

Vorkommen und Inversion von Saccharose in Weinbeeren

von

A. RAPP, A. ZIEGLER UND H. STEFFAN

Occurrence and inversion of sucrose in grape berries

S u m m a r y . — Using HPLC as a rapid method of determining sucrose, besides glucose and fructose, it could be shown that the sucrose content in grape berries ranges between 5.5 and 21 g/l berry juice. In the centrifuged berry juice sucrose decreases from 1.8 to 11.4 g/l were observed within 2 hours at a temperature of 20 °C. The sucrose inversion is influenced by temperature, solid berry components, pH value and by added sucrose. An addition of SO₂ up to 200 mg/l does not influence the inversion rate. Sucrose inversion has also been established in intact, isolated berries. By means of ¹⁴C-sucrose it could be shown that freshly imported sucrose is more intensively inverted than sucrose already incorporated inside the berries. Variety-specific differences in the sucrose concentration or in the invertase activity could not be established in the investigated material.

Einleitung

Während in der älteren Literatur die Auffassung vertreten wurde, daß in Weinbeeren keine Saccharose vorkomme, wurden nach neueren Untersuchungen sehr unterschiedliche Saccharosemengen gefunden (ASTEGIANO und GRAZIANO 1958 (zitiert bei WEGER 1971 a), KLIEWER 1965, DE FRANCESCO 1968, WEGER 1971 a, b, SCHRADER *et al.* 1975, HAWKER *et al.* 1976).

Die im Verlauf der Reife in die Beeren eingewanderten Kohlenhydrate bestehen nach HARDY (1967) und KOBLET (1969) hauptsächlich aus Saccharose. Diese wird durch die Invertase (β -D-Fructofuranosido-fructo-hydrolase) in Glucose und Fructose gespalten (ARNOLD 1965, HARDY 1967, HAWKER 1968), wobei noch nicht völlig geklärt ist, ob die Inversion schon vor oder erst nach dem Eintritt in die Beeren erfolgt. Die Beeren selbst leisten sowohl durch Eigenassimilation als auch durch Umwandlung der Äpfelsäure ebenfalls einen wenn auch nur geringen Beitrag zur Zuckerakkumulation (HALE 1962, DRAWERT und STEFFAN 1966, RIBÉREAU-GAYON 1967, STEFFAN 1968).

In den letzten Jahren wurde nach der säulenchromatographischen Auftrennung der Zucker (KHYM und ZILL 1952) die Methode der Hochdruckflüssigkeitschromatographie angewandt. Mit dieser neuen verbesserten Analysenmethode ist es möglich, die einzelnen Zucker innerhalb weniger Minuten zu trennen und quantitativ zu bestimmen (PALMER und BRANDER 1974, RAPP *et al.* 1975).

Mit den vorliegenden Untersuchungen beabsichtigen wir, den Saccharosegehalt, wie er in intakten Weinbeeren vorliegt, sowie die Inversionsgeschwindigkeit zu ermitteln, um mehr Klarheit über das Vorkommen und Verhalten von Saccharose in Weinbeeren bzw. Traubensaft und Traubenmaische zu erhalten. Ferner stellte sich die Frage nach der Sortenspezifität, da eine erbliche Variabilität von Saccharosegehalt und Invertaseaktivität auch züchterisch bedeutsam sein könnte.

Material und Methoden

Die Versuche wurden in den Jahren 1975 und 1976 zu verschiedenen Reifeterminen bei 2 interspezifischen Neuzüchtungen und 20 *Vitis-vinifera*-Sorten durchgeführt.

1. Aufarbeitung der Proben

a) ohne Inhibierung der Enzyme: 20 g frisch geerntete, gesunde Weinbeeren wurden 3 min lang entsaftet und 3 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Vom klaren Zentrifugat wurde der Saccharosegehalt ermittelt, sodann die Probe zur Bestimmung der Saccharoseinversion aufgeteilt und bei verschiedenen Temperaturen in Abständen von 30 min analysiert. Die 1. Bestimmung (Ausgangssaccharosegehalt) erfolgte spätestens 10 min nach Zerstörung des Zellverbandes.

b) Inhibierung der Enzyme: 20 g frisch geerntete Weinbeeren wurden mit 20 ml Methanol 1 min homogenisiert und 3 min zentrifugiert. Vor dem Analysieren wurde das Methanol unter Vakuum bei 40 °C abgedampft, der Rückstand in definierter Wassermenge aufgenommen und darin der Saccharosegehalt bestimmt.

