

Auf diese Weise sind die Weine verschiedener Typen chromatographisch leicht zu unterscheiden. Wohl sind auch die nahe verwandten Weinsorten chromatographisch zu identifizieren, weil auch der Vergleich der Jahrgänge von demselben Wein einen wahrnehmbaren Unterschied zeigt.

### *Zusammenfassung*

Es ist eine Vorbehandlungs- und chromatographische Analysenmethode für die vergleichende Identifizierung der Weine entwickelt worden, welche sich auf die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Weine stützt. Mit dieser Methode kann man den Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung auch während der Gärung und der Reifung der Weine folgen.

Die Aminosäurechromatogramme desselben Weines sind leicht zu reproduzieren.

Die Chromatogramme desselben Weines, aber verschiedenen Jahrganges, weichen voneinander bezüglich der Gesamtkonzentration der Aminosäuren ab. Die Chromatogramme zeigen sich deutlich als von demselben Typus, weil die Verhältnisse unter den Aminosäuren dieselben blieben.

Die Chromatogramme der verschiedenen Weinsorten zeigen deutliche Unterschiede besonders im Gesamtaminosäuregehalt. Die Verhältnisse der Mengen von Alanin, Prolin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure, Valin, Leucin und Isoleucin und die Gegenwart oder das Fehlen des Phenylalanins bilden eine gute Bewertungsgrundlage.

## **Zur Kenntnis der Eiweißstoffe des Weines\***

### *III. Mitteilung<sup>1</sup>*

#### **Papierelektrophoretische Untersuchungen der „löslichen“ Traubenproteine**

Von

**J. KOCH und H. SCHWAHN**

*Mitteilung aus dem Institut für Obst- und Gemüseverwertung der Lehr- und Forschungsanstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau Geisenheim i. Rhg.*

Mit 3 Textabbildungen

*(Eingegangen am 6. Mai 1957)*

Nachdem bereits früher gezeigt werden konnte, daß das Rohprotein in Traubensaft und Wein sowie der sog. Wärmetrub und der „natürliche“ Eiweißtrub des Weines aus den gleichen Aminosäuren bestehen, sei nunmehr über die „löslichen“ Traubenproteine berichtet, die durch Papierelektrophorese erfaßt werden können.

#### **Papierelektrophoretische Darstellung**

Im Traubensaft vorkommende Proteine lassen sich bei  $pH$  5–6 mit Ammoniumsulfat ausfällen. Die dabei ausfallenden Eiweißstoffe sind jedoch nicht mit den Proteinen identisch, die nach Vorr gefällt werden können und von uns als Rohprotein bezeichnet wurden.

\* Diese Arbeit wurde mit Mitteln der deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten und des Zentralverbandes der Süßmost- und Obstgetränke-Industrie, Bonn, unterstützt, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

<sup>1</sup> II. Mitteilung: Diese Z. 106, 361 (1957).

Stickstoff- und Eiweißbestimmungen (Biuret-Methode) zeigen ebenso wie Aminosäureuntersuchungen nach der Hydrolyse, daß in der Voitschen Fällung außer Proteinen noch andere, zum Teil niedermolekulare Stickstoff-Substanzen vorkommen.

Der Vergleich des Proteingehaltes von Fällungen, die mit verschiedenen typischen Eiweißfällungsmitteln erhalten werden können (Tab. 1), berechtigt zu der Annahme, daß durch das Aussalzen mit Ammoniumsulfat die im Traubensaft und Wein gelösten Proteine erfaßt werden können.

Die Ammoniumsulfatfällung kann durch Umfällen und durch Dialyse gegen Wasser gereinigt werden. Aus der überstehenden Lösung läßt sich nach Dialyse und Einengen im Vakuum mit Ammoniumsulfat noch ein Niederschlag fällen, dessen Eiweißgehalt aber so gering ist, daß er bei den hier durchgeführten vergleichenden Untersuchungen vernachlässigt werden kann.

