

Über die elektrophoretische Differenzierung und Klassifizierung von Proteinen

II. Dünnschicht-isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus Trauben verschiedener Rebsorten

Friedrich Drawert und Werner Müller***

Institut für chemisch-technische Analyse und chemische Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan (BRD)

Eingegangen am 13. Juli 1973

On the Differentiation and Classification of Proteins by Electrophoresis

II. Thin-Layer-Isoelectric Focussing of Proteins from Different Grape-Varieties

Summary. By means of thin-layer-isoelectric focussing (DIEF) the heterogeneity of proteins in grapes is demonstrated. Up to 25 different components were detected whereby at least 4 components definitely could be identified as common to all varieties investigated. — By enzyme determination (esterases and phenolases) the multiplicity of enzymes and isoenzymes present in grapes is also demonstrated. This, up to 7 activity-zones in the range of pH 7—9 in esterases and 5—8 activity zones in phenolases at pH 4—6 were detected.

Zusammenfassung. Mit der dünn-schicht-isoelektrischen Fokussierung (DIEF) wird die Heterogenität der Proteine in Weintrauben aufgezeigt. Es konnten dabei bis zu 25 verschiedene Komponenten nachgewiesen werden, wobei mindestens 4 eindeutig als allen untersuchten Sorten gemeinsame Komponenten identifiziert wurden. — Anhand von Enzymnachweisen (Esterasen und Phenolasen) wird die Mannigfaltigkeit der in der Traube vorkommenden Enzyme und Isoenzyme demonstriert. So treten bei den Esterasenachweisen bis zu 7 Aktivitätszonen im pH 7—9 Bereich und bei den Phenolasen 5—8 Aktivitätszonen im Bereich von pH 4—6 auf.

Einleitung

Für die Proteine und Enzyme der Rebe, speziell der Traubenbeeren, des Traubenmostes und des Weines besteht ein erhebliches Interesse. Eine genauere Kenntnis der Proteine der Beeren erlaubt u. U. eine Sortendifferenzierung; die Proteine des Weines sind in gewissen Jahrgängen nur schwer und oft unter nachteiliger Veränderung durch Stabilisierungsmaßnahmen zu entfernen, um Trübungen zu verhindern. Die Enzyme spielen vor allem während der Maischeprozesse eine positive wie negative Rolle.

Wir verfolgten zunächst das Ziel, mit geeigneten elektrophoretischen Methoden eine Bestandsaufnahme der Traubenproteine vorzunehmen, um auch deren Sortenspezifität zu prüfen; sodann einen ersten Einblick in die Verteilungsmuster gewisser Enzyme und Isoenzyme zu bekommen. Nachfolgend werden die Ergebnisse unter Anwendung der dünn-schicht-isoelektrischen Fokussierung beschrieben.

Material und Methoden

Zur Untersuchung gelangten zehn verschiedene Weintraubensorten aus dem Anbaugebiet Südpfalz: Silvaner, Müller-Thurgau, Ruländer, Morio-Muskat, Färber und die Neuzüchtungen Kerner, Nobling, Huxel, Optima und Bacchus. Die vollreifen Trauben wurden innerhalb 2 Tagen nach der Ernte mit Aceton zu Trockenpulver verarbeitet.

1. Herstellung eines Aceton-trockenpulvers

200 g Traubenbeeren (nur gesunde Beeren) entkernen und in 500 ml Aceton von -30°C einbringen. Temperatur dabei durch Zugabe von Trockeneis oder flüssigem Stickstoff stets unter -20°C halten. Die Trauben in dem Aceton 1 Std bei -25°C (Kühltruhe) aufbewahren und dann homogenisieren, wobei die Temperatur nicht über -20°C steigen soll. Das Homogenat in einen

* Auszug aus der Diss. W. Müller, TU-München 1973. Die Arbeiten wurden vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten gefördert.

** Herrn Professor H. Ludwig Acker zum 60. Geburtstag gewidmet.

2-l-Erlenmeyerkolben überspülen und über Nacht bei -25°C in der Kühltruhe belassen. Danach auf einem Büchner-Trichter absaugen, zweimal mit Aceton-Wasser (4 + 1) von -25°C nachspülen, dreimal mit reinem Aceton von -25°C und leicht trocken saugen. Das Pulver 3–5 Std im Vakuum trocknen (bis kein Acetongeruch mehr wahrnehmbar ist), wiegen und bei -20°C aufbewahren.