2. Saccharosebestimmung

Die Bestimmung der Saccharose wurde nach der von uns entwickelten Hochdruckflüssigchromatographischen Methode (RAPP *et al.* 1975) durchgeführt. — Trennsäule: 50-cm-Säule gefüllt mit Aminex A 6 ($17,5 \pm 2,5 \mu\text{m}$); mobile Phase: Wasser; 0,105 ml/min.

3. Isotopenversuche

a) Aufnahme über den Beerenstiel: Intakte gesunde Beeren wurden mit einem etwa 3 mm langen Stiel in eine markierte wäßrige Lösung von Saccharose-(U-¹⁴C) (0,5 μCi) eingetaucht.

b) Injektion ins Beereninnere: Je 1 μl markierte wäßrige Saccharose-(U-¹⁴C)-Lösung (0,5 μCi) wurde mit einer Injektionsnadel ins Beereninnere appliziert. Damit durch den Turgor der Beeren kein Saft austrat, wurde die Beere vor der Injektion mit einer feinen Kanüle angestochen und in diesen Kanal sodann die Nadel der Injektionsspritze eingeführt.

Die Beeren wurden in eiskaltem 80%igem Methanol homogenisiert und zentrifugiert. Beim Injektionsversuch wurden die Beeren ohne Beerenhaut aufgearbeitet, da nur der Anteil an Saccharose erfaßt werden sollte, der im Beerenfleisch selbst invertiert wurde.

Von der methanolischen Lösung wurden 20 μl auf Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetragen und in dem System Ameisensäure/Butanon-2/2-Methyl-Propanol-2/Wasser (15 : 30 : 45 : 15) zweimal aufsteigend chromatographiert. Die Detektion der radioaktiven Substanzflecken wurde mit der Beta-Kamera vorgenommen, die markierten Flecken wurden sodann von der Platte abgeschabt, im Oximat verbrannt und die Aktivität im Szintillationszähler gemessen. Der Radioaktivitätsanteil der Glucose-, Fructose- und Saccharose-Fractionen wurde gegen die Werte der als Referenz mitchromatographierten markierten Originalsaccharose verrechnet. Hierdurch können die Fehler eliminiert werden, die eventuell aufgrund einer nichtenzymatischen Inversion bei der Chromatographie auftreten.

Ergebnisse und Diskussion

1. Saccharosegehalt in Weinbeeren

Nach den in den Jahren 1975 und 1976 durchgeführten Untersuchungen an verschiedenen Rebsorten liegt der Saccharosegehalt in klaren zentrifugierten Trauben-

Saccharoseinversion bei Zusatz von Saccharose zur Traubenmaische (Sorte B 6-18; 70,6 °Oechsle, 5,6‰ Säure, pH-Wert 3,9). Natürlicher Saccharosegehalt 10,2 g/l
 Sucrose inversion when adding sucrose to grape mash (cultivar B 6-18; 70.6 °Oechsle, 5.6‰ acid, pH value 3.9). Natural sucrose content 10.2 g/l

	nach	Saccharose (g/l)						
		0	10	120	180	240	300	600 min
Zugabe von 24 g/l								
25 °C	34	11,5	3,0	0,6	0,6	0,6	—	
10 °C	34	21,2	19,0	14,0	6,0	1,2	—	
Zugabe von 130 g/l								
25 °C	140	112	78	45	20	4	1	
10 °C	140	132	118	105	92	60	30	

