

Ein Beitrag zum Nachweis unterschiedlicher Malatpools in Beeren der Rebe

von

H. STEFFAN und A. RAPP

Investigations on the existence of different malate pools in grape berries

S u m m a r y . — In order to demonstrate the existence of differently available malate pools, ripening grape berries were fed with ^{14}C -malic acid in two different experimental series (pedicel application and injection). The results show that malic acid injected into ripening grapes (Phase IV) is — nearly independent of the stage of ripeness — metabolized less rapid (40—47 % respiration- $\text{CO}_2/20$ h) than is malic acid applied through the pedicel (78—95 % respiration- $\text{CO}_2/20$ h). In green berries (Phase I—III) respiration, i. e. metabolization, of injected malate can scarcely be established. The rate of sugar formation from malate (gluconeogenesis) is less intensive in the pedicel application experiment than in the injection experiment which is to be simulating the malate incorporated.

The results are interpreted as follows: 1) There is an active malate pool, where malic acid imported through the pedicel is steadily respired, independently of the stage of ripeness. 2) An inactive malate pool exists in the interior of the berries. Malic acid already incorporated in the interior of the berries is almost not metabolized in green berries. Owing to an increase in permeability, it is transported to the berry periphery and dissimilated only with berry ripening. Possible factors of the change in permeability are discussed.

Einleitung

Der Reifungsprozeß bei Weinbeeren ist dadurch gekennzeichnet, daß mit Beginn des Weichwerdens die titrierbare Säure ihr Maximum erreicht hat und von da an, korrespondierend mit der Einlagerung von Zucker, der Säureabbau beginnt. Die Säureverminderung ist hauptsächlich auf den Abbau der Äpfelsäure zurückzuführen. In vorangegangenen Arbeiten (12, 18) konnte gezeigt werden, daß Äpfelsäure reifeabhängig zum größeren Teil zu CO_2 veratmet und gleichzeitig auf dem Weg der Gluconeogenese in geringerem Maße zu Zucker metabolisiert wird (11, 14, 17, 18). Die hohe Veratmungsrate von 60—95 % der durch den Beerenstiel applizierten ^{14}C -Äpfelsäure ist nicht korrelierbar mit der tatsächlichen analytisch gemessenen Säureabnahme bei Freilandreben. Bei einer Reihe von Neuzüchtungen des Geilweilerhofes haben wir die Intensität des Säureabbaus, repräsentiert durch die Abnahme der Äpfelsäure, während der Reifungsphase untersucht. Die einzelnen Sorten lassen deutliche Unterschiede während dieser Phase erkennen. Dabei wird die Säure anfangs schneller als in der späteren Reifephase dissimiliert. Während beim Riesling in der Zeit vom 7. 9. — 21. 9. 1975 noch 0,5 ‰ Säure/d abgebaut wurden (anfangs 0,7 ‰/d), war bei der Sorte C-97-45 der Säureabbau mit nur 0,05 ‰ (anfangs 0,9 ‰/d) praktisch zum Erliegen gekommen, obwohl zum Ende der Vegetationszeit noch 12,5 ‰ Säure vorhanden waren.

Nach Ansicht verschiedener Autoren (8, 9, 13) wird der Abbau der Äpfelsäure nicht durch erhöhte Temperatur und gesteigerte Enzymaktivitäten forciert; es wird vielmehr vermutet, daß Malat infolge zunehmender Permeabilität an die Orte mit lebhafter Stoffwechselaktivität gelangt. Diese Hypothesen führen zusammen mit den oben aufgeführten analytischen Fakten zu der Annahme, daß es unterschiedlich verfügbare Malatpools gibt.

Als Beitrag zu diesem Problem haben wir Äpfelsäure-[U- ^{14}C] sowohl durch den Beerenstiel als auch direkt ins Beereninnere appliziert, um damit Unterschiede in der Metabolisierbarkeit von eintransportiertem und von bereits abgelagertem Malat zu untersuchen.

