

Immobilisierung von Glycosidasen an magnetische Partikel mit dem Ziel einer Weinaromaverbesserung

Dem Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik
der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

von

Herrn

M. Sc. Marvin J. Ferner

aus Trier

Datum der mündlichen Prüfung	15.03.2016
Dekan	Prof. Dr.-Ing. J. Seewig
Prüfungsvorsitzender	Prof. Dr.-Ing. E. Kerscher
Berichterstatter	Prof. Dr. R. Ulber
	Prof. Dr. H. Raddatz
	Prof. Dr. W. Thiel

Kaiserslautern, 2016

D 386

Kurzzusammenfassung

In der Winzertechnik werden Enzympräparate für diverse Anwendungen eingesetzt. Dabei gibt es zahlreiche kommerzielle Enzyme zur Verbesserung bzw. Freisetzung von Aromen. Solche Enzympräparate werden nach einiger Zeit durch eine Bentonitschönung inaktiviert bzw. ausgefällt und gehen damit verloren. Der Einsatz von neuem Enzympräparat bei jedem weiteren Gärungsansatz stellt dabei einen Kostenfaktor für den Winzer dar und es bleibt eine gewisse Rest-Enzymaktivität im Wein erhalten. Letzteres führt dazu, dass solche Weine sensorisch nach einem halben bis einem Jahr abbauen. Um sensorische Beeinträchtigungen und Qualitätsminderungen vorzubeugen ist eine vollständige Entfernung der Enzyme wichtig. Eine Immobilisierung dieser Enzyme an Magnetit-Partikel stellt eine Möglichkeit dar, dieses Problem zu lösen. Besonders die vollständige Entfernung durch eine Magnet-Separation und die anschließende Wiederverwendbarkeit der Enzyme sind dabei wichtige Vorteile für den Winzer.

Bei Enzympräparaten zur Weinaromaverbesserung handelt es sich um pektolytische Enzymmischungen mit einer β -Glucosidase-Nebenaktivität. Gerade in Weißwein kommen viele Aromen glykosidisch gebunden vor und sind dadurch sensorisch nicht wirksam. Diese glykosidischen Verbindungen können durch eine β -Glucosidase-Aktivität gespalten und das entsprechende Aroma-Aglykon freigesetzt werden. Allerdings liegt bei der Freisetzung der Aromastoffe ein sequentieller Mechanismus vor, d.h. es werden ebenfalls andere Glycosidasen, wie Arabinosidase, Rhamnosidase oder Xylosidase, benötigt, um Aroma freizusetzen. Daher muss es sich bei den für die Aromafreisetzung eingesetzten Enzymen immer um eine Mischung aus Glycosidasen handeln. Die Immobilisierung verschiedener Enzyme auf einen Träger ist dahingehend eine Herausforderung, indem jedes Enzym andere Voraussetzungen hat, um erfolgreich an einen Träger zu koppeln. Aus diesem Grund ist die simultane Immobilisierung mehrere Enzyme immer nur ein Kompromiss.

Ziel dieser Arbeit war es, die Enzyme erfolgreich an Magnetit-Partikel zu koppeln und mittels analytischer und sensorischer Untersuchungen die Wirksamkeit und die Eigenschaften der Enzyme hinsichtlich eines Einsatzes in der Winzertechnik zu bewerten. Zur Immobilisierung wurden superparamagnetische Magnetit-Partikel, die in einer Matrix aus Polyvinylalkohol eingeschlossen waren, verwendet und die Konjugation der Enzyme wurde mit Carbodiimid durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist mehrere Glycosidasen verschiedener Spezifität aus einem kommerziellen, önologischen Enzympräparat erfolgreich an Magnetit-Partikel zu koppeln und dadurch die Aroma-Ausprägung von Wein positiv zu beeinflussen. Bei den untersuchten Bedingungen stellten sich pH 3,8 bis 4,0 als beste Voraussetzung heraus, um möglichst viele Glycosidasen aktiv an den Träger zu konjugieren. Generell hatte die β -Glucosidase eine relativ hohe Kopplungsaffinität zum Träger, sodass im immobilisierten Enzymgemisch andere Mengenverhältnisse der einzelnen Glycosidasen vorlagen als im Ausgangsprodukt. Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Änderung im Aktivitätsprofil zeigten keine signifikanten Unterschiede. Durch die Kopplungsreaktion kam es zu keiner negativen Beeinträchtigung. Für alle Enzympräparate wurde allerdings eine deutliche Inhibition der β -Glucosidase-Aktivität durch Glucose festgestellt. Die Enzyme sollten daher erst am Ende bzw. nach der Gärung eingesetzt werden, da dort die Glucose-Konzentration am niedrigsten ist. Stabilitätsuntersuchungen der gekoppelten Glycosidasen im Wein zeigten lediglich leichte Aktivitätsverluste. Somit war die Kopplung stabil und stellte kein Hindernis für einen Einsatz im Wein dar. Die Rückgewinnung der Magnetit-Partikel aus Wein wurde mit Hilfe eines Hochgradient-Magnet-Separators durchgeführt. Die Separation hatte ebenfalls keinen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität der gekoppelten Enzyme.

Da die Enzyme an Magnetit-Partikel gekoppelt wurden, ist eine mögliche Eisenmigration aus den Partikeln in den Wein ebenfalls ein wichtiges Kriterium und wurde entsprechend untersucht. Dabei konnten durch den Einsatz der Magnetit-Partikel im Wein teilweise ein stark erhöhter Eisengehalt festgestellt werden. Eine erhöhte Eisen-Konzentration im Wein kann zu drastischen Qualitätseinbußen und zu vermehrter Oxidation führen. In Folge dessen stellt die Eisenmigration aus den Partikeln noch ein erhebliches Problem bei einem späteren Einsatz in der Winzertechnik dar. Untersuchungen zum Phenolgehalt der mit Magnetit-Partikel behandelten Weinproben ließen auf einen solchen oxidativen Abbau durch die erhöhten Eisen-Konzentrationen schließen. Weitere Untersuchungen einiger Einzelphenole bestätigten diese Annahme. Neben verminderten Phenolgehalten konnten dagegen einige Phenole, wie Kaffeesäure, p-Coumarsäure und Resveratrol, durch den Enzymeinsatz signifikant gesteigert werden.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die gekoppelten Enzyme fähig waren, Aromastoffe im Wein freizusetzen. Der Terpenegehalt konnte signifikant durch

Enzymeinsatz, sowohl frei als auch immobilisiert, gesteigert werden. Dies betraf besonders die Monoterpene Nerol und Geraniol. Ein Vergleich zwischen gekoppelten und freien Glycosidasen zeigte, dass durch das nicht-immobilisierte Enzymgemisch etwas mehr der untersuchten Verbindungen freigesetzt wurde. Dieser Effekt kann mit der durch die Kopplung veränderten Enzym-Zusammensetzung erklärt werden, da ein größerer Anteil an β -Glucosidase an die Magnetit-Partikel koppelte, aufgrund des sequentiellen Mechanismus, aber auch andere Glycosidasen von Bedeutung sind, um das entsprechende Aglykon freizusetzen.

An Magnetit-Partikel gekoppelte Glycosidasen können gut in bestehende Batch-Prozesse der Weinherstellung integriert werden. Außerdem sind, abgesehen vom Magnet-Separator, nur geringe Investitionen in neue Anlagen nötig. Weitere Vorteile sind eine gute Abtrennung und Wiederverwendbarkeit der gekoppelten Enzyme, enzymfreies Produkt, nahezu identische Anwendung im Vergleich zu bestehenden Enzympräparaten und es ist kaum neue Prozess-Expertise für die Winzer notwendig. Die Prozessbetrachtung zeigte allerdings auch die Komplexität der Hydrolyse glykosidisch gebundener Stoffe im Wein, da eine Vielzahl von Faktoren die Hydrolyse der Glykoside im Wein beeinflusst. Somit ist eine Vorhersage bzw. Abschätzung der Freisetzung an Aromastoffen im Wein durch einen Enzymeinsatz äußerst kompliziert und es ist zurzeit noch nicht möglich die erworbenen Kenntnisse zur Hydrolyse der Glykoside den Weingütern effizient zur Verfügung zu stellen.

Die Glycosidasen β -Glucosidase, Arabinosidase, Rhamnosidase und Xylosidase konnten erfolgreich auf die verwendeten Magnetit-Partikel immobilisiert, deren mögliche Wiederverwendbarkeit gezeigt und durch den Einsatz dieser Enzyme der Gehalt an Terpenen und einiger Phenole signifikant gesteigert werden. Diese Erkenntnisse zeigen, dass ein Einsatz der an Magnetit-Partikel gekoppelten Glycosidasen in der Winzertechnik möglich ist. Allerdings können die erhöhten Eisengehalte durch die Verwendung der Magnetit-Partikel zu Qualitätseinbußen führen. Daher sind die verwendeten Partikeln noch nicht für einen Einsatz in der Winzertechnik geeignet. Diese bedürfen weiterer Entwicklung, da für einen erfolgreichen Einsatz möglichst inerte Partikel vorliegen sollten, um die beschriebenen negativen Effekte zu minimieren.

Abstract

To date, winemakers use enzyme preparations for various applications including numerous commercial enzymes to improve or release flavour. The latter enzyme preparations are inactivated and precipitated by bentonite fining. The enzymes are then separated with a clarifying agent (e.g., bentonite). Apart from the loss of the active enzymes, this step incurs costs for winemakers because new enzyme preparations must be used for each new fermentation batch. Furthermore, residual enzyme activity is retained in the wine, which causes the flavour balance of treated wines to deteriorate after six months to one year. Therefore, a complete removal of the enzymes is crucial. Enzyme immobilisation on magnetic particles could potentially be used to address these problems. Particularly the complete removal by magnetic separation and subsequent reuse of enzymes provides important benefits for winemakers.

Commercial enzyme preparations for aroma improvement are pectinolytic enzyme preparations with β -glucosidase side activities. Especially in white wine, many flavours are glycosidically bound and thus do not directly affect the flavour of wines. These glycosidic bound compounds can be separated through β -glucosidase activity and release the relevant flavour aglycone. However, the release of aglyca is in most cases a sequential mechanism, which means that other glycosidases, such as arabinosidase, rhamnosidase or xylosidase, are required to release the aroma. Releasing aroma in wine therefore always necessitates a mixture of glycosidases. The immobilisation of different enzymes on a carrier represents a particular challenge, as each enzyme has different requirements in order to successfully connect to the carrier. The simultaneous immobilisation of different enzymes thus represents always a compromise.

The aim of this work was to develop an immobilised magnetic biocatalyst with multiple glycosidically activities from commercial *Aspergillus niger* glycosidases and to evaluate the effectiveness and properties of the immobilised enzymes in terms of their utility in winery technology. Superparamagnetic microparticles consisting of a polyvinyl alcohol matrix that was subsequently carboxylated for protein binding were used as the magnetic carrier for immobilisation, which was performed using carbodiimide.

The results showed that it is possible to successfully immobilise several glycosidases with different specificities from a commercial, oenological enzyme preparation onto magnetic particles and thereby influence the flavour characteristics of wine. In the studied environment, pH 3.8 to 4.0 provided preconditions to actively attach as many glycosidases as possible to the carrier. The β -glucosidase exhibited an overall

considerable connective affinity to the carrier, so that the immobilised enzyme preparation contained higher proportions of β -glucosidases than the original preparation. The results showed no significant differences with regard to a possible change in the activity profile as result of the immobilisation. The coupling reaction therefore revealed no adverse effects. However, there was for all enzyme preparations a significant inhibition of β -glucosidase activity by glucose. The enzymes should therefore be used only at the end or after the fermentation. Stability analysis of the immobilised glycosidases in the wine showed merely a slight loss of activity. The coupling was thus stable and represented no obstacle to its use in wine. The recovery of the magnetic particles from the wine was carried out using a high gradient magnetic field separator and the separation had no negative effect on the enzyme activity of the coupled enzymes.

Due to the immobilisation of the enzymes onto magnetic particles, a possible iron migration from the particles to the wine represented another important criterion and was appropriately scrutinised. A strong increase in the iron content could in some cases be detected due to the use of magnetic particles in wine. Increased iron levels can lead to drastic quality losses and increased oxidation in wine. The iron migration from the particles is therefore still a significant problem for its subsequent use in the winemaking industry. Studies of the phenol content of the wine samples treated with magnetic particles suggested such oxidative degradation by the increased levels of iron. Further investigation of the phenol content confirmed this assumption. Despite reduced phenol levels, however, some individual phenols (caffeic acid, coumaric and resveratrol) could be significantly increased by the use of such enzymes.

Further investigations showed that the coupled enzymes were capable of releasing aroma compounds from the wine. Terpene levels were significantly increased by the use of enzymes, free or immobilised. This was particularly relevant for the monoterpenes nerol and geraniol. Here, a comparison between the coupled and the free enzyme preparation showed a slightly higher release of the compounds in the non-immobilised enzyme mixture. The lower release by the immobilised enzymes can be explained by the changed composition of the enzyme mixture due to the immobilisation. The relative portion of the β -glucosidase was higher for the immobilised biocatalyst. The release of the fragrant aglyca is a sequential mechanism, so that the other glycosidases, like arabinosidase and rhamnosidase, are also important for the cleavage of the aromatic precursors.

The glycosidases immobilised onto magnetic particles can be easily integrated into existing batch processes of winemaking. Apart from the magnet separator, the process furthermore requires only modest investments in new equipment. Further advantages are the good separation and reuse of the coupled enzymes, an enzyme-free product, its nearly identical application compared to existing enzyme preparations, and hardly any new process expertise for the winemaker. However, the process review also showed the complexity of the hydrolysis of glycosidically bound substances in wine as it is influenced by a variety of factors. Thus, any prediction or estimate of the release of aromatic substances by the use of enzymes is hard to achieve due to the complexity of the wine. To date, it is moreover not yet possible to translate all of the acquired knowledge to the wineries due to the lack of an efficient methodology to improve the aroma of all the wines present in the market has not been found.

The glycosidases arabinosidase, rhamnosidase and xylosidase were successfully immobilised onto magnetic particle. The possible recyclability could be shown and the content of terpenes and some phenols significantly could increase using such enzymes. The results obtained are thus of considerable interest for the possible future application of immobilised enzymes in the winemaking industry. However, the enhanced levels of iron in wine using magnetic particles may result in a loss of quality. Therefore, the particles used are not suitable for use in the winery technology and thus require further development. For a successful application, more inert particles should be used to minimize the negative effects described.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
2 Theoretischer Teil	5
2.1 Wein	5
2.1.1 Herstellung	6
2.1.2 Inhaltsstoffe	10
2.1.3 Weinaroma	14
2.1.4 Terpene	15
2.1.5 Terpen-Glykoside und andere glykosidisch gebundene Stoffe	20
2.1.6 Hydrolyse der Glykoside	24
2.1.7 Wein-Fehler	26
2.1.8 Wirtschaft und Gesamt-Prozess	28
2.2 Gesetze	30
2.2.1 Wein	30
2.2.2 Enzyme in der Weinbereitung	31
2.2.3 Technische Hilfsstoffe für eine Immobilisierung	32
2.3 Enzyme für den Einsatz im Wein	34
2.3.1 β -Glucosidasen	37
2.3.2 Eigenschaften der Glycosidasen zur Aromafreisetzung	48
2.3.3 Herstellung von Enzympräparaten	49
2.3.4 Immobilisierung von Enzymen	53
2.4 Toxizität magnetischer Partikel	64
3 Methoden	66
3.1 Allgemeines	66
3.2 Proteinbestimmung	68
3.2.1 Kjeldahl-Methode	68
3.2.2 Bradford-Methode	69
3.3 Enzymaktivität	70

3.4	Enzymkinetik	75
3.5	Immobilisierung	83
3.6	Stabilität der immobilisierten Enzyme	87
3.7	Glykosyl-Glucose-Assay	88
3.8	Aromatisierung	88
3.9	Enzymeinsatz	90
3.9.1	Enzymbehandlung von Wein	90
3.9.2	Eisenmigration in Abhängigkeit der Magnetit-Partikel	90
3.10	Eisenbestimmung	91
3.11	Gesamtphenolgehalt	92
3.12	Einzelphenol-Bestimmung mittels HPLC	93
3.13	Zucker, organische Säuren und Alkohol im Wein	96
3.14	Terpen-Bestimmung mittels GC/MS	97
3.14.1	Prinzip der Probenvorbereitung	97
3.14.2	Gaschromatographische Methoden zur Terpen-Bestimmung	102
3.14.3	Semiquantitative Auswertung	104
3.15	Separation der Magnetit-Partikel	105
3.16	Sensorik	109
4	Ergebnisse und Diskussion	111
4.1	Proteinbestimmung handelsüblicher Enzympräparate	111
4.2	Aktivitätsbestimmungen	114
4.2.1	Charakterisierung verschiedener Enzympräparate	114
4.2.2	Zwischen-Fazit	125
4.2.3	Weitere Glycosidase-Aktivitäten	126
4.2.4	Fazit	126
4.3	Immobilisierung der Glycosidasen an Magnetit-Partikel	129
4.3.2	Fazit	134

4.4	Vergleich zwischen freiem und immobilisiertem Enzym	139
4.4.1	Weitere Glycosidase-Aktivitäten	142
4.4.2	Fazit	144
4.5	Enzymkinetik	146
4.5.1	Michaelis-Konstante K_M	146
4.5.2	Wechselzahl k_{cat}	151
4.6	Langzeitstabilität der immobilisierten Glycosidasen	156
4.6.1	Stabilität der β -Glucosidase	156
4.6.2	Stabilität der anderen Glycosidasen	157
4.6.3	Fazit	159
4.7	Glykosid-Gehalt in Wein	160
4.8	Eisenmigration in Wein nach Magnetit-Partikel-Einsatz	162
4.8.1	Eisenmigration in Wein	162
4.8.2	Eisenmigration in Abhängigkeit der Weinsäure-Konzentration	164
4.8.3	Fazit	166
4.9	Magnet-Separation der Magnetit-Partikel	167
4.10	Zucker, organische Säuren und Alkohol im Wein	168
4.11	Phenolische Inhaltsstoffe	169
4.11.1	Gesamtphenolgehalte	169
4.11.2	Einzelphenolgehalte	171
4.11.3	Fazit	179
4.12	Aromafreisetzung nach Enzymeinsatz	180
4.12.1	Aromatisierung	180
4.12.2	Enzymbehandlung von Wein	182
4.12.3	Oxidations- und Alterungsaromen	187
4.13	Sensorik	191
4.13.1	Geruch	191
4.13.2	Geschmack	193
4.13.3	Rangordnungsprüfung	195
4.13.4	Diskussion	196

4.14	Prozessbetrachtung	198
5	Zusammenfassung und Ausblick	206
6	Literaturverzeichnis	213
	Abbildungsverzeichnis	251
	Tabellenverzeichnis	255
7	Anhang	259
7.1	Geräte	259
7.2	Chemikalien	260
7.3	Verbrauchsmaterialien	262
7.4	Methoden	263
7.4.1	Proteinbestimmung	263
7.4.2	Glycosyl-Glucose-Assay	265
7.4.3	Eisenbestimmung	268
7.4.4	Gesamtphenolgehalt	270
7.4.5	Einzelphenol-Bestimmung	271
7.4.6	Zucker, organische Säuren und Alkohol im Wein	273
7.4.7	Terpen-Bestimmung mittels GC/MS	274
7.5	Ergebnisse	278
7.5.1	Proteinbestimmung handelsüblicher Enzympräparate	278
7.5.2	Magnet-Separation der Magnetit-Partikel	278
7.5.3	Glykosid-Gehalt in Wein	278
7.5.4	Aktivitätsbestimmungen	279
7.5.5	Immobilisierung der Glycosidasen an Magnetit-Partikel	286
7.5.6	Vergleich freies zu immobilisiertem Enzym	287
7.5.7	Langzeitstabilität der immobilisierten Glycosidase	289
7.5.8	Eisenmigration in Wein nach Magnetit-Partikel-Einsatz	293
7.5.9	pH-Werte der verwendeten Lösungen	294
7.5.10	Sensorik	295
	Danksagung	297
	Angaben zur Person	298

Abkürzungsverzeichnis

Neben den Symbolen der chemischen Elemente des Periodensystems und den internationalen Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

A	Absorption
Abb.	Abbildung
Anh.	Anhang
Ara	Arabinosidase bzw. α -L-Arabinofuranosidase
ATP	Adenosintriphosphat
β G	β -Glucosidase
BG	Bestimmungsgrenze
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderalbumin (engl. bovine serum albumin)
c	Konzentration
ca.	circa
CO ₂	Kohlendioxid
C/P	Citrat/Phosphat(-Puffer)
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DLR	Dienstleistungszentrum ländlicher Raum
d.h.	das heißt
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
E	Enzym
EC-Nr.	numerisches Klassifikationssystem für Enzyme (engl. Enzyme Commission numbers)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EG	Europäische Gemeinschaft
EfG	Erfassungsgrenze
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
engl.	englisch
ES	Enzym-Substrat-Komplex
et al.	und andere (lat. et alia)
etc.	und so weiter (lat. et cetera)
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
ExoI	β -D- Glucan Exohydrolase

Abkürzungsverzeichnis

Fa.	Firma
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (engl. Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FCC	Food Chemical Codex
FDA	Food and Drug Administration
fr.	französisch
GAE	Gallussäure-Äquivalente (engl. Gallic acid equivalents)
GC	Gaschromatograph
Gew.-%	Gewichtsprozent
GH	Glykosid Hydrolase
GRAS	Generally Recognized As Safe (dt. allgemein als sicher anerkannt, in den USA eine Zulassungsbezeichnung der FDA)
GT	Gewürztraminer
HCA	Hydrophobic Cluster Analyses
HGMS	Hochgradient-Magnet-Separation/Separator (engl. High Gradient Magnetic Separator)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
HS	Headspace
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
i.d.R.	in der Regel
immo.	immobilisiert
IS	interner Standard
JECFA	Gemeinsamer FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe (engl. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
kat	Katal
k _{cat}	Wechselzahl
KCl	Kaliumchlorid
K _i	Inhibitor-Konstante
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
konz.	konzentriert
lat.	lateinisch
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl. liquid/liquid extraction)
LSD	Least Significant Difference
M	Molar

MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg _E	mg _{Enzym}
mg _P	mg _{Protein}
min	Minuten
MM	Morio Muskat
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer
MW	Mittelwert
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
n.a.	nicht angegeben
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
n.d.	nicht detektiert
NG	Nachweisgrenze
NIST	National Institute of Standards and Technology
n-OG	n-Octyl-β-D-Glucopyranosid
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
NSI	Nukleotid-Sequenz-Identität
O ₂	Sauerstoff
OIV	Internationale Organisation für Rebe und Wein (fr. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin)
pH	potentia Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration in wässriger Lösung
PDB ID	Protein Data Bank Identification
PET	Polyethylenterephthalat
pI	isoelektrischer Punkt
pNP	p-Nitrophenol
pNPA	p-Nitrophenyl-α-L-Arabinofuranosid
pNPG	p-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid
pNPR	p-Nitrophenyl-α-L-Rhamnopyranosid
pNPX	p-Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid
PVA	Polyvinylalkohol
R ²	Bestimmtheitsmaß
RGT	Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur

Abkürzungsverzeichnis

Rha	Rhamnosidase bzw. α -L-Rhamnopyranosidase
RI	Brechungsindex (engl. refractive index)
RM	Reaktionsmix
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
RP	Reversed Phase
R _t	Retentionszeit
S	Substrat
S.	Seite
s	Standardabweichung
s.	siehe
SDE	simultane Destillation-Extraktion
SHE	statische Headspace (engl. Static Headspace Extraction)
SO ₂	Schwefeldioxid
SPME	Mikrofestphasenextraktion (engl. Solid Phase Microextraction)
SPE	Festphasenextraktion (engl. Solid Phase Extraction)
Tab.	Tabelle
TDN	1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalen
THV	Technische Hilfsstoff-Verordnung
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VK	Variationskoeffizient
Vol.-%	Volumenprozent
Wasser	Reinstwasser
WF	Wiederfindung
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization)
Xyl	Xylosidase bzw. β -D-Xylopyranosidase
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Wein gehört bereits seit Jahrtausenden als Genussmittel zum Bestandteil vieler Kulturen. Dabei ist das Weinaroma einer der wichtigsten intrinsischen Faktoren, welcher die wahrnehmbare Weinqualität und Konsumentenakzeptanz beeinflusst [1–4]. Die chemische Zusammensetzung schwankt aufgrund der Beeinflussung durch Klima, Boden, Lage, Art und Behandlung von Trauben, Most und Wein innerhalb weiter Grenzen [5, 6]. Die sensorische Wahrnehmung von Wein ist äußerst komplex und wird durch eine Vielzahl von geschmacks- und geruchsaktiven Verbindungen, wie Terpenen, Estern, Methoxypyrazinen und Aldehyden, geprägt [6]. Den terpenoiden Verbindungen kommt dabei eine zentrale Rolle zu. Diese können sowohl frei als auch glykosidisch gebunden in der Traube bzw. im Wein vorliegen, wobei glykosidisch gebundene häufiger vorkommen als freie Monoterpene [7, 8]. Glykosidisch gebundene Terpene haben keinen direkten Einfluss auf das Aroma, sie fungieren als Präkursoren einiger Aromen und können durch gezielte Freisetzung das sortentypische Aroma eines Weins verstärken [5]. Glykosidisch gebundene Terpene werden daher auch als Aroma-Reservoir eines Weins bezeichnet.

Geschichtlich betrachtet, wurde die enzymatische Freisetzung von flüchtigen Komponenten (Monoterpenen [9] und Vanille [10]) aus den entsprechenden β -D-Glykosiden durch den Einsatz von β -Glucosidasen bereits Anfang des 20. Jahrhunderts beobachtet [11]. Betrachtet man allerdings ausschließlich die enzymatische Hydrolyse von diglykosidisch gebundenen Aroma-Präkursoren, wie diese hauptsächlich im Wein vorkommen, wurden von ersten Beobachtungen erst Ende der 80iger Jahre berichtet [12].

Im Weinbau werden Enzyme u.a. zur Mostklärung, zur Farbstoff- und Saftextraktion aus der Weinbeerenhaut, zur Freisetzung von Mannoproteinen aus den Zellwänden von Hefezellen, zur Stabilisierung von Polyphenolen sowie zur Freisetzung von Aromen eingesetzt [13]. I.d.R. handelt es sich um Enzyme mit hydrolytischer Aktivität wie Pektinylasen, Polygalacturonasen, Pektinesterasen, Cellulasen, Cinnamylesterasen oder β -Glucosidasen. Besonders pektolytische Enzympräparate mit einer β -Glucosidase-Nebenaktivität, sogenannte „Aromaenzyme“, sind interessant und können helfen, das sortentypische Wein-Aroma auszubilden bzw. dieses zu intensivieren [5]. β -Glucosidasen führen dabei zur Freisetzung aromaprägender Terpene [14, 15], welche bei den sogenannten Bukettrebsorten (Gewürztraminer, Muskateller, Riesling etc.) zu den prägenden Aromastoffen gehören [16].

Endogene Glycosidasen aus Trauben und Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) werden durch die typischen Bedingungen im Most bzw. Wein (saurer pH-Wert und Glucose) gehemmt. Aufgrund dieser Tatsache sind Enzyme vom Fadenpilz (*Filamentous fungi*) in den letzten Jahrzehnten Gegenstand der Forschung, um einen möglichen Einsatzbereich der Hydrolyse von glykosidisch gebundenen Aromavorstufen zu untersuchen [17–19]. Seit den 1970er Jahren werden kommerzielle Enzympräparate vom *Aspergillus niger* ausgiebig in der Weinbereitung und Obstverarbeitung verwendet [20].

Insbesondere um die Aroma-Qualität von Wein bei einer sogenannten gezügelten Vergärung (Fermentation unter Kühlung) zu verbessern, werden vielfach Gemische dieser Enzyme verwendet, um die glykosidisch gebundenen Terpene freizusetzen. Damit jedoch eine gewisse Aromabalance gehalten wird, d.h. nicht „zu viel“ Aroma freigesetzt wird, muss das Enzymgemisch nach einiger Zeit durch eine Bentonitschönung inaktiviert bzw. ausgefällt werden und geht dadurch verloren. Neben dem Verlust an aktivem Enzym ist hierbei weiterhin nachteilig, dass bei jedem Gärungsansatz neues Enzympräparat eingesetzt werden muss und dass außerdem eine gewisse Rest-Enzymaktivität im Wein erhalten bleibt. Letzteres führt dazu, dass derart behandelte Weine sensorisch nach einem halben bis einem Jahr abbauen. Gesetzliche Anforderungen verbieten eine Anwesenheit von exogenen Proteinen in Wein, aus diesem Grund ist eine vollständige Entfernung der Enzyme unerlässlich [21]. Eine Immobilisierung dieser Enzyme ist eine Möglichkeit diese Probleme zu lösen.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden noch keine immobilisierten Enzyme in der Winzertechnik kommerziell eingesetzt, auch die Verwendung handelsüblicher Enzyme bleibt aus mehreren Gründen in der Winzertechnik begrenzt, die wie folgt zusammengefasst werden können: Traditionalismus der Winzer und Einfluss der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Traubenmost und Wein (pH, Temperatur, Ethanol, Zucker, Polyphenole, etc.) auf die Enzymaktivitäten. Dennoch existieren zahlreiche Studien, die sich mit der Immobilisierung von Glycosidasen zur Aromaverbesserung befassen. Dabei basieren die meisten Methoden zur Immobilisierung auf einer Adsorption der Enzyme auf Chitosan in Verbindung mit einer anschließenden Quervernetzung mit Hilfe von Glutaraldehyd [22–27]. Daneben gibt es ebenfalls Studien, die sich mit der Immobilisierung auf Ionenaustauscher-Harzen [28, 29] oder Epoxid-aktivierten Acryl-Partikeln [20] befassen. Aufgrund bekannter Vorteile

gegenüber löslichen Enzympräparaten, bietet eine Enzym-Immobilisierung viele Vorteile für industrielle Prozesse, hierbei sind insbesondere die Kontrolle der enzymatischen Reaktion und enzymfreie Produkte zu nennen.

Ein interessanter Ansatz bietet eine Immobilisierung von Enzymen an magnetische Partikel. Solche Partikel besitzen im Allgemeinen eine niedrige Toxizität und können durch entsprechende Magnetfelder wieder gut aus Reaktionsgemischen abgetrennt werden [30]. Bis jetzt wurden noch keine Enzyme bzw. Glycosidasen an magnetische Träger für den Einsatz im Wein konjugiert. Besonders der Vorteil einer vollständigen Entfernung und einer möglichen Wiederverwendung machen diesen Ansatz sehr interessant.

Somit ergeben sich für diese Arbeit vielfältige Aufgabenfelder, wie eine erfolgreiche Immobilisierung aromafreisetzender Enzyme an magnetische Partikel, Bestimmung des Aroma-Freisetzungs potentials und die Rückgewinnung der Partikel. In Abb. 1 ist das Grundprinzip eines möglichen Einsatzes der magnetischen Enzym-Partikel im Wein schematisch dargestellt.

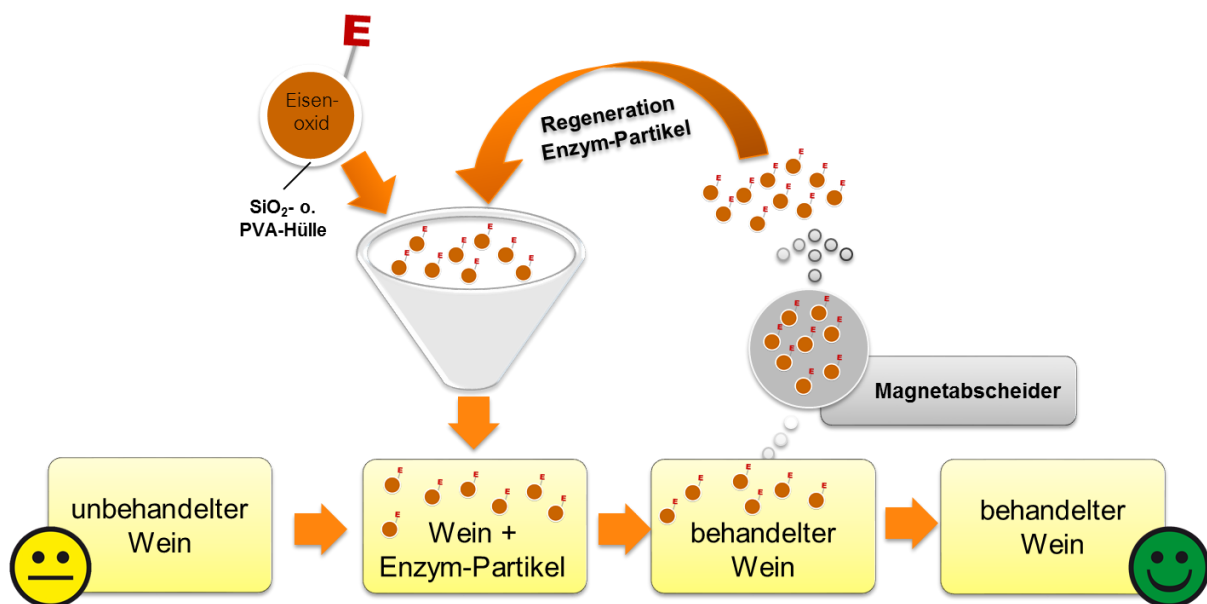


Abb. 1 Schematische Darstellung eines möglichen Einsatzes von an Magnetit-Partikel immobilisierter Glycosidasen im Wein

Im Rahmen dieser Arbeit sollen β -Glucosidasen und weitere glykosidhydrolytisch wirksame Enzyme (Glycosidasen) an Magnetit-Partikel immobilisiert und ihre Wirksamkeit im Wein ermittelt werden. Um eine mögliche Verwendung im Wein abschätzen zu können, werden zunächst verschiedene Enzympräparate charakterisiert. Entsprechende Glycosidasen sollen anschließend an Magnetit-Partikel immobilisiert werden. Zur Immobilisierung werden superparamagnetische Magnetit-

Partikel, die in einer Matrix aus Polyvinylalkohol (PVA) eingeschlossen sind, verwendet. In einem weiteren Schritt wird die Wirksamkeit im Wein ermittelt, sowie entsprechende Umsatzprodukte analytisch erfasst. Anschließend sollen die immobilisierten Glycosidasen mit einem Hochgradient-Magnet-Separator (HGMS) wieder vollständig aus einem Wein entfernt und auf eine mögliche Wiederverwendung geprüft werden.

2 Theoretischer Teil

2.1 Wein

Die Weinherstellung ist ein biologischer Prozess und das Weinaroma wird durch viele Faktoren, wie die Variation der Rebsorte, Hefe, Enzyme und andere önologische Parameter, beeinflusst [31, 32]. Bei diesem Prozess spielen sowohl die Art der Hefezellen als auch Enzyme eine Schlüsselrolle. In den letzten Jahrzehnten wurden einige Versuche durchgeführt um die Hefe-Stämme zu verbessern, die bei der Fermentation des Traubensaftes bzw. Most eingesetzt werden. Daneben wurden ebenfalls Versuche zur Nutzung von exogenen mikrobiellen Enzymen während der Weinherstellung durchgeführt [33]. Hauptsächlich sind dabei drei exogene Enzyme zu nennen: Pectinasen, β -Glucanasen und Hemicellulasen [34]. Vorteile dieser drei Enzyme bzw. deren Einsatz während der Weinherstellung sind zum einen bessere Einmischung der Traubenhaut und damit verbesserte Farbextraktion, zum anderen einfache Most-Klärung und -Filtration, sowie eine verbesserte Weinqualität und -stabilität [33]. Ein weiteres Enzym vom Typ der β -Glucosidasen hat nun ebenfalls beträchtliche Aufmerksamkeit in der Weinindustrie auf sich gezogen, da β -Glucosidasen die Fähigkeit besitzen aus natürlicherweise vorhandenen glykosidischen Präkursoren, β -glykosidisch gebundene Terpene als Aroma freizusetzen und so das Aroma von Wein zu verstärken [35, 36].

2.1.1 Herstellung

Die Weinherstellung erfolgt generell immer nach dem gleichen Prinzip (s. Abb. 2). Zuerst werden die geernteten Trauben entrappt, anschließend eingemaischt und gekeltert (gepresst). Der erhaltene Most wird dann, i.d.R. durch Zugabe von Reinzuchthefen, vergoren und der erhaltene Jungwein anschließend geklärt, gefiltert, und in Flaschen abgefüllt bzw. in Tanks gelagert.

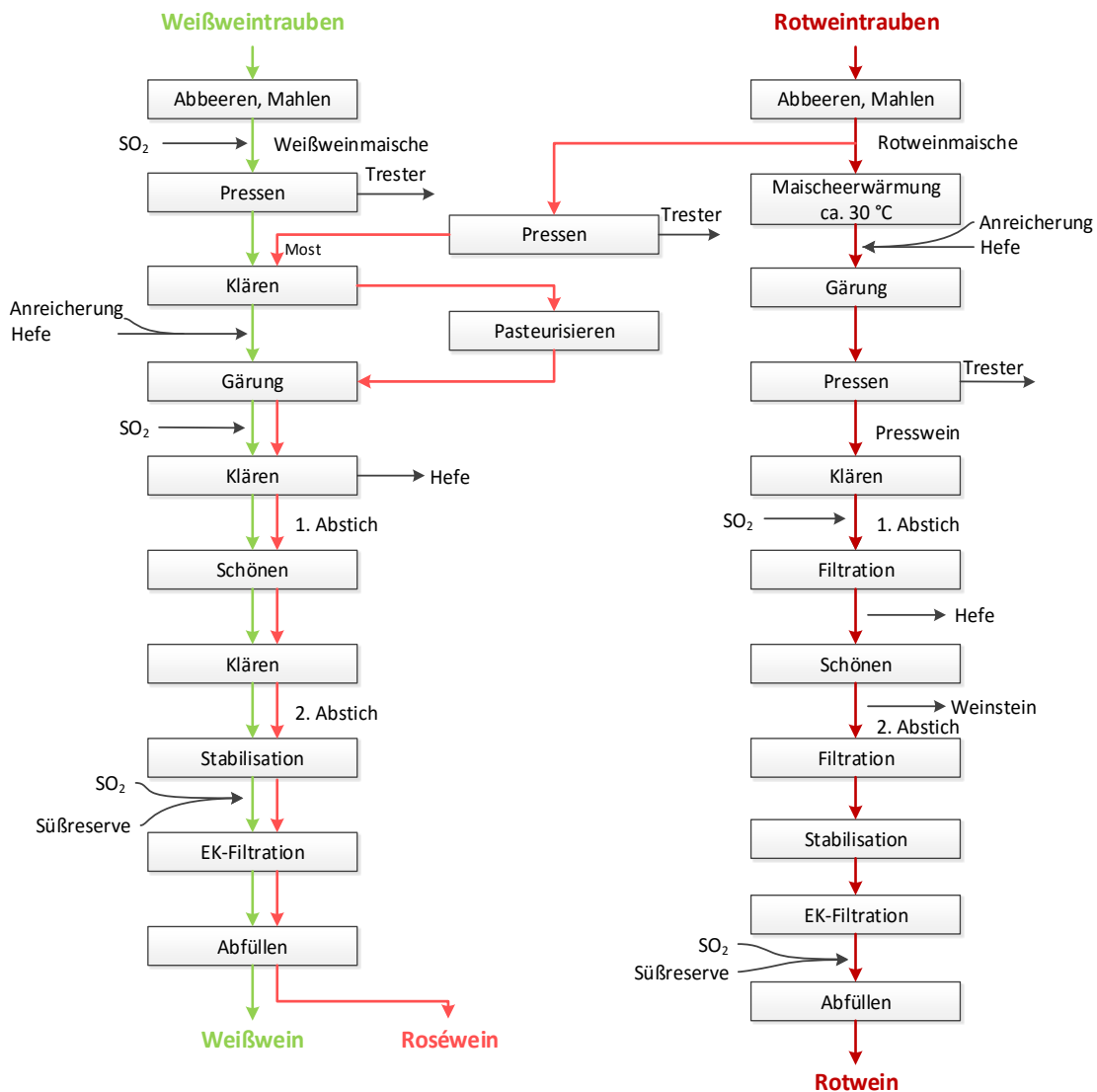


Abb. 2 Schematische Darstellung der Weinherstellung (modifiziert nach [37])

Der Unterschied zwischen Rotwein- und Weißweinherstellung ist die Reihenfolge der Arbeitsschritte. Bei der Rotweinherstellung wird die Maische direkt vergoren, um möglichst viele Farbstoffe aus den Trauben zu extrahieren. Erst danach wird die vergorene Maische gepresst und gefiltert. Roséweine werden ebenfalls aus Rotweintrauben gewonnen, dann allerdings ähnlich der Weißweinherstellung weiterverarbeitet. Beim Roséwein darf die Maische nur kurze Zeit ruhen bzw.

„angären“, damit bloß ein Teil der Farbstoffe aus den Rotweintrauben extrahiert wird und der Roséwein so seinen typischen leicht roten-, roséfarbenen Charakter erhält.

2.1.1.1 Maischen

Die geernteten Weintrauben werden entrappt und anschließend gemahlen. Aus den gemahlene Weintrauben entsteht ein dickflüssiges Gemisch aus Schalen, Traubenkernen, Fruchtfleisch und Saft, die sogenannte Maische. Die Maische wird danach einige Stunden stehen gelassen, um Aromavorstufen, Geschmacksstoffe, Phenole (Farbstoffe) und andere lösliche Stoffe aus den Beeren bzw. der Beerenhaut zu extrahieren. Durch die Maischestandzeit wird ebenfalls die Pressbarkeit verbessert, da originär vorhandene Enzyme oder zugesetzte Enzyme die Pektine im Fruchtfleisch und in der Beerenhaut abbauen und so die Maische verflüssigen [38, 39].

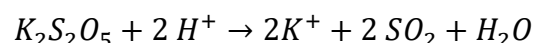
2.1.1.2 Pressen/Keltern

Die Maische wird anschließend gepresst bzw. gekeltert. Dadurch werden die festen Traubenrückstände, der sogenannte Trester, vom Most getrennt. Heute wird bei der Weißweinherstellung hauptsächlich pneumatisch gepresst. Diese Pressung ist schonend, die Kerne in der Maische werden nicht zerdrückt und darin enthaltene Bitterstoffe können nicht freigesetzt werden [38, 39].

2.1.1.3 Schwefeln

Eine Schwefelung kann mehrere Gründe haben. Zum einen dient die Schwefelung der Maische bzw. des Mostes der Erhaltung oxidationsempfindlicher Inhaltsstoffe, der Verhinderung der enzymatischen Bräunung durch Phenoloxidation sowie der Hemmung unerwünschter Mikroorganismen, wie wilde Hefen, Essigbakterien, Schimmelpilze, wobei echte Weinhefen der Gattung *Saccharomyces* hingegen kaum beeinflusst werden [39, 40]. Weitere wichtige Effekte sind eine Unterdrückung von Fehlparomen („Luftton“, „Oxidationston“, „Alterston“, „Sherryton“) durch Bindung von Carbonyl-Verbindungen (z.B. Ethanal) als Hydroxysulfonsäuren [37, 38].

Zur Schwefelung zugelassen sind Schwefeldioxid oder Kaliumdisulfit (Verordnung (EG) Nr. 606/2009). Kaliumdisulfit wird dem Most bzw. Wein dabei meist in Tablettenform zugesetzt, wobei 10 g Kaliumdisulfit 5 g SO₂ entsprechen bzw. 50 % des Kaliumdisulfits zu SO₂ zerfallen [38]. Kaliumdisulfit spaltet unter sauren Bedingungen, wie diese im Wein vorkommen, Schwefeldioxid ab:



Nur ein Teil bleibt als schwefelige Säure erhalten, ein Teil wird zu Sulfat oxidiert und ein weiterer Teil wird an Zucker und andere Carbonyl-Verbindungen gebunden. Für den Gärverlauf, Reifung und Haltbarkeit von Wein ist eine richtige Dosierung von SO₂ von großer Bedeutung. Im fertig ausgebauten Wein wird ein Gehalt von 30 bis 50 mg/l an freiem SO₂ angestrebt [37].

2.1.1.4 Gärung

Die Gärung von Traubenmost erfolgt i.d.R. als Batch-Prozess in Fässern oder meist in Stahl tanks mit Gärverschlüssen. Dabei werden die Behältnisse nur zu 70 bis 75 % gefüllt, damit noch Raum für den Gärungsschaum vorhanden ist [39, 40]. Für höherwertige Weine werden häufig kleinere Tanks in einer Größenordnung von 50 bis 100 hl eingesetzt, bei „Standard-Qualitäts“-Weinen beträgt die Größe der Tanks meist 200 bis mehr als 2000 hl [39].

Eine Weingärung erfolgt entweder spontan, da sich verschiedene Hefen auf der Beerenoberfläche befinden, oder durch Verwendung einer Reinzuchtheife. Bei den wilden Formen sind insbesondere *Saccharomyces apicultas* und *exiguus* zu nennen, bei den Reinzuchthefen *Saccharomyces cerevisiae*, var. *ellipsoideus* oder *pastorianus* [38]. Um den Prozess der Gärung besser kontrollieren zu können, wird i.d.R. eine Reinzuchtheife verwendet, dabei gibt es für die unterschiedlichen Anforderungen der verschiedenen Weinsorten passende Reinzuchthefen. Hauptsächlich werden hochvergärende Stämme, die hohe Alkoholausbeuten (bis 145 g/l) ermöglichen, verwendet. Daneben gibt es andere Hefetypen, wie sogenannte „Sulfithefen“, die gegen schwefelige Säure weniger empfindlich sind, oder „Kaltgärhefen“, die auch bei niedrigen Temperaturen wirksam bleiben. Meist werden die Hefen als Trockenhefen mit 5 bis 10 g pro Hektoliter dem Most im Gärbehälter zugesetzt. Die Gärung wird dabei oft gezügelt, d.h. langsam (bis 21 Tage) und kühl (bei Weißweinen unter 20 °C, 20 bis 24 °C bei Rotweinen). Ein Einsatz von schwefeliger Säure verzögert den Gärbeginn bei 100 mg/l SO₂ um 3 Tage und bei 200 mg/l SO₂ um 3 Wochen [38].

Die Hauptgärung findet in 5 bis 10 Tagen statt und erreicht ihren Höhepunkt nach 3 bis 4 Tagen. Am Ende ist der Zucker, genauer die Glucose, weitgehend zu Alkohol vergoren. Proteine, Pektine, Gerbstoffe, Tartrate und Zellfragmente scheiden sich mit der Hefe als Bodensatz ab. Um eine vollständige Vergärung des Zuckers zu Alkohol zu verhindern und dadurch eine gewisse Restsüße im Wein zu erhalten, wird eine Nachgärung durch Zusatz von schwefeliger Säure unterbunden [38]. Bei der Nachgärung und anschließender Reifung des Weins spielen Milchsäurebakterien eine

wichtige Rolle. Milchsäurebakterien bauen Äpfelsäure zu Milchsäure und CO₂ ab (biologischer Säureabbau). Allerdings kann eine unkontrollierte Vermehrung dieser Mikroorganismen zu unerwünschten geschmacklichen Veränderungen, z.B. Milchsäurestich oder Sauerkrautton. Bei säurearmen Weinen ist der Abbau von Äpfelsäure nicht erwünscht [40].

2.1.1.5 Abstich und Kellereibehandlung/Reifung

Als Abstich wird das Abziehen des Weins von der Hefe bezeichnet. Dies wird etwa 6 bis 8 Wochen nach der Gärung durchgeführt und der Wein zunächst mittels Filtration vorgeklärt. Eine Autolyse der Hefezellen durch längere Lagerung über Hefe kann zu Trübungserscheinungen und zur Bildung von Schwefelwasserstoff (Ursache für Hefe- oder Schwefelwasserstoff-Böckser) führen [40].

Zum Abbinden des überschüssigen Acetaldehyds, zum Abstoppen einer weiteren Gärung und zum Schutz vor mikrobiellem Verderb kann der Wein nochmals geschwefelt werden. Eine anschließende Reifung der Weine erfolgt heute überwiegend inahltanks. Nach der abgeschlossen Reifung werden die Weine geschönt und filtriert [40].

2.1.1.5.1 Schönung und Filtration

Schönen und Filtrieren haben beide den Sinn den Wein zu klären indem Trubstoffe entfernt werden. Der Wein wird damit stabilisiert. Zu den weintypischen Trubstoffen zählen meist Proteine sowie oxidierte und kondensierte Polyphenole [37].

Geklärt wird der Wein i.d.R. durch Schönung (Fällung), Filtration oder Zentrifugation. Zu den Schönungsverfahren gehören der Einsatz von Speisegelatine, Hausenblase kombiniert mit Casein, Eiereiweiß, Tannin, Bentonit, Kaolin, Agar-Agar oder gereinigte Holzkohle. Diese Stoffe werden dem Wein zugesetzt und adsorbieren oder fällen trübende und unangenehm schmeckende Stoffe. Dabei ist die Verwendung von Bentonit heutzutage am bedeutsamsten bei den Schönungsverfahren. Unerwünschte Schwefelverbindungen werden mit Kupfersulfat entfernt [38, 41].

Zur endgültigen Klärung der geschönten Weine werden diese über Cellulose oder Kieselgur durch Schichtenfilter oder Anschwemmfilter filtriert. Um die Haltbarkeit von Wein und Süßmost zu verlängern, hat eine entkeimende Filtration mittels Membranfiltern große Bedeutung erlangt [37].

2.1.1.5.2 Lagerung

Entscheidend für die Lagerfähigkeit eines Weins sind mehrere Faktoren. Wein sollte lichtgeschützt, bei konstanten und mäßigen Temperaturen sowie unter Luftabschluss gelagert werden, um eine Oxidation von Weininhaltsstoffen und damit eine Qualitätsminderung zu verhindern.

2.1.2 Inhaltsstoffe

Wein besteht aus zahlreichen chemischen Substanzklassen, zusammenfassend sind folgende Haupt-Stoffgruppen zu nennen [42]:

- Alkohole
- Kohlenhydrate
- Säuren
- Stickstoffverbindungen
- Mineralstoffe
- Phenole

In geringeren Mengen kommen in Wein ebenfalls Aldehyde, Acetale, Ester, Terpene, Enzyme, Vitamine und gelöste Gase wie Kohlendioxid, Schwefeldioxid, Sauerstoff und Schwefelwasserstoff vor [42].

Die chemische Zusammensetzung von Wein schwankt aufgrund der Beeinflussung durch Klima, Boden, Lage, Art und Behandlung von Trauben, Most und Wein innerhalb weiter Grenzen [5, 6]. Die Qualität von Wein wird insbesondere durch den Gehalt an Ethanol, Extrakt, Zucker, Glycerin, Säuren und Bukettstoffen determiniert [6]. Tab. 1 zeigt nachfolgend die durchschnittliche Zusammensetzung von Traubenmost. In Abb. 3 ist die chemische Zusammensetzung der wichtigsten Weininhaltsstoffe dargestellt.

Tab. 1 Durchschnittliche Zusammensetzung von Traubenmost [37]

Bestandteil	Menge [g/l]
Wasser	780 – 850
Zucker (als Glucose)	120 – 250
Säuren (als Weinsäure)	6 – 14
N-Verbindungen	0,5 – 1
Mineralstoffe	2,5 – 3,5

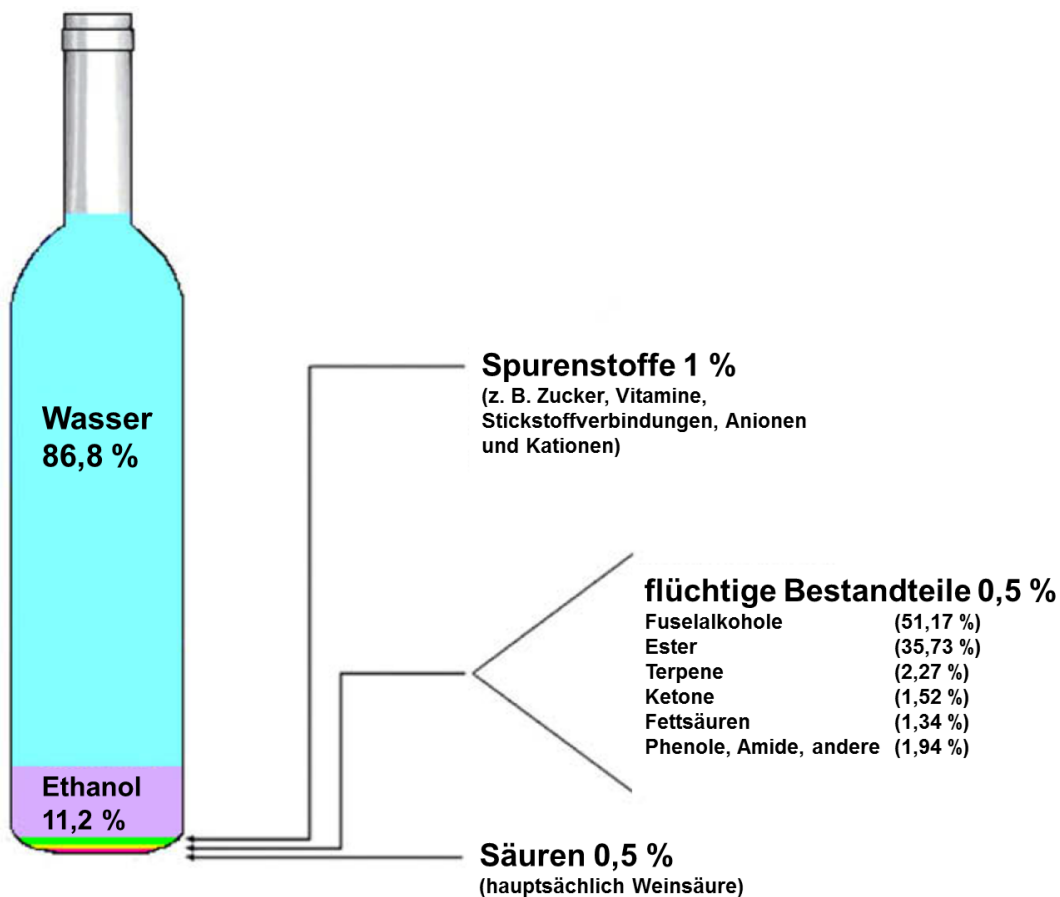


Abb. 3 Chemische Zusammensetzung von Wein inklusive der durchschnittlichen Mengen der wichtigsten Weininhaltsstoffe. Die Werte variieren je nach untersuchtem Weintyp und verwendeter Extraktionstechniken. Ethanol ist als Gewicht pro Volumen (w/v) dargestellt, wie auch alle anderen Komponenten. Modifiziert nach [43].

2.1.2.1 Alkohole

2.1.2.1.1 Ethanol

Ethanol ist neben Wasser der Hauptbestandteil in Wein und weist i.d.R. einen Anteil von 7 bis 16 Vol.-% auf. Der durch die Gärung entstehende Ethanol kann auf kaum mehr als 16 Vol.-% ansteigen, da Weinhefen durch höhere Ethanolgehalte gehemmt werden. Mit Hilfe von alkoholresistenten Hefen können allerdings auch höhere Ethanol-Konzentrationen erzielt werden. Der natürliche Ethanolgehalt eines Weins ist ein direktes Maß für den Reifegrad der verarbeiteten Trauben bzw. den Zuckergehalt der Trauben [42, 44].

2.1.2.1.2 Methanol

Methanol ist toxisch und kommt in Wein nur in geringen Mengen (15 bis 250 mg/l) vor [38]. Das enthaltene Methanol stammt meist nur zu geringen Anteilen aus dem Stoffwechselprozess der Hefen, sondern entsteht größtenteils aus dem

enzymatischen Abbau des fruchteigenen Pektins. Eine Enzymbehandlung mit pektolytischen Enzymen erhöht demnach den Methanolgehalt [42, 44].

2.1.2.1.3 Höhere Alkohole

Höhere Alkohole kommen im Wein zwischen 150 bis 700 mg/l vor und weisen teilweise ausgeprägte Geruchs- und Geschmackseigenschaften auf, was wiederum einen großen Beitrag zum Aroma des Weins leistet. Die mengenmäßig wichtigsten höheren Alkohole, sogenannte Fuselöle, sind Isobutanol und die beiden Amylalkohole 2-Methyl-butanol-1 und 3-Methyl-butanol-1. Diese Stoffe entstehen meist aus den Zuckern des Traubenmostes [42, 44].

2.1.2.1.4 Mehrwertige Alkohole

Glycerin ist als Gärungsprodukt mit 6 bis 10 g/l bzw. 8 bis 10 % Anteil an enthaltenen Gesamt-Alkoholen mit Abstand der bedeutungsvollste der mehrwertigen Alkohole und. Glycerin entsteht aus Glucose und verleiht dem Wein Vollmundigkeit sowie einen abgerundeten Geschmack, den sogenannten Körper eines Weins [42, 44].