2. Extraktion des Acetonrockenpulvers

Eine 100 g Trauben entsprechende Menge des Acetonrockenpulvers mit 50 ml 0,1 m-Phosphatpuffer pH 7,4 bei ca. 2°C unter Zusatz von 10% Glycerin, 0,5% Natriumcoffeinbenzoat und 0,5% Polyvinylpyrrolidon (PVPP) 2 min homogenisieren (Ultra Turrax), anschließend 2 Std stehen lassen und bei 30000 g in der Kühlzentrifuge bei 2°C zentrifugieren. Den Überstand durch Ultrafiltration im Kühlraum unter Verwendung eines Membranfilters SM 12136 (Sartorius-Werke, Göttingen), der eine Ausschlussgrenze für Moleküle mit einem MG von 10000 aufweist, auf ca. 2 ml einengen. Die Zeitdauer der Ultrafiltration kann durch stetiges Schütteln mit Hilfe einer geeigneten Schüttelapparatur wesentlich verkürzt werden (Fritsch, Pulverisette).

3. Dünnschicht-isoelektrische Fokussierung

Die Methode wurde im Prinzip ausführlich beschrieben [1, 2]. Beschichtung: Sephadex G 75 in 1%iger Ampholytlösung pH 3–10, auf Glasplatten 20×20 cm; Schichtdicke 0,75 mm. — Elektrophoresebedingungen: 4 Std bei 300 V, anschließend 1–2 Std bei 500 V; Gerät der Fa. Desaga, Heidelberg. — Trocknen des Papierabklatsches: 15 min bei 110°C . — Auswaschen der Ampholyte: 10%ige Trichloressigsäure (TCA)-Lösung. — Färbelösung: 0,5% Coomassie Blue G 250 (Serva, Heidelberg) in H_2O /Methanol/Eisessig (6 + 3 + 1). — Entfärbelösung: H_2O /Methanol:Eisessig (6 + 3 + 1). — Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wird spektral-photometrisch bei den Wellenlängen 280 und 260 nm bestimmt und nach Kalkcar [3] mittels der Formel $1,45 \times \text{OD}_{280} - 0,74 \times \text{OD}_{260} = \text{mg Protein/ml}$ errechnet ($\text{OD} = \text{opt. Dichte} = \text{Extinktion}$). Das Probenauftragsvolumen richtet sich nach der Proteinkonzentration. Bei einer Schichtdicke von 0,75 mm und einer Auftragsbreite von 18 mm (Deckglasmethode) liegt die günstigste Menge bei den Traubenproteinen zwischen 4–8 mg Protein insgesamt. Bei einem Auftragsvolumen über 40 μl empfiehlt es sich, die Proben im Abstand von ca. 5–10 mm hintereinander (in späterer Laufrichtung gesehen) aufzutragen. Dieses Verfahren kommt meist dann zur Anwendung, wenn eine weitere Konzentrierung der Proteine mit einer starken Viscositätszunahme verbunden ist, wie es häufig bei verschiedenen Traubensorten vorkommt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Vitatron-Universaldensitometer TLD 100 (Vitatron GmbH, Forsbach) in der Reflektion.

4. Enzymnachweise

Nachweis der Esterasen [4, 5]: Einen 20×20 cm großen Bogen Filtrierpapier (Schleicher und Schüll 2043 bmgI oder Whatman Nr. 3) mit 0,3 m-Phosphatpuffer (KH_2PO_4 — Na_2HPO_4) pH 7,2 imprägnieren. Kurz vor Beendigung der DIEF, d. h. kurz vor dem Papierabklatsch, das gepufferte Papier nochmals mit folgender Lösung tränken: 300 mg Fast Blue (Serva, Heidelberg) in 10 ml H_2O , gemischt mit 40 mg β -Naphthylacetat in 90 ml Methanol (muß stets frisch hergestellt werden).

Das Papier bei Zimmertemperatur trocknen und nach beendigter Fokussierung vom Plattende her über die Gelschicht abrollen. Nach einer Kontaktzeit von 5–10 min erscheinen violette Banden. Den Abklatsch trocknen (bei schmalen Banden bei Raumtemperatur, bei breiteren rasch bei 110°C).

Nachweis der Phenolasen [5]: Einen 20×20 cm großen Bogen Filtrierpapier (S. u. S. 2043 bmgI oder Whatman Nr. 3) mit entlüftetem 0,02 m-Phosphatpuffer pH 7,2–7,4, der folgende Substanzen enthält, kurz vor dem Abklatsch imprägnieren und kurz antrocknen: 0,0015 m-Kaffeensäure, 0,01 m-Brenzkatechin, 0,0015 m-DOPA, 0,01 m-Pyrogallol, 0,0015 m-Tyrosin.

Nach einer Kontaktzeit von 5–10 min das Papier bei Raumtemperatur trocknen. Nach ca. 20 min wird gewöhnlich das Maximum der Farbtintensität erreicht. Zur Vermeidung evtl. auftretender Bandenverbreiterung durch weiterlaufende Enzymtätigkeit den Abklatsch für kurze Zeit in den Trockenschrank bei 110°C legen.