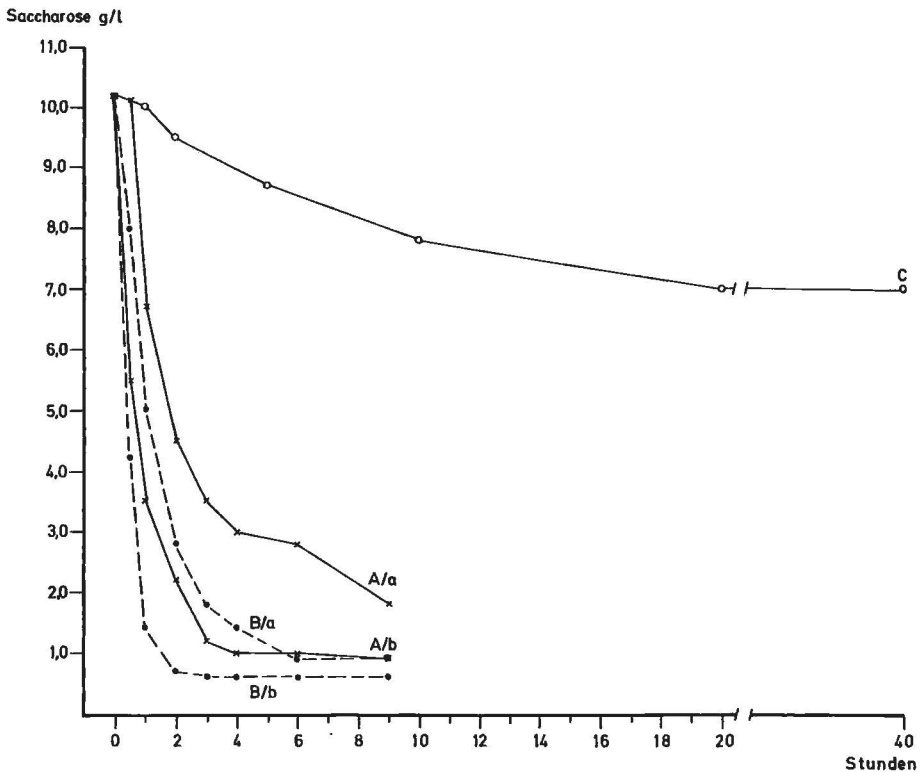


Abb. 1: Saccharoseinversion in Traubensaft und Traubenmaische in Abhängigkeit von der Temperatur und bei Lagerung intakter Beeren. Sorte B 6-18 (Neuzüchtung der BFA Geilweilerhof); 70,6 °Oechsle, 5,6‰ Säure, pH-Wert 3,9. A/a: zentrifugierter Traubensaft bei 10 °C, A/b: zentrifugierter Traubensaft bei 25 °C, B/a: Traubenmaische bei 10 °C, B/b: Traubenmaische bei 25 °C, C: intakte Beeren bei 20 °C gelagert, Saccharose sofort bestimmt.

Sucrose inversion in grape juice and grape mash in dependence on temperature and when storing intact berries. Cultivar B 6-18 (new breeding of BFA Geilweilerhof); 70.6 °Oechsle, 5.6‰ acid, pH value 3.9. A/a: centrifuged grape juice at 10 °C, A/b: centrifuged grape juice at 25 °C, B/a: grape mash at 10 °C, B/b: grape mash at 25 °C, C: intact berries stored at 20 °C, sucrose immediately determined.

säften — ohne Enzyminhibierung — zwischen 5,5 und 21 g/l. Bei 11 von 19 untersuchten Rebsorten liegen im Jahre 1976 die Saccharosegehalte über 12 g/l. Dabei ist kein direkter Zusammenhang zwischen Oechsle-Graden, Säuregehalt und Saccharosemenge festzustellen. Allerdings zeigt sich die Tendenz, daß im allgemeinen von 80—85 °Oechsle an Saccharosewerte über 10 g/l festzustellen sind. Die in zentrifugierten Traubensäften ermittelten Werte liegen höher als diejenigen anderer Autoren. WEGER (1971 a) bestimmte den Saccharosegehalt mit Hilfe der gravimetrischen und papierchromatographischen Methode in Südtiroler Traubenmosten und fand bei reifem und überreifem Lesegut Werte zwischen 0 und 12,9 g/l. SCHRADER *et al.* (1975), die die Saccharose mit dem Autoanalyser und nach REBELEIN (vor und nach Inversion) bestimmten, konnten Saccharosegehalte von maximal 1,51 g/100 g Beeren nachweisen. Das entspricht einer Menge von etwa 18 g/l. Die letztgenannten Autoren fanden mit zunehmender Reife, nämlich von Anfang August bis Mitte September, eine Zunahme des Saccharosegehaltes bis zu einem Maximalwert von ca. 1 g/100 g Beeren (entsprechend 12 g/l).

Um zu prüfen, inwieweit während der Aufarbeitung eine Saccharosespaltung stattfindet, wurde bei einigen Sorten zusätzlich der Saccharosegehalt unter sofortiger Ausschaltung der Enzymaktivität bei der Aufarbeitung bestimmt. Nach Inhibierung der Enzyme durch Homogenisieren der Weinbeeren in Methanol (10 g Beeren in 10 ml Methanol) wurde bei allen untersuchten Sorten ein um 3—5 g/l höherer Saccharosegehalt gefunden. Das bedeutet, daß beim Aufarbeiten der Proben, obwohl vom Zerstören des Zellverbandes bis zur Analyse nur maximal 10 min vergingen, schon ein Teil der Saccharose invertiert wird. Ferner wird beobachtet, daß selbst in methanolischen Lösungen die säurekatalysierte Hydrolyse abläuft. In 2—13 Wochen alten methanolischen Lösungen war die Saccharose zum Teil vollkommen invertiert. Es empfiehlt sich deshalb, die Probelösung möglichst schnell zu analysieren.