2.1.2.2 Kohlenhydrate

Vollständig vergorene Weine enthalten i.d.R. nur geringe Mengen an Kohlenhydraten (2 bis 4 g/l). Im Wein kommen hauptsächlich D(+)-Glucose und D(-)-Fructose als Monosaccharide bzw. Hexosen neben geringen Mengen an Pentosen, wie Arabinose, vor [42, 44]. Bei den meisten Weinen mit einem natürlichen Restzuckergehalt überwiegt der Fructose-Anteil, obwohl in den reifen Trauben Glucose und Fructose in etwa gleichen Mengen vorliegen [44]. Dies hängt damit zusammen, dass die meisten *Saccharomyces cerevisiae* Stämme glucophil sind, d.h. hauptsächlich Glucose verstoffwechseln und erst gegen Ende der Gärung Fructose angreifen.

Als Disaccharide sind hauptsächlich Saccharose, Maltose und Melibiose, lediglich in Spuren, nachweisbar [42].

2.1.2.3 Säuren

Der Säuregehalt eines Weins bestimmt dessen Geschmack und Haltbarkeit wesentlich [45]. Beispielsweise enthalten Weine aus reifen Trauben guter Jahrgänge geringere Säure-Konzentrationen als Weine aus unreifen Trauben sonnenarmer Jahre [42]. Der pH-Wert von Wein liegt zwischen 2,8 und 3,8. Titrierbare Säuren sind in deutschen Weinen zwischen 4 und 9 g/l, berechnet als Weinsäure, enthalten [45].

Diese Säuren werden als ursächliche Bestandteile der Trauben und des Traubenmostes (z.B. Weinsäure, Äpfelsäure und Citronensäure) sowie als Zwischen- und Endprodukte der alkoholischen Gärung (z.B. Bernsteinsäure, Brenztraubensäure, gradkettige Fettsäuren Hexan-, Octan- und Dodecansäure) eingetragen. Essig- und Ameisensäure entstammen vorwiegend aus dem Stoffwechsel weineigener Bakterien [42].

Mengenmäßig überwiegen Wein- und Äpfelsäure im Wein. Je nach Reifegrad der Trauben kann der Anteil an Äpfelsäure um das Drei- bis Vierfache den Gehalt an Weinsäure übersteigen. Bei gut ausgereiften Trauben liegt das Verhältnis beider Säuren meist bei 1:1 [44]. In sonnenreichen Anbaugebieten sind Weine allgemein säureärmer [42].

2.1.2.4 Stickstoffverbindungen

Die Stickstoffverbindungen des Mostes fallen zum Teil beim Einmaischen und Keltern gebunden an Gerbstoffen aus, ein großer Teil (70 bis 80 %) wird durch die Hefen verstoffwechselt. Bei den noch verbleibenden Stickstoffverbindungen handelt es sich hauptsächlich um Aminosäuren, wobei Prolin dominiert [37]. Die Aminosäuren sind wichtig für die Aroma-Bildung eines Weins [44, 46–49]. Der Gesamtgehalt hängt stark von Herkunft und Sorte des Weins ab. In der Literatur schwanken die Werte von 250 bis 4330 mg/l. Arginin, Prolin und Alanin treten dabei quantitativ deutlich hervor [42].

2.1.2.5 Mineralstoffe

In deutschen Weinen liegt der Mineralstoffgehalt normalerweise zwischen 1,8 und 4 g/l [38]. Die Zusammensetzung des Mineralstoffgehalts wird durch den Boden bzw. den Standort (geologische Beschaffenheit, Verwitterungszustand, pH-Wert), sowie den Jahrgang (Klima, Reifegrad) beeinflusst. Die Konzentrationen können je nach Kellerbehandlung (Kontaktzeit der Maische mit den Beerenhäute und Stielen der Weintraube) und Kellerbehandlungsstoffen (Kieselgur, Aktivkohle, Bentonit etc.) variieren [38, 44].

2.1.3 Weinaroma

Wie bereits erwähnt, ist die sensorische Wahrnehmung von Wein äußerst komplex, aufgrund der Vielzahl an geschmacks- und geruchsaktiven Verbindungen wie Terpenen, Estern, Methoxypyrazinen und Aldehyden. Diese vermitteln ein ausgeprägtes Aroma und typische Geschmacksnoten wie floral, fruchtig, pfeffrig und holzig [6, 50–52]. Der sensorische Grundeindruck eines Weins, wie süß, sauer, salzig und bitter, wird dagegen durch die Anwesenheit von Zuckern, mehrwertigen Alkoholen, Salz, Polyphenolen und Flavonoiden hervorgerufen [6]. Im Weinaroma kommen weit über 1000 flüchtige Stoffe in Konzentrationen von g/l bis ng/l vor [53]. Für die unterschiedlichen Aromastoffe variieren die Geschmacks- und Geruchsschwellenwerte über einen weiten Konzentrationsbereich [5, 54]. Einige dieser aromaaktiven Substanzen, z.B. 3-Alkyl-2-methoxypyrazine, Thiole oder Haloanisole, weisen so niedrige Geruchsschwellenwerte auf, dass bereits wenige ng/l genügen, um den Wein wahrnehmbar zu verändern [55]. Der Gesamt-Aromeneindruck von Wein ist somit das Resultat einer Vielzahl von Interaktionen zwischen einer großen Anzahl chemischer Komponenten und den sensorischen Rezeptoren der Konsumenten.

Das chemische Aromaprofil eines Weins ist abhängig von der Traube, der Fermentations-Mikroflora (Hefen), einer möglichen sekundären mikrobiologischen Fermentation und der Alterung bzw. den Lagerungsbedingungen. Die Aroma-Zusammensetzung der Trauben wiederum hängt von Faktoren, wie Sorte und den spezifischen Klima- und Umweltbedingungen ab. Weitere Einflussfaktoren der chemischen Zusammensetzung des Weinaromas sind Qualität der Traube sowie Reifegrad, spezifische Verarbeitungstechniken und Fermentation [6].

Weinaromen können prinzipiell in drei Aroma-Gruppen unterteilt werden: primäre, sekundäre und tertiäre Aromen.

Primäre Aromen werden hauptsächlich durch die Rebsorte und die Anbaubedingungen beeinflusst. Trauben sind meist geschmacklich neutral (Süße der Trauben steht im Vordergrund, weniger die Aromen). Das sortentypische Aroma liegt nur in kleinen Anteilen frei vor, der überwiegende Teil gebunden als sogenannte Aromavorstufen. Die von der Traube abgeleiteten Komponenten sind verantwortlich für das primäre Aroma bzw. den sortenabhängigen Charakter eines Weins und sind hauptsächlich im Exokarp-Gewebe zu finden. Der Großteil dieser Komponenten ist als Zucker- oder Aminosäure-Konjugate in den Vakuolen der Exokarp-Zellvakuolen

eingelagert und nur teilweise als freie flüchtige Stoffe vorhanden [4]. Aus den Konjugaten können die gebundenen Aromen durch den Einsatz von Glycosidasen und Peptidasen entweder während dem Mahlen und Pressen der Trauben oder der Gärung freigesetzt werden, wobei die Menge an wahrnehmbaren Stoffen im fertigen Wein erhöht wird [4, 56]. Zu den sortentypischen Aromen von Trauben zählen u.a. Terpene, Norisoprenoide und Pyrazine.

Sekundäre Aromen entstehen hauptsächlich als (Neben-)Produkte bei der Gärung durch Hefen und Milchsäurebakterien und weisen die höchsten Konzentrationen auf. Dazu zählen Ethanol, Fuselöle (aliphatische Alkohole, Ether, Säuren, Aldehyde, etc.) und Ester [4, 57]. In Abhängigkeit der Gärbedingungen und der verwendeten Hefe variieren auch hier die Konzentrationen dieser Komponenten stark [4].

Tertiäre Aromen entstehen während der Lagerung und Reifung von Wein. Der Verlust des von trauben- und gärungsabgeleiteten Charakters von jungem Wein wird durch die Entwicklung eines Altersbouquets ersetzt. Die Lagerbedingungen (Fass, Flasche, Temperatur, etc.) haben einen entscheidenden Einfluss auf das Aromaprofil von reifem, gelagertem Wein [4].

Im nachfolgenden Abschnitt wird genauer auf relevante Aroma-Stoffgruppen, zu denen u.a. die Terpene im Wein zählen, eingegangen.

2.1.4 Terpene

Den terpenoiden Verbindungen im Wein kommt beim Aroma eine zentrale Rolle zu, sie sind sortentypisch für eine Rebsorte. Terpene entstehen durch Polymerisation von Isoprenen und gehören, zu den Primäraromen. Sensorisch relevant sind Terpene für das süßlich-blumige Aroma von aromatischen Wein- bzw. Rebsorten mit höherem Terpengehalt, wie Muskateller, Gewürztraminer und Morio Muskat [32].

Chemisch betrachtet werden Terpene aufgrund ihres unverwechselbaren Kohlenstoffgerüsts gruppiert (s. Abb. 4). Dieses Grundgerüst der Terpene besteht aus einer C₅-Isopren-Einheit (2-Methyl-1,3-butadien). Terpene bestehen im Allgemeinen aus zwei, drei, vier oder sechs Isopren-Einheiten. Diese werden entsprechend als Monoterpene, Sesquiterpene, Diterpene und Triterpene bezeichnet [44].

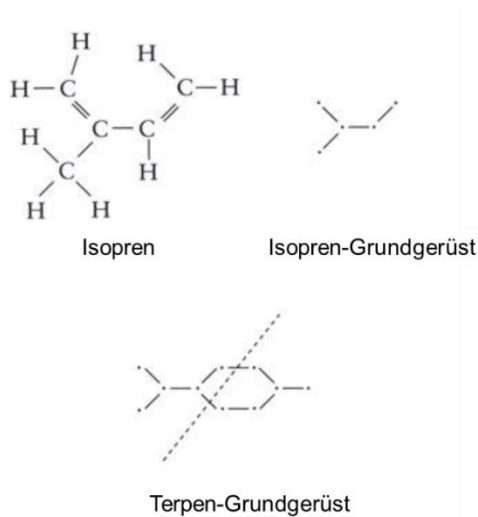


Abb. 4 Grundgerüst der Isoprene und Terpene [44]

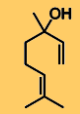
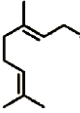
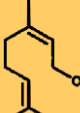
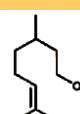
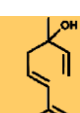
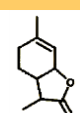
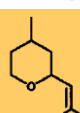
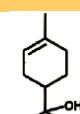
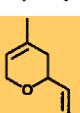
Terpene können eine Vielzahl von funktionellen Gruppen besitzen. Dabei besitzen viele wichtige Terpene Hydroxyl-Gruppen, sodass diese zu den Terpenalkoholen zählen. Terpenoxide sind Terpene mit einer sauerstoffenthaltenden Ringstruktur, sowie der Isoprenoid-Grundstruktur und enthalten als solche eine zyklische Ether-Bindung (C-O-C).

Anders als viele der aromatischen Bestandteile des Weins, stammen Terpene hauptsächlich aus den Trauben [58]. Sie sind größtenteils in der Trauben-Haut lokalisiert, wo diese in Plastiden synthetisiert werden [44].

2.1.4.1 Monoterpene

Bisher wurden über 70 Monoterpenkomponenten im Wein identifiziert, wobei Linalool, Geraniol, Nerol, α -Terpineol und Citronellol die dominierenden Monoterpenverbindungen sind [59]. In Tab. 2 sind nachfolgend bedeutende Monoterpene und deren sensorische Eigenschaften zusammengestellt.

Tab. 2 Strukturen, Geruchseigenschaften und Geruchsschwellenwerte einiger wichtiger Monoterpene in Wein [55, 60]

Aromastoff	Struktur	Geruchseigenschaft	Geruchsschwellenwert ($\mu\text{g/l}$)
Linalool		blumiger Duft mit leichten Akzenten von Gewürz und Zitrone	15
Geraniol		feiner Rosenduft, leicht süß	30
Nerol		frischer, leicht pflaumiger, rosiger Duft mit betonten Citrusakzenten	400
Citronellol		kraftvoller, etwas wachsig wirkender Rosenduft	15
Hotrienol		blumig-süßer Duft	110
Weinlacton		süßlicher, kokosnussartiger Duft	0,01
cis-Rosenoxid		durchdringend grüner, grasartiger Stängelduft; erinnert an Rose und Geranium	0,2
α -Terpineol		blumig-süßer, an Flieder erinnernder Duft mit leichtem Fichtennadeleinschlag	400
Neroloxid		würzig-grüne, leicht blumige Geraniumnote	110

Betrachtet man Trauben, können drei Kategorien von Monoterpenen unterschieden werden, wobei einige Zusammenhänge zwischen diesen Kategorien bestehen [8].

Eine Gruppe stellt **freie Aromakomponenten** dar. In der Regel handelt es sich dabei meist um Linalool, Geraniol, Nerol sowie die Pyran- und Furan-Formen der Linalool-Oxide. Dazu kommen abhängig von Saft- bzw. Most-Behandlung und externen Faktoren, wie z.B. Klima, einige zusätzliche Monoterpene, wie Citronellol, Hotrienol, α -Terpineol, Myrecenol sowie einige weitere Aldehyde, Oxide und Kohlenwasserstoffe. Im Wein wurden neben den freien Aromakomponenten außerdem verschiedene Monoterpen-Ethyl-Ester und -Acetate gefunden.

Polyhydroxylierte Formen der Monoterpene oder die freien geruchlosen Polyole bilden eine zweite Gruppe. Eine Besonderheit bei diesen Polyolen ist, dass sie keinen

direkten Einfluss auf das Aroma haben. Allerdings sind einige sehr reaktiv, können relativ leicht aufbrechen und so angenehme sowie wirksame flüchtige Stoffe freisetzen. So kann z.B. Diendiol zu Hotrienol und Neroloxid abgebaut werden [61].

Bei der Klassifizierung sind drittens noch die **glykosidisch konjugierten Formen** der Monoterpene zu nennen. Diese haben ebenfalls keinen direkten Einfluss auf das Aroma der Trauben bzw. des Weins. Allerdings können diese Verbindungen als Aroma-Präkursoren fungieren und durch gezielte Freisetzung das sortentypische Aroma eines Weins verstärken [5, 8, 62, 63]. Glykosidisch gebundene Monoterpene sind dabei häufiger anzutreffen als freie Monoterpene [7, 64] und Polyole [59]. In Trauben sind etwa 90 % der Terpene als Glykoside präsent [65], sodass man im Fall der glykosidisch gebundenen Monoterpene von einer Aroma-Reserve bzw. einem Aroma-Reservoir sprechen kann.

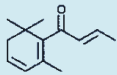
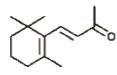
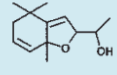
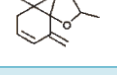
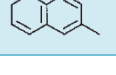
2.1.4.2 C₁₃-Norisoprenoide

Carotinoide werden als Präkursoren der C₁₃-Norisoprenoide angesehen, wobei die Carotinoid-Konzentration der Carotinoide in Trauben abhängig von der Sorte, sowie der Beerenreife ist [66]. C₁₃-Norisoprenoide sind eine sehr heterogene Gruppe von Naturstoffen und werden vermutlich durch eine oxidative Spaltung der Carotinoid-Moleküle zwischen den C₉- und C₁₀-Positionen erzeugt, wodurch Norisoprenoide mit 13 Kohlenstoffatomen entstehen. Obwohl andere Norisoprenoide mit 9 bis 20 Kohlenstoffatomen in der Natur vorkommen, sind für Wein lediglich die C₁₃-Norisoprenoide von Bedeutung. Vergleichbar mit den Monoterpenen, kommt der Großteil der C₁₃-Norisoprenoide als Glykoside gebunden vor [64]. Berger (2007) postulierte nach Skouroumounis et al. (2002), dass die C₁₃-Norisoprenoide nur monoglykosidisch gebunden vorliegen [32, 67]. Ein genauerer Blick in die angegebene Literaturstelle zeigt allerdings, dass keine Angaben zum Vorkommen dieser Glykoside gemacht wurden. Es wurde lediglich die Bildung von β -Damascenon aus Glykosiden und seine Umwandlung beschrieben. Günata et al. (2002) hingegen gehen auf das Vorkommen der C₁₃-Norisoprenoiden in den Trauben bzw. den Blättern der Reben ein [68]. Danach sollen in den Blättern der Rebe wahrscheinlich mehr Mono- als Diglykoside vorliegen, in den Trauben jedoch das Verhältnis von Mono- zu Diglykosiden ausgeglichener sein. Dies wurde hauptsächlich für das C₁₃-Norisoprenoid Megastigmane-3,9-diol festgestellt [68]. Daher ist auch hier, analog zu den Terpenen, davon auszugehen, dass die betreffenden C₁₃-Norisoprenoide

sowohl mono- als auch diglykosidisch gebunden vorliegen, Diglykoside jedoch wahrscheinlich überwiegen.

Betrachtet man das Aroma der C₁₃-Norisoprenoide, dann liefern säurekatalysierte Umlagerungen im Wein sehr potente Aromastoffe, wie z.B. (*E*)- β -Damascenon [32]. (*E*)- β -Damascenon hat eine äußerst niedrige Geschmacksschwelle (50 ng/l in einem Modell-Wein [69]), wobei niedrige Konzentrationen eher als zitronenmelissenartig beschrieben werden, eine 100-fach höhere Konzentration hingegen eine Apfel-, Rosen- und Honig-Note verursachen [70]. In Tab. 3 sind die Strukturen der wichtigsten C₁₃-Norisoprenoide und deren sensorischen Eigenschaften zusammengestellt.

Tab. 3 Strukturen, Geruchseigenschaften und Geruchsschwellenwerte einiger wichtiger C₁₃-Norisoprenoide im Wein [55, 60]

Aromastoff	Struktur	Geruchseigenschaft	Geruchsschwellenwert [μ g/l]
(<i>E</i>)- β -Damascenon		süß, blumig	50
β -Ionon		süß, blumig	800
Actinidol		campherartig	-
Vitispiran		harzig, balsamisch	800
TDN		kerosinartig	20

Die Terpene Vitispiran, Riesling-Acetal oder 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalen (TDN) gehören ebenfalls zur Gruppe der C₁₃-Norisoprenoide. Sie werden durch Abbau der Carotenoide Antheraxanthin, Violaxanthin, Neoxantin und anschließender Enzym- sowie Säure-katalysierter Umlagerungen gebildet [55]. Diese Stoffe werden mit dem Alterungsgeschmack bei Riesling in Verbindung gebracht. Dieser Alterungsgeschmack wird als petroleum-, kerosin-, dieselartig oder im deutschen Sprachgebrauch als *Firne* beschrieben [71]. In jungen Weinen ist TDN i.d.R. nicht vorhanden, kann sich dann allerdings bei gealtertem Wein bis 200 μ g/l entwickeln. Der Geschmacksschwellenwert dieser Verbindung liegt bei 20 μ g/l [32, 72].

2.1.5 Terpen-Glykoside und andere glykosidisch gebundene Stoffe

Die ersten glykosidisch gebundenen Aromastoffe wurden 1969 in Rosen identifiziert [73] und 1974 ihre Anwesenheit dann zum ersten Mal in Trauben vermutet [74]. Diese Vermutung konnte erst 1982 bestätigt werden [75]. Noble et al. (1987) beobachteten, dass Glykoside in terpenhaltigen Trauben und Weinen "eine wichtige Reserve der potenziellen Weinaromen" darstellen [76]. Außerdem entdeckten Park et al. (1991), dass ca. 90 % der Monoterpene glykosyliert bzw. in gebundener Form in Trauben der Sorte „Muscat d’Alexandrie“ vorkommen [77].

Monoterpene spielen in einigen aromatischen Rebsorten eine Hauptrolle und ein Großteil dieser Komponenten kommt glykosidisch gebunden vor [7, 75, 78]. Die meisten Rebsorten enthalten freie und gebundene Glykosid-Terpene, wobei die Konzentrationen in den sogenannten Aroma-Sorten höher sind. Daher bietet die enzymatische Hydrolyse der Glykoside eine interessante Möglichkeit um Aroma im Wein freizusetzen.

Die Aromastoff-Zusammensetzung variiert signifikant zwischen den verschiedenen Rebsorten [5]. Dabei ist eine große Anzahl an Aroma-Komponenten in den meisten Pflanzengeweben glykosyliert oder als nicht-flüchtige und geschmacklose Glykokonjugate akkumuliert [79–81]. Die meisten Norisoprenoide in Früchten, einige sind Präkursoren wichtiger Aromastoffe, sowie zahlreiche Terpene wurden in ihrer glykosidischen Form nachgewiesen. Insbesondere Terpene besitzen geringe Aromaschwellenwerte. In Verbindung mit den sensorischen Eigenschaften der Aglyka sind glykosidische Verbindungen eine wichtige potentielle Quelle für Aroma während der Fruchtsaft-Verarbeitung und der Weinherstellung [82] und können insbesondere bei Wein zu einem blumigen Aroma beitragen [8]. Diese Aroma-Präkursoren können durch Säuren [7] oder Enzyme [61, 62] hydrolysiert werden. Besonders Muskateller-Trauben weisen einen hohen Anteil an Terpenen auf [83].

Chemisch betrachtet geht mit einer Glykosylierung eine höhere Wasserlöslichkeit und geringere chemische Reaktivität einher, was eine bessere Speichermöglichkeit bzw. Transportmöglichkeit für die Pflanzen bedeutet. Das häufige Auftreten von glykosylierten sekundären Metaboliten zeigt, dass sowohl Glykosid-Hydrolasen als auch Glykosid-Transferasen verantwortlich für deren Metabolismus sind und eine zentrale Rolle in vielen biologischen Prozessen spielen. Die O-Glykosid-Hydrolasen (EC 3.2.1.x) sind eine große Enzym-Gruppe mit biologischer, biomedizinischer und industrieller Bedeutung [11].

Der Großteil der Monoterpene ist an Disaccharid-Reste gekoppelt und nur Spuren an einen einzigen Glucose-Rest [75, 84]. Hauptsächlich kommen Arabinofuranosyl-Glykoside von Geraniol, Nerol und Linalool vor [12, 75]. Bei den Glykosiden wurden u.a. als Zucker-Reste 6-O- α -L-Rhamnopyranosyl- β -D-Glucopyranosid, 6-O- α -L-Arabinofuranosyl- β -D-Glucopyranosid, 6-O- β -L-Arabinofuranosyl- β -D-Glucopyranosid oder lediglich β -D-Glucose identifiziert [7, 75, 85]. Die bisher identifizierten Glykoside von Aroma-Komponenten zeigen eine direkte Verbindung des Aromastoffes zum β -D-Glucose-Rest (s. Abb. 5), was das Enzym β -Glucosidase als zentrales Enzym bei der enzymatischen Hydrolyse der Wein-Glykoside prädestiniert [81].

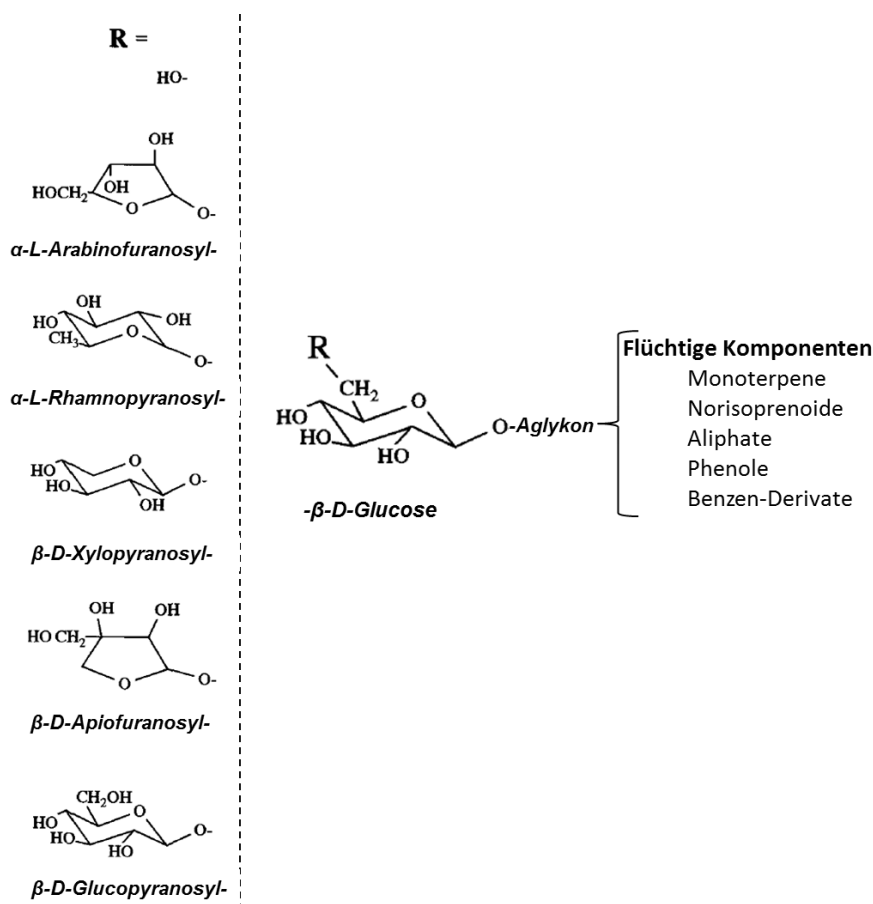


Abb. 5 Mono- und Disaccharid-Zuckerreste, die als Aroma-Präkursoren in Trauben identifiziert wurden (modifiziert nach [86])

Bei den Aglyka kommen überwiegend Terpenole und terpenhaltige Polyole vor [87, 88]. Ebenso wurden Linalool-Oxide und Terpendiole/-thiole gefunden. Des Weiteren können andere Aroma-Präkursoren, wie lineare oder cyclische Alkohole (z.B. Hexanol, Phenylethanol, Benzylalkohol), C₁₃-Norisoprenoide, Phenolsäuren und vermutlich flüchtige Phenole, wie Vanillin, vorkommen [8, 89].

Die Verteilung von freien und glykosidisch gebundenen Formen innerhalb der Traubenbeere ist nicht einheitlich [90]. In der Beerenhaut sind mehr als die Hälfte der flüchtigen Komponenten lokalisiert [91]. Eine direkte Analyse der Glykoside hat u.a. ergeben, dass die meisten Glykoside in Traubenbeeren als Diglykoside vorliegen [78]. Aglyka zeigen eine große Vielfalt, mehr als 200 Aglyka in 150 unterschiedlichen Pflanzengewebe sind bisher bekannt [79, 81, 92], wobei nicht alle durch Freisetzung direkt ein Aromastoff sind. Als wichtige Vertreter der Aglyka, die direkt freigesetzt werden können, sind z.B. Linalool und Geraniol zu nennen. Andere Aglyka unterliegen einem speziellen Metabolismus hin zu potenten Aromastoffen, so z.B. β -Damascenon, welches durch weitere enzymatische und/oder chemische Umwandlung entsteht [72]. Betrachtet man nur die Glykoside der aromareichsten Aglyka, kommen am häufigsten Apiosyl-Glykoside (bis zu 50 %, abhängig von der Rebsorte), gefolgt von Rutinosiden (6 bis 13 %) und weiteren Glykosiden (4 bis 9 %) vor. Vorliegende Untersuchungen deuten darauf hin, dass nicht alle Glykoside in jeder Sorten enthalten sind und die Verhältnisse ebenfalls sortenabhängig differieren [8, 93].

Hieraus resultiert die Frage, warum Aromastoffe überhaupt glykosidisch gebunden in Pflanzen vorliegen? Da glykosidisch gebundene Stoffe nicht flüchtig sind, sind diese entsprechend gut als Speicher- bzw. Transportstoffe geeignet. Ebenfalls ist zu vermuten, dass die gebildeten Aromastoffe erst zum Ort der Wirkung transportiert werden und dann dort aromatisch wirksam sind bzw. sein sollen. Als Beispiel für die Funktion der Aglyka in Pflanzen ist da das Anlocken von Insekten, z.B. Bienen, zu geöffneten Blüten zu nennen [81]. Weitere Annahmen sind, dass die Glykoside der Pflanze als Aroma-Reserve und zur Entgiftung dienen [94]. Die Pflanzenzell-Vakuolen fungieren dabei als Metabolit-Reserven und sind somit integraler Bestandteil der Entgiftung [95]. Glykoside, die in den Vakuolen der Zellen identifiziert wurden, konnten diese Theorien bestätigen [96–98]. Außerdem mangelt es Traubenbeeren an Strukturen zum Speichern von kleinen lipophilen Molekülen [56]. Entsprechend treten in Trauben höhere Konzentrationen an Glykosiden im Verhältnis zu den flüchtigen Aroma-Gegenständen auf [77, 99]. Typischerweise zeigen viele Aglyka eine geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen. Die Addition einer Zuckereinheit erhöht die Löslichkeit dieser Verbindungen, verhindert die Diffusion durch Zellmembranen, und stellt somit eine bequeme Lagerungsform dar [100].

Des Weiteren ist zu beachten, dass die aktivsten Aromastoffe lipophil sind. Jedoch können hohe lokale Konzentrationen lipophiler Moleküle toxisch für eine Pflanze sein,

beispielsweise durch Aufbrechen der Zellmembranen [101]. Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass die Pflanzen flüchtige Geschmackskomponenten als Entgiftungsstrategie glykosylieren [102]. Weiterhin scheint die Glykosylierung nukleophile Aglyka zu stabilisieren und somit ihre Reaktivität mit anderen zellulären Strukturen (durch Elektronenübertragungsreaktionen) zu verhindern [103]. Außerdem soll eine verbesserte Wasserlöslichkeit der kleinen lipophilen Verbindungen durch die Glykosylierung, eine Diffusion in den Tonoplast verhindern und somit ihre Fähigkeit hemmen, sich außerhalb der Vakuole zu bewegen [104]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Bewegung der Glykoside aus der Zelle begrenzt oder zumindest stark reguliert wird.

2.1.5.1 Weitere glykosidische Verbindungen im Wein

Neben den glykosidisch gebundenen Aromastoffen gibt es ebenfalls andere Gruppen glykosidisch gebundener Verbindungen im Wein. Interessant sind besonders Phenole. Phenole bzw. Polyphenole werden mit positiven Gesundheitseffekten in Verbindung gebracht, wobei lediglich die deglykolisierten Formen einiger glykosidischen Verbindungen vorteilhafter sind [105, 106]. Polyphenole zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen, die an der oxidativen Bräunung von Mosten und Weinen weißer Rebsorten beteiligt sind [107] und beeinflussen folglich die sensorischen Eigenschaften, speziell Farbe und Geschmack eines Weins [108]. Zu den Polyphenolen gehören u.a. Phenolcarbonsäuren, Flavone, Anthocyane und Catechine [42]. In der Traube sind die Polyphenole unterschiedlich verteilt. Im Traubenkern sind ca. 60 % der Polyphenole vertreten, größtenteils als Proanthocyanidine, Catechine, sowie als deren Oligo- und Polymere. Der Traubenkern wird von einer Lipidschicht umschlossen, was eine Extraktion der Polyphenole während der Mazeration verhindert. In der Traubenhaut sind nochmal 30 % der extrahierbaren Polyphenole enthalten, hauptsächlich Anthocyane und Resveratrol [109]. Letzteres zählt u.a. als Radikalfänger zu den anerkannten Antioxidantien. Generell werden den Polyphenolen positive gesundheitliche Effekte wie krebsvorbeugende Eigenschaften zugesprochen [110–112].

Alonso et al. (1986) konnten in Rot- und Weißweinen sechs Flavanol-Glykoside nachweisen [113]. In spanischen Weinen wurde dabei vermehrt ein Quercetin-3-O-Glucosid nachgewiesen [113]. Quercetin hat von allen in der Literatur beschriebenen Polyphenolen das stärkste antioxidative Potential [114]. Daneben können auch andere

Polyphenole glykosidisch gebunden vorliegen und so, neben den aromarelevanten Terpenen, durch eine β -Glucosidase-Aktivität freigesetzt werden.

Anthocyane, verantwortlich für die Farbe im Wein, wurden in jungen Weinen in ihrer glykosidischen Form vorgefunden. Allerdings ist nicht klar, welchen Effekt die Anthocyan-Deglykosylierung auf die Farbe und Stabilität während der Alterung und Reifung des Weins hat [115]. Einige Studien zu Fruchtsäften [116] und sizilianischen Blutorangen [117] zeigen, dass ein deutlicher Abbau der Anthocyane mit steigender Glucosidase-Aktivität festzustellen war. Allerdings zeigten Wightman und Wrolstad (1996), dass es zu keinem Verlust an Pigmentierung kommt [118], daher empfiehlt sich bei der kommerziellen Fruchtsaftherstellung der Einsatz von Enzympräparaten mit β -Glucosidase-Aktivität.

2.1.6 Hydrolyse der Glykoside

Monoterpene spielen, wie bereits erwähnt, in einigen aromatischen Rebsorten eine Hauptrolle, wobei der größte Teil dieser Komponenten glykosidisch gebunden ist [7, 75, 78]. Daher bietet die enzymatische Hydrolyse der Glykoside eine interessante Möglichkeit Aroma im Wein freizusetzen. Dieser Mechanismus ist bereits bekannt und hat sich in der Winzertechnik etabliert. Zur Hydrolyse der Präkursoren wird allerdings nicht nur eine β -Glucosidase-Aktivität benötigt, sondern, da es sich um einen sequentiellen Mechanismus handelt, vorgeschaltete Enzyme, wie Arabinosidase, Rhamnosidase, Xylosidase oder Apiosidase [12].

Die Traubenglykoside können ebenfalls durch **Säurehydrolyse** gebundene Monoterpene freisetzen und so das Aroma des Traubensaftes verbessern bzw. erhöhen [75]. Allerdings kann eine Säurehydrolyse in Verbindung mit der Erhitzung zu einer Umgruppierung der Monoterpen-Aglyka führen [80, 119]. Als Alternative gibt es enzymatische Methoden, hierdurch können mittels minimaler Änderungen der natürlichen Monoterpen-Verbindungen die Konzentration an freien Aromastoffen im Traubensaft erhöht werden [7].

Die Freisetzungsrates durch eine Säurehydrolyse hängt stark vom pH-Wert, der Temperatur des Mediums und der Struktur des Aglykon-Restes ab. So werden z.B. Glykoside von tertiären Alkoholen, wie Linalool/-oxide und α -Terpineol, im Vergleich zu solchen mit primären Alkohol Aglykon-Resten, wie Geraniol oder Nerol, leichter hydrolysiert [7]. Am Beispiel Muskateller-Wein zeigten Park und Noble (1993), dass

nach 2 Jahren Lagerung bei 10 °C mehr als die Hälfte der Geraniol-Glykoside noch vorhanden waren, wohingegen die Linalool-Glykoside vollständig hydrolysiert waren [120].

Eine **enzymatische Hydrolyse** der Trauben Monoterpen-Diglykoside findet in zwei Schritten statt. Zunächst wird die Inter-Zucker-Verbindung durch das entsprechende Enzym, z.B. eine α -L-Arabinofuranosidase oder α -L-Rhamnopyranosidase, ungeachtet der Struktur des Aglykon-Restes gespalten und das korrespondierende Monoterpenyl- β -D-Glykosid freigesetzt. Die Freisetzung des Aglykon-Restes kann nur während dem zweiten Schritt stattfinden, da erst jetzt die β -Glucosidase gegenüber dem zuvor entstandenen Monoterpen- β -D-Glykosid angreifen kann [12]. Abb. 6 zeigt den sequentiellen Mechanismus der Glycosidasen.

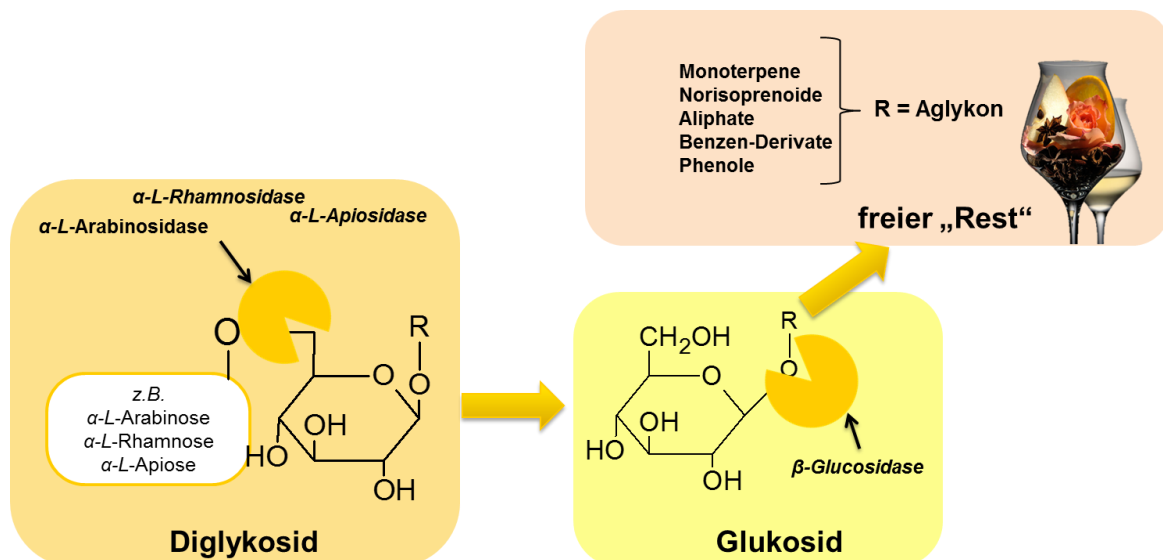


Abb. 6 Sequentieller Mechanismus der Glycosidasen (eigene Darstellung nach [19])

Glucosidasen befinden sich auch in der Beerenhaut der Trauben. Allerdings lässt die schwache bzw. geringe Aktivität dieser β -Glucosidasen darauf schließen, dass diese nicht zur enzymatischen Freisetzung der Aromastoffe aus den Präkursoren beitragen. Ähnliches gilt für andere β -Glucosidasen z.B. aus Mandeln [121].

Neben dem sequentiellen Mechanismus wurde des Weiteren eine Endoglucosidase (nicht weiter klassifiziert) aus der Haut der Trauben entdeckt, die fähig war die heterosidische Bindung von Disaccharide-Glykosiden zu Disaccharid und Aglykon zu spalten und so das Aglykon direkt freizusetzen [122]. Allerdings ist die spezielle Glycosidase nur in einem pH-Bereich von 4 bis 8 stabil und somit für den Einsatz in Wein eher ungeeignet.

2.1.7 Wein-Fehler

Es gibt zahlreiche, durch chemische, physikalische Vorgänge oder Kontamination verursachte, Fehler im Wein. Einige Hauptfehler sind Farb-, Geruchs- und Geschmacksfehler sowie Weintrübungen [38]. Da in dieser Arbeit, Glycosidasen an Magnetit-Partikel immobilisiert und diese anschließend im Wein zur Aromaverbesserung eingesetzt werden sollen, werden lediglich Wein-Fehler betrachtet, die durch eine mögliche Migration von Eisen aus den zur Immobilisierung eingesetzten magnetischen Partikeln resultieren können.

Durch erhöhte Eisen-Konzentration können Farbfehler (schwarzer Bruch), Geschmacksfehler (Metallgeschmack) und Trübungen (weißer Bruch) auftreten. Eisen ist in der Regel in Most und Wein in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 20 mg/l vorhanden [123]. Normalerweise ist der Eisengehalt in Trauben niedrig, selbst wenn diese auf Böden mit hohem Eisengehalt gewachsen sind. Ohne Kontamination hat ein typischer Wein 1 bis 5 mg/l Eisen [123, 124]. Die wichtigste Kontaminationsquelle für Eisen im Wein ist der Kontakt mit eisenhaltigen Legierungen während des Herstellungsprozesses (Weinlese, Transport, Fermentation, Lagerung in Tanks usw.). Aus diesem Grund wird heutzutage hauptsächlich Edelstahl verwendet [124]. Eisen-Konzentrationen über 10 mg/l führen zu Trübungen und Farbveränderungen, welche eine nachteilige Beeinflussung der organoleptischen Eigenschaften von Wein haben. Daneben kann ein adstringierender Metallgeschmack auftreten [123].

Eisen ist in Spuren als Enzym-Aktivator, Stabilisator und als funktionelle Komponente von Proteinen wichtig für die metabolischen Aktivitäten während der Fermentation von Wein. Eisen-Konzentrationen von über 20 mg/l können die Gärung inhibieren. Die Zelloberfläche der Hefen ist netto negativ geladen, so dass exogene zweiwertige Kationen wie Eisen schnell und reversibel an diese binden können. Auf diese Art und Weise sollen 45 bis 75 % des Eisens im Most durch die Gärung (Adsorption an die Hefezellmembran) entfernt werden [125]. Ein Großteil des Eisens in Wein liegt als Fe^{2+} vor. Das Verhältnis von Fe^{3+} zu Fe^{2+} hängt vom Oxidationsgrad des Weins ab, Fe^{2+} dominiert bei geringen Sauerstoff-Gehalten [124].

Eisen besitzt in höheren Konzentrationen andere Eigenschaften als im Spurenbereich, wie Veränderung des Redox-Systems des Weinaromas durch Oxidation, Beeinflussung des sensorischen Charakters und Beteiligung an der Bildung von Komplexen mit Tanninen und Phosphaten mit dem Ergebnis einer größeren Instabilität

des Weins. Letzteres führt zur Trübung von Wein und später zu unerwünschten Ausfällungen [124, 126]. Bei diesen Metalltrübungen handelt es sich um komplexe Vorgänge. Lösliche Metalle, in diesem Fall Eisen, reagieren mit verschiedenen Weininhaltsstoffen und werden dadurch unlöslich, z.B. als Eisenphosphat oder auch in Verbindung mit Phenolen und Proteinen [126]. Es entsteht ein sogenannter weißer Bruch bzw. weiß-grauer Schleier und/oder ein blauer bzw. schwarzer Bruch im Wein. Eisen-III-Phosphat-Bruch, **weißer Bruch**, hängt von einigen Faktoren, wie Eisengehalt, pH, Redox-Potential, Phosphatgehalt und Konzentration an Weinsäure, ab. Diese Eisen-Instabilität, als Eisen-III-Phosphat-Bruch bzw. Niederschlag, tritt besonders häufig im pH-Bereich von 2,9 bis 3,6 auf [124]. Weißer Bruch entsteht, wenn das im Wein gelöste Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert und sich der weißlich-schleierige Eisen-III-Phosphat-Bruch abscheidet [38]. Seine Bildung kann bereits ab Eisen-Konzentrationen von mehr als 4 – 5 mg/l auftreten [126].

Beim **blauen oder schwarzen Bruch** reagieren phenolische Substanzen mit Fe^{3+} und es bildet sich z.B. Eisentannat (blauer Bruch) [124]. Bei Luftkontakt kann sogar eine bläulich grüne bis blauschwarze Trübung entstehen (schwarzer Bruch). Eine Eisentrübung tritt normalerweise bei Zutritt von Luftsauerstoff auf. Diese Trübung kann durch Erwärmung, Schwefelung und Zugabe von Ascorbinsäure aufgelöst werden [126].

Eisen kann ebenfalls Komplexe mit verschiedenen organischen Säuren in Wein bilden, welche dieses in einer Folgereaktion mit Phosphat unwirksam machen. Citronensäure als Tricarbonsäure hat beispielsweise eine starke Affinität zu Eisen. Dementsprechend fügen einige Winzer bei einem Eisengehalt von über 5 mg/l dem Wein Citronensäure mit Konzentrationen von 12 bis 24 g/hl zu, um so den Eisengehalt wieder zu senken [124].

Ein weiteres Problem bei erhöhten Eisen-Konzentrationen ist die verstärkte Oxidationsgefahr. Einige Komponenten wie Anthocyane, Tannine, Phenole und Acetaldehyde sind besonders oxidationsanfällig. Zwischen der Eisen-Konzentration und Oxidationsanfälligkeit besteht ein direkter Zusammenhang [127].

Von der OIV sind verschiedene Verfahren zur Reduktion von Eisen im Wein zugelassen, wie die Zugabe von Tannin, Calciumphytat, die Verwendung von Kaliumhexacyanoferrat und der bereits erwähnte Zusatz von Citronensäure [128].

Eine mögliche Eisenmigration durch Magnetit-Partikel im Wein ist als Risiko für mögliche Qualitätseinbußen zu berücksichtigen. Es gibt zwar keine gesetzlichen

Grenzwerte für Eisen in Wein, allerdings könnte es in Folge des Magnetit-Partikel-Einsatzes zu erhöhten Eisenwerten im Wein kommen und den damit beschriebenen möglichen Wein-Fehlern. Daher müssen im Rahmen der Arbeit auch mögliche Änderungen des Eisengehalts im Wein untersucht werden.

2.1.8 Wirtschaft und Gesamt-Prozess

2014 wurden weltweit 270 Millionen hl Wein produziert, wobei 9,2 Millionen hl auf Deutschland entfielen [129]. Der Anteil der Weißwein-Produktion lag 2014 in Deutschland bei 5,8 Millionen hl [130]. Die bewirtschafteten Rebflächen der Winzer gliederte sich dabei 2013 wie folgt: 21,8 % der Winzer bewirtschafteten eine Rebfläche kleiner 5 ha, 22,2 % von 5 – 10 ha, 29,1 % von 10 – 20 ha und 26,9 % eine Rebfläche größer 20 ha [131]. Die Aufteilung der Rebflächen pro Winzer zeigt, dass in Deutschland noch viele kleinere Betriebe existieren, die meist noch traditioneller Wein herstellen.

Dabei zeigt der Wein-Konsum von weltweit 240 Millionen hl (2014) und deutschlandweit von 20 Millionen hl (2014), dass Wein einen großen Markt darstellt und der Konsument oft aromareiche, florale Weine bevorzugt [1–4].

In Abb.7 ist eine Weißweinherstellung mit entsprechender Zugabe aromafreisetzender Enzyme schematisch dargestellt.

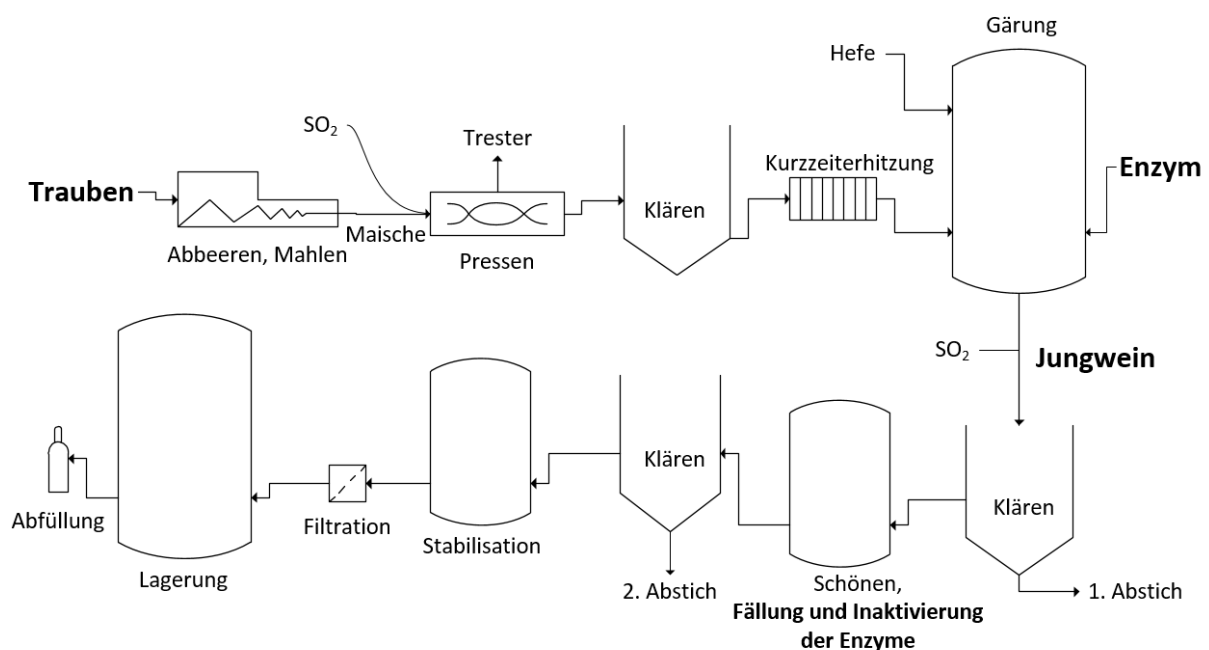


Abb. 7 Prozess-Schema Weißweinherstellung mit Enzymzugabe

Eine Zugabe aromafreisetzender Enzyme erfolgt dabei i.d.R. am Ende der Gärung, welche anschließend beim Schönen wieder, z.B. mit Betonit, ausgefällt und entfernt werden müssen.

Die Kosten zur Herstellung von Wein aus Most kann, in Abhängigkeit der Art des erzeugten Weins (z.B. jung-abgefüllter Wein, gereifter Wein, in Fässern gereifter Wein, etc.), variieren. Durchschnittlich betragen die Kosten zur Herstellung von 1 l Wein, verkauft in einer 0,75 l-Glasflasche, rund 0,5 bis 1,2 €/l [132].

Die Kosten für ein aromafreisetzendes Enzym (z.B. Rapidase Revelation Aroma) belaufen sich auf ca. 60 €/100g (exkl. MwSt.), was bei einem empfohlenen Einsatz von 2 bis 3 g/hl somit ca. 2,10 €/hl bzw. 2,1 Cent/l Mehrkosten für den Winzer bedeutet. Durch eine Behandlung des Weins mit aromafreisetzenden Enzymen kann jedoch die Konsumenten-Akzeptanz eines Weins erhöht werden und so eventuell ein höherer Preis erzielt werden.

2.2 Gesetze

In diesem Abschnitt sollen kurz die wichtigsten Gesetze zum Thema Wein und Enzymeinsatz dargestellt werden. Ebenfalls erwähnt werden Gesetze, welche die Verwendung von Chemikalien zur Immobilisierung von Enzymen betreffen.

2.2.1 Wein

Nach der Verordnung (EG) Nr. 491/2009 ist Wein ein Erzeugnis, das ausschließlich durch vollständige oder teilweise alkoholische Gärung der frischen, auch eingemaischten Weintrauben (*Vitis vinifera*) oder des Traubenmostes gewonnen wird. Die Trauben müssen neben ausreichendem Gehalt an Zucker, ebenfalls einen ausreichenden Gehalt an Fruchtsäuren aufweisen. Der Begriff „Wein“ ist dem Erzeugnis aus Trauben vorbehalten. Für Obst-, Beeren- oder Fruchtweine muss entsprechend das Ausgangsmaterial vorgeschrieben werden.

Weiterhin ist Wein charakterisiert über den Alkoholgehalt, der je nach Anbauzone mindestens zwischen 8,5 und 9 Vol.-% liegen soll und bei maximal 15 Vol.-% bzw. in Ausnahmefällen auch 20 Vol.-% aufweisen darf. Außerdem muss Wein einen als Weinsäure berechneten Gesamtsäuregehalt von mindestens 3,5 g/l aufweisen.

Nach der Verordnung (EG) Nr. 607/2009 Anhang XIV Teil B und der Weinverordnung § 41 sind folgende Geschmacksangaben bzw. Restzuckergehalt definiert:

- **trocken** wenn der Zuckergehalt folgende Werte nicht überschreitet:
 - 4 g je Liter oder
 - 9 g je Liter, sofern der in g je Liter Weinsäure ausgedrückte Gesamtsäuregehalt höchstens um 2 g je Liter niedriger ist als der Restzuckergehalt.
- **halbtrocken** wenn der Zuckergehalt den vorgenannten Höchstwert überschreitet, folgende Werte aber nicht überschreitet:
 - 12 g je Liter oder
 - 18 g je Liter, sofern der in g je Liter Weinsäure ausgedrückte Gesamtsäuregehalt höchstens um 10 g je Liter niedriger ist als der Restzuckergehalt.
- **lieblich** wenn der Zuckergehalt den vorgenannten Höchstwert überschreitet, aber nicht mehr als 45 g je Liter beträgt.
- **süß** wenn der Zuckergehalt mindestens 45 g je Liter beträgt.

Tab. 4 zeigt die zulässigen Höchstwerte für Schwefeldioxid in Wein.

**Tab. 4 Zulässige Höchstwerte für Schwefeldioxid in Wein nach Verordnung (EG) Nr. 606/2009
Anhang I B**

Art des Weins	EG-Höchstgrenze SO₂-Gehalt
Rotwein < 5 g/l Restzucker	150 mg/l (bis 31. Juli 2009: 160 mg/l)
Rotwein > 5 g/l Restzucker	200 mg/l (bis 31. Juli 2009: 210 mg/l)
Weißwein & Roséwein < 5 g/l Restzucker	200 mg/l (bis 31. Juli 2009: 210 mg/l)
Weißwein & Roséwein > 5 g/l Restzucker	250 mg/l (bis 31. Juli 2009: 260 mg/l)
Spätlese und vergleichbare ausländische Weine	300 mg/l
Auslese und vergleichbare ausländische Weine	350 mg/l
Beerenauslese und Trockenbeerenauslese, Eiswein und vergleichbare ausländische Weine	400 mg/l

Zur Schwefelung zugelassen ist die Verwendung von Schwefeldioxid oder Kaliummetabisulfit, auch Kaliumdisulfit oder Kaliumpyrosulfit genannt.

2.2.2 Enzyme in der Weinbereitung

Nach Verordnung (EG) Nr. 1493/99 (Anh. IV, Nr. 1j) waren pektolytische Enzyme, pektolytische Enzyme (Lysozym, Urease) mit β -glykosidischer Nebenaktivität und β -Glucanasen bei der Weinherstellung zugelassen. Seit Januar 2009 ist die Verwendung von Enzymen in Lebensmitteln europaweit einheitlich durch eine Positiv-Liste geregelt (Verordnung (EG) Nr. 1332/2008).

Mit der Verordnung (EG) Nr. 53/2011 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 606/2009 zu önologischen Verfahren kam es zu Ergänzungen bzw. Änderungen einiger önologischer Verfahren. Das betrifft auch die Verwendung von önologischen enzymatischen Zubereitungen:

- zur Mazeration
- zur Klärung
- zur Stabilisation
- zur Filtration
- zum Hervorheben von im Traubenmost und im Wein anwesenden aromatischen Vorverbindungen der Traube
- z.B. Pectinlyase, Pectin-Methyl-Esterase, Polygalacturonase, Hemicellulase, Cellulase, Betaglukanase und Glucosidase

Enzympräparate müssen den allgemeinen und speziellen Reinheits- und Identitätskriterien der JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) und FCC (Food Chemical Codex) für Lebensmittelenzyme bzw. laut Verordnung (EG) Nr. 606/2009 den von der OIV veröffentlichten Reinheits- und Identitätskriterien des Internationalen Weinkodex entsprechen (RESOLUTION OIV-OENO 485-2012). Damit ist die europäische Gesetzgebung mit der neuen Verordnung weniger restriktiv. So ließ z.B. die Verordnung (EG) 1493/1999 lediglich Pectinasen von *Aspergillus niger*, β -Glucanasen von *Trichoderma harzianum*, Urease von *Lactobacillus fermentum* und Lysozyme zu.

Pektinase-, Cellulase- und Glucosidase-Präparate sind gemäß dem internationalen Weinkodex der OIV ebenfalls zur Aromaverbesserung zugelassen. Damit wurde auf eine genaue Herkunft der Enzympräparate verzichtet, allerdings dürfen die Enzymquellen, wie bei allen Lebensmittel-Enzympräparaten [133], weder pathogen noch toxinerzeugend sein und müssen eine gute genetische Stabilität aufweisen. Darüber hinaus dürfen die Fermentationsmedien keine gesundheitsschädlichen Rückstände in den Enzympräparaten hinterlassen. Im Fall der Mikroorganismen ist eine Sicherheitsstudie durchzuführen, um zu gewährleisten, dass ein Enzympräparat, welches von einer bestimmten Mikroorganismenart produziert wurde, keinerlei Gesundheitsgefahren birgt [134]. Interessant ist der Abschnitt der RESOLUTION OIV-OENO 365-2009 über Trägerstoffe für Enzympräparate, dabei müssen im Falle von geträgerten bzw. immobilisierten Enzymen die verwendeten Trägerstoffe den Normen für Materialien mit Lebensmittelkontakt entsprechen. Für derartige Präparate muss die Konzentration an Trägerbestandteilen, die in den Most oder den Wein gelangen könnten, bestimmt und auf dem Etikett des Enzympräparates angegeben werden.

2.2.3 Technische Hilfsstoffe für eine Immobilisierung

Bei der Verwendung von Chemikalien zur Immobilisierung von Enzymen greift die Regelung nach der technischen Hilfsstoff-Verordnung (THV) [135]:

Nach der THV sind technische Hilfsstoffe für den Einsatz in der industriellen Verarbeitung und Herstellung von Lebensmitteln definierte Lebensmittelzusatzstoffe, die zugegeben werden um technische Prozesse zu erleichtern bzw. zu ermöglichen. Diese Stoffe dürfen im Endprodukt gar nicht oder nur in unvermeidbaren, möglichst geringen Rückständen vorhanden sein und dürfen keine Wirkung mehr im Endprodukt besitzen. Die technischen Hilfsstoffe müssen nicht deklariert werden, was sowohl den Einsatz als auch mögliche Rückstände betrifft, außer diese Rückstände erzielen

nachweislich eine Wirkung. In diesem Fall muss der Stoff als Lebensmittelzusatzstoff gekennzeichnet werden.

