

Fluoreszenzmikroskopische Methode zum Nachweis von Malvidin-3,5-Diglukosid in Trauben und Weinen verschiedener Rotweinsorten

MARTINA STARK-URNAU, BERND H.E. HILL, WALTER K. KAST und HANS LAY

Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau
D-74189 Weinsberg, Traubenplatz 5
E-mail: Walter.Kast@lvwo.bwl.de

Zum Nachweis von Malvidin-3,5-Diglukosid in Wein oder Traubensaft wurde ein praxistauglicher Schnelltest entwickelt. Malvidin-3,5-Diglukosid konnte im Wein nach Oxidation mit salpetriger Säure ab einer Konzentration von 50 mg/l innerhalb von 30 Minuten fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Der Schnelltest eignet sich insbesondere für die Überprüfung neu gezüchteter Rotweinsorten auf Malvidin-3,5-Diglukosid, da nur 100 µl Wein oder Saft für eine Analyse benötigt werden.

Schlagwörter: Traubensaft, Wein, Malvidin-3,5-Diglukosid, Schnelltest

Analysis of malvidin-3,5-diglucoside in red grapevine cultivars by means of fluorescence microscopy. A quick test (30 minutes) was developed for the analysis of malvidin-3,5-diglucoside in wine and grape juice. After oxidation with nitrous acid 50 mg/l malvidin-3,5-diglucoside could be detected minimally in wine by fluorescence microscopy. As little as 100 µl of wine or juice were needed for analysis of malvidin-3,5-diglucoside. This test can be used for the analysis of new vine cultivars when only small quantities of liquid are available.

Key words: Grape juice, wine, malvidin-3,5-diglucoside, quick test

Méthode de détection de la malvidine-3,5-diglucoside dans les raisins et les vins de différents cépages rouges au microscope de fluorescence. *Un test rapide et pratique a été développé afin de détecter la malvidine-3,5-diglucoside dans le vin ou dans le jus de raisin. La malvidine-3,5-diglucoside a pu être détectée dans le vin après oxydation à l'acide nitreux à partir d'une concentration de 50 mg/l en l'espace de 30 minutes à l'aide d'un microscope de fluorescence. Ce test rapide convient notamment à la vérification de la présence de la malvidine-3,5-diglucoside dans les nouveaux cépages rouges, étant donné qu'une quantité de 100 µl de vin ou de jus suffit pour une analyse.*

Mots clés: jus de raisin, vin, malvidine-3,5-diglucoside, test rapide

Malvidin-3,5-Diglukosid (O³,O⁵-Di-β-D-glucopyranosyl-malvidin) stellt einen roten Farbstoff dar, der unter anderem aus Schalen von Weintrauben isoliert worden ist (BEILSTEIN, 1975). Chemisch wird Malvidin-3,5-Diglukosid der Gruppe der Anthocyane zugeordnet. Anthocyane sind für die rote Färbung der Rotweine verantwortlich, während in Weißweinen bislang keine Anthocyane nachgewiesen werden konnten.

Die Rebe gehört zur botanischen Familie der Vitaceae, wobei die Art *Vitis vinifera* L. die qualitativ besten Weine hervorbringt. Andere verwandte Arten sind u. a. *Vitis riparia* Michx. und *Vitis labrusca* L. Im Weinbau wird die Bezeichnung Hybride für Rebsorten ver-

wendet, die aus einer Kreuzung zweier verschiedener Vitis-Arten hervorgegangen sind. Malvidin-3,5-Diglukosid wird zum Nachweis verwendet, dass ein Rotwein aus einer Hybridsorte oder einer Nicht-Vinifera-Weinsorte hergestellt worden ist (AMERINE and OUGH, 1980). Ebenso kann der Verschnitt einer europäischen Weinsorte mit Hybridwein über Malvidin-3,5-Diglukosid nachgewiesen werden.

Bislang wurden Anthocyane im Wein meist über Papierchromatographie (LAY und DRAEGER, 1991), HPLC (BURNS et al., 2002) oder fluorimetrische Methoden (GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ et al., 1993; EISENBRAND et al., 1965) nachgewiesen. Diese Methoden sind entweder

sehr zeitaufwändig oder es werden größere Mengen an Material (Wein) benötigt. Ziel dieser Arbeit war es, einen Schnelltest zum Nachweis von Malvidin-3,5-Diglukosid zu entwickeln, bei dem bereits einzelne Beeren oder 100 µl Wein für eine Analyse ausreichen. Dieser Schnelltest soll zur Überprüfung neu gezüchteter Rotweinsorten auf Malvidin-3,5-Diglukosid eingesetzt werden, da diese Farbstoffkomponente mittlerweile kontrovers diskutiert wird (EIBACH, 2004).