2. Saccharoseinversion im Traubensaft

In zentrifugiertem Saft reifer Weinbeeren wurde sofort nach der Aufarbeitung und 2 Std. später der Saccharosegehalt ermittelt. Dabei zeigte sich, daß bei einer Raumtemperatur von 20 °C bei den untersuchten 19 Sorten die Saccharosewerte durchschnittlich um 4 g/l abnahmen. Einige Sorten fielen durch extrem niedrige Abnahmewerte (bis zu 1,8 g/l) und einige durch hohe Werte (bis zu 11,4 g/l) auf. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, ist diese Abnahme von der Temperatur abhängig. Bei der Sorte B 6-18 nimmt innerhalb von 2 Std. bei 25 °C der Saccharosegehalt von 10,2 g/l auf 2,2 g/l und bei 10 °C von 10,2 g/l auf 4,5 g/l ab. In der 1. Std. beträgt bei 25 °C die Abnahme 1 g/l · 10 min und bei 10 °C 0,6 g/l · 10 min. Nach den Angaben von WEGER (1971 b) ist in Traubenmost die Saccharose bei 25 °C nach 6 Std. und bei 4 °C nach 48 Std. vollkommen invertiert. Diese Abnahme bei 25 °C deckt sich mit unseren Ergebnissen.

Wird eine praxisnahe Aufarbeitung der Weinbeeren vorgenommen, so ist in dieser Probe die Saccharoseabnahme höher als im zentrifugierten Beerensaft (Abb. 1). Die Abnahme in der 1. Std. beträgt bei 25 °C 1,5 g/l · 10 min und bei 10 °C 0,8 g/l · 10 min.

Nach WEGER (1971 b) geht die Inversion der natürlichen wie auch der zugesetzten Saccharose mit gleicher Geschwindigkeit vor sich. Dieses Ergebnis können wir nicht bestätigen. In unseren Versuchen erhöht ein Zusatz von Saccharose zur Maische die Inversionsgeschwindigkeit (Tabelle). Bei 25 °C beträgt in der Kontrollmaische (ohne Zusatz) während der 1. Std. die Saccharoseabnahme 1,5 g/l · 10 min. (Abb. 1). Nach

Abb. 2: pH-Abhängigkeit der Saccharoseinversion in Traubenmost. Sorte Morio-Muskat; 70,6 ‰ Oechsle, 11,7‰ Säure, pH-Wert 3,18. pH-Einstellung: Ansäuern mit Äpfelsäure und Citronensäure, neutralisieren mit Kalilauge. Dependence of sucrose inversion on the pH in grape must. Cultivar Morio Muscat; 70.6 ‰ Oechsle, 11.7‰ acid, pH value 3.18. pH regulation: acidifying with malic acid and citric acid, neutralizing with potassium hydroxide solution.

Zugabe von 24 g Saccharose/l steigt die Inversionsgeschwindigkeit auf 2 g/l · 10 min und nach Zugabe von 130 g Saccharose/l auf 5 g/l · 10 min (Tabelle).

WEGER (1971 b) beschreibt bereits den Einfluß der Temperatur auf die Inversion. Auch wir konnten feststellen, daß bei einer Temperaturerhöhung auf 25° C die Saccharose doppelt so schnell abgebaut wird wie bei 10 °C. Einen weiteren Einfluß auf die Inversion übt der pH-Wert aus. Die bei der Sorte Morio-Muskat in zentrifugiertem Most durchgeführte Bestimmung zeigt deutlich, daß ein Optimum für die Saccharosespaltung bei pH 3,4 vorliegt (Abb. 2).