Obwohl die Verwendung der technischen Hilfsstoffe in der THV geregelt ist, wird dort allerdings nur die Verwendung von Bleich- und Extraktionsmitteln genauer beschrieben und es werden nur für die Extraktionsmittel tolerierte Rückstandshöchstmengen genau definiert bzw. festgelegt. Im Gegensatz zu den Lebensmittelzusatzstoffen, müssen technische Hilfsstoffe nicht zugelassen werden und bedürfen keiner Deklaration auf der Verpackung bzw. dem Endprodukt.

Daher sollte eine Immobilisierung (s. Enzymimmobilisierungshilfsstoffe in der THV) von Enzymen an magnetische Partikel ohne lebensmittelrechtliche Probleme realisierbar sein. Außerdem fallen die geträgerten Enzyme unter die THV, s. Enzympräparate und Enzymträger, da angestrebt wird, dass keinerlei Rückstände im Lebensmittel Wein verbleiben. Das zu entwickelnde Enzymsystem bedarf daher keiner Zulassung und muss später auch nicht deklariert werden.

2.3 Enzyme für den Einsatz im Wein

Enzyme sind hochmolekulare Proteine mit katalytischer Aktivität, sogenannte Biokatalysatoren, und werden von entsprechenden Zellen synthetisiert, d.h. sie beschleunigen Reaktionen ohne dabei selbst verbraucht zu werden [136, 137].

Für den Einsatz von Enzympräparaten in der Weinindustrie gibt es mehrere Gründe. Zum einen ermöglicht der Einsatz von pektolytischen Enzymen die Ausbeuteerhöhung beim Pressen. Daneben können Klär- und Filtrationsprobleme behoben werden. Des Weiteren können spezielle Enzympräparate das Geschmacksbild des Weins positiv beeinflussen [13].

Schwierigkeit beim Einsatz von „Aroma“-Enzymen im Most bzw. Wein stellt der hohe Zuckergehalt dar. Zu hoher Zuckergehalt hemmt die Wirkung des Enzyms. Daher ist eine Zugabe erst in der abklingenden Gärung oder nach dieser sinnvoll. Allerdings hat der Einsatz eines Enzympräparates zu Beginn der Gärung den Vorteil, dass freigesetzte Aromastoffe durch die intensive Gärung weiter zu „reifen“ Stoffen reagieren [16].

Van Rensburg und Pretorius erwähnten, dass zu den wichtigen Enzymen für die Weinbereitung u.a. Pektinasen, Proteinase, Glucosidasen und Glucose-Oxidase zählen [138]. Von diesen Enzymen sind die β -Glucosidasen mit die bedeutungsvollsten, da sie zu einem sortentypischen Wein-Aroma und -Geschmack beitragen. Die Verwendung verschiedener Quellen an β -Glucosidase-Enzymen wurde daher als mögliches Verfahren zur Verbesserung des Weingeschmacks vorgeschlagen.

Zahlreiche veröffentlichte Studien zeigen, dass der Einsatz von Enzympräparaten bzw. exogenen β -Glucosidasen einen Effekt auf die Aromastoffe im Wein hat bzw. diese steigern kann [18, 20, 25]. Tab. 5 zeigt eine mögliche Erhöhung der Terpen-Gehalte in Wein durch enzymatische Behandlung.

Tab. 5 Erhöhung ausgewählter Terpenegehalte vor und nach enzymatischer Behandlung [25]

Terpene	ohne Enzym [$\mu\text{g/l}$]	mit Enzym [$\mu\text{g/l}$]
Linalool	160	342
α -Terpineol	40	40
Citronellol	30	335
Nerol	12	75
Geraniol	80	190
Gesamt-Terpenegehalt	322	982

Im Großen und Ganzen kann man festhalten, dass durch den Enzymeinsatz, im Speziellen Monoterpene, Norisoprene und Benzenderivate, der aromarelevante Terpengehalt gesteigert werden kann. Dabei wurde bisher der höchste Anstieg bei den Monoterpenen Geraniol, Nerol, Linalool, Linalooloxid, bei den Norisoprenoiden 3-Hydroxy- β -Damascon, 3-oxo- α -Ionol, Vomifiol und bei den Benzenderivaten Benzylalkohol, 2-Phenylethanol, Tyrosol und Zingeron beobachtet [139, 140].

Besonders geeignet für den Einsatz von Enzympräparaten sind sogenannte terpenreiche Rebsorten, wie Muskateller, Morio Muskat oder Gewürztraminer [32]. Diese Rebsorten haben intensivere florale Aromen-Attribute, bei denen die Monoterpene weitgehend über den Wahrnehmungsschwellenwerten liegen [141, 142]. Bei anderen Rebsorten kann ebenfalls ein Anstieg der Monoterpen-Gehalte beobachtet werden, allerdings überschreiten diese Steigerungen meist nicht den Wahrnehmungsschwellenwert [18, 143]. Außerdem weisen enzymbehandelte Weine meist eine höhere Konzentration an Citronellol auf, also eine stärkere Citrus-Note. Ein Grund dafür ist die Hefe-Reduktionsaktivität von Geraniol und Nerol [11, 144].

Bei den Norisoprenoiden sieht dies etwas anders aus, denn hier unterscheiden sich die Gehalte mit und ohne Enzymbehandlung, innerhalb der Rebsorten kaum [141]. Bei der Erfassung der freigesetzten Aglyka besteht jedoch das Problem bei Norisoprenoiden, das kaum Standards kommerziell erhältlich sind und nur unvollständige GC/MS-Datenbanken angeboten werden. Daneben sind enzymatisch freigesetzte Norisoprenoide meist geruchslos. Einige können in geruchsaktive Komponenten, wie β -Damascon, Vitispiran oder Theaspiran, durch säurekatalytische Reaktionen (z.B. durch das saure Milieu im Wein) während Wein-Lagerung umgewandelt werden [72]. Hier könnte eine frühzeitige Freisetzung der Aglyka durch eine enzymatische Hydrolyse die Bildung von Geruchsstoffen in Weinen beschleunigen. Die meisten glykosylierten Aglyka sind wenig reaktiv, sodass eine saure Hydrolyse der Glykoside unter traditionellen Wein-Lagerbedingungen nur langsam erfolgt [120, 145].

Benzen-Derivate, die durch Enzymeinsatz freigesetzt werden, haben vermutlich aufgrund der hohen Aromaschwellenwerte dieser Substanzen kaum Einfluss auf das Aroma von Wein [18, 141].

Eine Enzymzugabe nach der Fermentation führt zur höchsten Steigerung an freien Terpenen bzw. Aromastoffen [143]. Die Verwendung solcher Enzyme in der Weinindustrie ist aufgrund des Traditionalismus der Winzer und des Einflusses

physikalisch-chemischer Eigenschaften von Traubenmost und Wein (pH, Temperatur, Ethanol, Zucker, Polyphenole, etc.) auf die Enzymaktivitäten begrenzt [13].

Von Fadenpilze stammende pektolytische Enzympräparate sind eine gute Möglichkeit, diese als exogene Glycosidasen-Quellen zu verwenden. Diese Präparate, die im Allgemeinen als sichere Mikroorganismen anerkannt sind, besitzen GRAS-Status (engl. generally recognized as safe) und werden seit 1970 in der Fruchtsaftherstellung und Weinbereitung vielfach verwendet, um u.a. die Saftklärung, Saftausbeute und Farbextraktion zu verbessern. Zusätzlich zu ihren Hauptaktivitäten, besitzen diese Enzympräparate auch andere Enzym-Nebenaktivitäten wie Glycosidasen, die im weintypischen pH, im Gegenteil zu solchen aus Pflanzen und Hefen, bemerkenswert stabil sind [18].

In Tab. 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzympräparate dargestellt.

Tab. 6 Verwendete Enzympräparate in dieser Arbeit

Enzympräparat	Einsatz
Rapidase Revelation Aroma, Fa. Oenobrand	2-3 g/hl, 2-10 Wochen
Lallzyme BETA, Fa. Lallemand	5 g/hl, 3 Wochen
Panzym Arome G, Fa. SIHA	4-5 g/hl, 10-15 Tage
VinoTaste Pro, Fa. Novozymes	6 g/hl
Natuzym Arom MG, Fa. Schliessmann Kellerei-Chemie	3-5 g/hl, 2-3 Wochen
Trenolin Bukett DF, Fa. Erbslöh	10 ml/hl
Novarom Blanc, Fa. Novozymes	5-10 g/hl, mind. 4 Wochen
Lafazym Arom, Fa. Laffort	3-5 g/hl, 3-5 Wochen
Everzym Arom, Fa. Ever Intec	1-3 g/hl
Zimarom, Fa. Vason Group	1-3 g/hl

Bei allen verwendeten Produkten handelt es sich um pektolytische Enzympräparate mit einer β -Glucosidase-Nebenaktivität mit dem Ziel einer Aromafreisetzung im Wein. Die Hersteller empfehlen dabei einen Zusatz der Enzyme i.d.R. am Ende der alkoholischen Gärung oder direkt im Jungwein mit einer Dosierung von 1 bis 10 g/hl und einer Einwirkzeit von 2 bis 10 Wochen. Während der Einwirkzeit wird eine Temperatur >15 °C empfohlen. Zur Inaktivierung und Fällung der Enzyme werden ca. 5 bis 10 g/hl Bentonit vorgeschlagen.

2.3.1 β -Glucosidasen

Glucosidasen sind in der Natur weit verbreitet und katalysieren effizient die Hydrolyse vieler verschiedener Glykoside und Oligosaccharide [146]. Die β -Glucosidase gehört zu den Hydrolasen mit der EC-Nr. 3.2.1.21. β -Glucosidase aus süßen Mandeln gehörte zu den ersten Enzymen, die näher untersucht wurden [147, 148]. β -Glucosidasen hydrolysieren Kohlenhydrate mit Aryl-, Amino- oder Alkyl- β -D-Glykoside-Resten, kurze Oligosaccharide und Disaccharide [149]. Die Aktivität solcher β -Glucosidasen unterscheidet sich stark in Abhängigkeit von der Herkunft [150–152]. β -Glucosidasen werden in allen Bereichen lebender Organismen gefunden und spielen eine entscheidende Rolle bei der Entfernung von nicht-reduzierenden, terminalen Glycosyl-Resten von Sacchariden und Glykosiden. Innerhalb der **Glykosid-Hydrolasen** sind sie von großer Bedeutung und Interesse.

β -Glucosidasen haben in verschiedenen Organismen zahlreiche Funktionen, unter anderem die Aufspaltung von Glykolipiden und exogenen Glykosiden in tierischen Organismen, Lignifikation in pflanzlichen Organismen [153], Abbau von Zellwand-Oligosacchariden [154], Phytohormon-Konjugat-Aktivierung [155], Freisetzung von aromatischen Verbindungen in Pflanzen sowie der Umwandlung von Biomasse durch Mikroorganismen. Diese Funktionen sind der Grund für viele landwirtschaftliche und industrielle Anwendungen, wie Umwandlung von Biomasse oder Aromafreisetzung in Getränken [11, 152]. Bakterielle oder fungale β -Glucosidasen sind meist Teil eines Cellulase-Enzym-Systems und verantwortlich für die Hydrolyse von kurzkettigen Oligosacchariden und Cellobiose zu Glucose als geschwindigkeitsbestimmender Schritt [149]. Die Enzymaktivität sinkt mit steigender Glucose-Kettenlänge [150, 151]. Somit unterscheiden sich β -Glucosidasen unterschiedlicher Herkunft in ihrer Spezifität für den entsprechenden Aglykon-Teil (Aryl-, Alkyl- oder Amino), welcher glykosidisch gebunden ist.

Neben der Einteilung in EC-Klassen, entwickelte Henrissat (1991 und 1997) eine alternative Einteilung der Glykosid-Hydrolasen (GH) anhand ihrer Aminosäure-Sequenz [156–158]. Diese Einteilung ist die aktuell akzeptierte Klassifizierungsmethode für diese Enzyme [149]. Die β -Glucosidase wird in die Familie der Glykosid-Hydrolasen GH1, GH3, GH5, GH9 und GH30 eingeordnet [156, 158–160]. Familien, die ähnliche Strukturen im katalytischen Bereich aufweisen und ähnliche katalytische Aminosäuren enthalten, was auf eine gemeinsame Abstammung und ähnlichen katalytischen Mechanismus schließen lässt, sind nochmals in

sogenannte Clans gruppiert [157, 158]. Der Clan GH-A besitzt den größten Anteil an Familien und beinhaltet die Familien der β -Glucosidasen GH1, GH5 und GH30. GH1 umfasst die größte Anzahl an bereits charakterisierten β -Glucosidasen [152]. Die meisten β -Glucosidasen gehören zur Familie der GH1, besonders pflanzliche [152]. GH3 umfassen β -Glucosidasen bakterieller, Schimmelpilz- und Hefe-Herkunft [149]. Beide Familien (GH1 und GH3) umfassen sogenannte „retaining“-Enzyme, die ihr Substrat mit einer Netto-Retention der anomeren Konfiguration über ein Doppel-Verlagerungs-Mechanismus hydrolysieren. Außerdem variieren diese Enzyme in ihrer strukturellen Zusammensetzung und Ausrichtung. Im Wesentlichen findet man fast ausschließlich α -helikale Sekundärstrukturen bis hin zu β -Faltblatt-Anordnungen [161]. Es wurden ebenfalls Endoglucosidasen in der Traubenhaut entdeckt, die fähig sind auch potentielle aromatische Disaccharide zu spalten [122]. Solche Diglycosidasen, die in einem Schritt das entsprechende Aglykon direkt vom Diglykosid abspalten, sind zu vernachlässigen, da zum einen sehr wenige Diglycosidasen bekannt und diese zum anderen meist sehr substratspezifisch sind [11, 162].

2.3.1.1 Klassifizierung

β -Glucosidasen sind eine heterogene Gruppe von hydrolytischen Enzymen und wurden bereits nach verschiedenen Kriterien klassifiziert. Im Allgemeinen waren in der Literatur zwei Methoden zur Klassifizierung bekannt, die zum einen auf der Substratspezifität und zum anderen auf der Nukleotid-Sequenz-Identität (NSI) basieren [163]. Basierend auf der Substratspezifität werden diese Enzyme in (1) Aryl- β -Glucosidasen, die auf Aryl-Glykoside wirken, in (2) wahre Cellobiasen, die Cellobiose unter Freisetzung von Glucose hydrolysieren und in (3) breite Substratspezifitäts-Enzyme, die innerhalb eines weiten Spektrums auf Substrate wirken, eingeteilt [149]. Die meisten β -Glucosidasen, die bislang charakterisiert wurden, werden der letzten Kategorie zugeordnet.

Eines der ersten Klassifizierungssysteme, basierend auf der verfügbaren Sequenz, teilt diese Enzyme in zwei Typen ein, Typ I und Typ II β -Glucosidasen [164]. Ein anderes System nach Rojas et al. (1995) unterteilte die β -Glucosidasen in zwei Subfamilien, Subfamilie A (BGA) und Subfamilie B (BGB) [165]. Allerdings wurden diese frühen Methoden größtenteils durch das NSI-System von Henrissat und Bairoch (1996), basierend auf der Sequenz und der Faltungs-Ähnlichkeiten (HCA, Hydrophobic Cluster Analyses) dieser Enzyme ersetzt [163]. Die HCA verschiedener solcher Enzyme lässt vermuten, dass die α -Helices und die β -Stränge in ähnlichen Positionen

in der gefalteten Konformation lokalisiert sind [149]. Hinzu kommt, dass einige hoch bzw. stark konservierte Aminosäuren ebenfalls in der Nähe des aktiven Zentrums entdeckt wurden. Es wird erwartet, dass eine solche Klassifizierung strukturelle Besonderheiten, evolutionäre Beziehungen und katalytische Mechanismen dieser Enzyme reflektieren kann [149].

Das Klassifizierungssystem für alle Glykosid-Hydrolasen, welche insgesamt fast 2000 ausmachen, umfasste im Jahr 2002 88 Familien [149], 2015 schon 135. Dabei enthält alleine Familie GH1 652 sequenzierte β -Glucosidasen (Stand 2006) [166]. Familie GH1 umfasste 2002 62 β -Glucosidasen unterschiedlichster Herkunft [149], 2015 hat sich diese Anzahl bereits auf 209 erhöht. Familie GH3 der Glykosid-Hydrolasen enthielt 2002 44 β -Glucosidasen [149], und 2015 sind es 183. Diese Nomenklatur ist sehr gebräuchlich, wird ständig aktualisiert und ist auf <http://www.cazy.org/> abrufbar [156–158].

2.3.1.2 Herkunft

Wie bereits beschrieben, gibt es eine große Bandbreite an β -Glucosidasen, die sich allerdings entsprechend ihrer Herkunft stark bezüglich ihrer Aktivität unterscheiden.

2.3.1.2.1 Pflanzliche β -Glucosidasen

Glucosidasen sind in der Pflanzenwelt weitverbreitet [11, 141]. Auch Weintrauben besitzen ein Enzym mit β -Glucosidase-Aktivität, allerdings wurde nur eine geringe α -Rhamnosidase, α -Arabinosidase oder β -Apiosidase-Aktivität festgestellt [8, 167, 168]. Trauben- β -Glucosidasen zeigen eine geringe Stabilität und Aktivität bei Traubensaft- bzw. weintypischen pH-Werten [169]. Ähnliche β -Glucosidase-Aktivität wurde in Rebenblättern beobachtet [8, 167]. Darüber hinaus weisen β -Glucosidasen pflanzlicher Herkunft eine geringere Aktivität bei Terpen-Monoglykosiden mit einer tertiären Alkoholgruppe auf, wie Linalool oder α -Terpineol, und sind meist nur fähig Terpen-Monoglykoside mit primärer Alkoholgruppe, wie Geraniol, Nerol oder Citronellol, zu hydrolysieren [8, 121, 167].

2.3.1.2.2 Mikrobielle β -Glucosidasen

2.3.1.2.2.1 Hefe- β -Glucosidasen

Bei Hefen handelt es sich um endogene β -Glucosidasen. Einige Hefen, wie z.B. *Hansenula*⁴¹, *Candida molischian*^{42a}, *C. wickerhamii*⁴³, besitzen ebenfalls eine β -Glucosidase-Aktivität, die aber meist durch höhere Glucose-Konzentrationen inhibiert wird [170]. Viele *Saccharomyces* Stämme hingegen zeigen keine

β -Glucosidase-Aktivität, lediglich bei einem Hefe-Stamm (*Saccharomyces cerevisiae*) von 153 untersuchten, konnte eine β -Glucosidase-Aktivität nachgewiesen werden [17]. Daher sind eher non-*Saccharomyces*- β -Glucosidasen für die Entwicklung eines sortentypischen Weinaromas von Bedeutung [171]. Die Vorgänge bei *Saccharomyces cerevisiae* sind komplexer, da diese Hefe dennoch fähig ist das Terpenprofil von Wein zu ändern (Umwandlung von Geraniol und Nerol zu Citronellol). Die Intensität der Umwandlung hängt allerdings vom Stamm ab [144]. Daneben weisen einige Daten auf eine β -Glucosidase-Aktivität von weiteren önologischen Hefestämmen und die damit verbundenen technologischen Vorteile dieser Enzyme, wie z.B. Glucosetoleranz, hin. Allerdings werden diese Glucosidasen durch Ethanol inhibiert [80].

Hefe- β -Glucosidasen aus *S. cerevisiae* sind im Grunde zu vernachlässigen, da diese durch den niedrigen pH-Wert und die schlechte Stabilität nur geringe β -Glucosidase-Aktivitäten aufweisen und dadurch einen geringen Einfluss auf die Hydrolyse der glykosidischen Aroma-Präkursoren haben [172].

2.3.1.2.2 Bakterielle β -Glucosidasen

Zu Milchsäurebakterien gibt es nur wenige Daten bezüglich einer β -Glucosidase-Aktivität in der Weinherstellung. Unter anderem wird z.B. *Oenococcus oeni* als vorteilhaft für das Weinaroma beschrieben [173]. Über die wirksamen β -Glucosidase-Aktivitäten einiger *O. oeni* Stämme wurde bereits in einigen Studien berichtet [174, 175]. Zusätzlich entdeckten Mansfield et al. (2002), dass einige *O. oeni* Stämme β -Glucosidase-Enzyme produzieren [176]. Kommerzielle Enzyme für den önologischen Gebrauch werden meist aus fungalen, weniger aus bakteriellen Quellen isoliert [115].

2.3.1.2.3 Fungale β -Glucosidasen

Die geeignetsten Enzympräparate bei der Weinherstellung besitzen eine β -D-Glucopyranosidase, α -L-Arabinofuranosidase, α -L-Rhamnopyranosidase und β -D-Apiofuranosidase-Aktivität [177] und werden meist aus dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* gewonnen. Diese Enzyme kommen in kommerziell erhältlichen Präparaten oft nur in geringen Mengen als Nebenaktivität vor. Hauptsächlich weisen sie eine β -D-Apiosidase-Aktivität auf [178]. Eine Bestimmung der freien flüchtigen Verbindungen (Terpene, Norisoprenoide und flüchtige Phenole) zeigt, dass die Konzentrationen bei enzymbehandelten Weinen stark zunehmen (265 bis 2000 %), und zwar nicht nur bei Aromasorten, sondern auch bei neutralen Rebsorten [8, 179].

Eine Freisetzung des glykosidisch gebundenen Aromas ist meist nur in trockenen Weinen erfolgreich, da β -Glucosidasen aus fungalen Enzympräparaten durch den geringeren Anteil an Glucose in trockenen Weinen kaum gehemmt werden können. Eine Hydrolyse der Terpen-Glykoside in süßen Weinen ist aus diesem Grund meist nicht komplett bzw. sehr schwach [8, 179].

2.3.1.3 Struktur

β -Glucosidasen haben eine Vielzahl von Strukturen, allerdings ist die Faltung des katalytischen Bereiches bei allen β -Glucosidasen der GH-Familie ähnlich [152]. Im Clan GH-A, zu dem GH1, GH5 und GH30 gehören, haben alle Enzyme ähnliche $(\beta/\alpha)_8$ -Fass Bereiche, welche die aktiven Zentren enthalten [152]. Diese aktive Zentren enthalten zwei konservierte Carbonsäure-Reste auf den β -Strängen 4 und 7, welche als katalytische Säure/Base und Nukleophil dienen [180, 181]. Die Länge und Subunit-Masse der GH1-Enzyme variiert beträchtlich, abhängig von der Anwesenheit redundanter GH1-Bereiche. Allerdings variiert auch der katalytische Bereich von 440 bis 550 Resten abhängig von der Länge der variablen Schleifen an den C-terminalen Enden der β -Stränge der $(\beta/\alpha)_8$ -Fässer [182]. Diese Monomere bilden eine Vielzahl von Quartärstrukturen, einschließlich monomerer Enzyme, Dimere, Tetramere, Hexamere, Octamere und große Aggregate [152]. Die GH3- β -Glucosidasen besitzen eine zwei-Domän-Struktur, bestehend aus einer $(\beta/\alpha)_8$ -Fass-Supersekundärstruktur (8 α -Helices und 8 β -Strängen, die abwechselnd in der Sequenz aneinander gereiht sind) gefolgt von einer $(\alpha/\beta)_6$ -Sandwich-Struktur (6 β -Faltblättern zwischen drei α -Helices auf der anderen Seite \rightarrow β -Faltblatt und α -Helices sind in "Schichten" ähnlich zu einem mehrschichtigen Sandwich angeordnet) [183]. Das aktive Zentrum der GH3-Enzyme liegt zwischen der $(\beta/\alpha)_8$ - und $(\alpha/\beta)_6$ -Sandwich Domäne, von denen jedes einen katalytischen Carboxylat-Rest besitzt. Eine β -D-Glucan Exohydrolase (ExoI) aus Gerste, aus welcher zuverlässige Modelle für die anderen GH3-Familien abgeleitet werden können, besitzt als katalytisches Nukleophil ein Aspartat beim Rest D285, welches sich auf der Schleife nach β -Faltblatt 7 des $(\beta/\alpha)_8$ -Fass befindet. Die katalytische Säure/Base, das Glutamat E491, befindet sich auf der langen Schleife der $(\alpha/\beta)_6$ -Sandwich-Domäne (s. Abb. 8) [184].

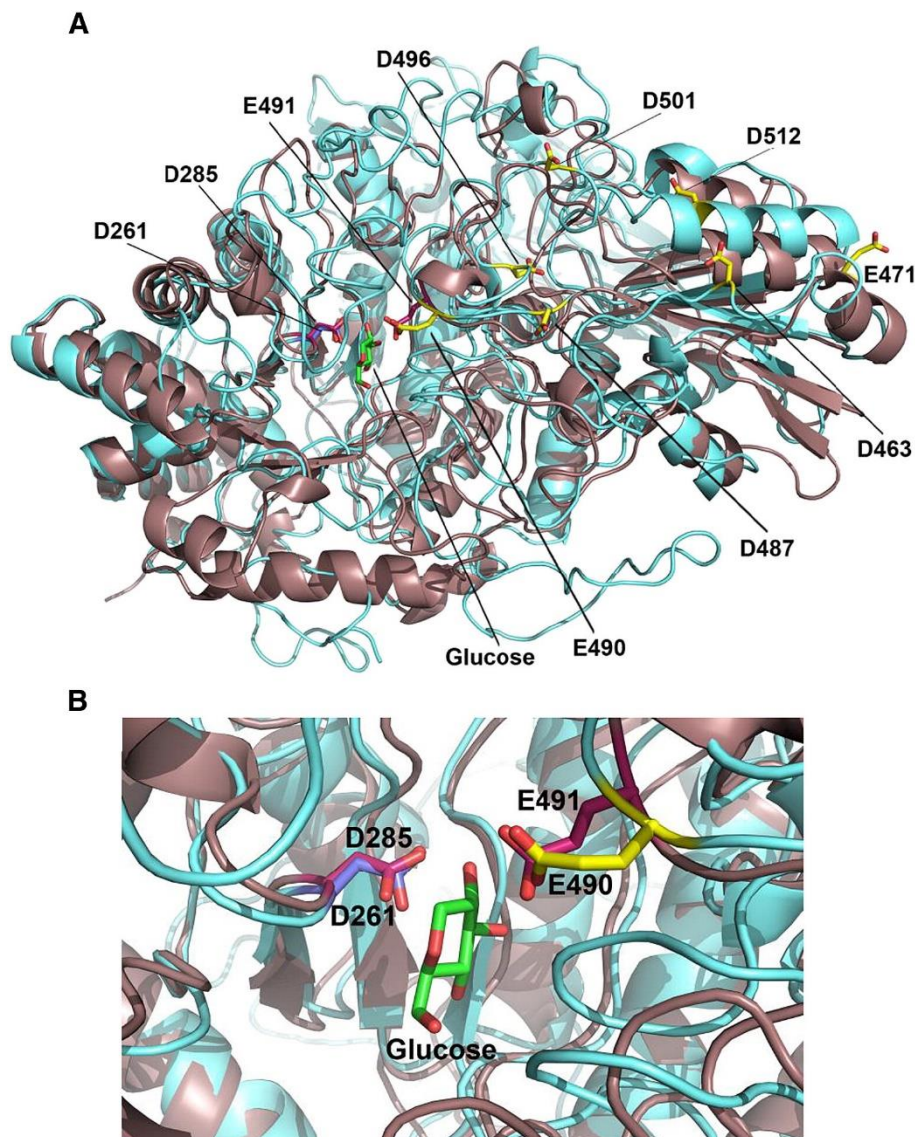


Abb. 8 Strukturelle Überlagerung des dreidimensionalen Modells einer *A. niger* ASKU28 β -Glucosidase (cyan) mit der Kristallstruktur einer β -D-Glucan Exohydrolase (ExoI) aus Gerste im Komplex mit Glucose (PDB ID: 1ex1, braun). (A) Übersicht (B) Nahaufnahme des Bereichs des aktiven Zentrums. Seitenketten der wichtigsten Reste sind als Stick-Modelle vertreten. Das Nukleophil und Säure/Base-Katalysator der ExoI (D285 und E491) sind in Magenta und das Glucose-Molekül in der Bindungstasche des ExoI in grün dargestellt. Die Seitenkette des Nukleophils (D261) der *A. niger* ASKU28 β -Glucosidase ist violett abgebildet. Die Seitenketten der sieben konservierten sauren Reste der *A. niger* ASKU28 β -Glucosidase (D463, E471, D487, E490, D496, D501, D512) sind in gelb dargestellt. [185]

Ausgehend von den für diese Arbeit verwendeten Enzympräparaten (s. Kapitel 2.3, Tab. 6) kann aufgrund der Herkunft (*A. niger*) die Familie der β -Glucosidase lediglich anhand der Datenbank von www.cazy.org und der Häufigkeit des Vorkommens abgeschätzt werden, da zu den verwendeten Präparaten keine entsprechenden Daten vorliegen. Im Rahmen der Arbeit wurden nur Enzym-Präparate vom Typ *Aspergillus niger* eingesetzt, d.h. es handelt sich wahrscheinlich um eine GH1- oder GH3-Glucosidase. Allerdings, egal ob GH1 (Clan GH-A) oder GH3 (kein Clan), hydrolysieren beide nach dem Retaining-Mechanismus. GH1 weist eine $(\beta/\alpha)_8$ -Struktur

auf und das katalytische Nukleophil bzw. die Base ist Glutaminsäure, die gegebenenfalls auch die Säure sein kann. Bei GH3 ist das katalytische Nukleophil bzw. Base Asparaginsäure und die Säure wiederum Glutaminsäure.

2.3.1.4 Katalytischer Mechanismus

Es gibt zwei Mechanismen wie die Glykosid-Hydrolyse ablaufen kann, ein Mechanismus unter Inversion („Inverting“) und einer unter Beibehaltung der Chiralität am anomeren Kohlenstoffatom („Retaining“) [186]. Beide Mechanismen verwenden ein Paar von sauren und nukleophilen Resten, i.d.R. Carbonsäuren, auf jeder Seite des Zuckers, im Retaining-Mechanismus (B) mit einem Abstand von ungefähr 5 Å und im Inverting-Mechanismus (A) von 10 Å. Hier muss ein Wassermolekül zwischen die katalytische Base und das Substrat passen (s. Abb. 9) [152].

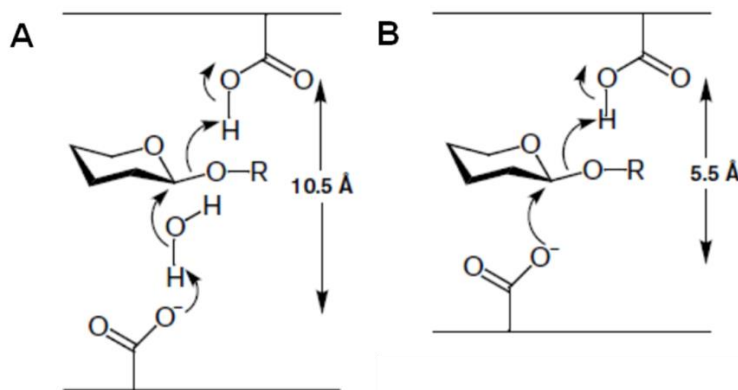


Abb. 9 Abstand zwischen den sauren und nukleophilen Resten beim Inverting-Mechanismus (A) und Retaining-Mechanismus (B) [187]

Es gibt nur wenige β -Glucosidasen in der GH9-Familie. Allerdings sind diese die ersten β -Glucosidasen, die nach dem Inverting-Mechanismus hydrolysieren, welcher der vorherrschende Mechanismus in der GH9-Familie ist. Diese Tatsache ist ungewöhnlich, da alle anderen beschriebenen β -Glucosidasen nach dem Retaining-Mechanismus arbeiten. Beim **Inverting-Mechanismus** macht ein aktiviertes Wassermolekül einen direkten nukleophilen Angriff auf das anomere Kohlenstoffatom um das Aglykon in einem Schritt abzutrennen [188]. Die katalytische Base zieht ein Proton aus dem ankommenden Wassermolekül, während die katalytische Säure die verlassende Aglykon-Gruppe protoniert [152].

Der allgemein akzeptierte Mechanismus für die hydrolytische Wirkung der β -Glucosidasen ist der **Retaining-Mechanismus** unter Beibehaltung der anomeren Konfiguration, wie z.B. bei GH Clan A und den Familien GH1, GH3 und GH30. Der

Glucose-Rest wird bei der Bindung an das Enzym in Vorbereitung zur Bildung der Halb-Sessel-Konformation des beabsichtigten Übergangszustands in die Boot-Konformation verzerrt [187]. Die Katalyse läuft in zwei Schritten ab: Glykosylierung und Deglykosylierung [152]. Beim ersten Schritt der Glykosylierung gibt die katalytische Säure ein Proton an das Aglykon ab, während das katalytische Nukleophil von der gegenüberliegenden Seite unter Bildung eines α -verknüpften, kovalenten Enzym-Glykon-Zwischenproduktes angreift. Im zweiten Schritt der Deglykosylierung wird der Prozess wieder umgekehrt. Die katalytische Base (die gleiche Carboxylat-Gruppe wie bei der katalytische Säure) entzieht ein Wassermolekül, was die nukleophile Energie/Kraft erhöht, um das anomere Kohlenstoffatom anzugreifen und das katalytische Nukleophil wieder von der Glucose zu verdrängen. Abb. 10 bildet beide Mechanismen ab.

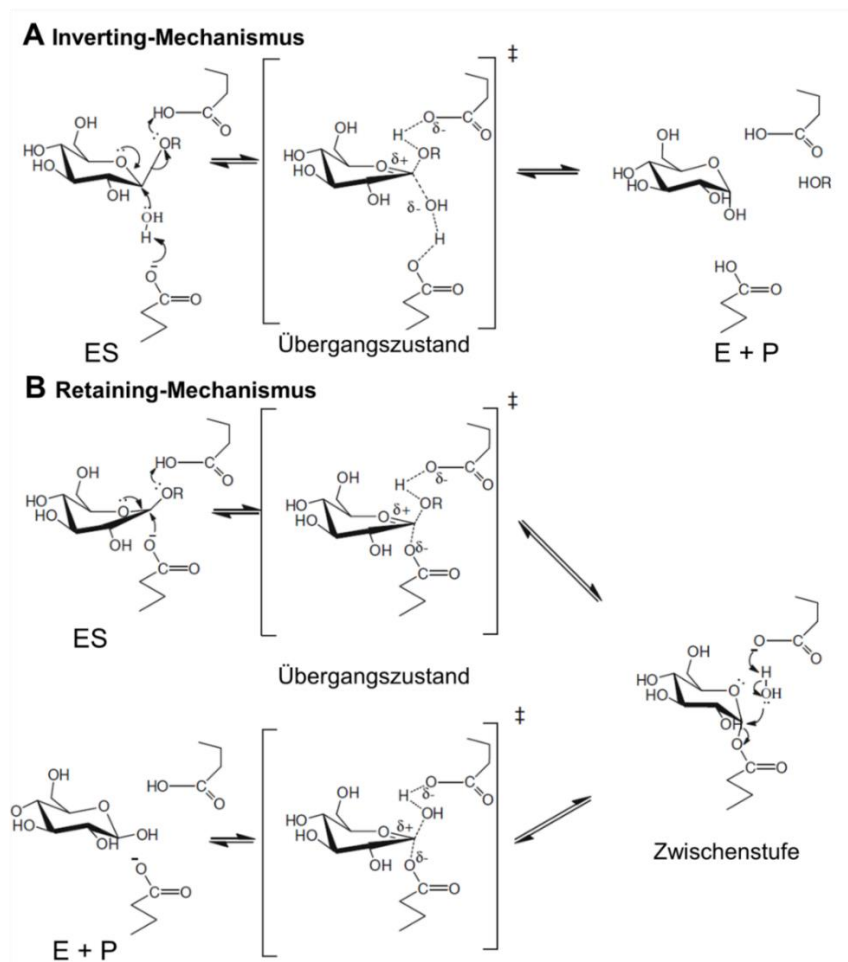


Abb. 10 Mechanismus von (A) Inverting- und (B) Retaining-Glucosidasen (modifiziert nach [152])

2.3.1.5 Einflussfaktoren auf den katalytischen Mechanismus

2.3.1.5.1 Substratspezifität

Der Aglykon-Rest der Diglykoside hat keinen Effekt auf die Aktivität der „vorgeschalteten“ Enzyme beim sequentiellen Mechanismus, wie z.B. α -Arabinofuranosidase [12, 84], α -Rhamnopyranosidase [12] oder β -Apiofuranosidase [189]. Zu erklären ist diese Tatsache unter dem Umstand, dass die Ausrichtung des terminalen Zuckers des Diglykosids, unabhängig vom Aglykon-Rest, gleich ist [190]. Bei der β -Glucosidase hat die Struktur der Glykoside hingegen einen großen Effekt auf die Aktivität [35, 84, 121, 167].

Die GH1-Enzyme besitzen eine ziemlich breite Glykon-Spezifität. Marana (2006) analysierte die Spezifität der GH1-Enzyme und kam zu dem Schluss, dass diese durch ein Wasserstoffbindungsnetzwerk gelenkt wird, welches mindestens 5 Amino-Reste im aktiven Zentrum und 4 Substrat-Hydroxyl-Gruppen einschließt [166]. Dabei ist Glutamat als Rest von entscheidender Bedeutung für die Unterscheidung zwischen den Enzymen ist. Außerdem wurde beobachtet, dass die Bindung des Aglykons ebenfalls einen Effekt auf die Zucker-Bindungsstelle hat [191, 192], so dass ein Einfluss auf die Glykon-Spezifität durch weiter entfernte Reste in der Substrat-Bindungstasche nicht ausgeschlossen werden kann [152]. Allerdings haben einige GH1-Hydrolasen gezeigt, dass die unterschiedlichen Reste nicht der einzige Grund für die Substratspezifität sein können [193, 194]. Es kann festgehalten werden, dass im Gegensatz zu stark bzw. hoch konservierten Glykon-Bindungsstellen andere Reste der aktiven Bindungsstellen sich so gegenseitig ergänzend beeinflussen, sofern diese sich überlappen, um mit dem Aglykon in jeder GH1-Glucosidase, die bisher untersucht wurden, zu interagieren [152]. Turan und Zheng (2005) zeigten ebenfalls bei β -D-glykosidisch gebundenen Substraten, dass die Aktivität der β -Glucosidase stark vom vorherrschenden Substrat abhängt [195].

2.3.1.5.2 Kinetische Parameter für die Substrat-Hydrolyse

β -Glucosidasen haben, abhängig vom jeweiligen Substrat, unterschiedliche kinetische Parameter [152]. Die K_M -Werte für natürlich vorkommende Substrate und andere gute Substrate liegen üblicherweise bei 1 mM oder weniger, allerdings variieren diese Werte grob um das 1000-fache.

Wenn β -Glucosidasen mit unterschiedlicher Effizienz sich in der Fähigkeit das Aglyka wieder zu verdrängen unterscheiden, ist der limitierende bzw. geschwindigkeitsbegrenzende Schritt die Glykosylierungsreaktion. Unterscheidet sich

allerdings das Substrat im Glykon, ist der Glykosylierungs-, Deglykosylierungs-Schritt oder beide der limitierende Schritt [152].

2.3.1.5.3 Inhibitoren und Co-Faktoren

Die β -Glucosidase wird durch Glucose stark inhibiert, die Größe der Inhibition hängt mit der Herkunft des Enzyms zusammen [196, 197]. Daher kann die Verwendung von glucosetoleranten β -Glucosidasen für eine Aroma-Freisetzung im Wein vorteilhaft sein. Andere Zucker, Mono- oder Disaccharide, welche in üblichen Mengen im Fruchtsaft oder Wein vorhanden sind, haben hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität [162]. β -Glucosidasen von z.B. Mandeln oder Trauben sind im Vergleich zu solchen aus einigen Hefen und Schimmelpilzen resistenter. In Tab. 7 sind einige K_i -Werte (= Dissoziationskonstante der Enzym-Inhibitor-Verbindung) zur Glucose-Inhibition von β -Glucosidasen zusammengefasst.

Tab. 7 Inhibition der β -Glucosidase durch Glucose

K_i -Wert [mM]	Herkunft β -Glucosidase	Quelle
170	Mandeln	[198]
210	Trauben	[169]
6,7	<i>S. cerevisia</i>	[199]
7	<i>C. molischiana</i>	[200]
0,6 – 10	Schimmelpilze	[201, 202]

Die „Co-Enzyme“, wie α -L-Arabinofuranosidase [203] oder α -L-Rhamnopyranosidase [204], werden hingegen nicht signifikant durch in Fruchtsaft übliche Glucose-Konzentrationen inhibiert. β -Glucosidasen werden durch Zucker-Analoga im Übergangszustand, substratanaloge Glykoside und durch freie Aglyka des Substrats, sowie durch nur langsam hydrolysierte Substrate gehemmt [152]. Da sich die Aglykon- und Glykon-Bindungstaschen im aktiven Zentrum unterscheiden, können Zucker-Analoga, die ähnlich wie die Halb-Sessel-Konformation des Übergangszustandes ausgeprägt sind, an die Glykon-Bindungsstelle binden und das Enzym inhibieren, wohingegen freie Aglyka an die Aglykon-Bindungsstelle binden können. Zwar bezeichnen Ketudat Cairns und Esen (2010) freie Glucose nur als schwachen Inhibitor (üblicherweise K_i von 100 – 200 mM), da Glucose erst zur Halb-Sessel-Konformation verformt werden muss, um an die Glykon-Bindungsstelle anzudocken, wobei angenommen wird, dass dazu ein Teil der Energie der Aglykon-Bindung benötigt wird [152]. Allerdings zeigen andere Publikationen ein gegenteiliges Bild. Viele β -Glucosidasen sind empfindlich gegenüber Glucose und für die meisten mikrobiellen

β -Glucosidasen ist Glucose ein starker Inhibitor ($K_i = 0,6 - 10 \text{ mM}$) [149, 196, 197, 201, 202, 205–207]. Freie Aglyka können wirksame kompetitive Inhibitoren sein, da sie ohne energetisch ungünstige Verformung an die Aglykon-Bindungsstelle binden können [152].

Durch die im Wein üblichen Ethanolgehalte (10 Vol.-%) [177, 196] oder Schwefeldioxid-Gehalte (50 - 250 ppm) [162, 208] werden die Glykosid-Hydrolasen nicht signifikant beeinflusst. Die meisten Metall-Ionen, wie Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} und Fe^{3+} , dagegen sind wirksame Inhibitoren für β -Glucosidasen [11, 152, 209]. Die stärkste Hemmung erfolgt durch Ag^+ , Hg^{2+} und Cu^{2+} . Eine Hemmung durch diese Kationen hängt wahrscheinlich mit der Bindung an das katalytische Nukleophil Glutamat zusammen [11].

Bezüglich der Notwendigkeit von Co-Faktoren bei β -Glucosidasen gibt es bisher jedoch keine klaren Beweise [11].

2.3.1.5.4 pH- und Temperatur-Optima

Aufgrund ihrer Herkunft und Aminosäure-Sequenz zeigen β -Glucosidasen eine Reihe von **pH-Optima** und -Stabilitäten [152]. Die Optima der meisten β -Glucosidasen variieren zwischen pH 4,0 und 7,5 und sind zwischen pH 4,0 und 9,0 stabil. I.d.R. liegen die Optima bei pflanzlichen [121, 169] und mikrobiellen β -Glucosidasen [210] zwischen 4,0 und 6,0. In dem pH-Bereich von Fruchtsäften und Wein (2,8 bis 3,8) wurden dementsprechend nur 5 bis 15 % der Aktivitätsmaxima der meisten β -Glucosidasen beobachtet [11].

Die Aktivitätsoptima der fungalen Arabinosidasen [84] und Rhamnosidasen [11, 177] sind sehr ähnlich zur fungalen β -Glucosidase [211]. Arabinosidasen und Rhamnosidasen hingegen zeigen auch bei niedrigen pH-Werten von Wein oder Fruchtsäften teilweise noch mehr als 50 % Aktivität im Vergleich zum Maximum. Stabilität und Aktivität unter den niedrigen pH-Werten ist für viele mögliche industrielle Applikationen wichtig. Besonders Exoglucosidasen und β -Glucosidasen aus *A. niger* zeigen auch bei niedrigen pH-Werten noch akzeptable Aktivitäten [211].

Ähnlich sieht es bei der Temperaturstabilität und den **Temperatur-Optima** aus. Auch diese variieren sehr stark und hängen von der Herkunft der Enzyme ab. Mesophile β -Glucosidasen weisen die höchste Aktivität bei 30 bis 65 °C auf, werden allerdings im Allgemeinen über 55 bis 70 °C inaktiviert [212–215]. Eine höhere Aktivität bei Temperaturen oberhalb der Extreme der natürlichen Enzym-Bedingungen ist physiologisch nicht relevant und könnte zu einer schnellen Hitze-Denaturierung führen.

Aus diesem Grund werden Enzymaktivitäts-Assays meistens zwischen 30 bis 40 °C durchgeführt [152]. Eine höhere Temperaturstabilität einiger thermophiler Enzyme, im Vergleich zu mesophilen Enzymen, wird auf die steigende Anzahl an Prolin-Resten, elektrostatische Brücken, internen Wasser-Molekülen und die Bindung von mehreren Untereinheiten in der quartären Struktur zurückgeführt [216].

Die Temperatur-Optima von pflanzlichen [169] und mikrobiellen [210] β -Glucosidasen variieren meist zwischen 40 bis 50 °C. Von einer thermischen Denaturierung ist i.d.R. ab 50 °C auszugehen [201, 210]. Im Großen und Ganzen kann festgehalten werden, dass β -Glucosidasen aus Schimmelpilzen hitzeresistenter sind als solche aus Pflanzen oder Hefen [11].

2.3.2 Eigenschaften der Glycosidasen zur Aromafreisetzung

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Charakteristika, Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt (pI), der Glycosidasen vom Typ *A. niger* in Tab. 8 zusammengefasst.

Tab. 8 Charakteristika verschiedener Glycosidasen vom Typ *A. niger*

Glycosidase	Molekulargewicht	Quelle	pI	Quelle
β-Glucosidase (EC 3.2.1.21)	ca. 120 kDa	[205, 217]	4,0 – 4,5	[24]
			4,2	[27, 217, 218]
			4,0	[36, 205]
α-L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	61 kDa	[84, 219]	3,5	[27, 84, 217–219]
			3,3 u. 3,5	[36, 220]
	67 u. 83 kDa	[220]	3,7	[84]
			3,3 – 3,7	[24]
α-L-Rhamnopyranosidase (EC 3.2. 1.40)	90 kDa	[27]	6,0	[27, 218]
			5,0	[36]
β-D-Xylopyranosidase (EC 3.2.1.37)	60 – 120 kDa (nicht <i>A. niger</i>)	[221]	4,2 – 9,0 (nicht <i>A. niger</i>)	[221]
	122 kDa	[222]	4,9	[222]

β -Glucosidasen bestehen aus einer primären Proteinstruktur mit einer hohen Rate an Glutamin- und Asparaginsäure auf [205, 217], weitere Charakteristika der β -Glucosidase wurden bereits im vorherigen Abschnitt ausführlich beschrieben (s. Kapitel 2.3.1.5). Der katalytische Mechanismus der Enzyme β -Glucosidasen und

Arabinofuranosidase wahrscheinlich der gleiche und kann dementsprechend durch die Säure-Base-Katalyse (Retaining-Mechanismus) erklärt werden [84, 205, 217]. Über die **Rhamnopyranosidase** sind der Literatur nur wenige Informationen zu entnehmen [27]. Dies kann wie folgt zusammengefasst werden: pI bei 6, Molekulargewicht bei 90 kDa, pH und Temperatur-Optimum liegen wahrscheinlich bei 4,5 und 40 °C [27, 223, 224]. Bei der Rhamnopyranosidase handelt es sich um ein Glykoprotein, welches keine Metall-Co-Faktoren und Disulfidbrücken enthält, wohingegen die Zusammensetzung und Aminosäuren-Sequenz unbekannt ist. Der katalytische Mechanismus könnte dem der anderen Glycosidasen entsprechen, d.h. der Säure-Base-Typ (Retaining-Mechanismus). Außerdem besitzt *A. niger* eine geringe spezifische Produktivität für Rhamnopyranosidase, was zu Schwierigkeiten bei der Aufreinigung von Rohenzymen führt [225]. Auch über die **Xylopyranosidase** gab es nur wenige Informationen. Die meisten Xylopyranosidasen besitzen einen pI von 4,0 – 5,0 [226]. Vries und Visser (2001) geben für eine *Aspergillus* Xylosidasen einen m_w -Bereich von 60 bis 120 kDa, ein Temperatur-Optimum von 50 bis 75 °C, ein pH -Optimum von 2,5 bis 6,5 und einen pI -Bereich von 4,2 bis 9 an [221]. Wobei die wichtigen *A. niger* Exoenzyme mit 122 kDa, einem pH -Optimum von 3,8 bis 4,0, einem Temperatur-Optimum von 70 °C und einem pI von 4,9 angegeben wurden [222]. Außerdem werden Xylosidasen von Typ *Aspergillus* der Glykosid-Hydrolasen-Familie 3 (GH 3) zugeschrieben und katalysieren nach dem Retaining-Mechanismus [221].

2.3.3 Herstellung von Enzympräparaten

Die gezielte Verwendung von Enzympräparaten hat die entscheidenden Vorteile einer ausgeprägten Substrat- und Reaktionsspezifität sowie einer hohen Reaktionsgeschwindigkeit unter produktschonenden Bedingungen (pH , Temperatur). Somit ist eine gelenkte, schnelle und kontinuierliche Reaktionsführung bei geringem technischem Aufwand möglich [227]. Wichtig bei der Herstellung von Enzymen für den Einsatz im Lebensmittel bzw. bei der Wahl der zur Herstellung verwendeten Mikroorganismen ist die Tatsache, dass sichere Stämme verwendet werden, d.h. diese dürfen nicht pathogen noch toxisch sein [133].

In der Regel erhält man aus pflanzlichem und tierischem Material oder Mikroorganismen schonend gewonnene Enzymgemische mit einer spezifischen Aktivität. Durch geeignete Verfahren werden aus diesen Enzymgemischen die sogenannten „Leitenzyme“ angereichert und dann entsprechend weiterverarbeitet. Neben der Aktivität des Hauptenzym kommen in solchen Präparaten meist auch

technisch unvermeidbare Fremd- bzw. Nebenaktivitäten vor, die sowohl gewünscht als unerwünscht sein können [136]. In Abb. 11 sind die prinzipiellen Verfahrensschritte zur Herstellung von Enzymen dargestellt.

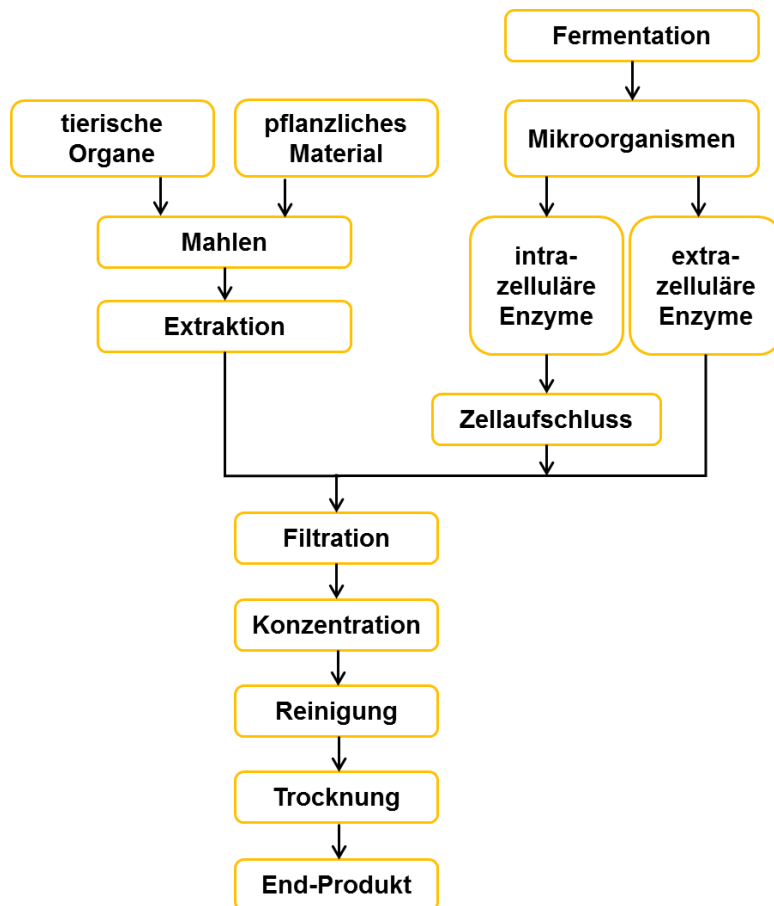


Abb. 11 Verfahrensschritte bei der Herstellung von Enzymen nach [137]

Die Verwendung aerober Submerskulturen in einem Rührkesselreaktor gehört zu den typischen industriellen Verfahren für die Produktion von extrazellulären Enzymen durch Mikroorganismen. Eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen wird für die industrielle Herstellung von Enzymen verwendet. Dabei spielen eukaryotische Systeme, wie Hefe und Pilze, ebenso eine große Rolle, wie prokaryotische Systeme mit gram-negativen und gram-positiven Familien. Bei biopharmazeutischen Enzymen werden Säuger- und Insekten-Zelllinien ebenfalls in Betracht gezogen [137].

Grundlegend wird in einem ersten Schritt das Fermentationsmedium mit einem entsprechenden Mikroorganismus beimpft und anschließend unter geeigneten Bedingungen fermentiert. In Abb. 12 ist eine Submersfermentation schematisch dargestellt.

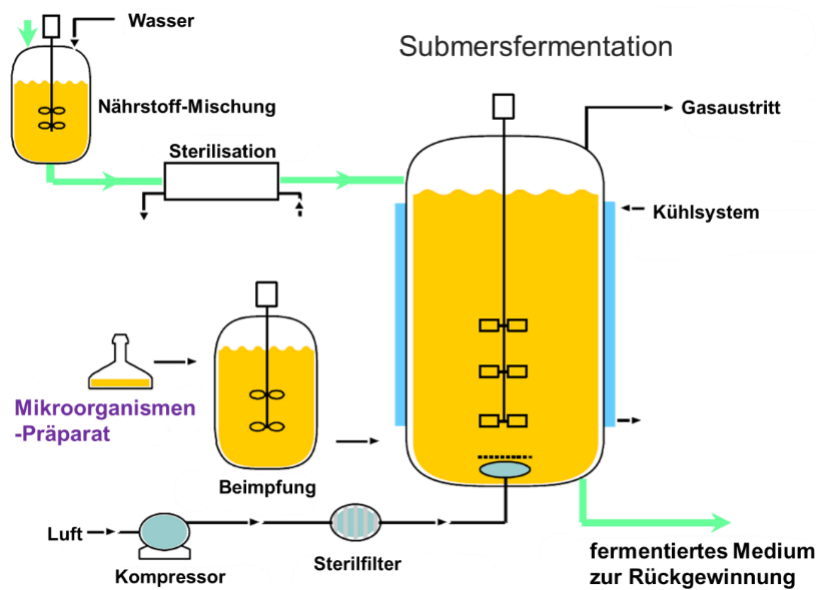


Abb. 12 Schematische Darstellung einer Fermentation in der Enzymherstellung (modifiziert nach [228])

Der Reinheitsgrad kommerzieller Enzyme reicht von Rohenzymen hin zu hochreinen Formen und hängt entsprechend von der Anwendung bzw. Verwendung ab. Isolierung intrazellulärer Enzyme beinhaltet oft die Trennung komplexer biologischer Mischungen. Extrazelluläre Enzyme werden wiederum meist nur mit wenigen anderen Komponenten in das Medium freigesetzt. Enzyme sind sehr komplexe Proteine und besitzen ihre hohe Spezifität als Katalysatoren nur in ihrem nativen Zustand, welcher von bestimmten Bedingungen, wie pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke abhängt. Daher können nur milde und spezifische Methoden zur Enzymisolierung verwendet werden [137]. Im Prinzip umfasst die Isolierung von Enzymen zwei Schritte: Zerkleinerung des Gewebes mit einer anschließenden Extraktion und Anreicherung. Eine Anreicherung der Enzyme erfolgt, da die Enzymkonzentration im Ausgangsmaterial oft sehr gering ist. Für viele industrielle Anwendungen genügen meist nur teilweise aufgereinigte Enzympräparate, für analytische und medizinische Verwendung müssen Enzyme dagegen hochrein sein. Dabei spielen Verfahren, wie Kristallisation, Elektrophorese und Chromatographie, eine wichtige Rolle. Die Aufarbeitung der Enzyme für technische Zwecke zielt, im Gegensatz zu den weitestgehend gereinigten Enzymen für die Analytik, nur darauf ab, störende Fremdaktivitäten zu reduzieren bzw. diese zu beseitigen. Bei den Fraktionierungen werden meist selektive Fällungsoperationen, wie Adsorption an anorganischen Gelen, Chromatographie an porösen Gelen und eine Ultrafiltration durch Membranen angewandt [137].

Enzyme werden als stabilisierte Flüssigkonzentrate oder Feststoffpartikel verkauft. Die primäre Aufgabe einer solchen Formulierung ist es, Verluste der enzymatischen Aktivität bei Transport, Lagerung und Verwendung zu minimieren. Vermarktet werden diese Präparate dann mit definierter katalytischer Aktivität, die durch Zusatz geeigneter Verdünnungsmittel (z.B. Salze, Kohlenhydrate) auf die erforderliche Konzentration eingestellt werden. Der Gehalt an aktivem Enzym ist meist relativ gering, um eine einfache Dosierung für den Anwender zu gewährleisten [37].