Material und Methoden

An 4 verschiedenen Terminen während der Phase IV der Beerenentwicklung (Säureabbau, Zuckereinlagerung) wurden Trauben mit etwa 10 Beeren von einem Rebstock mit der Rasierklinge unter Wasser abgeschnitten und im Labor in einen Glastopf eingesetzt. Jeweils eine Traube tauchte mit der Schnittstelle des Stiels in eine Lösung von 20 μCi ^{14}C -Äpfelsäure, und bei der Traube im Parallelversuch wurden 2 μl Lösung entsprechend 2 μCi markierte Äpfelsäure mit einer Hamilton-Spritze in jede einzelne Beere injiziert. Die Einstichstelle wurde zur Vermeidung des Ausblutens mit einem Degaplast-Film klebend verschlossen. Die Traube des Injektionsversuches stand mit der Schnittstelle ihres Stiels in einer inaktiven Äpfelsäurelösung der gleichen Konzentration wie die markierte Lösung. An den Beeren des Stielapplikationsversuchs wurden ebenfalls, analog dem Injektionsversuch, Einstichkanäle angebracht. Während der Versuchszeit von 15 h verblieben die Trauben in einem verdunkelten Wittschen Topf, der mit einer Aquariumpumpe und einer Waschflasche mit 10 % NaOH zur Absorption des Atmungs- CO_2 im Kreislauf geschaltet war.

Nach Versuchsende wurden die Beeren zur Entfernung etwa anhaftender Äpfelsäure kurz abgespült und in flüssige Luft getaucht; die gefrorenen Beeren wurden anschließend mit 10 ml Äthanol 1 min homogenisiert. Nach der Zentrifugation wurden Bodensatz (Beerenrückstand) und Überstand (Beerenextrakt) gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 5 ml H_2O gelöst und eine Gruppentrennung mit Ionenaustauscher im Batchverfahren durchgeführt. Nach Behandlung mit Dowex-50 (H^+ -Form), das die Aminosäuren bindet, wurden mit Dowex-1 (Carbonatform) die organischen Säuren gebunden. Das Filtrat enthielt die Neutralstoffe. Die Aminosäuren wurden mit 2 n Ammoniaklösung, die organischen Säuren mit 2 n Ammoniumcarbonatlösung eluiert. Anschließend wurden die Eluate gefriergetrocknet und definiert gelöst. Die Bestimmung der Radioaktivität der Lösungen erfolgte durch Szintillationsmessung, die der Festproben nach Verbrennung im Oximat. Der Absorptionscocktail bestand aus 320 ml Phenyläthylamin, 400 ml Toluol, 220 ml Methanol, 50 ml Wasser, 5 g Butyl-PBD.

Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchungen wurden mit uniform markierter Äpfelsäure durchgeführt, um den Umsatz des gesamten Malatmoleküls zu studieren, nämlich die Decarboxy-

Tabelle 1

Prozentuale Verteilung der Radioaktivität nach Stielapplikation (A) und Injektion (I) von ^{14}C -Äpfelsäure

Distribution of radioactivity (per cent) after application of ^{14}C -malic acid through the pedicel (A) and by injection

	Grüne Beeren	d nach Blüte				
		40	70	80	90	100
A	Beerenextrakt	63	22	17	12	5
	Atmungs- CO_2	37	78	83	88	95
I	Beerenextrakt	97	60	57	55	54
	Atmungs- CO_2	3	40	43	45	46

lierung im Atmungsstoffwechsel und die Einbeziehung in Synthesewege, wobei hauptsächlich die Gluconeogenese — die Bildung von Zucker aus dem Äpfelsäuremolekül — von Interesse ist. Tabelle 1 zeigt die Verteilung der Radioaktivität im Atmungs- CO_2 und im Beerenextrakt aus den beiden Versuchsreihen. Die in zwei aufeinanderfolgenden Jahren durchgeführten Experimente zeigten eine gute Übereinstimmung, so daß nur jeweils eine Tabelle als repräsentativ für beide Versuchsjahre dargestellt wird.

Die Veratmung von stielapplizierter Äpfelsäure weist die bereits gezeigte Tendenz aus, daß zu Beginn des Säureabbaus weniger (78 %) und gegen Ende mehr (95 %) Äpfelsäure dissimiliert wird (12, 18). Dagegen zeigt die injizierte Äpfelsäure, die das bereits abgelagerte -Malat simulieren soll, nicht diesen reifeabhängigen Gang, sondern eine nahezu gleichbleibende Veratmungsrate (40—46 %).