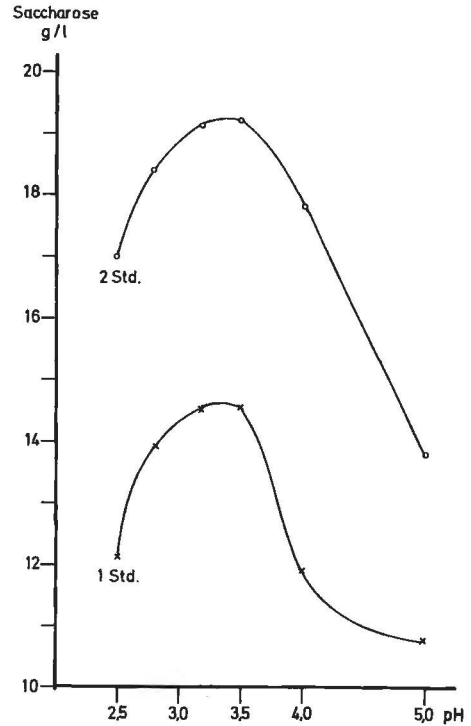
CORDONNIER *et al.* (1975) haben in einem synthetischen Versuchsansatz mit einem Enzympräparat aus Weinbeeren bei einer Temperatur von 80 °C ein Optimum bei pH 1,8 gefunden, was in unseren Versuchen nicht nachweisbar war. Wahrscheinlich rührt der Unterschied daher, daß bei verschiedenen Temperaturen auch verschiedene Optima vorliegen. Nach unserer Meinung beginnt außerdem bei 80 °C die saure Hydrolyse der Saccharose, so daß ein pH < 2,5 diese Spaltung begünstigt.

Die Inversionsgeschwindigkeit wird durch SO₂-Gaben bis 200 mg/l nicht beeinträchtigt, weder beim Versuch mit Maische noch mit zentrifugiertem Saft. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von WEGER (1971 b) und CORDONNIER *et al.* (1975).

Da die Invertase je nach Reifegrad in unterschiedlicher Aktivität vorliegt, was auch HAWKER (1968) und CORDONNIER *et al.* (1975) gefunden haben, kann angenommen werden, daß schon während der Aufarbeitung Saccharosespaltung eintritt. Dies wäre eine Erklärungsmöglichkeit für unterschiedliche Saccharoseangaben, die auf verschiedenen Aufbereitungsverfahren beruhen.

3. Saccharoseinversion in intakten Beeren

In intakten Weinbeeren konnten wir ebenfalls eine Saccharoseabnahme feststellen (Abb. 1). Sie verläuft anfangs langsam und bleibt nach 15–20 Std. bei den beiden untersuchten Sorten um 7 g/l stehen. Daraus kann auf eine Inversion der in der intakten Beere befindlichen Saccharose geschlossen werden. Zur Klärung dieser Feststellung wurden Versuche mit radioaktiv markierter Saccharose-(U-¹⁴C) durchgeführt. Hierbei sollte sowohl das Schicksal der gerade in Einlagerung begriffenen als auch der bereits eingelagerten Saccharose ermittelt werden. Dazu wurde



in einer Versuchsserie die markierte Saccharose über den Stiel appliziert, in einer anderen direkt ins Beereninnere injiziert. Nach einer Versuchszeit von 6, 12 und 20 Std. bei 25 °C fanden wir nach der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung der Methanolhomogenate eine unterschiedliche Verteilung der Radioaktivität bei Glucose, Fructose und Saccharose. Nach 6 Std. sind bei Aufnahme über den Beerenstiel 15%, nach 12 Std. 24% und nach 20 Std. 57% der zugeführten Saccharose invertiert. Die ins Beerenfleisch injizierte Saccharose invertiert langsamer; nach 6 Std. waren 9% und nach 20 Std. erst 13% invertiert.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die im Beereninneren abgelagerte Saccharose nur geringfügig (13% nach 20 Std.) invertiert wird. Damit kann die anfänglich festgestellte deutliche Abnahme der Saccharose in intakten Weinbeeren überwiegend auf die Invertierung der in der Beerenhaut befindlichen Saccharose zurückgeführt werden.

Zusammenfassung

Durch die Anwendung der HPLC-Methode zur schnellen quantitativen Erfassung von Saccharose neben Glucose und Fructose konnte gezeigt werden, daß der Saccharosegehalt in Weinbeeren zwischen 5,5 und 21 g/l Beerensaft liegt. Im zentrifugierten Beerensaft nimmt der Saccharosegehalt innerhalb von 2 Std. bei einer Temperatur von 20 °C um 1,8 bis 11,4 g/l ab. Die Saccharoseinversion wird von Temperatur, festen Beerenanteilen, pH-Wert und zusätzlich zugefügter Saccharose beeinflusst. Ein Zusatz von SO₂ bis 200 mg/l hat keinen Einfluß auf die Spaltgeschwindigkeit. Auch in intakten, isolierten Beeren konnten wir eine Saccharoseinversion nachweisen. Dabei konnte mit ¹⁴C-markierter Saccharose gezeigt werden, daß frisch eingewanderte Saccharose intensiver invertiert wird als bereits im Beereninneren eingelagerte. In dem bearbeiteten Untersuchungsmaterial konnten keine sortenspezifischen Unterschiede der Saccharosekonzentration oder der Invertaseaktivität aufgezeigt werden.

