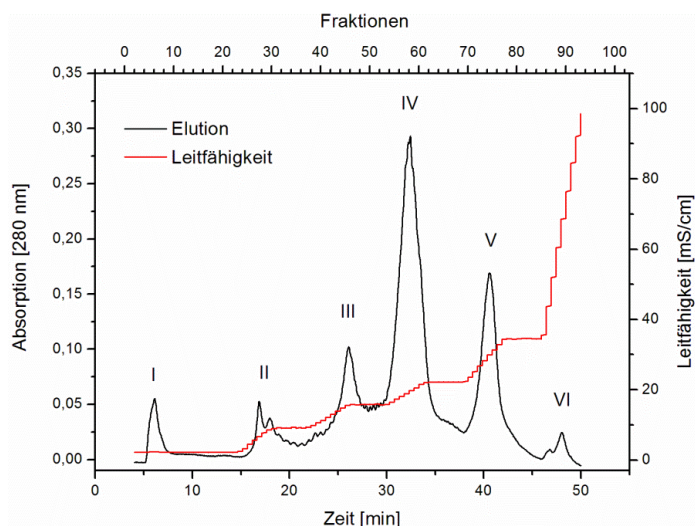
Einzelne Peaks wurden mittels SDS-PAGE näher untersucht (Abbildung 29). Es erfolgte eine Einteilung in einzelne Proteinklassen. Im ersten Peak eluieren die Glykoproteine, die erst durch eine Glykoproteinfärbung visualisiert wurden (Fraktionen 7 & 8, PAS-Färbung hier nicht dargestellt). Anschließend eluierte die Invertase (Fraktion 10) und in dem größten Peak

ab ca. 150 min. eluieren die meisten Proteine im Molekulargewichtsbereich von 20 - 25 kDa (Fraktionen 16 - 20), allerdings konnten diese auch in den vorherigen Fraktionen erkannt werden. In diesem Bereich befinden sich erfahrungsgemäß die TLPs und Chitinasen [48].



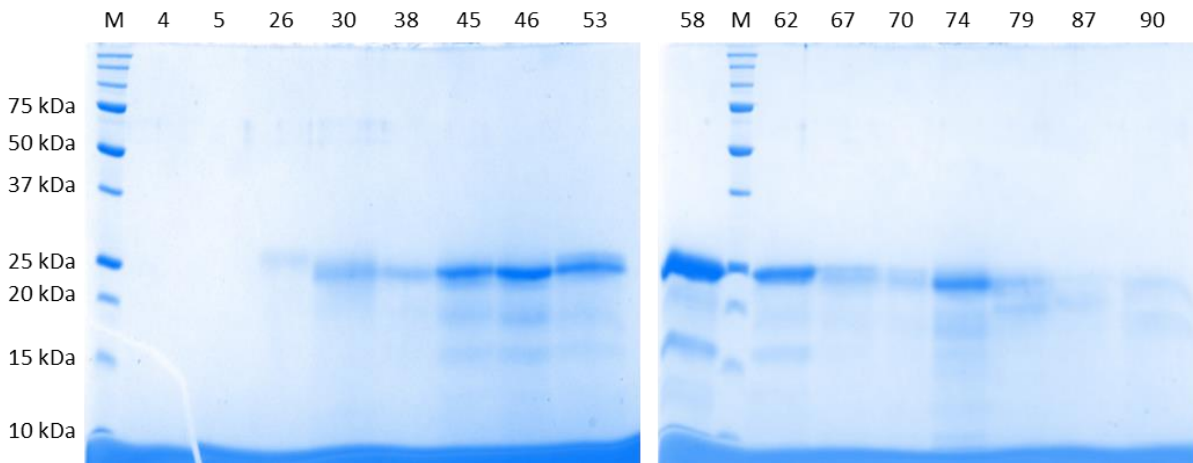
**Abbildung 29: SDS-PAGE einzelner Fraktionen nach dem SEC Lauf.** Die Proben sind entsprechend den Fraktionen aus Abbildung 28 benannt. 12,5 % SDS-Gele, Coomassie Färbung. M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad.

Da sich in diesen Fraktionen verschiedene Proteinbanden befanden, wurden weitere Aufreinigungsschritte angeschlossen. Dazu wurden die Fraktionen 16 - 20 zusammengefügt und aufkonzentriert (mittels Zentrifugalkonzentratoren, MWCO 10 kDa). Um diese Proteine mittels Kationenaustauschchromatographie auftrennen zu können, musste die Probe mit 0,1 M Citratpuffer pH 3 unter Verwendung von Zentrifugalkonzentratoren umgepuffert werden. Die Elution erfolgte mittels eines Hochsalzgradienten, der an diese Probe des SEC-Laufs angepasst wurde (Abbildung 30, vgl. Tabelle 17).



**Abbildung 30: Aufreinigung der aufkonzentrierten Fraktionen 16 - 20 des SEC-Laufs (Abbildung 28) mittels Kationenaustauschchromatographie (UNO S-1 Säule).** Die Elution erfolgte mit einem 0,1 M Citratpuffer pH 3 und 1 M NaCl. Die Flussrate betrug 1 ml/min (vgl. 3.10.2 & Tabelle 17).

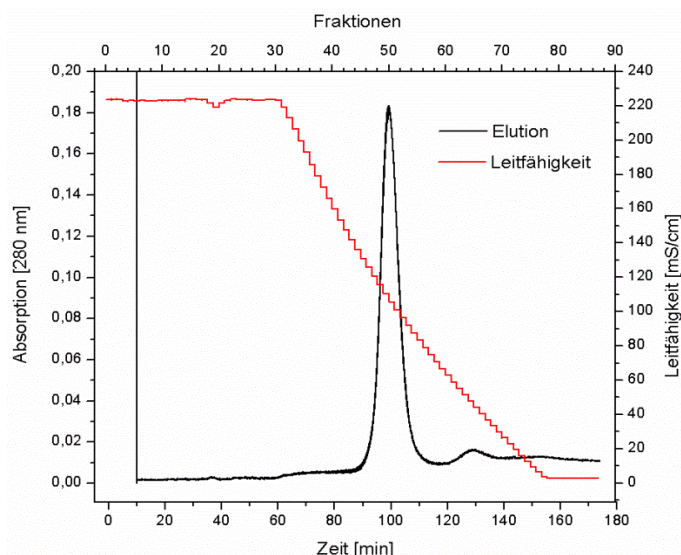
Bei dieser Trennmethode eluieren die Proteine mit ansteigender Kationenkonzentration. In Peak I (Fraktionen 3 – 6) eluierten Bestandteile, die nicht an die Säule gebunden haben. Mit Beginn des Salzgradienten eluierten fünf Peaks (Abbildung 30, Peaks II - VI), dabei wiesen der Peak II und VI neben dem eigentlichen Hauptpeak Schultern auf. Auch in diesem Fall wurden die interessanten Fraktionen des Elutionsprofils mittels einer SDS-PAGE näher betrachtet (Abbildung 31).



**Abbildung 31: SDS-PAGE einzelner Fraktionen nach der Kationenaustauschchromatographie.** Die Proben sind entsprechend den Fraktionen aus Abbildung 30 benannt. 12,5 % SDS-Gele, Coomassie Färbung. M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad.

In fast allen aufgetragenen Fraktionen sind Proteine im Molekulargewichtsbereich von 15 - 25 kDa nachweisbar. In den Fraktionen 4 und 5 (Peak I) sind mit dieser Färbung keine Proteine zu erkennen, hier könnten auch kleinere Peptide ein Grund für die Absorption im Elutionsprofil sein. In den übrigen Fraktionen sind, wenn auch zum Teil eher schwach, mehrere Banden zu erkennen. Daher wurde eine weitere Methode zur Proteinaufreinigung angeschlossen, um die bereits nach ihren Ladungseigenschaften aufgetrennten Proteine noch nach ihrer Hydrophobizität zu trennen.

Dazu wurden Peak III (Fraktionen 44 - 52), IV (Fraktionen 53 - 63) und Peak V (Fraktionen 72 – 76) separat aufkonzentriert. Zur weiteren chromatographischen Untersuchung wurde die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) durchgeführt. Um die Proben mittels HIC aufzutrennen, wurden diese mit einem Citratpuffer pH 4 mit 1,25 M Ammoniumsulfat unter Verwendung von Zentrifugalkonzentratoren umgepuffert. Dadurch wurde ein Großteil der Hydrathülle verdrängt und die Proteine konnten an die Säule binden. Am Beispiel des Peaks IV der Kationenaustauschchromatographie ist exemplarisch das entsprechende Elutionsprofil dargestellt (Abbildung 32). Man erkennt einen großen Peak (nach ca. 90 min) gefolgt von einem weitaus kleineren Peak (nach ca. 125 min). Beide eluierten erst nach einer Abnahme der Salzkonzentration um ca. 45 % von der Säule.



**Abbildung 32: Elution der konzentrierten Fraktionen 53 – 63 der Kationenaustauschchromatographie (Peak IV, Abbildung 30) mittels Hydrophober Interaktionschromatographie.** Als Gelmatrix wurde Phenylsepharose eingesetzt. Die Elution erfolgte mit einem 0,05 M Citratpuffer pH 4 und 1,25 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ . Die Flussrate betrug 2 ml/min (vgl. 3.10.3 & Tabelle 18).

Diese so isolierten Proteine wurden nach den Aufreinigungen aufkonzentriert und umgepuffert, zur Entfernung der hohen Salzkonzentrationen aus den Lösungen. Zur Identifizierung, um welche Proteine bzw. um welche TLP-Isoformen es sich im Einzelnen handeln könnte, werden Proben dieser Proteine zur massenspektrometrischen Analyse gegeben. Die Ergebnisse dieser Analyse konnten nicht mehr berücksichtigt werden.

Die so isolierten Proteine können für die Untersuchungen der Trübung gezielt eingesetzt werden.

#### 4.7 Versuche zur Stabilität von Wein

Im Rahmen des Forschungsprojektes AiF 17338N sollen die Ursachen der Trubentstehung sowie die dabei involvierten Komponenten untersucht werden. Hier ist es von Interesse einzelne Weinkomponenten hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens zu untersuchen. Speziell in diesem Fall wurde die Wechselwirkung eines Modellweins mit verschiedenen Polysacchariden untersucht. Neben Hitzestabilitätstests (durchgeführt bei 80 °C für 3 h an der Hochschule Geisenheim durch Frau Miriam Meier) wurden weiterführende Versuche zur Verfolgung des temperaturabhängigen Aggregationsverhaltens mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) durchgeführt. Das Denaturierungsverhalten der Komponenten im Modellweinsystem wurde mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) näher betrachtet. Im Fokus der Untersuchungen standen die im Wein enthaltenen Proteine und deren Wechselwirkungen mit der Umgebung.

Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden mit verschiedenen Lösungen durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden die zu untersuchenden Komponenten in einem 0,1 M Citratpuffer pH 3,5 gelöst. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die zu beobachteten Ergebnisse auf den Wechselwirkungen der Proteine mit den zugefügten Polysacchariden zurückzuführen sind. In einem späteren Schritt wurden diese Versuche mit einer Echtweidlösung (Rieslingpermeat, cutoff <10 kDa, pH 3,5) wiederholt. Bei diesen Versuchen konnte zusätzlich der Einfluss der Polyphenole in der Weidlösung berücksichtigt werden. Zur Untersuchung der Stabilität wurden dem wieder aufgelösten Weidlyophilisat verschiedene Polysaccharide (Carboxymethylcellulose, Gummi arabicum, Arabinogalactan, Rhamnogalacturonan) zugefügt, die unter anderem für die Metallstabilisierung oder auch Weidsteinstabilisierung bereits Anwendung finden [11, 34]. Hier wurde das bereits näher analysierte Auxerroislyophilisat als Modellsystem eingesetzt (vgl. 4.6).

#### **4.7.1 Einfluss von Polysacchariden auf die Trübung im Puffersystem**

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte die Wirkung von vier verschiedenen Polysacchariden auf die Weidtrübung untersucht werden. Zwei dieser Polysaccharide sind natürliche Bestandteile der Weidbeere und somit auch im Weid enthalten. Diese beiden, das Arabinogalactan und die Rhamnogalacturonane gehören zu den Hauptbestandteile der Polysaccharide im Weid, neben den Mannoproteinen [29, 32]. Die beiden anderen Polysaccharide, Carboxymethylcellulose (CMC) und Gummi arabicum, sind auch als Lebensmittelzusatzstoffe bekannt. Sie werden bei der Stabilisierung von Kupfer- oder Eisentrübung, Weidsteinausfall, Gerbstoffausflockung und zu Verbesserung des Geschmacks und Mundgefühls eingesetzt [34, 40, 46].

#### **Ergebnisse der Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung zur Betrachtung des temperaturabhängigen Aggregationsverhaltens von Weidproteinen**

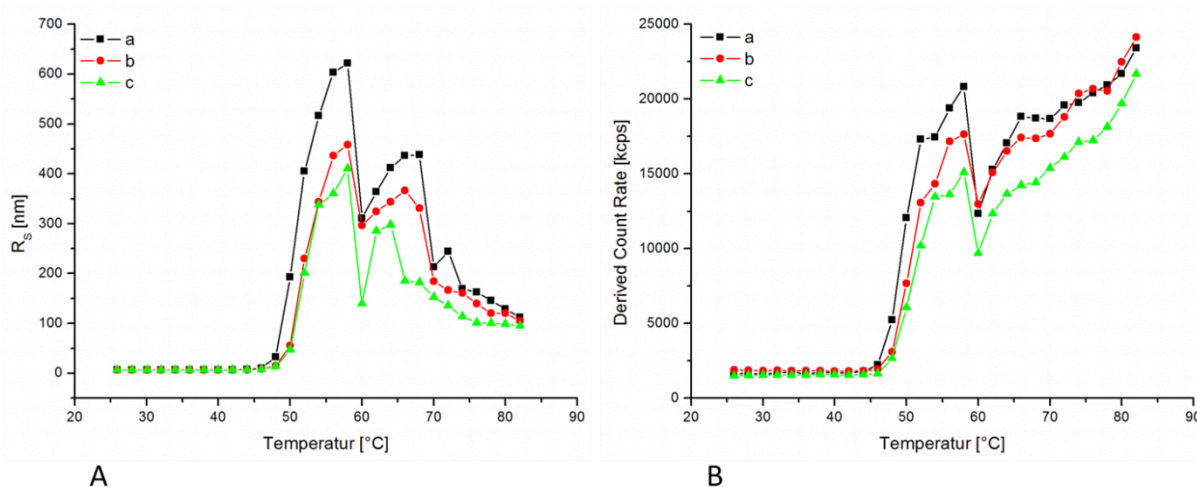
Zur Untersuchung der temperaturabhängigen Aggregation der Auxerroisproteine als Modellsystem wurden Trendmessungen mit der dynamischen Lichtstreuung (DLS) durchgeführt (vgl. 3.17). Mit der DLS ist es möglich, den hydrodynamischen Radius von Molekülen zu beobachten. Da die zu beobachtende Lösung polydispers ist, wird nur die relative Änderung der Teilchengröße verfolgt, die man im Vergleich zu den verschiedenen Versuchsansätzen betrachtet. Was diese Methode zusätzlich auszeichnet, ist die Möglichkeit, die Probe während der Messung zu erhitzen und so die Veränderung der Teilchengröße in einem Temperaturgradienten zu beobachten.

Die bei dieser Methode benötigte Proteinkonzentration betrug 1 mg/ml. Pro Messung wurden 100  $\mu$ l eingesetzt. Durch das für die DLS große Probenvolumen kann die Verdunstung von ca. 5 % während der Temperaturerhöhung ausgeglichen und mögliche Messfehler vermieden werden. Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt, da die Messwerte sehr schwankten und zum Teil auch sehr stark voneinander abwichen. Die Ansätze wurden entsprechend Tabelle 13 pipettiert. Alle verwendeten Lösungen wurden in 0,1 M Citratpuffer pH 3,5 gelöst.

**Tabelle 13: Pipettierschema zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens der Auxerroisproteine.** Für alle Versuche wurde eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Die Stammlösung aus dem Weinlyophilisat (34 mg/ml) enthielt eine Gesamtproteinkonzentration von 2 mg/ml.

Verhältnis Lyophilisat zu Polysaccharid	34 mg/ml Weinlyophilisat [ $\mu$ l]	34 mg/ml Polysaccharid [ $\mu$ l]	Puffer [ $\mu$ l]	Endvolumen [ $\mu$ l]
1:0	500	0 (0 mg/ml)	500	1000
1:0,25	500	125 (4,25 mg/ml)	375	1000
1:0,5	500	250 (8,5 mg/ml)	250	1000
1:0,75	500	375 (12,75 mg/ml)	125	1000
1:1	500	500 (17 mg/ml)	0	1000

Die Messungen wurden von 26 °C bis 82 °C in 2 °C Schritten durchgeführt. Bei jeder Temperaturstufe äquilibrierte die Probe für 3 min vor der Messung. Nach dem obigen Pipettierschema wurden die vier Polysaccharide sowie der Modellwein ohne weitere Zusätze getestet (Tabelle 13). An den Messungen des Modellweines ohne Zusätze ist dies exemplarisch dargestellt (Abbildung 33).



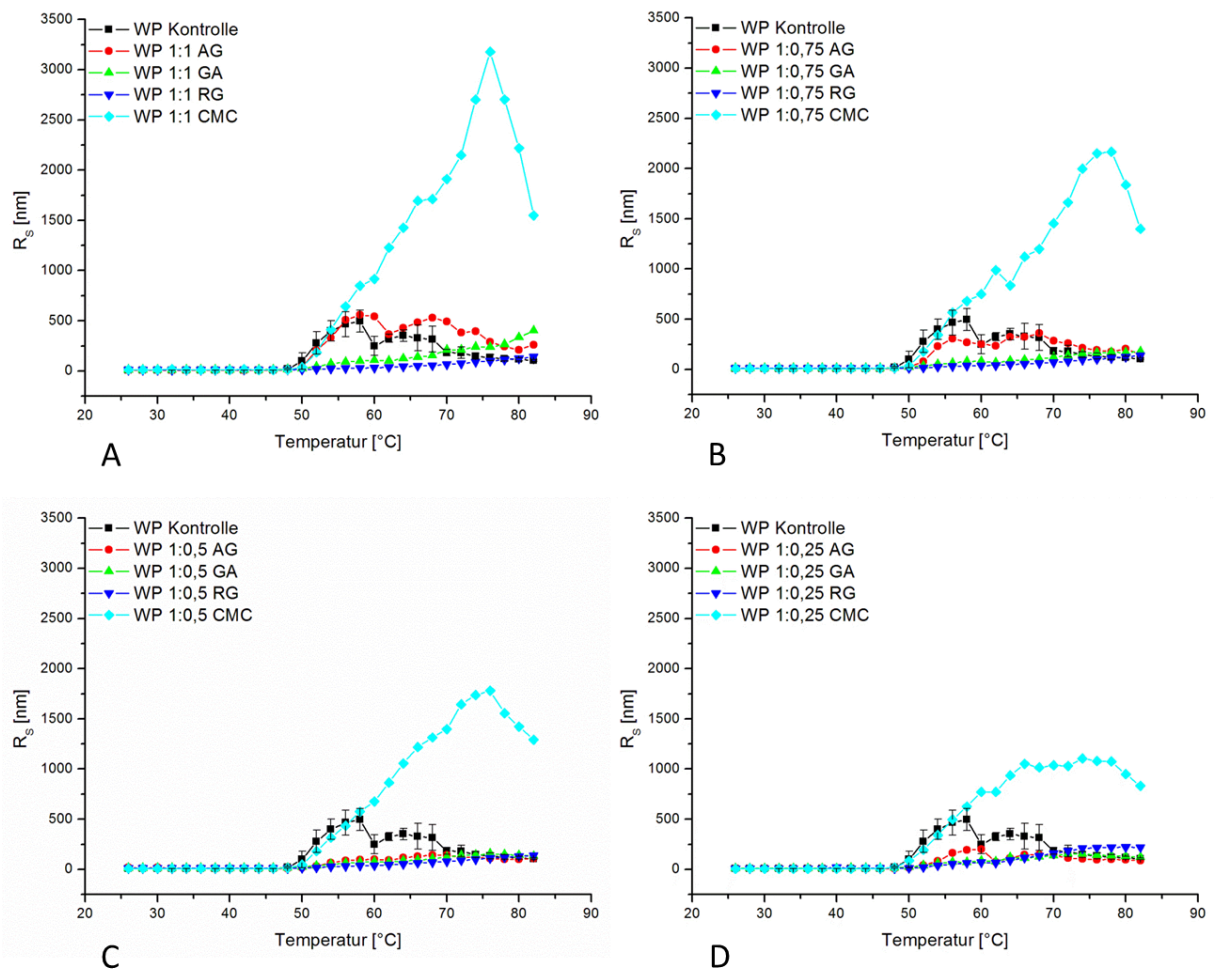
**Abbildung 33: DLS Messungen der Auxerroisproteine ohne weitere Zusätze.** Die Mittelwerte dieser Messung dienten als Kontrolle für alle weiteren Messungen (vgl. 3.17). A: Auftragung des hydrodynamischen Radius  $R_s$  der gemessenen Probe; B: Auftragung der Derived Count Rate zur Überprüfung der Qualität der Messergebnisse. Die Messungen wurden dreimal wiederholt ( $\rightarrow$  a, b, c).

In der Abbildung 33 ist zum einen die Änderung des hydrodynamischen Radius  $R_S$  (A) und die der Derived Count Rate (B) bei der Temperaturerhöhung dargestellt. Während der hydrodynamische Radius von der Software des Zetasizers nach der Stokes-Einstein-Gleichung berechnet wird, gibt die Derived Count Rate die Anzahl der gemessenen Photonen pro Sekunde an (vgl. 3.17). Dadurch lässt sich die Stabilität der Probe während der Messung verfolgen. Hier gilt, je größer die Partikel im Messbereich sind, desto mehr Photonen können detektiert werden. In beiden Graphen dieser Abbildung ist ein Anstieg der Messwerte ab einer Temperatur von ca. 48 °C bis zu einem Maximum bei 58 °C (ca.  $R_S = 496,8 \pm 110,8$  nm;  $n=3$ ) zu beobachten. Bei den Messungen des hydrodynamischen Radius folg darauf ein Abfall der Radien, die allerdings noch weit über den Werten für die anfängliche Messung liegen (bei 26 °C ca.  $R_S = 6,6 \pm 0,3$  nm; bei 82 °C ca.  $R_S = 103 \pm 8,6$  nm;  $n=3$ ). Die Daten der Derived Count Rate steigen dagegen weiter an, wobei hier auch ein Einbruch der Daten bei ca. 60 °C zu sehen ist, ebenso wie bei den Messungen des Radius. Aus dem Verlauf der Derived Count Rate lässt sich schließen, dass die gemessenen Partikel nicht sedimentierten (kein Abfall der Messdaten bei hohen Temperaturen, wie bei den Daten zu  $R_S$ ), allerdings müssen sich bei diesen hohen Temperaturen vermehrt kleinere Partikel gebildet haben, wodurch der Anstieg der Rate zu erklären wäre. Dies zeigte sich auch bei den weiteren Messungen, weshalb bei den nachfolgenden Ergebnissen darauf verzichtet wurde die Derived Count Rate anzugeben.

Die Messungen wurden dreimal durchgeführt. Dadurch wurden starke Schwankungen zwischen den Messungen deutlich. Daher wurden in den weiteren Ergebnissen die Mittelwerte der Messpunkte aufgetragen und die Standardabweichung exemplarisch nur bei der Kontrollmessung angegeben (Abbildung 34). Dadurch soll die Variabilität der Werte veranschaulicht werden. Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit wurde darauf verzichtet diese auch bei den anderen Kurven einzuzeichnen.

Anhand der Standardabweichungen ist zu sehen, dass die Werte erst ab einer Temperatur von ca. 50 °C stark schwankten. Das Gleiche war auch bei den Daten der Derived Count Rate zu beobachten. Bei dieser Temperatur wurde der Beginn der Aggregation vermutet. Da diese Methode bei den Berechnungen der Partikelgröße von idealen, kugelförmigen Partikeln ausgeht, ist es möglich, dass besonders bei den ungeordneten Partikeln der Aggregate die Daten dazu stark schwanken. Für die Verfolgung der temperaturabhängigen Aggregation wird sich vorwiegend auf den Beginn der Aggregation bezogen.



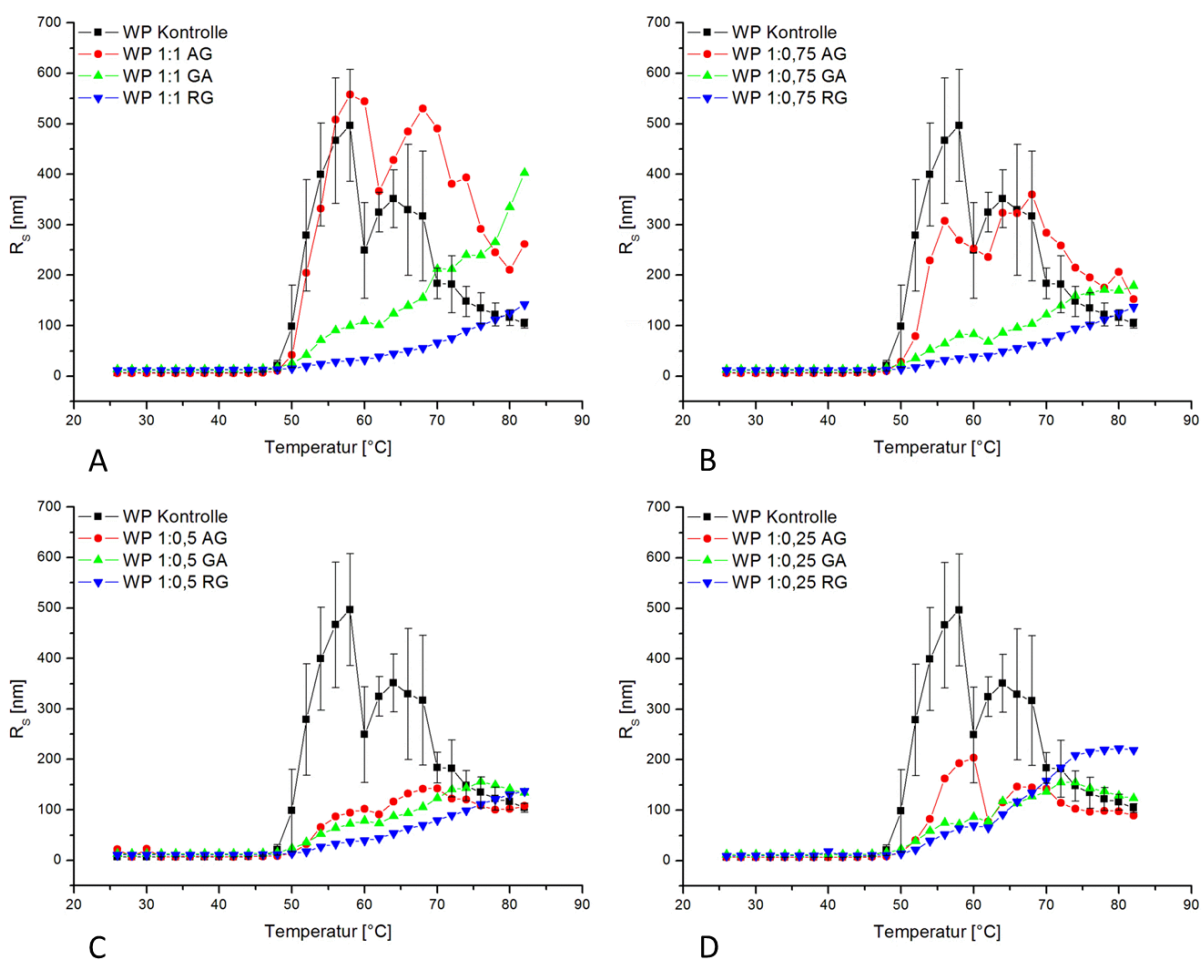


**Abbildung 34: Zusammenfassende Ergebnisse der DLS Messungen zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens der Modellweinsteinproteine mit verschiedenen Polysacchariden bei vier verschiedenen Konzentrationsverhältnissen.** Zur Vergleichbarkeit wurde eine einheitliche Achsenskalierung gewählt und pro Diagramm das entsprechende Verhältnis von Modellweinstyophilisat zu dem entsprechenden Polysaccharid aufgetragen. A: Verhältnis 1:1; B: Verhältnis 1:0,75; C: Verhältnis 1:0,5; D: Verhältnis 1:0,25. In jeder Graphik wurde zusätzlich als Kontrolle die Messung der Modellproteine ohne Polysaccharide mit aufgetragen. schwarz: Modellweinsteinproteine (WP) & Standardabweichung; rot: Zusatz von Arabinogalactan (AG); grün: Zusatz von Gummi arabicum (GA); blau: Zusatz von Rhamnogalacturonan (RG); hellblau: Zusatz von Carboxymethylcellulose (CMC).

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der temperaturabhängigen Aggregation unter Einfluss verschiedener Polysaccharide dargestellt. Es folgt eine phänomenologische Betrachtung der Ergebnisse, die auch mit weiteren Versuchen, wie dem Stabilitätstest (durchgeführt an der Hochschule Geisenheim durch Frau Miriam Meier) bestätigt werden müssen.

Generell zeigen die Ergebnisse bei allen untersuchten Bedingungen einen Anstieg der Aggregation bei ca. 48 °C wie auch bei der Kontrolle bereits beobachtet wurde (Abbildung 34). Die Messungen mit dem Polysaccharid Carboxymethylcellulose (CMC) wiesen bei allen getesteten Verhältnissen von Lyophilisat zu Polysaccharid, die stärksten Abweichungen von der Kontrolle ab einer Temperatur von 58 °C auf. Ab dieser Temperatur liegen die bestimmten Radien weit über denen der Kontrolle (Abbildung 34, CMC: hellblaue Messkurven; Kontrolle: schwarze Messkurven). In Abbildung 35 ist ein vergrößerter

Ausschnitt der Messungen dargestellt, um auch die Ergebnisse der anderen Messreihen besser erkennen zu können. Hier zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle, dass der Zusatz von Rhamnogalacturonan und Gummi arabicum den Anstieg der ermittelten Radien bereits ab 48 °C merklich reduzierte (Abbildung 35, blaue und grüne Kurvenverläufe). Gerade bei der Betrachtung des maximalen Wertes der Kontrolle bei 58 °C von ca.  $R_S = 496,8 \pm 110,8$  nm weisen diese beiden Polysaccharide, selbst im höchsten Verhältnis zueinander eingesetzt (Abbildung 35 A) Werte von  $R_S = 99,6 \pm 43,7$  nm für Gummi arabicum und für Rhamnogalacturonan von  $R_S = 30,1 \pm 0,7$  nm auf. Bei Arabinogalactan konnte ebenfalls eine reduzierende Wirkung auf die Partikelgröße beobachtet werden, allerdings nur in geringeren Verhältnissen dem Weinlyophilisat zugesetzt (Abbildung 35 C,  $R_S = 94,5 \pm 54,4$  nm).