Aus Tabelle 2 ist die Verteilung der Radioaktivität innerhalb des Beerenextraktes ersichtlich. Die Bildungsrate der Neutralstoffe (vornehmlich Zucker) aus injizierter Äpfelsäure ist höher als bei Applikation über den Stiel. Wir deuten diesen Befund nicht als erhöhte Gluconeogenese. Für das aus injizierter uniform markierter Äpfelsäure entbundene $^{14}\text{CO}_2$ ist die Wahrscheinlichkeit einer Refixierung größer, obwohl die Carboxylaseaktivität nachläßt (8, 13), weil das Atmungs- CO_2 aus

Tabelle 2

Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Beerenextrakt nach Stielapplikation (A) und Injektion (I) von ^{14}C -Äpfelsäure

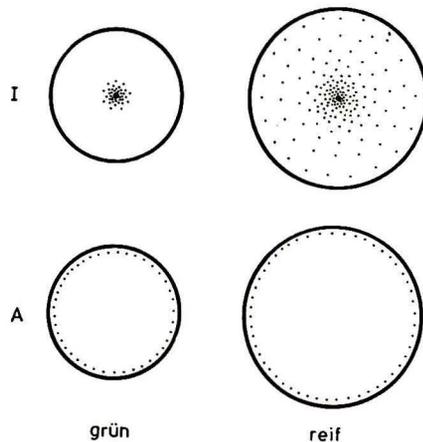
Distribution of radioactivity (per cent) in the grape extract after application of ^{14}C -malic acid through the pedicel (A) and by injection (I)

		d nach Blüte			
		70	80	90	100
A	Organische Säuren	80	79	76	69
	Aminosäuren	13	12	14	17
	Neutralstoffe	7	9	10	14
I	Organische Säuren	78	74	72	66
	Aminosäuren	12	14	15	16
	Neutralstoffe	10	12	13	18

der im Beereninneren abgelagerten Äpfelsäure eine längere Verweilzeit hat, bis es an der Beerenoberfläche entweichen kann. Zum Nachweis der reinen Gluconeogenese sind die Versuche mit Äpfelsäure-[3-¹⁴C] und Äpfelsäure-[2,3-¹⁴C] (14, 17) repräsentativ. Bei der Verwendung von uniform markiertem Malat werden alle Stoffwechselprodukte erfaßt, die bei der Dissimilation des gesamten Moleküls entstehen. Für die Neubildung von Zucker aus Äpfelsäure kann man nach den vorliegenden Ergebnissen (14, 18) einen Anteil von etwa 5 % veranschlagen, während der Hauptteil des in dieser Zeit eingelagerten Zuckers assimilatorischen Ursprungs ist. Die gleichzeitige Neubildung von Malat in der Beere ist ebenfalls als gering anzusehen. Auf Grund der verschiedenen Applikation zeigt sich eine unterschiedliche Metabolisierbarkeit der Äpfelsäure (Tabellen 1 und 2), wonach sich zwei verschiedene Pools andeuten, in denen Malat umgesetzt wird. In grünen Beeren wird Äpfelsäure nur abgebaut, wenn es auf dem normalen Wege eintransportiert wird (Aufnahmeversuch A), wohingegen bereits eingelagerte Äpfelsäure nicht zu CO₂ veratmet wird (Injektionsversuch I). Bei reifenden Beeren wird dieser anfänglich „inerte Malatpool“ dagegen mobilisiert, was sich an dem auftretenden markierten CO₂ zeigt.