Die gereinigte Ammoniumsulfatfällung läßt sich gefrier-trocknen und der so erhältliche, in Veronalpuffer ( $p_H$  8,6) lösliche Trockenrückstand nach GRASSMANN und HANNIG<sup>2</sup> in den meisten Fällen papierelek-trophoretisch in zwei Eiweiß-fractionen trennen, die unter den Versuchsbedingungen ( $p_H$  8,6) zur Anode wandern.

Aus den Pherogrammen (Abb. 1) ist zu erkennen, daß die Fraktion I (Frak-tion mit größerer Wanderungsgeschwindigkeit) aus zwei und mehr Banden bestehen kann. Die verschiedenen Eiweißstoffe haben allerdings so ähnliche Wanderungs-geschwindigkeiten, daß sie nur schwer getrennt werden können, so daß in den meisten Fällen auf den Pherogrammen nur zwei Banden zu sehen sind. Das Verhältnis der

Tabelle 1. Übersicht über den Proteingehalt verschiedener „Eiweißfällungen“ von EK-filtrierte Traubensaft

Nr.	Fällungsmittel	Protein je l bestimmt nach der Biuret-Methode <sup>1</sup>		
		im Most in mg	im Filtrat (Fällung 5) in mg	insgesamt in mg
1	Ammoniumsulfat . .	166	20	186
2	Aceton . . . . .	175	10	185
3	Na-Wolframat . . .	98	71	169
4	Trichloressigsäure . .	78	31	109
5	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Alkohol . . .	188	—	188
	(nach Vorr) . . . . .			

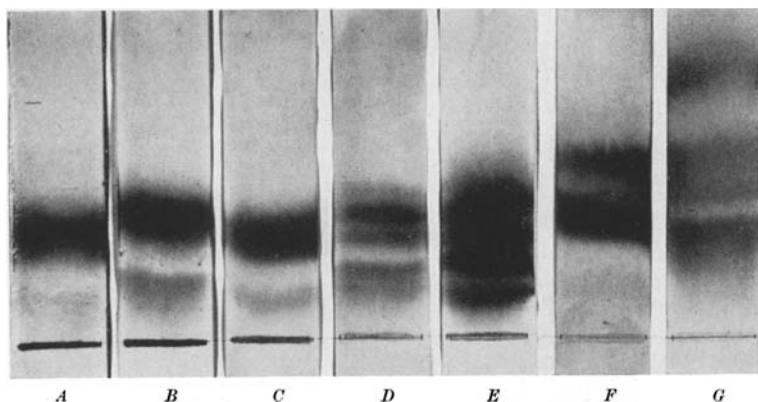


Abb. 1. Pherogramme verschiedener frisch gepreßter roter und weißer Traubensäfte. Weiße Trauben: A Rießling, B Müller-Thurgau, C CD 49—83, D Seibel 52—79, E Gewürztraminer; Rote Trauben: F Portugieser, G Léon Milliot

<sup>1</sup> WEICHSELBAUM, T. E.: Amer. J. Chem. Path. 10, 40 (1946). — FRANK, H., u. P.-H. KOECHER: Dtsch. Arch. klin. Med. 197, 181 (1950).

<sup>2</sup> GRASSMANN, W., u. K. HANNIG: Hoppe-Seyler's Z. 290, 1 (1952).

Tabelle 2. *Prozentuale Verteilung der beiden Eiweißfraktionen in handelsüblichen deutschen Traubensäften*

Bezeichnung	Eiweißfraktion	
	I in %	II in %
L 49 . . . . .	63,6	36,5
T 49 . . . . .	60,2	39,7
T 50 . . . . .	100	0
Gutedel Winkel 53 . .	90,1	9,8
R 54 . . . . .	86,5	13,5
S 88/54 . . . . .	64,2	35,8
S 8 + R 54 . . . . .	68,1	32
T 54 . . . . .	63,6	36,6
Meraner Muskateller .	93,7	6,3

beiden Fraktionen zueinander kann durch photometrische Auswertung in üblicher Weise<sup>1</sup> quantitativ bestimmt werden.