**Abbildung 35: Darstellung der DLS Messergebnisse ohne die Daten der CMC-Messreihe zur besseren Betrachtung des Einflusses der anderen Polysaccharide bei vier verschiedenen Konzentrationsverhältnissen.** Auch hier wurde zur Vergleichbarkeit eine einheitliche Achsenskalierung verwendet und pro Diagramm das entsprechende Verhältnis von Lyophilisat zu dem entsprechenden Polysaccharide aufgetragen. A: Verhältnis 1:1; B: Verhältnis 1:0,75; C: Verhältnis 1:0,5; D: Verhältnis 1:0,25. Zum besseren Vergleich wurde in jede Graphik die Messreihe des Modellweins ohne Zusätze als Kontrolle mit aufgetragen. schwarz: Modellweinproteine (WP) & Standardabweichung; rot: Zusatz von Arabinogalactan (AG); grün: Zusatz von Gummi arabicum (GA); blau: Zusatz von Rhamnogalacturonan (RG).

Aus den Daten kann geschlossen werden, dass die natürlicherweise in den Trauben vorkommenden Polysaccharide Arabinogalactan und Rhamnogalacturonan im Gegensatz zu CMC einen reduzierenden Einfluss auf die Größe der Aggregate haben. Bei den Messungen mit Arabinogalactan schienen bereits geringe Konzentrationen erheblich auf die Größe der Aggregate zu wirken. Erst mit höheren Konzentrationen nähern sich die Radien den Größenordnungen wieder der Kontrolle an (Abbildung 35 A & B). Rhamnogalacturonan weist hier auch den stärksten Einfluss auf, da bei allen Messreihen die Größe der Aggregate immer weit unter denen der Kontrolle liegt. Durch den Kontakt mit dem Rhamnogalacturonan wird eine Interaktion zwischen den Weinproteinen verhindert. Das Polysaccharid komplexiert mit den Proteinen über Wasserstoffbrückenbindungen, ummantelt diese und verhindert so deren vermehrte Aggregation [8, 248].

Ergänzend zu diesen Versuchen wurde ein Wärmetest von Frau Miriam Meier (Hochschule Geisenheim) durchgeführt. Dazu wurden die Proben bei verschiedenen Temperaturen (20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C) inkubiert. Hier betrug das gemessene Probenvolumen 20 ml und die Messungen wurden dreimal wiederholt. Jede Probe wurde bei der entsprechenden Temperatur eine Stunde inkubiert, dann 15 min wieder auf 20 °C temperiert und anschließend mit dem Nephelometer (Streulichtmessung, Winkel 90° bei 860 nm) gemessen. Bei diesen Messungen gelten Werte unterhalb von 2 FNU (Formazine Nephelometric Units, gemäß Norm ISO 7027 für Trübungsmessung im Streulichtverfahren bei 860 nm und 90°) als trübungsstabil. Bei den FNU Einheiten handelt es sich um standardisierte Referenzwerte, die durch Formazin als Eichsubstanz ermittelt werden. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass Rhamnogalacturonan den verwendeten Modellwein stabilisierte und die Messwerte die Grenze von 2 FNU nicht überschritten. Die Zugabe von CMC destabilisierte die Probe, da bereits bei 50 °C eine Trübung oberhalb der 2 FNU Grenze zu messen war. Bei den übrigen Proben war dies erst ab einer Temperatur von 70 °C der Fall (Daten von Frau Miriam Meier, Hochschule Geisenheim).

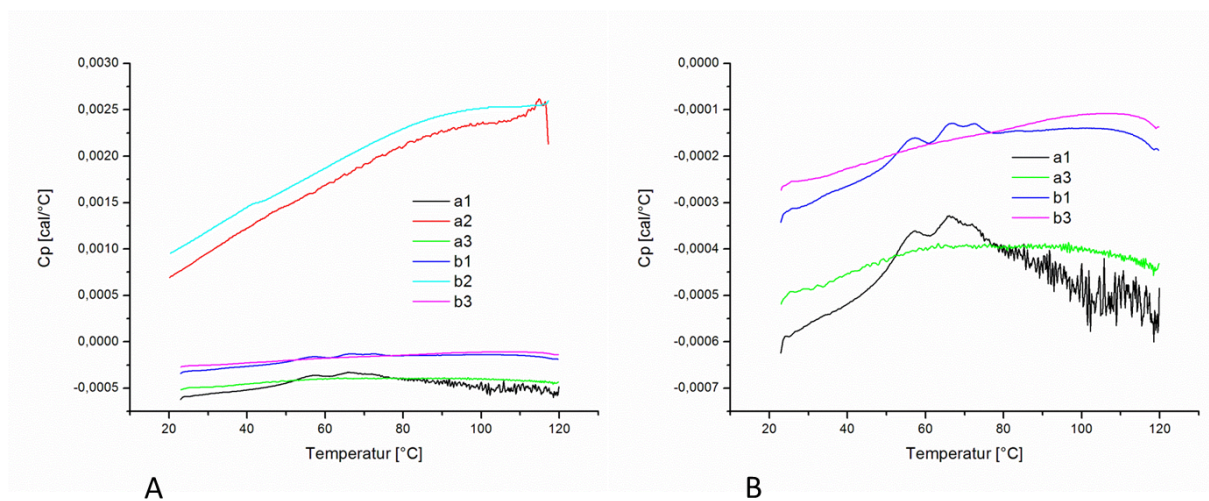
CMC schien in diesem System größere Aggregate zu erzeugen als es ohne diesen Zusatz möglich wäre. Man kann dies als Hinweis darauf deuten, dass dieser Zusatz zu starken Trübungen führt, die nur mit sehr hohen Mengen an Bentonit behoben werden können. Hinweise aus der Praxis bestätigen diese Beobachtungen [11, 34].

### **Ergebnisse der Messungen zur Schmelzpunkt Betrachtung der Gesamtweinproteine mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie**

Bei den DLS Ergebnissen konnten unterschiedliche Verhaltensweisen bei den Polysacchariden beobachtet werden (vgl. Abbildung 34). Hier sind die verstärkte Aggregation

durch die Zugabe von CMC sowie die Verminderung der Aggregatgröße durch Zugabe von Rhamnogalacturonan zu nennen. Daraus stellte sich die Frage, ob die Polysaccharide die Stabilität der Modellweinproteine beeinflussen. Um dies zu untersuchen wurden Messungen mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) durchgeführt. Durch Änderungen in der Wärmekapazität der zu untersuchenden Lösung lässt sich bei dieser Methode die Auffaltung von Proteinen bzw. deren Schmelztemperatur betrachten.

Für die Messungen wurde eine Gesamtproteinkonzentration von ca. 0,13 mg/ml benötigt, dies entspricht einer Lyophilisat-Einwaage von ca. 2 mg/ml. Alle Proben wurden in 0,1 M Citratpuffer pH 3,5 gelöst. Da es aus der Literatur Hinweise auf reversible Faltung einzelner Proteine nach Hitzeeinwirkung gibt [56], sind die hier beschriebenen Versuche ebenfalls auf ihre Reversibilität hin untersucht worden. Dazu wurden die Proben zunächst mittels DSC von 20 °C auf 120 °C erhitzt (gekennzeichnet mit 1), von 120 °C auf 20 °C gekühlt (gekennzeichnet mit 2) und erneut auf 120 °C erhitzt (gekennzeichnet mit 3). Alle Messreihen wurden mit einer Heizrate von 60 °C pro Stunde und in Doppelbestimmung durchgeführt. Im Folgenden ist exemplarisch für alle weiteren DSC Versuche am Beispiel des Modellweines ohne weitere Zusätze dieser Ablauf dargestellt (Abbildung 36).



**Abbildung 36: DSC Messung des Modellweines ohne weitere Zusätze.** Die Messung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt (Messung a & b). A: alle Messreihen; B: Vergrößerung der Messreihen 1 und 3. 1: Messung von 20 °C nach 120 °C; 2: Messung von 120 °C nach 20 °C; 3: Messung von 20 °C nach 120 °C;  $C_p$ : Wärmekapazität.

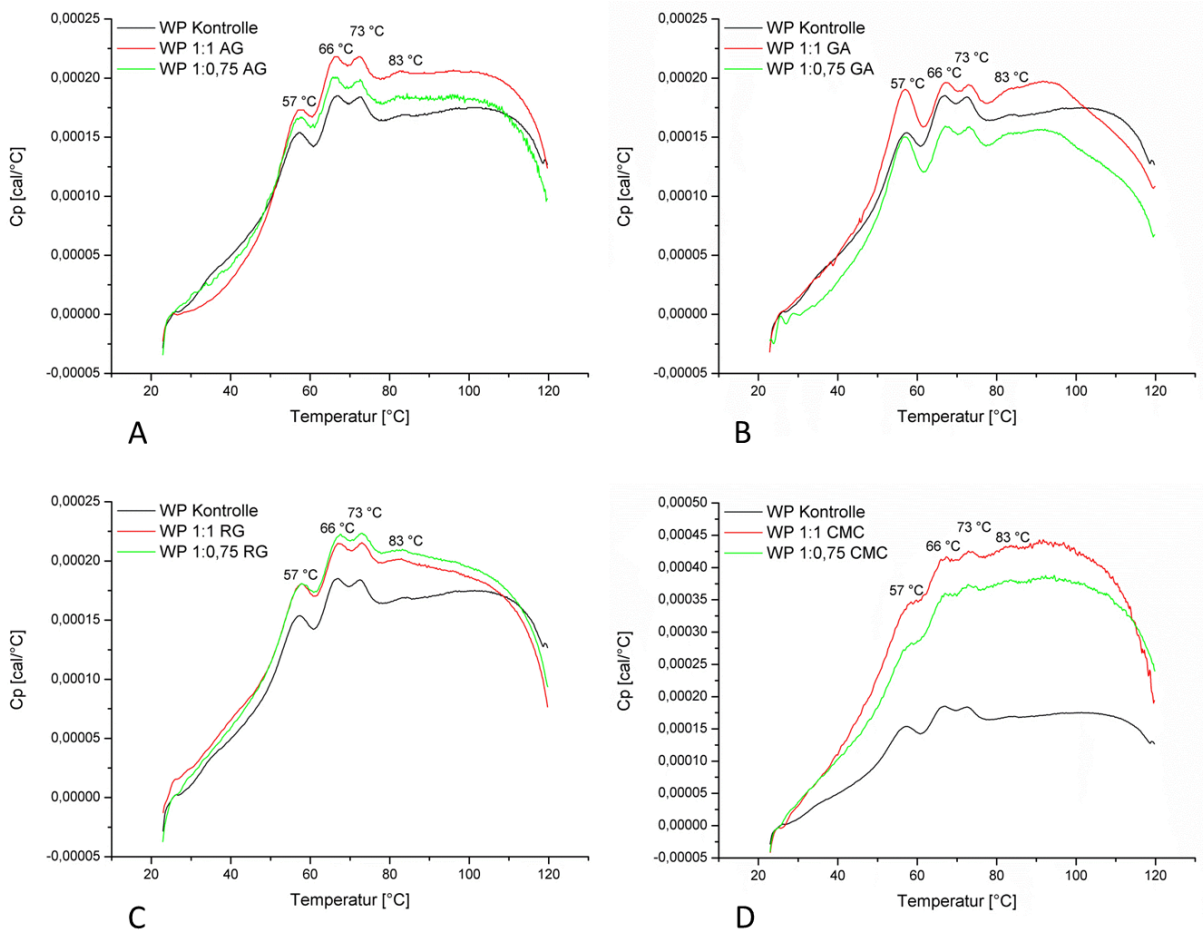
In der Abbildung 36 ist die Doppelbestimmung der Auxerrosproteine, die als Modellproteine dienen, mit den gemessenen Wärmekapazitäten aufgeführt. Bei diesen Messungen werden im Besonderen die Verläufe bei der Aufheizung der Probe betrachtet (Abbildung 36 a/b1, a/b3), da sich hierüber die Informationen über Schmelztemperaturen der Proteine und deren reversible Auffaltung treffen lassen. Bei den jeweiligen ersten Messungen (Abbildung 36 a/b1) sind Peaks bei 57 °C, 66 °C, 73 °C und 83 °C zu erkennen. Dies lässt sich am besten bei der Messung b1 beobachten (vgl. Abbildung 36 B). Bei der Messung a1 sind ab ca. 80 °C

starke Schwankungen im Verlauf der Wärmekapazität zu sehen. Hier muss hinzugefügt werden, dass dieses Verhalten bei jeder Messung beobachtet werden konnte, wenn das DSC Gerät über einige Tage ausgestellt war und zuvor kein Probelauf mit Aqua dest. durchgeführt wurde. Allein anhand dieser Daten kann keine Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Proteinen erfolgen, lediglich aus der Literatur könnte man Rückschlüsse ziehen um welche es sich handeln könnte. In diesem Zusammenhang ist beispielsweise bekannt, dass für die Invertase eine Denaturierungstemperatur von ca. 83 °C detektiert wurde [56]. Mit der ergänzenden Betrachtung der zweiten Aufheizrate (Abbildung 36 B a/b3) sollte die potentielle Reversibilität der Proteinauffaltung detektiert werden. Da bei diesem wiederholten Erhitzen der Proben keine Peaks im Verlauf der Wärmekapazität zu sehen sind, wird daraus geschlossen, dass die Auffaltung der Proteine in diesen Proben nicht reversibel ist. Aus diesem Grund wird bei der Darstellung der weiteren DSC Ergebnisse nur der erste Temperaturverlauf von 20 °C nach 120 °C aufgeführt.

Darauf aufbauend wurde betrachtet, ob die zugesetzten Polysaccharide die Auffaltungs- bzw. Denaturierungstemperaturen der Proteine des Versuchswines beeinflussen. Das jeweils zu untersuchende Polysaccharid wurde ebenfalls der Referenzzelle zugesetzt, so dass ausschließlich die Wirkung auf die enthaltenen Weinproteine beobachtet werden konnte. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der vier untersuchten Polysaccharide zusammengefasst. Auch in diesem Fall wurde von jeder Messung eine Doppelbestimmung angefertigt. Zur Darstellung und besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde jeweils ein Offset abgezogen, so dass eine einheitliche Darstellung ermöglicht wurde und die eigentliche Messung ab 20 °C bei einer relativen Wärmekapazität von Null begann. Bei allen Messreihen wurde als Kontrolle die Messung der Modellproteine ohne Zusätze mit aufgetragen.

Generell ist bei diesen Messungen zu sagen, dass die bereits beschriebenen vier Peaks bei 57 °C, 66 °C, 73 °C und 83 °C in allen Messungen zu erkennen sind. Dabei sind die ersten drei Peaks deutlich zu erkennen, während der vierte weniger ausgeprägt erscheint. Auch durch die Zusätze der Polysaccharide verändern sich die Temperaturmaxima nicht (Abbildung 37). Dies deutet darauf hin, dass die Zugabe der Polysaccharide die Denaturierung der Proteine nicht wesentlich beeinflusst.

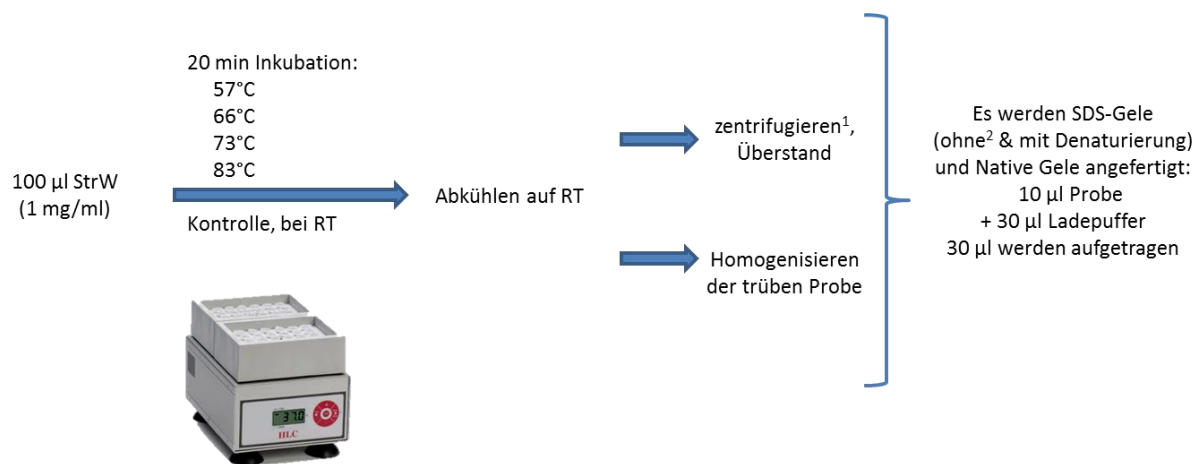
Die Messung mit CMC fällt am meisten ins Auge (Abbildung 37 D), da im Vergleich zur Kontrolle bereits der Anstieg der Messdaten viel steiler ausfällt. Auch die Spanne zwischen den gleichen Temperaturmaxima ist größer im Vergleich zu den Messungen mit den anderen Polysacchariden zu der Kontrolle. Dies deutet darauf hin, dass CMC einen stärkeren Einfluss auf die Wärmekapazität ausübt, als die übrigen Polysaccharide.



**Abbildung 37: DSC Messungen zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Polysaccharide auf die Denaturierungspunkte der Weinproteine.** Alle Ergebnisse sind im Vergleich zu der Messung der Modellweinproteine (WP) aufgetragen. Messungen: 0,13 mg/ml Gesamtprotein von 20 - 120 °C mit einer Heizrate von 60 °C/h. A: Messung mit Arabinogalactan (AG); B: Messung mit Gummi arabicum (GA); C: Messung mit Rhamnogalacturonan (RG); D: Messung mit Carboxymethylcellulose (CMC).

### Untersuchung der vier Denaturierungstemperaturen und der dabei entstehenden Aggregate

Bei der DSC Messung sind bei 57 °C, 66 °C, 73 °C und 83 °C Peaks entstanden. Da es sich bei der verwendeten Probe um ein Proteingemisch handelt, ist es nicht möglich eine eindeutige Aussage darüber zu treffen, welches Protein bei welcher Temperatur denaturierte. Um eine bessere Vorstellung zu bekommen, um welche Proteine es sich dabei handeln könnte, wird jeweils eine Probe des Modelllyophilisats bei der entsprechenden Temperatur für 20 min inkubiert und mittels PAGE, nativer und SDS-PAGE, näher untersucht. In Abbildung 38 ist schematisch die Versuchsdurchführung dargestellt. Es werden zwei Varianten der Proben betrachtet. Zum einen wird der Überstand der behandelten Probe betrachtet um einen Eindruck zu erhalten, welche Proteine sich noch nach der Wärmebehandlung in der Lösung bzw. Wein befinden würden. Zum anderen wird die homogenisierte Probe betrachtet, die zusätzlich den entstandenen Trub enthält.



**Abbildung 38: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der trübungsverursachenden Bestandteile im Modellweinsystem.** <sup>1</sup>: mit Hermle Tischzentrifuge, 15000 rpm, 10 min; <sup>2</sup>: Behandlung ohne den Einfluss von  $\beta$ -Mercaptoethanol und Inkubation bei 95 °C.

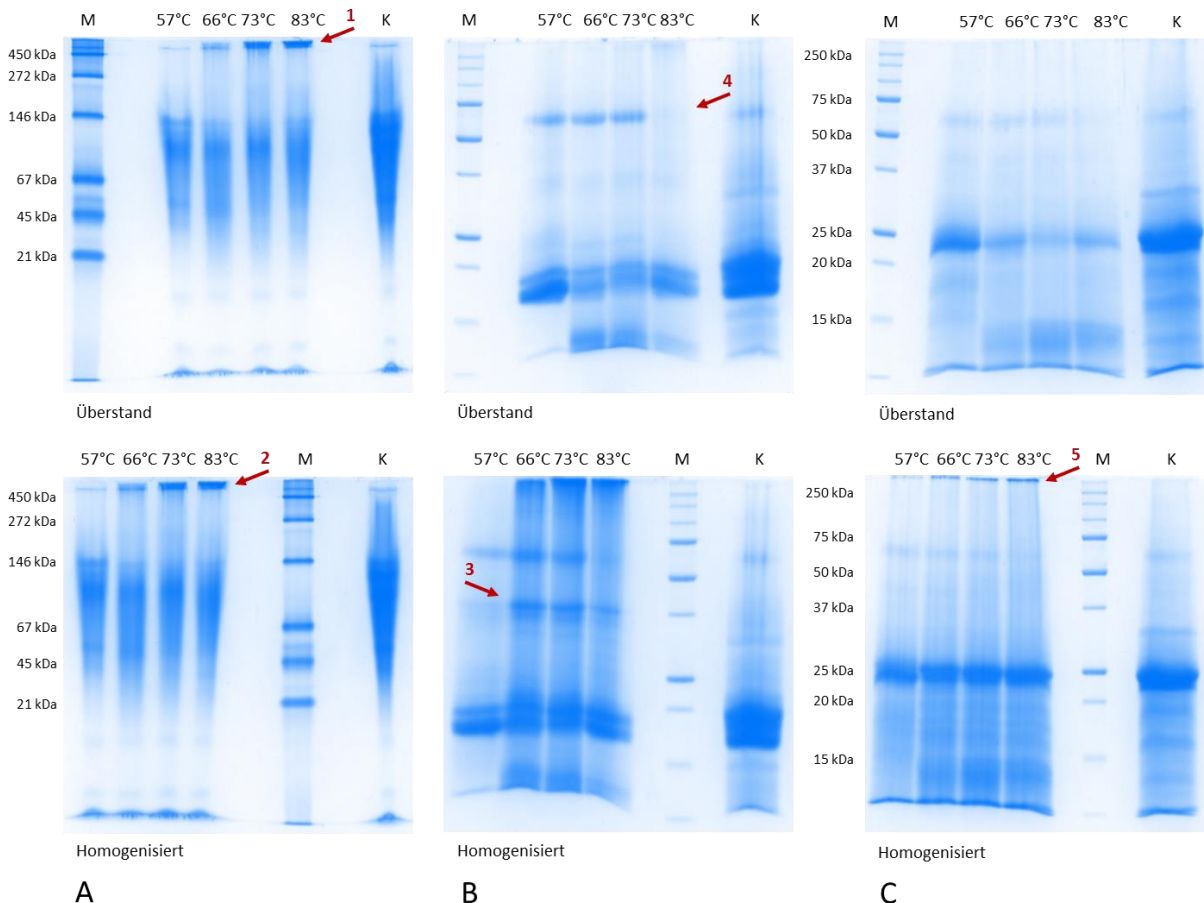
Aus dem Vergleich der unterschiedlich behandelten Proben mit der Kontrolle sollte es möglich sein eine Aussage über die bei der Aggregation beteiligten Proteine treffen zu können. In Abbildung 39 sind die Gele aus diesem Versuch zusammengefasst.

Bei allen Gelen wurde das gleiche Volumen an Probenlösung aufgetragen, um eine bessere Vergleichbarkeit auch zu den Gelen untereinander zu ermöglichen. Es wurde jeweils der zentrifugierte Überstand im Vergleich zur homogenisierten Probe betrachtet. Die interessantesten Erkenntnisse lieferten hier zum einen die nativen sowie die nichtreduzierenden SDS-Gele ohne vorherige Denaturierung der Proben (vgl. Abbildung 39 A & B). Erkennbar bei den nativen Gelen ist, dass sich mit steigender Temperatur mehr bzw. größere Aggregate bilden im Vergleich zu der Kontrolle, welche nicht bzw. kaum ins Gel einlaufen sowohl bei der homogenisierten als auch bei der vorher zentrifugierten Probe (Abbildung 39 A<sup>1&2</sup>). Eine weitere Aussage über die Zusammensetzung der Aggregate oder der beteiligten Proteine lässt sich mit dieser Methode nicht treffen.

Bei der Betrachtung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen weist die Kontrolle die bereits mehrfach beschriebenen typischen Banden der Weinproteine auf, wie die TLPs und Chitinasen bei ca. 20 – 25 kDa oder die Invertase bei ca. 70 kDa (Abbildung 39 C). Diese Proteine sind auch nach den entsprechenden Temperaturbehandlungen zu erkennen, allerdings nimmt deren Intensität im Vergleich zur Kontrolle deutlich ab. Dies wird besonders deutlich im Bereich von 20 – 25 kDa in den Gelen, auf die der Überstand der inkubierten Proben aufgetragen wurde (Abbildung 39 C, oben).

Bei dem SDS-Gel ohne vorherige Denaturierung der Proben laufen die Proteine im Molekulargewichtsbereich der TLPs weiter ins Gel ein als im Vergleich zu denen im SDS-Gel mit vollständiger Denaturierung der Proben. Ein möglicher Grund für dieses Phänomen

scheint, dass die Disulfidbrücken dieser Proteine eine Stabilisierung einer kompakten Struktur ermöglichen und dadurch besser durch das Netz der Polyacrylamidgele wandern. Die Invertase (ca. 70 kDa) dagegen scheint in beiden SDS-Gelen auf gleicher Höhe zu liegen. Ein weiterer Unterschied im Gel ohne Denaturierung ist eine Bande bei ca. 37 kDa, die ab einer Temperatur von 66 °C deutlich zu sehen ist (Abbildung 39 B<sup>3</sup>).



**Abbildung 39: Wärmetest des Modellweins, durchgeführt für die angegebenen Temperaturen der DSC Messungen in Citratpuffer.** Die Proben wurden bei den entsprechenden Temperaturen für 20 min inkubiert. Die Kontrolle K inkubierte bei Raumtemperatur. Die roten Pfeile markieren besondere Proteinbanden, auf die im Text näher eingegangen wird. A: Native PAGE, 10 %, pH 8,8, M: SERVA Native Marker; B: SDS-PAGE, 12,5 % ohne Denaturierung der Proben (ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol und Hitze), M: Precision Plus Protein Standards Unstained, Bio-Rad; C: SDS-PAGE, 12,5 % mit Denaturierung der Proben, M: Precision Plus Protein Standards Unstained, Bio-Rad; oben: Auftragung des Überstandes; unten: Auftragung der homogenisierten Proben (Überstand und Pellet); Coomassie Färbung.

Bei beiden SDS-Gel Varianten mit der homogenisierten und der Probe aus dem Überstand fällt auf, dass nach der Inkubation bei 57 °C Proteine unterhalb von 15 kDa nicht mehr angefärbt werden, die noch in der Kontrolle zu sehen sind (Abbildung 39 B & C). Diese Banden sind allerdings bei den höheren Temperaturen wieder zu sehen und auch im Vergleich zur Kontrolle deutlich intensiver angefärbt. Hierbei könnte es sich um Bruchstücke handeln, die durch die Hitzeeinwirkung entstanden sind und erst bei einer Temperatur von 83 °C zum Teil auch aggregieren. Deutlich erkennt man, dass die Invertase erst bei einer



Temperatur von 83 °C beeinflusst wird (Abbildung 39 B<sup>4</sup>) und vermutlich besser aggregiert aufgrund ihrer Auffaltung [56]. Bei der Bande auf Höhe der 37 kDa (Abbildung 39 B<sup>3</sup>) ist nicht klar, um welches Protein es sich handeln könnte. Da diese Bande auch erst durch die Temperaturbehandlung entstand, ist es möglich, dass es sich hierbei um ein kleineres Aggregat oder um Bruchstücke anderer Proteine handeln könnte. Gerade bei den homogenisierten Proben sind Aggregate ab einer Temperaturbehandlung von 66 °C gut oberhalb von 250 kDa zu erkennen. Diese Aggregate weisen eine hohe Stabilität auf, da diese auch bei der Denaturierung der Proben nicht vollständig gelöst wurden (Abbildung 39 C<sup>5</sup>).

Aufgrund dieser Gele kann vermutet werden, dass einzelne TLPs als auch die Invertase (allerdings diese erst ab hohen Temperaturen) bei der Trubentstehung involviert sind.

#### **4.7.2 Einfluss von Polysacchariden auf die Trübung im Echtweinsystem**

Im Folgenden wurden die Versuche zur Untersuchung des Einflusses von Polysacchariden auf die Stabilität der Weinproteine in einem Echtweinsystem (gelöst in Rieslingpermeat, MWCO <10 kDa) wiederholt. Durch dieses System muss eine zusätzliche Weinkomponente mitbetrachtet werden: die Polyphenole des Weines.

Es ist zu erwähnen, dass sowohl die Modellweinproteine (aus dem Auxerroislyophilisat) gelöst in Citratpuffer als auch eine entsprechende Probe gelöst in Permeat hinsichtlich der Polyphenole an der Hochschule Geisenheim untersucht wurden (Tabelle 14). Mit dieser Untersuchung (HPLC Analyse über Standardkalibrierung nach der SOP-WG2-34, Hochschule Geisenheim) konnte bestätigt werden, dass sich in dem Modellweinlyophilisat keine Polyphenole befinden. Das bedeutet auch, dass die Ergebnisse in Kapitel 4.7.1 auf die Wechselwirkung der Proteine mit den Polysacchariden zurückzuführen sind und nicht auf eventuell noch in dem Lyophilisat enthaltenen Polyphenolen beruht. Da für die weiteren Versuche ein Rieslingpermeat (MWCO <10 kDa), der Versuchsweine des Jahrgangs 2013, verwendet wurde, ließ sich mit dieser Methode (HPLC Analyse über Standardkalibrierung nach der SOP-WG2-34, Hochschule Geisenheim) auch nachweisen, welche Polyphenole sich darin befinden und somit die Versuche beeinflussen könnten. In Tabelle 14 sind die nachgewiesenen Polyphenole aufgelistet. Insgesamt konnten in der in Permeat gelösten Probe 39,8 mg/l Gesamtpolyphenole nachgewiesen werden. Dabei ist die Caftar säure mit einem Anteil von 64 % am stärksten vertreten.

**Tabelle 14: Ergebnisse der Polyphenolanalyse des Modellweinyophilisat gelöst in Citratpuffer und Rieslingpermeat.** Die Untersuchung wurde an der Hochschule Geisenheim mittels HPLC Analyse über Standardkalibrierung nach der SOP-WG2-34 durchgeführt.