Für die Frage, ob Permeabilitätsgründe dafür verantwortlich sind, daß abgelagertes Malat im Reifungsstadium zusehends aktiviert wird, wäre die Verteilung von injizierter gegenüber stielapplizierter Äpfelsäure innerhalb der Beere interessant. Zu diesem Zweck haben wir Gefrierschnitte von markierten Beeren hergestellt. Leider ergaben die Autoradiographien der sowohl äquatorial als auch meridional geschnittenen Beeren keine instruktiven Bilder. Nach unserer Erfahrung kann durch den Schnitt selbst bei gefrorenen Beeren eine Aktivitätsverwischung eintreten. Deshalb wurden an dicken äquatorialen Beeren Scheiben vom Mittelpunkt bis zur Peripherie mit Glaskapillaren senkrecht „Probebohrungen“ vorgenommen und die Kapillaren mit den Bohrpfropfen im Oximat verbrannt. Die Radioaktivitätsmessungen zeigen die Tendenz, daß bei den reifen Beeren des Injektionsversuches ein Aktivitätsgradient vom Einstichkanal bis zur Beerenperipherie besteht, während beim Aufnahmeversuch eine massive Aktivitätskonzentration in der Nähe der Beerenhaut auftritt, aber kein merkbar starker Gradient zum Beereninneren hin festzustellen ist. Die in grüne Beeren injizierte Äpfelsäure verteilt sich im Beerenfleisch kaum, und die Aktivität findet sich hauptsächlich in der Nähe des Einstichkanals (Abb.).

Nach GENEVOIS (4) und auch neueren Untersuchungen von STAUDT (16) findet vom Weichwerden der Beeren an kein Zellwachstum mehr, sondern fast nur noch Zell-



Schematische Darstellung der Radioaktivitätsverteilung in äquatorial geschnittenen Beeren. I = Injektion, A = Stielapplikation.

Distribution of radioactivity in equatorially cut berries (schematically). I = injection, A = pedicel application.

streckung statt. Die damit beginnende Permeabilitätssteigerung wurde beim Reifen von Früchten schon allgemein festgestellt (15). Hier kann die vorher in den Vakuolen abgelagerte Äpfelsäure besser an die Zellorte gelangen, in denen Malat metabolisiert wird.

Daß auch das Phytohormon Abscisinsäure die Membraneigenschaften der Zellen zu beeinflussen vermag, konnte an Karottengewebe (5) und an Sproßgeweben von *Rubus hispidus* (10) nachgewiesen werden. Da der Abscisinsäuregehalt in Weinbeeren mit fortschreitender Reife, d. h. mit zunehmendem Zuckergehalt, ansteigt (1,2), wird auch hier ein Zusammenhang gesehen zwischen dem ABS-Gehalt und den Reifungsvorgängen, die mit einer Erhöhung der Permeabilität von Zellmembranen einhergehen (2, 3).

Zusätzlich wird ein Zusammenhang zwischen der Kaliumkonzentration und der Permeabilität von Zellmembranen diskutiert (7, 19). HALE (7) konnte nämlich nur während der Reifezeit der Beeren (Phase IV) eine Beziehung zwischen Kalium- und Malatgehalt finden, nicht aber während der Zeit der Säureakkumulation (Phasen I—III). GROSS (6) fand bei Meerrettich ausschließlich kovalent an die Zellwand gebundene Malatdehydrogenase, wodurch die These gestützt wird, daß die Malatdehydrogenase-Reaktion beim Transport der Reduktionsäquivalente durch die Zellwand eine essentielle Rolle spielt. Es ist geplant, die Malatdehydrogenase bei Weinbeeren zu lokalisieren.

Zusammenfassung

Zur Frage, ob es unterschiedlich verfügbare Malatpools gibt, wurden reife Weinbeeren in zwei voneinander verschiedenen Versuchsreihen (Stielapplikation und Injektion) mit ^{14}C -Äpfelsäure gefüttert. Danach wird bei reifenden Beeren (Phase IV) die ins Beereninnere applizierte Äpfelsäure — nahezu unabhängig vom Reifegrad — weniger stark metabolisiert (40—47 % Veratmung- $\text{CO}_2/20$ h) als die durch den Beerenstiel zugeführte Äpfelsäure (78—95 % Veratmung/20 h). Bei grünen Beeren (Phasen I—III) ist eine Veratmung und damit Metabolisierung von injiziertem Malat kaum feststellbar. Die Bildungsrate von Zucker aus Äpfelsäure (Gluconeogenese) ist beim Injektionsversuch, der eingelagertes Malat simulieren soll, etwas höher als beim Aufnahmeversuch.