In Abb. 13 und Abb. 14 sind grundlegende Prozessschritte zur Gewinnung von Enzympräparaten aus einem Fermentationsmedium schematisch dargestellt.

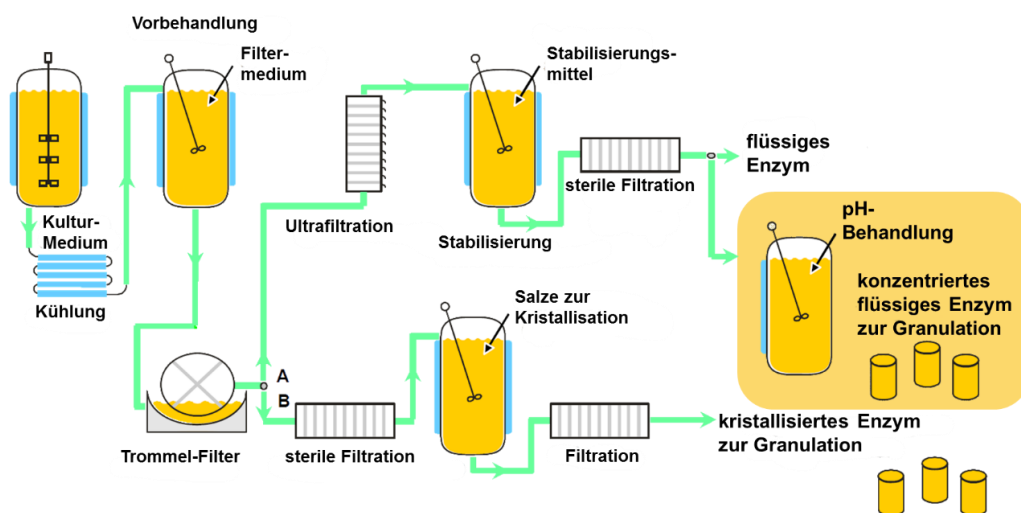


Abb. 13 Schematische Darstellung des Enzymgewinnungsprozesses (modifiziert nach [228])

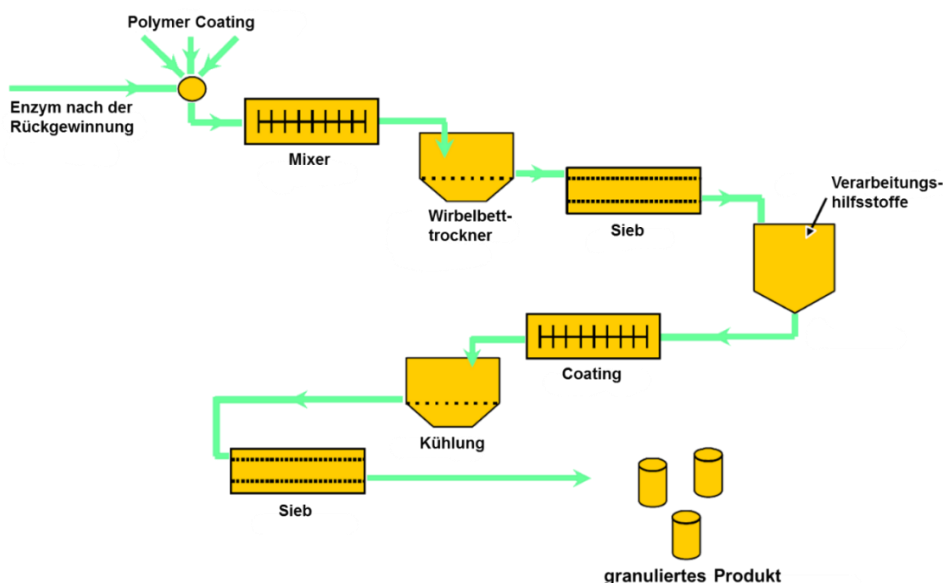


Abb. 14 Schematische Darstellung des Granulationsprozesses von Enzymen (modifiziert nach [228])

Tab. 9 zeigt die mögliche Zusammensetzung kommerzieller Enzympräparate.

Tab. 9 Zusammensetzung fester und flüssiger Enzympräparate (Quelle Fa. Novozym) [228]

Festes Enzym	Flüssiges Enzym
80 – 90 % Maltodextrin	45 – 55 % Glycerin
Enzym mit deklarerter Aktivität	40 – 45 % Wasser
3 – 4 % Wasser	Enzym mit deklarerter Aktivität
2 – 3 % KCl	1 – 5 % KCl
<1 % Citronensäure	

Der Zusatz von Maltodextrin dient dabei als Füllstoff, um die gewünschte Enzymkonzentration im Endprodukt einzustellen. Durch Glycerin im flüssigen Produkt soll das Risiko einer physikalischen Fällung nahe dem isoelektrischen Punkt minimiert werden [137].

Nachteilig bei solchen löslichen Enzympräparaten ist, dass diese nur ein einziges Mal eingesetzt werden können und anschließend wieder durch Fällung aus dem entsprechenden Medium entfernt werden müssen. Immobilisierte Enzyme hingegen können mehrfach verwendet werden. Dazu werden die Enzyme an ein festes Trägermaterial fixiert. Nachfolgend kann, z.B. in einem kontinuierlichen Verfahren, die Enzym-Reaktion über die Fließgeschwindigkeit kontrolliert werden.

2.3.4 Immobilisierung von Enzymen

Die ersten Immobilisierungen von Enzymen wurden bereits vor fast 100 Jahren beschrieben [229]. Danach wurden weitere Studien zur Immobilisierung von Enzymen veröffentlicht, allerdings kamen erst 1953 die erste immobilisierten Enzyme zur praktischen Anwendung [137, 230]. Neben der Anwendung in industriellen Verfahren, sind die Immobilisierungstechniken die Grundlage für eine Reihe von biotechnologischen Produkten, wie Anwendungen in der Diagnostik, der Bioaffinitätschromatographie und als Biosensoren. Zunächst wurden lediglich immobilisierte Einzel-Enzyme verwendet, ab den 1970er Jahren kam es zur Entwicklung von komplexeren Systemen, darunter Zwei-Enzymreaktionen mit Co-Faktor-Regeneration und lebenden Zellen. Die Hauptkomponenten eines immobilisierten Enzymsystems sind zum einen das Enzym selbst, die Matrix bzw. der Träger und die entsprechende Bindungsmethode. Die Enzyme können durch verschiedene Wechselwirkungen, wie reversible physikalische Adsorption und

Ionenbindungen, bis hin zu stabilen kovalenten Bindungen, an den Träger gebunden werden. Als Folge der Enzymimmobilisierung können sich einige Eigenschaften der Enzyme ändern, wie die katalytische Aktivität oder Temperatur-Stabilität [227].

Die häufigsten Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen können in reversible und irreversible Methoden aufgeteilt werden. Irreversible Immobilisierungen verhindern, dass das Enzym, während die Reaktion stattfindet, ausgewaschen werden kann. Sobald die Enzymaktivität abklingt, muss der Träger zusammen mit Enzym verworfen werden. Reversible Immobilisierungen hingegen erlauben die Wiedergewinnung der Träger nach der Inaktivierung des Enzyms [231].

Irreversible Immobilisierungen beinhalten die kovalente Bindung des Enzyms an eine Oberfläche, den Einschluss in eine Matrix oder Mikroverkapselung. Bei der irreversiblen Immobilisierung wird der Biokatalysator an den Träger gebunden und kann nicht wieder von diesem gelöst werden ohne dabei die biologische Aktivität des Enzyms oder den Träger zu zerstören. Die häufigsten Verfahren zur irreversiblen Enzymimmobilisierung sind kovalente Kopplung, Einschlussimmobilisierung, Mikroverkapselung oder Quervernetzung (s. Abb. 15).

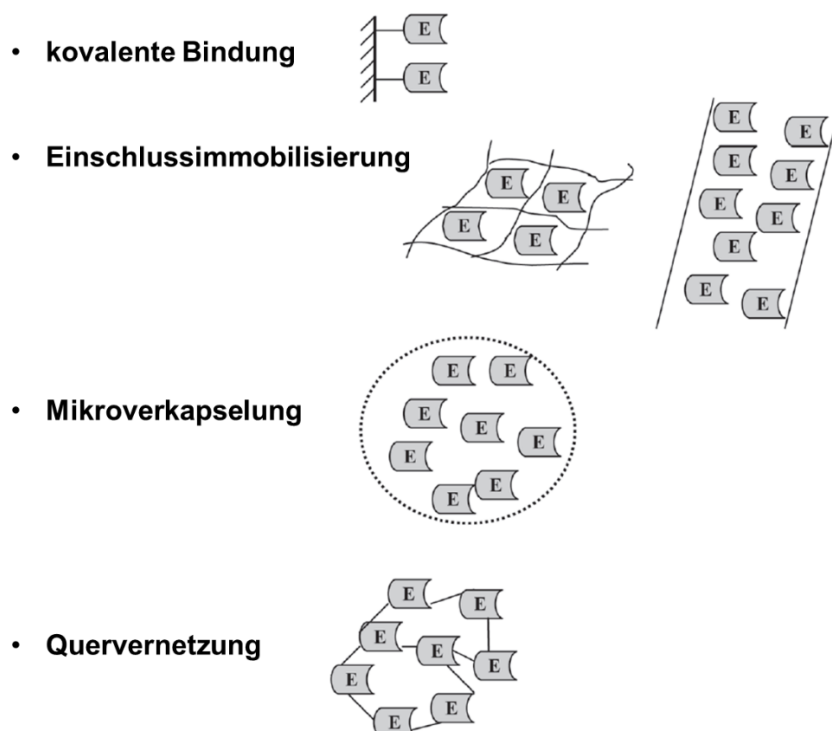


Abb. 15 Irreversible Methoden der Enzym-Immobilisierung (modifiziert nach [227])

Immobilisierung von Enzymen durch *kovalente Bindungen*, gehören zu den am häufigsten verwendeten Methoden. Ein Vorteil dieser Verfahren ist, dass aufgrund der stabilen Natur, die zwischen der Enzym und Matrix gebildeten Bindungen herrscht,

das Enzym während der Reaktion nicht in die Lösung freigesetzt wird. Um trotzdem eine hohe gekoppelte Aktivität zu erreichen, dürfen die essentiellen Aminosäure-Reste für die katalytische Aktivität nicht an der kovalenten Bindung an den Träger einbezogen werden. Eine Möglichkeit die Aktivitätsausbeute zu erhöhen, kann die Durchführung der Kopplung in Gegenwart von Substratanaloga sein [137, 227].

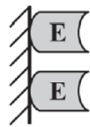
Eine Vielzahl von Reaktionen wurde in Abhängigkeit der funktionellen Gruppen, welche auf der Matrix vorhanden sind, entwickelt [232]. Im Allgemeinen können die Kopplungsmethoden in zwei Hauptklassen unterteilt werden: (1) Aktivierung der Matrix durch Zugabe einer reaktiven Funktion an ein Polymer und (2) Modifizierung des Polymergrundgerüsts, um eine aktivierte Gruppe zu erhalten. Die Aktivierungsprozesse sind i.d.R. so gestaltet die elektrophilen Gruppen auf dem Träger zu erhalten, die dann bei der Kopplung mit den Nucleophilen auf den entsprechenden Proteinen reagieren. Dabei sind die Grundprinzipien, wie das Steuern des Verlaufs der kovalenten Kopplung an den Matrices, analog zu denen, die für die chemische Modifikation von Proteinen verwendet werden. Bei kovalenter (Träger-)Bindung werden Enzyme über ihre Carboxyl-, Hydroxyl-, Sulfid- oder Amino-Gruppen an reaktive Gruppen bzw. Reste des Trägermaterials gekoppelt (Amid-, Ether-, Thioether-, oder Carbamat-Bindungen). Die am häufigsten verwendeten Reaktionen beziehen dabei die folgenden Seitenketten der Aminosäuren ein: Lysin (ϵ -Amino-Gruppe), Cystein (Thiol-Gruppe) und Asparaginsäure und Glutaminsäure (Carboxyl-Gruppe) [227]. Daher wird das Enzym stark an die Matrix gebunden und in vielen Fällen ebenfalls stabilisiert. Aufgrund der Natur der kovalenten Bindung, muss die Matrix bzw. der Träger jedoch zusammen mit dem Enzym verworfen werden, sobald die Enzymaktivität abnimmt. Der Vorteil dieser festen Bindung zwischen Enzym und Matrix bzw. Träger wird jedoch teilweise durch die Kosten, die im Allgemeinen geringere Ausbeute bei der immobilisierten Aktivität und durch den nicht-reversiblen Charakter dieser Bindung, aufgehoben [227].

Die *Einschlussverfahren* beruhen auf dem Einschluss eines Enzyms in einem polymeren Netzwerk, das das Substrat und die entsprechenden Produkte durchlässt, das Enzym jedoch zurückhält [233]. Diese Art der Immobilisierung unterscheidet sich von den oben beschriebenen Kupplungsmethoden, da das Enzym nicht an eine Matrix oder Membran gebunden ist. Dabei gibt es verschiedene Ansätze um ein Enzym einzuschließen, wie Gel- oder Faser-Einschluss und Mikroverkapselung. Allerdings ist

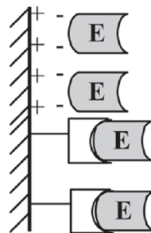
eine praktische Anwendung dieser Verfahren aufgrund des Massetransfers durch die Membranen oder Gele beschränkt [137, 227].

Bei der **reversiblen Immobilisierung** können, aufgrund der Art der Enzym-Träger-Bindung, die Enzyme unter schonenden Bedingungen wieder vom Träger abgetrennt werden (s. Abb. 16).

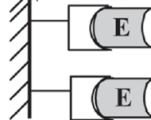
- **Adsorption**



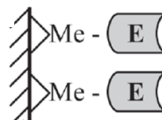
- **ionische Bindung**



- **Affinitätsbindung**



- **Chelat- oder Metall-Bindung**



- **Disulfidbrücken**

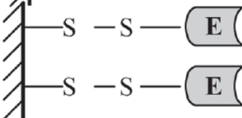


Abb. 16 Reversible Methoden der Enzym-Immobilisierung (modifiziert nach [227])

Die Verwendung von reversiblen Methoden zur Enzymimmobilisierung ist sehr attraktiv, vor allem aus wirtschaftlichen Gründen, da beim Abklingen der enzymatischen Aktivität der Träger regeneriert und wieder mit frischem Enzym beladen werden kann. Tatsächlich sind die Kosten für den Träger oft ein Hauptfaktor bei den Gesamtkosten des immobilisierten Katalysators [227]. Die reversible Immobilisierung von Enzymen ist besonders wichtig bei der Immobilisierung labiler Enzyme und bei den Anwendungen in bioanalytischen Systemen [234].

Die einfachste Methode ist die Immobilisierung durch nichtspezifische *Adsorption*, die hauptsächlich auf physikalischer Adsorption oder Ionenbindung basiert. Bei der physikalischen Adsorption werden die Enzyme durch Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen an eine Matrix gebunden. Immobilisierung durch Adsorption ist ein sanfter, leicht durchzuführender Prozess und in der Regel bleibt die katalytische Aktivität des Enzyms hierbei erhalten. Solche Verfahren sind daher wirtschaftlich attraktiv, können allerdings zu Problemen führen,

da es bei schwachen Wechselwirkungen zu Enzymaustritt aus der Matrix kommen kann [137, 227].

Die *Ionenbindung* basiert auf der elektrostatischen Anziehung positiv und negativ geladener Ionen. Eine offensichtliche Annäherung an diese reversible Immobilisierung von Enzymen sind die Protein-Liganden-Wechselwirkungen basierend dem Prinzip der Chromatographie. Diese Verfahren sind einfach und reversibel. Allerdings ist es i.d.R. schwierig die Bedingungen zu finden, unter denen das Enzym stark gebunden und vollständig aktiv ist. Probleme können insbesondere durch die Verwendung stark geladener Träger bei gleichzeitig geladener Substrate bzw. Produkte auftreten. Außerdem können sich Enzym-Eigenschaften, wie pH-Optimum und -Stabilität, ändern [137, 227, 235, 236].

Bei der *Affinitätsbindung* kommt es zu einer reversiblen Bindung zwischen komplementären Biomolekülen und dem Enzym. Dabei ist die außerordentlich hohe Selektivität dieser Interaktion ein großer Vorteil des Verfahrens. Allerdings erfordert dieses Verfahren oft die kovalente Bindung eines teuren Affinitätsliganden an eine Matrix [227].

Bei der *Chelat- oder Metall-Bindung* werden Übergangsmetallsalze oder Hydroxide an die Oberfläche eines organischen Trägers abgeschieden und durch Koordination mit den nukleophilen Gruppen an der Matrix gebunden. Das Metallsalz oder -hydroxid wird durch Erhitzen oder Neutralisation auf dem Träger ausgefällt (z.B. Cellulose, Chitin, Alginsäure und Siliziumdioxid basierende Träger). Aufgrund sterischer Faktoren ist es unmöglich, dass die Matrix alle Koordinationsstellen des Metalls besetzt. Somit bleiben einige der Positionen frei, um mit Gruppen der Enzyme zu koordinieren. Dieses Verfahren ist sehr einfach und die spezifischen Aktivitäten der immobilisierten Enzyme bleiben erhalten [227].

Bei der Bindung durch *Disulfidbrücken* wird eine stabile kovalente Bindung zwischen Matrix und Enzym gebildet, welche durch Reaktion mit einem geeigneten Mittel unter milden Bedingungen wieder aufgebrochen werden kann [227].

Eines der Hauptprobleme bei der Verwendung von immobilisierten Enzymen ist der Verlust an katalytischer Aktivität, insbesondere wenn die Enzyme auf makromolekulare Substrate wirken sollen. Durch den begrenzten Zugang des Substrats an das aktive Zentrum des Enzyms kann die Aktivität an den zugänglichen Oberflächengruppen des Substrats reduziert werden. Diese sterische Behinderung kann wiederum die charakteristischen Muster der Produkte, die aus dem

makromolekularen Substrat gebildet werden sollen, verändern. Es gibt verschiedene Strategien, um diese sterischen Probleme zu vermeiden, wie z.B. die Auswahl der Träger, oder die sorgfältige Wahl der Enzymreste, welche an der Immobilisierung beteiligt sind sowie die Verwendung von Abstandshaltern zwischen Träger und Enzym, sogenannte Spacer. Spacer sind längere Molekülketten zwischen Träger und Enzym. Durch den größeren Abstand des Enzyms zur Trägeroberfläche kann eine größere Beweglichkeit gewährleistet werden und eine damit verbundene höhere enzymatische Aktivität [227].

Wie bereits erwähnt ist die Wahl des Trägers bei der Immobilisierung ebenfalls wichtig. Die Eigenschaften der Matrix bzw. des Trägers sind bei der Bestimmung der Leistungsfähigkeit eines immobilisierten Enzymsystems von besonderer Bedeutung. Die Träger zur Immobilisierung können dabei entsprechend ihrer chemischen Zusammensetzung in organische und anorganische Trägermaterialien gruppiert werden. Organische Träger können wiederum in natürliche und synthetische Polymere unterteilt werden [227]. In Tab. 10 ist eine Klassifizierung der Trägermaterialien dargestellt.

Tab. 10 Klassifizierung von Trägermaterialien zur Immobilisierung nach [227]

Organisch
Natürliche Polymere
<ul style="list-style-type: none">• Polysaccharide: Cellulose, Dextrane, Agar, Agarose, Chitin, Alginate• Proteine: Collagen, Albumin• Kohlenstoff
Synthetische Polymere
<ul style="list-style-type: none">• Polystyrol• andere Polymere: Polyacrylat Polymethacrylate, Polyacrylamid, Polyamide, Vinyl und Allyl-Polymere
Anorganisch
natürliche Minerale: Bentonit, Silica (Kieselerde)
verarbeitete Materialien: Glas (nicht-porös und definierte Poren), Metalle, Metalloxide mit definierten Poren

Ideale Träger-Eigenschaften umfassen physikalische Druckfestigkeit, Hydrophilie, Inertheit, einfache Derivatisierung, Biokompatibilität, Resistenz gegen mikrobiellen Befall und Verfügbarkeit bei niedrigen Kosten.

In dieser Arbeit sollen die Enzyme über eine kovalente Bindung an einen magnetischen Träger gekoppelt werden. Dabei werden superparamagnetische Magnetit-Partikel verwendet, die in einer Matrix aus Polyvinylalkohol eingeschlossen

sind. Bei der kovalenten Bindung muss der Träger eine reaktive Gruppe, in diesem Fall Carboxyl-Gruppen, besitzen.

In der Literatur wurden bereits einige Methoden zur Immobilisierung von Glycosidasen zur Aromafreisetzung beschrieben (s. Tab. 11).

Tab. 11 Literaturdaten zur Immobilisierung von Glycosidasen

Quelle	Enzyme	Träger	Methode
[22–27, 237]	Glycosidase(n) aufgereinigt aus kommerziellem Enzym	Chitosan	Adsorption plus kovalente Bindung und/oder Quervernetzung mittels Glutaraldehyd
[238]	β -Glucosidase (<i>C. molischiana</i> 35M5N)	Ionenaustauscher	Ionenbindung
[29]	β -Glucosidase, rein	Ionenaustauscher	Ionenbindung
[239]	β -Glucosidase aufgereinigt aus kommerziellem Enzym	Amin-Agarose-Gel	Kovalente Bindung mittels Carbodiimid (EDC)
[20]	Glycosidasen aufgereinigt aus kommerziellem Enzym	Eupergit C, Acryl-Partikel, Epoxy-aktiviert	Kovalente Bindung
[240]	Cellulase	Magnetische Nanopartikel mit Aminogruppen	Kovalente Bindung mittels Glutaraldehyd
[241]	Cellulase	PVA magnetische Nanopartikel	Mikroemulsionssystem
[242]	Cellulase	Silica-beschichtete magnetische Partikel, aktiviert mit Cyanurchlorid	Kovalente Bindung
[243]	β -Glucosidase aus Mandeln	Magnetische Nanopartikel in Agarose	Adsorption
[244]	Lactase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Magnetische Partikel beschichtet mit Polyethylenimin	Quervernetzung mittels Glutaraldehyd
[245]	β -Glucosidase aufgereinigt (<i>A. niger</i>)	Magnetische Partikel beschichtet mit Polyethylenimin	Quervernetzung mittels Glutaraldehyd
[246]	β -Glucosidase rein (<i>A. niger</i>)	Magentische Nanopartikel	Quervernetzung mittels Glutaraldehyd

Dabei wurde eine Immobilisierung auf Chitosan am häufigsten publiziert [22–27, 237]. Bei der Immobilisierung von Glycosidasen auf Chitosan handelt es sich um eine Adsorption der Enzyme an das entsprechende Chitosan. Nachteilig bei einer „einfachen“ Adsorption der Moleküle ist die „lockere“ Bindung der Enzyme an das

Chitosan, sodass es zu einem Auswaschen der Enzyme in den Wein und zusätzlich zu einer leichten Inaktivierung der Enzyme kommt [24]. Außerdem ist die Halbwertszeit mit bis zu 80 Stunden relativ gering [237]. Eine anschließende Quervernetzung oder kovalente Bindung mit Glutaraldehyd verhinderte das Auswaschen und stabilisierte die Immobilisierung [24–27]. Die Reduktion der Schiff'schen Base, die durch die Reaktion zwischen Glutaraldehyd und dem Biokatalysator stattfindet, führte zu einer weiteren Abnahme der Enzymaktivität, jedoch zu einem erheblichen Anstieg der Stabilität des Immobilisats. Weitere Studien immobilisierten β -Glucosidasen auf Ionenaustauschern, um so glykosidisch gebundene Aroma-Komponenten aus Wein freizusetzen [28, 29, 238]. Vorteile dieser Methoden waren die Schnelligkeit (1 Stunde) und Effizienz (86 % an verbleibender Aktivität) der Immobilisierung [238]. Außerdem wurde keine Änderung im Aktivitätsprofil der β -Glucosidasen festgestellt. Spagna et al. (2000) immobilisierten kovalent eine β -Glucosidase auf einem Amin-Agarose-Gel mit Hilfe von einem Carbodiimid (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, Abk. EDC) [239]. Eine hohe Immobilisierungsausbeute und hohe Rest-Aktivität der β -Glucosidase konnte erreicht werden, allerdings lag die Halbwertszeit bei lediglich ca. 100 Stunden. Eine neuere Studie zur Immobilisierung von „Aroma-Enzymen“ von *A. niger* auf Epoxy-aktivierten Acryl-Partikeln zeigte eine erfolgreiche Immobilisierung der Enzyme mit einer anschließenden Steigerung des Aromas in einem Muskateller-Wein [20]. Die Immobilisierung bzw. -Ausbeute war pH-abhängig. González-Pombo et al. (2014) fanden bei einem pH von über 7,0 einen Rückgang der Immobilisierungsausbeute der Enzyme β -Glucosidase, Arabinosidase und Rhamnosidase, daher musste ein Kompromiss zwischen Ausbeute und Effizienz des Prozesses eingegangen werden [20]. Die kovalente Reaktion involvierte bei einem neutralen pH anfänglich die endständige Amino-Gruppe und wurde von den Seitenketten des Lysins (das häufigste Nukleophil auf der Protein-Oberfläche) gefolgt, was mit der Bildung einer sehr stabilen Amid-Bindung einherging [20]. Das zur Immobilisierung verwendete gelöste Enzympräparat war im pH-Bereich von 5 bis 9 unter den Immobilisierungsbedingungen sehr stabil (Erhaltung der Aktivität von 100 % bei β -Glucosidase, Arabinosidase und Rhamnosidase), daher deutet die Abnahme der exprimierten Aktivität des immobilisierten Biokatalysators bei pH-Werten über 7 wahrscheinlich auf Multipoint-Vernetzung der Enzyme zur Matrix hin, was zu Konformationsänderungen und Inaktivierungen der Enzyme führte.

Eine Enzym-Adsorption am Träger kann ein sehr schneller Prozess sein, die Etablierung einer kovalenten Bindung zwischen diesen hingegen ist ein langsamer Prozess, welcher die richtige Positionierung der Enzymgruppen zur starren Oberfläche des Trägers erfordert [20, 247, 248]. Aufgrund der entsprechenden Bedingungen war eine lange Inkubationszeit erforderlich, um hohe Immobilisierungsausbeuten zu erreichen. González-Pombo et al. (2014) erreichten eine maximale Ausbeute nach 4 Tagen [20].

Die Proteinbeladung beim Immobilisierungsprozess hatte ebenfalls einen entscheidenden Faktor auf die Ausbeute. Bei zu hohen Proteinkonzentrationen verringert sich der Anteil an gebundenem Protein wieder. González-Pombo et al. (2014) fanden als optimale Konzentration in Abhängigkeit der Effizienz eine Proteinkonzentration von 70 mg/g [20].

Nach einer Immobilisierung ändern sich des Öfteren die pH-Optima, was hauptsächlich von der verschiedenen Ionisierung der proteingeladenen Gruppen durch die Träger-Eigenschaften abhängig ist [22, 237]. Bei González-Pombo et al. (2014) hingegen zeigten sich keine Änderung der pH-Optima (pH 4,0 – 4,5) der drei untersuchten Glycosidasen im Vergleich zu den dazugehörigen löslichen Enzymen [20]. Die pH-Stabilitätsprofile waren ebenfalls nicht signifikant anders (pH 3 – 8). Dieses kommerzielle Enzympräparat war bereits unter Weinbedingungen sehr stabil, durch die Immobilisierung konnte dieses weiter stabilisiert werden [20].

Kommerzielle Enzympräparate beinhalten neben verschiedenen Glycosidase-Aktivitäten, auch andere nicht gewollte Nebenaktivitäten [19]. Daher ist es bei einer Immobilisierung i.d.R. oft besser reine Enzyme zu verwenden. Abgesehen von der nach González-Pombo et al. (2014) beschriebenen Immobilisierungsmethode [20], wurden bei den anderen erwähnten Methoden die kommerziellen Enzympräparate vor der Immobilisierung aufgereinigt. Allerdings ist eine Glycosidase-Aufreinigung vor der Immobilisierung ein komplizierter Prozess, welcher die Kosten erhöht, eine industrielle Anwendung begrenzt und mit einem Verlust an Stabilität der Enzyme einhergeht [20, 218].

Eine Immobilisierung von Glycosidasen zur Weinaromaverbesserung an magnetische Träger wurde bislang noch nicht publiziert. Es gibt einige Publikationen hinsichtlich der Immobilisierung von β -Glucosidasen zur Verzuckerung von Cellulosen [243, 245, 246]. Dabei wurden die Enzyme u.a. mittels Glutaraldehyd an magnetische Partikel [245,

246] oder über Absorption auf an Agarose gekoppelte magnetische Nanopartikel [243] immobilisiert.

Eine andere Voraussetzung für die direkte Immobilisierung an magnetische Oberflächen kann die Aktivierung der Fe-OH-Bindungen mit einem Carbodiimid sein [249] bzw. besitzt die Träger-Oberfläche Carboxyl-Funktionen, ist solch eine Art der Aktivierung besonders denkbar. Diese Immobilisierung mit einem Carbodiimid bewirkt eine stabile Amid-Bindung zwischen dem Träger und dem Enzym [250–254].

Ein weiterer Aspekt der mit Magnetit-(Nano-)Partikel verbunden ist, stellt der Einfluss der freiliegenden Eisen-Stellen auf der Oberfläche dar. Es gibt Berichte über Enzyme, die ihre Aktivität aufgrund von Eisen-Komplexen [255] oder beim Auftreten von Cystein-Reaktionen mit Ferrihydrit(FeOOH)-Stellen an eisenoxidhaltigen Nanopartikeloberflächen verlieren [256].

Die Katalyse der Hydrolyse von Cellulose in Glucose wird durch Cellulasen (EC 3.2.1.4) durchgeführt, zu den auch die Glycosidasen gehören. Verschiedene Immobilisierungsverfahren wurden dabei bereits durchgeführt, um eine magnetisch-gekoppelte Cellulase zu erhalten. Bei diesen Verfahren wurde z.B. eine direkte Immobilisierung an magnetische Träger [240] und eine Immobilisierung an magnetische Polyvinylalkohol/ Fe_2O_3 -Nanopartikel erfolgreich durchgeführt [241]. Pan et al. (2009) immobilisierten eine β -Galactosidase mittels Glutaraldehyd an magnetische Fe_3O_4 -Chitosan-Nanopartikel und erreichten dabei ähnliche pH und Temperatur-Stabilitäten, eine gute Wiederverwendbarkeit und Lagerstabilität [257].

Die Größe und Oberfläche der verwendeten Träger ist ebenfalls ein wichtiges Kriterium. Poröse Träger haben den Vorteil, dass diese eine große Oberfläche aufweisen und somit die Enzym-Beladung pro Masse-Einheit hoch ist. Allerdings kommt es bei porösen Trägern bzw. Materialien zu Begrenzung bei der Diffusion des Substrats zum Enzym und dadurch zu geringeren Umsatzraten [258]. Bei nicht-porösen Trägern kommt es zu fast keiner Begrenzung der Diffusion, nachteilig ist hier die geringere Enzym-Beladung auf dem Träger [30]. Die Immobilisierung von Enzymen auf Nanomaterialien bzw. magnetischen Nanopartikeln kann daher interessant sein, da sich aufgrund der kleineren Partikel die Oberfläche pro Masse-Einheit deutlich vergrößert und somit eine höhere Enzym-Beladung erreicht werden kann [259]. Allerdings kann es besonders bei industriellen Applikationen zu Problemen bei der vollständigen Rückgewinnung der Nanopartikel kommen [30]. Daher muss bei der

Größe der magnetischen Partikeln zwischen Oberfläche pro Masse-Einheit und einer möglichst vollständigen Magnet-Separation abgewogen werden.

Des Weiteren ist eine Multi-Enzym-Immobilisierung an magnetische Träger eine große Herausforderung, da es schwierig ist den besten Immobilisierungsträger und die geeignetste Kopplungsmethode vorherzusagen. Einige Fortschritte in diesem Bereich wurden in letzter Zeit beschrieben [231], allerdings wurden hier mehrere Enzyme in ihrer reinen Form an magnetische Partikel immobilisiert.

Viele der beschriebenen Immobilisierungsmethoden binden die Enzyme mit Glutaraldehyd an den entsprechenden Träger. Aufgrund der Toxizität für Mensch und Umwelt und der damit verbundenen Entsorgungsproblematik [260] wurde auf die Verwendung von Glutaraldehyd verzichtet. In Abstimmung mit dem Arbeitskreis Kampeis (Umweltcampus Birkenfeld) und aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit der Partikel, wurden superparamagnetische Magnetit-Partikel, die in einer Matrix aus PVA (Polyvinylalkohol) eingeschlossen und mit Carboxyl-Gruppen funktionalisiert sind, verwendet. Um eine möglichst vollständige Rückgewinnung der Partikel zu gewährleisten, fiel die Entscheidung zugunsten von Mikropartikeln mit Durchmessern von 1 bis 3 μm . Diese Entscheidung fiel u.a. auch, da es bei Verwendung von Nanopartikeln zu Problemen bei der vollständigen Rückgewinnung kommen kann [30]. Somit geben die beschriebenen Erkenntnisse erste Hinweise auf mögliche Einflussfaktoren bei der Immobilisierung von Glycosidasen auf entsprechenden Trägern. Allerdings sind die entsprechenden Studien nur bedingt vergleichbar, da entweder andere Träger, Enzyme oder Kopplungsmethoden, als für diese Arbeit vorgesehen, verwendet wurden. Aufgrund der Funktionalisierung der Magnetit-Gruppen mit Carboxyl-Gruppen ist eine Immobilisierung mit Hilfe eines Carbodiimid interessant, um eine stabile Kopplung zwischen Partikel und Enzym zu erreichen.

2.4 Toxizität magnetischer Partikel

Bei den in dieser Arbeit zur Immobilisierung verwendeten Partikeln handelt es sich um superparamagnetische Magnetit-Partikel, die in einer Matrix aus PVA (Polyvinylalkohol) eingeschlossen sind. Da die Partikel im Wein eingesetzt werden sollen und eine vollständige Abtrennung durch eine Magnet-Separation nicht zu 100 % gewährleistet werden kann, müssen die Partikel auch bezüglich einer möglichen Toxizität für den Menschen betrachtet werden.

Die Zytotoxizität von PVA-beschichteten magnetischen Partikeln mit verschiedenen Formen und Morphologien (z.B. Nanokugeln, Nanostäbchen, Magnetit kolloidaler Nanokristallcluster und Nano-Partikel) wurde in Maus-Fibroblasten-Zellen und menschliche Leukämiezellen umfassend von Mahmoudi et al. (2009) untersucht [261, 262]. Dabei kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass solche Partikel keine oder nur eine kleine Toxizität zeigten. Karlsson et al. (2008) untersuchten die Toxizität der Partikel (20 und 40 µg/ml) in menschlichen Lungenkrebszelllinien und konnten weder DNA-Schäden noch intrazelluläre ROS (Reaktive Sauerstoffspezies, engl. reactive oxygen species – auch oft ungenau als „Sauerstoffradikale“ bezeichnet) als toxische Effekte finden [263]. Allerdings wurden kleine oxidative DNA-Schäden festgestellt. Eine andere Studie untersuchte den Effekt der Partikel auf den Zellzyklus und bestätigte den Verbleib in der G0/G1-Zellzyklus-Lücke [264]. Neuere Untersuchungen von Mahmoudi et al. (2009 und 2010) beobachteten die Existenz von Gas-Vesikeln an mit Partikeln behandelten Zellen bei zunehmender Körnung der Zellen [265, 266]. Es wurde angenommen, dass die Autophagozytose eine mögliche Ursache der Zytotoxizität sein kann. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass die In-vitro-Zytotoxizitätsstudien aufgrund der großen Menge an Proteinabsorption auf der Oberfläche der Partikel, größere Fehler in den Ergebnissen enthalten sein können. Eine weitere Studie verwendete eine andere, modifizierte Methode, um dieses Problem zu umgehen bzw. auszuschließen [267]. Dabei wurden die magnetischen Nanopartikel in ein Zellmedium gegeben und für eine Zeitspanne von 24 h mit der Lösungen in Kontakt gelassen um eine stabile Proteinkorona auf der Oberfläche der Partikel zu schaffen. Das Medium wurde anschließend durch ein frisches Medium ersetzt und die daraus erhaltenen Partikel wurden für die Toxizitätsassays verwendet. Dadurch konnten die Fehler im Vergleich zu konventionellen In-vitro-Methoden (Nanopartikel können wesentliche Veränderungen im Zellmedium verursachen, z.B. durch Denaturierung von Proteinen, die wiederum Zytotoxizität verursachen) deutlich

reduziert werden. Die aus der Verwendung dieses modifizierten Ansatzes resultierenden Ergebnisse, zeigten eine deutlich verringerte Toxizität der Nanopartikel [267, 268].

Außerdem ist das Verständnis der Interaktionen zwischen diesen Nanopartikeln und den Proteinen sehr wichtig. In einer biologischen Flüssigkeit können Proteine adsorbiert oder auf Nanopartikeln gebunden sein und die Adsorption kann einen signifikanten Effekt auf das biologische, biochemische und zelluläre Verhalten ausüben. Daher bildet die Nanopartikel-Protein-Interaktion eine Schlüsselfrage, um die Toxizität der Nanopartikel definieren zu können [267, 269]. Genauer gesagt, kann die Denaturierung der Proteine nach der Wechselwirkung mit solchen Partikeln, zum Freilegen neuer antigener Stellen führen, die dann eine neue Immunreaktion auslösen könnten [270].

Bei den angeführten Studien wurden jeweils Nanopartikel (typischerweise bei 1 bis 100 nm) untersucht und es wurde keine bis nur eine geringe Toxizität der Nanopartikel gefunden. Da in dieser Arbeit typischerweise Mikropartikel (1 – 3 μm) Verwendung finden, ist von einer geringen bis zu keiner Toxizität der Partikel auszugehen, da die Partikel in aller Regel zu groß sind, um die Zellbarriere zu durchdringen und daher mit großer Wahrscheinlichkeit einfach wieder unverändert ausgeschieden werden.

3 Methoden

Einige Methoden (Proteinbestimmung, Eisenbestimmung, etc.) werden in diesem Kapitel nur kurz dargestellt und die genaue Durchführung sowie die Validierungsparameter befinden sich im Anhang (Kapitel 7.4). Bei den betreffenden Methoden wird auf das entsprechende Kapitel im Anhang verwiesen.

3.1 Allgemeines

3.1.1 Temperierung

Alle Proben wurden, sofern nichts anderes angegeben, vor der jeweiligen Untersuchung auf 20 °C temperiert.

3.1.2 Kalibrierung

Aus den Regressionsgeraden, Auftragung der Konzentration der verwendeten Standards gegen die Peakfläche (chromatographische Methoden) bzw. gegen die Extinktion (bei photometrischen Methoden), wurden die entsprechenden Kalibrierfunktionen ermittelt. Über diese konnten dann die Konzentrationen des jeweiligen Parameters für die entsprechende Probe bestimmt werden.

3.1.2.1 Präzision (Wiederholstandardabweichung)

Zur Ermittlung der Wiederholstandardabweichung (Verfahrensstandardabweichung) wurden geeignete Standards bzw. Proben 10-fach gemessen.

3.1.2.2 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen

Zur Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen wurde die DIN 32645 (Stand November 2008) und die darauf basierende Excel-Vorlage von [271] herangezogen. Die jeweiligen Berechnungen erfolgten mittels zugehöriger Gleichungen der Kalibriermethode.

3.1.2.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen chromatographischer Methoden

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 bzw. 10:1 des kleinsten Kalibrierstandards herangezogen [272].

3.1.2.4 Signifikanz

Die Datenanalyse und Prüfung auf Signifikanzniveaus in dieser Arbeit basieren auf der einfaktoriellen Varianz-Analyse (ANOVA) unter Verwendung des Microsoft Office

Excel (2013) Add-Ins Analysis ToolPak. Lineare Regressionen und mathematische Berechnungen erfolgten mittels Microsoft Excel 2013.

3.1.3 Verwendete Weine

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden ein Gewürztraminer (Moselland eG Winzergenossenschaft) und ein Morio Muskat (Rheinberg Kellerei), beide Jahrgang 2014, verwendet. Diese Rebsorten zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an glykosidisch gebundenen Aromastoffen aus [16]. Bei den Versuchen zur Separation der Magnetit-Partikel wurde ein Verschnitt von Weißweinen aus verschiedenen Ländern der europäischen Gemeinschaft (Rheinberg Kellerei, 9,5 Vol.-%) verwendet.

3.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt ist der wichtigste Referenzwert, um die spezifische Aktivität von Enzympräparaten zu bestimmen. Es gibt verschiedene Methoden diesen zu bestimmen [137]. Bei biologischen Proben handelt es sich normalerweise um Mischungen verschiedener Proteine. Unterschiedliche Proteine verhalten sich bei der Quantifizierung, entsprechend der Aminosäure-Zusammensetzung, unterschiedlich. Außerdem können verschiedene Stoffe, die sich neben den Proteinen in der Probelösung befinden, die Bestimmung stören. Aus den erläuterten Umständen ist es daher erklärlich, dass die unterschiedlichen Methoden zur Quantifizierung von Proteinen abweichende Ergebnisse liefern. Die Angabe der verwendeten Methode ist somit unerlässlich, um die Ergebnisse beurteilen bzw. reproduzieren zu können.

In der Biochemie wird oft die Bradford-Methode angewendet [137]. Bei dieser Methode reagiert ein Farbstoff direkt mit Seitenketten der Aminosäuren, daher eignet sich diese Methode nicht zur Bestimmung von immobilisiertem Protein bzw. Enzym. Daher wird dort der Proteingehalt mittels Kjeldahl-Methode indirekt über den Stickstoffgehalt bestimmt. Bei dieser Methode werden die Proteine bzw. Enzyme vollständig hydrolysiert. Die Bindung zwischen Enzym und Träger stellt somit kein Problem dar.

3.2.1 Kjeldahl-Methode

Die Proteinbestimmung nach der Kjeldahl-Methode gehört zu den ältesten Methoden. Diese Methode beruht auf der reduzierenden Veraschung der Probe und der damit verbundenen Freisetzung des gesamten Stickstoffs als Ammoniak. Dieser wird mittels Wasserdampfdestillation abgetrennt und der Ammoniak über Titration quantifiziert. Es lässt sich also der relative Gesamt-Stickstoffgehalt einer Probe bestimmen. Darüber kann der Proteingehalt dann näherungsweise errechnet werden [137, 273].

Die Probe wird mit einer starken Säure (konz. Schwefelsäure) und einem Katalysator aufgeschlossen (Kjeldahl-Aufschluss). Dadurch wird der im Protein gebundene Ammoniumstickstoff aus der organischen Matrix freigesetzt und als Salz der verwendeten Säure gebunden. Der im Protein gebundene Stickstoff, bzw. Ammoniak (NH_3), wird als charakteristischer Bestandteil der Proteine quantifiziert. Nach dem Aufschluss wird die Probe mit einem Überschuss an Natronlauge versetzt, der Ammoniak wird dadurch ausgetrieben bzw. freigesetzt und in eine Borsäurevorlage destilliert. Der in der Borsäure gebundene Ammoniak kann nun über eine Titration mit Schwefelsäure-Lösungen quantifiziert werden.

Um vom Stickstoffgehalt Rückschlüsse auf das in der Probe vorhandene Protein ziehen zu können, benötigt man Umrechnungsfaktoren, die vom Stickstoffgehalt der Einzelproteine abhängen (Aminosäure-Zusammensetzung und -anzahl). Ein Standardprotein enthält 16 % Stickstoff, daher wird der Faktor 6,25 immer dann verwendet, wenn keine anderen Vorgaben vorhanden sind.

Die entsprechende Durchführung und die Validierungsparameter sind im Anhang (s. Kapitel 7.4.1.1) dargestellt.

3.2.2 Bradford-Methode

Bei der Bradford-Methode reagieren Proteine mit einem Farbstoff (Coomassie Brilliant Blue). Dieser Farbstoff kann je nach pH-Wert in verschiedenen Formen vorliegen, wobei die Form in direktem Zusammenhang mit der jeweiligen Form steht. Binden Proteine an den Farbstoff, ist die blaue Form am stabilsten. Dabei konjugieren vor allem basische und unpolare Aminosäuren an den Farbstoff. Der gebildete Protein-Farbstoff-Komplex kann anschließend photometrisch quantifiziert werden [137, 274]. Der ungebundene Farbstoff besitzt sein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch Komplexbildung mit den Proteinen wird der Farbstoff zu seiner typisch blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich entsprechend auf 595 nm [275]. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes liegt sehr viel höher als der des ungebundenen Farbstoffes. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Protein-Komplexes kann mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagenz photometrisch bestimmt werden und ist somit ein Maß für die Protein-Konzentration einer Probe.

Allerdings ist das Ausmaß der Farbreaktion von Protein zu Protein verschieden, da die Farbreaktion abhängig vom Gehalt an aromatischen und basischen Aminosäuren ist. Eine Kalibrierung wird meist mit Standardproteinen durchgeführt [i.d.R. Rinderalbumin (BSA, engl. bovine serum albumin)]. Die Bradford-Methode ist aufgrund der vom Gehalt an aromatischen und basischen Aminosäuren abhängigen Farbreaktionen an diesem Punkt ungenau. Allerdings bietet der Bradford-Test eine hohe Sensitivität, sowie eine einfache und schnelle Durchführung.

Die entsprechende Durchführung und die Validierungsparameter sind im Anhang (s. Kapitel 7.4.1.2) dargestellt.

3.3 Enzymaktivität

In der Literatur wurden zahlreiche Methoden zur Aktivitätsbestimmung von β -Glucosidasen und anderen Glycosidasen beschrieben [21, 23, 115, 117, 171, 174, 175, 276–281]. Die meisten dieser Methoden basieren auf der von Blondin et al. (1983) veröffentlichten Methode [276]. Dabei handelt es sich prinzipiell um ein β -glykosidisch gebundenes Glykosid und in den meisten Fällen fungiert *p*-Nitrophenol (pNP) als Aglykon (*p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid, kurz pNPG). Nach Spaltung der glykosidischen Bindung durch die entsprechende Glycosidase kann das freigesetzte *p*-Nitrophenol anschließend photometrisch erfasst werden. In der RESOLUTION OENO 5/2007 des internationalen önologischen Kodexes wurde ebenfalls eine β -D-Glucosidase-Aktivität mittels pNPG dargestellt.

Daneben beschreibt eine weitere Methode von Sigma-Aldrich die Erfassung der Aktivität der β -Glucosidase über das natürliche Glykosid Salicin [282]. Dabei wird die aus dem Salicin freigesetzte Glucose nach Nelson (1944) und Somogyi (1952) bestimmt [283, 284]. Der Nachteil dieser Methode ist, dass diese deutlich zeitintensiver und aufwendiger ist. Außerdem bereitet eine Erfassung der Aktivität über die freigesetzte Glucose Probleme bei einer Änderung der Bedingungen, z.B. um den Einfluss von Glucose oder Fructose auf eine β -Glucosidase zu erfassen. Eine photometrische Bestimmung des *p*-Nitrophenol bietet außerdem den Vorteil, dass unmittelbar nach der Inkubation der Proben, diese photometrisch ohne weitere Aufarbeitung vermessen werden können. Romero et al. (1985) haben einen Vergleich der pNP-Methode (α -L-Rhamnosid) mit einer HPLC-Methode publiziert [204]. Laut Romero et al. (1985) bietet eine photometrische Aktivitätsbestimmung der β -Glucosidase mittels pNPG ebenfalls zahlreiche Vorteile [204]. Die Methode ist spezifisch für die Bestimmung der entsprechenden Glycosidase-Aktivität, im Gegensatz zur photometrischen Methode von Nelson-Somogyi für reduzierende Zucker [283, 284]. Die photometrische Methode ist genauso spezifisch wie die HPLC-Variante, allerdings deutlich schneller und günstiger. Hinzu kommt eine hohe Sensitivität dieser Methode für pNP unter alkalischen Bedingungen.

3.3.1 Prinzip

Die Enzymaktivität des jeweiligen Enzyms (β -Glucosidase, Arabinosidase, Rhamnosidase, Xylosidase) wurde mittels entsprechenden synthetischen Glykosiden, *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (pNPG), *p*-Nitrophenyl- α -L-Arabinofuranosid

(pNPA), *p*-Nitrophenyl- α -L-Rhamnopyranosid (pNPR) und *p*-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranosid (pNPX), bestimmt. Die Enzyme sind substratspezifisch und spalten dementsprechend nur die glykosidische Bindung des entsprechenden Glykosids. Das *p*-Nitrophenol wird freigesetzt. Die Reaktion wird mit Natriumcarbonat abgestoppt. Im alkalischen Milieu ist das *p*-Nitrophenol gelb und das freigesetzte *p*-Nitrophenol kann bei dem Absorptionsmaximum von 400 nm über den molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt werden. Anhand der Menge an freigesetztem *p*-Nitrophenol kann dann die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Zeit berechnet werden.

3.3.2 Definition Enzymaktivität

Enzymaktivität ist die Fähigkeit eines Enzyms, als biochemischer Katalysator Stoffumsetzungen zu beschleunigen. 1961 wurde für quantitative Vergleiche die "Internationale Einheit" (engl. unit, U) eingeführt. Dabei entspricht 1 U derjenigen Enzymmenge, die unter definierten Reaktionsbedingungen 1 μ mol Substrat pro Minute umsetzt [28, 137]. Nach dem internationalen Maßsystem (SI-Einheiten) ist Katal die gültige Einheit für Enzymaktivität, wobei 1 Katal (abgekürzt kat) einem Stoffumsatz von 1 mol pro Sekunde entspricht. Genauer ausgedrückt, 1 nkat entspricht 1 nmol freigesetztes pNP pro ml Enzym-Lösung bzw. mg Enzym [137, 211]. Allerdings ist die ältere Definition U noch weitgehend in Gebrauch (Umrechnung: 1 U = $16,67 \cdot 10^{-9}$ kat = 16,67 nkat). In dieser Arbeit wurde die Enzymaktivität nach dem internationalen Maßsystem in der SI-Einheit kat bzw. nkat angegeben. Die katalytische Aktivität eines Enzyms wird also unter definierten Versuchsbedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur, Art des Puffers, Co-Faktoren) ermittelt. Die Wirkung des Enzyms bei einem solchen Reaktionsansatzes wird als Geschwindigkeit des Substratumsatzes oder Produktbildung gemessen.

Enzymeinheiten dienen als wichtige Kontrollgröße bei der Anreicherung und Reindarstellung von Enzymen. Bei der spezifischen Aktivität eines Enzyms wird die katalytische Aktivität auf den Proteingehalt des Enzympräparates bezogen, üblicherweise in U bzw. kat pro mg [137].

3.3.3 Durchführung

Tab. 12 Photometrie-Parameter zur Bestimmung der Enzymaktivität

Photometer	Lambda 25, Fa. PerkinElmer
Wellenlänge	400 nm
Küvetten	1 cm PP-Makroküvette
Messung	gegen Wasser

Die Methode zur Enzym-Aktivitätsbestimmung basiert auf den Methoden von Blondin et al. (1983), Martino et al. (1994) und Spagna et al. (2002) [276], [27, 285].

Die Aktivität wurde mit den entsprechenden synthetischen Glykosiden, *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (pNPG), *p*-Nitrophenyl- α -L-Arabinofuranosid (pNPA), *p*-Nitrophenyl- α -L-Rhamnopyranosid (pNPR) und *p*-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranosid (pNPX), durchgeführt. Dazu wurde zuerst eine 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer nach McIlvaine (1921) mit den entsprechenden pH-Werten hergestellt [286]. Die weiteren Bedingungen wurden den möglichen Parametern im Wein angepasst (s. Kapitel 2.1.2). Die Schwefeldioxid-Gehalte wurden aufgrund der gesetzlich vorgeschriebenen Höchstmengen und der Tatsache, dass unter sauren Bedingungen 50 % des Kaliumdisulfits zu SO₂ zerfallen, festgelegt [38]. Anschließend wurden die Substratlösungen pNPG (5 mM) und pNPA, pNPR und pNPX (je 1,5 mM) [27] in der entsprechenden Puffer-Lösung gelöst. Die Substratlösungen wurden erst kurz vor jeder Messung hergestellt. Für die Enzym-Lösungen wurden die entsprechenden Enzyme in Wasser gelöst. Die Enzym-Lösungen wurden an jedem Versuchstag neu angesetzt, jeweils im Duplikat und zwischen den Messungen wurden die Enzymlösungen kühl (ca. 4 °C) gelagert. Zum Abstoppen des Reaktionsmixes wurde ein 1,0 M Na₂CO₃-Puffer (Stopp-Reagenz) hergestellt.

0,9 ml der Substratlösung wurden im Reagenzglas in einem Wasserbad temperiert. Zum Starten der Reaktion wurden 0,1 ml der Enzym-Lösung dazugegeben, mit dem Vortex-Mixer gemischt und entsprechend für 5 – 30 min inkubiert. Für den Blindwert wurde analog dazu, anstelle der Probe-Lösung, die gleiche Menge an Wasser dazugegeben. Danach wurde die Enzym-Reaktion sofort durch Zugabe von 2 ml des Stopp-Reagenzes (1 M Na₂CO₃) gestoppt und mit dem Vortex-Mixer gemischt. Die Proben wurden anschließend zügig vermessen, da sich das Glykosid im alkalischen Milieu langsam weiter zersetzt [287]. Die Proben wurden in eine Messküvette gegeben und bei 400 nm die Absorption des freigesetzten pNP erfasst.

Bei der Aktivitätsmessung der immobilisierten Enzyme wurden diese nach dem Abstoppen der Reaktion mittels Membranfilter (PET, 0,2 µm) abgetrennt und die erhaltene klare Lösung anschließend ebenfalls photometrisch vermessen.

Die Messungen wurden im Duplikat durchgeführt.

Die Aktivität der freien und immobilisierten Glycosidase wurde entsprechend der genannten Verfahren bestimmt und als Funktion folgender Parameter dargestellt:

- pH-Wert (2,8 – 8,0)
- Temperatur (15 – 37 °C)
- Ethanol (0 – 15 Vol.-%)
- Glucose (0 – 100 g/l)
- Fructose (0 – 200 g/l)

Als Bezugs- bzw. Referenzpunkt wurde jeweils pH 5,0 und 37 ° C gewählt.

3.3.4 Auswertung

Die Menge an freigesetztem *p*-Nitrophenol wurde über den molaren Extinktionseffizient von 18300 M⁻¹ cm⁻¹ bei 400 nm bestimmt [288].

Die Berechnung des freigesetzten *p*-Nitrophenols erfolgt über Gl. 1.

$$c = \frac{\Delta A}{\varepsilon * d} = \frac{\Delta A}{0,0000183 \text{ nMol/l} * 1 \text{ cm}} \quad \text{Gl. 1}$$

A = Absorption

A = A_{Probe} - A_{Blindwert}

ε = molarer Extinktionseffizient von pNP

d = Schichtdicke Küvette = 1 cm

Die Aktivität des Enzyms wurde in Katal (kat) angegeben. 1 kat entspricht der Menge an Enzym, die 1 Mol Substrat pro Sekunde unter den gegebenen Bedingungen freisetzt (s. Gl. 2).

$$\frac{\text{nkat}}{\text{mg}} = \frac{\text{nMol freigesetztes pNP im RM}}{\text{Sekunden} * \frac{\text{mg}}{\text{RM}}} \quad \text{Gl. 2}$$

Die Enzymaktivität wurde entweder direkt auf die Menge an verwendetem Enzympräparat oder auf den Proteingehalt der Enzympräparate bezogen (spezifische Aktivität):

mg_E = Menge an eingesetztem Enzympräparat

mg_P = Proteingehalt des eingesetzten Enzympräparates

Gleiches gilt für die immobilisierten Enzyme, dort wurde die Enzymaktivität entweder auf die Partikel-Konzentration oder den Proteingehalt des Immobilisats bezogen.

3.3.5 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze für p-Nitrophenol wurden gemäß Kapitel 3.1.2.1 bestimmt.

Tab. 13 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze für p-Nitrophenol

Analyt	Nachweisgrenze [μM]	Erfassungsgrenze [μM]	Bestimmungsgrenze [μM]
p-Nitrophenol	0,609	1,218	1,966

Tab. 14 Wiederholstandardabweichung/Variationskoeffizient von p-Nitrophenol (n=10)

Präzision				
Analyt	WF	MW [μM]	s [μM]	VK [%]
p-Nitrophenol	100,7 %	6,672	0,175	2,63

3.4 Enzymkinetik

Die Enzymkinetik ist ein Maß für die Geschwindigkeit enzymkatalysierter chemischer Reaktionen. Ein Hauptziel ist die Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit, sowie die Bestimmung der dazugehörigen Parameter bzw. Einflussfaktoren für ein bestimmtes Enzym.