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Modellweinyophilisat gelöst in Citratpuffer pH 3,5</b>	<b>Modellweinyophilisat gelöst in Rieslingpermeat pH 3,5</b>
Konzentration	mg/l	mg/l
Tyrosol	0	0
Caftarsäure	0	25,6
Glutathionylcaftarsäure	0	6,2
Coumarylglucose	0	0
Coutarsäure	0	3,1
Fertarsäure	0	4,9
Summe farbloser Phenole	0	39,8

Für die folgenden Versuche wurden alle benötigten Lösungen mit dem Rieslingpermeat (cutoff <10 kDa, pH 3,5) hergestellt. Die Modellweinproteine sowie die bislang für die Testungen eingesetzten Polysaccharide wurden auch für diese Versuche eingesetzt.

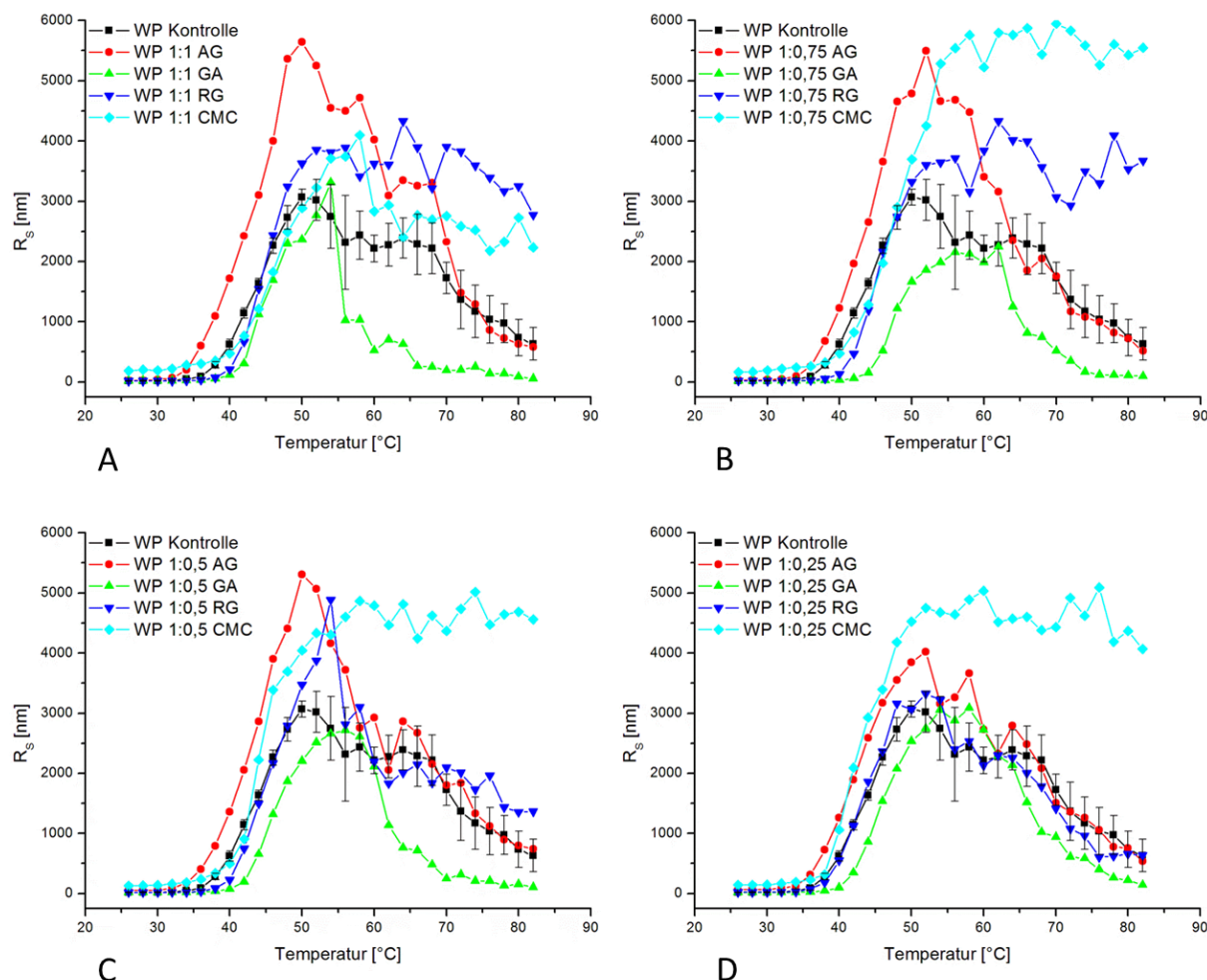
### **Ergebnisse der Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung zur Betrachtung des temperaturabhängigen Aggregationsverhaltens der Modellweinproteine im Echtweinsystem**

In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Versuche zur temperaturabhängigen Aggregation in einem Echtweinsystem dargestellt. Dazu wurden die bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Versuche, statt in Citratpuffer, in einem Rieslingpermeat (MWCO <10 kDa) durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde auch hier ein pH-Wert von 3,5 eingestellt.

Bei diesen Versuchen mussten die Versuchsbedingungen angepasst werden, da sich die im Permeat gelösten Proben anders verhielten und bereits bei niedrigen Temperaturen zu vergleichsweise hohen Messwerten führten. Darum wurde für diese Versuche eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml eingesetzt. Auch die Konzentrationen der anderen Stammlösungen wurden halbiert, da so die in Tabelle 13 aufgeführten Verhältnisse von Weinyophilisat zu den Polysacchariden dennoch getestet werden konnten. Jede Probe wurde dreimal gemessen. Pro Messung wurden 100 µl benötigt. Alle verwendeten Lösungen wurden in Rieslingpermeat pH 3,5 gelöst. Während der ersten Untersuchungen wurde

beobachtet, dass die Flüssigkeit in diesen Proben vermehrt verdunstete. Um dem vorzubeugen, wurden diese Proben mit Paraffin überschichtet.

In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der DLS Versuche mit Permeat dargestellt. Auch hier wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit die Standardabweichung nur bei der Kontrolle eingezeichnet (vgl. 4.7.1).



**Abbildung 40: Zusammenfassende Ergebnisse der DLS Messungen zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens der Modellweinproteine mit verschiedenen Polysacchariden (vier verschiedene Konzentrationsverhältnisse) in Rieslingpermeat.** Zur Vergleichbarkeit wurde eine einheitliche Achsenskalierung verwendet und pro Graph das entsprechende Verhältnis von Modellweinyophilisat zu dem entsprechenden Zusatz aufgetragen. A: Verhältnis 1:1; B: Verhältnis 1:0,75; C: Verhältnis 1:0,5; D: Verhältnis 1:0,25. Zum besseren Vergleich wurde in jede Graphik zusätzlich als Kontrolle die Messung der Modellproteine ohne Zusätze mit aufgetragen. schwarz: Modellweinproteine (WP) & Standardabweichung; rot: Zusatz von Arabinogalactan (AG); grün: Zusatz von Gummi arabicum (GA); blau: Zusatz von Rhamnogalacturonan (RG); hellblau: Zusatz von Carboxymethylcellulose (CMC).

Der Verlauf dieser Messreihen ähnelt stark denen der Messungen in Citratpuffer (vgl. Abbildung 34). Betrachtet man zunächst den Verlauf der Kontrolle (Abbildung 40, schwarze Messkurven) beginnt diese ab einer Temperatur von ca. 36 °C zu steigen bis zu einem Maximum von  $R_s = 3069,2 \pm 132,2$  nm bei 50 °C. anschließend erfolgt wieder ein Abfall der

Daten, die auch nicht die Größenordnungen der Ausgangsradien erreichen (Beginn bei 26 °C:  $R_S = 17,4 \pm 4,2$  nm, Endpunkt bei 82 °C:  $R_S = 632,2 \pm 270,3$  nm). Die Messwerte begannen erst ab einer Temperatur von ca. 50 °C stärker zu schwanken (vgl. Abbildung 40, schwarze Messkurven mit Standardabweichungen). Im Vergleich zu den Daten der Messreihen in Citratpuffer beginnt in diesem Fall die Aggregation bereits um ca. 12 °C niedrigeren Temperaturen. Bei diesen Versuchen konnte eine Sedimentation der Partikel auch durch den Abfall der Derived Count Rate einiger Messungen verfolgt werden (vgl. 8.3).

Die Messungen mit den entsprechenden Polysacchariden verlaufen ähnlich. Durch den Zusatz von Arabinogalactan (Verhältnis 1:1, Abbildung 40 A, rote Messkurve) wird ein Maximum von  $R_S = 5643,0 \pm 373,4$  nm bei 50 °C erreicht. Auch die Messungen mit CMC erreichen dieses Maximum ( $R_S = 5756,7 \pm 850,1$  nm ab 58 °C), allerdings erst eingesetzt in geringeren Konzentrationen (Verhältnis 1:0,75, Abbildung 40 B, hellblaue Messkurve). Dies ist auch bei den anderen niedrigeren Verhältnissen zu beobachten (Abbildung 40 C & D, hellblaue Messkurve). Hier ist auch kein Abfall der Radiengröße zu erkennen. Die Partikel verbleiben vermehrt in der Schwebelage und sedimentieren nicht. Bei den anderen beiden Polysacchariden, Gummi arabicum und Rhamnogalacturonan, folgen die Messreihen vorwiegend denen der Kontrolle.

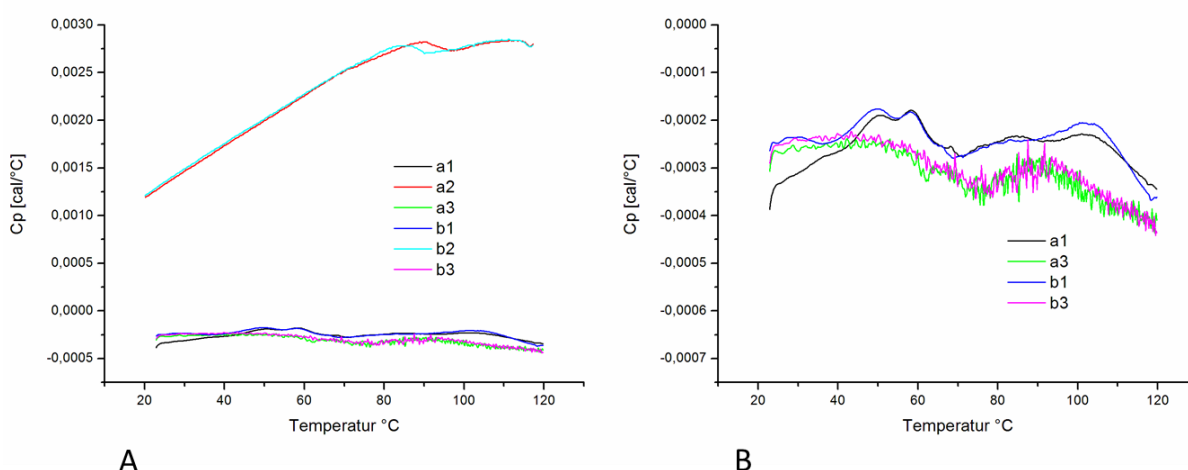
Während bei den Messungen in Citratpuffer die Größe der Partikel ausschlaggebend für die unterschiedliche Wirkung der Polysaccharide war, zeigen sich bei den Proben im Echtweinsystem die Unterschiede zwischen den Polysacchariden im Beginn der temperaturabhängigen Aggregation.

Betrachtet man die Polysaccharide Arabinogalactan und Gummi arabicum, werden deutliche Unterschiede sichtbar (Abbildung 40, rote & grüne Kurven). Während durch den Einsatz von Arabinogalactan die Aggregation bereits bei 32 °C beginnt, konnte dieser durch den Einsatz von Gummi arabicum um bis zu 10 °C auf ca. 42 °C verschoben werden. Wie bereits erwähnt führt der Einsatz von Arabinogalacturonan zu einer vermehrten Aggregation im Vergleich zur Kontrolle, besonders ab einem Verhältnis von 1:0,5 eingesetzt (Abbildung 40 C, rote Kurve). Hier lieferte das Gummi arabicum die interessantesten Ergebnisse zur Trubreduzierung. Durch diesen Zusatz wurde der Beginn der Aggregation zu höheren Temperaturen verschoben und auch die Messpunkte lagen zum größten Teil unter denen der Kontrolle (Abbildung 40 C, grüne Kurve). Allerdings konnte auch durch den Einsatz von Rhamnogalacturonan, dass noch einen stabilisierenden Einfluss auf die Trubbildung in Citratpuffer aufwies, der Beginn der Aggregation leicht zu höheren Temperaturen verschoben werden. Aber dies nicht so effektiv wie durch die Verwendung von Gummi arabicum.

Bei den von Frau Miriam Meier durchgeführten Wärmetests an der Hochschule Geisenheim konnten im Echtweinsystem auch keine massiven Unterschiede zwischen den eingesetzten Polysacchariden und deren Einfluss auf die Stabilität beobachtet werden. Alle Proben wiesen bereits ab einer Temperatur von 40 °C FNU Werte oberhalb des Grenzwertes von 2 auf.

### Ergebnisse der DSC Messungen zur Schmelzpunktbetrachtung

Mit den DSC Messungen sollte der Einfluss der Polysaccharide auf die Stabilität der Weinproteine gelöst im Rieslingpermeat verfolgt werden. Für diese Messungen konnten die gleichen Konzentrationen eingesetzt werden wie bereits bei den Messungen in Citratpuffer (vgl. Abbildung 37). Auch hier wurde eine Gesamtproteinkonzentration von ca. 0,13 mg/ml eingesetzt. Alle Proben wurden in Rieslingpermeat pH 3,5 gelöst. Die Messreihen wurden einmal wiederholt und aufgrund deren quantitativ ähnlicher Verläufe wurde auch hier nur eine der Messreihen dargestellt. In Abbildung 41 ist dies am Beispiel der Kontrolle ohne weitere Zusätze von Polysacchariden aufgeführt (vgl. 4.7.1, Abbildung 35).

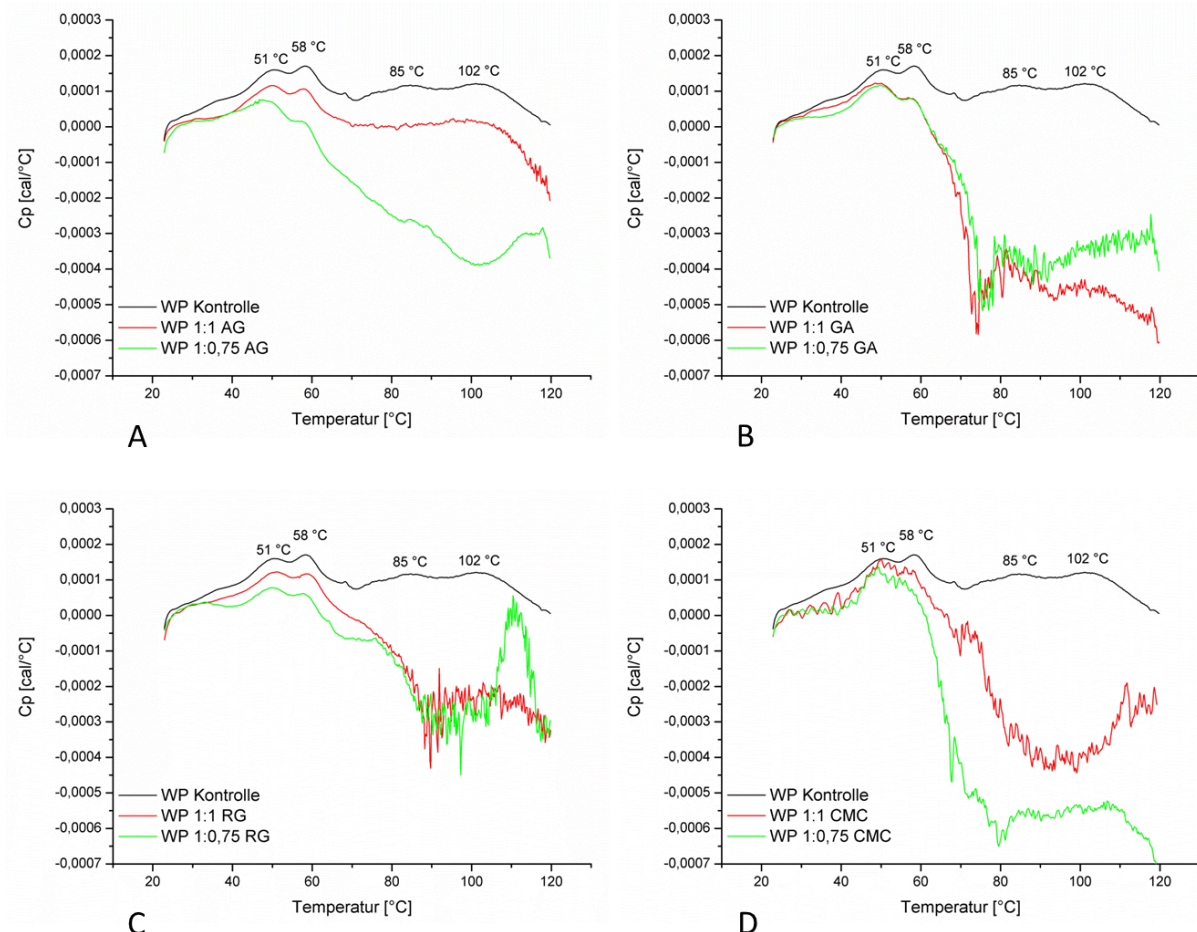


**Abbildung 41: DSC Messung des Modellweines ohne weitere Zusätze jedoch in Rieslingpermeat.** Die Messung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt (Messung a & b). A: alle Messreihen; B: Vergrößerung der Messreihen 1 und 3. 1: Messung von 20  $^\circ\text{C}$  nach 120  $^\circ\text{C}$ ; 2: Messung von 120  $^\circ\text{C}$  nach 20  $^\circ\text{C}$ ; 3: Messung von 20  $^\circ\text{C}$  nach 120  $^\circ\text{C}$ ;  $C_p$ : Wärmekapazität.

In Abbildung 42 sind die Ergebnisse der DSC Messungen dargestellt. Bei der Betrachtung der Wärmekapazität der Kontrolle können vier Peaks detektiert werden bei 51  $^\circ\text{C}$ , 58  $^\circ\text{C}$ , 85  $^\circ\text{C}$  und 102  $^\circ\text{C}$  (Abbildung 42, schwarze Messkurve). Hier sind die ersten beiden Peaks stärker ausgeprägt, während die Peaks bei den höheren Temperaturen eher sehr flach und breit erscheinen. Im Vergleich zu den Messungen der Proben in Citratpuffer wurden die Temperaturmaxima in einer kleineren Temperaturspanne aufgezeichnet (57  $^\circ\text{C}$  – 83  $^\circ\text{C}$ , Abbildung 37, schwarze Messkurve). Allerdings ist hier das Verhalten der Proben mit den Polysaccharidzusätzen auch unterschiedlich zu denen in Citratpuffer. Die Proben mit den

Polysacchariden weisen zum Teil noch die ersten Peaks bei 51 °C und 58 °C auf (Abbildung 42 A, B & C). Allerdings beginnen alle Proben ab einer Temperatur von ca. 60 °C stark zu aggregieren, was an dem starken Abfall aller Messkurven mit Polysaccharidzusatz zu erkennen ist (Abbildung 42). Dies lässt sich auch daran erkennen, dass sich der Peak bei 58 °C erniedrigt, was mit dem Einfluss der Aggregation bereits auf diese Proteine zu erklären ist (vgl. Abbildung 42 A, grüne Messkurve). Dadurch können über die hinteren beiden Peaks (bei 85 °C und 102 °C) bei diesen Proben keine Aussagen mehr getroffen werden. Bei den Messungen mit CMC lässt sich im besten Fall noch der erste Peak leicht erkennen, allerdings kann aufgrund der starken Schwankungen in der Wärmekapazität keine Aussage über dessen Einfluss auf die Proteinstabilität getroffen werden.

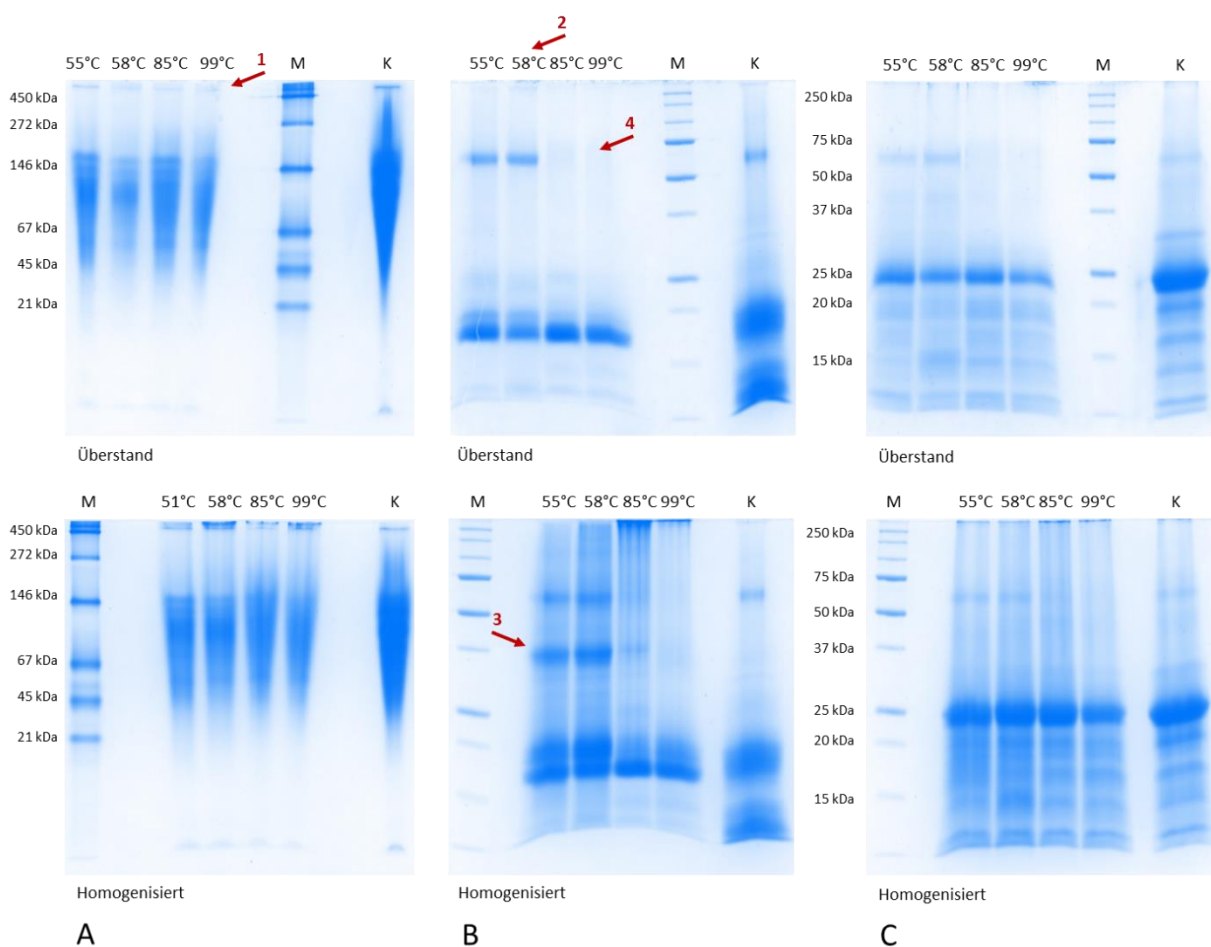
Diese starke Aggregation der Proteine ließ sich auch bei den Ergebnissen der DLS Messungen nachvollziehen (vgl. Abbildung 40), hier tritt ebenfalls ab ca. 60 °C bei fast allen Proben eine Sedimentation der Aggregate ein.



**Abbildung 42: DSC Messungen zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Polysaccharide auf die Denaturierungspunkte der Weininhaltsstoffe in Rieslingpermeat.** Alle Ergebnisse sind im Vergleich zu der Messung der Modellweinproteine (WP) aufgetragen. Messungen: 0,13 mg/ml Gesamtprotein von 20-120 °C mit einer Heizrate von 60 °C/h. A: Messung mit Arabinogalactan (AG); B: Messung mit Gummi arabicum (GA); C: Messung mit Rhamnogalacturonan (RG); D: Messung mit Carboxymethylcellulose (CMC).

## Untersuchung der vier Denaturierungstemperaturen und der dabei entstehenden Aggregate

Bei den bisherigen Untersuchungen des Einflusses verschiedener Polysaccharide auf die Trubentstehung im Echtweinsystem wurden im Rahmen der DSC Messungen vier Temperaturmaxima in der Kontrolle ohne weitere Zusätze von Polysacchariden entdeckt. Diese Maxima sollen genauer hinsichtlich deren Einfluss auch die Proteinzusammensetzung im Wein untersucht werden. Dazu wird wie bei den in Citratpuffer gelösten Proben vorgegangen (vgl. Abbildung 38). Die Proben inkubierten 20 min bei den entsprechend angepassten Temperaturen, bei 51 °C, 58 °C, 85 °C und 99 °C (maximale Temperatur des Heizblocks). Auch hier wurden wieder die verschiedenen PAGEs zur Betrachtung der Proteinzusammensetzung in den Proben eingesetzt (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Wärmetest des Modellweins mit Rieslingpermeat, durchgeführt für die markanten Temperaturen der DSC Messungen.** Die Proben wurden bei den entsprechenden Temperaturen für 20 min inkubiert. Die Kontrolle K inkubierte bei Raumtemperatur. Die roten Pfeile markieren besondere Proteinbanden, auf die im Text näher eingegangen wird. A: native PAGE, 10 %, pH 8,8, M: SERVA Native Marker; B: SDS-PAGE, 12,5 % ohne Denaturierung der Proben (ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol und Hitze), M: Precision Plus Protein Standards Unstained, Bio-Rad; C: SDS-PAGE, 12,5 % mit Denaturierung der Proben, M: Precision Plus Protein Standards Unstained, BioRad; oben: Auftragung des Überstandes; unten: Auftragung der homogenisierten Proben (Überstand und Pellet); Coomassie Färbung.

Zur besseren Vergleichbarkeit dieser Versuche mit denen in Citratpuffer, wurde hier gleich verfahren (vgl. 4.7.1). Auch hier soll betrachtet werden, welche Proteine sich nach der Aggregation und dessen Entfernung noch im Wein befinden (Abbildung 43, oben) im Vergleich zur kompletten Lösung mit den Aggregaten (Abbildung 43, unten).

In allen Gelen mit Auftragung des Überstandes nach Zentrifugation sind die Proteine weniger intensiv angefärbt als bei der entsprechenden Kontrolle. Besonders gut ist dies bei den SDS-Gelen im Bereich von 15 – 25 kDa zu erkennen (Abbildung 43 B & C, oben). Allerdings fällt auch bei den nativen Gelen auf, dass im Überstand große Moleküle oberhalb von 450 kDa im Vergleich zur Kontrolle noch kaum zu sehen sind (Abbildung 43 A<sup>1</sup>). Dafür werden Banden dieser Größenordnung in den homogenisierten Proben dieser Gele deutlich sichtbar (Abbildung 43 A).

Auch die Gele mit den teildenaturierten Proben (Abbildung 43 B), die nach der entsprechenden Wärmebehandlung nicht mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und Hitze denaturiert wurden, weisen ein ähnliches Proteinmuster zu den in Citratpuffer gelösten Proben auf (Abbildung 39 B). Auch hier sind die TLPs und Chitinasen auf die Höhe von 15 – 20 kDa verschoben, vermutlich aufgrund der kompakteren Struktur durch Erhalt der Disulfidbrücken, während die Invertase bei ca. 70 kDa nicht davon beeinflusst zu sein scheint. Die Proteinmuster der Temperaturen 51 °C und 58 °C sehen nahezu identisch aus (Abbildung 43 B<sup>2</sup>). Es lässt sich auch wieder eine Bande bei ca. 37 kDa erkennen, deren Herkunft und Zusammensetzung unklar ist (Abbildung 43 B<sup>3</sup>). Erst bei 85 °C zeigt sich, dass die Invertase aufgrund der Hitzeeinwirkung vermutlich aggregierte und auch nach vollständiger Denaturierung der Probe nicht mehr im Gel erscheint (Abbildung 43 B<sup>4</sup>). Die Behandlung der Proben bei 99 °C weist keine sichtbaren Unterschiede zu der bei 85 °C inkubierten Probe auf. Zur Vollständigkeit wurden auch hier die SDS-Gele mit reduzierten Proben dargestellt, allerdings lieferten diese keine weiteren Erkenntnisse (Abbildung 43 C).

Anhand dieser Untersuchungen lassen sich keine massiven Unterschiede der Proben gelöst in Citratpuffer zu denen in Permeat erkennen. Weitere Versuche, wie der Einfluss dieser Versuchsbedingungen auf einzelne Weinproteine oder auch die Wirkung einer Kombination der verschiedenen Polysaccharide auf die Modellsysteme, müssten abgeschlossen werden.

Es sollte berücksichtigt werden, dass im Falle des Permeats weitere Komponenten in die Versuchslösungen gelangten, wie Salze, die hier nicht weiter betrachtet wurden.



## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit behandelt zwei verschiedene Bereiche zum Thema Wein. Die Schwerpunkte liegen zum einen bei der potentiellen Allergenität von Weinproteinen. Im Speziellen wurde hier das allergene Potential des LTP der Traube bzw. dessen Relevanz als Auslöser für Unverträglichkeiten in der Weinbauregion Rheinhessen betrachtet. Vorrausgehend wurde die strukturelle Stabilität des LTPs aus der Traube mit der aus dem Wein verglichen.

Zum anderen wurden Weinproteine und deren Einfluss bei der Entstehung von Trübung betrachtet. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bislang verschiedene Proteine diskutiert werden bei der Trubentstehung eine Rolle zu spielen. Zusätzlich wurden einige Einflussfaktoren auf die Trübung untersucht.