Literatur

- ARNOLD, W. N., 1965: Fructofuranosidase from grape berries. *Biochem. Biophys. Acta* **110**, 143—147.
- CORDONNIER, R., BIRON, C. et DUGAL, A., 1975: Les invertases du raisin et de *Saccharomyces cerevisiae*. Leur participation respective à l'hydrolyse du Saccharose ajouté à la vinification. *Ann. Technol. Agric. (Paris)* **24**, 171—192.
- DRAWERT, F. und STEFFAN, H., 1966: Biochemisch-physiologische Untersuchungen an Traubenbeeren. III. Stoffwechsel von zugeführten ¹⁴C-Verbindungen und die Bedeutung des Säure-Zucker-Metabolismus für die Reifung von Traubenbeeren. *Vitis* **5**, 377—384.
- DE FRANCESCO, F., 1968: Motivi tecnici ed economici per la corezione con saccarosio dei vini a denominazione d'origine controllata e garantita. *Vini d'Italia* **56**, 333—339.
- HALB, C. R., 1962: Synthesis of organic acids in the fruit of the grape. *Nature (London)* **195**, 917—918.
- HARDY, P. J., 1967: Sucrose breakdown and synthesis in the ripening berry. *Austral. J. Biol. Sci.* **20**, 465—470.
- HAWKER, J. S., 1968: Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries. *Phytochemistry* **8**, 9—17.
- — —, RUFFNER, H. P. and WALKER, R. R., 1976: The sucrose content of some Australian grapes. *Amer. J. Enol. Viticult.* **27**, 125—129.
- KHYM, J. X. and ZILL, L. P., 1952: The separation of sugars by ion exchange. *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2090—2098.
- KLIEWER, W. M., 1965: The sugars of grapevines. II. Identification and seasonal changes in the concentration of several trace sugars in *Vitis vinifera*. *Amer. J. Enol. Viticult.* **16**, 168—178.

- KOBLET, W., 1969: Wanderung von Assimilaten in Rebtrieben und Einfluß der Blattfläche auf Ertrag und Qualität der Trauben. *Wein-Wiss.* 24, 277—319.
- PALMER, J. K. and BRANDER, W. B., 1974: Determination of sucrose, fructose and glucose by liquid chromatography. *J. Agricult. Food Chem.* 22, 709—712.
- RIÉREAU-GAYON, G., 1967: Etude du métabolisme des glucides, des acides organiques et des acides aminés chez *Vitis vinifera*. *C. R. Séances Acad. Agricult. France* 53, 631—635.
- RAPP, A., BACHMANN, O. und ZIEGLER, A., 1975: Bestimmung von Zucker, Glycerin und Äthanol im Wein mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie. *Dt. Lebensm.-Rundsch.* 71, 345—348.
- SCHRADER, U., LEMPERLE, E., BECKER, N. J. und BERGNER, K., 1975: Der Aminosäure-, Zucker-, Säure- und Mineralstoffgehalt von Weinbeeren in Abhängigkeit vom Kleinklima des Standortes der Rebe. 1. Mitt. Zuckergehalt. *Wein-Wiss.* 30, 99—111.
- STEFFAN, H., 1968: Untersuchungen über Veränderungen von Inhaltsstoffen in reifen Beeren der Rebe mit ¹⁴C-Verbindungen. Diss. Univ. Karlsruhe.
- WEGER, B., 1971 a: Über den Gehalt der Trauben an natürlicher Saccharose und deren Inversionsgeschwindigkeit im Most. *Wein-Wiss.* 26, 194—201.
- — 1971 b: Über die Inversionsgeschwindigkeit von Saccharose in Most. *Mitt. Klosterneuburg* 21, 435—438.

Eingegangen am 11. 3. 1977

Dir. u. Prof. Dr. A. RAPP
BFA für Rebenzüchtung
Geilweilerhof
D 6741 Siebeldingen