Die Versuchsergebnisse werden dahingehend gedeutet, daß es 1. einen aktiven Malatpool gibt, in dem die über den Beerenstiel eintransportierte Äpfelsäure unabhängig vom Reifestadium ständig veratmet wird, und daß 2. ein inaktiver Malatpool im Beereninneren existiert. Die im Beereninneren bereits abgelagerte Äpfelsäure ist bei grünen Beeren nahezu unmetabolisierbar; sie wird erst nach Weichwerden der Beeren infolge der Permeabilitätssteigerung besser an die Beerenperipherie transportiert und abgebaut. Die möglichen Faktoren für die veränderte Permeabilität werden angesprochen.

Literatur

1. COOMBE, B. G. and HALE, C. R., 1973: The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiol.* 51, 629—634.
2. DÜRING, H., 1974: Abscisinsäure in reifenden Weinbeeren. *Vitis* 13, 112—119.
3. — — , ALLEWELDT, G. und KOCH, R., 1978: Studies on hormonal control of ripening in berries of grape vines. *Acta Horticult.* 80, 397—405.
4. GENEVOIS, L., 1938: Formation et évolution physiologique des acides organiques dans les raisins. *Rev. Vitic.* 88, 103—121, 382—447.

5. GLINKA, Z. and REINHOLD, L., 1972: Induced changes in permeability of plant cell membranes to water. *Plant Physiol.* 49, 602—606.
6. GROSS, G. G., 1977: Cell wall bound malate-dehydrogenase from horseradish. *Phytochemistry* 16, 319—321.
7. HALE, C. R., 1977: Relation between potassium and the malate and tartrate contents of grape berries. *Vitis* 16, 9—19.
8. HAWKER, J. S., 1969: Changes in the activities of malic enzyme, malate dehydrogenase, phosphopyruvate carboxylase and pyruvate decarboxylase during development of a non-climacteric fruit (the grape). *Phytochemistry* 8, 19—23.
9. LAKSO, N. and KLIEWER, W. M., 1975: The influence of temperature on malic acid metabolism in grape berries. *Plant Physiol.* 56, 370—372.
10. PILET, R. E. and ROLAND, J. C., 1971: Effects of abscisic acid on the growth of the ultrastructure of tissues cultivated *in vitro*. *Cytobiologie* 4, 41—61.
11. RIBÉREAU-GAYON, P. et RIBÉREAU-GAYON, G., 1969: Etudes biochimiques sur la composition du raisin et ses variations. *Rev. Franç. Oenol.* 35, 5—16.
12. RAPP, A., STEFFAN, H., KUPFER, G. und ULLEMEYER, H., 1971: Über den Säurestoffwechsel in Weinbeeren. *Angew. Chem.* 83, 925—928.
13. RUFFNER, H. P., HAWKER, J. S. and HALE, C. R., 1976: Temperature and enzyme control of malate metabolism in berries of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* 15, 1877—1880.
14. — — —, KOBLET, W. und RAST, D., 1975: Gluconeogenese in reifenden Beeren von *Vitis vinifera*. *Vitis* 13, 319—328.
15. SACHER, J. A., 1973: Senescence and postharvest physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24, 197—224.
16. STAUDT, G., 1978: Blütenbiologische Untersuchungen an Reben. Vortrag; Tagung des Forschungsrings des Deutschen Weinbaues bei der DLG, Neustadt/Weinstr., 19. — 21. 4. 1978.
17. STEFFAN, H., 1968: Untersuchungen über Veränderungen von Inhaltsstoffen in reifenden Beeren der Rebe mit ¹⁴C-Verbindungen. Diss. Univ. Karlsruhe.
18. — — —, RAPP, A., ULLEMEYER, H. und KUPFER, G., 1975: Über den reifeabhängigen Säure-Zucker-Stoffwechsel bei Beeren von *Vitis-vinifera*-Sorten, untersucht mit ¹⁴C-Verbindungen. *Vitis* 14, 181—189.
19. VICKERY, R. S. and BRUINSMAN, J., 1973: Compartments and permeability for potassium in developing fruits of tomato. *J. Exp. Bot.* 24, 1261—1270.

Eingegangen am 26. 1. 1979

Dr. H. STEFFAN
BFA für Rebenzüchtung Geilweilerhof
D 6741 Siebeldingen