### 5.1 Lipid Transfer Protein als Traubenallergen

Das LTP ist ein weit verbreitetes Allergen in der Pflanzenwelt [99]. Besonders im Pfirsich stellt dieses Protein mit der Bezeichnung Pru p 3 das Hauptallergen dar [94]. Die strukturellen Eigenschaften, wie die konservierte Aminosäuresequenz die durch vier Disulfidbrücken in der Tertiärstruktur stabilisiert wird (vgl. Abbildung 5), sind ein Grund für ihre potentielle Allergenität [89, 90, 94, 233]. Gerade diese Proteine zeichnen sich durch ihre hohe strukturelle Stabilität gegenüber proteolytischem Verdau aus [95, 97, 249, 250]. Als Grund für diese Resistenz geben Wijesinha-Bettoni *et al.* (2010) die Starrheit der LTP-Struktur an [97]. Aufgrund dieser Eigenschaften gegenüber den aciden Bedingungen, der gastrointestinalen und der duodenalen Verdauung ist ein Zusammenhang mit der Allergenität solcher Proteine beschrieben [95, 97, 133, 249]. Sie gelangen über die Darmschleimhäute in die Blutbahn, werden als körperfremd erkannt und von Makrophagen aufgenommen. Darauf folgt eine Allergenprozessierung und die entsprechenden Allergenfragmente werden an der Zelloberfläche präsentiert [251]. Dieser Schritt wird als Sensibilisierung bezeichnet. Erst bei erneutem Kontakt mit dem Allergen wird das Immunsystem aktiviert und es bilden sich IgE Antikörper. Durch die Mastzellensensibilisierung, die diese IgE-Antikörper präsentieren, ist bei einem weiteren Kontakt mit dem Allergen der Ausbruch allergischer Symptome möglich.

Verschiedene LTPs aus Früchten, Nüssen und auch Pollen werden häufig in klinischen Studien bezüglich ihrer Allergenität betrachtet [82, 124, 127, 129, 252-256]. In diesen Studien wird das Protein in hoher Reinheit für die Testungen eingesetzt. Dazu finden sich häufig Aufzeichnungen über die rekombinante Expression prominenter LTPs [94, 255, 256].

Auch die chromatographische Aufreinigung der Proteine aus dem entsprechenden Pflanzenextrakt wird beschrieben [252, 257-259].

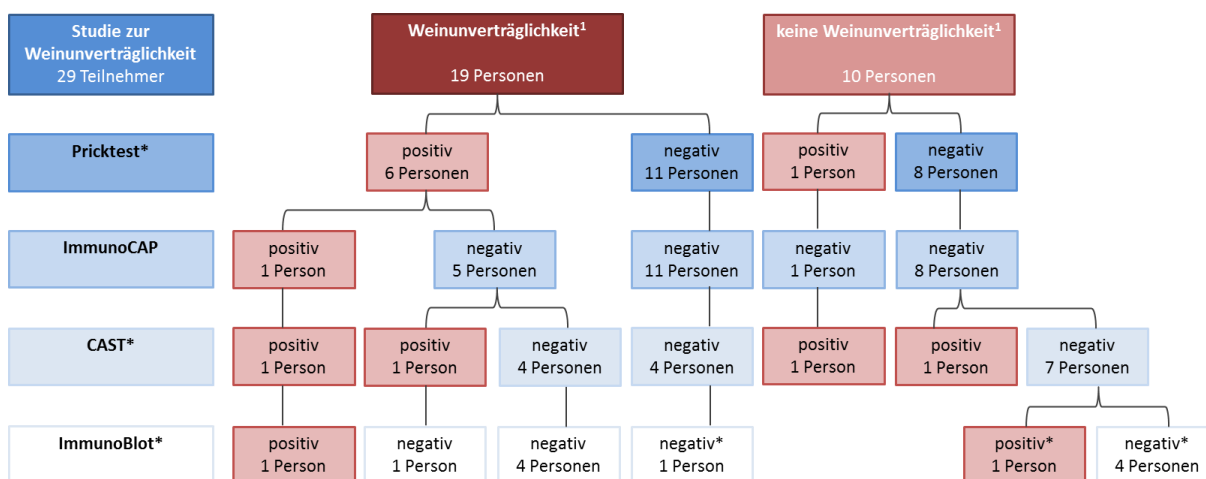
### **5.1.1 Aufreinigung und Charakterisierung des Lipid Transfer Proteins**

Zur Untersuchung des allergenen Potentials des LTPs aus der Dornfelder Traube und des entsprechenden Weines wurden diese Proteine isoliert und näher charakterisiert. Zur Aufreinigung dieses Proteins konnte der *pI* von ca. 9 ausgenutzt werden, um es mittels Kationenaustauschchromatographie von den anderen Weinproteinen (vorwiegend *pI* 4 - 5) zu trennen [231]. Viele Arbeitsgruppen verwenden ebenfalls diese Methode um die LTPs aus den jeweiligen Extrakten zu entfernen [255-260], wobei die meisten dieser Arbeitsgruppen weitere Aufreinigungsschritte mittels Gelfiltration oder HIC miteinander kombiniert anwenden [252, 257-259]. Auf solche weiteren Schritte konnte hier verzichtet werden, da die nachfolgenden Untersuchungen des Proteins, unter anderem durch SDS-PAGE (vgl. Abbildung 8), dessen Reinheit bestätigten [231]. Auch mittels der Fluoreszenzversuche konnte die Abwesenheit von tryptophanhaltigen Proteinen in der Versuchslösung bestätigt werden. Hier wurde die Eigenheit des LTP ausgenutzt in der Aminosäuresequenz keine Tryptophane zu enthalten (Abbildung 10). Vergleichbare Spektren wurden für LTPs aus der Erbse und dem Pfirsich in der Arbeit von Ramazzina *et al.* (2012) gezeigt [254]. Die Analyse der Sekundärstruktur mit CD-Spektren ist mit Daten von anderen LTPs vergleichbar und wies für  $\alpha$ -Helices einen typischen Verlauf auf [129, 254, 255, 258]. Aufgrund dieser Ergebnisse ließ sich behaupten, dass es sich bei den für die weiteren Versuche eingesetzten LTPs um reine Proben handelte. Dadurch konnte bei den Resultaten der klinischen Untersuchungen davon ausgegangen werden, dass, wenn nicht anders beschrieben, diese Reaktionen nur mit den Wechselwirkungen auf das LTP zu erklären sind.

### **5.1.2 Zusammenfassung der klinischen Studie**

Bei den klinischen Untersuchungen konnten insgesamt 29 Personen untersucht werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Abbildung 44 zusammengefasst. Es erfolgte eine Unterteilung in die Personen, die nach Eigenangaben an einer Weinunverträglichkeit leiden ( $n = 19$ ) und die ohne eine Weinunverträglichkeit ( $n = 10$ ). Bei einigen der untersuchten Probanden war eine Sensibilisierung auf Trauben und Weine zu erkennen. Lediglich eine Probandin (Nr. 7), aus der Gruppe der Personen mit einer Weinunverträglichkeit, wurde in allen Versuchen auf verschiedene Trauben- und Weinprodukte positiv getestet. Die IgE-Antikörper dieser Probandin reagierten auch im ImmunoBlot stark mit den verschiedenen Proteinen aus den Wein- und Traubenproben

(Abbildung 13). Im Besonderen reagierten ihre IgE-Antikörper auf Proteine im Molekulargewichtsbereich der Thaumatin-ähnlichen Proteine (20 - 25 kDa), der Chitinasen (25 - 30 kDa) und der Invertasen (ca. 70 kDa), die ebenfalls als Allergene diskutiert werden [100, 101, 116]. Allerdings konnte bei dieser Probandin keine eindeutige Reaktion auf das LTP nachgewiesen werden. Aufgrund der starken Sensibilisierung dieser Probandin auf Pollen und Gräser sind die getesteten Reaktionen eventuell auf pollenassoziierte Kreuzreaktionen auf Nahrungsmittel z.B. über kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten (CCD/ MUXF3) zurückzuführen [140, 261]. Dies bestätigten auch die Versuche mit Bromelain als glykosyliertes Protein zur Untersuchung von kreuzreaktiven Kohlenhydratdeterminanten (CCD) und dem speziellen CCD-Blocker von ProGlycAn (Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich) [262]. Die Inkubation der Serum IgE-Antikörper mit diesen Molekülen konnte deren Reaktivität inhibieren.



**Abbildung 44: Übersicht über die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen zur Weinunverträglichkeit (n = 29).** Es wurden insgesamt 29 Personen im Zusammenhang mit einer Weinunverträglichkeit getestet, um dessen Ursache zu untersuchen. Eine Unterteilung erfolgte in Personen mit und ohne Weinunverträglichkeit. <sup>1</sup>: Einteilung erfolgte nach Eigenangabe der Probanden; \*: Es wurden nicht alle Personen aus diesen Gruppen getestet (vgl. Tabelle 8).

Bei diesen Untersuchungen erwies sich der CAST als sehr sensitive Methode und korrelierte mit dem Pricktest. Die Ergebnisse des ImmunoCAP korrelierten nicht mit den Ergebnissen des CAST oder des Pricktestes. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass der Test auf die Weintraubenproteine (ImmunoCAP Nr. f259) aus einem Proteingemisch besteht und die Anteile der einzelnen Proteinklassen, wie TLPs, Chitinasen oder LTPs, nicht bekannt sind und auch nicht im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden konnten. Eine Probe dieses Proteingemischs wurde nicht von der Firma Phadia AB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) zur Verfügung gestellt. Da in der Traube die TLPs und Chitinasen den größten Anteil an Proteine ausmachen [70, 80], ist unklar, ob das LTP sich in einer ausreichenden Menge in der Testsubstanz des ImmunoCAPs befand.

In dieser Studie konnten 19 Personen mit subjektiv intensiven Weinunverträglichkeiten hinsichtlich einer Allergie gegen Wein untersucht werden. Bei keiner Person konnte eine echte IgE-Antikörper-vermittelte Allergie nachgewiesen werden, die nicht mit einer Kreuzreaktion zu erklären gewesen wäre. Insgesamt legen diese allergologischen Untersuchungsergebnisse nahe, dass echte allergische Reaktionen gegen Wein eher selten im Vergleich zu anderweitig vermittelten Intoleranzreaktionen sind.

Hier lag der Fokus auf der Betrachtung der Trauben- und Weinproteine, insbesondere bei dem LTP als bekanntes Traubenallergen. Allerdings können auch andere Substanzen im Wein als Auslöser einer Weinunverträglichkeit wirken wie z.B. Insektengifte [263], Schönungsmittel [9, 264] oder biogene Amine, wie Histamin, Putrescin, Cadavarin, Tyramin sowie Säuren und Sulfite (bereits deklarierungspflichtig) [123, 265], die hier nicht untersucht wurden. Symptome wie Hautrötung und Herzklopfen lassen sich auch entweder durch biogene Amine oder durch die gefäßerweiternde Wirkung des Alkohols auf das Herz-Kreislaufsystem erklären [122, 156]. Die Vielzahl der im Wein enthaltenen Komponenten könnte insbesondere aufgrund ihrer Kombination mögliche Ursachen für das Auftreten von Unverträglichkeiten sein [13, 266].

Alle diese weiteren potentiellen Auslöser von Unverträglichkeitsreaktionen können ihre Wirkung bereits durch den Verzehr von Spuren dieser Stoffe bewirken. Die Ausmaße und tolerierten Grenzwerte dieser Komponenten können sich individuell unterscheiden, was die Forschung nach der Ursache, im Speziellen bei der Weinunverträglichkeit erschwert. Aufbauende Untersuchungen sollten auch weitere Komponenten berücksichtigen.

### **5.1.3 Tatsächliche Gefährdung durch traubeneigene Proteine**

Bei den bisher beschriebenen Fällen einer Weinintoleranz handelt es sich um Einzelfälle, die vorwiegend im mediterranen Raum auftraten [101, 111-114, 116, 117]. Häufige Ursache für diese Unverträglichkeitsreaktionen ist das Vorliegen einer Allergie auf das LTP des Pfirsichs [101, 112, 115].

Auch aus Deutschland sind zwei Fälle mit einer Wein- bzw. Traubenunverträglichkeit beschrieben, allerdings wiesen beide Fallstudien verschiedene Ursachen auf, die zu diesen Symptomen führten [119, 120]. Bei diesen beiden Fallstudien wurden in den durchgeführten ImmunoBlots IgE-Antikörper gegen die verschiedenen Traubenproteine in einem Bereich von 9, 15, 24 und 30 kDa nachgewiesen. Dies ist vergleichbar mit den ImmunoBlots der Probandin Nr. 7, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie (vgl. Abbildung 13). Bei dem Proband in der Arbeit von Sbornik *et al.* (2007) lagen ebenfalls weitere Allergien vor [120]. Hier scheint es sich, vergleichbar mit der Probandin Nr. 7, um eine pollenassoziierte

Kreuzreaktion auf Trauben- bzw. Weinproteine zu handeln. Im Gegensatz dazu wurde bei der Probandin in der Arbeit von Schäd *et al.* (2005) eine Pollinosis (Heuschnupfen) ausgeschlossen [119]. Da somit mögliche Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden konnten, wurde von Schäd *et al.* (2005) gefolgert, dass es sich bei diesen Reaktionen um eine echte IgE-Antikörper-vermittelte Allergie gegen Trauben- bzw. Weinproteine handelte [119].

Zusammengefasst zeigen die hier aufgeführten Ergebnisse, dass eine echte Trauben- bzw. Weinallergie eher selten vorliegt und dass die meisten Unverträglichkeitsreaktionen auf andere Auslöser zurückzuführen sind. Zu diesen Auslösern sollten neben möglichen Kreuzreaktionen auch biogene Amine oder Sulfite in Betracht gezogen werden [108, 121, 123]. Auf diese Stoffe konnte im Rahmen der klinischen Untersuchungen nicht weiter eingegangen werden, sollte aber bei weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden.

Es ist erwähnenswert, dass sich bei der hiesigen Studie mehr Personen mit einer Weinunverträglichkeit meldeten, als sich später in der Hautklinik für die weiteren Testungen vorstellten. Diese geringe Bereitschaft für die Abklärung der Ursache ihrer Symptome ist auch ein möglicher Grund, dass sich bei den hier untersuchten Probanden keine echten Allergiker befanden.

## 5.2 Proteinzusammensetzung im Wein

### 5.2.1 Einflüsse von weinbaulichen Maßnahmen

Es wurden verschiedene Weine hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung betrachtet. Dabei unterschieden sich die verwendeten Proben nicht nur in der Rebsorte sondern auch in der Lage der Reben und zum Teil im Jahrgang (vgl. Abbildung 14 & Abbildung 15). Die Unterschiede zwischen den Proben lassen sich gut erkennen und belegen die teilweise Variabilität der Proteinzusammensetzung in Weinen bzw. Trauben [48, 267, 268]. Die am häufigsten vorkommenden Proteine wie die TLPs, im Molekulargewichtsbereich von 20 – 25 kDa, Chitinasen (ca. 30 kDa) oder auch Glykoproteine (51 - 527 kDa, nur mit PAS-Färbung sichtbar) lassen sich in allen getesteten Weinen erkennen. Die Einflüsse des Jahrgangs konnten am Beispiel von Rieslingen aus den Jahren 2008 und 2012 der Hochschule Geisenheim näher dargestellt werden (Probenbezeichnung: MM\_7 & MM\_21). Durch den Vergleich mit einem weiteren Riesling von der Mosel (Probenbezeichnung: MM\_0, Jahrgang 2011) wurde so auch der Unterschied zu einer anderen Lage der gleichen Rebsorte betrachtet (Abbildung 15). Vorwiegend wurden Unterschiede im Bereich der Molekulargewichte von 19, 22, 30 und 70 kDa beobachtet. Gerade die Bande bei ca. 70 kDa konnte bei dem Wein von der Mosel (Probenbezeichnung: MM\_0, Jahrgang 2011) nicht in vergleichbarer Intensität dargestellt werden. Die Arbeit von Hayasaka *et al.* (2001) weist

auch kleinere Unterschiede in der Proteinzusammensetzung verschiedener Trauben und zum Teil auch verschiedener Jahrgänge auf [267]. Wobei diese Arbeitsgruppe auch bestätigt, dass z.B. Proteine aus der TLP-Familie bei allen getesteten Proben nachgewiesen wurden, allerdings auch in variierenden Anteilen. Hiermit wird die Aussage gestützt, dass die Proteinzusammensetzung in den Trauben durch viele Faktoren beeinflusst wird [267]. Da sich diese Zusammensetzung der Proteine in der Traube auf die im Wein auswirkt, ist die Arbeit von Hayasaka *et al.* (2001) eine gute Grundlage für die hier erhaltenen Erkenntnisse [267]. Auch die Arbeit von Wigand *et al.* (2009) unterstützt die bei den massenspektrometrischen Daten erhaltenen Ergebnisse (vgl. Tabelle 9 & Tabelle 10) bezüglich der Unterschiede bei verschiedenen Rebsorten, hier besonders im Vergleich eines Weißweins mit einem Rosé Wein [48].

Auch eine „klimatische Bedingung“ konnte in den Versuchsweinbergen der Hochschule Geisenheim simuliert werden. Dazu wurde ein Teil der Reben eines Weinberges zusätzlich bewässert. Somit konnte im Vergleich zu den nicht zusätzlich bewässerten Reben der Einfluss von Trockenheit auf die Zusammensetzung der Proteine im Most bzw. Wein untersucht werden. Diese Daten zeigen, dass sich bei den gestressten, also nicht zusätzlich bewässerten Trauben ein höherer Proteingehalt nachweisen ließ, als bei den zusätzlich bewässerten (Most: Trockenstress: 106,3 mg/l; Bewässert: 74,0 mg/l). Dies zeigten auch Pocock *et al.* (2000) am Beispiel reifer Shiraz Trauben [81]. Die trockengestressten Trauben enthielten ca. 57 % mehr Proteine pro Liter (nicht bewässert: 52 mg/l, bewässert: 33 mg/l) als die bewässerten [81]. Es ist leider nicht mehr nachvollziehbar wie sich die eingesetzten Traubenbeeren der Hochschule Geisenheim in Größe und Aussehen unterschieden. Es wäre möglich, dass der höhere Proteingehalt durch geringere Wassereinlagerungen in den Beeren zu erklären wäre. In der Arbeit von Grimplet *et al.* (2009) wurde der Einfluss von Trockengestress und Bewässerung auf die Traubenbeere näher untersucht [237]. Grimplet *et al.* (2009) dokumentierten, dass sich die Größe sowie der Zuckergehalt der reifen Beeren nicht wesentlich voneinander unterschieden. Dadurch könnte man annehmen, dass es bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Weinen (Probenbezeichnung: MM\_6 & MM\_7; vgl. 4.4.2) dieser Trauben auch nicht der Fall gewesen ist. In den Untersuchungen von Grimplet *et al.* (2009) konnte gezeigt werden, dass Trockenstress u.a. zu einer vermehrten Expression von Endochitinasen im Fruchtfleisch führte [237]. Während sich in den hier vorliegenden Daten verschiedene TLPs (vgl. Tabelle 9, Accession Nummer: CAB85636.1, CAB85637.1, AAF82264.1, CAN66515.1) vermehrt nachweisen ließen.

Die hier ermittelten Daten bestätigen die Aussage, dass es sich bei Wein um ein sehr komplexes Medium handelt [7, 13]. Gerade bei den anschließenden Untersuchungen zur

Trübung zeigt diese Komplexität in der Proteinzusammensetzung, dass eine Verallgemeinerung der erhaltenen Daten nur schwer zu formulieren ist.

### 5.2.2 Einflüsse von oenologischen Maßnahmen

Nicht nur die weinbaulichen Maßnahmen beeinflussen die Proteinzusammensetzung sondern auch die daran anschließenden oenologischen Maßnahmen zur Weinherstellung.

Es konnten unterschiedliche Proteinkonzentrationen nach der Maische- und der Ganztraubenpressung gemessen werden (im Most: MP: 52,8 mg/l, GTP: 82,5 mg/l). Im Gegensatz zu den Hinweisen aus der Praxis wurden höhere Konzentrationen im Most und Wein nach der Ganztraubenpressung nachgewiesen. Allerdings wird die Maischepressung vorwiegend bei der Rotweinherstellung eingesetzt. In diesem Fall beträgt die Maischestandzeit mindestens 12 h. Dadurch gelangen mehr Proteine oder auch andere Traubeninhaltsstoffe aus den Traubenschalen und Fruchtfleisch durch Diffusion in den Most. Die durchgeführte Maischepressung erfolgte mit einem Riesling nach einer Standzeit von 2 h, somit ist es wahrscheinlich, dass der Unterschied in der Proteinkonzentration ausschließlich auf die Pressung zurückzuführen ist. Zum Einfluss der Maischestandzeiten auf die Proteinkonzentration im Most findet sich nur vereinzelt Literatur. Da gerade Maischestandzeiten bei der Rotweinherstellung eingesetzt werden um den Polyphenolgehalt der Proben zu erhöhen, spielt der Proteineintrag eher eine untergeordnete Rolle [269].

Eine sehr wichtige oenologische Maßnahme ist die Schönung. Mit dieser sollen vorwiegend zu Trübungen führende Inhaltsstoffe, insbesondere Proteine, aus dem Wein entfernt werden. Hier erwies sich das Bentonit als ein sehr effektives Schönungsmittel [188], ohne zu einem Eintrag von potentiellen Allergenen zu führen, was durch andere Schönungsmittel, wie Gelatine der Fall wäre [9, 50, 51]. Dieses Mineral adsorbiert unspezifisch verschiedene Proteine und auch andere Inhaltsstoffe wie Farb- und Aromakomponenten aus dem Wein [181, 182, 245]. Bislang ist nichts Näheres über dessen Selektivität bekannt. Am Beispiel der  $\beta$ -Glucosidase aus *Vitis vinifera* wurde dies exemplarisch untersucht (vgl. 4.5). In Kapitel 5.3.1 wird dies weiter aufgegriffen.

## 5.3 Trübung

Ein großes Problem eines Winzers ist die Nachtrübung bei bereits abgefüllten Weinen. Dieser optische Fehler führt zu Rückrufaktionen und, damit verbunden, zu ökonomischen Schäden. Die Trübung entsteht durch Aggregation verschiedener Weininhaltsstoffe. Die in diesem Zusammenhang am häufigsten erwähnten Inhaltsstoffe sind Polyphenole,

Polysaccharide und Proteine [37, 161, 172, 270]. Derzeit ist nicht bekannt, um welche Weinkomponenten es sich im Speziellen handelt [169]. Gerade bei den Proteinen werden einige diskutiert auf die Trübung einen Einfluss zu haben, wie z.B. TLPs, Chitinasen, Glucosidasen aber eine eindeutige Identifikation ist noch nicht gelungen [55, 57, 81]. Dies ist auch damit zu begründen, dass es zum einen viele verschiedene Rebsorten gibt und zum anderen sich diese auch in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden können [48, 267], was auch in dieser Arbeit dargestellt wurde (vgl. 5.2). Diese Variationen erschweren die Identifizierung der eigentlich trüberzeugenden Proteine.

Ein Großteil meiner Dissertation befasst sich mit der Untersuchung der Trübung und vor allem auch mit dessen Vermeidung. In diesem Zusammenhang soll die Wirkungsweise von Bentonit näher betrachtet werden, um bessere Testverfahren zur Ermittlung des Bentonitbedarfs zu entwickeln. Problematisch ist hier, dass die verschiedenen Bentonittypen sich in ihrer Wirkungsweise unterscheiden [193, 195-198]. Außerdem ist aktuell kein Testverfahren erhältlich, das eine realistische Einschätzung des Bentonitbedarfs gewährleistet. Vorwiegend wird bei diesen Tests der Gesamtproteingehalt erfasst und daraus die Bentonitdosage ermittelt. Diese Methoden führen zu einer Überschätzung des einzusetzenden Bentonits, was wiederum zu starken Verlusten in der Qualität und auch der Quantität der Weine führt.

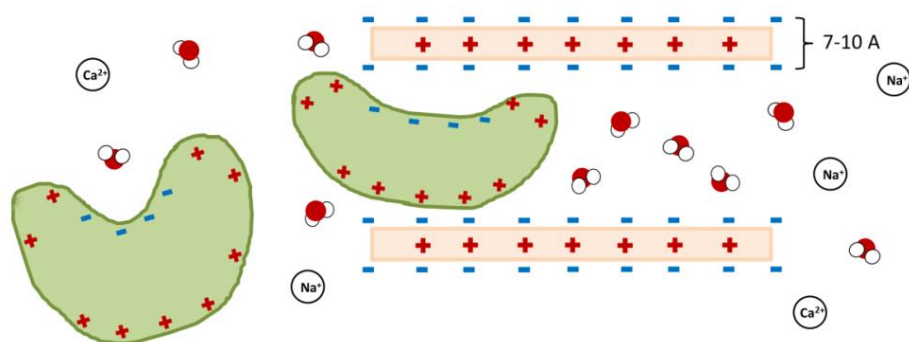
### **5.3.1 Wechselwirkungen von Bentonit bei der Weinschönung**

Bentonit besteht zum größten Teil aus dem Dreischichtsilikat Montmorillonit, das ihm seine Eigenschaft als Kationenaustauscher verleiht [193, 199]. Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle Proteine mit gleicher Intensität aus der Lösung entfernt werden (vgl. 4.4.3 & Tabelle 10). Als Ursache für diese Selektivität wurde die unterschiedliche Flexibilität bzw. Struktur der Proteine aufgeführt [128]. Auch die Größe scheint eine entscheidende Rolle zu spielen. Bei den Weinproteinen handelt es sich mehrheitlich um Proteine mit Molekulargewichten von 15 – 30 kDa (also relativ kleine Proteine). Dies konnte auch in den verschiedenen SDS-Gelen (vgl. Abbildung 22) und auch massenspektrometrischen Daten der verschiedenen Weine dargestellt werden (vgl. Tabelle 10) [7, 80, 271]. Diese Proteine wurden bevorzugt von dem Bentonit aus der entsprechenden Lösung entfernt (vgl. Tabelle 10). Genauso konnte gezeigt werden, dass die großen Proteine oberhalb von 250 kDa, also Glyko- bzw. Mannoproteine, nicht davon beeinflusst wurden. Gerade dieser Proteinklasse wird in der Literatur ein Schutz vor Trübung nachgesagt [58, 59, 61], vermutlich aufgrund ihres hohen Mannoseanteiles, der in der Lage ist mit Polyphenolen Komplexe zu bilden ähnlich wie auch andere Polysaccharide (vgl. 1.2.2). Somit scheint die Bentonitschönung



hier eine Selektivität zu zeigen, die bei der Entwicklung von Testverfahren berücksichtigt werden sollte.

Anhand eines Beispiels konnte die mögliche Wechselwirkung eines Proteins mit Bentonit beschrieben werden. Bei dieser  $\beta$ -Glukosidase scheint es sich um ein sehr flexibles Protein zu handeln, da es keine stabilisierenden Disulfidbrücken aufweist. Obwohl es mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa relativ groß ist, wird es in diesen Versuchen vollständig aus den Versuchswässern entfernt (vgl. Abbildung 24). Ähnliches wurde in der Arbeit von Sauvage *et al.* (2010) berichtet [10]. In dieser Arbeit wurde mit einer Bentonitreihe verfolgt, bei welcher Bentonitkonzentration welche Proteine aus der Modelllösung entfernt werden. Allerdings gibt diese Arbeit keine näheren Erklärungen für die gute Adsorbierbarkeit der  $\beta$ -Glukosidase an. Die präsentierte Lösung basiert auf der hohen Flexibilität des Enzyms aufgrund des Fehlens stabilisierender Disulfidbrücken [128]. Aufgrund dieser Flexibilität ist es möglich, dass sich das Protein in den Interlamellarraum des Bentonits einlagert. Ähnliches wurde auch von Rodriguez *et al.* (1977) für große flexible Proteine vorgeschlagen [198]. Eine Zusammenfassung dieser und der in meiner Arbeit postulierten Hypothese ist in Abbildung 45 veranschaulicht. Das gewölbte Molekül wird bei der Einlagerung zwischen die Lamellen breiter und flacher.



**Abbildung 45: Schematische Darstellung der Wechselwirkung von Bentonit mit der  $\beta$ -Glukosidase.** Dargestellt ist die leichte Konformationsänderung der  $\beta$ -Glukosidase (dargestellt in grün) zur besseren Einlagerung zwischen zwei Lamellen des Montmorillonits. In der Umgebung der Proteine befinden sich Wassermoleküle und austauschfähige Kationen.

Bislang wurden in Bezug auf die Adsorbierfähigkeit des Bentonits bevorzugt die Eigenschaften der Proteine wie Struktur, Ladung und Stabilität betrachtet. Allerdings spielen im Zusammenhang mit der Adsorbierbarkeit auch die Eigenschaften des Montmorillonits eine entscheidende Rolle. Dazu wurden verschiedene Versuche zur Adsorbierfähigkeit von Tonmineralen von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt, vorwiegend mit verschiedenen Schichtsilikaten [229, 230]. Dabei zeigte sich, dass das Montmorillonit bei diesen Versuchen das beste Ergebnis im Vergleich zu Kaolinit oder Illit lieferte [230, 272], womit sich auch die Beliebtheit dieses Materials als Adsorber erklären lässt. Bei diesem Mineral spielen die

komplexierten mono- und divalenten Kationen eine große Rolle, da sie Eigenschaften wie Quellung oder auch Adsorbierbarkeit beeinflussen [191, 193, 204, 273]. Dabei weist das Na<sup>+</sup>-Montmorillonit bzw. Na<sup>+</sup>-Bentonit die beste Wirksamkeit auf (vgl. 4.5.2) [191, 193, 204, 274]. Das nächstbessere Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Mischbentonit wird bislang vermehrt eingesetzt. Das Mischbentonit weist ähnlich wie auch das Na<sup>+</sup>-Bentonit starke Quellfähigkeiten auf, d.h. der Interlamellarraum kann sich durch die Einlagerung von Wassermolekülen weit ausdehnen und so eine bessere Zugänglichkeit der Proteine zur austauschfähigen Oberfläche bieten [193, 198, 204]. Aber nicht nur die innerkristallinen Eigenschaften des Bentonits können die Adsorptionsfähigkeit beeinflussen sondern auch verschiedene Umgebungsparameter wie Temperatur, pH-Wert oder Ionenstärke [188, 190, 191, 201, 202]. Es ist bekannt, dass die Wirksamkeit des Ca<sup>2+</sup>-Bentonits stark vom pH-Wert abhängt [193]. Bei diesem Bentonittyp erschwert die starke Komplexbildung des Ca<sup>2+</sup>-Ions an das Tonmineral die Adsorption [274]. Erst mit einer Erniedrigung des pH-Wertes unterhalb von pH 3,5 sind die Ladungen der Proteine ausreichend ausgeprägt, um das Ca<sup>2+</sup>-Ion von den Bindungsstellen zu verdrängen und an die Oberfläche des Minerals zu binden [7, 188]. Dieses Verhalten konnte auch bei den hier durchgeführten Versuchen beobachtet werden (vgl. 4.5.2).