Untersuchungen an Trauben, über die hier nicht im einzelnen berichtet werden kann, lassen erkennen, daß das lösliche Traubenprotein im Saft erst während der Reife auftritt. In den handelsüblichen deutschen Traubensäften läßt sich das lösliche Traubeneiweiß nachweisen. Die Ergebnisse der lichtelektrischen Auswertung einiger Pherogramme sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

### Einfluß verschiedener kellertechnischer Maßnahmen

#### *Kurzzeiterhitzung der Moste*

Die löslichen Traubenproteine sind, wie die meisten Eiweißkörper, *wärmelabil*. Beim Erhitzen des frischen Keltermostes, wie es bei der Kurzzeiterhitzung zur Inaktivierung der Oxydasen in der Praxis der Süßmost-<sup>2</sup> und Weinbehandlung<sup>3</sup> vorkommt, tritt eine Hitzedenaturierung auf, deren Ausmaß von der Dauer und der

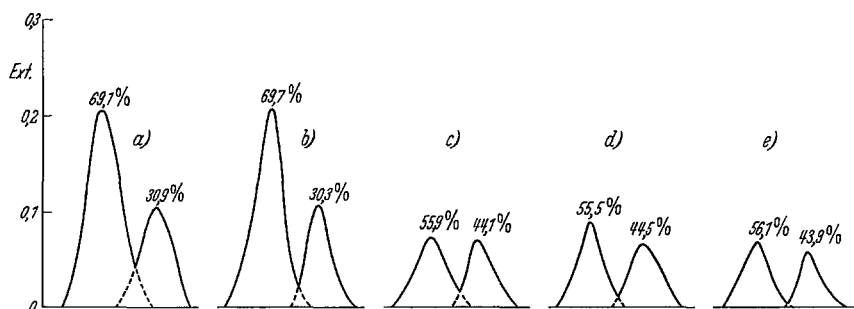


Abb. 2. *Der Einfluß des Erhitzens auf das Protein im frischen Keltermost der Trauben.* a) frisch gekelterter, zentrifugierter Traubenmost (63° Oechsle, 13,8‰ Gesamtsäure); b) der gleiche Most, fermentiert, nach Kieselgur- u. Schichtenfiltration (EK-Schichten); c) der gleiche Most zentrifugiert und auf 75° C kurzzeiterhitzt; d) der gleiche Most zentrifugiert und auf 87° C kurzzeiterhitzt; e) der gleiche Most, zentrifugiert und auf 87° C erhitzt, aber 2 min heißgehalten

Höhe der Temperatur abhängt. Das Eiweiß coaguliert und fällt aus, so daß das elektrophoretische Bild der im Most verbleibenden Proteine nach der Wärmebehandlung ein anderes ist als vorher (Abb. 2a, c—e).

Durch die Kurzzeiterhitzung werden beide Eiweißfraktionen der Traubenmoste abgebaut, Fraktion I jedoch stärker als Fraktion II, so daß das Verhältnis beider zueinander geändert wird. Die Kieselgur- und die EK-Filtration (entkeimende Filtration über keimdichte Filterschichten) sind ohne Einfluß auf das Eiweiß (Abb. 2b).

<sup>1</sup> WEICHSELBAUM, T. E.: Zit. S. 21, Anm. 1.

<sup>2</sup> KOCH, J.: *Neuzeitliche Erkenntnisse auf dem Gebiet der Süßmostherstellung*. 2. Aufl. Frankfurt/M.: S. Horn 1956.

<sup>3</sup> KOCH, J.: *Diese Z.* 100, 15 (1955).

### Gärung

Vergärt man den Keltermost *weißer* Trauben, so ist zu beobachten, daß in dem entstandenen Wein die gleichen löslichen Proteine enthalten sind wie im Most. Durch die Gärung tritt nur eine Eiweißabnahme ein, was auch auf Grund anderer Untersuchungen von KOCH und BRETTAUER<sup>1</sup> beobachtet wurde (Abb. 3). Vergärt man proteinhaltige *rote* Traubenmaishe, wie das bei der Rotweinherstellung allgemein üblich ist, so kann im Wein kein lösliches Traubenprotein mehr nachgewiesen werden. Auch auf der Maische vergorene Moste weißer Trauben liefern Weine, die frei von löslichem Traubenprotein sind. Es ist noch ungeklärt, ob das Protein bei der Maischgärung durch in Lösung gehende Gerbstoffe gefällt wird, was angenommen werden kann.