Ergebnisse

Die DIEF der Traubenproteine im pH 3–10 Gradienten wird in Abb. 1 und 2 wiedergegeben. Die Traubenproteine wurden dabei in durchschnittlich 9–12 Hauptkomponenten getrennt. Ausnahmen bilden *Kerner* mit nur 7 und *Morio* mit 14 deutlich erkennbaren Zonen. Das Auftragsvolumen betrug je nach Proteingehalt 60–120 μl und die Fokussierungsdauer $5\frac{1}{2}$ Std. Die Ausbildung des pH-Gradienten über die ganze Plattenbreite hinweg ist nicht gleichmäßig und hängt in geringem Umfang sowohl von der Proteinkonzentration als auch insbesondere von den Begleitstoffen in der Probe ab. Darauf wies auch Wenn [6] hin.

Je reiner die Proteinlösung war, desto mehr wurde der pH-Gradient in der Nähe der Startzone zur kathodischen Seite verschoben (vgl. Abb. 1 und 2). Obgleich dies nur wenige Millimeter ausmachte, mußte diese Abweichung bei weiteren Betrachtungen berücksichtigt werden. Im neutralen und alkalischen Bereich hat sich der Gradient wieder ausgeglichen und ist über die gesamte Plattenbreite gleichmäßig ausgebildet. Aus diesen Gründen wird bei der densitometrischen Auswertung des Papierabklatsches die Bandenverschiebung in der Weise korrigiert, daß als Bezugspunkt

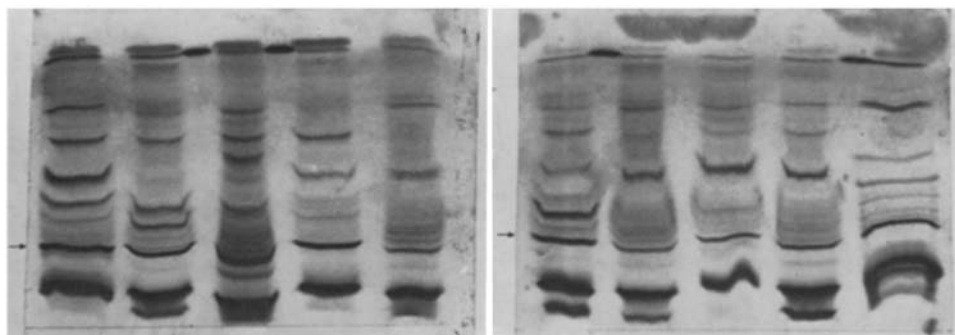


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1. Dünnschicht-isoelektrische Fokussierung in pH 3—10 Trägerampholyten. Von links nach rechts: *Ruländer, Nobling, Morio, Kerner, Bacchus*. Auftragsmenge: 60—120 μ l. Anode unten, Kathode oben

Abb. 2. Dünnschicht-isoelektrische Fokussierung in pH 3—10 Trägerampholyten. Von links nach rechts: *Silvaner, Optima, Müller-Thurgau, Huxel, Färber*. Auftragsmenge: 60—120 μ l. Anode unten, Kathode oben

für die einzelnen Komponenten nicht die Startlinie, sondern die, allen Sorten gemeinsame, in Abb. 1 und 2 mit einem Pfeil gekennzeichnete Bande gilt. Bei näherer Betrachtung der direkten photographischen Wiedergabe der beiden Pherogramme fällt auf, daß auch die Laufstrecken geringfügigen Schwankungen unterworfen sind, vor allem zwischen zwei verschiedenen Platten und Läufen. Um auch diesen kleinen