Material und Methoden

Die Weinproben oder Beeren stammten von Weinen oder Weintrauben der Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau, Referat Rebenzüchtung und Rebenveredlung, Weinsberg (Tab. 1). Die Beeren- schale wurde abgezogen und in einem Eppendorfhütchen mit einem Pistill gemörsert. Mit der Zerkleinerung

einer Beere erreicht man ein Volumen von etwa 100 µl. Jeweils 100 µl Wein oder Traubensaft wurden in ein Eppendorfhütchen pipettiert. Der Wein wurde mit 15 µl Acetaldehyd zur Abbindung der schwefeligen Säure versetzt und 20 Minuten stehen gelassen. Bei Traubensaft entfiel dieser Schritt. Nach Zugabe von 5 µl n-HCl zum Einstellen des pH-Wertes wurden anschließend 10 µl einer 1 %-igen Natriumnitritlösung zugegeben. Nach zwei Minuten Inkubationszeit wurden 100 µl ammoniakalisches Ethanol (5 % Ammoniak in Ethanol) zugefügt und ein Farbumschlag von rot nach braun beobachtet.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden zur Vermeidung von Verschleppungen jeweils neue Objektträger verwendet. Auf diese wurden mit einem Wattestäbchen mikrokristalline Cellulose (Art.Nr. 2330, Fa. Merck, Darmstadt) beziehungsweise Polyclar AT (PVPP), (Art.Nr. 33162, Fa. Serva, Heidelberg) aufgetragen, an-

Tabelle 1:
Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Malvidin-3,5-Diglukosid in Rotweinsorten

Rebsorte	Genealogie	Neongrüne Fluoreszenz der Flüssigkeit	
		Cellulose	PVPP
Bl. Limberger	-	keine	keine
Bl. Spätburgunder	-	keine	keine
Baco noir Nr. 1	Folle blanche x <i>Vitis riparia</i>	stark	stark
Cabernet Carbon	Cabernet Sauvignon x (Merzling x (Saperavi severnyi x Bl. St.Laurent))	stark	schwach
Cabernet Carol	Cabernet Sauvignon x (Merzling x (Saperavi severnyi x Muskat Ottonel))*	stark	stark
Cabernet Mitos	Bl. Limberger x Cabernet Sauvignon	keine	keine
Dornfelder	Helfensteiner x Heroldrebe	keine	keine
Léon Millot	Goldriesling x (<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i>)	keine	keine
Muscat bleu	(S.V. 18-315 x Müller-Thurgau) x S.V. 20-347	stark	stark
Monarch	(Merzling x (Saperavi severnyi x Muskat Ottonel))* x Dornfelder	stark	stark
Prior	(Joan Seyve 234-16 x Bl. Spätburg.) x (Merzling x (Saperavi severnyi x Bl. St.Laurent))	stark	stark
Rathay	Blauburger x (S.V. 18-402 x Bl. Limberger)**	keine	keine
Roesler	Zweigelt x (S.V. 18-402 x Bl. Limberger)	keine	keine
Regent (Wein)	Diana x Chambourcin	stark	stark
Bl. Trollinger	-	keine	keine
We 70-281-37	Bl. Limberger x Cabernet Sauvignon	keine	keine
We 71-461-14	W. Riesling x <i>V. amurensis</i>	stark	schwach
We 73-45-84	Bl. Limberger x <i>V. amurensis</i>	stark	stark
We 73-40-27	Cabernet Sauvignon x <i>V. amurensis</i>	keine	keine
We 75-11-30	Schwarzelbling x <i>V. amurensis</i>	stark	stark
We 75-51-2	Sauvignonasse x (W. Riesling x <i>V. amurensis</i>)	keine	keine
We 75-115-7	W. Riesling x <i>V. amurensis</i>	keine	keine
We 76-54-41	Sulmer x <i>V. amurensis</i>	schwach	stark
We 85-498-21	Schwarzriesling x (Saperavi severnyi x St. Laurent)	stark	stark
We 88-545-58	Dornfelder x Regent	stark	stark
We 91-4-6	Hegel x Regent	stark	stark
We 92-9-35	Cabernet Dorio x Regent	stark	stark
We 92-9-60	Cabernet Dorio x Regent	mittel	mittel
We 93-12-34	Hegel x Regent	stark	mittel