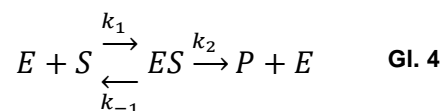
3.4.1 Allgemeines

Die Theorie zur Beschreibung dieser kinetischen Zusammenhänge wurde zuerst von Henri (1903) und schließlich von Michaelis und Menten (1913) aufgestellt. Die zentrale Gleichung dieser Theorie ist die Michaelis-Menten-Gleichung (s. Gl. 3) [137, 289].

$$v = \frac{v_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Gl. 3}$$

mit v: Reaktionsgeschwindigkeit [mol/(l min)]
 [S]: Substratkonzentration [mol/l]
 K_M : Michaelis-Konstante [mol/l]
 v_{max} : maximale Geschwindigkeit [mol/(l min)]

Für die Herleitung der Michaelis-Menten-Gleichung wurde folgender Reaktionsverlauf angenommen (s. Gl. 4):



Im ersten Schritt bilden dabei Enzym (E) und Substrat (S) mit der Geschwindigkeitskonstante k_1 einen sogenannten Enzym-Substrat-Komplex (ES-Komplex), welcher wieder mit der Geschwindigkeitskonstante k_{-1} zerfallen kann. Beim zweiten Schritt, welcher durch die geschwindigkeitsbestimmende Geschwindigkeitskonstante k_2 bestimmt ist, wird das Substrat in das entsprechende Produkt (P) umgewandelt und das Enzym wieder freigesetzt. Dabei ist die Umsetzung des ES-Komplexes deutlich langsamer als die Rückreaktion ($k_2 \ll k_{-1}$) [289].

Zur weiteren Lösung des Problems müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Die Substratkonzentration [S] wird als deutlich größer als die Enzymkonzentration [E] angenommen ($[S] \gg [E]$), dadurch kann die freie Substratkonzentration als ungefähr gleich angenommen werden ($[S]_f \sim [S]$). Außerdem dürfen sich in der Anfangsphase keine andere Zwischenprodukte als der ES-Komplex gebildet werden, um so die gesamte Enzymkonzentration [E] aus der freien

Enzymkonzentration $[E]_f$ und der Konzentration der ES-Komplex $[ES]$ berechnen zu können (s. Gl. 5).

$$[E] = [E]_f + [ES] \quad \text{Gl. 5}$$

Die Konzentration des ES-Komplexes $[ES]$ muss als letzter Punkt durch Bildung und Zerfall in der Anfangsphase konstant bleiben, dadurch gilt:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad \text{Gl. 6}$$

Somit liegt ein quasi-stationärer Zustand (steady state) vor. Mit diesen Annahmen verallgemeinerten Briggs und Haldane (1925) [290] die Herleitung von Michaelis und Menten [289].

$[ES]$ ist damit abhängig von der Geschwindigkeit der Bildung (bestimmt durch k_1) und der Verlustrate des Komplexes (bestimmt durch k_{-1} und k_2). Für Bildung und Zerfall des ES-Komplexes können folgende Gleichungen aufgestellt werden (s. Gl. 7 und Gl. 8) [289]:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E]_f[S]_f \quad \text{Gl. 7} \quad \text{und} \quad -\frac{d[ES]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \text{Gl. 8}$$

Mit der Annahme des quasi-stationären Zustands und einer Umstellung nach $[ES]$ wird folgende Gleichung erhalten:

$$[ES] = \frac{[E]_f[S]_f}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad \text{Gl. 9}$$

Damit wird nun die Michaelis-Konstante K_M als Abkürzung für die kinetische Konstante im Nenner der rechten Seite der Gl. 9 eingeführt:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Gl. 10}$$

$[E]_f$ kann durch $([E]-[ES])$ und $[S]_f$ mit $[S]$ (Substratabbau ist in der stationären Phase unbedeutend) ersetzt werden, daraus ergibt sich:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M + [S]} \quad \text{Gl. 11}$$

Mit $v = k_2 [ES]$ für eine Reaktion pseudo-erster Ordnung wird folgende Gleichung erhalten:

$$v = k_2[E] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad \text{Gl. 12}$$

Wird die Gleichung für komplexere Reaktionsschemen verallgemeinert und k_2 durch k_{cat} ersetzt, erhält man folgende Gleichung:

$$v = k_{cat}[E] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad \text{Gl. 13}$$

Wird nun $[S]$ gegen unendlich erhöht, so erhält man die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} . Ersetzt man $k_{cat} [E]$ durch v_{max} und man erhält die Michaelis-Menten-Gleichung (s. Gl. 3) [289].

Durch Inhibition der Enzyme können Abweichungen zu diesem Verhalten auftreten, z.B. durch eine Substratinhibition. Die Substratinhibition tritt bei hohen Substratkonzentrationen auf und ist durch die Ausbildung eines inaktiven Substrat-Enzym-Substrat-Komplex zu erklären. Durch Einführung der Inhibitionskonstanten K_i kann eine Inhibition mit folgender Gleichung berücksichtigt werden [289]:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S] \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)} \quad \text{Gl. 14}$$

Sowohl K_M als auch v_{max} werden als kinetische Parameter bezeichnet, dabei ist nur K_M von der eingesetzten Enzymmenge unabhängig. Wohingegen v_{max} von der Enzymkonzentration abhängig ist. Daher ist k_{cat} die geeignetere Größe, um Werte für unterschiedliche Enzymkonzentrationen bei gleichen Reaktionsbedingungen zu vergleichen.

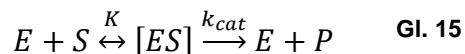
K_M ist gleichbedeutend mit der Substratkonzentration, bei der gerade die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Außerdem gibt K_M an, wie groß die Affinität zwischen Substrat und Enzym ist. Je größer K_M , desto kleiner die Affinität zwischen Substrat und Enzym. k_{cat} wird auch als Wechselzahl bezeichnet und gibt an, wie viele katalytische Umwandlungen pro Zeiteinheit und Enzym stattfinden. Ist die verwendete Konzentration an Enzym bekannt, kann k_{cat} direkt durch Dividieren des experimentell bestimmten Wertes von v_{max} berechnet werden. Wechselzahlen werden typischerweise als Einheiten von Molekülen des produzierten Produkts pro Zeiteinheit der vorhandenen Moleküle des Enzyms angegeben. Solange die gleichen Einheiten verwendet werden, um die Menge des erzeugten Produkts und die Menge des vorhandenen Enzyms anzugeben, heben sich diese Einheiten auf und die endgültige Einheit ist die reziproke Zeit. Daher ist wichtig, dass die Produkteinheiten und die Enzymkonzentration in molaren Einheiten ausgedrückt werden. Im Rohenzym-Proben

oder Enzymgemischen ist es allerdings oft unmöglich die Konzentration des entsprechenden Enzyms in einer anderen Einheit als der Gesamtproteinmasse anzugeben. In der Literatur wird daher die Enzymaktivität oft als Anzahl produziertes Produkt pro Sekunde pro Milligramm Protein in der Enzymprobe ausgedrückt (z.B. nkat/mg). Derartige Einheiten können nützlich beim Vergleich von Rohenzymen sein. Allerdings muss besonders für diese Arbeit beachtet werden, dass es schwierig ist, diese Werte auf kinetische Konstanten, wie k_{cat} , zu beziehen [289].

Um einen Vergleich von K_M - und k_{cat} -Werten gewährleisten zu können, müssen die Reaktionsbedingungen genau definiert und eingehalten werden. Allerdings ist ein Vergleich der Werte schwierig, da diese von vielen Faktoren wie pH-Wert, Temperatur, Substrat, Ionenstärke und Co-Enzymkonzentration abhängen.

3.4.1.1 Kompetitive Hemmung

Eine kompetitive Hemmung liegt vor, wenn ein Hemmstoff dem Substrat des Enzyms chemisch so ähnlich ist, dass dieser vom Enzym am aktiven Zentrum binden kann. Der K_M -Wert wird größer. Man erhält also neben dem [ES]-Komplex auch eine Enzym-Inhibitor-Verbindung [EI], welche allerdings kein Produkt bildet. Somit konkurrieren Inhibitor und Substrat um die gleiche Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms [137].



K = Dissoziationskonstante, in diesem Fall gleich K_M ($K_M=K_S=K$)

I = kompetitiver Inhibitor

K_i = Dissoziationskonstante der Enzym-Inhibitor-Verbindung

Bei kompetitiven Inhibitoren handelt es sich meist um Substratanaloga. Eine Sonderform stellt die Produkthemmung dar, bei dieser Hemmung greift das Produkt selbst regulierend in den enzymatischen Ablauf ein, indem es ein Enzym hemmt. Diese beeinflussen den katalytischen Prozess nicht und somit bleibt v_{max} , damit auch k_{cat} , (nahezu) unverändert. Allerdings wird durch den Inhibitor mehr Substrat benötigt, um die halbmaximale Geschwindigkeit zu erreichen und daher wird K_M (scheinbar) größer [289]. Die kompetitive Hemmung lässt sich wie folgt beschreiben:

$$v = \frac{v_{max} * S}{\alpha * K_M + [S]} \quad \text{Gl. 17}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad \text{Gl. 18}$$

K_M wird in Anwesenheit eines Inhibitors also um den Faktor α größer. Im Lineweaver-Burk-Diagramm schneiden sich die Geraden bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen auf der Ordinate.

3.4.1.2 Nicht-kompetitive Hemmung

Bei einer nicht-kompetitiven Hemmung wird v_{\max} und k_{cat} , niedriger, K_M bleibt (nahezu) unverändert. Die Dissoziationskonstante K_i beschreibt die Wechselwirkung mit einer funktionellen Gruppe des Enzyms, die am katalytischen Prozess, allerdings nicht an der Substratbindung beteiligt ist [137]. Im Lineweaver-Burk-Diagramm zeigt sich die nicht-kompetitive Hemmung durch das Schneiden der Geraden auf der Abszisse [137].

3.4.2 Durchführung

Tab. 15 Photometrie-Parameter zur Bestimmung der Enzymaktivität

Photometer	Lambda 25, Fa. PerkinElmer
Wellenlänge	400 nm
Küvetten	1 cm PP-Makroküvette
Messung	gegen Wasser

Die enzymatische Aktivität der freien und immobilisierten β -Glucosidase zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde mit pNPG bestimmt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 20 mM pNPG erstellt. Als Stammlösung wurde eine 1 mM, 10 mM und 20 mM pNPG-Lösung verwendet. Die weitere Bestimmung wurden gemäß Kapitel 3.3 durchgeführt.

Die Kinetik für folgende Parameter wurde bestimmt:

- pH 5,0 und 37 °C
- pH 3,5 und 37 °C
- pH 3,5 und 25 °C
- 5 g/l und 50 g/l Glucose
- 5 g/l Fructose
- 10 Vol.-% Ethanol
- 5 mg/l Eisen, entsprechende Menge an Eisenchlorid im Puffer gelöst
- Modell-Wein (10 Vol.-% Ethanol, 5,4 g/l Fructose, 3,6 g/l Glucose, 9 g/l Weinsäure, auf pH 3,5 mit Natronlauge (2 M) eingestellt)

Als Referenzpunkt wurde wieder pH 5,0 und 37 °C gewählt, d.h. sofern nichts anderes angegeben ist, wurden die beschriebenen Stoffe im Referenz-Puffer (C/P-Puffer, pH 5,0) gelöst und bei 37 °C gemessen. Die Versuche wurden jeweils im Duplikat durchgeführt.

3.4.3 Auswertung und Datenanalyse

Zur Bestimmung der Enzymkinetik wurden für verschiedene Substratkonzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt [289]. Nach der Michaelis-Menten-Gleichung erhält man durch Auftragung von experimentell bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten v_0 gegen die zugehörige Substratkonzentrationen $[S]$ eine Kurve in Form einer rechtwinkligen Hyperbel. Theoretisch könnte man die kinetischen Parameter direkt aus der erhaltenen Hyperbel bestimmen (als Näherung für die Bedingung $[S] \rightarrow \infty$ und $K_M = [S]$ bei $v_{max}/2$, somit kann v_{max} im oberen Konzentrationsbereich abgelesen werden). Allerdings werden schon bei sehr hohen Substratkonzentrationen nur 90 % des Maximalwerts v_{max} erreicht und das Substrat wirkt meist bereits hemmend auf die Enzymaktivität. Die Produktkonzentration einer Reaktion ist anfangs deutlich kleiner als die Substratkonzentration ($[P] \ll [S]$), daher kann die Bildung des Produktes als quasi-linear mit der Zeit angenommen werden, d.h. am Anfang der Reaktion ist $v = \frac{d[P]}{dt}$ linear [289].

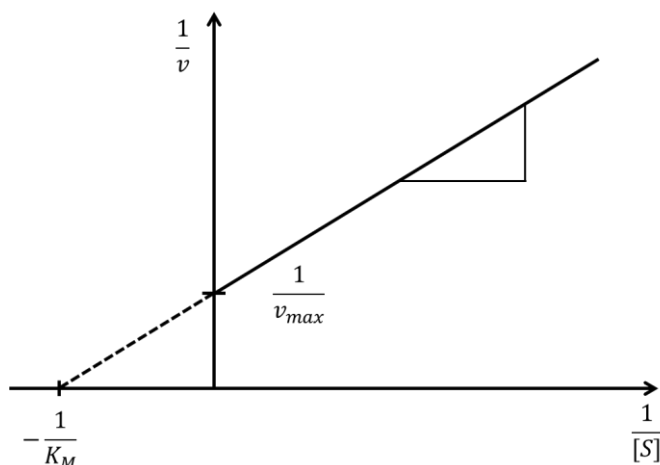


Abb. 17 Schematische Darstellung des Lineweaver-Burk-Diagramms

Daher wurden zur einfachen Darstellung und Auswertung diverse Linearisierungsmethoden entwickelt, um anhand der linearen Diagramme aus den Achsenschnittpunkten bzw. Geradensteigungen die kinetischen Konstanten zu bestimmen [289]. Dabei ist das am häufigsten verwendete Verfahren zu den linearisierten enzymkinetischen Daten das von Lineweaver und Burk (1934) [291]. Die

doppelt-reziproke Auftragung $1/v$ gegen $1/[S]$ liefert das sogenannte Lineweaver-Burk-Diagramm. Dadurch erhält man eine Gerade mit der Steigung K_M/v_{max} , wobei die Gerade die Ordinate bei $1/v_{max}$ und die Abszisse bei $-1/K_M$ schneidet. Daraus ergibt sich folgende Gleichung (s. Gl. 19) [289]:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad \text{Gl. 19}$$

$$y = a * x + b$$

Bei dieser reziproken Darstellung korrespondieren die kleinsten Substratkonzentrationen $[S]$ mit den höchsten Werten von $1/[S]$. Somit besitzen diese Datenpunkte ein stärkeres „optisches“ Gewicht, als die höheren Substratkonzentrationen, was einen Nachteil dieses Verfahrens ist. Allerdings gehen diese in der Nähe des Ursprungs unter, obwohl diese Werte meist mit einem geringeren Messfehler belastet sind. Daher wird der experimentelle Fehler verstärkt und ungleichmäßig in dieser Analyse gewichtet, was zu schlechten Schätzungen der kinetischen Konstanten führt, selbst wenn der experimentelle Fehler relativ gering ist [289].

Die Auswertung nach Lineweaver und Burk ist ungenauer als die direkte Analyse der Daten, da die Werte für die niedrigen Substratkonzentrationen, welche mit den größten Fehlern behaftet sind, durch eben diese reziproke Auftragung das Ergebnis am meisten beeinflussen. Eine Alternative bietet die Ermittlung der entsprechenden kinetischen Parameter mit numerischen Verfahren. Dabei gibt es viele Programmen, die die vorgegebenen Funktionen an experimentelle Daten anpassen. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des in Microsoft Excel integrierten Tools „Solver“ diejenige Hyperbel $[y = a \cdot x / (b + x)]$ ermittelt, deren Parameter a und b (hier v_{max} und K_M) den gemessenen Daten am ehesten entsprechen, somit also die kleinste Fehlerquadratsumme ergeben (nichtlineare Regression).

Allerdings eignet sich insbesondere Lineweaver-Burk immer noch gut zur graphischen Darstellung. Zum einen sind Abweichungen vom idealen Verhalten gut erkennbar, außerdem sind die kinetischen Parameter leicht aus diesem Diagramm abzulesen.

3.4.3.1 Berechnung k_{cat}

Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung (k_{cat}) erfolgt nach folgender Gleichung (s. Gl. 21):

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[Enzym]} = \text{Wechselzahl} \quad \text{Gl. 20}$$

k_{cat} wird über die Maximalgeschwindigkeit v_{max} und die Gesamtkonzentration des Enzyms [E] berechnet [289]. Wie bereits weiter oben beschrieben, ist die Berechnung von k_{cat} ohne genaue Konzentration des Enzyms schwierig. Da die Konzentration der β -Glucosidase im Enzympräparat unbekannt war, wurde k_{cat} daher über die Menge des eingesetzten Enzymgemischs berechnet. Somit hat k_{cat} in unserem Fall folgende Einheit [$s^{-1} \text{ mg}^{-1}$].

3.4.3.2 Berechnung Hemmkonstante K_i

Die Berechnung der Hemmkonstante K_i erfolgt über folgende Gleichung:

$$K_i = \frac{K_M * [I]}{K_M' - K_M} \quad \text{Gl. 21}$$

$K_M' = K_M$ in Gegenwart einer konstanten Konzentration eines kompetitiven Inhibitors;

[I] = Konzentration des Inhibitors

K_i ist ein Maß für die Hemmqualitäten des Inhibitors und analog zur Michaelis-Konstanten K_M gilt, je kleiner der K_i -Wert ist, desto besser ist die Bindung/Affinität an das Enzym.

3.5 Immobilisierung

3.5.1 Prinzip

In dieser Arbeit wurde die Immobilisierung der Glycosidasen an superparamagnetische Magnetit-Partikel mit einem Carbodiimid durchgeführt. Dieses Verfahren beschreibt die kovalente Verknüpfung von Amino-Gruppen enthaltenden Liganden, wie Antikörper, Proteine oder niedermolekulare Substanzen mit den Carboxyl-Gruppen der Magnetit-Partikel (M-PVA C22 Magnetit-Partikel, Fa. chemagen PerkinElmer) mittels Carbodiimid.

Die Carbodiimid-Methode ist ein binäres kovalentes Bindungssystem, somit kann von einer guten Reproduzierbarkeit der Immobilisierung ausgegangen werden. Carbodiimide reagieren mit den terminalen Carboxyl-Gruppen der magnetischen Partikel zu hochreaktiven O-Acylisoharnstoff-Derivaten, welche dann leicht mit den Amino-Gruppen der Enzyme reagieren.

Das verwendete Carbodiimid EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) hat eine starke inaktivierende Wirkung auf Enzyme [292, 293], um den Biokatalysator bzw. das Enzym vor Deaktivierung durch EDC zu schützen, wurde der aktivierte Träger vor der Enzymzugabe gewaschen und das EDC entfernt [294].

EDC besitzt eine gute spezifische Wirkung und eine mäßige Reaktivität, es kann eine Amid-Bindung zwischen den Amino-Gruppen eines Enzyms und der Carboxyl-Gruppen des Trägers bilden [26]. Die Bildung der Amid-Bindung geschieht prinzipiell in zwei Schritten: erstens die Aktivierung der Carboxyl-Gruppe, die zur Bildung des aktivierten Derivats O-Acylisoharnstoff führt und zweitens die Bildung der Amid-Bindung unter Abspaltung von Harnstoff, welches als thermodynamische Antriebskraft wirkt [295, 296].

3.5.1.1 Mechanismus der Immobilisierung

Die Kopplung eines Proteins mittels Carbodiimid ist generell unkompliziert, allerdings können einige Nebenreaktionen die Kopplung erschweren. Die Säure reagiert mit der Carbodiimid-Gruppe, um das Schlüsselzwischenprodukt zu produzieren, den O-Acylisoharnstoff, der als Carbonsäure-Ester mit einer aktivierten Abgangsgruppe angesehen werden kann. Der O-Acylisoharnstoff reagiert mit der Amino-Gruppe zum gewünschten Amid (und Harnstoff) [295]. Der bei Carbonsäureamid-Synthese entstehende Harnstoff kann dabei leicht abgetrennt werden.

Die Carboxyl-Gruppe der Carbonsäure addiert an eine C=N-Doppelbindung des Carbodiimid, wobei der O-Acylisoharnstoff gebildet wird. Dabei wird als Zwischenschritt durch Protonierung des EDCs das Carboxylat-Anion gebildet. Der Einsatz von EDC beschleunigt die Reaktion, da die Reaktivität des O-Acylisoharnstoff höher ist als die der Carbonsäure (s. Abb. 18).

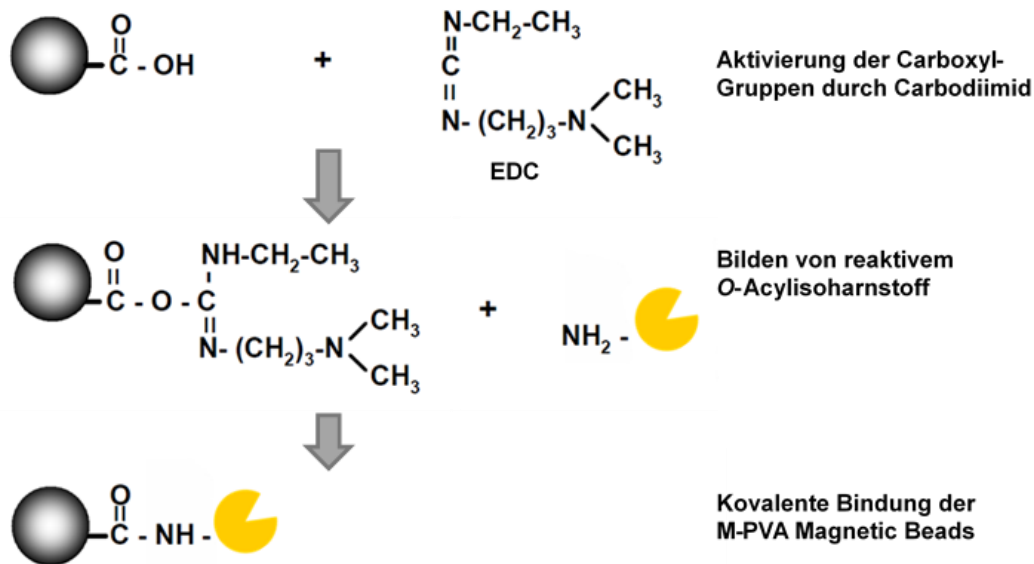


Abb. 18 Mechanismus der Enzym-Kopplung mit Carbodiimid (modifiziert nach [297])

Die Nebenreaktionen der O-Acylisoharnstoff erzeugen sowohl erwünschte und unerwünschte Produkte. Der O-Acylisoharnstoff kann mit einer zusätzlichen Carbonsäure reagieren, es entsteht ein Säureanhydrid, die weiter reagieren können, um das gewünschte Amid zu ergeben. Der unerwünschte Haupt-Reaktionsweg beinhaltet die Umlagerung des O-Acylisoharnstoff zum stabilen N-Acylharnstoff [295].

3.5.2 Durchführung

Tab. 16 Parameter zur Immobilisierung und Bestimmung der Immobilisierungsausbeute/-effizienz

Thermoschüttler	HLC, Fa. Ditabis
Schüttler	Mini LabRoller, Fa. Labnet International
Photometer	Lambda 25, Fa. PerkinElmer
Wellenlänge	400 nm
Küvetten	1 cm PP-Makroküvette
Messung	gegen Wasser

Bei der Immobilisierung wurde sich an der vom Hersteller beschriebenen Methode orientiert [298]. Die Immobilisierung wurde in Eppendorf-Röhrchen durchgeführt und

die Magnetit-Partikel mittels Magnetabscheider abgeschieden. Für die Immobilisierung wurden superparamagnetische Magnetit-Partikel (M-PVA C22 Magnetit-Partikel) verwendet, die aus einer Matrix aus Polyvinylalkohol bestehen und für eine Bindung mit Proteinen entsprechend an der Oberfläche carboxyliert waren. Die funktionellen Gruppen saßen auf einem C22-Spacerarm. Der hohe Magnetit-Gehalt der magnetischen Partikel erlaubt schnelle Trennverfahren. Die Partikel haben eine polydisperse Größenverteilung (1 – 3 μm). In Abb. 19 ist ein M-PVA C22 Magnetit-Partikel schematisch dargestellt.

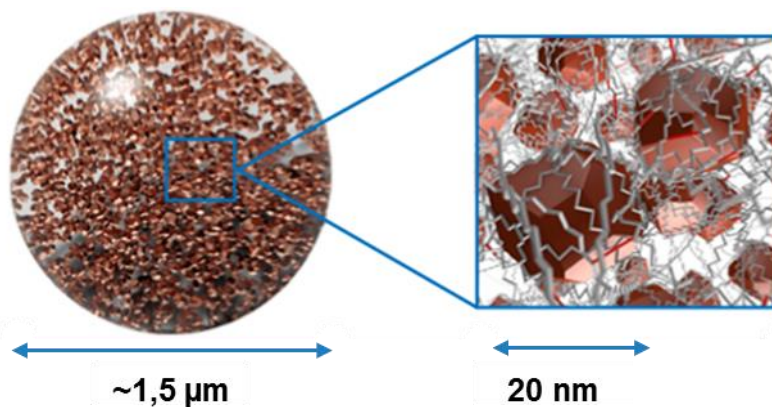


Abb. 19 Schematische Darstellung der M-PVA C22 Magnetit-Partikel [299]

Im ersten Schritt wurden die magnetischen Partikel aktiviert, dazu wurden 7 mg Partikel (50 μl der 140 g/l Partikel-Lösung) zweimal mit 1 ml 0,1 M MES-Puffer (pH 5,0) gewaschen. Danach wurden die Partikel durch 1 ml EDC-Lösung (0,6 mg EDC zu 1 ml MES) aktiviert und 15 min in einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Partikel erneut mit 1 ml MES-Puffer und 1 ml 50 mM Acetatpuffer gewaschen, um EDC-Reste vollständig zu entfernen.

Die letztendliche Immobilisierung der Glycosidasen erfolgte durch Inkubation von 1,0 ml der Enzymlösung (Konzentration: 10 g/l des Präparates Rapidase) im entsprechenden Puffer mit 7 mg der abgetrennten und aktivierten Partikel unter Schütteln für 2 h bei 4 $^{\circ}\text{C}$ im Überkopfschüttler. Danach wurden die Partikel zweimal mit jeweils 1 ml Acetatpuffer und jeweils 1 ml Citrat/Phosphat-Puffer gewaschen. Die schließlich abgetrennten Partikel wurden in 1 ml Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0) resuspendiert und die Endkonzentration der Partikel betrug 7 mg/ml. Die immobilisierten Enzyme wurden bei 4 $^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der Kopplungs-pH wurde für eine möglichst maximale Ausbeute entsprechend variiert. Bei folgenden pH-Werten wurde die Immobilisierung durchgeführt: 3,2 / 3,5 / 3,8 / 4,0 / 4,2 / 4,5 / 5,0 und 6,0.

3.5.3 Auswertung

Die Immobilisierungsausbeute und -effizienz des Immobilisierungsverfahrens bei unterschiedlichen pH-Werten wurden für die jeweilige Glycosidase bestimmt. Die Aktivitätsmessungen wurden entsprechend dem Kapitel 3.3 durchgeführt.

Die **Immobilisierungsausbeute** beschreibt die an den Träger gebundenen Enzym-Einheiten im Verhältnis der für die Immobilisierung zur Verfügung gestellten Enzym-Einheiten. Dazu wird die Differenz zwischen zur Verfügung gestellter Aktivität und der im Überstand und den Waschfraktionen nach der Immobilisierung zurückgebliebener Rest-Aktivität ins Verhältnis zur Gesamtaktivität gesetzt. Die theoretische Gesamtaktivität ist die maximal mögliche immobilisierte Aktivität, in der Annahme, dass es durch die Immobilisierung keinen Aktivitätsverlust gibt. In der Regel wird deutlich mehr Enzym bei der Immobilisierung zur Verfügung gestellt als Bindungsstellen auf dem Träger zur Verfügung stehen, daher ist die Immobilisierungsausbeute meistens <100 %.

Die **Immobilisierungseffizienz** ist die am Immobilisat gemessene Enzymaktivität der kovalent am Träger gebundenen Enzym-Einheiten im Verhältnis zu den gekoppelten Enzym-Einheiten. Somit gibt die Immobilisierungseffizienz Auskunft über einen eventuellen Verlust an Aktivität durch den Immobilisierungsprozess, welche durch die kovalente Bindung an den Träger auftreten können. Dabei kann ein Teil des Enzyms seine katalytische Aktivität verlieren. Daher wird i.d.R. nicht die gesamte Aktivität des freien Enzyms in seiner immobilisierten Form wiedergefunden. Durch kovalente Immobilisierung kann es zu hohen Aktivitätsverlusten, bis hin zu einem kompletten Verlust an Aktivität, kommen, abhängig davon an welcher Stelle das Enzym bindet und ob es durch die Bindung an den Träger zu Konformationsänderungen kommt [300].

3.6 Stabilität der immobilisierten Enzyme

Die gekoppelten Enzyme wurden in verschiedenen Puffern bzw. Medien gelagert und über einen gewissen Zeitraum regelmäßig die Rest-Enzymaktivität bestimmt. Anhand der berechneten Aktivität konnten anschließend Aussagen über die Stabilität der gekoppelten Enzyme unter den entsprechenden Bedingungen getroffen werden.

3.6.1 Durchführung

Tab. 17 Parameter zur Bestimmung der Stabilität gekoppelter Enzyme

Klimaschrank	Friocell FC 222, Fa. MMM Group
Photometer	Lambda 25, Fa. PerkinElmer
Wellenlänge	400 nm
Küvetten	1 cm PP-Makroküvette
Messung	gegen Wasser

Für den Stabilitätstest wurden die immobilisierten Enzyme bei pH 3,5 und 20 °C in einem Modell-Wein (10 Vol.-% Ethanol, 9 g/l Weinsäure, auf pH 3,5 mit Natronlauge (2 M) eingestellt), in einem 0,1 M Citrat/Phosphatpuffer bei pH 5,0 und 20 °C und in Wein (Gewürztraminer, Jahrgang 2014, auf pH 3,5 mit Natronlauge (2 M) eingestellt) gelagert. Dazu wurden jeweils 210 mg des Immobilisats in 30 ml der entsprechenden Lösung suspendiert, was einer Konzentration von 7 mg/ml entsprach. In regelmäßigen Abständen wurde die Aktivität der immobilisierten Enzyme nach Kapitel 3.3 bei pH 5,0 und 37 °C bestimmt. Der mögliche Verlust an aktivem Enzyme wurde durch Abtrennung der Partikel mittels Magnet-Abscheider bestimmt und die Aktivität im erhaltenen Überstand gemessen. Die Aktivität im Überstand sollte Hinweise auf eine möglichen Freisetzung bzw. Loslösung der Enzyme von den Magnetit-Partikeln geben.

3.6.2 Auswertung

Die Bestimmung der Rest-Enzymaktivität in den Stabilitätsproben erfolgte über die in nach Kapitel 3.3 beschriebene Methode und wurde als Prozentsatz der Änderung zur Ausgangsaktivität (bei pH 5,0 und 37 °C) über die Zeit dargestellt. Die Experimente wurden im Duplikat durchgeführt.

3.7 Glykosyl-Glucose-Assay

Die Untersuchung der Proben auf ihren Glykosid-Gehalt erfolgte nach dem Glykosyl-Glucose-Assay [301, 302].

3.7.1 Prinzip

Die glykosidischen Verbindungen der Probe wurden mit Hilfe einer Festphasen-Kartusche (C18) festgehalten und alle anderen, störenden Inhaltsstoffe (Zucker, Säuren u.a.) durch Reinigung mit Wasser abgetrennt. Die festgehaltenen Glykoside wurden mittels Ethanol von der Säule eluiert und durch eine thermische Säurehydrolyse gespalten. Anschließend wurde enzymatisch die freigesetzte Glucose bestimmt. Da Aglykon und Glucose im Verhältnis 1:1 vorkommen, kann über die freigesetzte Glucosemenge der Gehalt an Aglyka berechnet werden.

Die entsprechende Durchführung und die Validierungsparameter sind im Anhang (s. Kapitel 7.4.2) dargestellt.

3.8 Aromatisierung

In der Literatur wurden zahlreiche Methoden zur Isolierung der Glykoside (Aroma-Präkursoren) aus Most und Wein beschrieben. Grundlegend handelt es sich bei den meisten Methoden um eine Isolierung mittels Adsorption. Dabei wurden die Glykoside selektiv von einem hydrophoben Adsorbens vom wässrigen Extrakt retentiert. Als Adsorbens-Material wurden zum einen C₁₈-RP Kartuschen [301, 303, 304] oder Amberlite XAD-2 [7, 18] eingesetzt.

3.8.1 Prinzip

Die glykosidischen Verbindungen der Probe wurden mit Hilfe einer SPE RP-18-Kartusche festgehalten und alle anderen, störenden Inhaltsstoffe (Zucker, Säuren u.a.) durch Reinigung mit Wasser abgetrennt bzw. die Aromastoffe durch ein organisches Lösungsmittel, in diesem Fall Pentan/Dichlormethan. Die festgehaltenen Glykoside wurden mittels Methanol von der Säule eluiert. Der erhaltene Methanol-Glykosid-Extrakt wurde anschließend unter Vakuum zur Trockene konzentriert und vom Methanol befreit. Der erhaltene trockene Glykosid-Extrakt wurde anschließend in der Modell-Wein-Lösung resuspendiert und mit den entsprechenden Enzymen versetzt, um anschließend, nach einer definierten Zeit, die freigesetzten Aromen zu bestimmen.

3.8.2 Durchführung

Tab. 18 Parameter zur Isolierung von Glykosiden aus Wein

Vakuunkammer	Chromabond Vakuunkamer, Fa. Macherey-Nagel
Vakuumpumpe	Vacuum Pump V-710, Fa. Büchi
Vakuum-Kontrollgerät	Vacuum Controller V-855, Fa. Büchi
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-215, Fa. Büchi
Heizbad	Heating Bath B-491, Fa. Büchi
Umwälzkühler	2219 Multitemp II, Fa. LKB Bromma
Festphasenkartusche	Bond Elut C18, 0,5 g, Fa. Agilent Technologies

Die **Isolierung** der glykosidischen Verbindungen aus Wein wurde mit C18-Umkehrphasenkartuschen (Bond Elut C18) durchgeführt. Die Methode wurde nach Williams et al. (1995), Schneider et al. (2004) und Arévalo Villena et al. (2006) durchgeführt [301, 303, 304]. Jede Kartusche wurde mit 20 ml Methanol und 20 ml Wasser vorkonditioniert. Danach wurden 100 ml Wein (Morio Muskat, Jahrgang 2014) auf eine Kartusche geladen. Die Kartusche wurde mit 50 ml Wasser gewaschen, um Zucker und andere störende Stoffe zu entfernen, und anschließend die freien flüchtigen Bestandteile mit 10 ml Pentan/Dichlormethan (2/1, v/v) eluiert. Die gebundene Aromafraktion wurde schließlich mit 20 ml Methanol eluiert, und der Extrakt bei 40 °C unter Vakuum zur Trockene konzentriert. Der erhaltene Glykosid Extrakt wurde bei -26 °C bis zur Analyse gelagert.

Die **Aromatisierung** wurde nach Spagna et al. (2000 und 2002) durchgeführt [27, 225]. Das Verfahren wurde leicht modifiziert. Zur Aromatisierung wurde der Glykosid-Extrakt aus 500 ml Wein in 100 ml der Modell-Wein-Lösung (9 g/l Weinsäure in 10 Vol.-% Ethanol und auf pH 3,5 mit Natronlauge (2 M) eingestellt) gelöst. 15 mg der immobilisierten Enzyme oder 5 mg des löslichen Enzyms wurden zu 100 ml der Modell-Wein-Lösung gegeben, welche die Glykoside enthielten. Die Probe wurde verschlossen und bei 25 °C für 24 h inkubiert.

3.8.3 Auswertung

Die Auswertung der freigesetzten Aromen erfolgte über die in Kapitel 7.4.7 beschriebene Methode.

3.9 Enzymeinsatz

3.9.1 Enzymbehandlung von Wein

Wein wurde mit den gekoppelten Enzymen inkubiert, nach einer gewissen Einwirkzeit wurden die gekoppelten Enzyme mittels HGMS (s. Kapitel 3.15) abgeschieden und das freigesetzte Aroma im Wein bestimmt (s. Kapitel 7.4.7).

3.9.1.1 Durchführung

Die immobilisierten Enzyme und das lösliche Enzympräparat wurden mit einem Gewürztraminer und Morio Muskat (beide Jahrgang 2014) inkubiert. Um vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten, wurde der pH-Wert der Weine auf pH 3,5 mit 2 M NaOH eingestellt. 15 mg der immobilisierten Enzyme und 5 mg des löslichen Enzympräparates wurden zu 100 ml der beiden Weine gegeben. Der Wein wurde bei 25 °C für 24 Tage lang inkubiert. Eine Kontrollprobe, Weine ohne Enzymzusatz, wurde ebenfalls inkubiert. Die Versuche wurden im Duplikat durchgeführt.

Beim den beiden Weinen (ebenfalls Gewürztraminer und Morio Muskat) für die sensorischen Untersuchungen wurde auf eine pH-Wert-Anpassung verzichtet und es wurden ein Ansatz von je 10 l hergestellt. Dazu wurden die beiden Weine mit jeweils 1,5 g der immobilisierten Enzyme versetzt und für 24 Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

3.9.1.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgt über die Methode 7.4.7, mit welcher die Menge an freigesetzten Aromen bestimmt wurde.

3.9.2 Eisenmigration in Abhängigkeit der Magnetit-Partikel

Die Magnetit-Partikel wurden in verschiedene Lösungen gegeben und in regelmäßigen Abständen wurde der Eisengehalt der Lösung bestimmt (Kapitel 3.10 und 7.4.3).

3.9.2.1 Durchführung

Zur Bestimmung der Eisenmigration wurden 1 l-Ansätze vom Morio Muskat, Gewürztraminer (beide Jahrgang 2014), C/P-Puffer (pH 5,0) und Modell-Wein (10 Vol.-% Ethanol, 9 g/l Weinsäure, auf pH 3,5 mit Natronlauge (2 M) eingestellt) hergestellt und mit je 150 mg der Magnetit-Partikel versetzt.

Zur Bestimmung der Eisenmigration in Abhängigkeit der Weinsäure-Konzentration wurden 1 l-Lösungen mit den entsprechenden Konzentrationen (0 / 1 / 3 / 5 / 7 / 10 und 15 g/l) in einer Ethanol-Lösungen (10 Vol.-%) angesetzt und wieder entsprechend mit je 150 mg der Magnetit-Partikel versetzt.

In regelmäßigen Abständen wurde die Eisenmigration in den entsprechenden Proben nach Kapitel 3.10 bestimmt. Vor der Probenentnahme wurden die Partikel mittels Magneten auf dem Boden der Ansätze konzentriert und in den Proben noch enthaltene Rest-Partikel wurden vor der Bestimmung mittels Membranfilter (PET, 0,2 µm) abgetrennt.

Die Versuche wurden im Duplikat durchgeführt.

3.9.2.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgte über die Methode 7.4.3, mit welcher die Menge an Eisen in den jeweiligen Proben bestimmt wurde.

3.10 Eisenbestimmung

Der Eisengehalt im Wein wurde mit leichten Abwandlungen gemäß der Vorschrift OIV-MA-AS322-05B der Methodensammlung der OIV durchgeführt [305].

3.10.1 Prinzip

Nach Aufschluss des Weins mit Wasserstoffperoxid liegt das Gesamteisen, als Fe^{3+} vor, dieser wird anschließend mithilfe einer Säure zu Fe^{2+} reduziert und dann durch die Bildung eines farbigen ortho-Phenanthrolin-Komplexes photometrisch quantifiziert.

Die entsprechende Durchführung und die Validierungsparameter sind im Anhang (s. Kapitel 7.4.3) dargestellt.

3.11 Gesamtphenolgehalt

Der Gesamtphenolgehalt oder auch Folin-Ciocalteu-Index wurde gemäß der Vorschrift MA-E-AS2-10 der Methodensammlung der OIV durchgeführt [305]. Im Unterschied zur originalen Methoden, wurde der Folin-Ciocalteu-Index in Form der Gallussäure-Äquivalente angegeben.

Die Folin-Ciocalteu-Methode zur Bestimmung des Gesamtphenolgehalts erfasst gleichmäßig die mannigfaltigen Phenole, womit exakte Messungen möglich sind. Durch die Verwendung der Gallussäure als allgemeingültige Referenzsubstanz, wird ein Datenvergleich möglich. Die Ergebnisse werden daher als Gallussäure-Äquivalente (Gallic acid equivalents, GAE) in mg/l angegeben [306].

Die Erfassung des Gesamtphenolgehalts mittels Folin-Ciocalteu-Methode liefert einen wichtigen Überblick über den Phenolgehalt von Wein. Aufgrund der Vielfalt der Phenole im Wein wäre dies durch Summierung einzelner, mittels HPLC erfasster Phenole, nicht bzw. nur sehr schwer möglich [307].

3.11.1 Prinzip

Bei der Folin-Ciocalteu-Methode ionisieren alle im Wein enthaltenen phenolischen Verbindungen im alkalischen Milieu vollständig zu ihrer Phenolstruktur und werden anschließend durch das Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Chinonen oxidiert. Das Folin-Ciocalteu-Reagenz besteht aus der Phosphormolybdänsäure ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) und der Phosphorwolframsäure ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$). Durch die Oxidation der Phenole werden diese zu intensiv blauen Verbindungen ($\text{W}_8\text{O}_{23}/\text{Mo}_8\text{O}_{23}$) reduziert. Die typische Blaufärbung der reduzierten Verbindungen weist das Absorptionsmaximum bei 750 nm auf und ist proportional zum vorliegenden Gesamtphenolgehalt der jeweiligen Probe [305]. Biologische Proben enthalten keine Verbindungen, die bei 750 nm Licht absorbieren, aufgrund dieser Tatsache wurde diese Wellenlänge für die Folin-Ciocalteu-Methode gewählt [307, 308].

Die entsprechende Durchführung und die Validierungsparameter sind im Anhang (s. Kapitel 7.4.5) dargestellt.

3.12 Einzelphenol-Bestimmung mittels HPLC

Zur Quantifizierung einiger phenolischer Verbindungen im Wein wurde eine HPLC-UV-Methode verwendet. Diese basiert auf der von Hausinger et al. (2012) beschriebenen Methode [309].

Die entsprechende Durchführung und die Validierungsparameter sind im Anhang (s. Kapitel 7.4.5) dargestellt.

In Abb. 20 und Abb. 21 sind die Chromatogramme der Wellenlänge 280 und 320 nm einer Phenol-Standardlösung der Konzentration 10 mg/l, in Abb. 22 und Abb. 23 sind die überlagerten Chromatogramme einer Standardaddition der entsprechenden Phenol-Standards in Wein (Gewürztraminer) dargestellt.

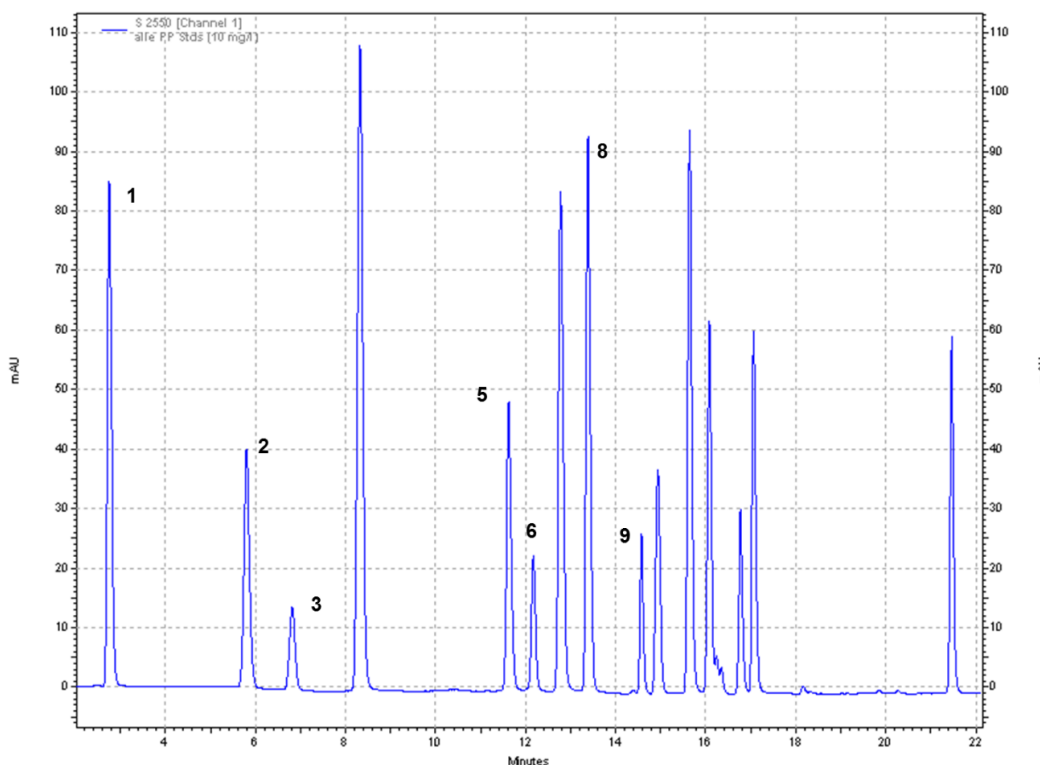


Abb. 20 HPLC-Chromatogramm der Phenol-Standardlösung der Konzentration 10 mg/l bei 280 nm:
1 Gallussäure, 2 Protocatechusäure, 3 Tyrosol, 5 Vanillinsäure, 6 Catechin, 8 Syringasäure, 9 Epicatechin

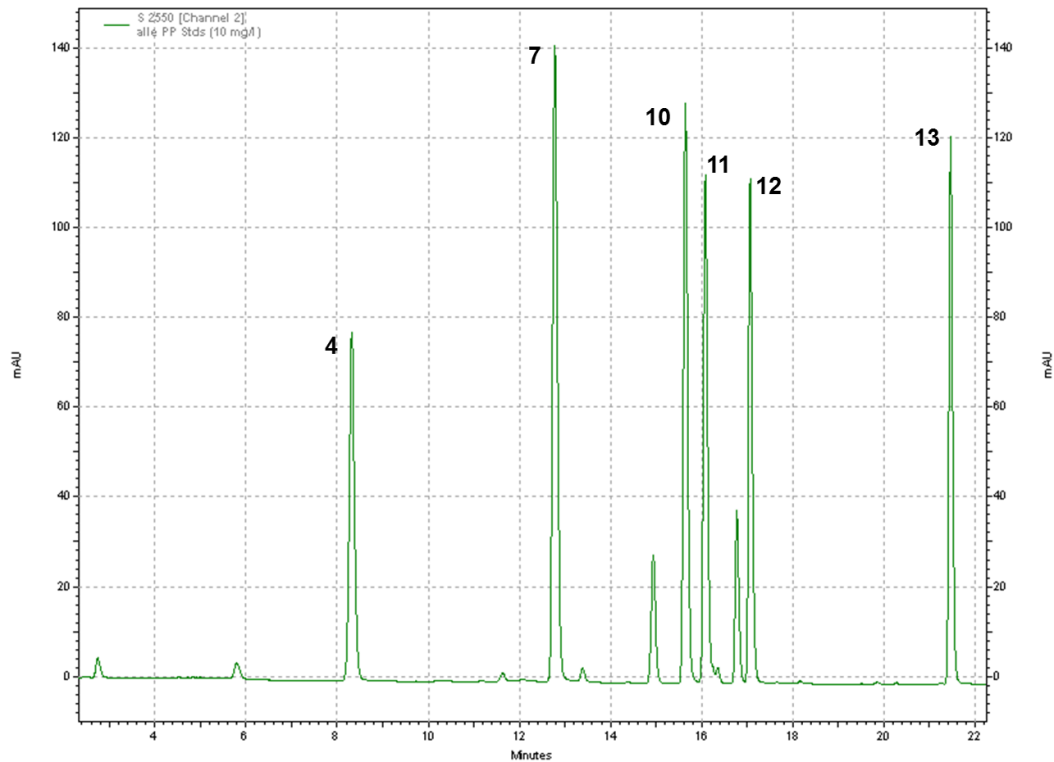


Abb. 21 HPLC-Chromatogramm der Phenol-Standardlösung der Konzentration 10 mg/l bei 320 nm: 4 Protocatechualdehyd, 7 Kaffeesäure, 10 p-Coumarsäure, 11 Syringaldehyd, 12 Ferulasäure, 13 trans-Resveratrol

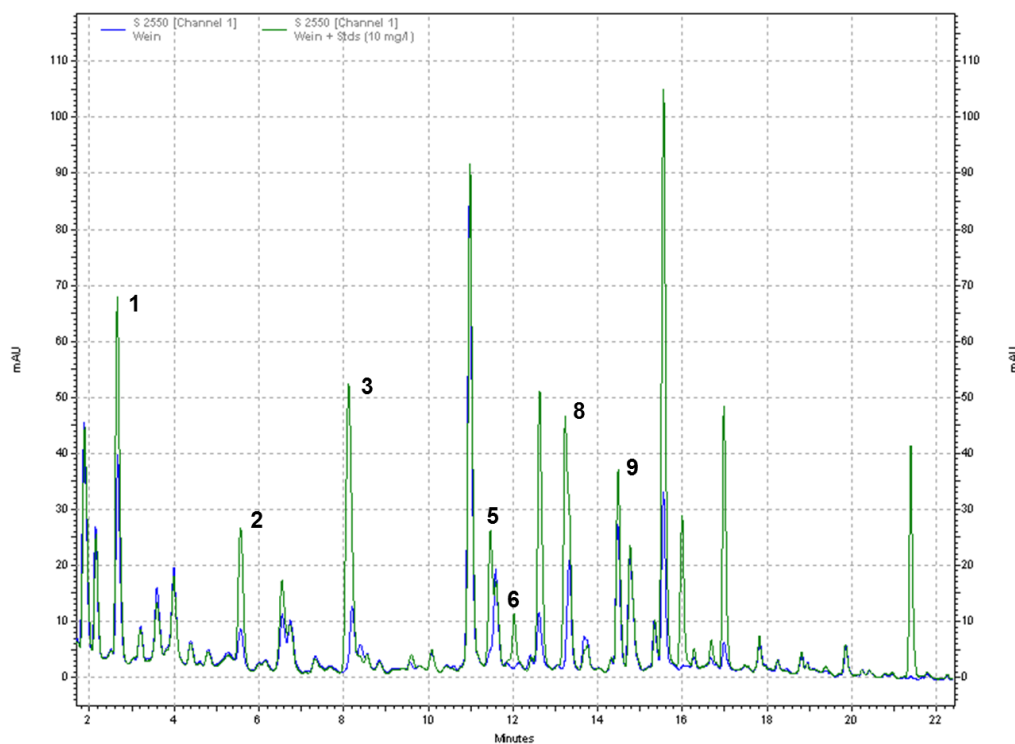


Abb. 22 HPLC-Chromatogramme der Standardaddition (10 mg/l) bei 280 nm überlagert: Wein (blau) und Wein plus Phenol-Standards (grün), 1 Gallussäure, 2 Protocatechusäure, 3 Tyrosol, 5 Vanillinsäure, 6 Catechin, 8 Syringensäure, 9 Epicatechin

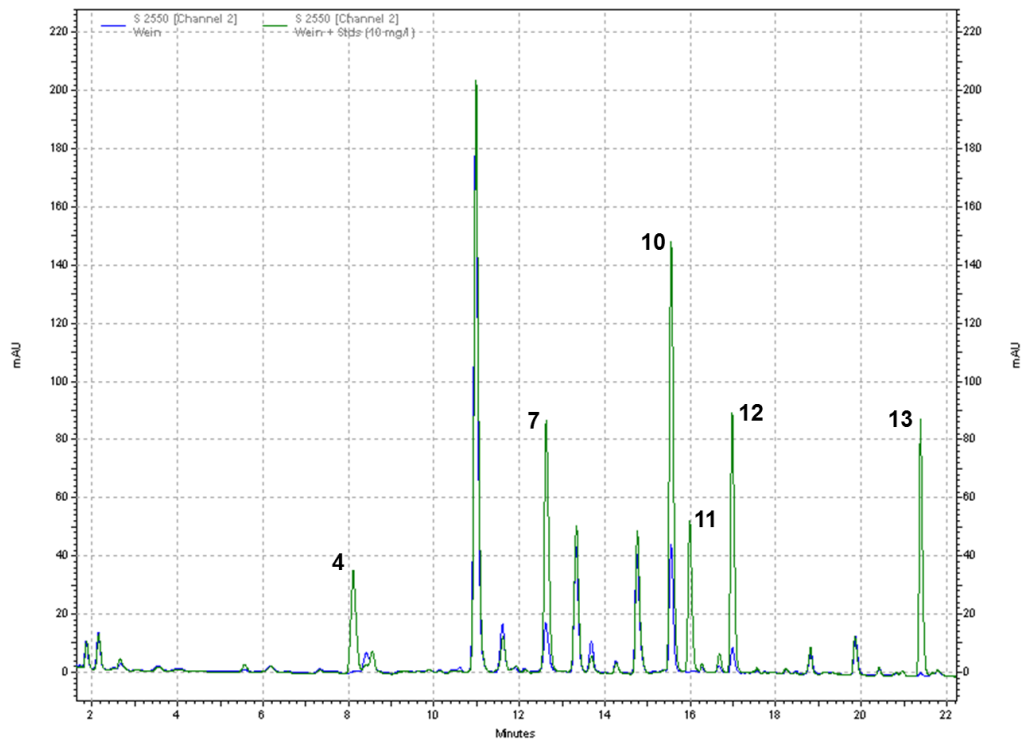


Abb. 23 HPLC-Chromatogramme der Standardaddition (10 mg/l) bei 320 nm überlagert: Wein (blau) und Wein plus Phenol-Standards (grün), 4 Protocatechualdehyd, 7 Kaffeensäure, 10 p-Coumarsäure, 11 Syringaldehyd, 12 Ferulasäure, 13 trans-Resveratrol

3.13 Zucker, organische Säuren und Alkohol im Wein

Chromatographische Methoden gelten als valide Alternative zur enzymatischen Methoden zur Bestimmung von Carbonsäuren und Zuckern. Die chromatographische Trennung der organischen Säuren Weinsäure und Äpfelsäure, der Zucker Fructose und Glucose, sowie von Glycerin und Ethanol konnte mittels Ion-Austausch-HPLC in Verbindung mit einem RI-Detektor erzielt werden [310, 311].

Zur Bestimmung von Weinsäure, Äpfelsäure, Glucose, Fructose, Glycerin und Ethanol wurde eine Ion-Austausch-HPLC mit RI-Detektor verwendet. Mit dieser Methode unter Verwendung des Brechungsindex (engl. refractive index - RI) -Detektor ist es möglich die Carbonsäuren gleichzeitig mit Fructose, Glucose, Glycerin und Ethanol zu bestimmen. Zwar ist die Empfindlichkeit dieser Methode nicht besonders groß, allerdings ist diese ausreichend um die genannten Komponenten im Wein zu bestimmen [312, 313].

Die entsprechende Durchführung und die Validierungsparameter sind im Anhang (s. Kapitel 7.4.6) dargestellt.

In Abb. 24 ist ein Chromatogramm der entsprechenden Standards dargestellt.

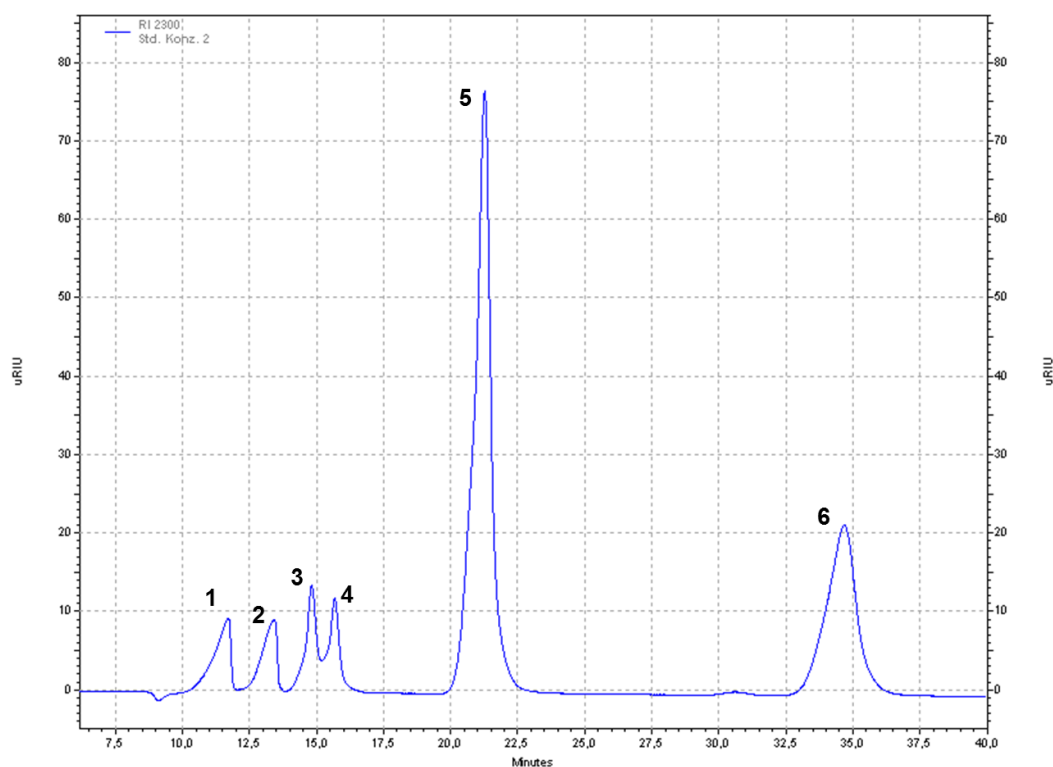


Abb. 24 HPLC-Chromatogramm der Standards: 1 Weinsäure, 2 Äpfelsäure, 3 Glucose, 4 Fructose, 5 Glycerin, 6 Ethanol

3.14 Terpen-Bestimmung mittels GC/MS

Bei der quantitativen Aroma-Bestimmung von Wein muss eine ziemlich große Anzahl an verschiedenen geruchsaktiven Verbindungen betrachtet werden [314]. Diese Verbindungen sind chemisch sehr unterschiedlich und dementsprechend können sich auch sehr vielfältige Probleme bei der Wein-Analyse ergeben.