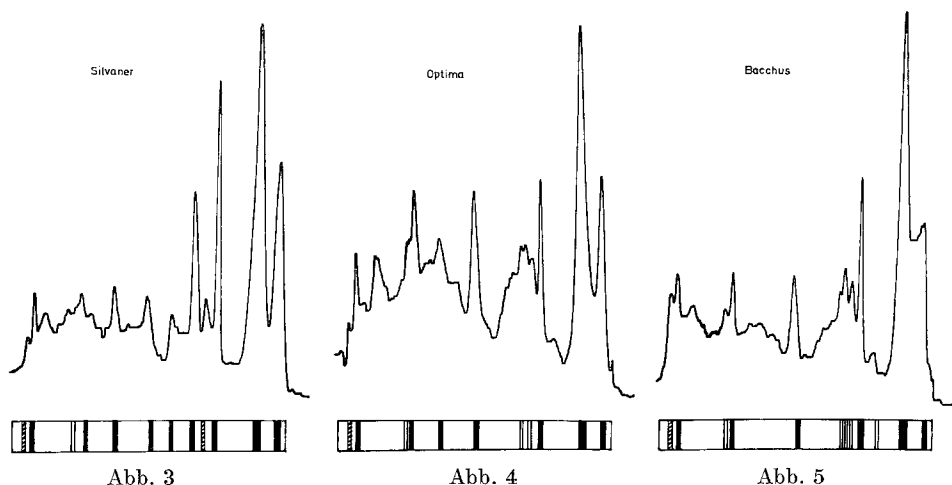
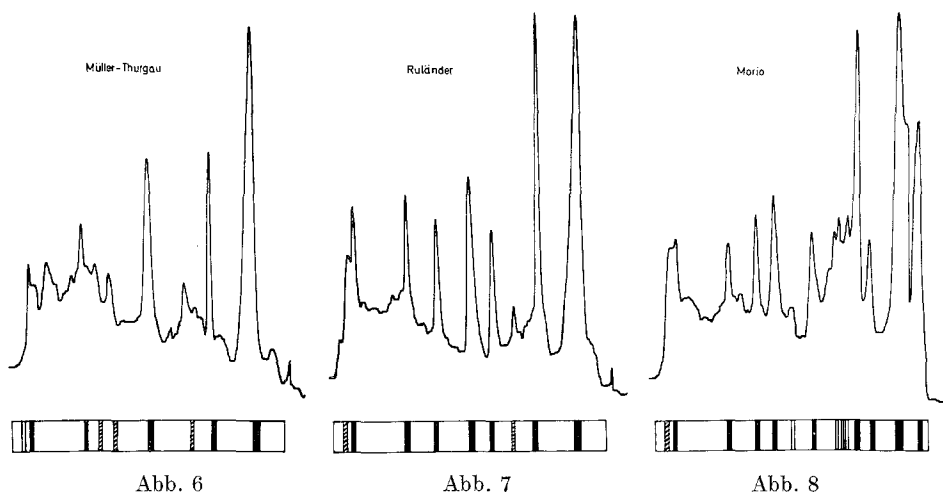


Abb. 3

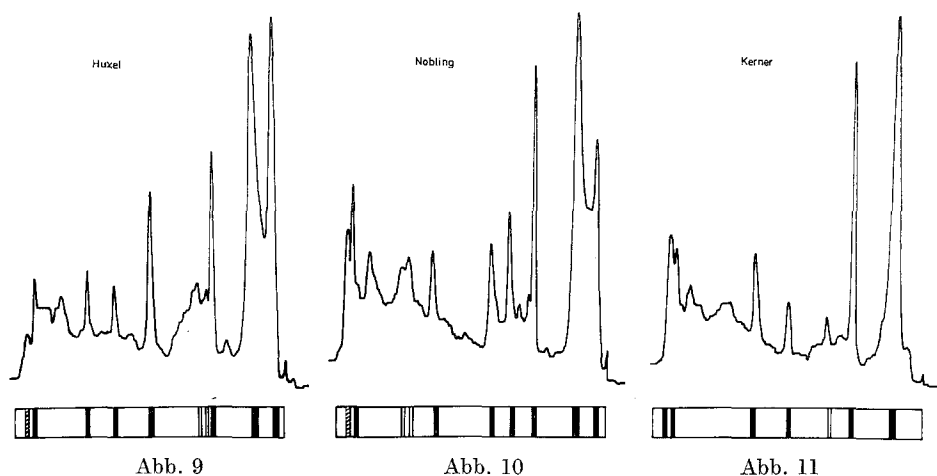
Abb. 4

Abb. 5

Abb. 3—12. Densitogramme der Proteinverteilungsmuster verschiedener Traubensorten nach der DIEF; darunter die zugehörigen Pherogramme. Anode rechts, Kathode links



Fehler auszugleichen, wurden die Proteinmuster auf eine einheitliche Laufstrecke von 13 cm umgezeichnet (Abb. 3–13), wobei als Bezugspunkt die zwei kurz aufeinanderfolgenden, bei allen von uns untersuchten Rebsorten im alkalischen Bereich zwischen pH 9,5–10 aufgetretenen Banden dienten. Die entsprechenden Fokussierungsmuster der einzelnen Weintrauben werden unter den dazugehörigen Densitogrammen in den Abb. 3–12 gezeigt.