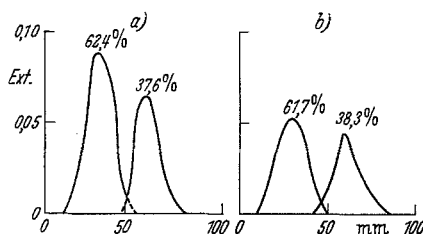


Abb. 3. Der Einfluß der Gärung auf das Traubenprotein. a vor der Gärung, b nach der Gärung. (lichtelektrische Auswertung der Pherogramme)

### Kurzzeiterhitzung der Weine

Wie bereits früher gezeigt werden konnte<sup>2</sup>, führt die Weinerhitzung zu dem gleichen Ergebnis wie die Mosterhitzung. Die löslichen Traubenproteine werden teilweise denaturiert, Fraktion I wieder stärker als Fraktion II<sup>3</sup>. Das Verhältnis der beiden löslichen Proteinfractionen ist keineswegs immer das gleiche (Tab. 3). Es hat den Anschein, als ob es dem Wert 1:1 zustrebt, wobei das praktisch erreichte Stadium, außer vom Ausgangszustand vor allem von der Dauer der Erhitzung abhängt. Noch unklar bleibt, inwieweit die Konzentration der im Wein vorhandenen Eiweißstoffe von Einfluß ist.

Tabelle 3. Einfluß der Weinerhitzung auf die Verteilung der beiden Eiweißfraktionen

Nr.	Bezeichnung	Eiweißfraktionen			
		vor		nach	
		dem Erhitzen			
		in %	in %	in %	in %
1	W 9	59,1	40,9	49,6	50,4
2	A 1/A 3	—	—	55,4	44,5
3	D 1/D 5	84,5	15,4	79,5	20,4
4	J 1/J 2	90,7	9,3	85,1	14,9
5	N 1/N 3	88,9	11,1	77,8	22,2

### Diskussion

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß das lösliche Protein der Traubenmoste und Weine aus mehreren Fraktionen besteht, die wärmelabil sind. Die früher beobachtete Konzentrationsabnahme der Aminosäuren im hydrolysierten Roheiweiß (Voit-Fällung) läßt sich als eine Denaturierung der löslichen Traubenproteine erkennen. Durch die Gärung wird das Protein als solches nicht verändert, wohl aber zum Teil — wahrscheinlich infolge der Alkoholbildung — ausgefällt, was mit den früheren Untersuchungen am hydrolysierten Roheiweiß übereinstimmt.

Da durch die Mosterhitzung die gleiche Denaturierung des löslichen Traubenproteins eingeleitet wird wie durch die Weinerhitzung, wird erklärlich, warum Weine,

<sup>1</sup> KOCH, J., u. G. BRETTAUER: Diese Z. **106**, 361 (1957).

<sup>2</sup> KOCH, J.: Weinberg u. Keller **3**, 49 (1956).

<sup>3</sup> KOCH, J., G. BRETTAUER u. H. SCHWAHN: Naturwiss. **43**, 421 (1956).

die aus kurzzeiterhitzten Mosten bereitet werden, ebenso „eiweißstabil“ sind wie erhitzte Weine aus unbehandelten Mosten.

Das Fehlen von löslichem Traubenprotein in Rotwein gibt eine Erklärung für das Fehlen von Eiweißtrübungen bei diesen alkoholischen Getränken, womit in dem löslichen Traubenprotein die Ursache für die Eiweißtrübungen der Weißweine gesehen wird.

Das reifebedingte Auftreten der löslichen Traubenproteine kann die vom jeweiligen Jahrgang abhängige Bereitschaft der Weine zur Eiweißtrübung erklären.