Zur Bestätigung dieser Erkenntnisse müssten weitere Versuche auch mit isolierten Proteinen angeschlossen werden.

### 5.3.2 Proteinaufreinigung

Zur Isolierung weiterer Proteine sind große Mengen an Ausgangsmaterial erforderlich. Auch die Komplexität der Weinzusammensetzung erschwert eine einfache und schnelle Isolierung einzelner Proteine [13]. Bei der Aufreinigung des LTPs konnten besondere Merkmale des Proteins, wie der pI für die Versuche ausgenutzt werden (vgl. 4.1.2) [231]. Dies ist in vergleichbarer Weise für die übrigen Weinproteine aufgrund ihrer ähnlichen Molekulargewichte und pI's nicht möglich [7, 80, 103, 271]. Verschiedene Arbeitsgruppen publizierten hierzu mögliche Aufreinigungsprotokolle, die aber zum Teil nur eine geringe Reinheit der Proben versprachen. Dies wurde durch die Arbeit von Marangon *et al.* (2009) verdeutlicht [103]. Hier verweist der Autor auf ein Elutionsprofil und markierte Bereiche in denen verschiedene Proteinklassen zu finden sind. Dabei überschneiden sich einige dieser Bereiche, sodass in den darunter liegenden Peaks keine reine Lösung einzelner Proteine zu finden war.

Es finden sich auch Arbeiten, die mit relativ hoher Reinheit einzelne Proteine isolierten [63, 275]. In Anlehnung an diese Arbeiten konnten in Kombination verschiedener Trennsysteme einzelne Proteine isoliert werden (vgl. 4.6). Aufgrund ihres Molekulargewichts und ihrer

unterschiedlichen Ladungen (verschiedene Peaks bei der IEC) wird vermutet, dass es sich bei diesen Proteinen um verschiedene Isoformen der TLPs handelte (vgl. 4.6). Sofern die Ergebnisse der MS-Analyse der von mir isolierten Proteinlösungen vorliegen, ist es möglich weiterführende Versuche mit Bentonit und der Trübungsrelevanz dieser Proteine noch gezielter durchzuführen. Auch wäre hierzu die Expression einzelner Proteine denkbar. Allerdings ist bei den im Wein enthaltenen Proteinen nicht klar, ob durch die Weinbereitung die Proteine strukturell verändert wurden und dadurch zu einer erhöhten Trübungsbildung neigen. Dies könnte nicht mit exprimierten Proteinen nachverfolgt werden.

## 5.4 Weinstabilisierung

Aufbauend auf den Ergebnissen zur Proteinzusammensetzung in verschiedenen Weinen und nach der Untersuchung des Einflusses der Schönung, werden Strategien zur Weinstabilisierung verfolgt. Als Basis hierfür dienen die Ergebnisse aus den Versuchen mittels DSC (Difference Scanning Calorimetry, vgl. Abbildung 37 & Abbildung 42). Hier konnte ein Bereich zwischen 60 – 85 °C ermittelt werden, in dem die meisten Entfaltungseignisse eintraten. Dies ermöglicht eine Anknüpfung an die bislang in den Analyselaboren durchgeführten Wärmetests zur Bentonitbedarfsermittlung [184, 205]. Basierend auf diesen Untersuchungen wird zusammengefasst, dass die Invertase (ca. 70 kDa) eher einen geringen Anteil an der natürlichen Trubentstehung aufweist. Dieses Protein wurde in den entsprechenden Untersuchungen zur temperaturabhängigen Aggregation erst ab einer Temperatur von 83 °C nicht mehr im Überstand der Modelllösungen nachgewiesen (vgl. Abbildung 39 & Abbildung 43). Daher kann angenommen werden, dass dieses Protein bei der natürlich entstehenden Nachtrübung durch Temperaturen von bis zu 40 °C nicht denaturiert und auch nicht in die Aggregation übergeht. Dies bietet einen Hinweis darauf, dass ein Wärmetest zur Bentonitbedarfsermittlung oberhalb von 80 °C durchgeführt, mehr Proteine detektiert, aufgrund des zusätzlichen Gehalts der Invertase, als eigentlich bei der Trubentstehung beteiligt sind. Das DLR Mosel empfiehlt einen Wärmetest bei wenigstens 70 °C mit einer Inkubationszeit von 4 h durchzuführen [206]. Mein Vorschlag hingegen wäre einen Bereich von 70 – 80 °C zu wählen. Dadurch würde eine Überschönung basierend auf dem zusätzlichen Gehalt durch die Invertase ausgeschlossen werden, da dieses Protein erst ab einer Temperatur von 83 °C bzw. im Wein erst ab 85 °C denaturiert.

Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche wurde die zeitabhängige Aggregation nicht im Detail verfolgt, was für weitere Untersuchungen zu überlegen wäre. Allerdings sollte basierend auf den Ergebnissen der temperaturabhängigen Aggregation die Messungen der Stabilitätstest an verschiedenen Weinen überprüft werden. Dadurch ließe sich herausfinden,

ob die Unterschiede in den Proteinzusammensetzungen der Weine einen Einfluss auf den Bentonitbedarf ausüben. Auch sollten die Anteile der entsprechenden Polyphenole, die in diesen Weinen enthalten sind und dessen Einfluss auf die Aggregation betrachtet werden. Hier könnte es möglich sein, dass aufgrund eines bestimmten Verhältnisses von Polyphenolen zu Proteinen der Bentonitbedarf bestimmt werden könnte. Mit darauf aufbauenden Versuchen und genaueren Analysen der Proteinzusammensetzung im Trub und der verbleibenden Proteine im Wein ist es denkbar eine standardisierte Methode zur Messung der Trübungsneigung zu etablieren.

Bislang wurde der Einfluss der Polysaccharide, eine weitere wichtige Gruppe im Wein eher vernachlässigt, daher wird im Folgenden vermehrt auf deren Einfluss bei der Trübung eingegangen.

#### **5.4.1 Trübung und Polysaccharide**

Es ist bekannt, dass Mannoproteine eine protektive Wirkung auf die Entstehung der Trübung ausüben, da sie in der Lage sind mit Polyphenolen bzw. Tanninen über Wasserstoffbrücken Komplexe zu bilden [58, 61, 170]. Dadurch werden die Polyphenole abgeschirmt und können nicht mehr mit den Proteinen in Wechselwirkung treten und Aggregate bilden. Ebenso werden verschiedene Polysaccharide eingesetzt um Weine zu schönen bzw. die Tartratbildung zu verhindern [12, 40]. Polysaccharide sind in der Lage Chelatkomplexe mit Kationen zu bilden, die als Bindungspartner zur Ausfällung der Weinsäure nicht mehr zur Verfügung stehen (vgl. 1.2.2). Dies legt nahe, diese Zusammenhänge auf die Weinstabilisierung zu untersuchen.

In der Literatur sind bereits einige Untersuchungen zu finden, die den Einfluss verschiedener Polysaccharide auf die Stabilität verschiedener Modellsysteme testeten [8, 37, 161, 248, 270]. In diesem Zusammenhang untersuchten Siebert *et al.* (1996) unter anderem den Einfluss von Pektin und Arabinogalactan auf die Trubentstehung und fanden heraus, dass diese beiden Zusatzstoffe in verschiedenen Getränken darauf eine reduzierende Wirkung hatten [37]. Diese Beobachtungen wurden von de Freitas *et al.* (2003) in ähnlicher Form ebenfalls veröffentlicht, allerdings wurde in dieser Arbeitsgruppe zusätzlich noch die Wechselwirkung zwischen Tanninen und Proteinen verfolgt [248].

Bei den in meiner Arbeit durchgeführten Versuchen ist auffällig, dass sich in Abhängigkeit von der Versuchsumgebung abweichende Ergebnisse generieren ließen. In der ersten Versuchsreihe sind die zugefügten Komponenten in einem Citratpuffer mit einem pH-Wert von 3,5 angesetzt (vgl. Abbildung 34), ähnlich dem durchschnittlichen pH-Wert für den Wein [7, 169]. Damit war es möglich, die Wechselwirkung von Proteinen und den verschiedenen

Polysacchariden zu betrachten. In einem zweiten Ansatz wurden diese Wechselwirkungen in einer Echtweinumgebung verfolgt (vgl. Abbildung 40). Auch hier wurde der gleiche pH-Wert von 3,5 eingestellt. Der größte Unterschied zwischen diesen beiden Ansätzen ist das Vorhandensein von traubeneigenen Polyphenolen in der Echtweinumgebung (vgl. Tabelle 14). Die Caftar säure, eine farblose Phenolcarbonsäure ist hier mit dem größten Anteil von 64 % enthalten (vgl. Tabelle 14). Ähnliche Anteile finden sich auch in anderen Weißweinen [276].

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Systeme, fällt auf, dass alle eingesetzten Stoffe ein unterschiedliches Verhalten in Citratpuffer und Echtweinsystem zeigen. Einer der wichtigsten Unterschiede ist der Beginn der Aggregation (Anstieg der Partikelgröße). In Citratpuffer setzte diese erst bei einer Temperatur von ca. 50 °C ein (Abbildung 34), während sich dies im Permeat bereits bei Temperaturen zwischen ca. 32 °C – 40 °C nachweisen ließ (Abbildung 40). Diese Daten bestätigten die Erfahrungswerte, dass eine Lagerung von Wein bei warmen Sommertemperaturen durchaus zu Nachtrübungen führen kann, sofern der Wein vorher nicht ausreichend stabilisiert wurde. Diese Hinweise bestätigen sich auch mit anderen Arbeiten [10, 56, 174].

Wenn man nun ergänzend den Einfluss der Polysaccharide auf die Trübung verfolgt, so beeinflussen diese die Trubbildung auf unterschiedliche Art (vgl. Abbildung 34). Gerade Carboxymethylcellulose (CMC) und Rhamnogalacturonan zeigen sehr gegensätzliche Ergebnisse in dem Citratpuffersystem. Während CMC zu einem massiven Anstieg der Partikelgröße führte, konnte mit Rhamnogalacturonan eine Aggregation verhindert werden, sodass bei dem Wärmetest zur Trubbestimmung (durchgeführt von Frau Miriam Meier, Hochschule Geisenheim) die Probenlösung als stabilisiert galt. Die beiden anderen Polysaccharide, Arabinogalactan (Abbildung 35 C, roter Kurvenverlauf) und Gummi arabicum (Abbildung 35 B, grüner Kurvenverlauf) wiesen auch eine reduzierende Wirkung auf die Partikelgröße auf, allerdings nur in niedrigen Konzentrationen zugesetzt. Eine Stabilisierung trat hierdurch nicht ein. Bei diesen Versuchen konnte in allen Fällen ein Anstieg der Aggregation ab einer Temperatur von 50 °C beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wiesen die Ergebnisse der Proben gemessen in Rieslingpermeat interessante Unterschiede in der Temperaturabhängigkeit der Aggregation auf. Während CMC und Rhamnogalacturonan in Citratpuffer gelöst noch auffällige Kurvenverläufe zeigten, verliefen sie nun mit dem Kontrollversuch ohne Polysaccharide sehr ähnlich. Auch der Beginn der Aggregation ist bei der gleichen Temperatur von ca. 36 °C zu beobachten. Hier zeigen diese beiden Stoffe keine markanten Einflüsse (Abbildung 40). Allerdings scheint CMC eine Sedimentation der Partikel zu verhindern. Dagegen sind die beiden anderen Polysaccharide auffällig. Während bei Arabinogalactan die Aggregation bereits bei ca. 32 °C einsetzt, wird

sie durch Gummi arabicum auf eine Temperatur von ca. 40 °C verschoben. Für Gummi arabicum wurde bereits in anderen Arbeitsgruppen eine reduzierende Wirkung auf die Aggregation beschrieben und bestätigten somit auch diese Ergebnisse [8, 248, 270]. Allerdings wurden in den zitierten Arbeiten etwas andere Modellsysteme bestehend aus BSA und Tanninen gewählt. In all diesen Versuchen erwies sich Pektin als ein gutes Polysaccharid zur Stabilisierung der Modelllösung [8, 161, 248, 270]. Dies konnte auch hier mit Rhamnogalacturonan (Pektinbestandteil) demonstriert werden, allerdings zeigte es auch nur in den Versuchen mit Citratpuffer die gute reduzierende Wirkung auf die Trübung (vgl. 4.7.1). Die destabilisierende Wirkung des Arabinogalactans ist in dieser Weise noch nicht dokumentiert worden. Stattdessen wurde ihm in der Arbeit von de Freitas *et al.* (2003) eine stabilisierende Wirkung nachgewiesen, allerdings nicht in der Effektivität wie Pektin oder Gummi arabicum [248]. Bei Waters *et al.* (1994) galt es noch als „haze protective factor“ [59]. Hierzu ist zu sagen, dass die stabilisierende Wirkung auch im Modellsystem ohne Polyphenole beobachtet wurde (Abbildung 35), aber sich diese nicht im Echtweinsystem bestätigte (Abbildung 40). Diese Bedingungen wurden in den anderen Arbeiten nicht getestet.

Durch diese Untersuchungen konnten auf die Trübung stabilisierende Effekte der Polysaccharide bestätigt werden. Allerdings zeigen die Versuche im Echtweinsystem, mit den eigentlichen Weinproteinen anstatt von BSA auch, dass es wichtig ist, dies ebenfalls zu überprüfen, da sich die Trubbildung anders verhält. Als Einflussfaktoren können an dieser Stelle zum einen die Struktur, und die Stabilität von Proteinen sowie der Polyphenolgehalt und auch die Polysaccharidzusammensetzung aufgeführt werden.

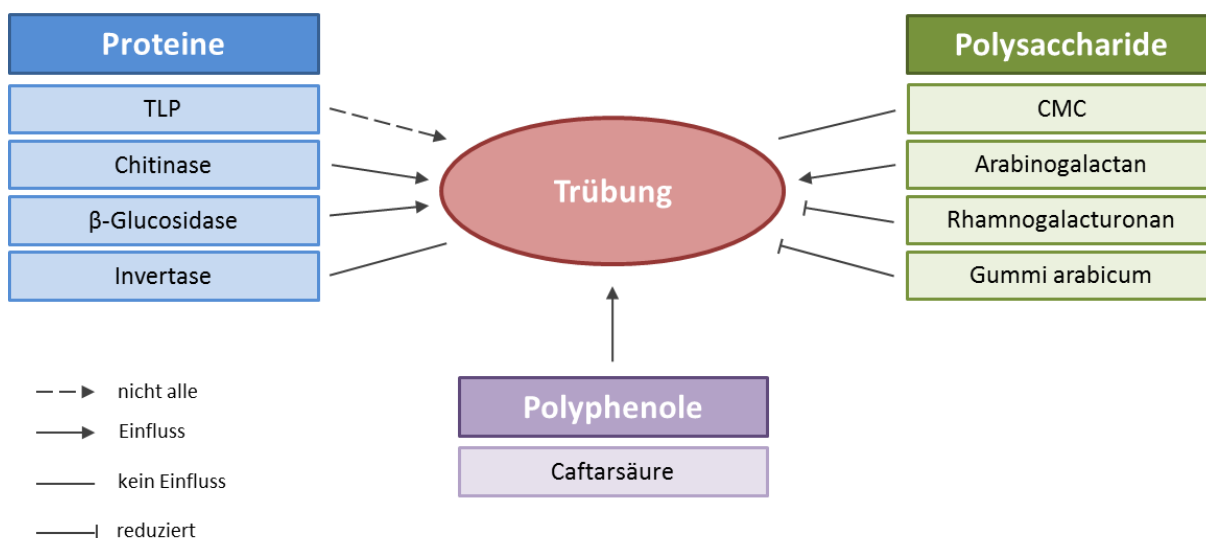
#### **5.4.2 Betrachtung potentiell trübungsrelevanter Einflussfaktoren**

Ein weiterer wichtiger Punkt, der bei den Untersuchungen betrachtet wurde, ist der Einfluss der Polysaccharide auf die Temperaturstabilität der Proteine. Mittels der DSC-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Schmelztemperaturen der detektierten Ereignisse nicht variierten, lediglich der Verlauf der Basislinie änderte sich, was auf den Einfluss der Polysaccharide zurückzuführen war. Bei den Proben im Echtweinsystem konnte das Eintreten starker Aggregation ab ca. 60 °C beobachtet werden. Hier sind die Messungen mit CMC nicht auswertbar, da das Messsignal durch Streuungen gestört ist (vgl. Abbildung 42). Der Zusatz des CMC und dessen Wechselwirkung mit den weiteren Weinkomponenten, wie den Polyphenolen, beeinflussen die Messung.

Durch diese Versuche konnte der Einfluss der Trubbildung bzw. Aggregation auf die Proteinzusammensetzung in Modellsystemen untersucht werden. Die Ergebnisse aus den

beiden Modellsystemen mit Citratpuffer und Rieslingpermeat ähneln sich. Die bei den DSC-Ergebnissen detektierten Temperaturmaxima wurden bei den Wärmestabilitätstests genauer untersucht (vgl. Abbildung 39 & Abbildung 43). In beiden Versuchsreihen konnten ähnliche Erkenntnisse gewonnen werden (vgl. Abbildung 39 und Abbildung 43). Unter beiden Versuchsbedingungen ist die Bande bei ca. 70 kDa, bei welcher die Invertase vermutet wird, ab einer Temperatur von 83 °C bzw. 85 °C nicht mehr im Überstand der Proben zu erkennen. Ansonsten kann man aus diesen Ergebnissen deutlich sehen, dass nicht alle in der Lösung befindlichen TLPs (20 – 25 kDa) an der Entstehung der Trübung beteiligt sind. Gerade in diesem Fall sollten massenspektrometrische Untersuchungen angeschlossen werden, da allein bei den in dieser Arbeit untersuchten Weinen acht verschiedene Isoformen der TLPs detektiert wurden. Wie bereits erwähnt scheint die Invertase zwar zu geringen Teilen bei niedrigeren Temperaturen an der Aggregation beteiligt zu sein, allerdings auch erst vollständig ab einer Temperatur von ca. 83 °C.

Entscheidend für weiterführende Versuche ist, dass erkannt wurde, dass nur einzelne Proteine im Molekulargewichtsbereich von 20 – 30 kDa wie die TLPs und Chitinasen an der Trubbildung beteiligt zu sein scheinen, was diese Erkenntnisse von Dufrechou *et al.* (2010) bestätigt [174]. Die generelle Aussage, dass alle TLPs trübungsrelevant sind, ist daher nicht exakt zutreffend. Allerdings müssten auch hier weitere Analysen zur Identifizierung der beteiligten Proteine angeschlossen werden. Damit könnte ein gezieltes Aufreinigungsprotokoll dieser Proteine aufgebaut werden.



**Abbildung 46: Einfluss der untersuchten Weininhaltsstoffe auf die Trubentstehung.** Dargestellt sind wesentliche Komponenten, die von mir bei der Untersuchung der Trübung berücksichtigt wurden. Die Bedeutung der Pfeile ist in der Legende in der Abbildung dargestellt. TLP: Thaumatin-ähnliche Proteine; CMC: Carboxymethylcellulose.

In der Abbildung 46 sind die getesteten Faktoren und dessen Einfluss auf die Trübung zusammengefasst. Hier zeigt sich dass die drei Hauptkomponenten, Proteine,

Polysaccharide und Polyphenole die Trübung auf verschiedenen Weisen beeinflussen. Aus der Kombination der einzelnen Versuchsergebnisse wurde der Einfluss einzelner Proteine wie den TLPs und Chitinasen sowie der Polyphenole und Polysaccharide wie Arabinogalactan eine Rolle bei der Entstehung von Trub detektiert. Während auch herausgearbeitet wurde, dass Rhamnogalacturonan und Gummi arabicum eine inhibierende Wirkung aufweisen, wenn auch zum Teil nur im Modellsystem.

Dabei wurde in diesem Zusammenhang der Einfluss von Schwefelzusätzen bislang noch nicht näher erwähnt. Eine Untersuchung von Pocock *et al.* (2007) zeigte die Wirkung von Sulfat auf die Trubbildung. In diesen Versuchen wurden Sulfatkonzentration von 0,1 – 1,5 g/l in verschiedenen Modelllösungen getestet, die zu Trübungen führten [162]. Allerdings werden Sulfatsalze, bevorzugt Ammoniumsulfat auch für die Fällung von Proteinen verwendet. Die durch die Sulfationen bewirkte Verdrängung der Hydrathülle könnte eine bessere Zugänglichkeit der Aggregationspartner, wie den Polyphenole zu den Proteinen bewirkt haben, wodurch es zur Trubbildung kam. Hier wäre es auch denkbar bei den Untersuchungen zur Trubentstehung den Einfluss von Sulfit, als weitere Schwefelquelle zu untersuchen.

In dem beschriebenen Echtweinsystem der Versuche zur Weinstabilisierung sind geringe Schwefelmengen im Permeat enthalten (Freie SO<sub>2</sub>: nicht nachweisbar, Gesamt-SO<sub>2</sub>: <10 mg/l; mittels Titration unter Verwendung einer Jodid-Jodat-Lösung, durchgeführt an der Hochschule Geisenheim), die noch nicht deklarierungspflichtig wären. Daher wird davon ausgegangen, dass diese Konzentrationen noch keinen Einfluss auf die Aggregation ausübten, allerdings sollte auch dies in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

Vielleicht bieten die hiesigen Erkenntnisse neue Ansätze zur Etablierung spezifischer Testverfahren zur Trübungsneigung bzw. dem Bentonitbedarf von Wein. Gerade in diesem Zusammenhang sollten die bislang durchgeführten Wärmetests überdacht werden, um eine einheitliche Empfehlung zu geben. Durch das gezielte Identifizieren der relevanten Proteine und deren Isolierung könnten immunologische Testverfahren denkbar sein. Ähnliches wurde bereits durch die Firma Sofralab Technologies (Épernay, Frankreich) mit dem Immuno Test versucht, wobei dieser Test auch eher generell TLPs und Chitinasen detektierte. Vielleicht ist es auch möglich über den Anteil dieser speziellen Proteine eine Aussage über den Bentonit- bzw. Schönungsbedarf zu gewinnen. So könnten standardisierte Verfahren eingesetzt werden und unterschiedliche Bedarfsangaben je nach Analyselabor vermieden werden.



## 6 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Versuche zur Charakterisierung und Identifizierung von Weinproteinen durchgeführt. Dabei wurde die Vielfältigkeit allein der Proteinzusammensetzung der Moste und Weine dargestellt.

Sowohl im Zusammenhang mit der Untersuchung der Weinunverträglichkeit als auch zu dem Thema Wein und Trübung konnte herausgearbeitet werden, dass nicht nur die Proteine eine große Rolle spielen, sondern dass viele andere Faktoren wie Polyphenole, Polysaccharide, Sulfite (um nur einige zu nennen) immer mit berücksichtigt werden müssen. Erst dadurch kann annähernd ein gesamtheitliches Bild und die Komplexität rund um das Thema Wein dargestellt werden.

## 7 Literatur

- [1] E. Rühl, J. Schmidt, Die Rebe als Kulturpflanze, Kulturgut Rebe und Wein (Hrsg H. König, H. Decker), (2013) 63-72.
- [2] G. Styger, B. Prior, F.F. Bauer, Wine flavor and aroma, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38 (2011) 1145-1159.
- [3] J. Tao, S.I. Dykes, P.A. Kilmartin, Effect of SO<sub>2</sub> concentration on polyphenol development during red wine micro-oxygenation, *J Agric Food Chem*, 55 (2007) 6104-6109.
- [4] A. Gambuti, D. Strollo, A. Erbaggio, L. Lecce, L. Moio, Effect of winemaking practices on color indexes and selected bioactive phenolics of aglianico wine, *J Food Sci*, 72 (2007) S623-S628.
- [5] G.H. Fleet, Yeast interactions and wine flavour, *Int J Food Microbiol*, 86 (2003) 11-22.
- [6] M. PuigDeu, E. LopezTamames, S. Buxaderas, M.C. TorreBoronat, Influence of must racking and fining procedures on the composition of white wine, *Vitis*, 35 (1996) 141-145.
- [7] R.B. Ferreira, M.A. Picarra-Pereira, S. Monteiro, V.B. Loureiro, A.R. Teixeira, The wine proteins, *Trends in Food Science & Technology*, 12 (2002) 230-239.
- [8] N. Mateus, E. Carvalho, C. Luis, V. de Freitas, Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates, *Anal Chim Acta*, 513 (2004) 135-140.
- [9] E. Vassilopoulou, A. Karathanos, G. Siragakis, S. Giavi, A. Sinaniotis, N. Douladiris, M. Fernandez-Rivas, M. Clausen, N.G. Papadopoulos, Risk of allergic reactions to wine, in milk, egg and fish-allergic patients, *Clin Transl Allergy*, 1 (2011) 10.
- [10] F.X. Sauvage, B. Bach, M. Moutounet, A. Vernhet, Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite, *Food Chem*, 118 (2010) 26-34.
- [11] H.J. Köhler, M. Geßner, A. Nagel-Derr, J. Burkert, Stabilität durch CMC?, *Das deutsche Weinmagazin*, 22 (2011) 22-26.
- [12] A. Rodrigues, J.M. Ricardo-Da-Silva, C. Lucas, O. Laureano, Influence of Fining and Tartaric Stabilisation Procedures on White Wine Mannoprotein Content, *S Afr J Enol Vitic*, 33 (2012) 88-94.
- [13] J.B. German, R.L. Walzem, The health benefits of wine, *Annu Rev Nutr*, 20 (2000) 561-593.
- [14] M.A. Ducasse, R.M. Canal-Llauberes, M. de Lumley, P. Williams, J.M. Souquet, H. Fulcrand, T. Doco, V. Cheynier, Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines, *Food Chem*, 118 (2010) 369-376.
- [15] R. Gilly, D. Mara, S. Oded, K. Zohar, Resveratrol and a novel tyrosinase in Carignan grape juice, *J Agric Food Chem*, 49 (2001) 1479-1485.
- [16] S.V. Rendig, J.D. Symons, J.C. Longhurst, E.A. Amsterdam, Effects of red wine, alcohol, and quercetin on coronary resistance and conductance arteries, *J Cardiovasc Pharm*, 38 (2001) 219-227.
- [17] S.L. Kamholz, Wine, spirits and the lung: good, bad or indifferent?, *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 117 (2006) 129-145; discussion 145.
- [18] A. Todaro, R. Palmeri, R.N. Barbagallo, P.G. Pifferi, G. Spagna, Increase of trans-resveratrol in typical Sicilian wine using beta-Glucosidase from various sources, *Food Chem*, 107 (2008) 1570-1575.

- [19] M.A. Baffi, T. Tobal, J.H. Lago, M. Boscolo, E. Gomes, R. Da-Silva, Wine aroma improvement using a beta-glucosidase preparation from *Aureobasidium pullulans*, *Appl Biochem Biotechnol*, 169 (2013) 493-501.
- [20] M.G. Lambrechts, I.S. Pretorius, Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review, *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21 (2000).
- [21] S.K. Park, A.C. Noble, Monoterpenes and Monoterpene Glycosides in Wine Aromas, *Acs Sym Ser*, 536 (1993) 98-109.
- [22] A. Rapp, I. Suckrau, G. Versini, Studies on Grape and Wine Aroma - Contribution to the Characterization of Different Neutral Vine Varieties (Silvaner, Weissburgunder, Rulander), *Z Lebensm Unters For*, 197 (1993) 249-254.
- [23] P. van Rensburg, I.S. Pretorius, Enzymes in Winemaking: Harnessing Natural Catalysts for Efficient Biotransformations - A Review, *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21 (2000) 52-73.
- [24] Y.Z. Gunata, C.L. Bayonove, R.L. Baumes, R.E. Cordonnier, The Aroma of Grapes .1. Extraction and Determination of Free and Glycosidically Bound Fractions of Some Grape Aroma Components, *J Chromatogr*, 331 (1985) 83-90.
- [25] A.P. Aryan, B. Wilson, C.R. Strauss, P.J. Williams, The Properties of Glycosidases of *Vitis-Vinifera* and a Comparison of Their Beta-Glucosidase Activity with That of Exogenous Enzymes - an Assessment of Possible Applications in Enology, *Am J Enol Viticult*, 38 (1987) 182-188.
- [26] Z. Gunata, S. Bitteur, J.M. Brillouet, C. Bayonove, R. Cordonnier, Sequential Enzymic-Hydrolysis of Potentially Aromatic Glycosides from Grape, *Carbohydr Res*, 184 (1988) 139-149.
- [27] Y.Z. Gunata, C.L. Bayonove, C. Tapiero, R.E. Cordonnier, Hydrolysis of Grape Monoterpenyl Beta-D-Glucosides by Various Beta-Glucosidases, *J Agric Food Chem*, 38 (1990) 1232-1236.
- [28] P. Tamborra, N. Martino, M. Esti, Laboratory tests on glycosidase preparations in wine, *Anal Chim Acta*, 513 (2004) 299-303.
- [29] S. Vidal, P. Williams, T. Doco, M. Moutounet, P. Pellerin, The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization, *Carbohydr Polym*, 54 (2003) 439-447.
- [30] A. Arnous, A.S. Meyer, Quantitative prediction of cell wall polysaccharide composition in grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins from acid hydrolysis monosaccharide profiles, *J Agric Food Chem*, 57 (2009) 3611-3619.
- [31] L. Martinez-Lapuente, Z. Guadalupe, B. Ayestaran, M. Ortega-Heras, S. Perez-Magarino, Changes in Polysaccharide Composition during Sparkling Wine Making and Aging, *J Agric Food Chem*, (2013).
- [32] S. Vidal, P. Williams, M.A. O'Neill, P. Pellerin, Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides, *Carbohydr Polym*, 45 (2001) 315-323.
- [33] F. Brissonnet, A. Maujean, Identification of Some Foam-Active Compounds in Champagne Base Wines, *Am J Enol Viticult*, 42 (1991) 97-102.
- [34] A. Rosch, CMC- Neue Möglichkeit der Weinstabilisierung, *Die Winzer-Zeitschrift*, März (2010) 51-53.
- [35] P. Pellerin, S. Vidal, P. Williams, J.M. Brillouet, Characterization of 5 Type-Ii Arabinogalactan-Protein Fractions from Red Wine of Increasing Uronic-Acid Content, *Carbohydr Res*, 277 (1995) 135-143.
- [36] E. Haslam, Polyphenol-Protein Interactions, *Biochemical Journal*, 139 (1974) 285-288.