In einer Gegenüberstellung werden alle Pherogramme in Abb. 13 dargestellt. Sämtliche von uns untersuchten Traubensorten weisen mindestens vier allen gemeinsame Komponenten auf. Zwei sehr stark ausgeprägte im sauren Bereich zwischen pH 4–5 und zwei deutlichen Banden im alkalischen bei pH 9–10. In den übrigen Bereichen zeigen sich recht deutliche Unterschiede. Äußerst ähnliche Fokussierungsmuster erscheinen bei den Sorten *Optima* und *Bacchus*, die mindestens acht eindeutig gleiche Komponenten besitzen und sich beide nur wenig von den Proteinen der Sorte *Silvaner* unterscheiden (ebenfalls je acht gemeinsame Banden). Eine gewisse Ähnlichkeit mit den vorher genannten Sorten zeigt noch *Nobling*. Auffallend ist das

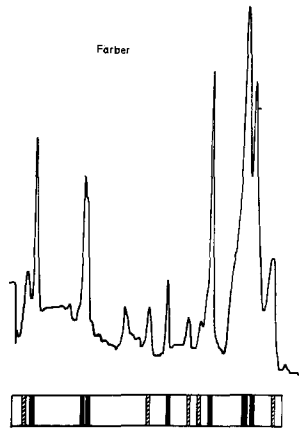


Abb. 12

völlige Fehlen von Banden im Bereich von pH 7–9 bei *Kerner* und die sehr starke Doppelbande bei *Färber* im Bereich von pH 7–8, die besonders charakteristisch für *Färber* ist und sonst nirgends auftritt. Diese Charakteristik kommt in Abb. 2 noch wesentlich besser zum Ausdruck.

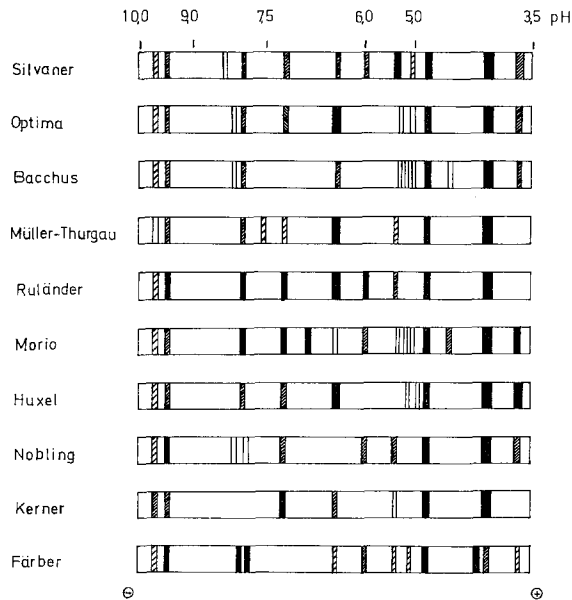


Abb. 13. Proteinverteilungsmuster von zehn verschiedenen Rebsorten nach der DIEF. Kathode links, Anode rechts. Oben: Ungefährender Verlauf des pH-Gradienten

Bei *Ruländer* sind auffallend die sieben sehr starken Banden, die über den gesamten pH-Bereich ziemlich gleichmäßig verteilt sind. Es fehlt hier aber wie bei *Müller-Thurgau* und *Kerner* eine saure Komponente bei einem pH von ca. 3,5, die der ersten Hauptbande, die allen Sorten gemeinsam ist und nur bei *Färber* in zwei Komponenten aufgespalten wird, vorgelagert ist. Ein vollkommenes Fehlen muß aber ausgeschlossen

werden, da bei erhöhter Auftragsmenge auch bei diesen letztgenannten Sorten eine schwache Zone erscheint. Die größte Auftrennung wurde bei *Morio* mit 14 deutlich sichtbaren Zonen erreicht, die geringste mit nur 7 bei *Kerner*.

Zymogramme

Esterasen

Der Nachweis der Esterasen mit β -Naphthylacetat und Fast Blue in Abb. 14 und 15 zeigt, daß außer bei der *Färbertraube*, die keine Esterase aufweist, wie auch Görg [7] festgestellt hat, bei allen Trauben mindestens 2 starke Enzymbanden erscheinen. Die meisten Isoenzyme enthalten *Morio* und *Bacchus*. Danach folgen *Optima*, *Silvaner* und *Nobling*. Nur mehr zwei ausgeprägte Enzymzonen sind bei

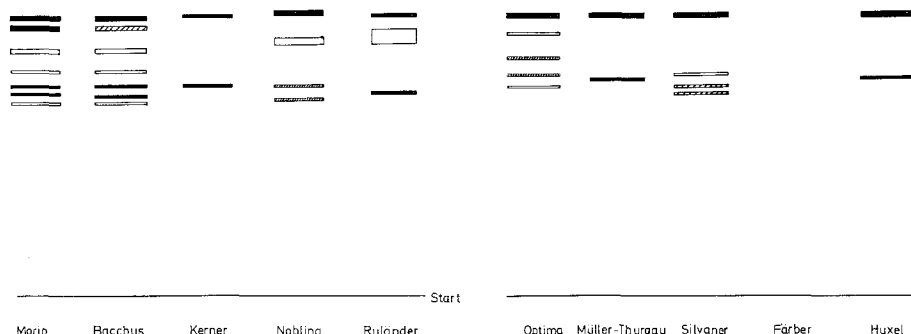


Abb. 14

Abb. 15

Abb. 14. Esterasezymogramm nach dünn-schicht-isoelektrischer Fokussierung in pH 3—10 Trägerampholyten. Nachweis mit β -Naphthylacetat. Auftragsmenge: 40—80 μ l. Anode unten, Kathode oben