3.14.1 Prinzip der Probenvorbereitung

In den meisten Fällen ist die Probenvorbereitung der mühsamste und zeitaufwendigste Schritt bei der Analyse von Proben im Speziellen bei der Gaschromatographie [315, 316]. Dabei geht der Schritt Richtung weniger anspruchsvolle Verfahren, wie die automatisierte SPE, Verdünnung oder Filtration der Proben kurz vor der Injektion, was einhergeht mit der Reduzierung der manuellen Operation, meist mit einer simultanen Reduzierung der Anfangs-Probenmenge [315–317].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Aroma-Komponenten aus Wein zu isolieren. Die konventionelle Methode, um Analyten aus einer flüssigen Probe zu erhalten, ist die Abtrennung in ein mit Wasser nicht mischbares Lösungsmittel, das Festhalten der Analyten auf einer Säule oder einer Festphasen-Matrix, oder als letzte Möglichkeit, das Verdampfen der Probe bis zur Trockne und einer anschließenden selektiven Solvatisierung der Analyten [315]. Die konventionelle bzw. die gebräuchlichste Methode stellt die **Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE, engl. liquid/liquid-extraction)** in ein nicht-polares Lösungsmittel dar [315, 318]. Dabei wird typischerweise ein größeres Volumen an organischem Lösungsmittel (100 – 250 ml) vom gleichen Probenvolumen verwendet und die Extraktion wird i.d.R. 2 bis 3-mal wiederholt, um möglichst hohe Wiederfindungsraten zu erreichen. Das Lösungsmittel wird anschließend getrocknet und durch Verdampfung konzentriert. Dieser Prozess ist langsam, man benötigt erhebliche Arbeitskraft und ist daher teuer. Außerdem wird ein großes Volumen an organischem Abfall produziert. Die wiederholenden manuellen Schritte führen ebenfalls oft zu Fehlern [315].

Die **simultane Destillation-Extraktion**, kurz **SDE**, gehörte zu den am häufigsten zitierten Proben-Vorbereitungen [319]. 1964 entwickelten Likens und Nickerson eine weithin akzeptierte SDE-Methode, im Originalen als Gerät für die Hopfen-Öl-Analyse [320]. Abb. 25 zeigt das Prinzip der SDE.

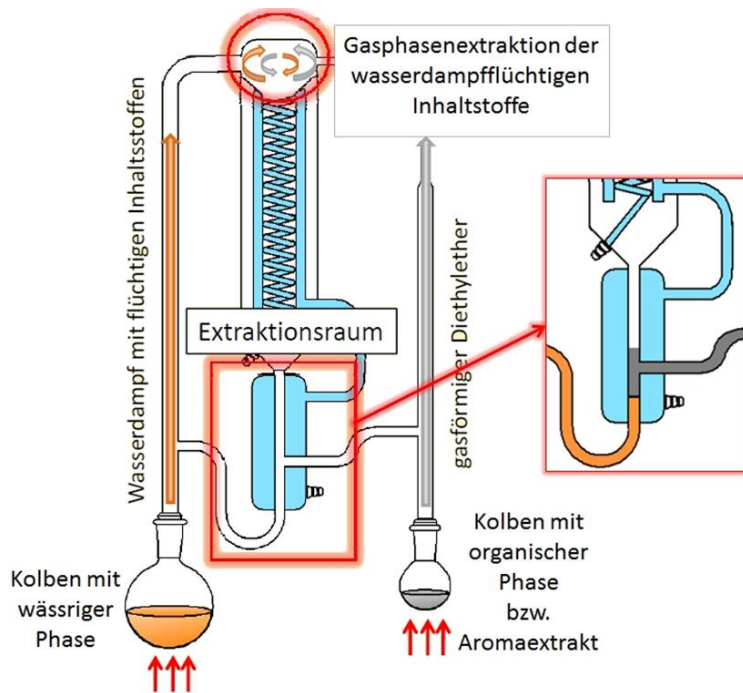


Abb. 25 Schematische Darstellung der SDE nach Likens und Nickerson (1964) [320] (modifiziert nach [321])

Diese Ein-Schritt-Isolation-Konzentration der Aroma Komponenten erlaubt eine drastische Zeiteinsparung über den Trennprozess und durch das kontinuierliche Recycling eine Reduktion an Lösungsmitteln [319].

Prinzipiell wird eine wässrige Probe in einem Rundkolben gekocht und der Wasserdampf steigt in den linken Arm des Apparats. Die flüchtigen Stoffe werden mit Wasserdampf zum oberen Teil des linken Arms destilliert. Simultan wird die organische Phase ebenfalls destilliert, der Dampf steigt zum oberen Teil der rechten Seite der Apparatur. Der Dampf kondensiert an dem Kühlfinger bzw. Allihnkühler und der Extraktionsprozess beginnt dann zwischen beiden Flüssigkeitsfilmen an der Kondensatoroberfläche. Das Wasser und das Lösungsmittel, gesammelt und im Extraktionsraum dekantiert, fließt in die jeweiligen Kolben zurück [319]. I.d.R. muss der Extrakt vor einer GC-Injektion nochmals konzentriert werden. Für Hopfenöl-Bestandteile wurden z.B. Wiederfindungsraten von 54 bis 99 % erreicht, natürlich abhängig von den verwendeten Komponenten, der Extraktionszeit und dem pH-Wert [322]. Godefroot et al. (1981) ermittelten mit einer Micro-SDE Wiederfindungsraten für weinrelevante Aromastoffe, wie Linalool, von 70 bis 113 % [323]. Auch im Vergleich zu anderen Extraktionsmethoden von flüchtigen Komponenten zeigt die SDE gute Wiederfindungsraten [319]. Viele Parameter, wie Destillation-Extraktion-Zeit und die Wahl des Lösungsmittels, beeinflussen die Wiederfindung der Aromakomponenten.

Ein Problem bei der Extraktionsmethode ist die Umbildung und Artefakt-Bildung durch die Erhitzung der Probe. Außerdem kann es durch die Erhitzung des Weins im sauren Milieu zur Säurehydrolyse der im Wein vorhandenen Glykoside kommen und da diese im speziellen in dieser Arbeit betrachtet werden sollen, ist diese Aufarbeitungsmethode eher ungeeignet.

Die analytischen Techniken zur Bestimmung von aromatischen flüchtigen Komponenten haben sich in den letzten Jahren stetig weiterentwickelt, um bessere Bestimmungsgrenzen und Wiederholbarkeit zu erreichen. Da sind insbesondere drei weitere Techniken zu nennen, die statische Headspace, die dynamische Headspace, auch Purge-and-Trap genannt und die Festphasenmikroextraktion [324].

Sind die Analyten flüchtig genug, kann man auf die Headspace (HS)-Extraktionstechnik zurückgreifen, welche die Extraktion und Injektion in einem Schritt kombiniert. Relativ neu ist da die HS-Trap-Technik, welche ein statisches Headspace-System mit einer Trap zum Anreichern der Analyten kombiniert. Bei Purge-and-Trap-Systemen werden die flüchtigen Analyten durch Gas aus der Lösung ausgetrieben, um diese anschließend in einer kryogenen Falle, einem Lösungsmittel oder einer Festphasen-Falle festzuhalten [325].

Bei der **Headspace**-Technik (auch Dampfraumanalyse-Technik genannt) wird nicht direkt die Probe an sich injiziert, sondern der Dampfraum über der Probe im gasdichten Vial auf die Säule gegeben. Im Dampfraum über der Probe stellt sich entsprechend der Temperatur, meist höhere, ein Gleichgewicht an flüchtigen Substanzen ein. Gleichgewichtseinstellungen sind von einigen Faktoren, wie Art und Konzentration der Analyten, Matrix, Temperatur, abhängig. Zur Analyse wird lediglich das Gas als Probe injiziert. Vorteil ist eine mögliche Automatisierung. Bei der Headspace-Analyse können die Proben direkt aus der Gasphase genommen werden (**statische Headspace Analyse**) oder das Gas kann über die Matrix der Probe geströmt werden und dann im nächsten Schritt fokussiert werden (**dynamische Headspace**).

Eine exakte Quantifizierung der flüchtigen Analyten ist bei einer Headspace-Methode schwierig und hängt von vielen Faktoren ab, Standards müssen entsprechend durch Standard-Addition oder Matrix-Spiking vorbereitet werden [315]. Schließlich basiert die Probe auf der Verteilung der Analyten zwischen der Gas- und der Matrix-Phase und die Konzentration der Analyten in der Gas-Phase kann durch die Löslichkeit der Analyten in der Matrix-Phase verändert werden. Besonders bei alkoholischen

Getränken, wie Wein, variiert die Konzentration der Analyten im Dampfraum mit dem Ethanolgehalt [326–328].

Das **Headspace-Trap**-Verfahren ist ein relativ neues Verfahren und wurde 2004 entwickelt [329, 330]. Es kombiniert die Vorteile der SHE (statischer Headspace, engl. Static Headspace Extraction) mit den Vorteilen der Purge-and-Trap-Technik: gute Reproduzierbarkeit der SHE mit den hohen Nachweisgrenzen der Purge-and-Trap-Technik. Kurz gesagt, die HS-Trap ist ein verbessertes statisches HS-System, welches flüchtige Komponenten einfängt, fokussiert und vorkonzentriert vor der Gaschromatographie-Analyse und das ganz ohne weitere Probenvorbereitung [331]. Im Gegensatz zu SPME, welche kleine Fasern oder beschichtete Kapillaren mit einem Sorbent-Volumen von 0,94 oder 5,99 mm³ aufweisen [332, 333], benutzt die HS-Trap-Technik gepackte Tubes mit einem festem Sorbent und einem deutlich höheren Volumina von 160 mm³.

Vorteile dieser Technik sind die Eliminierung zeitaufwendiger Schritte und das Risiko menschlicher Fehler, welches mit anderen GC-Probe-Vorbereitungsmethoden verbunden ist. Bei der HS-Trap-Technik wird nicht direkt die Probe analysiert, sondern der Dampfraum über der Flüssigen Phase im Probengefäß der Probe. Bei dieser Technik wird das geschlossene Gefäß solange thermostatisiert, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Probe und Gasphase ausgebildet hat. Anschließend wird ein Aliquot der Gasphase auf die Trennsäule gegeben. Beim Headspace-Trap-Verfahren wird zusätzlich die Probe in der Trap angereichert und es können so deutlich höhere Nachweisgrenzen erzielt werden [334]. Zum Beispiel wurde eine 35 – 55-fache Erhöhung der Extraktionsausbeute im Vergleich zur traditionellen SHE-GC ohne Trap beobachtet [333].

Einige Studien zeigen bereits die Vorteile diese Technik, z.B. zeigten Köhling und Wehner (2006), dass die Trap-Technik eine gute Alternative in der Begleitalkoholanalytik ist [335]. Die Autoren sahen außerdem als Vorteil, dass die Zugabe von Salzen zur Steigerung der Empfindlichkeit beim Einsatz der Trap-Technik entfallen kann und so Veränderung der Probe bzw. Matrix vermieden werden. Köhling und Wehner (2006) konnten auch keine Akkumulation der Analyten auf dem Adsorbens feststellen [335]. Einen Vorteil den die Meisten bei dieser Methode nennen, ist die stark vereinfachte Probenvorbereitung [335]. Weiterer Vorteil der Trap-Technik, die erhaltenen Chromatogramme sind praktisch ohne nachteilige Matrix Effekte [336].

Als Alternative dazu wurden Methoden entwickelt bei der die Analyten der Probe auf einer festen Phase festgehalten werden und in einem kleinen Volumen wieder von der Phase gelöst werden. Da wären die **Festphasenextraktion** (engl. **Solid Phase Extraktion**, kurz **SPE**) und die **Festphasenmikroextraktion (SPME, vom engl. Solid-Phase Microextraction)** als Methoden zu nennen. Diese Methoden extrahieren die Analyten durch festhalten auf einer festen Phasen und einer anschließenden Elution der Analyten mit einem kleinen Volumen an Lösungsmittel oder alternativ thermischer Desorption. Diese Methoden sind wesentlich schneller und man benötigt deutlich weniger Volumen an Lösungsmittel als bei den konventionellen Methoden [315].

In der Literatur werden einige Methoden beschrieben, bei denen die flüchtigen Komponenten mittels Polymeren adsorbiert werden, dann wieder mit geeignetem Lösungsmittel eluiert und anschließend entsprechend destillativ konzentriert werden [171].

Die **Festphasenextraktion** (engl. **Solid Phase Extraktion**, kurz **SPE**) wird bei vielen chromatographischen Methoden als Probenvorbereitung eingesetzt, um die Probe zu konzentrieren und von eventuellen Verunreinigungen, die die Analyse beeinträchtigen könnten, zu befreien. Die SPE-Säule hat zwei wichtige Vorteile, Standardisierung und daher größere Reproduzierbarkeit, und ein breites Angebot an möglichen Festphasen, am wichtigsten sind da die Reversed Phase bzw. Umkehrphasen und Ion-Austausch Materialien zu nennen [315]. Durch die vielen möglichen Festphasen, ob Polarität, Hydrophobizität oder Ionisierung, gibt es für die meisten Analyten aus den unterschiedlichsten Matrices die passende Phase, um eben diese Analyten festzuhalten und anschließend mit dem passenden Lösungsmittel wieder zu eluieren. Bei der SPE ist es immer noch nötig die Probe von der Phase zu extrahieren, üblicherweise mit einem organischen Lösungsmittel, bevor man die Probe entsprechend injizieren kann. Bei der die **Festphasenmikroextraktion** ist der letzte Schritte und die Notwendigkeit eines Lösungsmittels eliminiert worden. Entwickelt wurde die SPME-Methodik 1989 u.a. von Pawliszyn [337–340]. Eine spezielle Form der SPME ist die Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME, engl. Headspace Solid-Phase Microextraction). Diese wird oft für die Isolation von Aromakomponenten aus Wein verwendet [341–348]. Vorteile dieser Methode sind kein Lösungsmittelgebrauch und Schnelligkeit. Daneben soll sie laut Kang et al. (2010) für Weinaromen hohe Reproduzierbarkeit und Sensitivität besitzen [348]. Prinzipiell erfolgt die Extraktion bei der HS-SPME über eine Adsorption der flüchtigen

Komponenten an einer speziell beschichteten Faser und einer anschließenden Desorption der flüchtigen Komponenten in dem heißen Injektor des Gaschromatographen [348]. Die hohe Reproduzierbarkeit ist der Tatsache schuldig, dass alle Arbeitsschritte durch einen Autosampler-Roboter durchgeführt werden und der Mensch als mögliche Fehlerquelle größtenteils ausgeschlossen ist. Dabei wird eine Faser, welche mit einer stationären Phase beschichtet ist, als Extraktionsmedium verwendet. Nach der Durchführung einer Extraktion aus einer Probelösung, wird die Faser in den Injektionsöffnung eines Gaschromatographen platziert und die Analyten werden thermisch direkt in den Carriergas-Strom desorbiert.

Da die SPME-Faser ein relativ kleines Volumen an gebundener stationärer Phase besitzt, ist die Extraktion meistens unvollständig. Aus diesem Grund wurde die **Stir-Bar-Extraktion** entwickelt, bei der ein Magnetrührstäbchen mit einer stationären Phase beschichtet ist [349]. Die Oberfläche ist ebenfalls höher, als bei einer Faser und das Volumen der Adsorbens-Schicht ist deutlich größer, wodurch ein größeres Phasenverhältnis als bei der SPME erreicht wird und daher eine größere Extraktionsausbeute erreicht werden kann [315].

Aufgrund des hohen Lösungsmittel-Einsatz bei der LLE und der Verlust an Aroma beim späteren Einengen der Lösungsmittel-Fraktion, ist von einer Flüssigextraktion abzusehen. Eine SDE-Methode eignet sich aufgrund der Artefakt-Bildung nicht zu Analyse der Terpene im Wein. Außerdem ist diese Methode verhältnismäßig aufwendig. Für eine einfache Headspace-Analyse liegen die Terpene in zu niedriger Konzentration im Wein vor. Bei der HS-Trap-Technik beeinflusst der variierende Ethanol-Anteil im Wein den Dampfdruck der zu analysierenden Probe zu stark und der hohe Ethanol-Anteil im Dampfdruck kann ebenfalls die gesuchten Aromastoffe von der Trap verdrängen. Daher ist auch die Headspace-Trap-Technik für eine Weinaroma-Analyse eher ungeeignet, um verlässige quantitative Aussagen über eine Weinprobe machen zu können. Da eine SPME gerätetechnisch nicht möglich war, wurde die SPE zur Isolation der relevanten Aromakomponenten aus Wein verwendet.

3.14.2 Gaschromatographische Methoden zur Terpen-Bestimmung

In der Literatur wurden viele Methoden zur Aromen-Bestimmung in Wein abhängig von den zu untersuchenden Substanzen beschrieben. González-Pombo et al. (2011) beschrieben eine GC/MS-Methode bei der die flüchtigen Komponenten über eine WAX-Säule analysiert und mittels interner Standard-Methode bestimmt wurden [171].

Auch an anderen Stellen in der Literatur wurde am häufigsten bei der Wein-Aroma-Analyse eine sogenannte WAX-Säule verwendet [171, 303, 341, 344, 345, 347, 348, 350]. Bei den WAX-Säulen (einige Herstellerbezeichnungen: DB-WAX, SB-Wax, BP-20, CP-Wax 52 CB, Supelcowax-10, Stabilwax, PE-CW, HP-20M, AT-Wax) handelt es sich um eine Kapillarsäule mit einer auf Polyethylenglykol basierenden Phase, welche sehr polar ist.

In dieser Arbeit wurden folgende Terpene mittels Standards über einen internen Standard bestimmt: cis/trans-Linalooloxid, Linalool, α -Terpineol, β -Citronellol, Nerol, Geraniol, β -Damascenon und β -Ionon. Dabei wird der Gehalt der flüchtigen Komponenten über die Peakfläche bezüglich der Peakfläche des internen Standards berechnet.

Bei der Gaschromatographie ist die Auswahl des **internen Standards** ein wichtiger Punkt, um die gesuchten Analyten quantifizieren zu können. Dabei sind einige Kriterien zu beachten. Der interne Standard muss unter den experimentellen Bedingungen flüchtig sein, der Peak des internen Standards sollte nicht mit den anderen Peaks der gesuchten Analyten überlappen, es muss immer die gleiche Menge an internem Standard zur den Proben gegeben werden. Außerdem darf der interne Standard nicht bereits in den Proben vor Zugabe vorhanden sein und muss leicht mittels GC/MS detektierbar sein [351]. Als interner Standard wurde in dieser Arbeit 4-Nonanol verwendet [303, 350].

Die entsprechende Durchführung und die Validierungsparameter sind im Anhang (s. Kapitel 7.4.7) dargestellt.

In Abb. 26 ist ein Chromatogramm der Terpen-Standards der Konzentration 20 mg/l dargestellt.

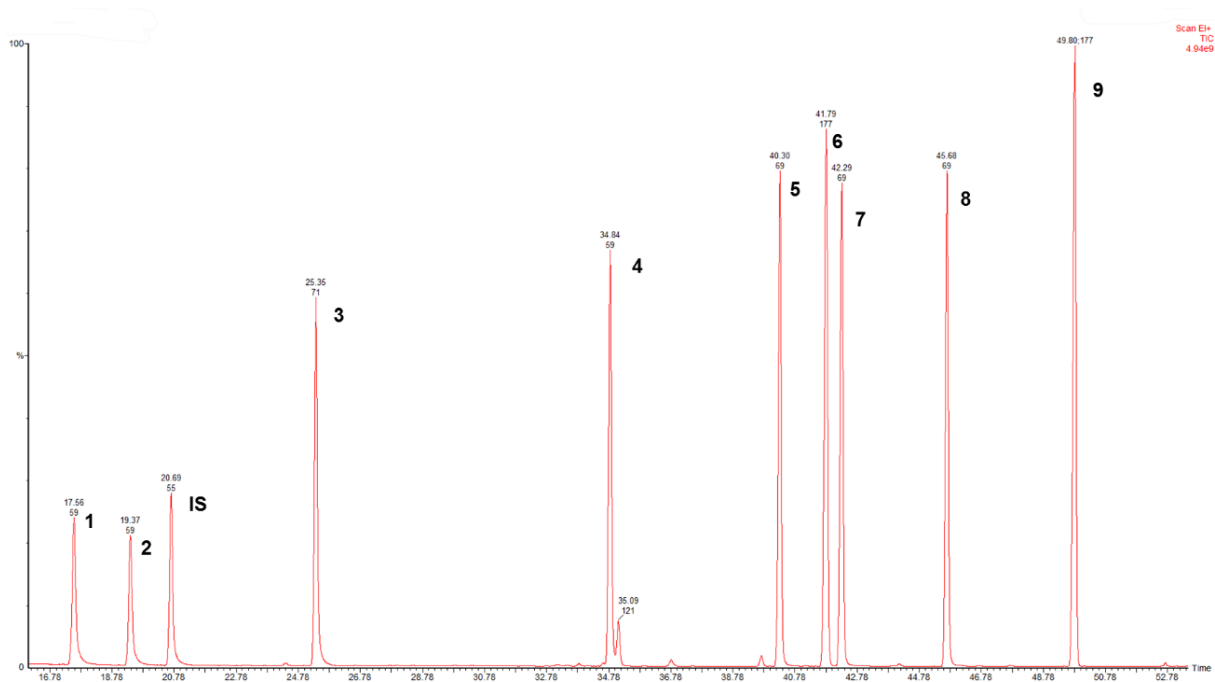


Abb. 26 GC/MS-Chromatogramm der Terpen-Standards der Konzentration 20 mg/l: 1 cis-Linalooloxid, 2 trans-Linalooloxid, 3 Linalool, 4 α -Terpineol, 5 β -Citronellole, 6 β -Damascenon, 7 Nerol, 8 Geraniol, 9 β -Ionon und IS 4-Nonanol (interner Standard)

3.14.3 Semiquantitative Auswertung

Analyten, die nicht als Reinsubstanz zur Verfügung standen und dementsprechend nicht kalibriert werden konnten, wurden semiquantitativ über den internen Standard 4-Nonanol bestimmt und als 4-Nonanol-Äquivalente dargestellt. In Tab. 19 sind die Stoffe dargestellt, die zusätzlich zu den Terpenen bestimmt wurden.

Tab. 19 Semiquantitative Bestimmung möglicher Alterungs- bzw. Oxidationsstoffe

Standard	R _t [min]	Ions monitored [m/z]	Quantifier Ion [m/z]
Ethylactat	12,2	75	45
Benzaldehyd	22,4	51, 106	77
Isobuttersäure	26,5	73, 88	43
Ethylcaprat	30,9	73, 101	88
Diethylsuccinat	33,9	55, 129	101

3.15 Separation der Magnetit-Partikel

Magnetismus wird schon seit langer Zeit in verschiedenen wissenschaftlichen Gebieten eingesetzt und war für lange auf den Bergbau und das Metallgewerbe beschränkt. Ein erstes Patent dazu wurde 1792 von William Fullarton eingereicht [352]. Applikationen im Bereich Biotechnologie sind weit neuer. Erst in den frühen 1940iger Jahren wurden magnetische Eisenoxide dazu benutzt um gelöste und kolloidale biologische Substanzen aus Schmutzwasser zu entfernen [353, 354]. Die Hochgradient-Magnet-Separation (HGMS) erweiterte die Verwendung von magnetischen Partikeln in der Biotechnologie in den 1950igern [355]. In den 1970iger kam es dann zu ersten Verwendungen solcher Partikel als Immobilisierungsmatrix [356–361]. Heutzutage wird die Magnet-Separation von Zellen, Protein und Nukleinsäuren routinemäßig in Laboren genutzt [354].

Angesichts des nicht-magnetischen Verhaltens der überwiegenden Mehrheit von biologischen Proben kann das Ziel in einer raschen und hochselektiven Art und Weise unter sehr schonenden Bedingungen abgetrennt werden (geringe Scherkräfte) [354]. Bei vielen Applikationen erfolgt die Abtrennung der magnetischen Partikel mit einem Niedrigmagnetfeld-Separator (<500 T/m) mit einem Permanent-Magneten, geeignet für kleine Volumina (bis zu 50 ml), allerdings limitiert auf Batch-Anwendungen und Mikropartikel. Werden, wie in dieser Arbeit, kleine oder niedrig magnetisierbare Partikel benutzt, muss eine Abtrennung der Partikel mit einem Hochgradient-Magnetfeld-Separator erfolgen. Diese Systeme bestehen typischerweise aus einem Behälter, der mit einer magnetisierbaren Matrix gefüllt ist und i.d.R. einem Elektromagneten, der ein starkes elektromagnetisches Feld (~ 1 T) erzeugt [354]. Der erzeugte magnetische Gradient ist höher als 10^4 T/m und erzeugt Kräfte, die stark genug sind, um sogar schwach magnetische Partikel im Durchfluss abzutrennen [362, 363]. HGMS sind die einzig geeigneten magnetischen Bioaufreinigungssysteme für größere Prozess-Volumina [354].

Für die meisten Applikationen werden superparamagnetische Partikeln mit einer hohen magnetischen Sättigung benötigt. Wie Paramagnete, besitzen superparamagnetische Partikel keine Remanenz, d.h. in Abwesenheit von einem externen Magnetfeld ist ihre durchschnittliche Magnetisierung null. Dadurch weisen die Partikel eine bessere Dispergierfähigkeit in Lösungen auf, da sie nicht magnetisch miteinander interagieren und so keine Aggregate formen [354]. Jedoch ist die magnetische Empfänglichkeit dieser Partikel deutlich höher als von Paramagneten und

wie Ferrimagnete, erreichen die superparamagnetischen Partikel ihre magnetische Sättigung ohne eine magnetische Hystereseschleife aufzuweisen. Hochmagnetisierbare Partikel reagieren schneller indem sie höhere Flussdichten erzeugen, wenn diese an einem externen magnetischen Feld angelegt werden. Dadurch können geringere Feldstärken für einen effizienteren Separationsprozess verwendet und eine bessere Prozessdynamik erreicht werden [354].

Holschuh und Schwämmle (2005) ermittelten für eine Magnet-Separation (HGMS mit einer 8 l Filterkammer) mit einer Flussrate von 150 l/h aus einer Zell-Suspension von 100 l und einer Partikel-Beladung von 500 g eine Effizienz von 99 % [364]. In der Weinproduktion muss mit deutlich größeren Volumina hantiert werden, man kann von 1000 bis zu 50000 l ausgehen. Für solche Volumina ist ein sehr großer Hochgradient-Magnet-Separator nötig, um eine möglichst hohe Flussrate erzielen zu können.

3.15.1 Prinzip

Die Magnetit-Partikel-Suspension wird durch eine Filterkammer geleitet. In der Filterkammer ist eine Rotor-Stator-Filtermatrix und durch Anlegen eines Hochgradient-Magnetfeldes werden die Magnetit-Partikel in der Filterkammer festgehalten. Nach der Filtration werden die Magnetit-Partikel durch Ausschalten des Magneten wieder aus der Filterkammer mit Hilfe von Wasser oder einer Puffer-Lösung gespült und können entsprechend wieder verwendet werden.

Die Filtrationsversuche wurden mit einem HGMS am Umweltcampus Birkenfeld in Zusammenarbeit mit der AG Kampeis durchgeführt.

3.15.2 Durchführung

Tab. 20 Parameter der Hochgradient-Magnet-Separations-Laboranlage

Hochgradient-Magnet-Separator	Fa. Vulkan Technic, Fa. PerkinElmer chemagen Technology
	peristaltische Pumpe: Ismatec MCP, Fa. IDEX Pumpenkopf: Easy-Load 2, Fa. Masterflex SE
Schläuche und Verbindungen	Pumpenschlauch: Innendurchmesser 8 mm (Magnet-Separation) Rohrleitungen der Anlage: aus Polyurethan (Ø 6 mm) und Schnellkupplungen aus Polyoxymethylen, Fa. Riegler
Durchflusszytometer	cytometer CyFlow Space, Fa. Sysmex Partec

Die HGMS-Laboranlage bestand aus einem Magnetabscheider, einer Pumpe, einem Durchflussmesser und einem Prozesssteuerungssystem. Die Förderpumpe war eine peristaltische Pumpe vom Typ Ismatec MCP mit einem Pumpenkopf Typ Easy-Load 2. Der Pumpenschlauch hatte einen Innendurchmesser von 8 mm. Die anderen

Rohrleitungen der Anlage waren aus Polyurethan mit einem Innendurchmesser von 6 mm und Schnellkupplungen aus Polyoxymethylen. Der Hochgradient-Magnet-Separator (s. Abb. 27 A) wurde mit einer Rotor-Stator-Filtermatrix (s. Abb. 27 B und Abb. 28) ausgestattet.

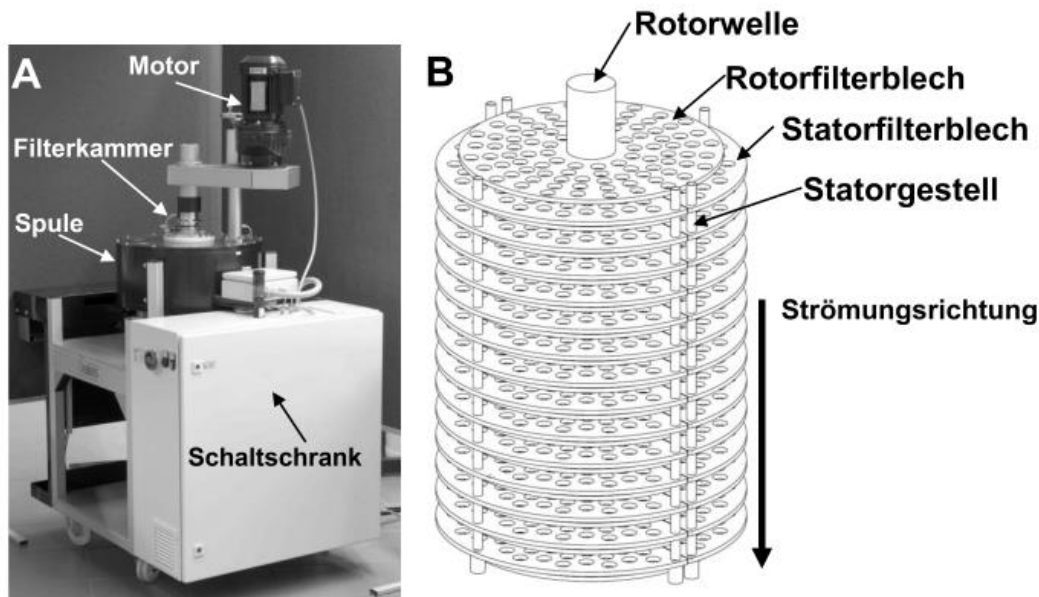


Abb. 27 Hochgradient-Magnet-Separator (A) und Rotor-Stator-Filtermatrix (B)

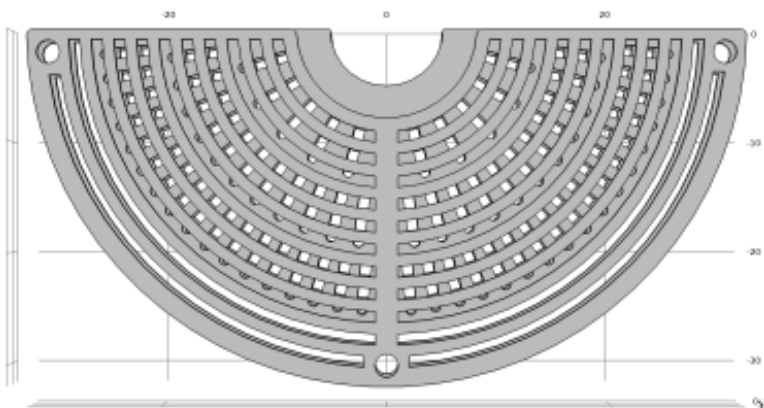


Abb. 28 Verwendete Rotor-Stator-Filtermatrix

Der Rotor-Stator-Magnetscheider erzeugt eine magnetische Flussdichte von 0,25 T in dem zylindrischen Volumen der elektromagnetischen Spule. Während des Betriebs wurde die Spule mittels Doppelmantel mit Wasser gekühlt, so dass die Temperatur und die Feldstärke konstant gehalten wurden. Die zylindrische Filterkammer mit einem Volumen von 250 ml wurde in der Mitte der Spule angeordnet. Die Filtermatrix bestand aus zwei Arten von kreisförmigen Filterplatten aus magnetischem rostfreiem Stahl (Werkstoffnummer 1.4016), die konzentrisch abwechselnd aufeinander gestapelt wurden. Die Rotor-Filterplatten wurden auf einer Rotorwelle und die Stator-Filterplatten auf einem Halterahmen angebracht ist. Die Stator-Filterplatten wurden durch drei 2

mm Gewindestangen verbunden, wobei der Abstand der Platten untereinander durch Abstandshalter aus Teflon eingestellt wurde (s. Abb. 27 B). Während der magnetischen Trennung floss die Flüssigkeit mit 400 ml/min um die Filterplatten und durch die Löcher in der Filterplatten, wobei der Rotor still stand. Hierdurch wurden die magnetischen Teilchen auf den Platten gesammelt und bildeten dichte Ablagerungen auf den Filterplatten. Im Allgemeinen, wenn die maximale Masse der Partikel erreicht wurde, tritt ein Filter-Durchbruch ein und ankommende Teilchen werden nicht länger auf den Filterstahlplatten zurückgehalten. Zum Rückgewinnen der Partikel wurde das Magnetfeld abgeschaltet und die Filterkammern gespült. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Rotor aktiviert und eine Geschwindigkeit von bis zu 1380 Umdrehungen pro Minute eingestellt. Durch die Scherkräfte um die Rotorfilterplatten wurden die Partikelablagerungen resuspendiert und die Teilchen mit dem Strom aus der Kammer ausgespült. Hierbei war es notwendig, zwischen dem Spülen in und gegen die Laderichtung zu unterscheiden, aufgrund der Lage der Masse der angesammelten Partikel. Die Partikelablagerungen waren vor allem am vorderen Viertel des Filters in Laderichtung.

Die Trennversuche wurden mit einer Partikel/Weißwein-Suspension mit einem Volumen von 10 l und einer Konzentration von 0,15 g/l durchgeführt. Dazu wurde die Suspension wiederholt filtriert und aus der Filterkammer sechsmal gespült. Nach jedem Lauf wurde die Aktivität der immobilisierten Enzyme im Vergleich zur Ausgangsaktivität bestimmt. Die Suspension wurde mit 400 ml/min durch den Filter gepumpt, beim Rückspülen rotierte der Rotor mit 1380 Umdrehungen/min.

Es wurden mehrere Filtrationen mit ein und demselben an Magnetit-Partikel gekoppelten Enzymen durchgeführt, um den Einfluss der Scherkräfte auf die Aktivität der gekoppelten Enzyme zu testen und damit Rückschlüsse auf die Wiederverwendbarkeit ziehen zu können.

Die Enzyme wurden nach Methode 3.5 gekoppelt und die Enzymaktivität nach 3.3 bestimmt.

Die Quantifizierung der Separationseffizienz der Magnetit-Partikel wurde mittels Offline-Analyse durch ein Durchflusszytometer durchgeführt. Das System wurde für eine Suspension mit Wasser und Weißwein kalibriert. Hierbei wurde folgende lineare Funktionen für die Proportionalität zwischen Zählungen pro ml und g/l ($R^2 = 0,99$) erhalten:

Partikel/Weißwein-Suspension: $c_{\text{Partikel}} [\text{g/l}] = n [\text{Zählungen/ml}] / 3,095 \cdot 10^7$

3.16 Sensorik

Für eine sensorische Bewertung der Weine (mit und ohne Enzymbehandlung) wurden diese sowohl einer Rangordnungsprüfung als auch einer beschreibender Prüfung (deskriptiv) mit Intensitätsabfrage unterzogen.

Als Grundlage dienten die aktuell geltenden DIN-Vorschriften (Sensorische Prüfung - Allgemeine Grundlagen DIN 10950, Rangordnungsprüfung DIN 10963 und Intensitätsprüfung DIN 10966). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Sensorik-Software EyeQuestion (Version 3.8.13, Fa. Logic8 BV, Elst, Niederlande). Die Ergebnisse wurden in Netzdiagrammen grafisch dargestellt, statistisch signifikante Unterschiede (Fischer-LSD) wurden in den zugehörigen Tabellen mit entsprechenden Buchstaben je Signifikanzlevel gekennzeichnet. Die Durchführung und Auswertung der sensorischen Untersuchungen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem DLR Mosel in Persona Herrn Achim Rosch.

3.16.1 Durchführung

Die sensorischen Untersuchungen wurden mit einem nach DIN 10961 geschulten Prüferpanel ($n \geq 10$) in einem den Anforderungen der DIN 10962 entsprechenden Prüfraum durchgeführt. Die zu prüfenden Proben wurden gemäß DIN EN ISO 4120 mit den Zahlen zufällig kodiert und verschlüsselt. Die Verkostung der Prüfproben erfolgte im offiziellen schwarzen DIN-Prüfglas Sensus Wein (DIN 10960, Fa. Schott Zwiesel).

3.16.2 Rangordnungsprüfung nach DIN 10963

Die Rangordnungsprüfung dient dazu mehrere Prüfmuster in eine Rangfolge zu bringen. Damit kann u.a. ein Einfluss unterschiedlicher Behandlung der Weine festgestellt werden. Den Prüfpersonen wurden die Prüfproben einer Varianten-Serie vorgelegt, die hinsichtlich der Prüfkriterien „Komplexität“ und „Gesamteindruck“ in eine Rangfolge (1 – 2, mit 1 am besten und 2 am schlechtesten) gebracht werden sollten.

3.16.3 Deskriptive Sensorik-Intensitätsprüfung nach DIN 10966

Dieses Prüfverfahren dient dazu eine Bewertung der Sinneseindrücke nach Art und Intensität auf einer Skala von 1 – 7 (1 = schwach, 7 = stark) vorzunehmen. Folgende sensorische Attribute wurden abgefragt:

Geschmack:

Geschmacksintensität, Apfel, Maracuja, Zitrone, Blumig, Honig, Würzig, Rauchig, Fruchtig, Reifeentwicklung, Nachgeschmack;

Geruch bzw. Aroma:

Geruchsintensität, Apfel, Maracuja, Zitrone, Blumig, Würzig, Rauchig, Fruchtig;

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Proteinbestimmung handelsüblicher Enzympräparate

Zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität benötigt man den Proteingehalt der Enzympräparate. Dazu wurden die 10 handelsüblichen Enzympräparate, Everzym Arom, Lafazym Arom, Lallzyme BETA, Natuzym Arom MG, Novarom Blanc, Panzym Arome G, Rapidase Revelation Aroma, Trenolin Bukett DF, VinoTaste Pro und Zimarom, sowohl nach der Kjeldahl-, als auch nach der Bradford-Methode auf die Protein-Konzentration untersucht (s. Kapitel 3.2). Der Proteingehalt der Enzympräparate ist nahezu gleichzusetzen mit dem Enzymgehalt der Präparate. Da diese Produkte aus einer Vielzahl von Enzymen bestehen und nicht bekannt war welche, konnte daraus dementsprechend nicht auf die Anteile der jeweiligen Enzyme im eigentlichen Enzympräparat geschlossen werden.

Abb. 29 zeigt den Proteingehalt der Enzympräparate nach Kjeldahl. Die 10 Enzympräparate wiesen einen Proteingehalt im Bereich von 2,6 % bis 12,0 % (w/w) auf. Lafazym hatte den höchsten Proteingehalt mit 12,0 % ($\pm 0,42$) und Lallzyme mit 2,6 % ($\pm 0,05$) den niedrigsten. Everzym wies einen Proteingehalt von 7,2 % ($\pm 0,59$), Natuzym von 8,3 % ($\pm 0,61$), Novarom von 8,2 % ($\pm 0,54$), Panzym von 7,4 % ($\pm 0,31$), Rapidase von 4,9 % ($\pm 0,24$), Trenolin von 8,7 % ($\pm 0,08$), VinoTaste von 3,6 % ($\pm 0,34$) und Zimarom von 5,6 % ($\pm 0,30$) auf.

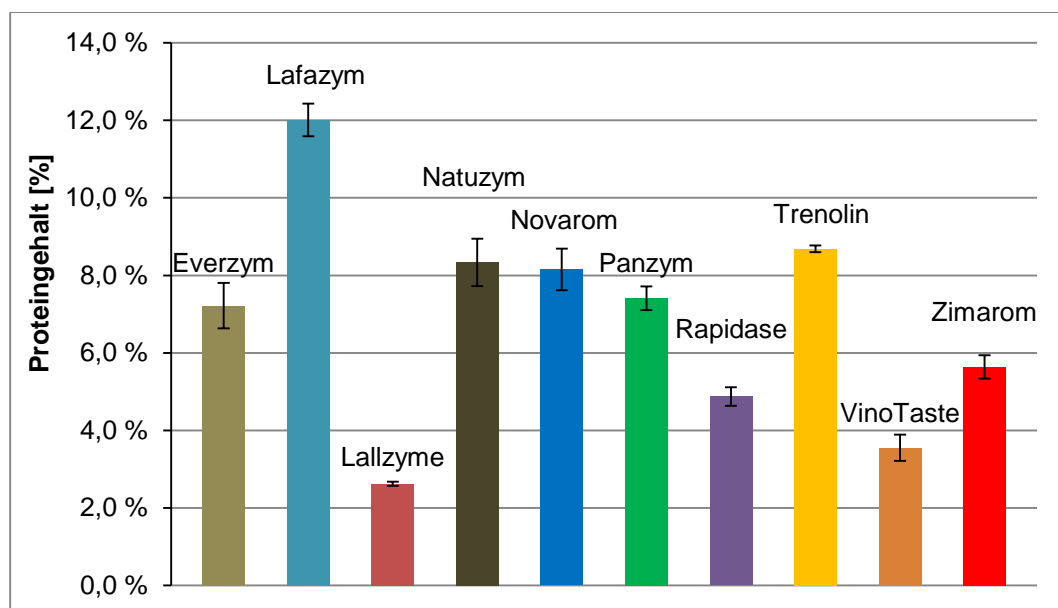


Abb. 29 Proteingehalte der Enzympräparate nach Kjeldahl (s. Kapitel 3.2.1)

Abb. 30 zeigt den Proteingehalt der Enzympräparate nach Bradford, die 10 Enzympräparate hatten einen Proteingehalt im Bereich von 1,1 % bis 4,4 % (w/w). Lafazym besaß auch bei der Bradford-Bestimmung den höchsten Proteingehalt mit 4,4 % ($\pm 0,16$) auf und Lallzyme hatte mit 1,1 % ($\pm 0,004$) auch hier den niedrigsten Proteingehalt. Everzym wies eine Protein-Konzentration von 3,2 % ($\pm 0,004$), Natuuzym von 3,2 % ($\pm 0,04$), Novarom von 2,7 % ($\pm 0,13$), Panzym von 4,1 % ($\pm 0,15$), Rapidase von 2,4 % ($\pm 0,03$), Trenolin von 2,4 % ($\pm 0,07$), VinoTaste von 1,6 % ($\pm 0,09$) und Zimarom von 2,5 % ($\pm 0,08$) auf.

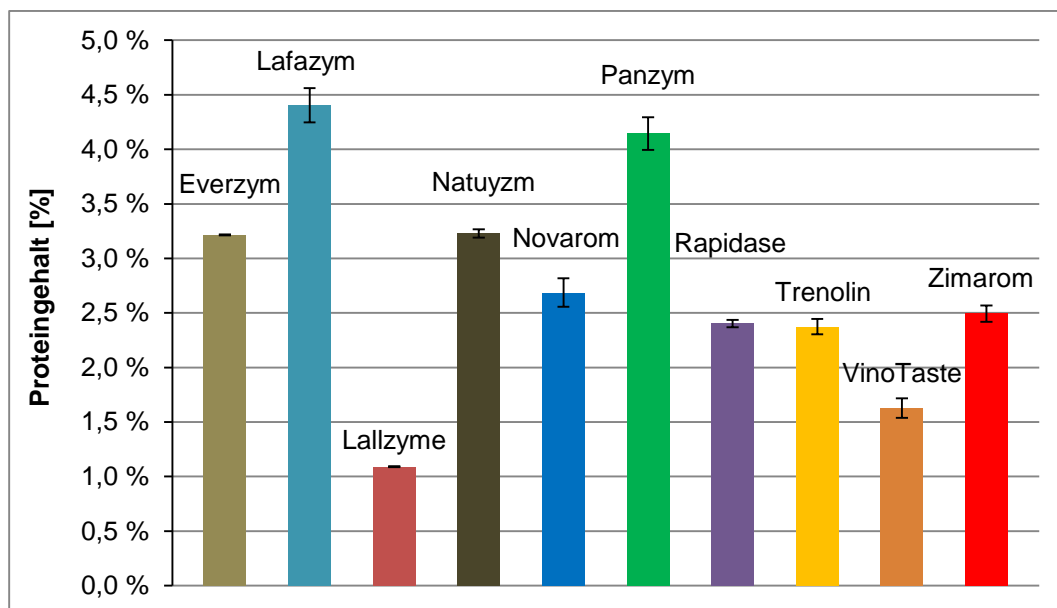


Abb. 30 Proteingehalte der Enzympräparate nach Bradford (s. Kapitel 3.2.2)

Bei der Proteinbestimmung nach Kjeldahl wurden signifikant höhere Proteingehalte gefunden, als nach der Bradford-Methode. Allerdings waren die Verhältnisse unter den Enzympräparaten ähnlich. Im Schnitt ergab die Kjeldahl-Methode eine etwa doppelt so hohe Protein-Konzentration. Der Proteingehalt der jeweiligen Enzympräparate ist i.d.R. mit dem Enzymgehalt des entsprechenden Präparats gleichzusetzen. Je höher also der Proteingehalt, desto höher ist wahrscheinlich der Enzymgehalt im jeweiligen Enzympräparat. Bei den anderen Stoffen handelt es sich um Füllstoffe, welche das Dosieren für den Anwender erleichtern sollen (s. Kapitel 2.3.3).

Da die Enzym-Zusammensetzung der Produkte nicht bekannt war und Kjeldahl indirekt über den Stickstoffgehalt den Proteingehalt bestimmt, Bradford aber über die basischen und unpolaren Seitenketten der Proteine bzw. Enzyme, erklärt dass die erhaltenen, unterschiedlichen Protein-Konzentrationen der beiden Methoden.

In der Biochemie und entsprechenden Publikationen wird häufig der Proteingehalt von Enzymproben anhand der beschriebenen Bradford-Methode bestimmt. Dabei reagiert ein Farbstoff direkt mit Seitenketten der Aminosäuren und wird anschließend photometrisch bestimmt. Daher wurde der Proteingehalt der Enzympräparate ebenfalls vergleichend über diese Methode bestimmt. Da allerdings die an die Enzyme gekoppelten magnetischen Partikel diese photometrische Bestimmung verfälscht, eignet sich diese Methode nicht zur Bestimmung von immobilisiertem Protein bzw. Enzym. Somit wurde im weiteren Verlauf der Proteingehalt mittels Kjeldahl-Methode indirekt über den Stickstoffgehalt bestimmt und die Ergebnisse dieser Methode zur Berechnung der spezifischen Aktivität verwendet. Da bei dieser Methode die Proteine bzw. Enzyme vollständig hydrolysiert werden, stellt die Bindung bzw. Immobilisierung der Proteine kein Problem dar.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass das Produkt Lafazym Arom die höchste Enzymkonzentration aufwies. Die Enzympräparate Everzym Arom, Natuzym Arom MG, Novarom Blanc, Panzym Arome G, Rapidase Revelation Aroma, Trenolin Bukett DF und Zimarom lagen alle in einem ähnlich Bereich an Proteinkonzentration (4,9 bis 8,7 %) bzw. Enzym. Lallzyme BETA und VinoTaste Pro besaßen die geringsten Proteingehalte (mit 2,6 % bzw. 3,6 %) und wiesen somit wahrscheinlich die niedrigste Konzentration an Enzymen auf. Da es sich bei den Enzympräparaten um eine Mischung aus pektolytischen Enzymen handelt, sagt der Gehalt an Protein bzw. Enzymen in dem jeweiligen Produkt noch nichts über die Qualität und Zusammensetzung aus. Man kann daher keine Rückschlüsse auf die Konzentration an Glycosidasen in dem Enzympräparat ziehen und somit auch nicht auf das Aromafreisetzungspotential. Der Proteingehalt dient lediglich dazu die spezifische Aktivität der jeweiligen Produkte zu bestimmen, um diese später Vergleichen zu können und so Rückschlüsse auf den Gehalt an Glycosidasen ziehen zu können.

4.2 Aktivitätsbestimmungen

4.2.1 Charakterisierung verschiedener Enzympräparate

Im ersten Schritt wurden die verschiedenen, marktgängigen Enzympräparate zur Aromafreisetzung auf ihre β -Glucosidase-Aktivität untersucht und entsprechend verglichen. Diese Versuche dienten dazu, einerseits das Enzympräparat mit dem höchsten Anteil an β -Glucosidase zu finden und andererseits das Produkt mit der besten Eignung aussuchen, um dieses Enzympräparat anschließend an die Magnetit-Partikel zu Immobilisierung. Dazu wurden die 10 handelsüblichen Enzympräparate auf ihre β -Glucosidase-Aktivität untersucht und unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert (s. Kapitel 3.3). Die Charakterisierung dieser 10 handelsüblichen und marktgängigen Enzympräparate sollte als Screening dienen, um das Enzympräparat mit der unter weintypischen Bedingungen besten β -Glucosidase-Aktivität für die weiteren Versuche zu finden. Folgende Parameter wurden unter Betrachtung der Relevanz für Wein untersucht:

- pH-Wert (2,8 – 5,0)
- Temperatur (15 – 37 °C)
- Ethanol (0 – 15 Vol.-%)
- Glucose (0 – 100 g/l)
- Fructose (0 – 200 g/l)
- Kaliumdisulfit (0 – 250 mg/l)

4.2.1.1 Temperatur-Abhängigkeit der β -Glucosidase-Aktivität

Betrachtet man die Aktivitätswerte der 10 Enzympräparate im Temperaturbereich von 15 bis 37 °C als relative Aktivität bei pH 5,0, zeigten alle Enzyme ein ähnliches Verhalten und gewannen mit zunehmender Temperatur an Aktivität (s. Abb. 31).

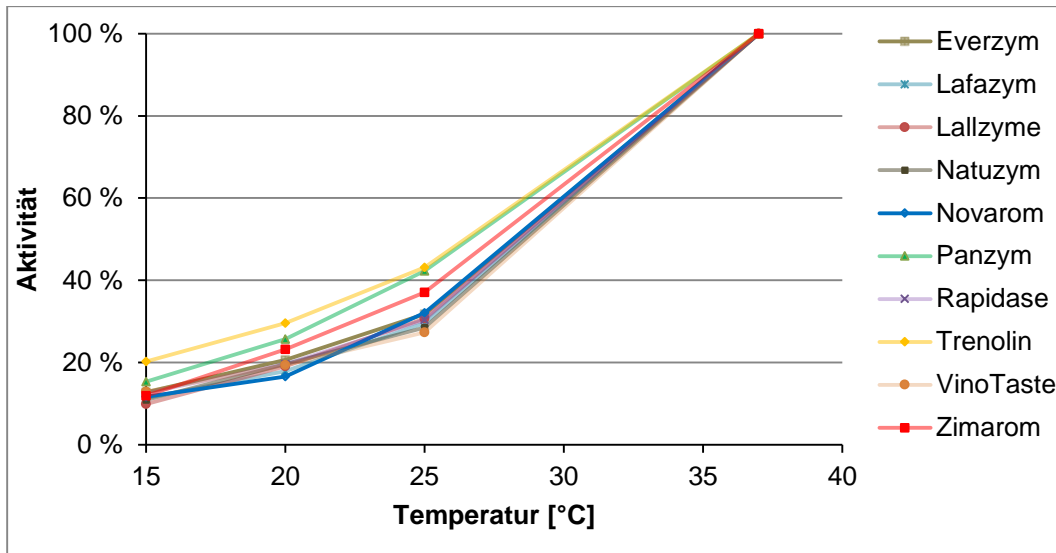


Abb. 31 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Temperatur, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

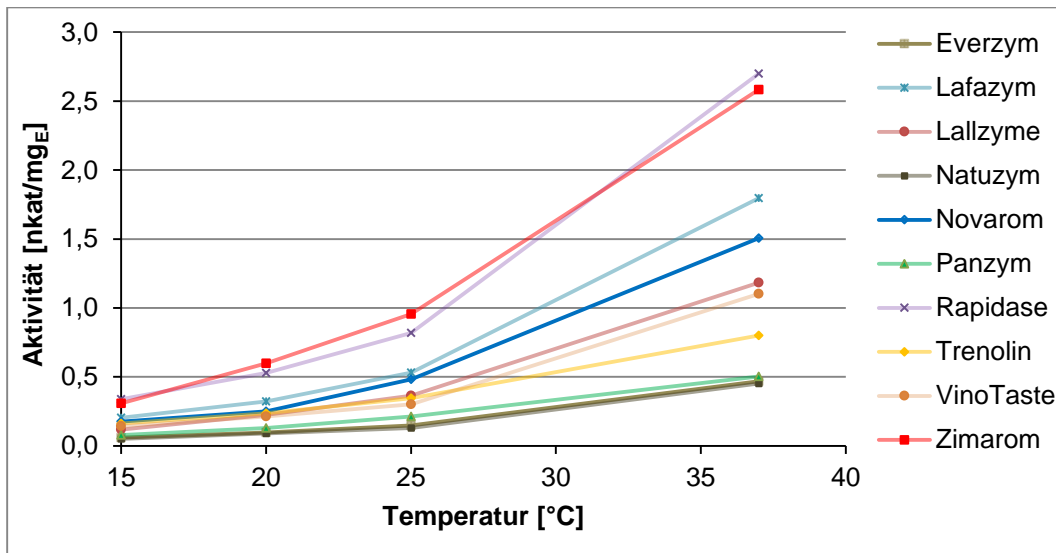


Abb. 32 Aktivität (nkat/mg_E) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Temperatur

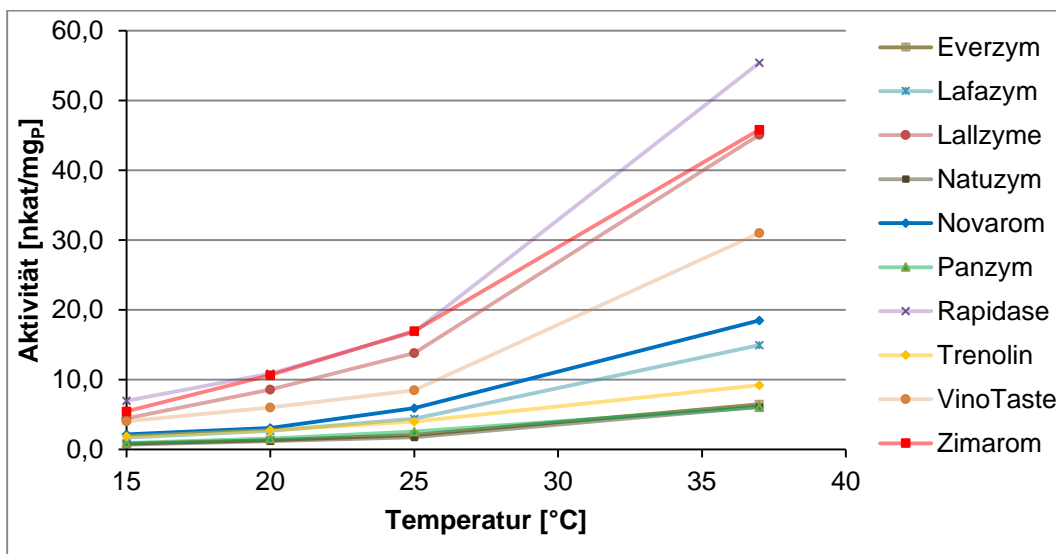


Abb. 33 Aktivität (nkat/mg_P) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Temperatur

Bezogen auf die Menge an eingesetztem Enzym (nkat/mg_E), wiesen die Enzympräparate Rapidase und Zimarom die höchsten Aktivitätswerte mit ca. 2,7 nkat/mg_E auf. Panzym und Everzym besaßen die niedrigsten Werte mit ca. 0,5 nkat/mg_E (s. Abb. 32). Bezieht man die Aktivität allerdings auf den entsprechenden Proteingehalt der Enzympräparate, hatte Rapidase den höchsten Aktivitätswert mit 55,4 nkat/mg_P, gefolgt von Lallzyme und Zimarom mit ca. 45 nkat/mg_P. Die anderen 7 Enzympräparate lagen im Bereich von 6 bis 31 nkat/mg_P (s. Abb. 33). Normierte man die Aktivitätswerte mit dem Referenzpunkt (pH 5,0 und 37 °C) wiesen alle Enzyme ein sehr ähnliches Verhalten auf, je niedriger die Temperatur, desto niedriger die Aktivität. Wie zu erwarten, entspricht dieses Verhalten der van-'t-Hoff'sche Regel oder auch RGT-Regel genannt: erhöht sich die Temperatur, steigert sich die Reaktionsgeschwindigkeit um das 2- bis 4- fache bzw. das Enzym setzt 2 bis 4-mal so viel Substrat um [365].