- [37] K.J. Siebert, A. Carrasco, P.Y. Lynn, Formation of protein-polyphenol haze in beverages, *J Agric Food Chem*, 44 (1996) 1997-2005.
- [38] J.P. Vincken, H.A. Schols, R.J.F.J. Oomen, M.C. McCann, P. Ulvskov, A.G.J. Voragen, R.G.F. Visser, If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture, *Plant Physiol*, 132 (2003) 1781-1789.
- [39] Z. Guadalupe, O. Martinez-Pinilla, A. Garrido, J.D. Carrillo, B. Ayestaran, Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and size exclusion chromatography (SEC), *Food Chem*, 131 (2012) 367-374.
- [40] P. Pellerin, T. Doco, G.R. Scollary, The influence of wine polymers on the spontaneous precipitation of calcium tartrate in a model wine solution, *Int J Food Sci Tech*, 48 (2013) 2676-2682.
- [41] T. Ueno, S. Yokota, T. Kitaoka, H. Wariishi, Conformational changes in single carboxymethylcellulose chains on a highly oriented pyrolytic graphite surface under different salt conditions, *Carbohydr Res*, 342 (2007) 954-960.
- [42] H. Claus, S. Tenzer, M. Sobe, M. Schlander, H. Konig, J. Frohlich, Effect of carboxymethyl cellulose on tartrate salt, protein and colour stability of red wine, *Aust J Grape Wine R*, 20 (2014) 186-193.
- [43] J.F. Su, Z. Huang, X.Y. Yuan, X.Y. Wang, M. Li, Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions, *Carbohydr Polym*, 79 (2010) 145-153.
- [44] J. Mocak, P. Jurasek, G.O. Phillips, S. Varga, E. Casadei, B.N. Chikemai, The classification of natural gums. X. Chemometric characterization of exudate gums that conform to the revised specification of the gum arabic for food use, and the identification of adulterants, *Food Hydrocolloid*, 12 (1998) 141-150.
- [45] A. Gallina, E. Fiorese, P. Pastore, F. Magno, Identification and semi-quantitative determination of gum arabic in wines by GC-MS and size exclusion chromatography, *Ann Chim-Rome*, 94 (2004) 177-184.
- [46] G. Luck, H. Liao, N.J. Murray, H.R. Grimmer, E.E. Warminski, M.P. Williamson, T.H. Lilley, E. Haslam, Polyphenols, astringency and proline-rich proteins, *Phytochemistry*, 37 (1994) 357-371.
- [47] C.A. Street, D.M.W. Anderson, Refinement of Structures Previously Proposed for Gum Arabic and Other Acacia Gum Exudates, *Talanta*, 30 (1983) 887-893.
- [48] P. Wigand, S. Tenzer, H. Schild, H. Decker, Analysis of protein composition of red wine in comparison with rose and white wines by electrophoresis and high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), *J Agric Food Chem*, 57 (2009) 4328-4333.
- [49] B. Ayestaran, Z. Guadalupe, D. Leon, Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process, *Anal Chim Acta*, 513 (2004) 29-39.
- [50] P. Weber, H. Steinhart, A. Paschke, Investigation of the allergenic potential of wines fined with various proteinogenic fining agents by ELISA, *J Agric Food Chem*, 55 (2007) 3127-3133.
- [51] P. Weber, H. Kratzin, K. Brockow, J. Ring, H. Steinhart, A. Paschke, Lysozyme in wine: A risk evaluation for consumers allergic to hen's egg, *Molecular nutrition & food research*, 53 (2009) 1469-1477.
- [52] I. Schneider, Allergene Stoffe im Wein – gibt es eine Lösung? Teil 1, *Das deutsche Weinmagazin*, 12 (2014) 34-36.
- [53] E. Dorrestein, R.B. Ferreira, O. Laureano, A.R. Teixeira, Electrophoretic and Fplc Analysis of Soluble-Proteins in 4 Portuguese Wines, *Am J Enol Viticult*, 46 (1995) 235-242.

- [54] T. Dambrouck, R. Marchal, L. Marchal-Delahaut, M. Parmentier, A. Maujean, P. Jeandet, Immunodetection of proteins from grapes and yeast in a white wine, *J Agric Food Chem*, 51 (2003) 2727-2732.
- [55] M. Esteruelas, P. Poinssaut, N. Sieczkowski, S. Manteau, M.F. Fort, J.M. Canals, F. Zamora, Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine, *Food Chem*, 113 (2009) 28-35.
- [56] R.J. Falconer, M. Marangon, S.C. Van Sluyter, K.A. Neilson, C. Chan, E.J. Waters, Thermal stability of thaumatin-like protein, chitinase, and invertase isolated from Sauvignon blanc and Semillon juice and their role in haze formation in wine, *J Agric Food Chem*, 58 (2010) 975-980.
- [57] M. Marangon, S.C. Van Sluyter, K.A. Neilson, C. Chan, P.A. Haynes, E.J. Waters, R.J. Falconer, Roles of grape thaumatin-like protein and chitinase in white wine haze formation, *J Agric Food Chem*, 59 (2011) 733-740.
- [58] I.V.S. Dupin, B.M. McKinnon, C. Ryan, M. Boulay, A.J. Markides, G.P. Jones, P.J. Williams, E.J. Waters, *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action, *J Agric Food Chem*, 48 (2000) 3098-3105.
- [59] E.J. Waters, P. Pellerin, J.M. Brillouet, A Wine Arabinogalactan-Protein That Reduces Heat-Induced Wine Protein Haze, *Biosci Biotech Bioch*, 58 (1994) 43-48.
- [60] F. Goncalves, A. Heyraud, M.N. De Pinho, M. Rinaudo, Characterization of white wine mannoproteins, *J Agric Food Chem*, 50 (2002) 6097-6101.
- [61] E.J. Waters, P. Pellerin, J.M. Brillouet, A *Saccharomyces* Mannoprotein That Protects Wine from Protein Haze, *Carbohydr Polym*, 23 (1994) 185-191.
- [62] A. Caridi, Enological functions of parietal yeast mannoproteins, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89 (2006) 417-422.
- [63] W. Pornaveewat, T. Takayanagi, K. Yokotsuka, Purification and Properties of Invertase from Muscat-Bailey-a Grapes, *J Ferment Bioeng*, 78 (1994) 288-292.
- [64] S.P. Robinson, C. Davies, Molecular biology of grape berry ripening, *Aust J Grape Wine R*, 6 (2000) 175-188.
- [65] A. Stintzi, T. Heitz, V. Prasad, S. Wiedemannmerdinoglu, S. Kauffmann, P. Geoffroy, M. Legrand, B. Fritig, Plant Pathogenesis-Related Proteins and Their Role in Defense against Pathogens, *Biochimie*, 75 (1993) 687-706.
- [66] J.P. Derckel, L. Legendre, J.C. Audran, B. Haye, B. Lambert, Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L): Five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues, *Plant Sci*, 119 (1996) 31-37.
- [67] A. Kasprzewska, Plant chitinases - Regulation and function, *Cell Mol Biol Lett*, 8 (2003) 809-824.
- [68] S.P. Robinson, A.K. Jacobs, I.B. Dry, A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening, *Plant Physiol*, 114 (1997) 771-778.
- [69] S. Vincenzi, A. Curioni, Anomalous electrophoretic behavior of a chitinase isoform from grape berries and wine in glycol chitin-containing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels, *Electrophoresis*, 26 (2005) 60-63.
- [70] E.J. Waters, N.J. Shirley, P.J. Williams, Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins, *J Agric Food Chem*, 44 (1996) 3-5.
- [71] J.J. Beintema, Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins, *FEBS Lett*, 350 (1994) 159-163.

- [72] J.P. Derckel, J.C. Audran, B. Haye, B. Lambert, L. Legendre, Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and beta-1,3-glucanases of ripening grape berries, *Physiol Plantarum*, 104 (1998) 56-64.
- [73] R. Velazhahan, K.S. Datta, S. Muthukrishnan, The PR-5 Family: Thaumatin-Like Proteins, Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (eds) *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press, Boca Raton, (1999) 107-129.
- [74] J. Hejgaard, S. Jacobsen, I. Svendsen, Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain, *FEBS Lett*, 291 (1991) 127-131.
- [75] X.Y. Ye, H.X. Wang, T.B. Ng, First chromatographic isolation of an antifungal thaumatin-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity, *Biochem Biophys Res Commun*, 263 (1999) 130-134.
- [76] H. Wang, T.B. Ng, Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits, *Phytochemistry*, 61 (2002) 1-6.
- [77] V.S. Ho, J.H. Wong, T.B. Ng, A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana, *Peptides*, 28 (2007) 760-766.
- [78] S. Ebrahim, K. Usha, B. Singh, Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism, *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, Extremadura: Formatex Research Center, v. 1 (2011) 1043-1054.
- [79] L. Edens, L. Heslinga, R. Klok, A.M. Ledebouer, J. Maat, M.Y. Toonen, C. Visser, C.T. Verrips, Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*, *Gene*, 18 (1982) 1-12.
- [80] R. Flamini, M. De Rosso, Mass spectrometry in the analysis of grape and wine proteins, *Expert Rev Proteomic*, 3 (2006) 321-331.
- [81] K.F. Pocock, Y. Hayasaka, M.G. McCarthy, E.J. Waters, Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity, *J Agric Food Chem*, 48 (2000) 1637-1643.
- [82] E.A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, M. Ispano, E. Scibola, C. Trambaioli, M.G. Giuffrida, R. Ansaloni, J. Godovac-Zimmermann, A. Conti, D. Fortunato, C. Ortolani, The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein, *J Allergy Clin Immunol*, 106 (2000) 744-751.
- [83] E. Gasteiger, Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. , *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, (2005) 571-607.
- [84] B.P. Cammue, K. Thevissen, M. Hendriks, K. Eggermont, I.J. Goderis, P. Proost, J. Van Damme, R.W. Osborn, F. Guerbette, J.C. Kader, et al., A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins, *Plant Physiol*, 109 (1995) 445-455.
- [85] J.C. Kader, Lipid-transfer proteins in plants, *Annu Rev Plant Phys*, 47 (1996) 627-654.
- [86] C.S. Cheng, D. Samuel, Y.J. Liu, J.C. Shyu, S.M. Lai, K.F. Lin, P.C. Lyu, Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense, *Biochemistry*, 43 (2004) 13628-13636.
- [87] J.C. Kader, Lipid-transfer proteins: A puzzling family of plant proteins, *Trends Plant Sci*, 2 (1997) 66-70.
- [88] T.N. Petersen, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, *Nat Methods*, 8 (2011) 785-786.

- [89] B. Heinemann, K.V. Andersen, P.R. Nielsen, L.M. Bech, F.M. Poulsen, Structure in solution of a four-helix lipid binding protein, *Protein Sci*, 5 (1996) 13-23.
- [90] D. Charvolin, J.P. Douliez, D. Marion, C. Cohen-Addad, E. Pebay-Peyroula, The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution, *Eur J Biochem*, 264 (1999) 562-568.
- [91] G.W. Han, J.Y. Lee, H.K. Song, C. Chang, K. Min, J. Moon, D.H. Shin, M.L. Kopka, M.R. Sawaya, H.S. Yuan, T.D. Kim, J. Choe, D. Lim, H.J. Moon, S.W. Suh, Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography, *Journal of molecular biology*, 308 (2001) 263-278.
- [92] D. Samuel, Y.J. Liu, C.S. Cheng, P.C. Lyu, Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*), *J Biol Chem*, 277 (2002) 35267-35273.
- [93] G. Salcedo, R. Sanchez-Monge, A. Diaz-Perales, G. Garcia-Casado, D. Barber, Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens, *Clin Exp Allergy*, 34 (2004) 1336-1341.
- [94] N. Pasquato, R. Berni, C. Folli, S. Folloni, M. Cianci, S. Pantano, J.R. Helliwell, G. Zanotti, Crystal structure of peach Pru p 3, the prototypic member of the family of plant non-specific lipid transfer protein pan-allergens, *J Mol Biol*, 356 (2006) 684-694.
- [95] E. Vassilopoulou, N. Rigby, F.J. Moreno, L. Zuidmeer, J. Akkerdaas, I. Tassios, N.G. Papadopoulos, P. Saxoni-Papageorgiou, R. van Ree, C. Mills, Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein, *J Allergy Clin Immunol*, 118 (2006) 473-480.
- [96] V. Cavatorta, S. Sforza, G. Aquino, G. Galaverna, A. Dossena, E.A. Pastorello, R. Marchelli, In vitro gastrointestinal digestion of the major peach allergen Pru p 3, a lipid transfer protein: Molecular characterization of the products and assessment of their IgE binding abilities, *Molecular Nutrition & Food Research*, 54 (2010) 1452-1457.
- [97] R. Wijesinha-Bettoni, Y. Alexeev, P. Johnson, J. Marsh, A.I. Sancho, S.U. Abdullah, A.R. Mackie, P.R. Shewry, L.J. Smith, E.N. Mills, The structural characteristics of nonspecific lipid transfer proteins explain their resistance to gastroduodenal proteolysis, *Biochemistry*, 49 (2010) 2130-2139.
- [98] H. Breiteneder, C. Mills, Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class, *Curr Opin Allergy Cl*, 5 (2005) 275-279.
- [99] M. Egger, M. Hauser, A. Mari, F. Ferreira, G. Gadermaier, The Role of Lipid Transfer Proteins in Allergic Diseases, *Curr Allergy Asthm R*, 10 (2010) 326-335.
- [100] E.A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, C. Ortolani, D. Fortunato, M.G. Giuffrida, L. Perono Garoffo, A.M. Calamari, O. Brenna, A. Conti, Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin, *J Allergy Clin Immunol*, 111 (2003) 350-359.
- [101] E. Vassilopoulou, L. Zuidmeer, J. Akkerdaas, I. Tassios, N.R. Rigby, E.N. Mills, R. van Ree, P. Saxoni-Papageorgiou, N.G. Papadopoulos, Severe immediate allergic reactions to grapes: part of a lipid transfer protein-associated clinical syndrome, *Int Arch Allergy Immunol*, 143 (2007) 92-102.
- [102] T. Okuda, M. Fukui, T. Takayanagi, K. Yokotsuka, Characterization of major stable proteins in Chardonnay wine, *Food Sci Technol Res*, 12 (2006) 131-136.
- [103] M. Marangon, S.C. Van Sluyter, P.A. Haynes, E.J. Waters, Grape and wine proteins: their fractionation by hydrophobic interaction chromatography and identification by chromatographic and proteomic analysis, *J Agric Food Chem*, 57 (2009) 4415-4425.
- [104] J. Ring, U. Kramer, T. Schafer, H. Behrendt, Why are allergies increasing?, *Curr Opin Immunol*, 13 (2001) 701-708.

- [105] A.B. Fishbein, R.L. Fuleihan, The hygiene hypothesis revisited: does exposure to infectious agents protect us from allergy?, *Curr Opin Pediatr*, 24 (2012) 98-102.
- [106] M. Webber-Witt, M. Christmann, Kennzeichnungspflicht: Allergene Rückstände, *Der Deutsche Weinbau*, 8 (2012) 34-35.
- [107] H. Vally, A. Carr, J. El-Saleh, P. Thompson, Wine-induced asthma: A placebo-controlled assessment of its pathogenesis, *J Allergy Clin Immunol*, 103 (1999) 41-46.
- [108] H. Vally, P.J. Thompson, Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks, *Addict Biol*, 8 (2003) 3-11.
- [109] B. Wuthrich, Allergic and intolerance reactions to wine, *Allergologie*, 34 (2011) 427-436.
- [110] P. Wigand, M. Blettner, J. Saloga, H. Decker, Prevalence of Wine Intolerance Results of a Survey From Mainz, Germany, *Dtsch Arztebl Int*, 109 (2012) 437-444.
- [111] F. Giannoccaro, G. Munno, G. Riva, S. Pugliese, M.T. Paradiso, A. Ferrannini, Oral allergy syndrome to grapes, *Allergy*, 53 (1998) 451-452.
- [112] A. Rodriguez, M.J. Trujillo, V. Matheu, M.L. Baeza, L. Zapatero, M. Martinez, Allergy to grape: A case report, *Pediatr Allergy Immunol*, 12 (2001) 289-290.
- [113] G. Senna, G. Mistrello, D. Roncarolo, M. Crivellaro, P. Bonadonna, M. Schiappoli, G. Passalacqua, Exercise-induced anaphylaxis to grape, *Allergy*, 56 (2001) 1235-1236.
- [114] D.C. Kalogeromitros, M.P. Makris, S.G. Gregoriou, V.G. Mousatou, N.G. Lyris, K.E. Tarassi, C.A. Papasteriades, Grape anaphylaxis: A study of 11 adult onset cases, *Allergy and Asthma Proceedings*, 26 (2005) 53-58.
- [115] D.C. Kalogeromitros, M.P. Makris, S.G. Gregoriou, A.C. Katoulis, N.G. Straurianeas, Sensitization to other foods in subjects with reported allergy to grapes, *Allergy and Asthma Proceedings*, 27 (2006) 68-71.
- [116] E.A. Borrás, E.B. Farauto, P.G. Jane, B.B. Zavala, Alcohol-induced anaphylaxis to grape, *Allergol Immunopath*, 35 (2007) 159-161.
- [117] G. Salcedo, R. Sanchez-Monge, D. Barber, A. Diaz-Perales, Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy, *Biochim Biophys Acta*, 1771 (2007) 781-791.
- [118] E.V. Vassilopoulou, L. Zuidmeer, J. Akkerdaas, N. Rigby, F.J. Moreno, N.G. Papadopoulos, P. Saxoni-Papageorgiou, C. Mills, R. van Ree, Optimized techniques for the extraction of grape allergens appropriate for in vivo and in vitro testing and diagnosis, *Mol Nutr Food Res*, 51 (2007) 360-366.
- [119] S.G. Schad, J. Trcka, S. Vieths, S. Scheurer, A. Conti, E.B. Brocker, A. Trautmann, Wine anaphylaxis in a German patient: IgE-mediated allergy against a lipid transfer protein of grapes, *Int Arch Allergy Immunol*, 136 (2005) 159-164.
- [120] M. Sbornik, J. Rakoski, M. Mempel, M. Ollert, J. Ring, IgE-mediated type-I-allergy against red wine and grapes, *Allergy*, 62 (2007) 1339-1340.
- [121] S. Bodmer, C. Imark, M. Kneubuhl, Biogenic amines in foods: histamine and food processing, *Inflamm Res*, 48 (1999) 296-300.
- [122] Y. Nakagawa, Y. Sumikawa, T. Nakamura, S. Itami, I. Katayama, T. Aoki, Urticarial reaction caused by ethanol, *Allergol Int*, 55 (2006) 411-414.
- [123] H. Vally, N. de Klerk, P.J. Thompson, Alcoholic drinks: important triggers for asthma, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 105 (2000) 462-467.



- [124] E.A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, C. Ortolani, M. Ispano, M. Monza, C. Baroglio, E. Scibola, R. Ansaloni, C. Incorvaia, A. Conti, The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein, *J Allergy Clin Immun*, 103 (1999) 520-526.
- [125] R. Sanchez-Monge, M. Lombardero, F.J. Garcia-Selles, D. Barber, G. Salcedo, Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy, *J Allergy Clin Immun*, 103 (1999) 514-519.
- [126] M. Gavrovic-Jankulovic, T. Cirkovic, O. Vuckovic, M. Atanaskovic-Markovic, A. Petersen, G. Gojgic, L. Burazer, R.M. Jankov, Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen, *J Allergy Clin Immun*, 110 (2002) 805-810.
- [127] M. Lombardero, F.J. Garcia-Selles, F. Polo, L. Jimeno, M.J. Chamorro, G. Garcia-Casado, R. Sanchez-Monge, A. Diaz-Perales, G. Salcedo, D. Barber, Prevalence of sensitization to *Artemisia* allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens, *Clinical and Experimental Allergy*, 34 (2004) 1415-1421.
- [128] V. Receveur-Brechot, M. Czjzek, A. Barre, A. Roussel, W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme, P. Rouge, Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo-beta-1,3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome, *Proteins*, 63 (2006) 235-242.
- [129] I. Lauer, N. Dueringer, S. Pokoj, S. Rehm, G. Zoccatelli, G. Reese, M.S. Miguel-Moncin, A. Cistero-Bahima, E. Enrique, J. Lidholm, S. Vieths, S. Scheurer, The non-specific lipid transfer protein, Ara h 9, is an important allergen in peanut, *Clinical and Experimental Allergy*, 39 (2009) 1427-1437.
- [130] E.A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, J. Scibilia, A. Conti, D. Fortunato, L. Borgonovo, S. Bonomi, L. Primavesi, B. Ballmer-Weber, Maize food allergy: lipid-transfer proteins, endochitinases, and alpha-zein precursor are relevant maize allergens in double-blind placebo-controlled maize-challenge-positive patients, *Anal Bioanal Chem*, 395 (2009) 93-102.
- [131] P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs, *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell, London, (1963).
- [132] R. Asero, G. Mistrello, D. Roncarolo, S.C. de Vries, M.F. Gautier, C.L.F. Ciurana, E. Verbeek, T. Mohammadi, V. Knul-Brettlova, J.H. Akkerdaas, I. Bulder, R.C. Aalberse, R. van Ree, Lipid transfer protein: A pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion, *Int Arch Allergy Imm*, 124 (2001) 67-69.
- [133] B.K. Ballmer-Weber, Lipid transfer protein as a potential panallergen?, *Allergy*, 57 (2002) 873-875.
- [134] H. Berkner, P. Neudecker, D. Mittag, B.K. Ballmer-Weber, K. Schweimer, S. Vieths, P. Rosch, Cross-reactivity of pollen and food allergens: soybean Gly m 4 is a member of the Bet v 1 superfamily and closely resembles yellow lupine proteins, *Bioscience Rep*, 29 (2009) 183-192.
- [135] C. Ortolani, M. Ispano, E. Pastorello, A. Bigi, R. Ansaloni, The Oral Allergy Syndrome, *Ann Allergy*, 61 (1988) 47-52.
- [136] N.E. Eriksson, H. Formgren, E. Svenonius, Food Hypersensitivity in Patients with Pollen Allergy, *Allergy*, 37 (1982) 437-443.
- [137] A. Diaz-Perales, M. Lombardero, R. Sanchez-Monge, F.J. Garcia-Selles, M. Pernas, M. Fernandez-Rivas, D. Barber, G. Salcedo, Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities, *Clinical and Experimental Allergy*, 30 (2000) 1403-1410.
- [138] H. Breiteneder, Thaumatin-like proteins - a new family of pollen and fruit allergens, *Allergy*, 59 (2004) 479-481.
- [139] R.C. Aalberse, Food allergens, *Environ Toxicol Phar*, 4 (1997) 55-60.
- [140] S. Vieths, S. Scheurer, B. Ballmer-Weber, Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen, *Ann Ny Acad Sci*, 964 (2002) 47-68.

- [141] F. Altmann, The role of protein glycosylation in allergy, *Int Arch Allergy Imm*, 142 (2007) 99-115.
- [142] U. Jappe, M. Raulf-Heimsoth, The significance of cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) for allergy diagnosis, *Allergologie*, 31 (2008) 82-90.
- [143] A. Mari, P. Iacovacci, C. Afferni, B. Barletta, R. Tinghino, G. Di Felice, C. Pini, Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases, *J Allergy Clin Immun*, 103 (1999) 1005-1011.
- [144] U. Jappe, A. Petersen, M. Raulf-Heimsoth, Allergische Soforttypreaktionen und kreuzreaktive Kohlenhydratepitope (CCD), *Allergo Journal*, 22 (2013) 25-32.
- [145] K. Fotisch, F. Altmann, D. Haustein, S. Vieths, Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients, *Int Arch Allergy Imm*, 120 (1999) 30-42.
- [146] C. Jin, B. Hantusch, W. Hemmer, J. Stadimann, F. Altmann, Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins, *J Allergy Clin Immun*, 121 (2008) 185-190.
- [147] R. Erzen, P. Korosec, M. Silar, E. Music, M. Kosnik, Carbohydrate epitopes as a cause of cross-reactivity in patients allergic to Hymenoptera venom, *Wien Klin Wochenschr*, 121 (2009) 349-352.
- [148] B. Schnyder, W.J. Pichler, [Food intolerance and food allergy], *Schweiz Med Wochenschr*, 129 (1999) 928-933.
- [149] S. Harada, D.P. Agarwal, H.W. Goedde, Aldehyde Dehydrogenase-Deficiency as Cause of Facial Flushing Reaction to Alcohol in Japanese, *Lancet*, 2 (1981) 982-982.
- [150] A. Halasz, A. Barath, L. Simonsarkadi, W. Holzapfel, Biogenic-Amines and Their Production by Microorganisms in Food, *Trends in Food Science & Technology*, 5 (1994) 42-49.
- [151] E. Diel, N. Bayas, A. Stibbe, S. Muller, A. Bott, D. Schrimpf, F. Diel, Histamine containing food: establishment of a German Food Intolerance Databank (NFID), *Inflamm Res*, 46 Suppl 1 (1997) S87-88.
- [152] C. von Wallbrunn, M. Moll, I. Schneider, Die alkoholische Gärung - Quelle biogener Amine?, *Das deutsche Weinmagazin*, 20 (2011) 12-16.
- [153] E. Kaschak, N. Göhring, H. König, P. Pfeiffer, Biogene Amine in deutschen Weinen: Analyse und Bewertung nach Anwendung verschiedener HPLC-Verfahren, *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, Juni (2009) 375-384.
- [154] L. Maintz, C.F. Yu, E. Rodriguez, H. Baurecht, T. Bieber, T. Illig, S. Weidinger, N. Novak, Association of single nucleotide polymorphisms in the diamine oxidase gene with diamine oxidase serum activities, *Allergy*, 66 (2011) 893-902.
- [155] S.M. Zimatkin, O.V. Anichtchik, Alcohol-histamine interactions, *Alcohol Alcoholism*, 34 (1999) 141-147.
- [156] A. Tawakol, T. Omland, M.A. Creager, Direct effect of ethanol on human vascular function, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286 (2004) H2468-2473.
- [157] D. Tousoulis, I. Ntarladimas, C. Antoniadis, C. Vasiliadou, C. Tentolouris, N. Papageorgiou, G. Latsios, C. Stefanadis, Acute effects of different alcoholic beverages on vascular endothelium, inflammatory markers and thrombolysis fibrinolysis system, *Clin Nutr*, 27 (2008) 594-600.
- [158] J.T. Littlewood, C. Gibb, V. Glover, M. Sandler, P.T.G. Davies, F.C. Rose, Red Wine as a Cause of Migraine, *Lancet*, 1 (1988) 558-559.
- [159] H. Dietrich, F. Will, J. Zacharias, Weinrübungen - Neue Strategien zur Aufklärung, *Das Deutsche Weinmagazin*, 13/14 (1995) 102-108.

- [160] H. Dietrich, F. Will, Vom Phänomen der Trübung., *Getränkeindustrie*, 2 (1998) 80-88.
- [161] S.F. Fenchak, W.L. Kerr, M. Corredig, Multifactorial study of haze formation in model wine systems, *J Food Quality*, 25 (2002) 91-105.
- [162] K.F. Pocock, G.M. Alexander, Y. Hayasaka, P.R. Jones, E.J. Waters, Sulfate--a candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine, *J Agric Food Chem*, 55 (2007) 1799-1807.
- [163] G.Y. Zhao, H.J. Diao, W. Zong, Nature of pectin-protein-catechin interactions in model systems: Pectin-protein-catechin interactions, *Food Sci Technol Int*, 19 (2013) 153-165.
- [164] J.C. Hsu, D.A. Heatherbell, Heat-Unstable Proteins in Wine .1. Characterization and Removal by Bentonite Fining and Heat-Treatment, *Am J Enol Viticult*, 38 (1987) 11-16.
- [165] J.C. Hsu, D.A. Heatherbell, Isolation and Characterization of Soluble-Proteins in Grapes, Grape Juice, and Wine, *Am J Enol Viticult*, 38 (1987) 6-10.
- [166] E.J. Waters, W. Wallace, P.J. Williams, Identification of Heat-Unstable Wine Proteins and Their Resistance to Peptidases, *J Agric Food Chem*, 40 (1992) 1514-1519.
- [167] E.J. Waters, Y. Hayasaka, D.B. Tattersall, K.S. Adams, P.J. Williams, Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines, *J Agric Food Chem*, 46 (1998) 4950-4957.
- [168] R.A. Muhlack, E.J. Waters, A. Lim, B.K. O'Neill, C.B. Colby, An alternative method for purification of a major thaumatin-like grape protein (VVTL1) responsible for haze formation in white wine, *Asia-Pac J Chem Eng*, 2 (2007) 70-74.
- [169] L. Batista, S. Monteiro, V.B. Loureiro, A.R. Teixeira, R.B. Ferreira, The complexity of protein haze formation in wines, *Food Chem*, 112 (2009) 169-177.
- [170] E.J. Waters, W. Wallace, M.E. Tate, P.J. Williams, Isolation and Partial Characterization of a Natural Haze Protective Factor from Wine, *J Agric Food Chem*, 41 (1993) 724-730.
- [171] H. Dawes, S. Boyes, J. Keene, D. Heatherbell, Protein Instability of Wines - Influence of Protein Isoelectric Point, *Am J Enol Viticult*, 45 (1994) 319-326.
- [172] K.J. Siebert, Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, Stabilization and analysis, *J Agric Food Chem*, 47 (1999) 353-362.
- [173] P.R. Mesquita, M.A. Picarra-Pereira, S. Monteiro, V.B. Loureiro, A.R. Teixeira, T.B. Ferreira, Effect of wine composition on protein stability, *Am J Enol Viticult*, 52 (2001) 324-330.
- [174] M. Dufrechou, F.X. Sauvage, B. Bach, A. Vernhet, Protein aggregation in white wines: influence of the temperature on aggregation kinetics and mechanisms, *J Agric Food Chem*, 58 (2010) 10209-10218.
- [175] M. Marangon, S. Vincenzi, M. Lucchetta, A. Curioni, Heating and reduction affect the reaction with tannins of wine protein fractions differing in hydrophobicity, *Anal Chim Acta*, 660 (2010) 110-118.
- [176] M. Dufrechou, C. Poncet-Legrand, F.X. Sauvage, A. Vernhet, Stability of White Wine Proteins: Combined Effect of pH, Ionic Strength, and Temperature on Their Aggregation, *J Agric Food Chem*, 60 (2012) 1308-1319.
- [177] M. Dufrechou, A. Vernhet, P. Roblin, F.X. Sauvage, C. Poncet-Legrand, White Wine Proteins: How Does the pH Affect Their Conformation at Room Temperature?, *Langmuir*, 29 (2013) 10475-10482.
- [178] E.J. Waters, G. Alexander, R. Muhlack, K.F. Pocock, C. Colby, B.K. O'Neill, P.B. Hoj, P. Jones, Preventing protein haze in bottled white wine, *Aust J Grape Wine R*, 11 (2005) 215-225.