Abb. 15. Esterasezymogramm nach dünn-schicht-isoelektrischer Fokussierung in pH 3—10 Trägerampholyten. Nachweis mit β -Naphthylacetat. Auftragsmenge: 40—80 μ l. Anode unten, Kathode oben

Müller-Thurgau, *Huxel* und *Kerner* zu sehen. Interessant ist, daß die Esterasen nur im Bereich von pH 7—9 auftreten, während sich die Phenolasen, wie unten beschrieben, im Bereich von pH 4—6 fokussieren. Trotz der gravierenden Unterschiede bezüglich der Zymogramme darf man keine sortenspezifischen Unterscheidungsmerkmale ableiten, da das Enzymmuster u. a. vom Reifestadium und den physiologischen Bedingungen während der Reifung, sowie vom Jahrgang abhängig sein kann.

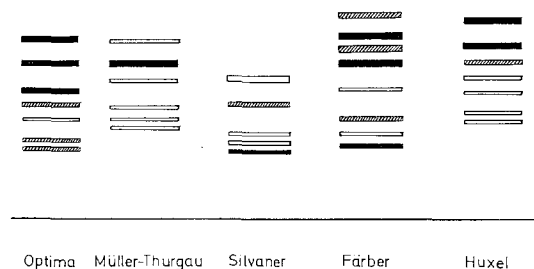


Abb. 16. Phenolasezymogramm nach dünn-schicht-isoelektrischer Fokussierung in pH 3—10 Trägerampholyten. Nachweis mit Substratgemisch verschiedener Phenole. Auftragsmenge: 40—80 μ l. Anode unten, Kathode oben

Phenolasen

Der Nachweis mit einem Substratgemisch verschiedener Phenole zeigt bei den untersuchten Sorten eine Vielzahl an Isoenzymen, die alle im Bereich von pH 4–6 liegen (Abb. 16). Die am stärksten ausgeprägten Enzymmuster weisen *Optima* und *Färber* auf, die beide 6 ausgeprägte Aktivitätszonen zeigen. Die anderen Sorten lassen immerhin noch bis zu 5 Banden erkennen. Um Sortenspezifität abzuleiten, müßten die Enzymmuster über das ganze Reifestadium der Weintrauben untersucht werden, um evtl. Änderungen mit zu erfassen.

Diskussion

Bei der Bestandsaufnahme fruchteigener Proteine und Enzyme ist die Erhaltung des ursprünglichen, nativen Zustandes von größter Bedeutung. Die Proteinextraktion mit Pufferlösung, die von uns bei der Untersuchung von Gerste und Malz [2, 8] angewandt wurde, ist hier aus verschiedenen Gründen nicht brauchbar. Der Hauptgrund hierfür liegt in erster Linie an der geringen Proteinkonzentration im Verhältnis zu den übrigen Inhaltsstoffen [9], die eine Konzentrierung der Proteine erschweren. Bei der Zerstörung des Zellverbandes werden außerdem Substanzen frei, die mit dem Protein in Reaktion treten und so zum Teil das Protein der weiteren Analytik entziehen. So weisen Jones [10] und Loomis [11] darauf hin, daß Gerbstoffe, insbesondere Polyphenole und Tannine, die in fast allen Früchten vorkommen, teils reversible (Polyphenole) und irreversible (Tannine) Verbindungen eingehen und hiermit das ursprüngliche Protein- bzw. Enzymmuster verändern. Um diese unkontrollierbaren Reaktionen zu umgehen, wird vielfach bei der Aufarbeitung von Früchten die Herstellung eines Acetontrockenpulvers [12, 13] bevorzugt. Hier wird durch totalen Wasserentzug jede Enzymaktivität durch endogene Enzyme gestoppt und gleichzeitig der größte Teil der Begleitstoffe, wie phenolische Verbindungen, Farbstoffe, Zucker und organische Säuren [14] entfernt. Das Pulver ist mehrere Wochen im Gefrierschrank lagerbar, ohne daß Veränderungen im Proteinmuster auftreten.