Somit hat die Temperatur später einen entscheidenden Einfluss auf die β -Glucosidase-Aktivität im Wein. Weißweine werden meist bei Temperaturen unter 20 °C vergärt (s. Kapitel 2.1.1.4) und später bei ca. 10 °C gelagert, eine Lagerung bei Temperaturen bis zu 20 °C führt allerdings ebenfalls nicht zu starken sensorischen Veränderungen im Wein [41]. Bei 20 °C verfügen die Enzympräparate durchschnittlich noch über eine Rest-Aktivität von 20 % im Vergleich zum Referenzpunkt 37 °C und bei 15 °C noch ca. 10 bis 15 % Rest-Aktivität. Somit kommt es wahrscheinlich zu einem erheblichen Verlust an β -Glucosidase-Aktivität beim Einsatz im Wein.

4.2.1.2 pH-Abhängigkeit der β -Glucosidase-Aktivität

Mit Blick auf die Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 2,8 bis 5,0), zeigten die meisten Enzymprodukte ein analoges Verhalten, die Aktivität nahm mit niedrigeren pH-Werten ab, abgesehen von pH 4,0. Bei den meisten Enzympräparaten hatte der pH 4,0 keinen Einfluss auf die Aktivität bzw. nur einen äußerst geringen mit Ausnahme von Trenolin und VinoTaste, welche signifikant an Aktivität verloren (s. Abb. 34).

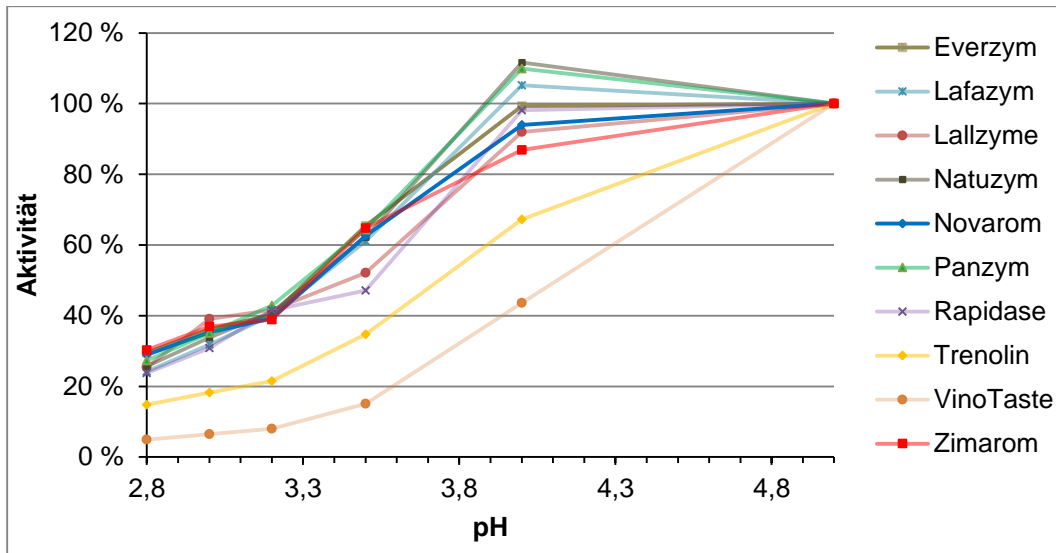


Abb. 34 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit des pH-Wertes, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

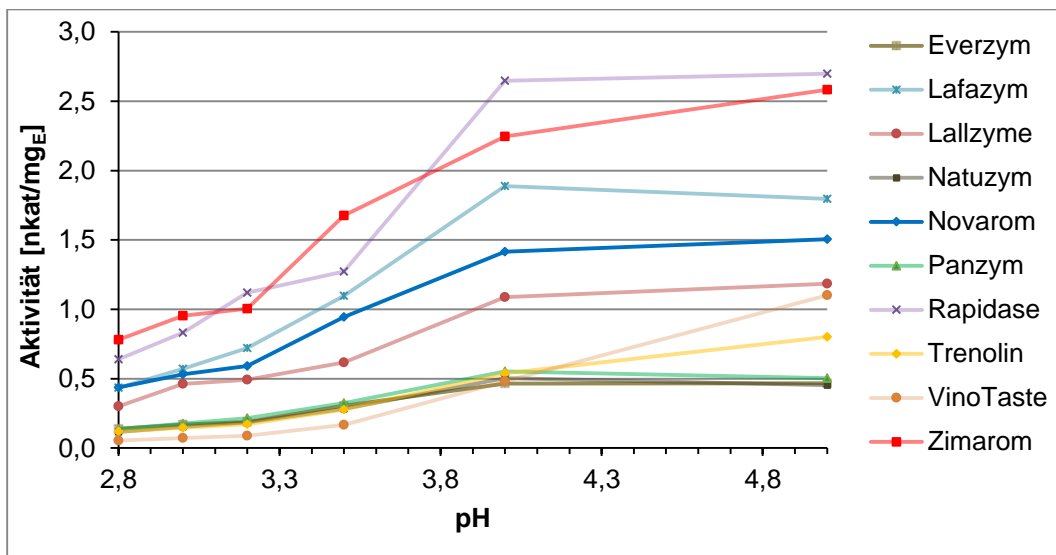


Abb. 35 Aktivität (nkat/mg_E) der Enzympräparate in Abhängigkeit des pH-Wertes

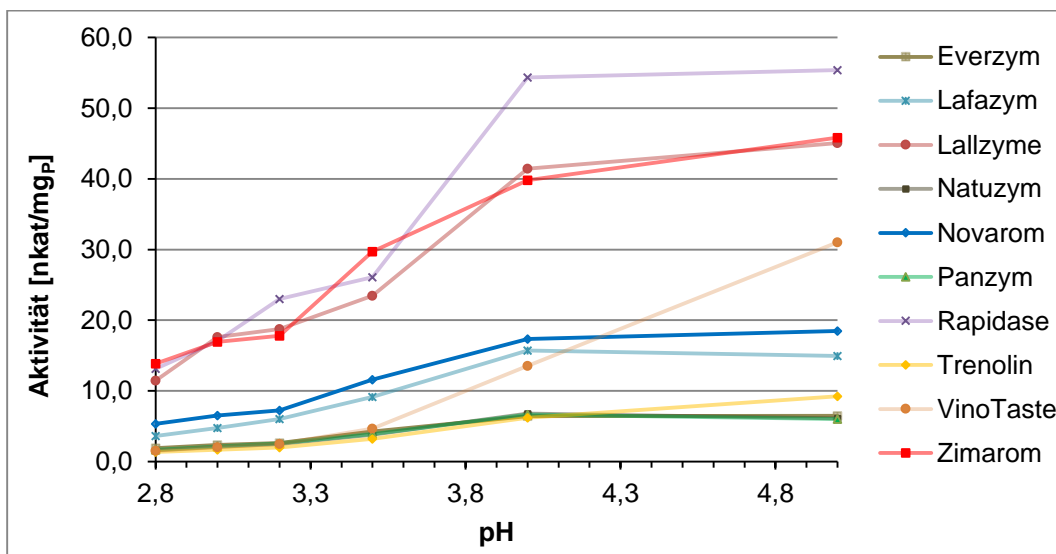


Abb. 36 Aktivität (nkat/mg_P) der Enzympräparate in Abhängigkeit des pH-Wertes

Bezogen auf die Menge an eingesetztem Enzym, zeigten Rapidase und Zimarom mit ca. 2,7 nkat/mg_E die höchsten Aktivitätswerte bei pH 5,0. Im weinrelevanten Bereich von pH 3,0 bis 3,5, besaßen ebenfalls die Enzyme Rapidase und Zimarom die höchsten Werte (s. Abb. 35). Bezogen auf den Proteingehalt, wiesen die drei Enzympräparate Rapidase, Lallzyme und Zimarom die höchsten Werte auf (s. Abb. 36). Die drei Enzyme besaßen ebenfalls signifikant höhere Werte als die anderen 7 Enzympräparate. Diese Präparate wurden mit bis zu 40% stark inhibiert und dieser Verlust an Aktivität setzte sich sukzessive bis pH 2,8 fort (s. Abb. 34).

Für mikrobielle β -Glucosidase wurden pH-Optima in einem Bereich von 4,0 bis 6,0 [210] und besonders für β -Glucosidasen aus *A. niger* noch akzeptable Aktivitäten bei pH-Werten unter 4 berichtet [211]. Unter anderem beobachteten Martino et al. (1996) für eine β -Glucosidase (*A. niger*) ein pH-Optimum von 5,0 und einer Rest-Aktivität von 64 % bei einem weintypischen pH von 3,5 [22]. Spagna et al. (1998 und 2002) ermittelten ein pH-Optimum von 4,5 und einer Rest-Aktivität von ca. 50 % bei pH 3,5 [24, 27]. González-Pombo et al. (2014) verwiesen ebenfalls auf ähnliche Werte [20]. Somit entsprechen die erhaltenen Ergebnisse den Erwartungen für die meisten Enzympräparate, die ebenfalls eine Rest-Aktivität von ca. 50 bis 65 % aufwiesen. Einzige Ausnahmen bildeten die Präparate Trenolin und VinoTaste, die durch einen niedrigen pH deutlich stärker an Aktivität verloren. Besonders VinoTaste besaß bei pH 3,5 lediglich eine Rest-Aktivität von 15,1 % im Vergleich zum Referenzpunkt pH 5,0 und 37 °C. Für die anderen Enzympräparate ist von einer pH-Wert-abhängigen Rest-Aktivität von ca. 60 % bei einem weintypischen pH von 3,5 auszugehen.

4.2.1.3 Ethanol-Abhängigkeit der β -Glucosidase-Aktivität

Interessanterweise gewannen alle Enzymprodukte durch Erhöhung der Ethanol-Konzentration an Aktivität (Abb. 37). Allerdings war das Ausmaß an Aktivitätssteigerung bei höheren Ethanol-Konzentrationen (15 Vol.-%) sehr unterschiedlich, abhängig vom Enzympräparat. Die Steigerung umfasste einen Bereich von lediglich 20 % bei Novarom und bis zu fast 70 % bei Natuzym.

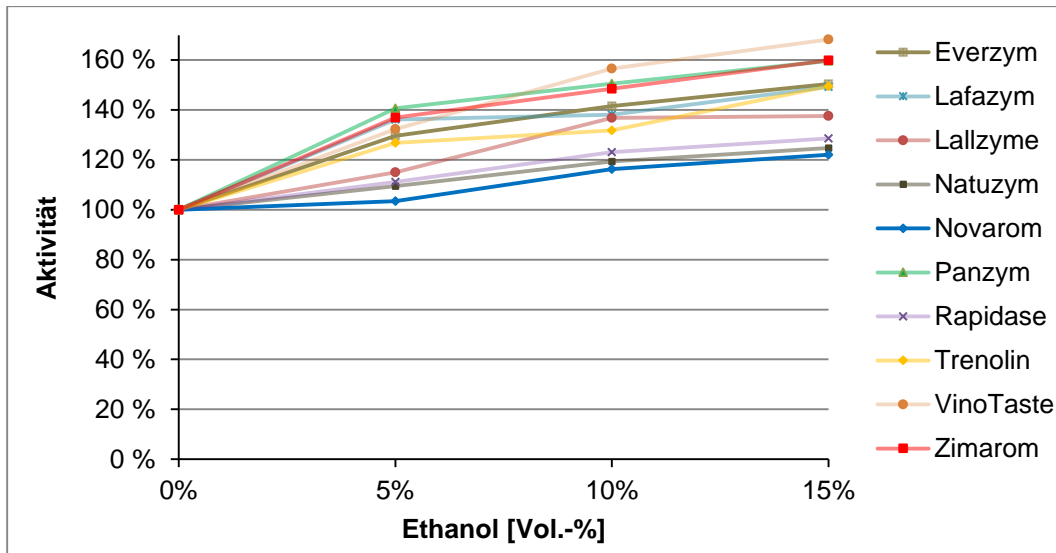


Abb. 37 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Ethanol-Konzentration, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

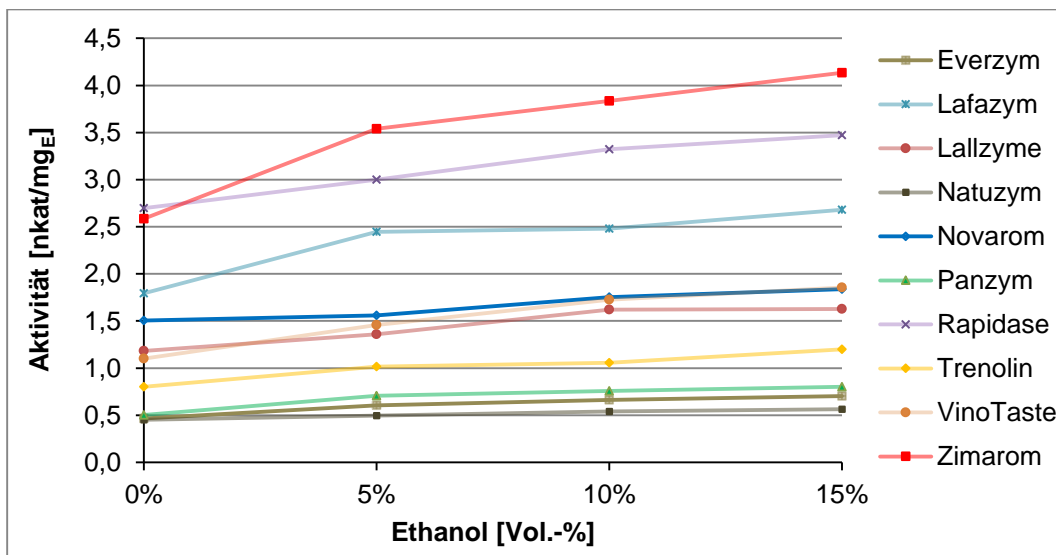


Abb. 38 Aktivität (nkat/mg_E) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Ethanol-Konzentration

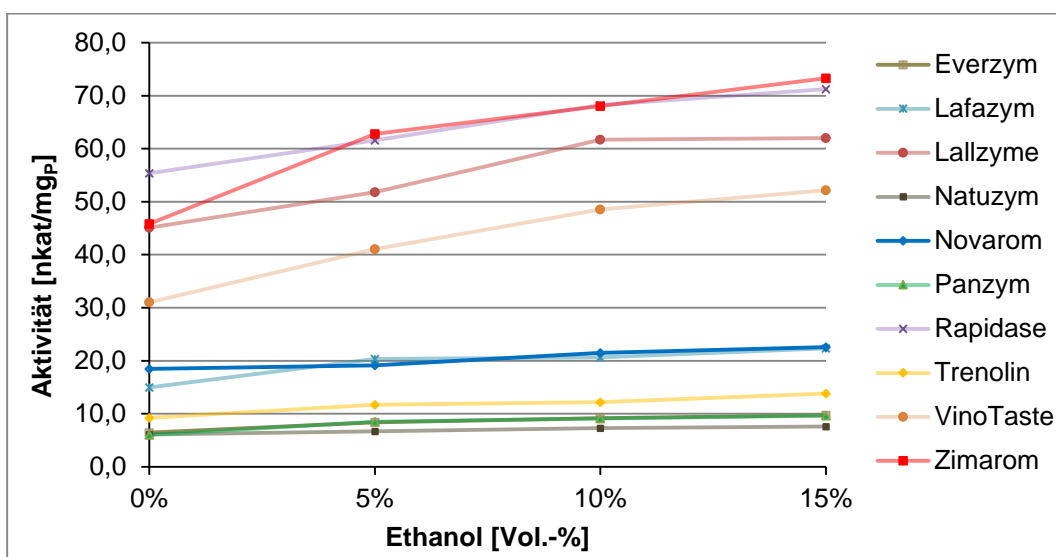


Abb. 39 Aktivität (nkat/mg_P) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Ethanol-Konzentration

Die Enzympräparate Rapidase und Zimarom wiesen mit 3,5 und 4,1 nkat/mg_E bei 15 Vol.-% Ethanol ebenfalls die höchsten Aktivitätswerte auf (s. Abb. 38). Bezogen auf die Protein-Konzentration hatten die vier Enzympräparate Rapidase (71,2 nkat/mg_P), Lallzyme (62,0 nkat/mg_P), VinoTaste (52,2 nkat/mg_P) und Zimarom (73,3 nkat/mg_P) signifikant höhere Werte, 52,2 bis 73,3 nkat/mg_P im Vergleich zu 7,6 bis 22,5 nkat/mg_P der anderen 6 Enzympräparate (s. Abb. 39).

Yan und Lin (2014) beobachteten ebenfalls eine Aktivitätssteigerung durch Ethanol (130 % bei 10 Vol.-%) [366]. Bei solchen alkoholtoleranten Enzymen wurde von Transglycosylierungsaktivitäten berichtet und einer damit verbundenen Aktivitätssteigerung durch Ethanol [366]. Eine Aktivitätserhöhung durch steigende Ethanolgehalte erklärten Reshmi und Sugunan (2013) ebenfalls als mögliches Resultat einer Transglycosylierungsaktivität [367]. Daher kann von einer möglichen Transglycosylierungsaktivität dieser *A. niger* β -Glucosidasen ausgegangen werden. Caldini et al. (1994) beobachteten eine ähnliche Steigerung an Aktivität durch Ethanol (ca. 150 % bei 15 Vol.-%) [36] und erklärten dies allerdings mit der stärker ausgeprägten Nukleophilie von Ethanol gegenüber Wasser [368]. Folglich kann die Steigerung ebenfalls ein Produkt der verbesserten Löslichkeit des Substrats und somit besserer Verfügbarkeit für die β -Glucosidase sein. Gallifuoco et al. (1998 und 1999) beobachteten keine nennenswerte Beeinflussung der Enzym-Aktivität durch Ethanol (3 – 12 Vol.-%) [21, 23].

Demnach ist von keiner negativen Beeinflussung der β -Glucosidase-Aktivität bei weintypischen Ethanol-Konzentrationen von 10 bis 15 Vol.-% auszugehen, sondern eher von einer besseren Verfügbarkeit der Substrate durch den im Wein enthaltenen Ethanol.

4.2.1.4 Fructose-Abhängigkeit der β -Glucosidase-Aktivität

Die meisten Enzympräparate haben ebenfalls mit zunehmenden Fructose-Konzentrationen (bis zu 100 g/l) an Aktivität gewonnen, noch höhere Fructose-Konzentrationen hingegen führten zu leichten Aktivitätsverlusten (25 % Aktivitätsverlust für Rapidase). Allerdings gewannen nicht alle Enzympräparate durch Erhöhung der Fructose-Konzentrationen an Aktivität. Im Falle von Natuzym, Panzym, Lafazym und Everzym war Fructose ein Inhibitor und Trenolin zeigte keinen signifikanten Effekt auf sich ändernde Fructose-Konzentrationen (s. Abb. 40).

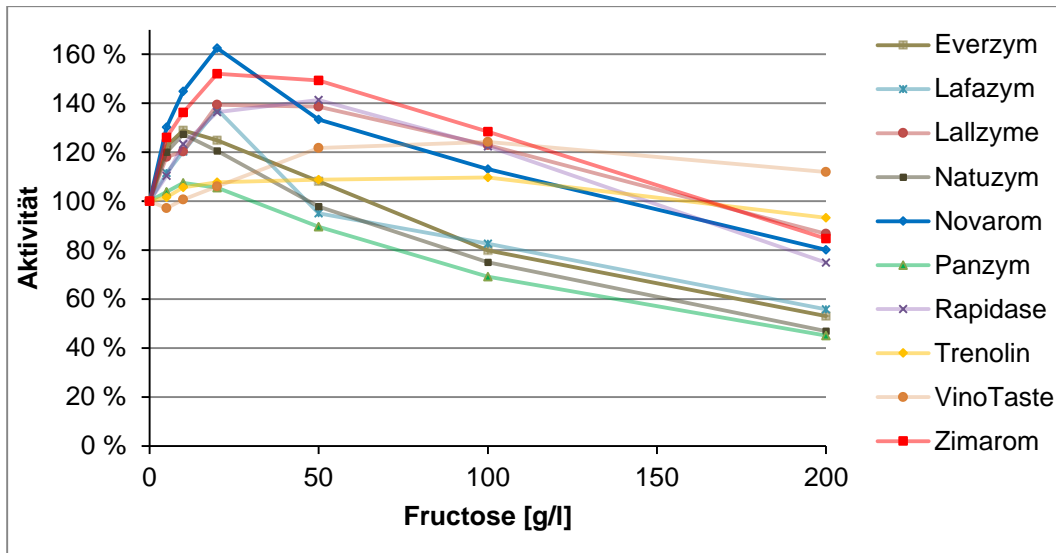


Abb. 40 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Fructose-Konzentration, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

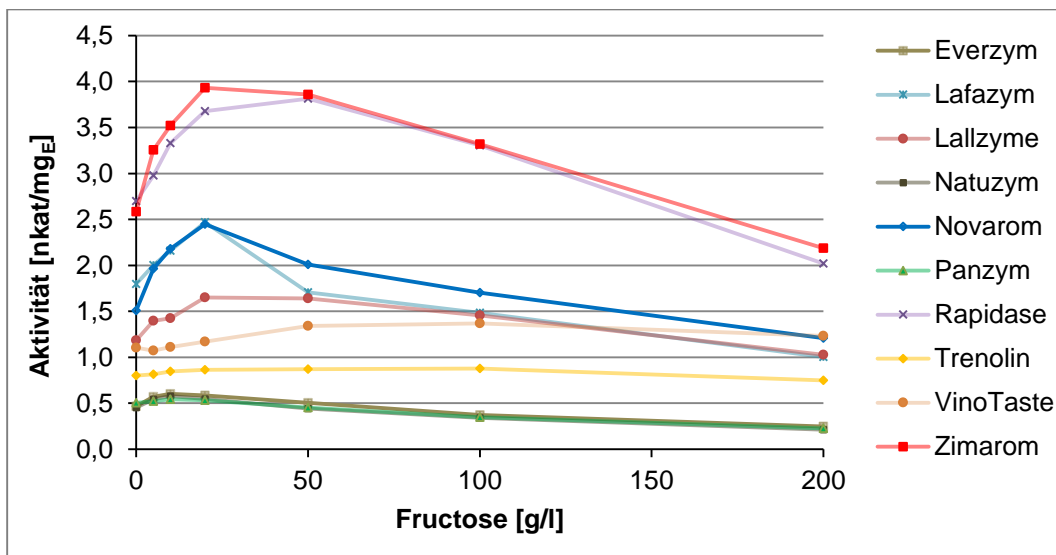


Abb. 41 Aktivität (nkat/mg_E) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Fructose-Konzentration

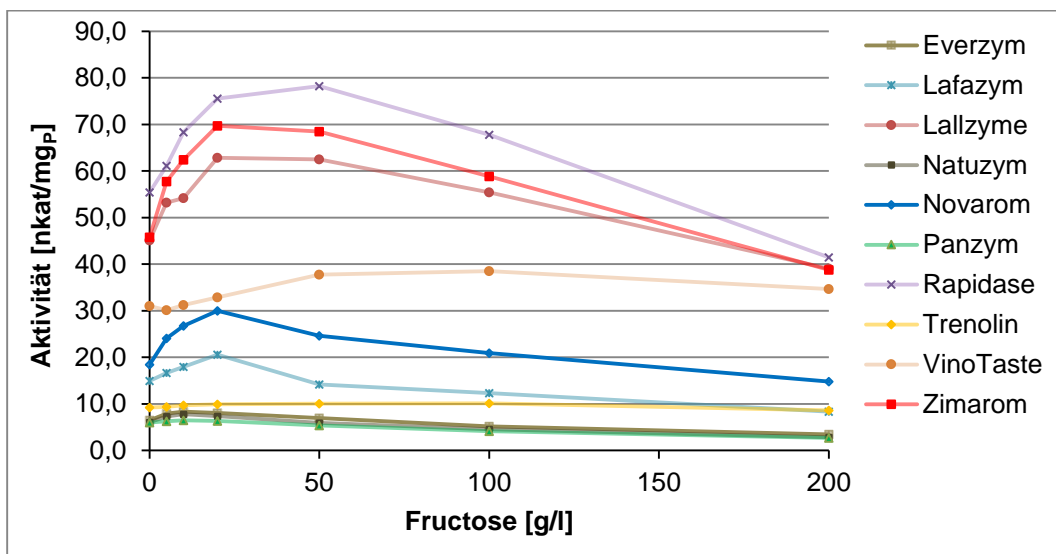


Abb. 42 Aktivität (nkat/mg_P) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Fructose-Konzentration

Die Enzympräparate Lafazym, Everzym, Natuzym und Panzym verloren bei einer Konzentration von 200 g/l Fructose fast 50 % an Aktivität. Allerdings enthalten lediglich Most oder Traubensaft höhere Fructose-Konzentrationen von bis zu 100 g/l, normale Fructose-Konzentration im Wein liegen im Bereich von etwa 5 g/l für trockenen Wein und bei 30 bis 45 g/l für lieblichen Wein. Daher kann Fructose als entscheidender Einflussfaktor auf die Enzymaktivität im Wein vernachlässigt werden.

Rapidase und Zimarom zeigten, bezogen auf die Enzymmenge, einen sehr ähnlichen Verlauf auf, Zimarom hatte mit 4,0 nkat/mg_E die höchste Aktivität bei 20 g/l Fructose und Rapidase bei 50 g/l Fructose mit ca. 3,8 nkat/mg_E (s. Abb. 41). Bezogen auf den Proteingehalt, zeigte Rapidase den höchsten Aktivitätsverlauf, gefolgt von Zimarom und Lallzyme. Die anderen 7 Enzympräparate besaßen signifikant geringere Aktivitäten im Bereich von 0 – 200 g/l Fructose (s. Abb. 42).

Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen den Erwartungen das Fructose keinen negativen Einfluss auf eine β -Glucosidase-Aktivität hat [162]. Gallifuoco et al. (1998 und 1999) und Riou et al. (1998) stellten ebenfalls keinen inhibierenden Einfluss von Fructose auf die β -Glucosidase-Aktivität fest [21, 23, 369]. Von einer Steigerung der Aktivität durch gewisse Fructose-Konzentrationen wurde bisher nicht berichtet. Besonders Lafazym (137,4 %), Lallzyme (139,4 %), Novarom (162,5 %), Rapidase (136,4 %) und Zimarom (152,2 %) gewannen bei einer Fructose-Konzentration von 20 g/l an Aktivität. Niedrige Fructose-Konzentrationen (<5 g/l), wie diese in trockenem Wein vorkommen, haben allerdings bei allen Enzympräparaten keinen signifikanten Effekt auf die β -Glucosidase-Aktivität. Demzufolge kann Fructose als Einflussfaktor beim späteren Einsatz im Wein vernachlässigt werden.

4.2.1.5 Glucose-Abhängigkeit der β -Glucosidase-Aktivität

Glucose jedoch ist für alle Enzymprodukte ein starker Inhibitor. Selbst kleine Konzentrationen von 5 g/l inhibierten einige der Enzympräparate teilweise über 50 % (s. Abb. 43).

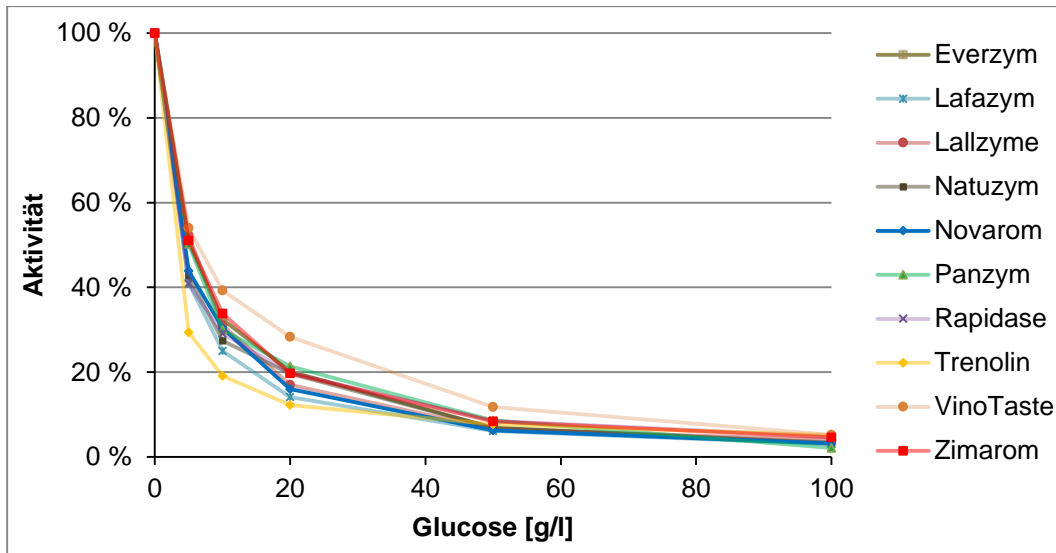


Abb. 43 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Glucose-Konzentration, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

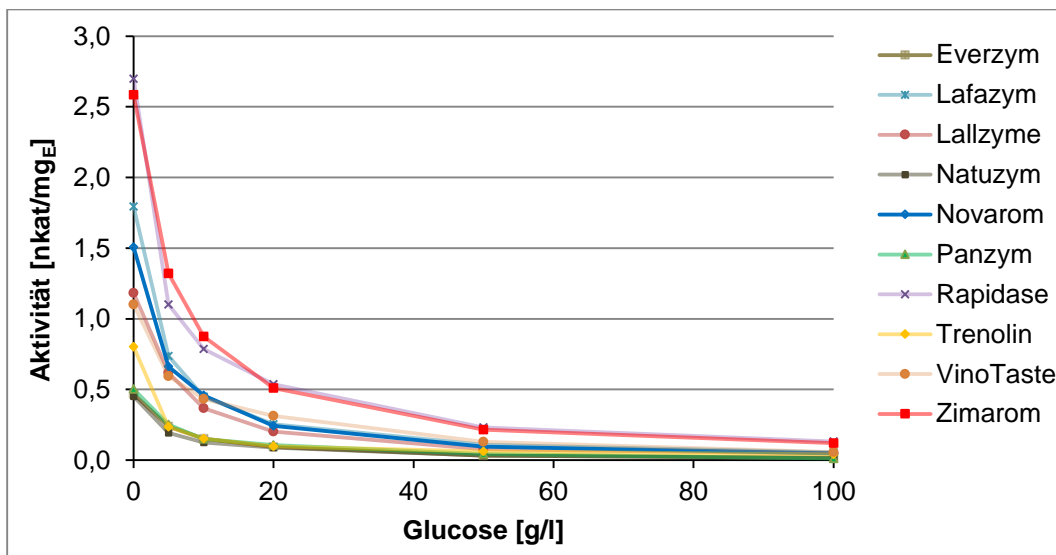


Abb. 44 Aktivität (nkat/mg_E) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Glucose-Konzentration

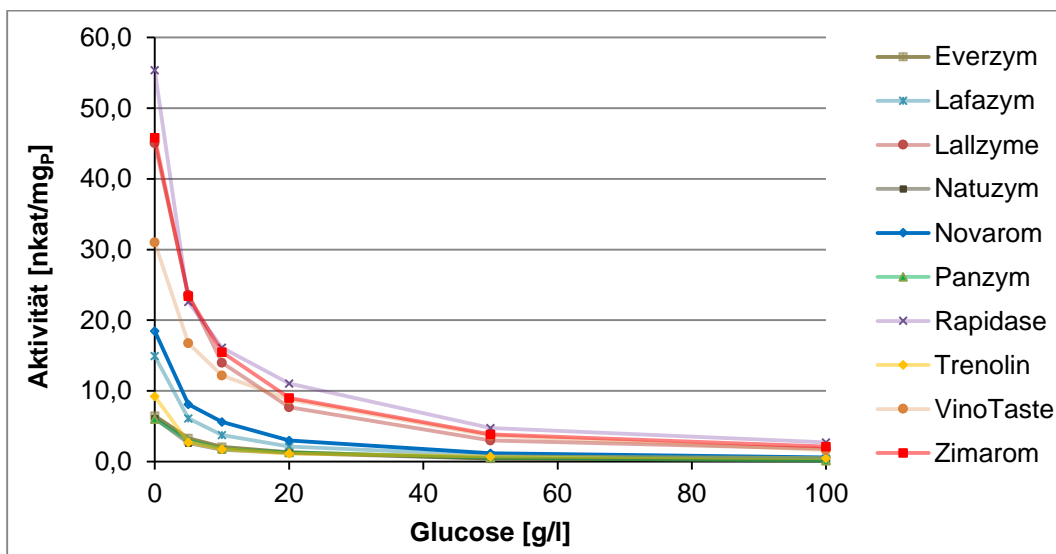


Abb. 45 Aktivität (nkat/mg_P) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Glucose-Konzentration

Bezogen auf die Enzymmenge zeigten wieder Rapidase und Zimarom den höchsten Aktivitätsverlauf im untersuchten Bereich (0 – 100 g/l Glucose) (s. Abb. 44). Bezogen auf den Proteingehalt ergaben sich bei Rapidase, Zimarom und Lallzyme die signifikant höchsten Aktivitäten (s. Abb. 45). Betrachtet man die relative Aktivität der Enzympräparate, wurde VinoTaste am geringsten durch höhere Glucose-Konzentrationen inhibiert.

Von einer deutlichen Inhibition der β -Glucosidase war auszugehen, da die meisten mikrobiellen Glucosidasen durch Glucose gehemmt werden [149, 197, 201, 202, 205–207]. Caldini et al. (1994) und Gallifuoco et al. (1998 und 1999) berichteten ebenfalls von einer deutlichen Inhibition der β -Glucosidase-Aktivität durch Glucose [21, 23, 36], so beobachtete Gallifuoco et al. (1999) eine Inhibition von ca. 60 % bei einer Glucose-Konzentration von 3,6 g/l [21].

Aufgrund der starken Inhibition durch Glucose, macht ein Einsatz der Enzympräparate während der Gärung keinen Sinn. Da die Enzympräparate bereits bei einer Glucose-Konzentration von 20 g/l teilweise über 80 % an Aktivität verlieren und im Most deutlich höhere Werte an Glucose auftreten. Somit sollten die Enzympräparate erst am Ende oder nach der Gärung im Jungwein eingesetzt werden, wenn die Glucose-Konzentration möglichst niedrig ist. Außerdem ist davon auszugehen, dass die Enzympräparate in einem trockenen Wein deutlich aktiver sind als in einem lieblichen Wein.

4.2.1.6 SO₂-Abhängigkeit der β -Glucosidase-Aktivität

Bei der Untersuchung der Aktivität in Abhängigkeit des Kaliumdisulfit-Gehalts bei pH 3,2 schwankten die Extinktionswerte stark und machten eine Messung schwierig. Unüblich hohe Blindwerte lassen auf eine Hydrolyse des synthetischen Glykosids pNPG durch Kaliumdisulfit bzw. Schwefeldioxid schließen. In Anwesenheit von Wasser reagiert Schwefeldioxid zur schwefeligen Säure bzw. ein Teil liegt als schweflige Säure und Hydrogensulfit vor und kann so zur Hydrolyse von pNPG führen. Beim Kaliumdisulfit wurde ein pH von 3,2 gewählt. Dies hat zwei Gründe, zum einen ist der pH-Wert von 3,2 weintypisch und zum anderen spaltet Kaliumdisulfit unter sauren Bedingungen Schwefeldioxid ab, ca. 50 % des Kaliumdisulfits zerfallen zu SO₂ [38]. Die Enzympräparate wurden durch Kaliumdisulfit bzw. Schwefeldioxid tendenziell kaum bis gar nicht gehemmt. Die Aktivitätswerte schwankten alle in einem Bereich von ca. 80 bis 120 %.

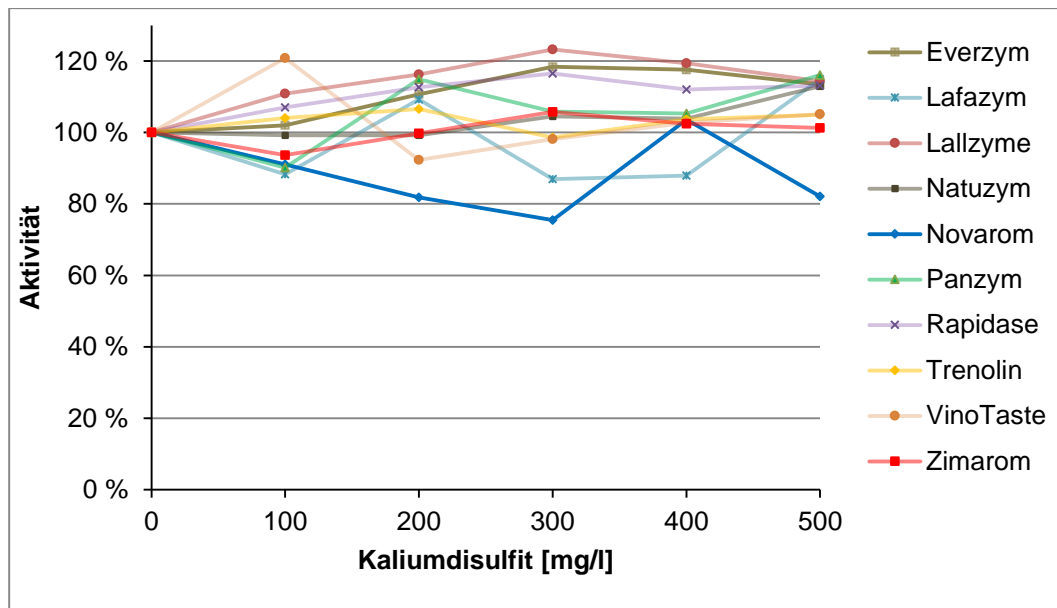


Abb. 46 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Kaliumdisulfit-Konzentration bei pH 3,2, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

Aufgrund der Schwankungen der Aktivitätswerte ist ebenfalls davon auszugehen, dass es durch die Anwesenheit von Kaliumdisulfit bzw. Schwefeldioxid zu einer chemischen Hydrolyse von pNPG zu pNP kam.

Die in Weißwein übliche bzw. maximale Konzentration an Schwefeldioxid von 200 mg/l (entspricht 400 mg/l Kaliumdisulfit) bei max. 5 g/l Restsüße führen bei keinem Enzympräparat zu einer Hemmung. Es kann davon ausgegangen werden, dass die üblichen und gesetzlich vorgeschriebenen Schwefeldioxid- bzw. Kaliumdisulfit-Konzentrationen keinen Einfluss auf die Aktivität der Enzympräparate haben.

4.2.2 Zwischen-Fazit

Temperatur- und pH-Wert-Absenkungen führten zu den erwarteten Aktivitätsverlusten. Glucose hatte deutlich inhibierende Effekte auf die β -Glucosidase-Aktivität, weswegen die Enzympräparate erst nach der Gärung eingesetzt werden sollten, die Parameter Ethanol, Fructose und Kaliumdisulfit hatten keine negativen Effekte auf eine β -Glucosidase-Aktivität. Zusammenfassend zeigten die drei Enzympräparate Rapidase, Lallzyme und Zimarom im Vergleich zu den anderen Enzympräparaten jeweils die signifikant höchsten Aktivitätswerte unter den weinrelevanten Bedingungen. Daher wurden die drei Enzyme anschließend noch auf weitere Glycosidase-Aktivitäten (Arabinosidase, Rhamnosidase und Xylosidase) untersucht.

4.2.3 Weitere Glycosidase-Aktivitäten

Die drei als am besten unter weintypischen Bedingungen geeigneten Enzympräparate Rapidase, Lallzyme und Zimarom wurden zusätzlich zur β -Glucosidase (β G)-Aktivität ebenfalls auf ihre Arabinosidase (Ara)-, Rhamnosidase (Rha)- und Xylosidase (Xyl)-Aktivität untersucht. Dabei wurde als Referenzpunkt pH 3,5 und 25 °C gewählt.

Bei den ermittelten Aktivitätswerten muss man ebenfalls wieder zwischen spezifischer, auf den Proteingehalt und der pro mg Enzympräparat bezogenen Aktivität unterscheiden. In Tab. 21 sind die Aktivitäten der verschiedenen Enzyme dargestellt.

Tab. 21 Glycosidase-Aktivitäten bei pH 3,5 und 25 °C

	Rapidase [nkat/mg _E]	Rapidase [nkat/mg _P]	Lallzyme [nkat/mg _E]	Lallzyme [nkat/mg _P]	Zimarom [nkat/mg _E]	Zimarom [nkat/mg _P]
βG	0,533 ± 0,012	10,9 ± 0,25	0,243 ± 0,006	9,2 ± 0,02	0,568 ± 0,007	10,1 ± 0,12
Ara	4,010 ± 0,15	82,3 ± 2,98	1,958 ± 0,07	74,6 ± 2,63	4,284 ± 0,102	76,0 ± 1,81
Rha	0,016 ± 0,0004	0,3 ± 0,007	0,009 ± 0,0002	0,3 ± 0,008	0,022 ± 0,0005	0,4 ± 0,009
Xyl	0,084 ± 0,0026	1,7 ± 0,05	0,048 ± 0,0008	1,8 ± 0,03	0,144 ± 0,005	2,5 ± 0,08

Betrachtet man die Aktivitäten pro mg Enzympräparat (mg_E), so wies sowohl Zimarom, als auch Rapidase bei allen Glycosidasen sehr ähnliche Aktivitäten auf. Lallzyme hingegen besaß bei allen Glycosidasen etwa um die Hälfte geringere Aktivitäten. Betrachtet man nun noch die Aktivität pro mg Protein des jeweiligen Enzympräparates (mg_P), so ergeben alle drei Enzympräparate wiederum sehr ähnliche Aktivitäten. Das heißt die Enzym-Zusammensetzung der Glycosidasen ist bei allen drei Enzympräparaten ähnlich. Allerdings besaß das Enzympräparat Lallzyme einen deutlich geringeren Proteingehalt als die anderen zwei Enzympräparate und enthielt somit wahrscheinlich mehr Füllstoffe, wie z.B. Maltodextrin, was bei den Immobilisierungsversuchen zu Problemen führen könnte.

4.2.4 Fazit

Die während der Gärung und Lagerung üblichen Temperaturen im Wein von 10 bis 20 °C führen zu deutlichen Aktivitätsverlusten von teilweise über 80 % im Vergleich zum Referenzpunkt. Auch ein weintypisch niedriger pH-Wert verursacht deutliche Verluste an β -Glucosidase-Aktivität der Enzympräparate. Besonders Glucose ist ein deutlicher Inhibitor für die β -Glucosidase, weswegen ein Einsatz der Enzympräparate

erst am Ende oder nach der Gärung im Jungwein Sinn macht. Bei der Inhibition durch Glucose handelt es sich wahrscheinlich um eine Produkthemmung, bei der durch die höhere Konzentration an Glucose im Medium ein Produktüberschuss besteht. Die meisten β -Glucosidasen sind empfindlich gegenüber Glucose [149, 205, 207]. Der Mechanismus der Inhibition der β -Glucosidase ist noch nicht gänzlich aufgeklärt und hängt stark von der Herkunft der entsprechenden β -Glucosidase ab [370]. Bei der Inhibition durch Glucose kann zum einen die Zugänglichkeit und zum anderen die Bindung selbst an das aktive Zentrum eine Rolle spielen. Yang et al. (2015) kamen zu dem Schluss, dass möglicherweise mehr die Glucose-Bindungspräferenz als die Zugänglichkeit an die jeweiligen Bindungsstellen die Glucose-Abhängigkeit einer β -Glucosidase bestimmt [370]. Dabei hatten glucosetolerante β -Glucosidase entsprechende Glucose-Bindungspräferenzen an anderen Stellen als an das aktive Zentrum. Yang et al. (2015) postulierten dementsprechend zwei mögliche Gründe für Glucose-Toleranz bzw. Inhibition von GH1 β -Glucosidasen [370]: (1) Abgesehen von der Bindung ans aktive Zentrum des Enzyms, kann Glucose, wie das Substrat, an anderen Stellen (von denen ein Teil für beide, Glucose und Substrat, geeignet sind) entlang des Substratkanals mit unterschiedlichen Affinitäten binden. (2) Die Reaktion der GH1 β -Glucosidasen auf Glucose hängt mit der relativen Affinität bzw. Präferenz der Glucose-Bindung an verschiedenen Stellen zu binden ab. Bei einer Hemmung bindet die Glucose bevorzugt am aktiven Zentrum und bei einer Toleranz bindet die Glucose bevorzugt an anderen Stellen im Substratkanal. In Abb. 47 ist der postulierte Mechanismus schematisch dargestellt.

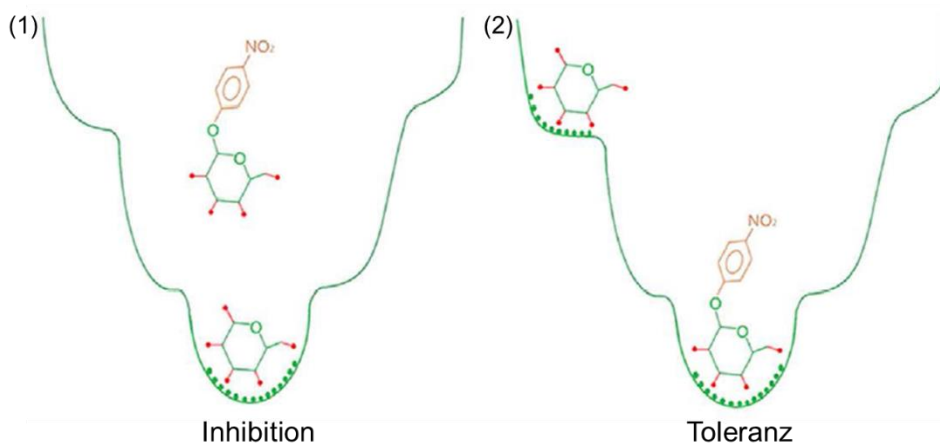


Abb. 47 Schematische Darstellung des nach Yang et al. (2015) vorgeschlagenen Mechanismus für Glucose-Effekte auf GH1 β -Glucosidasen. Das Außenprofil kennzeichnet die Substratkanalwand. Die Punkte auf der Kanalwand zeigen die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Liganden. Die roten Sticks mit Punkten am Ende kennzeichnen die Bindungen zwischen Kohlenstoff und Hydroxyl-Gruppen. [370]

Bindet die Glucose bevorzugt ans aktive Zentrum der β -Glucosidase kommt es zur kompetitiven Hemmung. Nicht nur die Zugänglichkeit sondern auch die Bindungsenergie, die beide mit der Struktur in Zusammenhang stehen, bestimmt die Menge an gebundener Glucose. Folglich ist die relative Affinität bzw. Präferenz anstatt der Zugänglichkeit an die Glucose-Bindungsstellen von entscheidender Bedeutung für die Glukose-Abhängigkeit von GH1 β -Glucosidasen [370]. Dabei gibt es mehrere Faktoren die diesen Mechanismus beeinflussen, die Anzahl und Lage der Bindungsstellen und die relative Affinität bzw. Präferenz der Bindestellen variieren von Protein zu Protein. Sowohl Anzahl/Lage und relative Affinität/Präferenz der Bindungsstellen hängen von strukturellen Merkmale ab und bestimmen die Variation der Glucose-Abhängigkeit der Glucosidasen [370]. Da GH3 Glucosidasen nach dem gleichen Mechanismus hydrolysieren (Retaining, s. Kapitel 2.3.1.4), ist der Mechanismus zur Glucose-Inhibition wahrscheinlich ähnlich.

Ethanol, Fructose und Schwefeldioxid hingegen können als Einflussfaktoren auf die Aktivität der β -Glucosidase im Wein vernachlässigt werden. Die drei Enzympräparate Rapidase, Lallzyme und Zimarom wiesen im Vergleich zu den anderen untersuchten Enzympräparaten jeweils die signifikant höchsten Aktivitätswerte unter den weinrelevanten Bedingungen auf, besonders bei Betrachtung der spezifischen Aktivität. Demnach ist davon auszugehen, dass diese Enzympräparate in Abhängigkeit der Protein-Konzentration die höchsten Anteile an dem Enzym β -Glucosidase besitzen. Daher wurden die drei Enzyme anschließend noch auf weitere Glycosidase-Aktivitäten (Arabinosidase, Rhamnosidase und Xylosidase) untersucht. Dabei unterschieden sich die spezifischen Aktivitätswerte der Glycosidasen kaum voneinander, wohingegen die Aktivitätswerte pro mg Enzympräparat von Lallzyme im Vergleich zu Rapidase und Zimarom deutlich niedriger waren. Dies lässt darauf schließen, dass der Gesamt-Anteil an Glycosidasen im Enzympräparat niedriger war. Daher wurde das Enzympräparat Rapidase Revelation Aroma (Fa. Oenobrand, Montpellier, Frankreich) für eine Immobilisierung an Magnetit-Partikeln ausgewählt.

4.3 Immobilisierung der Glycosidasen an Magnetit-Partikel

4.3.1 Immobilisierung bei verschiedenen pH-Werten

Die Immobilisierung der Glycosidasen an Magnetit-Partikel wurde mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) durchgeführt (s. Kapitel 3.5).

Zusätzlich zur β -Glucosidase-Aktivität wurden ebenfalls die Aktivitäten der drei Enzyme Arabinosidase, Rhamnosidase und Xylosidase bestimmt. Außerdem wurde die Immobilisierung bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, um die möglichst optimalen Bedingungen zu ermitteln, unter denen ein möglichst hoher Teil an Glycosidasen erfolgreich und aktiv an die Magnetit-Partikel gekoppelt werden konnten. Wichtig bei der Immobilisierung ist die Betrachtung des isoelektrischen Punktes (pI) der Enzyme. Am isoelektrischen Punkt liegen im Protein gleich viele negative wie positive Ladungen vor, die Summenladung des Moleküls ist also neutral. Bei einem pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes nimmt die Dissoziation der anionischen Gruppen (z.B. Säure-Gruppen) ab und das Molekül trägt eine positive Summenladung. Liegt der pH-Wert darüber, nimmt die Dissoziation der anionischen Gruppen zu und das Molekül bekommt eine negative Summenladung [371]. Wichtig ist zu beachten, dass am isoelektrischen Punkt die Wasserlöslichkeit eines Proteins am niedrigsten ist. Aufgrund der entstandenen intramolekularen Ladungen ist die Bildung einer stabilen Hydrathülle nicht mehr möglich.

4.3.1.1 β -Glucosidase

Betrachtet man die Immobilisierungsausbeute (= Differenz zwischen eingesetzter und erhaltener Aktivität im Überstand als Prozentsatz der Gesamtaktivität) der β -Glucosidase an die Magnetit-Partikel, so lag diese im pH-Bereich von pH 3 bis 4,2 bei über 80 %. D.h. ein Großteil der zur Verfügung gestellten β -Glucosidase wurde kovalent an die Magnetit-Partikel gebunden.

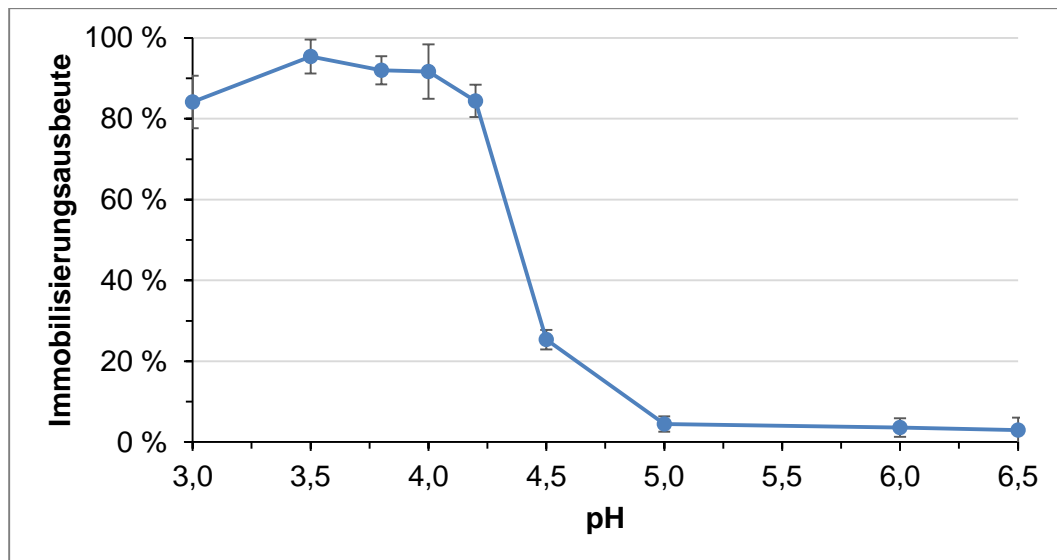


Abb. 48 Immobilisierungsausbeute (%) der β -Glucosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5

Die β -Glucosidase wies die höchste Ausbeute zwischen pH 3,5 und 4,0 mit 95,4 % respektive 91,7 % auf (s. Abb. 48). Stieg der pH über 4,2, so nahm die Bindung an die Partikel signifikant ab. Bei einem pH von 4,5 lag die Immobilisierungsausbeute nur noch bei 25 % und ab einem pH von 5,0 war diese bei nahezu 0. Die β -Glucosidase besitzt wahrscheinlich einen isoelektrischen Punkt (pI) von ca. 4 (s. Kapitel 2.3.2). Zur Kopplung trägt der nicht-dissoziierte Teil des Enzyms bei und somit kann dies eine mögliche Erklärung für die höhere Immobilisierungsausbeute der β -Glucosidase in der Nähe des pI, bzw. wenn der pH-Wert leicht darüber liegt, sein. Dort sollten die Amino-Gruppen unprotoniert vorliegen.

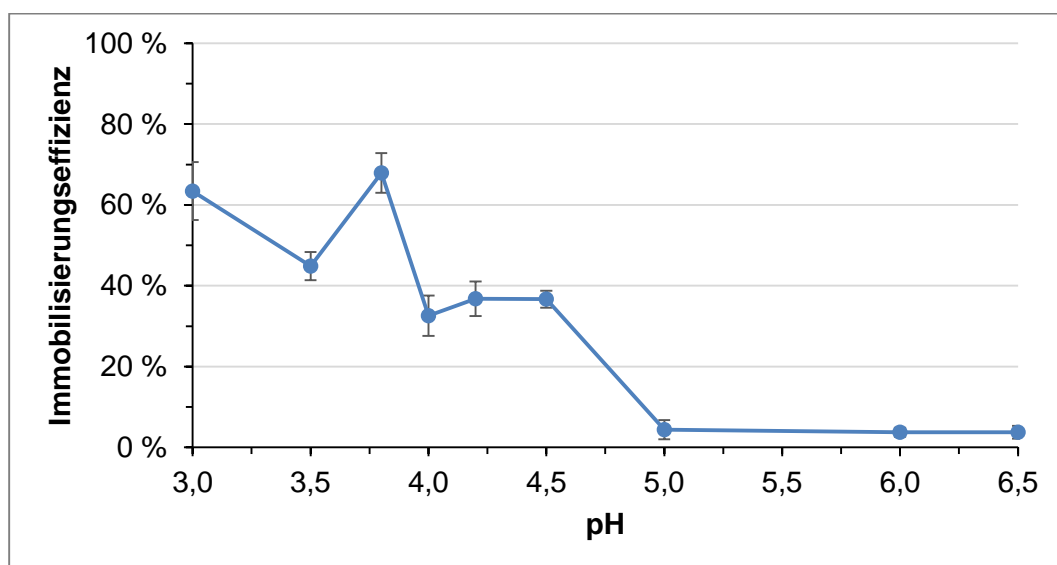


Abb. 49 Immobilisierungseffizienz der β -Glucosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5

Betrachtet man nun die Immobilisierungseffizienz der β -Glucosidase (s. Abb. 49), also den Anteil der gebundenen Enzyme, die nach der Kopplung noch aktiv am Magnetit-Partikel fixiert waren, so zeigte die β -Glucosidase im pH-Bereich von 3,0 bis 4,5 Werte von ca. 30 % bis 70 % und bei pH 3,5 die höchste Immobilisierungseffizienz mit 67,9 %. Ab einem pH von 5,0 lag diese aus genannten Gründen bei nahezu 0.