* Solaris, eine pilztolerante Weißweinsorte

** S.V.: Seyve Villard

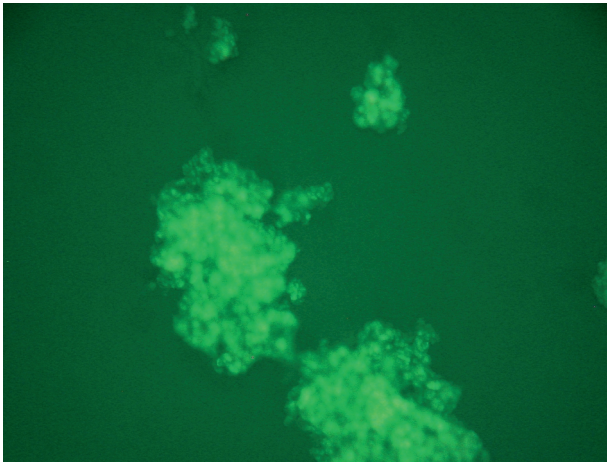


Abb. 1: Neongrüne Fluoreszenz von 'Regent'; die neongrün-fluoreszierenden Kristalle stellen die Trägersubstanz PVPP dar.

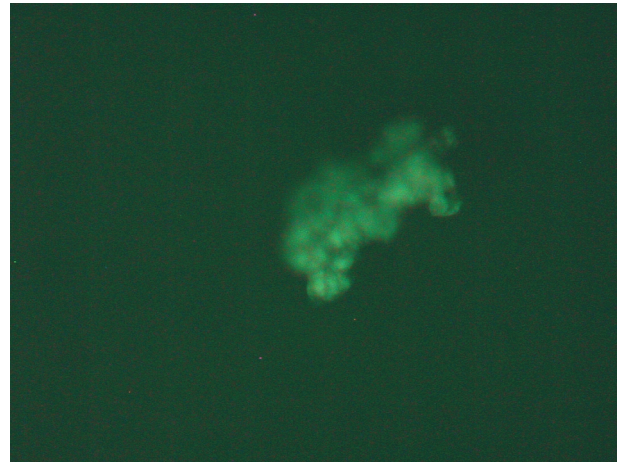


Abb. 2: Schwarze Flüssigkeit von Bl. Trollinger; die schwach neongrün-fluoreszierenden Kristalle stellen die Trägersubstanz PVPP dar.

schließlich 20 µl der Probenlösung auf die jeweilige Trägersubstanz oder direkt auf den Objektträger pipettiert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Axiophot (Zeiss, Jena) unter einem Anregungslicht von 365 nm und einem Kantenfilter von 420 nm.

Ergebnisse und Diskussion

Es gibt verschiedene fluorimetrische Methoden zum Nachweis von Malvidin-3,5-Diglukosid (AMERINE and OUGH, 1980), die alle auf der von DORIER und VERELLE (1966) entwickelten Reaktion beruhen. Bei dieser wird Malvidin-3,5-Diglukosid mit salpetriger Säure oxidiert und anschließend in einer ammoniakalischen Lösung diazotiert. Das entstandene Reaktionsprodukt weist unter UV-Licht bei 365 nm eine spezifische neongrüne Fluoreszenz auf. Durch Modifikation der oben genannten Methode und den Einsatz eines Fluoreszenzmikroskopes konnte zum einen das Probenvolumen von 10 ml auf 100 µl reduziert werden, zum anderen dauerte die Untersuchung auf Malvidin-3,5-Diglukosid nur 15 bis 30 Minuten, je nachdem ob Traubensaft oder Wein getestet wurden. Durch Verwendung geeigneter Trägersubstanzen wie mikrokristalliner Cellulose oder Polyclar AT (PVPP) konnte die Fluoreszenzmikroskopie erleichtert werden, da die neongrüne Fluoreszenz der Flüssigkeit neben fluoreszierenden Kristallen besser ausgewertet werden kann (Abb. 1).