Auf die Aktualität des Problems der Traubenproteine im Verlauf der Weinherstellung weisen verschiedene Veröffentlichungen [15–28] hin, die sich mit den bei der Traubensaftgewinnung in Lösung gehenden Proteinbestandteilen beschäftigen. Diese Proteine sind teilweise maßgeblich an den Proteinrübungen, die nach Werner u. Hartmann [29] besonders in bestimmten Jahrgängen wie 1947 und 1959 zu einem echten Problem geführt haben, da trotz Kurzzeiterhitzung und Bentonitbehandlung diese Erscheinung oft nicht verhindert werden konnte, beteiligt. Diemair u. *Mitarb.* [20] bestimmten die isoelektrischen Punkte der Traubensaftproteine verschiedener Rebsorten mittels der Elektrophorese auf gepuffertem Papier, fanden dabei isoelektrische Punkte zwischen pH 3,3 und 3,7 und vermuteten die Entstehung der Proteinausfällung in dem zufälligen Zusammentreffen des IP mit dem pH-Wert des Weines, da sie bei dieser Technik nur eine Proteinfraktion erhielten. Die von Radola [28] mit der IEF im Dichtegradienten und auf der Dünnschichtplatte gefundene Verteilung der Proteinkomponenten des Traubensaftes über den Bereich von pH 3–6 und die von uns bei der Fokussierung der nativen Traubenproteine erhaltene Verteilung zwischen pH 3–10 widerspricht dieser Theorie, die auf ein unvollkommenes Analysenverfahren zurückzuführen ist. Eine gewisse Übereinstimmung bezüglich des IP scheint zu bestehen, da bei unseren Untersuchungen die weitaus stärkste Fraktion im pH-Bereich zwischen 3,5 und 4,0 gefunden wurde. Die stark sauren Proteinkomponenten wurden schon von Savage [30] bei Biertrübungen als Hauptbeteiligte verantwortlich gemacht, so daß eine Parallele zu den Weintrübungen durchaus nicht von der Hand zu weisen ist. Der bei der Traubensaftgewinnung zwangsläufig anfallende Trub wurde von uns [31] nach der Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln auf seine Proteinbestandteile untersucht und eine Verteilung des Proteinmusters vor allem im Bereich von pH 4–6 gefunden, was im Einklang mit den Ergebnissen der IEF der Traubensaftproteine steht.

Die Differenzierung des löslichen Traubenproteins mittels Papierelektrophorese [15–18] deutete bereits seine Heterogenität an und die Abhängigkeit der erhaltenen Fraktionen von der Rebsorte [17]. Diemair *u. Mitarb.* [23] untersuchten verschiedene Rebsorten aus verschiedenen Jahrgängen mit der Hochspannungselektrophorese in Stärkegel und finden trotz großer Unterschiede im N-Gehalt keine Änderung der einzelnen Fraktionen im Verhältnis zueinander. Diese Sortenspezifität wird durch die Anwendung der Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgelen bei Traubensaft [25–28], Traubenbeeren [7] und Blattproteinen der Rebe [32–34] bestätigt und von uns durch die vorliegende Arbeit erhärtet.

Während bei der Auftrennung des Traubensaftproteins mit der DE 10–15 Komponenten gefunden wurden, konnten wir mit der DIEF des nativen Traubenproteins bis zu 25 Komponenten eindeutig nachweisen, die sich über den gesamten Bereich von pH 3–10 erstreckten. Dieser Befund stimmt mit den zur gleichen Zeit durchgeführten Untersuchungen von Görg [7] überein, die ebenfalls eine Proteinverteilung über den gesamten Bereich von pH 3–10 bei der IEF im PAA-Gel fand und dabei bis zu 50 Komponenten nachwies. Diese hohe Auflösung konnte mit der DIEF nicht erreicht werden. Hier wurden zur Auswertung nur die Hauptbanden herangezogen, da nach Clements [13] die schwachen Banden (Disk-Elektrophorese) nur schlecht reproduzierbar sind. Ein direkter Vergleich der letztgenannten, beiden Methoden ist nur unter gewissen Einschränkungen anzustellen, da die DIEF eine wesentlich höhere Proteinkonzentration verlangt als die IEF in PAA-Gelen und die aus dem Acetontrockenpulver gewonnene Proteinlösung deshalb durch Ultrafiltration eingengt wurde. Eine Rückverdünnung der bei der DIEF verwendeten Proben mit Phosphatpuffer und anschließender IEF in PAA-Gelen gab aus noch näher zu untersuchenden Gründen keine befriedigenden Ergebnisse. Gewisse Übereinstimmung konnte vor allem bei den sauren Komponenten erzielt werden. Auf die Erarbeitung weiterer Übereinstimmungen wurde wegen der sehr unterschiedlichen Bandenzahlen verzichtet.