Der papierelektrophoretische Nachweis des löslichen Traubenproteins ist in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung, worüber später noch berichtet werden soll. So läßt sich damit der Unterschied der Wein- und Mostbehandlung mit Bentonit von der Erhitzung und andererseits der Nachweis der Mostentschwefelung erbringen, die immer mit einer Erhitzung verbunden ist<sup>1</sup>, was für die Einfuhr „naturreiner“ Traubenmoste oder -säfte nach Deutschland von größter Bedeutung ist.

### Arbeitsvorschrift<sup>2</sup>

Zur Aufarbeitung von frisch geklertem Most werden 500 ml mit 0,5 ml Filtrationsenzym (Pektinol flüssig, Röhm & Haas, Darmstadt) versetzt und bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Wein kann ohne Vorbereitung verarbeitet werden. Nach dem Abfiltrieren der entstandenen Ausflockung bringt man 200 ml Most oder Wein mit 10%igem Ammoniak auf  $p_H$  5–6, engt im Vakuum bei 20° C auf 100 ml ein und sättigt im Becherglas mit fein gepulvertem Ammoniumsulfat, wozu etwa 60 g benötigt werden. Nach dem Stehen über Nacht (Kühlschrank) wird der Niederschlag abzentrifugiert (15000 U/min) und in 3 ml Veronalpuffer von  $p_H$  8,6 gelöst. Das Ungelöste wird abzentrifugiert und nacheinander mit  $1 \times 3$  ml Puffer und  $2 \times 2$  ml Wasser ausgezogen. In den vereinigten Lösungen (10 ml) fällt man das Eiweiß durch Zusatz von 5 g Ammoniumsulfat erneut aus. Nach dem Abzentrifugieren wird der entstandene Niederschlag in 5 ml Puffer gelöst und 6–8 Std gegen Wasser dialysiert. Die gereinigte Eiweißlösung wird bei –13° C eingefroren und etwa 14 Std getrocknet.

Zur quantitativen Eiweißbestimmung muß die überstehende Lösung der ersten Fällung gegen Phosphatpuffer von  $p_H$  7,4 24 Std dialysiert, auf 25 ml im Vakuum eingengt und erneut gefällt und gereinigt werden wie oben beschrieben. Die Rückstände der Gefriertrocknung werden in 0,2–0,3 ml Veronalpuffer gelöst und davon 0,02–0,05 ml auf Filtrierpapier Schleicher und Schüll Nr. 2043 a Mg. aufgetragen und der Elektrophorese nach GRASSMANN und HANNIG<sup>3</sup> (Elphor-H-Gerät) unterworfen.

Nach 24 Std werden die Streifen bei 100° C getrocknet und in einer gesättigten Lösung von Amidoschwarz in 10%iger methanolischer Essigsäure angefärbt. Den überschüssigen Farbstoff wäscht man in der von GRASSMANN und HANNIG beschriebenen Weise aus in einer Mischung von 10% Eisessig, 40% Wasser und 50% Methanol. Nach dem Trocknen werden die angefärbten Streifen mit Elphor-Transparenzlösung imprägniert und im Elphor-Auswertgerät photometriert.

### Zusammenfassung

Das mit Ammoniumsulfat fällbare, lösliche Traubenprotein aus Most und Wein läßt sich papierelektrophoretisch in zwei Hauptfraktionen trennen, die zur Anode wandern, wobei damit gerechnet werden muß, daß auch diesen noch keine einheitlichen Proteine zugrunde liegen.

Das lösliche Traubenprotein, das im Saft unreifer Trauben noch nicht enthalten ist, tritt erst mit zunehmender Reife auf und ist wärmelabil. Die Fraktion I ist empfindlicher als die Fraktion II.

Beim Vergären der Moste wird das Traubenprotein nur zum Teil ausgefällt, auf der Maische vergorene Trauben liefern dagegen Weine, die frei von löslichem Eiweiß sind.

<sup>1</sup> PILNIK, W.: *Fruchtsaft-Industrie* 2, 62 (1957).

<sup>2</sup> Frl. M. GROMANN danken wir für die experimentelle Mitarbeit.

<sup>3</sup> GRASSMANN, W., u. K. HANNIG: *Zit. S. 21, Anm. 2.*