- [179] J. Raichle, H. Dietrich, Photometrische Bestimmung des Bentonitbedarfes von Weinen., *Der Deutsche Weinbau*, 45 (1990) 1347-1352.
- [180] A. Rosch, Von stabil bis instabil, *Das deutsche Weinmagazin*, Mai (2012) 22-24.
- [181] G. Gonzalez-Neves, G. Favre, G. Gil, Effect of fining on the colour and pigment composition of young red wines, *Food Chem*, 157 (2014) 385-392.
- [182] M. Lambri, R. Dordoni, A. Silva, D.M. De Faveri, Effect of Bentonite Fining on Odor-Active Compounds in Two Different White Wine Styles, *Am J Enol Viticult*, 61 (2010) 225-233.
- [183] C. Maury, P. Sarni-Manchado, S. Lefebvre, V. Cheynier, M. Moutounet, Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines, *Am J Enol Viticult*, 54 (2003) 105-111.
- [184] K.F. Pocock, E.J. Waters, Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport?, *Aust J Grape Wine R*, 12 (2006) 212-220.
- [185] W. Patrick, S. Hans, P. Angelika, Determination of the Bovine Food Allergen Casein in White Wines by Quantitative Indirect ELISA, SDS-PAGE, Western Blot and Immunostaining, *J Agric Food Chem*, 57 (2009) 8399-8405.
- [186] S. Tolin, G. Pasini, A. Curioni, G. Arrigoni, A. Masi, F. Mainente, B. Simonato, Mass spectrometry detection of egg proteins in red wines treated with egg white, *Food Control*, 23 (2012) 87-94.
- [187] I. Schneider, Allergene Stoffe im Wein – gibt es eine Lösung? Teil 2, *Das deutsche Weinmagazin*, 13 (2014) 30-31.
- [188] W.H. Blade, R. Boulton, Adsorption of Protein by Bentonite in a Model Wine Solution, *Am J Enol Viticult*, 39 (1988) 193-199.
- [189] C. Grefhorst, Prüfung von Bentoniten, *Giesserei*, 93 (2006) 26-31.
- [190] E. Hamzehi, W. Pflug, Soil Enzymes and Clay-Minerals .1. Sorption and Binding Mechanism of Polysaccharide Cleaving Enzymes, *Z Pflanz Bodenkunde*, 144 (1981) 505-513.
- [191] K. Norrish, The Swelling of Montmorillonite, *Discuss Faraday Soc*, (1954) 120-134.
- [192] L. Fusova, Modification of the Structure of Ca-Montmorillonite, *GeoScience Engineering*, LV (2009) 27-32.
- [193] M. Segad, B. Jonsson, T. Akesson, B. Cabane, Ca/Na Montmorillonite: Structure, Forces and Swelling Properties, *Langmuir*, 26 (2010) 5782-5790.
- [194] R. Tettenhorst, Cation Migration in Montmorillonites, *Am Mineral*, 47 (1962) 769-&.
- [195] U. Hofmann, A. Hausdorf, Über Das Sedimentvolumen Und Die Quellung Von Bentonit, *Kolloid Z Z Polym*, 110 (1945) 1-17.
- [196] A. Buzagh, Über Den Einfluss Der Elektrolyte Auf Die Festigkeit Der Bentonit-Membranen, *Kolloid Z Z Polym*, 115 (1949) 155-160.
- [197] E. Gruner, R.E. Vogel, Das Quellungsverhalten Von Kalzium-Bentonit Und Natrium-Bentonit Und Seine Deutung, *Kolloid Z Z Polym*, 118 (1950) 100-110.
- [198] J.L.P. Rodriguez, A. Weiss, G. Lagaly, A natural clay organic complex from andalusian black earth, *Clay Clay Miner*, 25 (1977) 243-251.

- [199] E.W. Seugling, Jr., E.P. Guth, Study of the cationic exchange properties of acid activated bentonite. I. Effect of structure variation, pH, and ionic strength on the exchange rates of a series of beta-phenylethylamines, *J Pharm Sci*, 50 (1961) 929-936.
- [200] R.E. Grim, *Clay Mineralogy*, Science, 135 (1962) 890-&.
- [201] W. Pflug, Soil Enzymes and Clay-Minerals .2. Effect of Clay-Minerals on the Activity of Polysaccharide Cleaving Soil Enzymes, *Z Pflanz Bodenkunde*, 145 (1982) 493-502.
- [202] H.E. Makboul, J.C.G. Ottow, Kinetic-Behavior of Alkaline-Phosphatase Desorbed from Different Clay-Minerals, *Z Pflanz Bodenkunde*, 147 (1984) 497-501.
- [203] C. Cilindre, S. Jegou, A. Hovasse, C. Schaeffer, A.J. Castro, C. Clement, A. Van Dorselaer, P. Jeandet, R. Marchal, Proteomic approach to identify champagne wine proteins as modified by *Botrytis cinerea* infection, *J Proteome Res*, 7 (2008) 1199-1208.
- [204] I. Bihannic, A. Delville, B. Demé, M. Plazanet, F. Villiéras, L.M. Michot, Chapter 18: Clay Swelling: New Insights from Neutron-Based Techniques, (2009) 521-546.
- [205] M.R. Sarmiento, J.C. Oliveira, M. Slatner, R.B. Boulton, Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests, *Food Control*, 11 (2000) 423-432.
- [206] A. Rosch, Stabiler Wein: Wieviel Bentonit ist notwendig?, *Der Deutsche Weinbau*, 3 (2012) 18-21.
- [207] D. Endt, Vorkommen und Charakterisierung von Eiweißstoffen in Weißwein, Diplomarbeit, Technischen Universität Berlin (2009).
- [208] M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72 (1976) 248-254.
- [209] S.M. Read, D.H. Northcote, Minimization of Variation in the Response to Different Proteins of the Coomassie Blue-G Dye-Binding Assay for Protein, *Anal Biochem*, 116 (1981) 53-64.
- [210] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Verlag, Heidelberg Berlin, (1998).
- [211] S.J. Compton, C.G. Jones, Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay, *Anal Biochem*, 151 (1985) 369-374.
- [212] W.D. Loomis, J. Battaile, Plant Phenolic Compounds and Isolation of Plant Enzymes, *Phytochemistry*, 5 (1966) 423-&.
- [213] F. Fischer, S. Bauer, An All Rounder in the Chemistry Polyvinylpyrrolidone, *Chem Unserer Zeit*, 43 (2009) 376-383.
- [214] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- [215] Y. See, G. Jackowski, Estimating Molecular Weights of Polypeptides by SDS Gel Electrophoresis, *Protein Structure – A Practical Approach* (Creighton T., ed.), IRL Press, Oxford, (1989) 1-22.
- [216] D.H. Kang, Y.S. Gho, M.K. Suh, C.H. Kang, Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *B Kor Chem Soc*, 23 (2002) 1511-1512.
- [217] H. Blum, H. Beier, H.J. Gross, Improved Silver Staining of Plant-Proteins, Rna and DNA in Polyacrylamide Gels, *Electrophoresis*, 8 (1987) 93-99.
- [218] H.F. Steedman, Alcian Blue 8gs - a New Stain for Mucin, *Q J Microsc Sci*, 91 (1950) 477-479.

- [219] A.G.E. Pearse, *Histochemistry: Theoretical and Applied*, Churchill-Livingstone, Edinburgh, London, 2. Edition (1960) 231-261.
- [220] A.H. Wardi, W.S. Allen, Alcian Blue Staining of Glycoproteins, *Anal Biochem*, 48 (1972) 621-&.
- [221] M.G. Tingo, S.O. Kolset, R. Ofstad, G. Enersen, K.O. Hannesson, Sulfated glycosaminoglycans in the extracellular matrix of muscle tissue in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Spotted wolffish (*Anarhichas minor*), *Comp Biochem Phys B*, 140 (2005) 349-357.
- [222] J.H. Robins, G.D. Abrams, J.A. Pincock, The Structure of Schiff Reagent Aldehyde Adducts and the Mechanism of the Schiff Reaction as Determined by Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopy, *Can J Chem*, 58 (1980) 339-347.
- [223] J. Kyhse-Andersen, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods*, 10 (1984) 203-209.
- [224] M.C. Peitsch, Protein Modeling by E-Mail (Vol 13, Pg 658, 1995), *Bio-Technol*, 13 (1995) 723-723.
- [225] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics*, 22 (2006) 195-201.
- [226] F. Kiefer, K. Arnold, M. Kunzli, L. Bordoli, T. Schwede, The SWISS-MODEL Repository and associated resources, *Nucleic Acids Res*, 37 (2009) D387-D392.
- [227] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis, *J Comput Chem*, 25 (2004) 1605-1612.
- [228] I. Jelesarov, H.R. Bosshard, Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition, *J Mol Recognit*, 12 (1999) 3-18.
- [229] R. Aringhieri, G. Pardini, M. Gispert, A. Sole, Testing a Simple Methylene-Blue Method for Surface-Area Estimation in Soils, *Agrochimica*, 36 (1992) 224-232.
- [230] G. Kahr, F.T. Madsen, Bestimmung des Kationenaustauschvermögens und der Oberfläche von Bentoniten, Illit und Kaolinit durch Methylenblauadsorption, Kohler, E.E. [Hrsg.]: *Berichte der DTTG* 1994, (1994) 154-164.
- [231] N. Jaeckels, S. Tenzer, S. Rosfa, H. Schild, H. Decker, P. Wigand, Purification and structural characterisation of lipid transfer protein from red wine and grapes, *Food Chem*, 138 (2013) 263-269.
- [232] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res*, 25 (1997) 4876-4882.
- [233] H.C. Cheng, P.T. Cheng, P. Peng, P.C. Lyu, Y.J. Sun, Lipid binding in rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa*, *Protein Sci*, 13 (2004) 2304-2315.
- [234] S. Monteiro, M.A. Picarra-Pereira, A.R. Teixeira, V.B. Loureiro, R.B. Ferreira, Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes, *J Agric Food Chem*, 51 (2003) 4046-4053.
- [235] G.R. Cramer, A. Ergul, J. Grimplet, R.L. Tillett, E.A. Tattersall, M.C. Bohlman, D. Vincent, J. Sonderegger, J. Evans, C. Osborne, D. Quilici, K.A. Schlauch, D.A. Schooley, J.C. Cushman, Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles, *Funct Integr Genomics*, 7 (2007) 111-134.

- [236] D. Vincent, A. Ergul, M.C. Bohlman, E.A. Tattersall, R.L. Tillett, M.D. Wheatley, R. Woolsey, D.R. Quilici, J. Joets, K. Schlauch, D.A. Schooley, J.C. Cushman, G.R. Cramer, Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity, *J Exp Bot*, 58 (2007) 1873-1892.
- [237] J. Grimplet, M.D. Wheatley, H.B. Jouira, L.G. Deluc, G.R. Cramer, J.C. Cushman, Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well-watered and water-deficit stress conditions, *Proteomics*, 9 (2009) 2503-2528.
- [238] J.J. Liu, R. Sturrock, A.K.M. Ekramoddoullah, The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function, *Plant Cell Rep*, 29 (2010) 419-436.
- [239] P.A. Aredes Fernandez, M.E. Farias, M.C. de Nadra, Interaction between *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. Modification of available nitrogen and biogenic amine production, *Biotechnol Lett*, 32 (2010) 1095-1102.
- [240] F. Remize, A. Gaudin, Y. Kong, J. Guzzo, H. Alexandre, S. Krieger, M. Guilloux-Benatier, *Oenococcus oeni* preference for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation, *Arch Microbiol*, 185 (2006) 459-469.
- [241] G.H. Fleet, Wine yeasts for the future, *Fems Yeast Res*, 8 (2008) 979-995.
- [242] C. Sperisen, J. Ryals, F. Meins, Comparison of Cloned Genes Provides Evidence for Intergenomic Exchange of DNA in the Evolution of a Tobacco Glucan Endo-1,3-Beta-Glucosidase Gene Family, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (1991) 1820-1824.
- [243] R.S. Beffa, J.M. Neuhaus, F. Meins, Physiological Compensation in Antisense Transformants - Specific Induction of an Ersatz Glucan Endo-1,3-Beta-Glucosidase in Plants Infected with Necrotizing Viruses, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (1993) 8792-8796.
- [244] T. Cabaroğlu, A. Canbas, J.R. Lepoutre, Z. Gunata, Free and bound volatile composition of red wines of *Vitis vinifera* L. cv. Okuzgozu and Bogazkere grown in Turkey, *Am J Enol Viticult*, 53 (2002) 64-68.
- [245] S. Stankovic, S. Jovic, J. Zivkovic, Bentonite and gelatine impact on the young red wine coloured matter, *Food Technol Biotech*, 42 (2004) 183-188.
- [246] M. Fukui, K. Yokotsuka, Content and origin of protein in white and red wines: Changes during fermentation and maturation, *Am J Enol Viticult*, 54 (2003) 178-188.
- [247] N. Jaeckels, P. Fronk, H. Decker, Einfluss der Bentonitschönung auf die Proteinzusammensetzung im Wein, *Deutsches Weinbaujahrbuch 2016* (Hrsg Schulz H.R., Stoll M.), submitted (2016).
- [248] V. de Freitas, E. Carvalho, N. Mateus, Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry, *Food Chem*, 81 (2003) 503-509.
- [249] R. Asero, G. Mistrello, D. Roncarolo, S.C. de Vries, M.F. Gautier, C.L. Ciurana, E. Verbeek, T. Mohammadi, V. Knul-Brettlova, J.H. Akkerdaas, I. Bulder, R.C. Aalberse, R. van Ree, Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion, *Int Arch Allergy Imm*, 122 (2000) 20-32.
- [250] B. Prandi, L. Farioli, T. Tedeschi, E.A. Pastorello, S. Sforza, Simulated gastrointestinal digestion of Pru ar 3 apricot allergen: Assessment of allergen resistance and characterization of the peptides by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Sp*, 26 (2012) 2905-2912.
- [251] K. Murphy, P. Travers, M. Walport, *Janeway's Immunobiology* - 7th ed., Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, (2008) 555-558.

- [252] E.A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, A.M. Robino, J. Scibilia, D. Fortunato, A. Conti, L. Borgonovo, A. Bengtsson, C. Ortolani, Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen, *J Allergy Clin Immunol*, 114 (2004) 908-914.
- [253] V. Pravettoni, L. Primavesi, L. Farioli, O.V. Brenna, C. Pompei, A. Conti, J. Scibilia, M. Piantanida, A. Mascheri, E.A. Pastorello, Tomato Allergy: Detection of IgE-Binding Lipid Transfer Proteins in Tomato Derivatives and in Fresh Tomato Peel, Pulp, and Seeds, *J Agric Food Chem*, 57 (2009) 10749-10754.
- [254] I. Ramazzina, S. Amato, E. Passera, S. Sforza, G. Mistrello, R. Berni, C. Folli, Isoform identification, recombinant production and characterization of the allergen lipid transfer protein 1 from pear (Pyr c 3), *Gene*, 491 (2012) 173-181.
- [255] G. Zoccatelli, S. Pokoj, K. Foetisch, J. Bartra, A. Valero, M.D. San Miguel-Moncin, S. Vieths, S. Scheurer, Identification and characterization of the major allergen of green bean (*Phaseolus vulgaris*) as a non-specific lipid transfer protein (Pha v 3), *Mol Immunol*, 47 (2010) 1561-1568.
- [256] L. Zuidmeer, W.A. van Leeuwen, I.K. Budde, J. Cornelissen, I. Bulder, I. Rafalska, N.T. Besoli, J.H. Akkerdaas, R. Asero, M.F. Rivas, E.G. Mancebo, R. van Ree, Lipid transfer proteins from fruit: Cloning, expression and quantification, *Int Arch Allergy Imm*, 137 (2005) 273-281.
- [257] D. Douady, M. Grosbois, F. Guerbette, J.C. Kader, Proteins and the Intracellular Exchange of Lipids .9. Purification of a Basic Phospholipid Transfer Protein from Maize Seedlings, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 710 (1982) 143-153.
- [258] Y.J. Liu, D. Samuel, C.H. Lin, P.C. Lyu, Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*), *Biochem Biophys Res Commun*, 294 (2002) 535-540.
- [259] J.P. Douliez, C. Pato, H. Rabesona, D. Molle, D. Marion, Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2, *Eur J Biochem*, 268 (2001) 1400-1403.
- [260] E.A. Pastorello, A.M. Robino, Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy, *Molecular Nutrition & Food Research*, 48 (2004) 356-362.
- [261] A. Gonzalez-Quintela, J. Gomez-Rial, C. Valcarcel, J. Campos, M.L. Sanz, A. Linneberg, F. Gude, C. Vidal, Immunoglobulin-E reactivity to wine glycoproteins in heavy drinkers, *Alcohol*, 45 (2011) 113-122.
- [262] W. Aberer, F. Holzweber, W. Hemmer, L. Koch, D. Bokanovic, W. Fellner, F. Altmann, Inhibition of cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs) enhances the selectivity of in vitro allergy diagnosis, *Allergologie*, 37 (2014) 46-+.
- [263] A. Armentia, F. Pineda, S. Fernandez, Wine-induced anaphylaxis and sensitization to hymenoptera venom, *New Engl J Med*, 357 (2007) 719-720.
- [264] J.M. Rolland, E. Apostolou, K. Deckert, M.P. de Leon, J.A. Douglass, I.N. Glaspole, M. Bailey, C.S. Stockley, R.E. O'Hehir, Potential food allergens in wine: double-blind, placebo-controlled trial and basophil activation analysis, *Nutrition*, 22 (2006) 882-888.
- [265] L. Maintz, N. Novak, Histamine and histamine intolerance, *Am J Clin Nutr*, 85 (2007) 1185-1196.
- [266] M. Boban, D. Modun, I. Music, J. Vukovic, I. Brizic, I. Salamunic, A. Obad, I. Palada, Z. Dujic, Red wine induced modulation of vascular function: Separating the role of polyphenols, ethanol, and urates, *J Cardiovasc Pharm*, 47 (2006) 695-701.
- [267] Y. Hayasaka, K.S. Adams, K.F. Pocock, G.A. Baldock, E.J. Waters, P.B. Hoj, Use of electrospray mass spectrometry for mass determination of grape (*Vitis vinifera*) juice pathogenesis-related proteins: a potential tool for varietal differentiation, *J Agric Food Chem*, 49 (2001) 1830-1839.



- [268] K.C. Weiss, T.T. Yip, T.W. Hutchens, L.F. Bisson, Rapid and sensitive fingerprinting of wine proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, *Am J Enol Viticult*, 49 (1998) 231-239.
- [269] J. Darias-Martin, D. Diaz-Gonzalez, C. Diaz-Romero, Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production, *J Food Eng*, 63 (2004) 335-340.
- [270] E. Carvalho, M.J. Povoas, N. Mateus, V. de Freitas, Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions, *J Sci Food Agric*, 86 (2006) 891-896.
- [271] C. Cilindre, E. Fasoli, A. D'Amato, G. Liger-Belair, P.G. Righetti, It's time to pop a cork on champagne's proteome!, *J Proteomics*, (2014).
- [272] P.T. Hang, G.W. Brindley, Methylene Blue Absorption by Clay Minerals - Determination of Surface Areas and Cation Exchange Capacities - (*Clay-Organic Studies* .18, *Clay Clay Miner*, 18 (1970) 203-&.
- [273] W.B. Kleijn, J.D. Oster, A Model of Clay Swelling and Tactoid Formation, *Clay Clay Miner*, 30 (1982) 383-390.
- [274] F.J. Huertas, P. Carretero, J. Delgado, J. Linares, J. Samper, An Experimental Study on the Ion-Exchange Behavior of the Smectite of Cabo de Gata (Almeria, Spain): FEBEX Bentonite, *J Colloid Interf Sci*, 239 (2001) 409-416.
- [275] S.C. Van Sluyter, M. Marangon, S.D. Stranks, K.A. Neilson, Y. Hayasaka, P.A. Haynes, R.I. Menz, E.J. Waters, Two-step purification of pathogenesis-related proteins from grape juice and crystallization of thaumatin-like proteins, *J Agric Food Chem*, 57 (2009) 11376-11382.
- [276] M. Chamkha, B. Cathala, W. Cheynier, R. Douillard, Phenolic composition of champagnes from chardonnay and pinot noir vintages, *J Agric Food Chem*, 51 (2003) 3179-3184.

## 8 Anhang

### 8.1 Chromatographieprotokolle

**Tabelle 15: Versuchsprotokoll für die Gesamtprotein-Aufreinigung mittels SEC S-200.** Die 3 ml-Fractionen wurden von 30 ml bis 180 ml gesammelt.

Nr.	Start [ml]	Programmschritt
1	0,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Niedrigsalzpuffer mit 0,5 ml/min für 5 ml
2	5,0	UV-Baseline
3	5,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Niedrigsalzpuffer mit 0,5 ml/min für 5 ml
4	10,0	Injektion von 5 ml über die Probenschleife mit 0,5 ml/min für 10 min
5	15,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Niedrigsalzpuffer mit 0,5 ml/min für 240 ml
6	255,0	Ende des Protokolls

**Tabelle 16: Versuchsprotokoll für die LTP Aufreinigung mittels Kationenaustauschchromatographie UNO S-6.**

Nr.	Start [ml]	Programmschritt
1	0,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Niedrigsalzpuffer mit 2 ml/min für 6 ml
2	6,0	UV-Baseline
3	6,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Niedrigsalzpuffer mit 2 ml/min für 6 ml
4	12,0	Injektion von 8 ml über die Probenschleife mit 2 ml/min für 4 min
5	20,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Niedrigsalzpuffer mit 2 ml/min für 12 ml
6	32,0	Linearer Gradient von 0 % zu 50 % Hochsalzpuffer mit 2 ml/min für 30 ml
7	62,0	Isokratischer Fluss mit 100% Hochsalzpuffer mit 2 ml/min für 6 ml
8	68,0	Isokratischer Fluss mit 100% Niedrigsalzpuffer mit 2 ml/min für 18 ml
9	86,0	Ende des Protokolls

**Tabelle 17: Versuchsprotokoll für die TLP Aufreinigung mittels Kationenaustauschchromatographie UNO S-1.**

Nr.	Start [ml]	Programmschritt
1	0,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Niedrigsalzpuffer mit 1 ml/min für 2 ml
2	2,0	UV-Baseline
3	2,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Niedrigsalzpuffer mit 1 ml/min für 2 ml
4	4,0	Injektion von 2 ml über die Probenschleife mit 1 ml/min für 2 min
5	6,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Niedrigsalzpuffer mit 1 ml/min für 6,5 ml
6	12,5	Linearer Gradient von 0 % zu 5 % Hochsalzpuffer mit 1 ml/min für 4 ml
7	16,5	Isokratischer Fluss mit 95 % Niedrigsalzpuffer, 5 % Hochsalzpuffer mit 1 ml/min für 4 ml

8	20,5	Linearer Gradient von 5 % zu 10 % Hochsalzpuffer mit 1 ml/min für 4 ml
9	24,5	Isokratischer Fluss mit 90 % Niedrigsalzpuffer, 10 % Hochsalzpuffer mit 1 ml/min für 4 ml
10	28,5	Linearer Gradient von 10 % zu 15 % Hochsalzpuffer mit 1 ml/min für 4 ml
11	32,5	Isokratischer Fluss mit 85 % Niedrigsalzpuffer, 15 % Hochsalzpuffer mit 1 ml/min für 4 ml
12	36,5	Linearer Gradient von 15 % zu 25 % Hochsalzpuffer mit 1 ml/min für 4 ml
13	40,5	Isokratischer Fluss mit 75 % Niedrigsalzpuffer, 25 % Hochsalzpuffer mit 1 ml/min für 4 ml
14	44,5	Linearer Gradient von 25 % zu 100 % Hochsalzpuffer mit 1 ml/min für 5 ml
15	49,5	Isokratischer Fluss mit 100 % Hochsalzpuffer mit 1 ml/min für 6 ml
16	55,5	Isokratischer Fluss mit 100 % Niedrigsalzpuffer mit 1 ml/min für 10 ml
17	65,5	Ende des Protokolls

**Tabelle 18: Versuchsprotokoll für die TLP Nachreinigung mittels HIC.**

Nr.	Start [ml]	Programmschritt
1	0,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Hochsalzpuffer mit 2 ml/min für 20 ml
2	20,0	UV-Baseline
3	20,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Hochsalzpuffer mit 2 ml/min für 20 ml
4	40,0	Injektion von 4 ml über die Probenschleife mit 2 ml/min für 2 min
5	44,0	Isokratischer Fluss mit 100 % Hochsalzpuffer mit 2 ml/min für 40 ml
6	84,0	Linearer Gradient von 0 % zu 100 % Niedrigsalzpuffer mit 2 ml/min für 40 ml
7	68,0	Isokratischer Fluss mit 100% Niedrigsalzpuffer mit 2 ml/min für 60 ml
8	86,0	Ende des Protokolls

## 8.2 Vergleich der Lipid Transfer Proteine

```

      *           20           *           40           *           60
AAO333394 : MGSSGAVKLVCMVVICMVVAAPAVVEATVTCGQVASALSPCISYLYKGGAVPAGCCSGIK : 60
AAQ96338  : MGSSGAVKLVCMVVICMVMAAPAAVEAAITCGQVASALSPCISYLYKGGAVPAGCCSGIK : 60

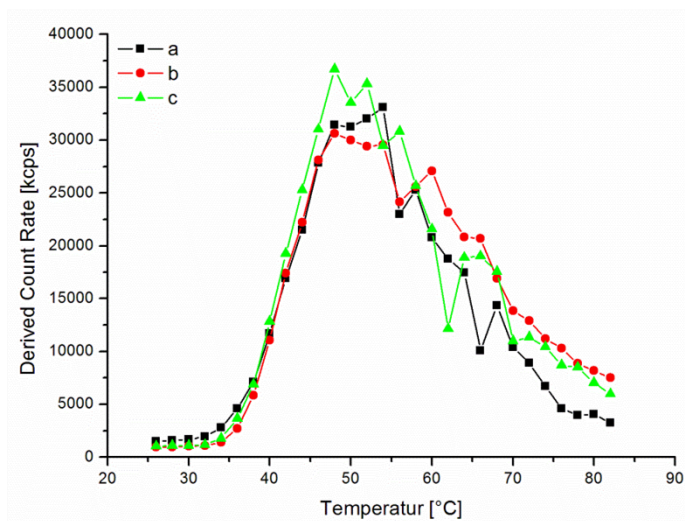
      *           80           *           100          *
AAO333394 : SLNSAAKTTGDRQAACKCLKTFSSSVSGINYGSLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCSKVT : 119
AAQ96338  : SLNSAAKTTGDRQAACKCLKTFSSSTVSGINLSLASGLPGKCGVSVPYKISPSTDCTKVT : 119

```

**Abbildung 47: Sequenzalignment der beiden detektierten LTPs der massenspektrometrischen Daten.** LTP Isoform 4 aus *Vitis vinifera* (GenBank ID: AAO333394); LTP aus *Vitis aestivalis* (GenBank ID: AAQ96338). Die Sequenzen sind zu 89 % identisch und weisen zu 93 % Ähnlichkeiten in den physiko-chemischen Eigenschaften der Aminosäuren auf. Verwendete Programme: ClustelX 1.8, GeneDoc 2.6.

## 8.3 Derived Count Rate der Permeat Kontrolle

In Abbildung 48 ist die Derived Count Rate der Kontrollprobe gemessen in Rieslingpermeat dargestellt. Anhand dieser Darstellung wird die beobachtete Sedimentation der Aggregate durch den Abfall der Messverläufe deutlich. Die Kurvenverläufe zeigt eine gute Übereinstimmung der wiederholten Messungen (n=3).