Äußerst ähnliche Verteilungsmuster bei der DIEF der Traubenproteine zeigen die Neuzüchtungen *Optima* und *Bacchus*, die von den gleichen Kreuzungseltern (*Silvaner* × *Riesling* × *Müller-Thurgau*) abstammen. Auch die Verwandtschaft mit *Silvaner* ist hier deutlich zu erkennen. Ganz verschiedene Fokussierungsmuster sind bei *Ruländer*, *Morio*, *Kerner* und *Färber* zu sehen. Auf die Möglichkeit einer eindeutigen und aussagekräftigen Sortendifferenzierung anhand der Proteinverteilung in der Weintraube durch umfangreiche Untersuchungen über mehrere Jahrgänge hinweg soll an dieser Stelle hingewiesen werden.

Die Enzymnachweise erbrachten eine bisher nie gezeigte Heterogenität an Isoenzymen bei den Esterasen und Phenolasen. Während bei der DE der Esterasen durchschnittlich 2–3 Aktivitätsbanden auftraten, konnten bei der DIEF bis zu 7 Aktivitätszonen gezählt werden. Die Phenolasen trennten sich bei der DE in 1–3 Komponenten, bei der DIEF dagegen in 5–8. Interessant dabei ist die Beobachtung, daß die Enzymaktivität der Esterasen nur zwischen pH 7–9 und die der Phenolasen zwischen pH 4–6 auftritt.

Literatur

1. Radola, B.J.: *Biochim. Biophys. Acta* **194**, 335 (1969)
2. Radola, B.J., Drawert, F.: *Brauwissenschaft* **23**, 449 (1970)
3. Kalckar, H.M.: *J. Biol. Chem.* **167**, 461 (1947)
4. Biserte, G., Scriban, R.: *Proc. Eur. Brew. Conv. Nizza* **1953**, S. 48
5. Radola, B.J.: *J. Chromatog.* **38**, 78 (1968)
6. Wenn, R.V.: *J. Inst. Brewing* **78**, 377 (1972)
7. Drawert, F., Görg, A.: in Vorbereitung
8. Drawert, F., Radola, B.J., Müller, W., Görg, A.: *Proc. Eur. Brew. Conv. Estoril* **1971**, S. 479
9. Hulme, A.C.: *Advan. Food Res.* **8**, 297 (1958)
10. Jones, J.D., Hulme, A.C., Woollorton, L.S.C.: *Phytochemistry* **4**, 659 (1965)
11. Loomis, W.D., Battaile, J.: *Phytochemistry* **5**, 423 (1966)

12. Morton, R.K.: In: S. P. Colowick und N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*, Vol. I, p. 25. New York: Acad. Press 1955
13. Clements, R.L.: *Ann. Biochem.* **13**, 390 (1965)
14. Westphal, N.: *Enzymatische und disk-elektrophoretische Untersuchungen zur Charakterisierung von Enzymen und Proteinen während Wachstum und Reifung von Früchten*. Diss. Univ. Karlsruhe 1969
15. Koch, J., Schwahn, H.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **107**, 20 (1958)
16. Koch, J., Schwahn, H.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **107**, 413 (1958)
17. Koch, J., Freter, H., Sajak, E.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **109**, 395 (1959)
18. Koch, J., Sajak, E.: *Amer. J. Enol. Viticult.* **10**, 114 (1959)
19. Diemair, W., Koch, J., Sajak, E.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **116**, 5 (1961)
20. Diemair, W., Koch, J., Sajak, E.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **116**, 7 (1962)
21. Diemair, W., Koch, J., Sajak, E.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **116**, 209 (1962)
22. Diemair, W., Koch, J., Sajak, E.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **116**, 216 (1962)
23. Diemair, W., Koch, J., Sajak, E.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **116**, 318 (1962)
24. Diemair, W., Koch, J., Sajak, E.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **116**, 327 (1962)
25. Moretti, R.H., Berg, H.W.: *Am. J. Enol. Viticult.* **16**, 69 (1965)
26. Bayly, F.C., Berg, H.W.: *Am. J. Enol. Viticult.* **18**, 18 (1967)
27. Bolcato, V., Pallavicini, C., Lamparelli, E.: *Riv. Viticult. Enol.* **18**, 42 (1965)
28. Radola, B.J., Richter, O.H.K.: *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **2**, 41 (1972)
29. Werner, H., Hartmann, G.: *Weinberg Keller* **13**, 3 (1966)
30. Savage, D.J., Thompson, C.C.: *J. Inst. Brewing* **78**, 472 (1972)
31. Drawert, F., Müller, W.: in Vorbereitung
32. Schäfer, H.: *Wein-Wiss.* **24**, 205 (1969)
33. Schäfer, H.: *Wein-Wiss.* **25**, 277 (1970)
34. Schäfer, H.: *Wein-Wiss.* **26**, 57 (1971)

Professor Dr. F. Drawert
und Dipl.-Ing. W. Müller
Institut für chemisch-technische Analyse
und chemische Lebensmitteltechnologie
der TU München
D-8050 Freising-Weihenstephan
Bundesrepublik Deutschland