Als positives Referenzmaterial für Malvidin-3,5-Diglukosid wurde eine Weinprobe von 'Regent' verwendet, die ca. 415 mg/l Malvidin-3,5-Diglukosid enthielt, bestimmt mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

Die Sorten 'Blauer Trollinger', 'Blauer Limberger' oder 'Blauer Spätburgunder' enthalten hingegen keine nennenswerten Mengen an Malvidin-3,5-Diglukosid und wurden deshalb als negative Kontrollen unserer Testmethode eingesetzt. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von 'Regent' ergab eine stark neongrüne Fluoreszenz der Flüssigkeit und eine grüne Fluoreszenz der PVPP-Kristalle (Abb. 1). Bei 'Blauem Trollinger' hingegen fluoreszierte die Flüssigkeit nicht, nur die PVPP-Kristalle leuchteten leicht neongrün (Abb. 2). Ähnlich verhielt es sich mit mikrokristalliner Cellulose als Trägersubstanz. Zur Überprüfung der Empfindlichkeit unserer Methode wurde 'Regent' bis auf eine Konzentration von 25 mg/l Malvidin-3,5-Diglukosid mit Wasser verdünnt. Eindeutig nachweisbar war Malvidin-3,5-Diglukosid durch eine neongrüne Fluoreszenz bis zu einer Konzentration von 50 mg/l. Auch bei frischem Traubensaft konnte Malvidin-3,5-Diglukosid bei 'Regent' anhand starker neongrüner Fluoreszenz nachgewiesen werden. Bei 'Dornfelder' blieb dagegen die Flüssigkeit schwarz, nur die PVPP-Partikel fluoreszierten schwach.

Nach Etablierung der Methode wurden verschiedene Rebsorten und Züchtungsweine in mehrfacher Wiederholung auf die Anwesenheit von Malvidin-3,5-Diglukosid untersucht (Tab. 1). Es zeigte sich, dass alle 'Regent'-Kreuzungen eine mittlere bis starke neongrüne Fluoreszenz aufweisen und damit auch Malvidin-3,5-Diglukosid enthalten. 'Blauer Limberger', 'Blauer Spätburgunder', 'Blauer Trollinger', 'Dornfelder', 'We 70-281-37', 'Zweigelt' oder auch 'Cabernet Mitos' wiesen keine neongrüne Fluoreszenz auf und enthielten folg-

lich auch keine nachweisbaren Mengen an Malvidin-3,5-Diglukosid. Ebenso wiesen 'Léon Millot', 'Ráthay' und 'Roesler' keine neongrüne Fluoreszenz auf, obwohl 'Léon Millot' die Kreuzung (*V. riparia* x *V. rupestris* Scheele) als Vatersorte hat und die beiden Letztgenannten in ihren Stammbäumen zusätzlich die nordamerikanischen Arten *V. labrusca* L., *V. aestivalis* Michx., *V. cinerea* und *V. berlandieri* Planch. enthalten. Bei Kreuzungen mit der ostasiatischen Wildrebe *V. amurensis* Rup. wiesen vier Proben der untersuchten Kreuzungen eine neongrüne Fluoreszenz auf, die anderen drei Proben waren negativ und scheinen kein Malvidin-3,5-Diglukosid zu enthalten. Bei den Rotweinsorten 'Monarch' und 'Cabernet Carol', die von 'Solaris', einer pilztoleranten Weißweinsorte, und 'Dornfelder' bzw. 'Cabernet Sauvignon' abstammen, zeigt sich, dass auch Weißweinsorten Träger des Gens für Malvidin-3,5-Diglukosid sein können.

Literatur

- AMERINE, M.A. and OUGH, C.S. (1980): Methods for analysis of musts and wines. - New York: Wiley, 1980
- BEILSTEIN, F.K. (1975): Beilsteins Handbuch der organischen Chemie. 4. Auflage. E III/IV, 17: 3916-3917 - Berlin: Springer, 1975
- BURNS, J., MULLEN, W., LANDRAULT, N., TEISSEDE, P.-L., LEAN, M.E.J. and CROZIER, A. 2002: Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet-Sauvignon and hybrid grapes. J. Agric. Food Chem. 50: 4096-4102
- DORIER, P. et VERELLE, P. 1966: Nouvelle méthode de recherche des glucosides anthocyaniques dans les vins. Ann. Falsif. Expert. Chim. 59 (669): 1-10
- EIBACH, R. 2004: Frage und Antwort. Dt. Weinbau (9): 132.
- EISENBRAND, J., HEIT, O. und BECKER, G. 1965: Über den direkten Nachweis von Malvin in Lösungen mit Hilfe seiner Fluoreszenz und die Anwendung auf Rotweinverdünungen. Dt. Lebensmittel-Rundschau 61(1): 8-11
- GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, Y., RIVAS-GONZALO, J.C. and SANTOS-BUELGA, C. 1993: Proposal of a method for fluorimetric analysis of malvin in red wines. Vitis 32: 119-124
- LAY, H. und DRAEGER, U. 1991: Farbstoffprofile verschiedener Rotweinsorten. Wein-Wiss. 46: 48-57

Manuskript eingelangt am 15. September 2004