**Abbildung 48: DLS Messungen der Auxerrosproteine ohne weitere Zusätze gelöst in Rieslingpermeat (vgl. 3.17).** Auftragung der Derived Count Rate zur Überprüfung der Qualität der Messergebnisse. Die Messungen wurden dreimal wiederholt (→ a, b, c)

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung von Arabinogalactan I und II. Vereinfachte Darstellung zweier Arabinogalactane in Anlehnung an die Arbeit von Vincken et al. 2003 [38]. A: Arabinogalactan I; B: Arabinogalactan II. ....</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung von Rhamnogalacturonan I und II. Vereinfachte Darstellung der Pektinbestandteile in Anlehnung an die Arbeit von Vincken et al. 2003 [38]. A: Rhamnogalacturonan I; B: Rhamnogalacturonan II. ....</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung des Cellulosederivates Carboxymethylcellulose. Verändert nach Su et al. 2010 [43]. ....</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Gummi arabicum Moleküls. Vereinfachte Darstellung eines Strukturvorschlags in Anlehnung an die Arbeit von Street et al. 1983 [47]. ....</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 5: Alignment verschiedener pflanzlicher LTPs. A: Sequenzalignment der Aminosäurezusammensetzung verschiedener LTPs (Signalpeptide wurden zuvor mittels Signal P 4.1 Server detektiert und entfernt [88]); B: Tabelle der Identitäten und Ähnlichkeiten der Aminosäuren zu denen von Vit v 1. Die konservierten Cysteine in dem Alignment wurden passend zu ihren jeweiligen Bindungspartnern farblich markiert. Mal d 3: Apfel Malus domestica (GenBank: AAV64878.1); Pyr c 3: Erbse Pyrus communis (GenBank: AAF26451.1); Pru p 3: Pfirsich Prunus persica (GenBank: AAV64877.1); Pru av 3: Kirsche Prunus avium (GenBank: AAF26449.1); Pru d 3: Pflaume Prunus domestica (UniProtKB/Swiss-Prot: P82534.1); Fra a 3: Erdbeere Fragaria ananassa (GenBank: AAY83343.1); Vit v 1: Traube Vitis vinifera (GenBank ID: AAO33394); Cor a 8: Haselnuss Corylus avellana (GenBank: AAK28533.1); Hev b 12: Latex Hevea brasiliensis (GenBank: AAL25839.1); Mus a 3: Banane Musa acuminata (GenBank: ABF69976.1). Verwendete Programme: ClustelX 1.8, GeneDoc 2.6. ....</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 6: Struktureller Aufbau des Oligosaccharidepitops MUXF3. Die N-glykosidischen Bindungen verlaufen über die in der Graphik angegebenen Positionen. Verändert nach Altmann (2007) [141]. ..</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 7: Schematische Darstellung der molekularen Struktur des Montmorillonits. A: Darstellung der Lamellenstruktur verändert nach Erbslöh Bentonit Informationen – holzeis: Bentonit Kompendium, Erbslöh Geisenheim Getränketechnologie GmbH &amp; Co. KG, Geisenheim (2004); B: Vergrößerte Darstellung der Kristallstruktur einer Lamelle aus Grim (1962) [200]. ....</i>	<i>18</i>

Abbildung 8: Isolierung des LTP aus der Dornfelder Traube und dem Wein mittels Kationenaustauschchromatographie. Dargestellt sind die Ergebnisse der Elution der Traubenproben (oben) und der Weinproben (unten). A: Elutionsprofil der LTP Aufreinigung; B: Vergrößerter Ausschnitt (Minute 18 - 34) des Elutionsprofils der LTPs. Die Elution erfolgte mit einem 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 und 1 M NaCl. Die Flussrate betrug 2 ml/min (vgl. Tabelle 16). C: 15 %ige SDS-Gele zur Überprüfung der Fraktionen (Coomassie Färbung). T1: Fraktionen 5 - 20; T2: Fraktionen 31 - 35; T3: Fraktionen 39 - 41; T4: Fraktionen 49 - 52; T5: Fraktionen 62 - 63; W1: Fraktionen 5 - 14; W2: Fraktionen 25 - 31; W3: Fraktionen 32 - 34; W4: Fraktionen 35 - 36; W5: Fraktionen 38 - 39; W6: Fraktionen 40 - 42; W7: Fraktionen 44 - 46; W8: Fraktionen 62 - 63; M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad [231]. ..... 55

Abbildung 9: Zuordnung der detektierten Peptide der LTP Proben nach der massenspektrometrischen Analyse. Anteilig wird die Übereinstimmung mit den identifizierten LTP Isoformen angegeben: LTP Isoform 4 aus *Vitis vinifera* (GenBank ID: AAO33394); LTP aus *Vitis aestivalis* (GenBank ID: AAQ96338). Grau hinterlegt sind die detektierten Peptidbereiche [231]. ..... 56

Abbildung 10: Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Reinheit der W6 LTP-Lösung. A: Excitation; B: Emission. Die Anregungen erfolgten bei den entsprechend in den Graphiken angegebenen Wellenlängen. .... 57

Abbildung 11: CD-Spektren der beiden LTP-Proben aus der Dornfelder Traube und dem Dornfelder Wein. Aufgezeichnet bei 20 °C. Die Konzentrationen der Proben betragen für das Trauben LTP T3: 0,48 mg/ml und für das Wein LTP W6: 0,52 mg/ml. .... 57

Abbildung 12: Übersicht der Häufigkeiten der auftretenden Symptome nach Weinkonsum. Die Daten basieren auf den Eigenangaben der Probanden (n=29). ..... 60

Abbildung 13: ImmunoBlots - Untersuchung der IgE-Antikörperreaktion mit verschiedenen Trauben- und Weinproteinen. A) Comassie gefärbtes 15%-SDS-Gel, B) ImmunoBlot mit Serum der Probandin (Nr. 7). Proben: 1: Pfirsich; 2: Rote Traube (Supermarkt); 3: Dornfelder Traube (Weingut Fleischer, Mainz); 4: Weiße Traube (Supermarkt); 5: Dornfelder Wein (PVP-gefällt, Weingut Fleischer, Mainz); 6: LTP aus Dornfelder Wein (Weingut Fleischer, Mainz) [231]; 7: gereinigtes LTP aus der Dornfelder Traube (Weingut Fleischer, Mainz) (15); 8: Riesling (Lyophilisat); 9: RunBlue Dual Color SDS Marker, Expedeon. Aufgetragen wurden jeweils 30 µl des entsprechenden Extraktes, der zuvor 3:1 mit Denaturierungspuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert wurde (vgl. 3.19.4). ..... 63

Abbildung 14: Betrachtung der Proteinzusammensetzung verschiedener Rebsorten. A: Riesling (MM\_0); B: Spätburgunder, ausgebaut als Blanc de Noir (MM\_5); C: Portugieser Weißherbst (MM\_3); D: Traminer (MM\_4 T9); E: Weißburgunder (MM\_4 T7). Alle Weinproben stammen aus dem Jahrgang 2011 (vgl. Tabelle 5). Als Stamm wurde eine Lösung aus 20 mg Lyophilisat in 1000 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt und entsprechend der Angaben an den Taschen verdünnt. Die rot markierten Molekulargewichtsbanden weisen auf die Bereiche mit den markantesten Unterschieden zwischen den Rebsorten. 12,5 % SDS-Gele, Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad. .... 67

- Abbildung 15: Vergleich der Proteinzusammensetzung verschiedener Riesling Weine. A: Riesling aus dem Jahr 2011 von der Mosel (MM\_0); B: Riesling aus dem Jahr 2008 aus Geisenheim (MM\_7); C: Riesling aus dem Jahr 2012 aus Geisenheim (MM\_21), dieses SDS-Gel wurde im Rahmen der von mir mitbetreuten Bachelorarbeit von J. Roth (2013) angefertigt (vgl. Tabelle 5). Als Stamm wurde eine Lösung aus 20 mg Lyophilisat in 1000 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt und entsprechend der Angaben an den Taschen verdünnt. Die rot markierten Molekulargewichtsbanden weisen auf die Bereiche mit den markantesten Unterschieden. 12,5 % SDS-Gele, Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad..... 69
- Abbildung 16: Vergleich der DSC Messungen von verschiedenen Weinen. Bei jeder Messung wurden ca. 500 µl einer 0,13 mg/ml Proteinlösung von 20 °C bis 120 °C mit einer Scannrate von 60 °C/h untersucht. Die Proben wurden in H<sub>2</sub>O gelöst. Weißburgunder: MM\_4 T7; Spätburgunder: ausgebaut als Blanc de Noir (MM\_5); Portugieser a: Portugieser Weißherbst (MM\_3); Auxerrois: Modellweinproteine; Portugieser b: W7044, siehe Kapitel 2.5..... 70
- Abbildung 17: Aufstellung der oenologischen Ausbauvarianten zur Untersuchung des Einflusses von Weinbau und Oenologie auf die Proteinzusammensetzung in Most und Wein der Hochschule Geisenheim. <sup>1</sup>: in Zusammenarbeit mit dem Institut für Weinbau (Herrn Dr. Manfred Stoll & Herrn Dr. Bernd Gruber), Hochschule Geisenheim; <sup>2</sup>: in Zusammenarbeit mit dem Institut für Oenologie (Herrn Dr. Maximilian Freund), Hochschule Geisenheim..... 71
- Abbildung 18: Übersicht der oenologischen Ausbauvarianten eines Rieslings (Jahrgang 2012) von dem Rüdesheimer Berg (Geisenheim). Die Bezeichnungen entsprechen den Abkürzungen aus Abbildung 17. Auszug aus der von mir mitbetreuten Bachelorarbeit von J. Roth (2013); 12,5 % SDS-PAGE, Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad..... 73
- Abbildung 19: Vergleich der Entsaftungsvarianten hinsichtlich der Proteinzusammensetzung in Most und Wein. MP: Maischepressung; GTP: Ganztraubenpressung; 12,5 % SDS-PAGE, Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad..... 75
- Abbildung 20: Einfluss weinbaulicher Maßnahmen auf die Proteinzusammensetzung im Wein, Riesling von dem Rüdesheimer Berg (Geisenheim, 2012). Aufgetragen wurden Moste bzw. Weine von bewässerten und nicht zusätzlich bewässerten (Trockenstress) Trauben. 12,5 % SDS-PAGE, Coomassie Färbung; M: Precision Plus Protein Unstained Standard..... 76
- Abbildung 21: Vergleich einer bewässerten mit einer trockengestressten Riesling Wein Variante des Jahrgangs 2008. Eingesetzt wurde jeweils 1 mg Lyophilisat der entsprechenden Probe. Erste Dimension: IEF im Bereich pH 3 - 10; 2. Dimension: 15 % SDS-PAGE. A: Riesling Wein mit zusätzlichen Bewässerungsterminen (MM\_7); B: Riesling Wein ohne weitere Bewässerung (trockengestresst, MM\_6). rot umkreist: Unterschiede in der Proteinzusammensetzung. Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad..... 77

- Abbildung 22: Vergleich eines unbehandelten und bentonitgeschönten Portugieser Weins. Weine der Winzergenossenschaft Mosel (MM\_3 & MM\_2). Erste Dimension: IEF im Bereich pH 3 - 10; 2. Dimension: 15 % SDS-PAGE. A: unbehandelter Wein; B: Wein geschönt mit 400 g/hl Bentonit. Rot umkreist: Nicht entfernte Proteinbereiche. Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard. .... 80
- Abbildung 23: PAS-Färbung des bentonitgeschönten und des unbehandelten Portugieser Weins. Winzergenossenschaft Mosel (MM\_3 & MM\_2). Als Stamm wurde eine Lösung aus 20 mg Lyophilisat in 1000  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eingesetzt und entsprechend der Angaben an den Taschen verdünnt. A: PAS-Färbung; B: PAS-Färbung mit Coomassie nachträglich eingefärbt. WmS: geschönter Wein; WoS: Wein ohne Schönung. 12,5 % SDS-PAGE, M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad. . 81
- Abbildung 24: Betrachtung der Wirkung von Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Bentonit auf die Proteinzusammensetzung zweier Weine: Grauburgunder und Riesling. A: Grauburgunder aus dem Jahr 2011; B: Riesling aus dem Jahr 2011. Es wurden jeweils 150 ml jeder Probe dialysiert und gefriergetrocknet. Das resultierende Lyophilisat von den entsprechenden Kontrollen ohne Behandlung im Vergleich mit der Behandlung mit Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Bentonit, wurde in 5 ml H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend für die Gele 1:2 mit H<sub>2</sub>O verdünnt bevor sie aufgetragen wurden. Die rot umrandeten Banden wurden mittels MS analysiert. 1: Kontrolle 1:2 verd.; 2: Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Bentonit 200 g/hl 1:2 verd.; 3: Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Bentonit 400 g/hl 1:2 verd.; 12,5 %ige SDS-PAGE, Coomassie Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard. .... 84
- Abbildung 25: Sequenzalignment der  $\beta$ -Glucosidase (Accession Nummer: XP\_002277446.1) aus *Vitis vinifera* und Banane (PDB: 2CYG) von den AS 35 - 339. A: Grauburgunder; B: Riesling. Die durch MS identifizierten AS sind grau hinterlegt. gelb umrandet: das einzige Cystein der Sequenzen; rot umrandet: positiv geladene AS (Arg, Lys); blau umrandet: negativ geladene AS (Asp, Glu). Verwendete Programme: ClustelX 1.8, GeneDoc 2.6. .... 87
- Abbildung 26: Darstellung der Tertiärstruktur mit den entsprechenden Oberflächen des mit Hilfe von SwissModel erstellten Modell der  $\beta$ -Glucosidase aus *Vitis vinifera* (Accession Nummer: XP\_002277446.1). Oben: Tertiärstruktur; unten: Oberfläche des Modells. Bilder wurden mit USCF Chimera 1.6.2 erstellt. Modelldarstellung der positiven (Arg, Lys) und negativen (Asp, Glu) AS am Proteinrückrad und an der Oberfläche. rot: positiv geladene AS (Arg, Lys); blau: negativ geladenen AS (Asp, Glu); grün: sonstige AS. .... 88
- Abbildung 27: Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Bentonite im Dornfelder Rotwein. Die Konzentration der Bentonite betrug je 50 g/hl. 1: unbehandelter Rotwein; 2: Behandlung mit Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup>-Bentonit; 3: Behandlung mit Na<sup>+</sup>-Bentonit; 4: Behandlung mit Ca<sup>2+</sup>-Bentonit; 5: Behandlung mit K<sup>+</sup>-Bentonit; 12,5 % SDS-Gel. Coomassie-Färbung, M: Precision Plus Protein Unstained Standard. (von mir mitbetreute Bachelorarbeit von Isabell Piroth, 2012) ..... 90
- Abbildung 28: Elutionsprofil nach Größenausschlusschromatographie des Modellweinsystems als Basis für die Aufreinigung verschiedener Weinproteine. Die Elution erfolgte mit einem 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 über die Sephacryl S-200 XK 16/60 Säule. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min (vgl. 3.10.1 & Tabelle 15). .... 92



- Abbildung 29: SDS-PAGE einzelner Fraktionen nach dem SEC Lauf. Die Proben sind entsprechend den Fraktionen aus Abbildung 28 benannt. 12,5 % SDS-Gele, Coomassie Färbung. M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad. .... 93
- Abbildung 30: Aufreinigung der aufkonzentrierten Fraktionen 16 - 20 des SEC-Laufs (Abbildung 28) mittels Kationenaustauschchromatographie (UNO S-1 Säule). Die Elution erfolgte mit einem 0,1 M Citratpuffer pH 3 und 1 M NaCl. Die Flussrate betrug 1 ml/min (vgl. 3.10.2 & Tabelle 17). .... 93
- Abbildung 31: SDS-PAGE einzelner Fraktionen nach der Kationenaustauschchromatographie. Die Proben sind entsprechend den Fraktionen aus Abbildung 30 benannt. 12,5 % SDS-Gele, Coomassie Färbung. M: Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad. .... 94
- Abbildung 32: Elution der konzentrierten Fraktionen 53 – 63 der Kationenaustausch-chromatographie (Peak IV, Abbildung 30) mittels Hydrophober Interaktionschromatographie. Als Gelmatrix wurde Phenylsepharose eingesetzt. Die Elution erfolgte mit einem 0,05 M Citratpuffer pH 4 und 1,25 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ . Die Flussrate betrug 2 ml/min (vgl. 3.10.3 & Tabelle 18). .... 95
- Abbildung 33: DLS Messungen der Auxerroisproteine ohne weitere Zusätze. Die Mittelwerte dieser Messung dienen als Kontrolle für alle weiteren Messungen (vgl. 3.17). A: Auftragung des hydrodynamischen Radius  $R_s$  der gemessenen Probe; B: Auftragung der Derived Count Rate zur Überprüfung der Qualität der Messergebnisse. Die Messungen wurden dreimal wiederholt ( $\rightarrow$  a, b, c). .... 97
- Abbildung 34: Zusammenfassende Ergebnisse der DLS Messungen zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens der Modellweinproteine mit verschiedenen Polysacchariden bei vier verschiedenen Konzentrationsverhältnissen. Zur Vergleichbarkeit wurde eine einheitliche Achsenskalierung gewählt und pro Diagramm das entsprechende Verhältnis von Modellweinyophilisat zu dem entsprechenden Polysaccharid aufgetragen. A: Verhältnis 1:1; B: Verhältnis 1:0,75; C: Verhältnis 1:0,5; D: Verhältnis 1:0,25. In jeder Graphik wurde zusätzlich als Kontrolle die Messung der Modellproteine ohne Polysaccharide mit aufgetragen. schwarz: Modellweinproteine (WP) & Standardabweichung; rot: Zusatz von Arabinogalactan (AG); grün: Zusatz von Gummi arabicum (GA); blau: Zusatz von Rhamnogalacturonan (RG); hellblau: Zusatz von Carboxymethylcellulose (CMC). . 99
- Abbildung 35: Darstellung der DLS Messergebnisse ohne die Daten der CMC-Messreihe zur besseren Betrachtung des Einflusses der anderen Polysaccharide bei vier verschiedenen Konzentrationsverhältnissen. Auch hier wurde zur Vergleichbarkeit eine einheitliche Achsenskalierung verwendet und pro Diagramm das entsprechende Verhältnis von Lyophilisat zu dem entsprechenden Polysaccharide aufgetragen. A: Verhältnis 1:1; B: Verhältnis 1:0,75; C: Verhältnis 1:0,5; D: Verhältnis 1:0,25. Zum besseren Vergleich wurde in jede Graphik die Messreihe des Modellweins ohne Zusätze als Kontrolle mit aufgetragen. schwarz: Modellweinproteine (WP) & Standardabweichung; rot: Zusatz von Arabinogalactan (AG); grün: Zusatz von Gummi arabicum (GA); blau: Zusatz von Rhamnogalacturonan (RG). .... 100

Abbildung 36: DSC Messung des Modellweines ohne weitere Zusätze. Die Messung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt (Messung a & b). A: alle Messreihen; B: Vergrößerung der Messreihen 1 und 3. 1: Messung von 20 °C nach 120 °C; 2: Messung von 120 °C nach 20 °C; 3: Messung von 20 °C nach 120 °C; Cp: Wärmekapazität. .... 102

Abbildung 37: DSC Messungen zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Polysaccharide auf die Denaturierungspunkte der Weinproteine. Alle Ergebnisse sind im Vergleich zu der Messung der Modellweinproteine (WP) aufgetragen. Messungen: 0,13 mg/ml Gesamtprotein von 20 - 120 °C mit einer Heizrate von 60 °C/h. A: Messung mit Arabinogalactan (AG); B: Messung mit Gummi arabicum (GA); C: Messung mit Rhamnogalacturonan (RG); D: Messung mit Carboxymethylcellulose (CMC). .... 104

Abbildung 38: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der trübungsverursachenden Bestandteile im Modellweinsystem. <sup>1</sup>: mit Hermle Tischzentrifuge, 15000 rpm, 10 min; <sup>2</sup>: Behandlung ohne den Einfluss von  $\beta$ -Mercaptoethanol und Inkubation bei 95 °C. ... 105

Abbildung 39: Wärmetest des Modellweines, durchgeführt für die angegebenen Temperaturen der DSC Messungen in Citratpuffer. Die Proben wurden bei den entsprechenden Temperaturen für 20 min inkubiert. Die Kontrolle K inkubierte bei Raumtemperatur. Die roten Pfeile markieren besondere Proteinbanden, auf die im Text näher eingegangen wird. A: Native PAGE, 10 %, pH 8,8, M: SERVA Native Marker; B: SDS-PAGE, 12,5 % ohne Denaturierung der Proben (ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol und Hitze), M: Precision Plus Protein Standards Unstained, Bio-Rad; C: SDS-PAGE, 12,5 % mit Denaturierung der Proben, M: Precision Plus Protein Standards Unstained, Bio-Rad; oben: Auftragung des Überstandes; unten: Auftragung der homogenisierten Proben (Überstand und Pellet); Coomassie Färbung. .... 106

Abbildung 40: Zusammenfassende Ergebnisse der DLS Messungen zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens der Modellweinproteine mit verschiedenen Polysacchariden (vier verschiedene Konzentrationsverhältnisse) in Rieslingpermeat. Zur Vergleichbarkeit wurde eine einheitliche Achsenskalierung verwendet und pro Graph das entsprechende Verhältnis von Modellweinyophilisat zu dem entsprechenden Zusatz aufgetragen. A: Verhältnis 1:1; B: Verhältnis 1:0,75; C: Verhältnis 1:0,5; D: Verhältnis 1:0,25. Zum besseren Vergleich wurde in jede Graphik zusätzlich als Kontrolle die Messung der Modellproteine ohne Zusätze mit aufgetragen. schwarz: Modellweinproteine (WP) & Standardabweichung; rot: Zusatz von Arabinogalactan (AG); grün: Zusatz von Gummi arabicum (GA); blau: Zusatz von Rhamnogalacturonan (RG); hellblau: Zusatz von Carboxymethylcellulose (CMC). .... 109

Abbildung 41: DSC Messung des Modellweines ohne weitere Zusätze jedoch in Rieslingpermeat. Die Messung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt (Messung a & b). A: alle Messreihen; B: Vergrößerung der Messreihen 1 und 3. 1: Messung von 20 °C nach 120 °C; 2: Messung von 120 °C nach 20 °C; 3: Messung von 20 °C nach 120 °C; Cp: Wärmekapazität. .... 111

- Abbildung 42: DSC Messungen zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Polysaccharide auf die Denaturierungspunkte der Weininhaltsstoffe in Rieslingpermeat. Alle Ergebnisse sind im Vergleich zu der Messung der Modellweinproteine (WP) aufgetragen. Messungen: 0,13 mg/ml Gesamtprotein von 20-120 °C mit einer Heizrate von 60 °C/h. A: Messung mit Arabinogalactan (AG); B: Messung mit Gummi arabicum (GA); C: Messung mit Rhamnogalacturonan (RG); D: Messung mit Carboxymethylcellulose (CMC)..... 112
- Abbildung 43: Wärmetest des Modellweins mit Rieslingpermeat, durchgeführt für die markanten Temperaturen der DSC Messungen. Die Proben wurden bei den entsprechenden Temperaturen für 20 min inkubiert. Die Kontrolle K inkubierte bei Raumtemperatur. Die roten Pfeile markieren besondere Proteinbanden, auf die im Text näher eingegangen wird. A: native PAGE, 10 %, pH 8,8, M: SERVA Native Marker; B: SDS-PAGE, 12,5 % ohne Denaturierung der Proben (ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol und Hitze), M: Precision Plus Protein Standards Unstained, Bio-Rad; C: SDS-PAGE, 12,5 % mit Denaturierung der Proben, M: Precision Plus Protein Standards Unstained, BioRad; oben: Auftragung des Überstandes; unten: Auftragung der homogenisierten Proben (Überstand und Pellet); Coomassie Färbung. .... 113
- Abbildung 44: Übersicht über die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen zur Weinunverträglichkeit (n = 29). Es wurden insgesamt 29 Personen im Zusammenhang mit einer Weinunverträglichkeit getestet, um dessen Ursache zu untersuchen. Eine Unterteilung erfolgte in Personen mit und ohne Weinunverträglichkeit. <sup>1</sup>: Einteilung erfolgte nach Eigenangabe der Probanden; \*: Es wurden nicht alle Personen aus diesen Gruppen getestet (vgl. Tabelle 8)..... 117
- Abbildung 45: Schematische Darstellung der Wechselwirkung von Bentonit mit der  $\beta$ -Glukosidase. Dargestellt ist die leichte Konformationsänderung der  $\beta$ -Glukosidase (dargestellt in grün) zur besseren Einlagerung zwischen zwei Lamellen des Montmorillonits. In der Umgebung der Proteine befinden sich Wassermoleküle und austauschfähige Kationen..... 123
- Abbildung 46: Einfluss der untersuchten Weininhaltsstoffe auf die Trubentstehung. Dargestellt sind wesentliche Komponenten, die von mir bei der Untersuchung der Trübung berücksichtigt wurden. Die Bedeutung der Pfeile ist in der Legende in der Abbildung dargestellt. TLP: Thaumatin-ähnliche Proteine; CMC: Carboxymethylcellulose..... 129
- Abbildung 47: Sequenzalignment der beiden detektierten LTPs der massenspektrometrischen Daten. LTP Isoform 4 aus *Vitis vinifera* (GenBank ID: AAO33394); LTP aus *Vitis aestivalis* (GenBank ID: AAQ96338). Die Sequenzen sind zu 89 % identisch und weisen zu 93 % Ähnlichkeiten in den physikochemischen Eigenschaften der Aminosäuren auf. Verwendete Programme: ClustelX 1.8, GeneDoc 2.6..... 150
- Abbildung 48: DLS Messungen der Auxerroisproteine ohne weitere Zusätze gelöst in Rieslingpermeat (vgl. 3.17). Auftragung der Derived Count Rate zur Überprüfung der Qualität der Messergebnisse. Die Messungen wurden dreimal wiederholt ( $\rightarrow$  a, b, c)..... 150

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Versuchsprotokoll zur Silberfärbung. Die Zeitangaben entsprechen der Färbung eines Minigels.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 2: Versuchsprotokoll der Alcian Blau Färbung. Die Zeitangaben sind an ein Minigel angepasst. ....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 3: Versuchsprotokoll der Perjodsäure-Schiff-Färbung. Die Zeitangaben sind an ein Minigel angepasst. ....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 4: Versuchsprotokoll für den Western Blot. ....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 5: Liste der getesteten Weine. ....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 6: Einteilung und Beurteilung der CAP Klassen nach Angaben des Herstellers Phadia AB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).....</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 7: Übersicht der Teilnehmer an den klinischen Untersuchungen. w: weiblich; m: männlich; k.A.: keine Angaben.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der klinisch untersuchten Probanden (n= 29). m: männlich; w: weiblich; neg: negativ; pos: positiv; +++: sehr starke Reaktion; ++: starke Reaktion ; +: schwache Reaktion; -: keine Reaktion; /: es wurde kein Test durchgeführt; x: Test wurde durchgeführt, allerdings mit negativem Ergebnis; CAP Klassen (spezifisch für spezifisches IgE): 0 (&lt;0,35 kU/l), 1 (0,35 – 0,70 kU/l), 2 (0,70 – 3,50 kU/l), 3 (3,50 – 17,5 kU/l), 4 (7,5 – 50,0 kU/l), 5 (50,0 – 100 kU/l), 6 (&gt;100 kU/l). Die Pricktest-Ergebnisse werden dargestellt als Durchmesser der Quaddel und der Rötung, jeweils in Millimeter. Angaben zu den verwendeten Weinen siehe Tabelle 5 (vgl. 3.19.1). ....</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 9: Ergebnisse der MS-Analyse der bewässerten und der entsprechend nicht bewässerten Riesling Weine. Die Ergebnisse wurden anteilig auf die 20 µg Gesamtprotein in % bestimmt und auf den Gesamtproteingehalt umgerechnet. Die Werte für die pI's und die Molekulargewichte MW wurden über die Aminosäuresequenzen berechnet. hellblau hinterlegt: traubeneigene Proteine. MB: mit Bewässerung, 6,75 mg/l (MM_7); OB ohne zusätzliche Bewässerung, 9,28 mg/l (MM_6); MW: Molekulargewicht. ....</i>	<i>78</i>
<i>Tabelle 10: Ergebnisse der MS-Analyse eines Portugieser Weins ohne und mit Bentonitschönung. Der Wein wurde mit 400 g/hl Bentonit geschönt. Die Ergebnisse wurden anteilig auf die 20 µg Gesamtprotein in % bestimmt und auf die Gesamtproteinkonzentration im Wein umgerechnet. Die Werte für die pI's und die Molekulargewichte MW wurden über die Aminosäuresequenzen berechnet. hellblau hinterlegt: traubeneigene Proteine. WoS: Wein ohne Schönung, 22,63 mg/l (MM_3); WmS: geschönter Wein, 4,27 mg/l (MM_2); MW: Molekulargewicht. ....</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 11: Ergebnisse der MS-Analyse der markierten Proteinbande aus dem Grauburgunder Wein (vgl. Abbildung 24 A). Die Werte für die pI's und die Molekulargewichte MW wurden über die Aminosäuresequenzen berechnet. hellblau hinterlegt: traubeneigene Proteine.....</i>	<i>85</i>

---

<i>Tabelle 12: Ergebnisse der MS-Analyse der markierten Proteinbande aus dem Riesling Wein (vgl. Abbildung 24 B). Die Werte für die <math>pI</math>'s und die Molekulargewichte <math>MW</math> wurden über die Aminosäuresequenzen berechnet. hellblau hinterlegt: traubeneigene Proteine. ....</i>	<i>86</i>
<i>Tabelle 13: Pipettierschema zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens der Auxerroisproteine. Für alle Versuche wurde eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Die Stammlösung aus dem Weinlyophilisat (34 mg/ml) enthielt eine Gesamtproteinkonzentration von 2 mg/ml. ....</i>	<i>97</i>
<i>Tabelle 14: Ergebnisse der Polyphenolanalyse des Modellweinlyophilisat gelöst in Citratpuffer und Rieslingpermeat. Die Untersuchung wurde an der Hochschule Geisenheim mittels HPLC Analyse über Standardkalibrierung nach der SOP-WG2-34 durchgeführt. ....</i>	<i>108</i>
<i>Tabelle 15: Versuchsprotokoll für die Gesamtprotein-Aufreinigung mittels SEC S-200. Die 3 ml-Fraktionen wurden von 30 ml bis 180 ml gesammelt. ....</i>	<i>148</i>
<i>Tabelle 16: Versuchsprotokoll für die LTP Aufreinigung mittels Kationenaustauschchromatographie UNO S-6. ....</i>	<i>148</i>
<i>Tabelle 17: Versuchsprotokoll für die TLP Aufreinigung mittels Kationenaustauschchromatographie UNO S-1. ....</i>	<i>148</i>
<i>Tabelle 18: Versuchsprotokoll für die TLP Nachreinigung mittels HIC. ....</i>	<i>149</i>

---

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Jaeckels N., Tenzer S., Rosfa S., Schild H., Decker H., Wigand P. (2013): Purification and structural characterisation of lipid transfer protein from red wine and grapes. Food Chem 138: 263-269

Jäckels N., Fronk P., Decker H.: Einfluss der Bentonitschönung auf die Proteinzusammensetzung im Wein. Deutsches Weinbaujahrbuch 2016 (eds. Schulz H.R., Stoll M.), angenommen

### In Bearbeitung

Jaeckels N., Bellinghausen I., Fronk P., Heydenreich B., Saloga J., Decker H. Sensitization to grape allergens as possible cause of intolerance to wine?

Jaeckels N., Tenzer S., Rosch A., Scholten G., Decker H., Fronk P. Bentonite fining efficiently removes  $\beta$ -glucosidase during wine making.

### Vorträge

Meier M., Jäckels N., Fronk P., Will F., Decker H., Dietrich H.: Charakterisierung nachtrübungsrelevanter Weinproteine. Frühjahrstagung des Forschungsrings des Deutschen Weinbaus (FDW), Neustadt (April 2014)

Jäckels N., Bellinghausen I., Fronk P., Heydenreich B., Saloga J., Decker H.: Unverträglichkeitsreaktionen nach dem Konsum von Wein und Traube. 25. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz (März 2013):

Fronk P., Jäckels N., Riebel M., Decker H.: Weinforschung in der Biophysik. JungChemikerForum, Mainz, Germany (06.06.2013)

Wigand P., Jaeckels N., Decker H.: Intolerance to wine: Potential Allergens? IAK-Annual Meeting, Mainz (27.10.2011)

Wigand P., Jäckels N., Decker H.: Charakterisierung potentieller Weinallergene. Workshop Proteincharakterisierung in der Immunologie beim AESKU.KIPP.Institute, Wendelsheim (14.10.2011)





## Danksagung



## Lebenslauf

---

## **Erklärung**

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

### **Copyright**

Die Inhalte dieses Werkes sind urheberrechtliches Eigentum des Instituts für Molekulare Biophysik im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Ich bestätige, dass die Protokollbücher und alle wichtigen Unterlagen sowie Abbildungen nachvollziehbar auf einem Datenträger im Institut für Molekulare Biophysik hinterlegt wurden.

Mainz, Oktober 2014

Nadine Jäckels