4.3.1.2 Arabinosidase

Insgesamt zeigte die Arabinosidase deutlich schlechtere Ausbeuten bei den Immobilisierungsversuchen. Die Immobilisierungsausbeute stieg nie über 30 % und war mit 27 % bei pH 4,5 am höchsten. Im Vergleich zur β -Glucosidase koppelte sie bei pH 5,0 immer noch zu 13 % und erst ab pH 6,0 war die Bindung an die Partikel nahezu 0. Der pI der Arabinosidase lag wahrscheinlich etwas höher (4,5) (s. Kapitel 2.3.2), was die höhere Konjugationsrate bei pH 4,5 erklärt. Die Bindung der Arabinosidase an die Magnetit-Partikel war unabhängig vom pH-Wert signifikant niedriger. Die höchste Immobilisierungsausbeute wurde mit 27,3 % bei einem pH-Wert von 4,5 erhalten.

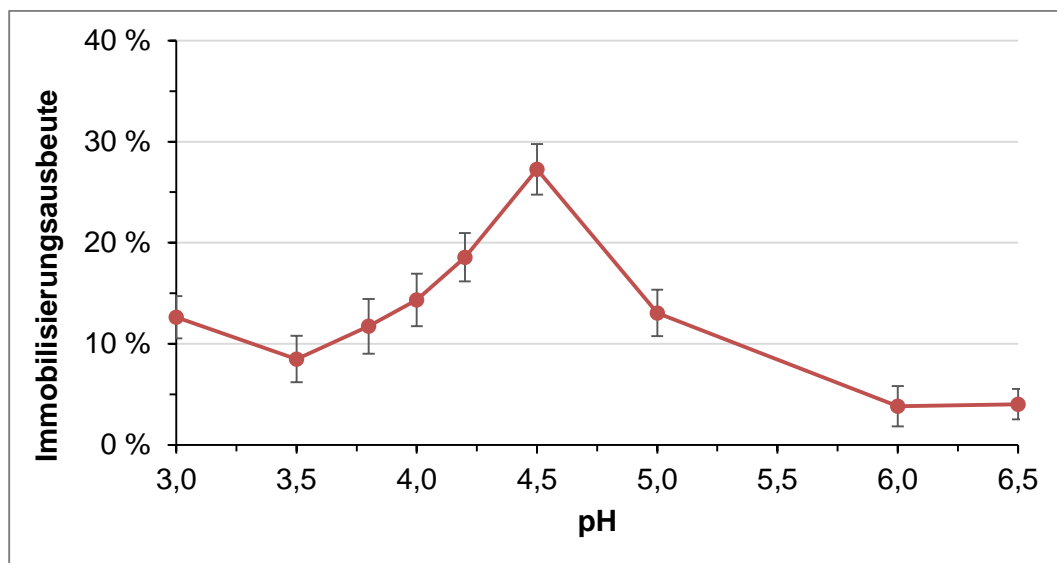


Abb. 50 Immobilisierungsausbeute der Arabinosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5

Auch bei der Immobilisierungseffizienz sind die Werte der Arabinosidase deutlich schlechter im Vergleich zur β -Glucosidase. Die höchste Effizienz zeigte die Arabinosidase mit 9 % bei pH 3,5. Ab pH 4,5 finden sich nahezu keine aktiven Enzyme mehr auf den Partikeln und das obwohl die Konjugation bei pH 4,5 am höchsten war. Scheinbar kommt es zu Konformationsänderung des Enzyms und damit zu einer Inaktivierung. Aufgrund geänderter Ladungen der Aminosäure-Reste im aktiven Zentrum in Folge eines geänderten pH-Wertes könnte es zu Kopplungsreaktion am aktiven Zentrum kommen und damit zum Verlust an katalytischer Aktivität.

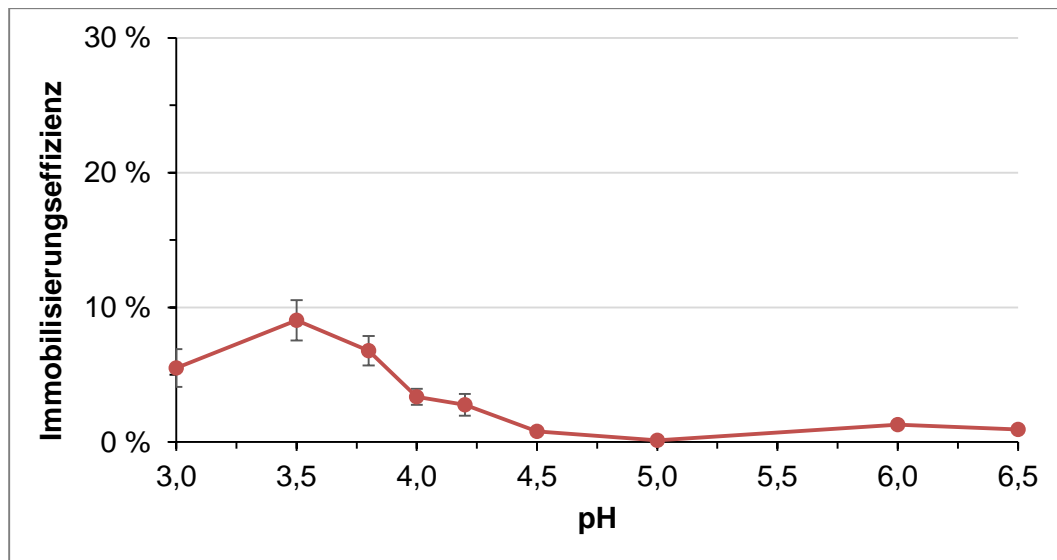


Abb. 51 Immobilisierungseffizienz der Arabinosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5

4.3.1.3 Rhamnosidase

Bei der Rhamnosidase konnte bei pH-Werten von 3,0 bis 3,8 eine Immobilisierungsausbeute von ca. die 15 % und ab pH 4,0 von ca. 50 bis 60 % erhalten werden. Die beste Konjugation ergab sich mit 56,6 % bei pH 4,2. Dies kann mit dem deutlich höherem pI der Rhamnosidase erklärt werden, der im Bereich von 6 liegt (s. Kapitel 2.3.2).

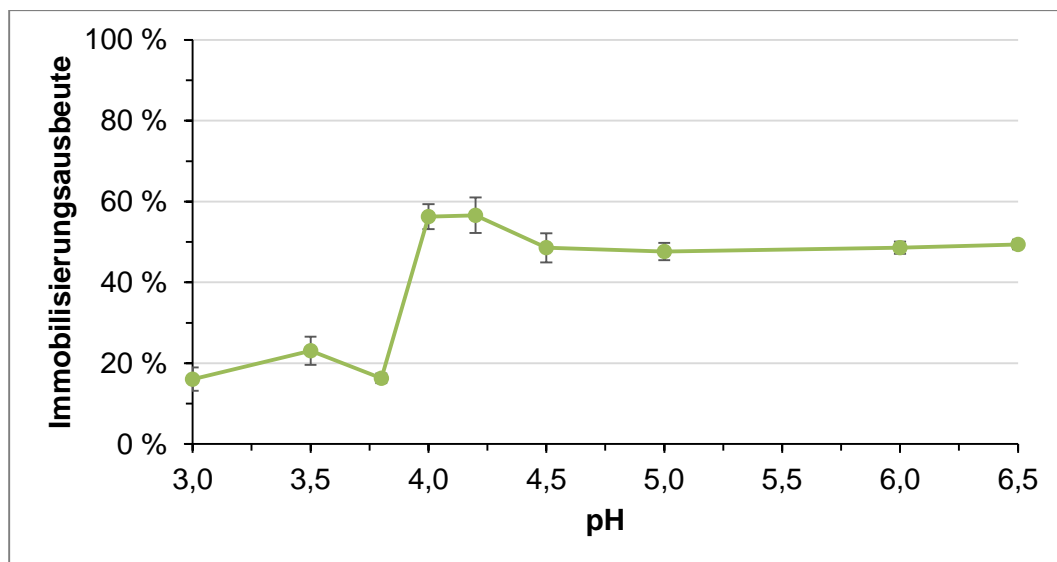


Abb. 52 Immobilisierungsausbeute der Rhamnosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5

Die Immobilisierungseffizienz der Rhamnosidase verlief allerdings konträr zur Ausbeute, d.h. im pH-Bereich von 3,0 bis 4,2 war diese am höchsten und ab pH 4,5 nahezu 0. Für die Rhamnosidase ergab sich die höchste Immobilisierungseffizienz bei pH 3,8 mit 72,7 %.

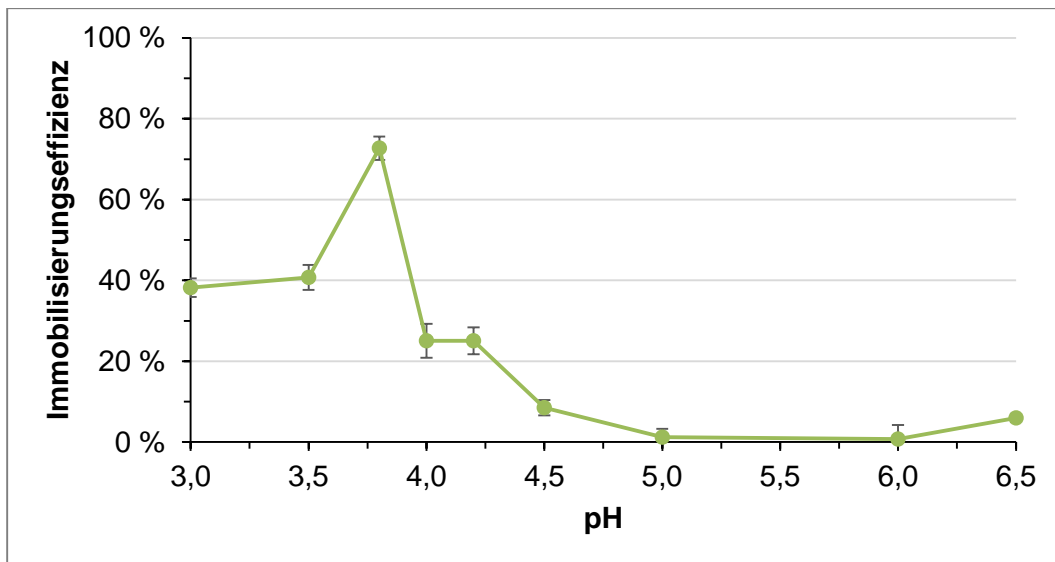


Abb. 53 Immobilisierungseffizienz der Rhamnosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5

4.3.1.4 Xylosidase

Die Immobilisierungsausbeute der Xylosidase lag bei den pH-Werten von 3,5 bis 4,2 im Bereich von 60 % und zeigte mit 66 % die beste Bindung an die Partikel zwischen pH 4,0 und pH 4,2. Bei pH 3,0 sank diese unter 20 % und ab einem pH von 5,0 war nahezu keine Aktivität mehr nachweisbar. Der pI der Xylosidase liegt in einem ähnlichen Bereich wie der pI der β -Glucosidase (s. Kapitel 2.3.2), daher nimmt die Immobilisierungsausbeute bei pH-Werten über 4,5 aus genannten Gründen ab.

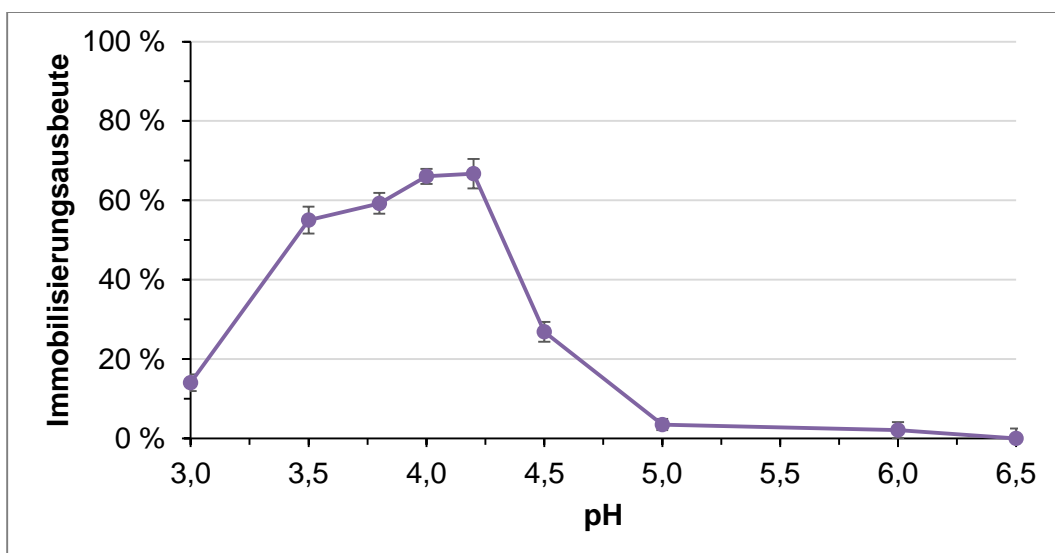


Abb. 54 Immobilisierungsausbeute der Xylosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5

Die Xylosidase zeigte bei pH-Werten von 3,0 bis 4,5 eine Immobilisierungseffizienz von 60 % bis fast 100 %. Der höchste Wirkungsgrad der Immobilisierung konnte bei pH 3,0 mit 93,5 % erzielt werden, allerdings lag die Konjugation dort nur bei 14,0 %.

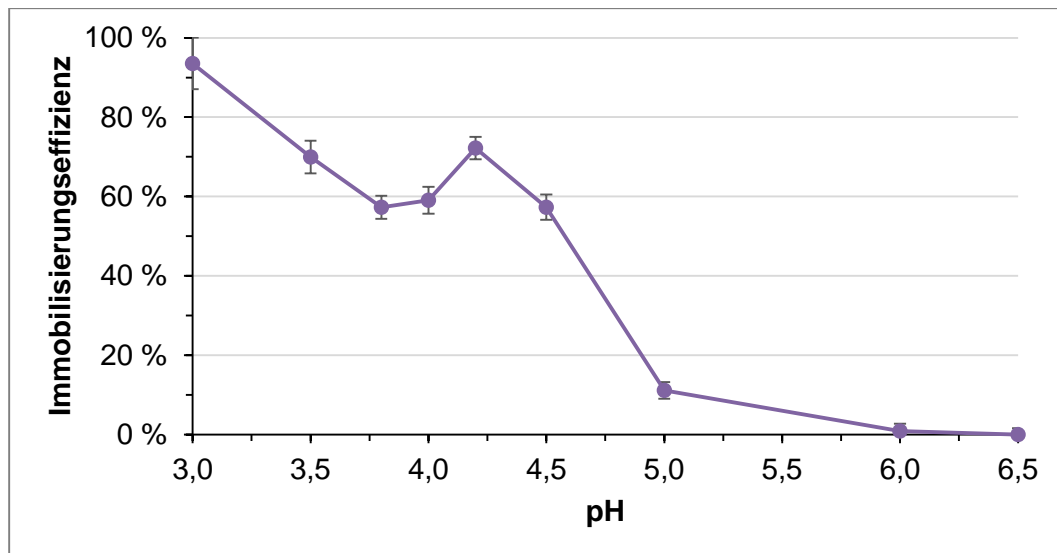


Abb. 55 Immobilisierungseffizienz der Xylosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5

4.3.2 Fazit

Generell kann man festhalten, dass die Immobilisierung mehrerer Enzyme auf einen Träger nur ein Kompromiss darstellen kann, da i.d.R. jedes Enzym bei unterschiedlichen Bedingungen unterschiedlich gut oder schlecht in Abhängigkeit von den unterschiedlichen pI-Werten der jeweiligen Enzyme an den Träger bindet.

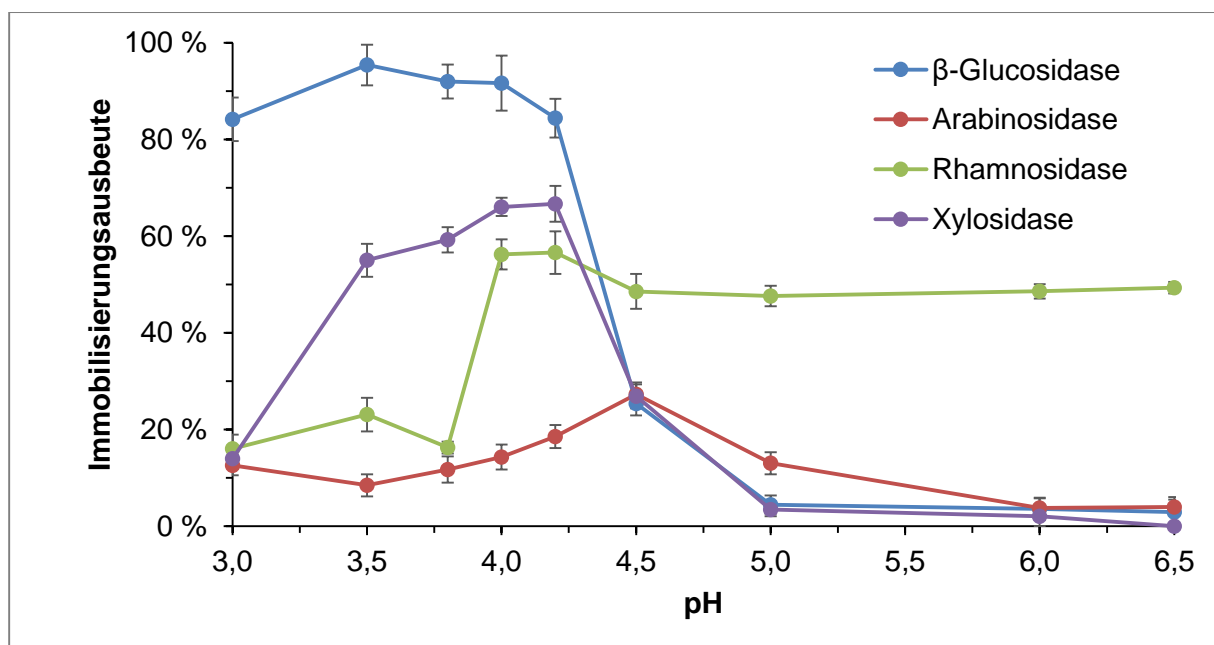


Abb. 56 Immobilisierungsausbeute der Glycosidasen im pH-Bereich 3,0 bis 6,5

Betrachtet man alle 4 Enzyme, so lagen die höchsten Ausbeuten im pH-Bereich von 3,8 bis 4,2 (siehe Abb. 56).

Bei der Immobilisierungseffizienz zeigte sich ein ähnliches Bild (s. Abb. 57), auch hier hatten die 4 Enzyme die höchsten Werte im Bereich von pH 3,5 bis 4,2 und ab pH 5,0 war diese für alle vier Glycosidasen bei nahezu 0 %. Um nun möglichst viel und aktives Enzym an die Partikel zu immobilisieren, wurde daher pH 3,8 als Kopplungs-pH gewählt.

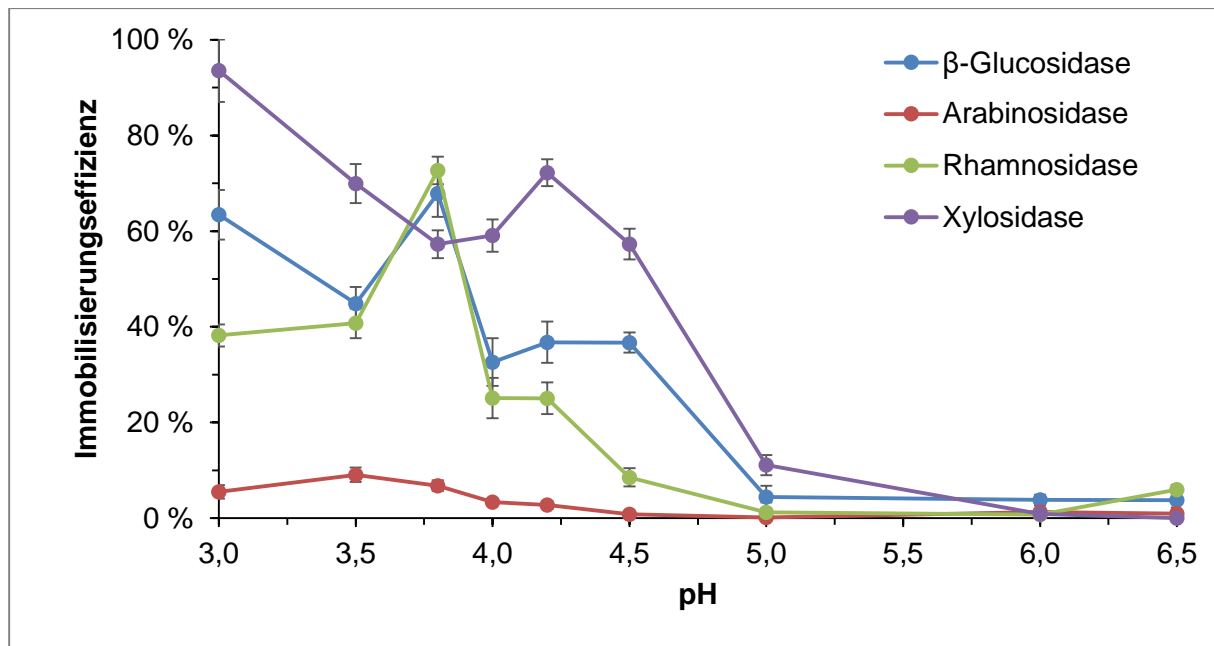


Abb. 57 Immobilisierungseffizienz der Glycosidasen im pH-Bereich 3,0 bis 6,5

Betrachtet man die absoluten Aktivitätswerte der Glycosidasen (s. Tab. 22), zeigten sich deutlich geänderte Verhältnisse im Vergleich zum Ausgangsprodukt. Die Rhamnosidase und besonders die Arabinosidase sind in deutlich geringerer Anzahl an den Magnetit-Partikeln vorhanden. Dadurch weist das immobilisierte Enzymgemisch später im Wein, im Vergleich zum freien Enzympräparat, geringere Arabinosidase- und Rhamnosidase-Aktivitäten auf. Insgesamt besaß die β -Glucosidase eine hohe Affinität zur Kopplung an die Magnetit-Partikel, gefolgt von der Xylosidase. Die ähnlich große Affinität der β -Glucosidase und Xylosidase an die Magnetit-Partikel zu koppeln, kann vermutlich mit den ähnlich Eigenschaften der beiden Enzyme erklärt werden (s. Kapitel 2.3.2). Beide Enzyme haben wahrscheinlich einen pI im Bereich von 4,0 bis 4,5 und besitzen ein Molekulargewicht von ca. 120 kDa.

Tab. 22 Aktivitäten der freien und immobilisierten Glycosidasen bei pH 5,0 und 37 °C, Kopplungs-pH 3,8

	Freie Glycosidasen		Immobilisierte Glycosidase	
	[nkat/mg _E]	[nkat/mg _P]	[nkat/mg _E]	[nkat/mg _P]
β-Glucosidase	2,438 ± 0,163	50,0 ± 3,3	1,636 ± 0,022	52,1 ± 0,7
Arabinosidase	5,696 ± 0,429	116,9 ± 8,8	0,061 ± 0,002	1,93 ± 0,06
Rhamnosidase	0,059 ± 0,002	1,22 ± 0,04	0,012 ± 0,001	0,49 ± 0,02
Xylosidase	0,268 ± 0,008	5,49 ± 0,16	0,113 ± 0,009	3,61 ± 0,15

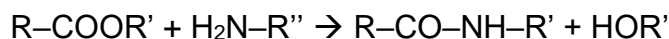
Bei der Aromafreisetzung (s. Kapitel 2.1.6) handelt es sich um einen sequentiellen Mechanismus und die drei Glycosidasen Arabinosidase, Rhamnosidase und Xylosidase sind, neben der β-Glucosidase, ebenfalls von großer Bedeutung für die Freisetzung der Aromastoff. Daher ist davon auszugehen, dass, aufgrund der veränderten Verhältnisse der Glycosidasen am Immobilisat, das Freisetzungspotential des Immobilisats im Vergleich zum freien Enzympräparat schlechter sein wird.

González-Pombo et al. (2014) konnten verschiedene Glycosidasen (β-Glucosidase, Arabinofuranosidase und Rhamnosidase) erfolgreich in einem pH-Bereich von 5,0 bis 9,0 an Eupergit-Partikel über Epoxid-Gruppen immobilisieren [20]. Die höchsten Immobilisierungseffizienzen von ca. 90 % erreichten sie, unabhängig vom Enzym, im pH-Bereich von 6,0 bis 7,0. Die Autoren stellten, im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen, kaum einen Effekt durch einen veränderten pH-Wert auf die Immobilisierungsausbeute bzw. -effizienz der verschiedenen Glycosidasen fest. Spagna et al. (2000) konnten eine β-Glucosidase erfolgreich auf einem Amin-Agarose-Gel über Adsorption (bei pH 5,0) und anschließender Bildung kovalenter Bindungen mittels EDC immobilisieren [239]. Dabei wurden eine Immobilisierungsausbeute von 100 % und eine Immobilisierungseffizienz von 46 % erreicht. Gueguen et al. (1996) beobachteten die höchste Immobilisierungsrate für die Kopplung einer β-Glucosidase auf einen Ionenaustauscher bei pH 4,0 [238]. Martino et al. (1996) erhielten bei einer Immobilisierung einer β-Glucosidase auf Chitosan mit anschließender kovalenter Bindung eine deutlich geringere Immobilisierungsausbeute und -effizienz von ca. 5 bis 20 %, wobei auch hier pH 4,0 die höchsten Werte lieferte [22]. Spagna et al. (1998) koppelten eine β-Glucosidase und Arabinosidase erfolgreich an ein Chitosan-Derivat mit anschließender Quervernetzung mittels Glutaraldehyd und erreichten dabei die höchsten Adsorptionsausbeuten und -effizienzen bei einem pH von 4,5 bis 6,0 [24]. Die β-Glucosidase wies eine Ausbeute von ca. 40 % und Effizienz von ca. 50 % bei pH 4,5 und die Arabinosidase von ca. 50 % und ca. 90 % bei pH 6,0 auf. Spagna et al.

(2001) immobilisierten eine Rhamnosidase auf Chitosan mit anschließender Quervernetzung mit Glutaraldehyd [26]. Die höchste Adsorption (100 %) und Immobilisierungseffizienz (ca. 85 %) wurden bei pH 6,0 erreicht.

Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Methoden und Träger zur Kopplung der Enzyme, sind die Literaturwerte nur schwer mit den hier erhaltenen Werten zu vergleichen. Zum Beispiel stellt die Immobilisierung an Chitosan eine Adsorption der Enzyme dar, der pH-Wert beeinflusst die Ladung des Chitosans und entscheidet somit über die Adsorptionsrate. Die anschließende kovalente Bindung oder Quervernetzung diente lediglich zur Stabilisierung des Immobilisats. Außerdem wurden oftmals reine oder aufgereinigte Enzyme verwendet.

Die Kopplung der Enzyme an die mit EDC aktivierten Magnetit-Partikel sollte in einem pH-Bereich von 4,0 – 6,5 liegen, um optimale Bindungskapazitäten zu erreichen [297, 298]. Bei der Reaktion des reaktiven O-Acylisoharnstoff-Derivates (aktiviertes Magnetit-Partikel) reagiert eine freie Amino-Gruppe des zu koppelnden Enzyms mit dem O-Acylisoharnstoff-Derivat:



Dabei entsteht eine Amid-Bindung zwischen dem aktivierten Magnetit-Partikel und der Amino-Gruppe des entsprechenden Enzyms. Für diese Reaktion sollte die Amino-Gruppe in ihrer unprotonierten Form vorliegen, da ansonsten die Bildung der Amid-Bindung behindert wird. Somit kann dies eine mögliche Erklärung für die höchsten Immobilisierungsausbeuten der Glycosidasen in der Nähe ihrer isoelektrischen Punkte, bzw. wenn der pH-Wert leicht darüber liegt, sein, da dort die Amino-Gruppen unprotoniert vorliegen. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen diese Theorie, da die Glycosidasen, abgesehen von der Rhamnosidase (pI 5,0 – 6,0), ihren isoelektrischen Punkt wahrscheinlich im Bereich von 3,5 bis 4,5 besitzen (s. Kapitel 2.3.2) und die höchsten Ausbeuten in diesem pH-Bereich beobachtet wurden. Die Immobilisierungseffizienz wiederum hängt davon ab, welche Amino-Gruppe mit dem O-Acylisoharnstoff-Derivat reagiert und ob es dadurch zu Konformationsänderungen des Enzyms kommt, wodurch dann die katalytische Aktivität negativ beeinflusst werden kann. Außerdem könnte es aufgrund geänderter Ladungen der Aminosäure-Reste im aktiven Zentrum in Folge eines geänderten pH-Wertes zu Kopplungsreaktion am aktiven Zentrum kommen und damit zum Verlust an katalytischer Aktivität.

Die Bildung des O-Acylisoharnstoff-Derivat geschieht im sauren Bereich am schnellsten, allerdings hydrolysieren Carbodiimide bei niedrigen pH-Werten von ca. 2,5 bis 4,0 [372]. Somit stellt ein leicht saurer pH von 5,0 bei der Aktivierung der Partikel einen guten Kompromiss zwischen Schnelligkeit der Reaktion und Stabilität des Carbodiimids dar, welcher ebenfalls von den Standard-Hersteller-Protokollen vorgeschlagen und in dieser Arbeit im ersten Schritt der Immobilisierung verwendet wurde [297, 298].

Damit haben die Aktivierung der Partikel und die Kopplung der Enzyme verschiedene Ansprüche an den pH-Wert während der Reaktion. Die Aktivierung des carboxylierten Magnetit-Partikel zum O-Acylisoharnstoff-Derivat geschieht am besten in einem leicht sauren Bereich. Wohingegen die Amino-Gruppen der zu koppelnden Enzyme im nicht-ionisierten Zustand vorliegen müssen [372]. Daher ist neben der inaktivierenden Wirkung von EDC auf die Enzyme, der unterschiedliche pH-Anspruch der Aktivierung und der nachfolgenden Kopplung, die zwei-Schritt Methode, Aktivierung der Magnetit-Partikel und Kopplung der Enzyme, sinnvoll und notwendig.

Die Ergebnisse zeigen, dass das kommerzielle Enzympräparat Rapidase erfolgreich an die magnetischen Partikel ohne weitere Aufreinigung immobilisiert werden konnte. Die β -Glucosidase hatte eine Immobilisierungsausbeute von 92,0 % und eine Immobilisierungseffizienz von 67,9 %, die Arabinosidase von 11,7 % bzw. 6,8 %, die Rhamnosidase von 16,3 % und 72,7 % und die Xylosidase von 59,2 % und 57,3 %. Die Versuche mit Wein werden zeigen, ob die immobilisierten Glycosidasen zur Aromafreisetzung ausreichend sind (s. Kapitel 4.12).

Vorteil der angewandten Methode war, dass keine Aufreinigung des kommerziellen Enzympräparates notwendig war. Das handelsübliche Enzymprodukt wurde lediglich in Wasser gelöst. Das verwendete Immobilisierungsverfahren ist einfach, aber dennoch effektiv.

4.4 Vergleich zwischen freiem und immobilisiertem Enzym

Die an magnetische Partikel immobilisierten Glycosidasen wurden mit den freien Glycosidasen aus dem Enzympräparat Rapidase verglichen, um eventuelle Konformationsänderung durch die Immobilisierungen entdecken zu können. Die Enzyme wurden in Abhängigkeit von pH, Temperatur, Glucose, Fructose und Ethanol untersucht. Abgesehen von den variierenden Parametern, wurden pH 5,0 und 37 °C als konstante Reaktionsbedingungen gewählt, woraus sich dann auch der entsprechende Referenzpunkt pH 5,0 und 37 °C ergab. Bei den vergleichenden Werten aus der Literatur ist zu beachten, dass andere Immobilisierungsmethoden und Träger verwendet wurden. Für das Immobilisat wurde ein Proteingehalt von 3,1 % ($\pm 0,19$) bestimmt (nach Methode 3.2.1).

Eine Verschiebung der **pH-Optima** nach einer Immobilisierung wurde teilweise für einige Enzyme berichtet und den unterschiedlichen Ionisierung der geladenen Protein-Gruppen durch die Träger-Eigenschaften zugeschrieben [22, 237]. Dennoch, das pH-Optimum für die immobilisierte β -Glucosidase in Bezug auf die entsprechenden Werte für das freie Enzym war unverändert (s. Abb. 58). Außerdem waren die jeweiligen pH-Stabilitätsprofile im untersuchten pH-Bereich (pH 2,8 bis 8,0) analog. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen anderen Autoren, die z.B. Eupergit C als Träger für die Immobilisierung verwendet haben [20, 248].

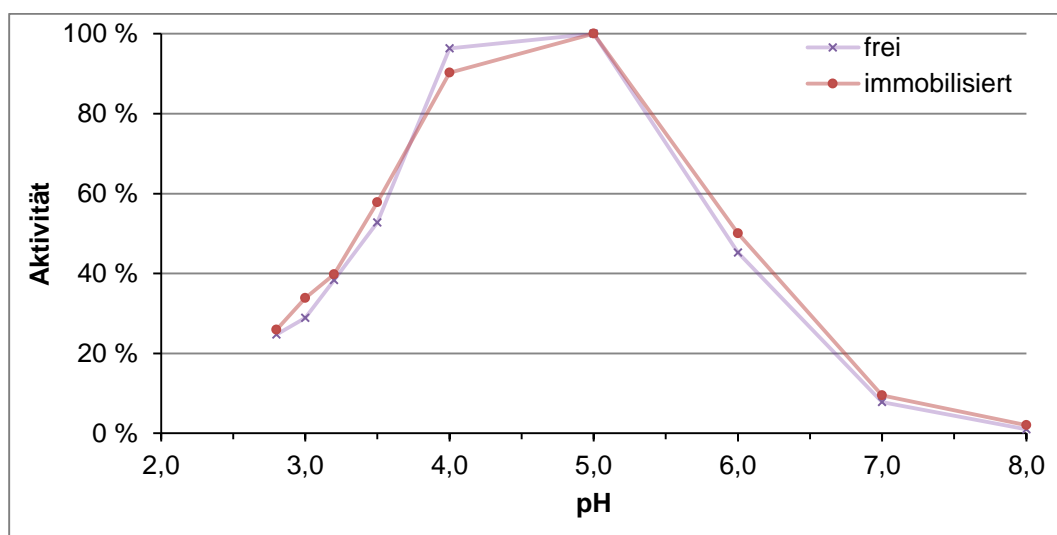


Abb. 58 Relative Aktivität (%) der freien und immobilisierten β -Glucosidase in Abhängigkeit des pH-Werts, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

Die optimale **Temperatur** für die Wirksamkeit der beiden Enzyme zeigte das gleiche Verhalten. Die Kurve der relativen Aktivität der freien und der immobilisierten

β -Glucosidase waren nahezu identisch (siehe Abb. 59). Das Temperatur-Optimum der beiden Enzyme, frei und immobilisiert, betrug 70 °C.

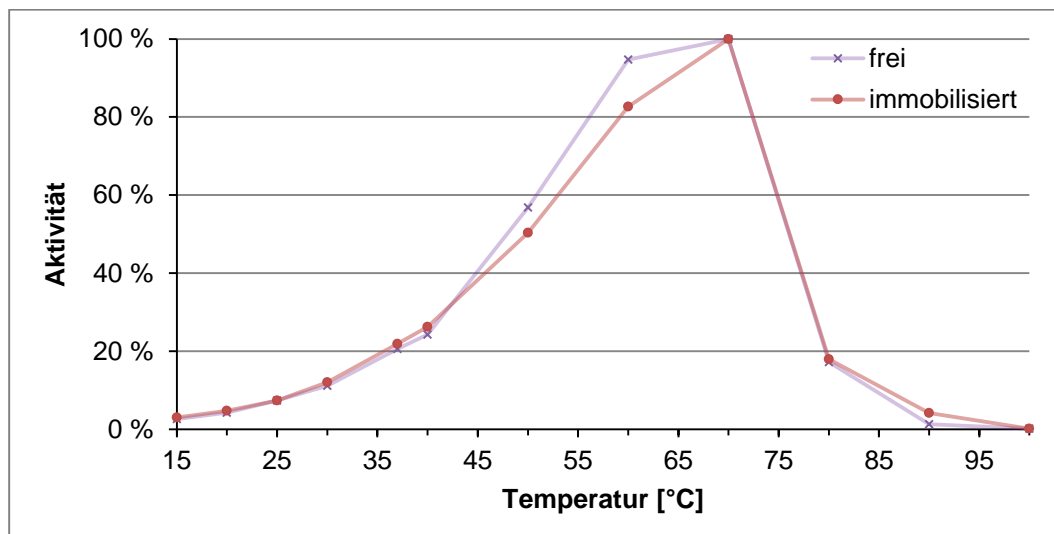


Abb. 59 Relative Aktivität (%) der freien und immobilisierten β -Glucosidase in Abhängigkeit der Temperatur, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

Gegenüber diesen Ergebnissen gewann die β -Glucosidase an Aktivität durch Erhöhung der **Ethanol**-Konzentration (s. Abb. 60). Eine Steigerung des Ethanolgehalts auf 15 Vol.-%, ergab eine Aktivitätserhöhung der immobilisierten β -Glucosidase auf 150,9 % und für das freie Enzym auf bis zu 133,3 %. Die immobilisierte β -Glucosidase gewann im Vergleich zum freien Enzym mehr Aktivität. Wie bereits beschrieben, hängt die Aktivitätssteigerung durch Ethanol wahrscheinlich mit der stärker ausgeprägten Nukleophilie von Ethanol gegenüber Wasser zusammen und/oder einer Transglycosylierungsaktivität (s. Kapitel 4.2.1.3). Eine mögliche Erklärung für die stärkere Steigerung durch Ethanol beim der immobilisierten β -Glucosidase kann eine Stabilisierung des Enzyms in Folge der Kopplung mit dem Magnetit-Partikel sein, dadurch kommt eventuell die verbesserten Löslichkeit des Substrats durch Ethanol und damit besseren Verfügbarkeit stärker zur Geltung.

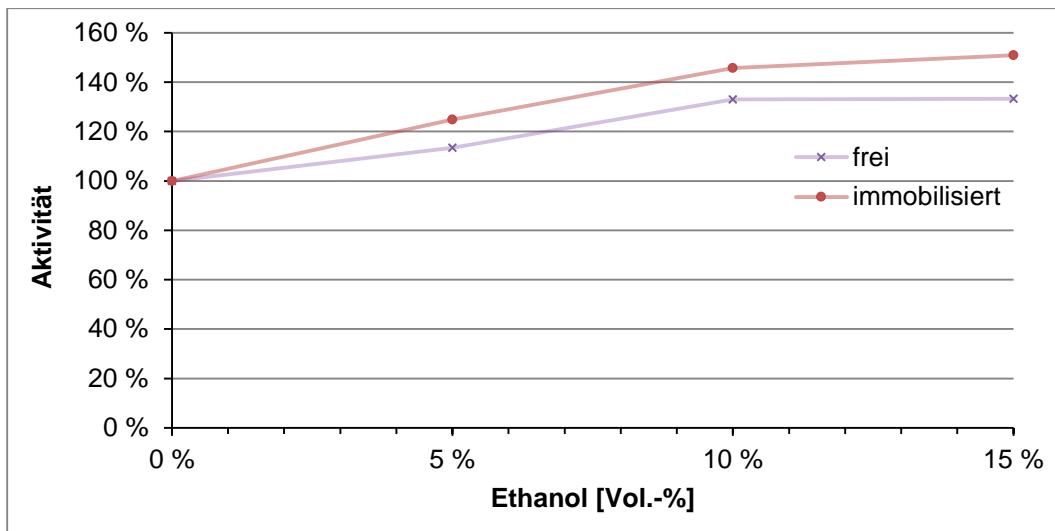


Abb. 60 Relative Aktivität (%) der freien und immobilisierten β -Glucosidase in Abhängigkeit der Ethanol-Konzentration, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

Die Inhibitor-Wirkung von **Glucose** waren für beide β -Glucosidasen ebenfalls analog (s. Abb. 61). Beispielsweise verloren beide Enzyme 80 % an Aktivität bei einer Glucose-Konzentration von 20 g/l.

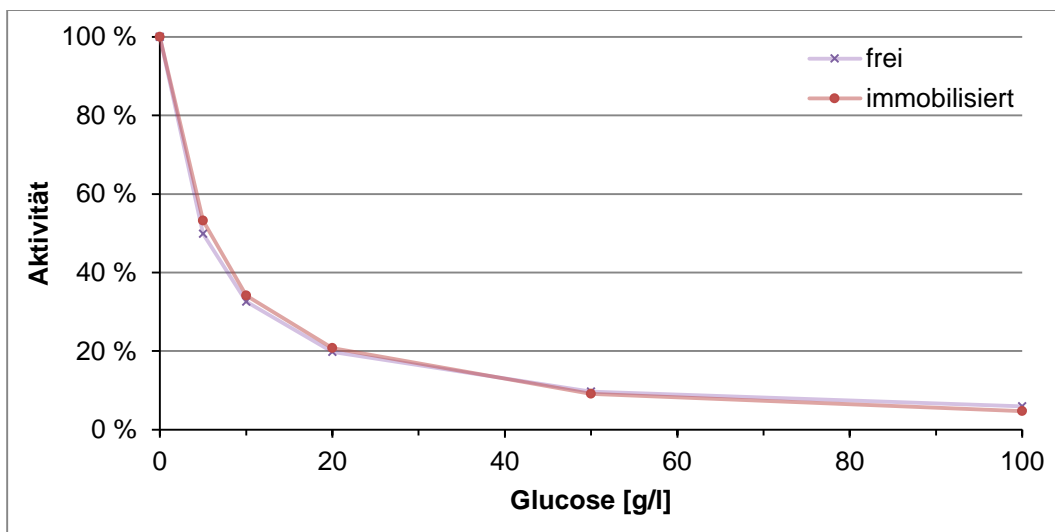


Abb. 61 Relative Aktivität (%) der freien und immobilisierten β -Glucosidase in Abhängigkeit der Glucose-Konzentration, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

Fructose hingegen führte in einem Bereich von etwa 10 bis 170 g/l zur Erhöhung der Aktivität (s. Abb. 62). So steigerte z.B. eine Fructose-Konzentration von 50 g/l die Aktivität des immobilisierten Enzyms auf bis zu 170,0 % und die des freien Enzyms auf bis zu 154,4 %. Wurde die Fructose-Konzentration weiter erhöht, war der Rückgang der Aktivität sowohl für das freie als auch für das immobilisierte Enzym ähnlich. Trotz dessen zeigte das immobilisierte Enzym insgesamt eine etwas höhere

Aktivität, was vermutlich auf eine erhöhte Stabilität durch Immobilisierung zurückzuführen ist. Allerdings war der Unterschied nicht signifikant.

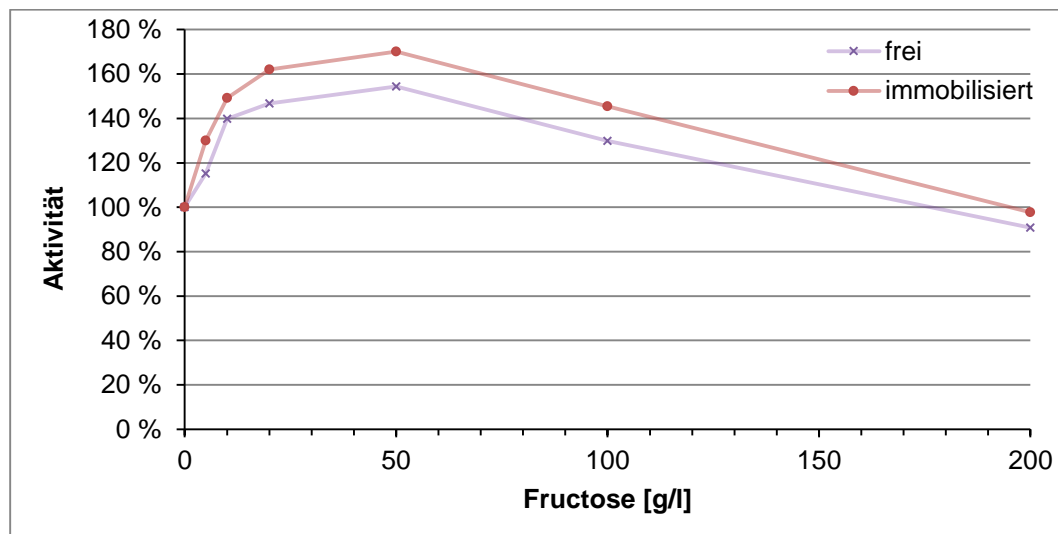


Abb. 62 Relative Aktivität (%) der freien und immobilisierten β -Glucosidase in Abhängigkeit der Fructose-Konzentration, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

4.4.1 Weitere Glycosidase-Aktivitäten

Das immobilisierte und freie Enzymgemisch wurden zusätzlich zur β -Glucosidase-Aktivität noch auf die drei Glycosidase-Aktivitäten Arabinosidase, Rhamnosidase und Xylosidase untersucht. Folgende Bedingungen wurden getestet: pH 3,5 und 25 °C, 10 Vol.-% Ethanol, 5 g/l Glucose und 5 g/l Fructose. Abgesehen von den variierenden Parametern, wurden pH 5,0 und 37 °C als konstante Reaktionsbedingungen gewählt. Bei den vergleichenden Immobilisierungswerten aus der Literatur ist wiederum zu beachten, dass andere Immobilisierungsmethoden und Träger verwendet wurden.

4.4.1.1 Arabinosidase-Aktivität

In Abb. 63 ist zu erkennen, dass mit sinkender Temperatur und niedrigerem pH die Arabinosidase ca. 50 % Aktivität verlor, egal ob immobilisiert oder frei. Durch Ethanol kam es ebenfalls zu einer ähnlich hemmenden Wirkung, die immobilisierte Arabinosidase wies jeweils im Vergleich zum Referenzpunkt eine Aktivität von 57,7 % und die freie Arabinosidase von 63,4 % auf. Fructose und Glucose hatten keinen signifikanten Effekt auf die Arabinosidase-Aktivität, was sowohl für das Immobilisat als auch für das freie Enzym galt. Für die Arabinosidase beobachtete Caldini et al. (1994) ebenfalls eine Hemmung durch Ethanol, ca. 90 % Rest-Aktivität bei einer Ethanol-Konzentration von 10 Vol.-% [36].

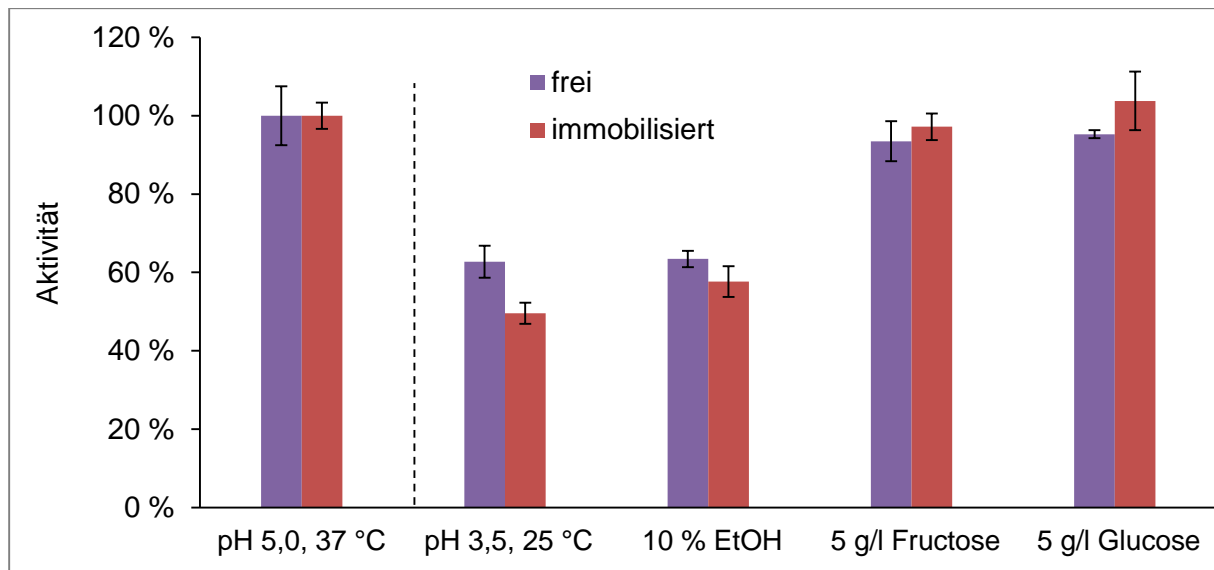


Abb. 63 Relative Aktivität der freien und immobilisierten Arabinosidase, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

4.4.1.2 Rhamnosidase-Aktivität

Die Rhamnosidase verlor deutlich mehr Aktivität bei pH 3,5 und 25 °C als die Arabinosidase. Beide Enzyme, immobilisiert und frei, verloren ca. 70 % an Aktivität. Der Verlust durch Ethanol lag bei der immobilisierten Rhamnosidase bei 51,8 % und bei der freien bei 56,2 %. Spagna et al. (2000) beobachteten ebenfalls eine Hemmung durch steigende Ethanolgehalte [225]. Bei 10 Vol.-% Ethanol fanden sie eine Rest-Aktivität von ca. 55 %. Für die Rhamnosidase beobachtete Caldini et al. (1994) eine Rest-Aktivität von ca. 50 % bei 10 Vol.-% Ethanol [36].

Auch hier hatten sowohl Glucose als auch Fructose keinen signifikanten Effekt auf die Rhamnosidase. Wohingegen Spagna et al. (2001) von einer ca. 20 %igen Hemmung durch Fructose (5 g/l) berichteten, ähnlich wie bei Glucose [26].

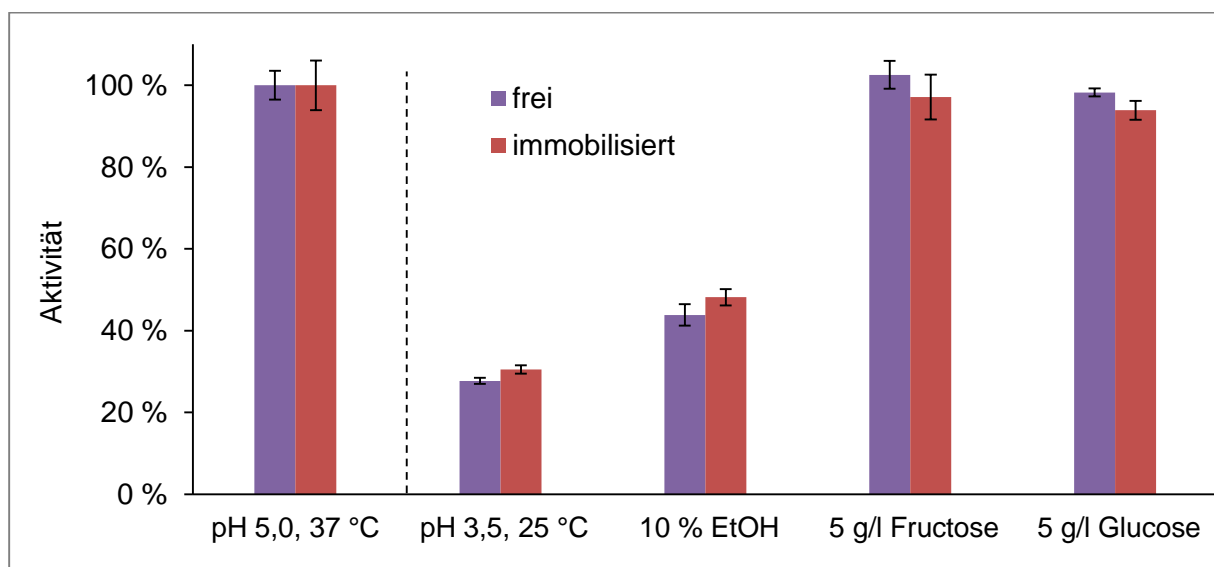


Abb. 64 Relative Aktivität der freien und immobilisierten Rhamnosidase, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

4.4.1.3 Xylosidase-Aktivität

Bei pH 3,5 und 25 °C verlor die freie Xylosidase mit 75,3 % deutlich mehr an Aktivität als die immobilisierte Xylosidase mit 48,1 %. Durch die Immobilisierung kam es vermutlich zu einer Stabilisierung des Enzyms, wodurch der pH-Wert einen geringeren Einfluss auf die Xylosidase hat.

Durch einen Ethanolgehalt von 10 Vol.-% stieg die Aktivität beider Xylosidasen (immobilisiert oder frei) deutlich auf 210,6 % für die freie und auf 220,3 % für die immobilisierte Xylosidase. Fructose und Glucose hatten keine negativen Effekte auf die Xylosidase. Jedoch wurde durch 5 g/l Fructose eine signifikante Aktivitätssteigerung der freien Xylosidase auf 135,5 % und auf 124,5 % für die immobilisierte Xylosidase festgestellt. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei 5 g/l Glucose, 120,3 % (immobilisiert) respektive 111,2 % (frei).

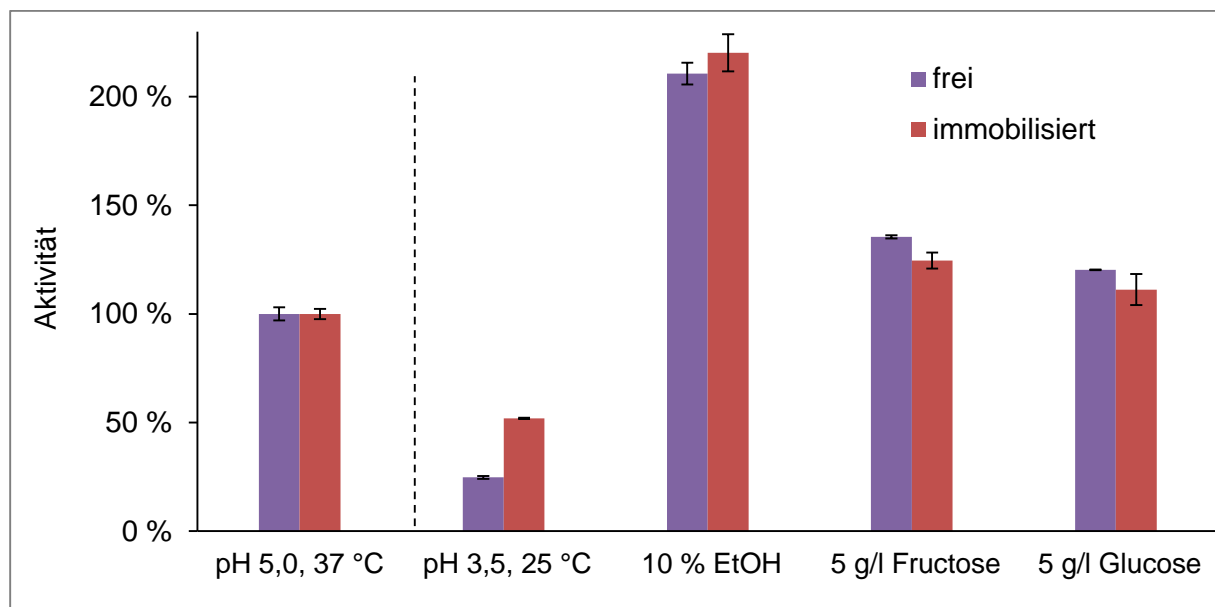


Abb. 65 Relative Aktivität der freien und immobilisierten Xylosidase, Referenz-Punkt pH 5,0 und 37 °C

4.4.2 Fazit

Es kam in Folge der Immobilisierung zu keinem nennenswerten Aktivitätsverlust, bezogen auf den Proteingehalt, der β -Glucosidase. Die Aktivitätsprofile waren nahezu identisch. Die immobilisierte β -Glucosidase zeigte sogar einen etwas höheren relativen Aktivitätsgewinn durch steigende Fructose- bzw. Ethanol-Konzentrationen. Somit ist von keiner negativen Beeinflussung bzw. Konformationsänderung der β -Glucosidase durch die Immobilisierung auszugehen. Demzufolge sollte die immobilisierte β -Glucosidase im Vergleich zum freien Enzym ein ähnliches

Freisetzungspotential haben. Aufgrund der etwas höheren Aktivitätssteigerung bei den Parametern Ethanol und Fructose, kann sogar vermutet werden, dass das immobilisierte Enzym im Wein eine etwas höhere β -Glucosidase-Aktivität aufweist.

Aus den gewonnenen Ergebnissen der anderen drei Glycosidasen (Arabinosidase, Rhamnosidase und Xylosidase) kann festgehalten werden, dass es auch dort zu keinen bzw. nur geringen Aktivitätsänderungen bzw. Konformationsänderungen durch die Immobilisierung kam. Bei der immobilisierten Arabinosidase kam es zu leichten Aktivitätsverlusten bei pH 3,5 und 25 °C. Bei der Rhamnosidase konnten keinerlei signifikanten Änderungen festgestellt werden und die immobilisierte Xylosidase hatte bei pH 3,5 und 25 °C einen signifikant geringeren Aktivitätsverlust im Vergleich zur freien Xylosidase. Glucose und Fructose hatten kaum bis nur geringe Effekte auf die Aktivität der Glycosidasen Arabinosidase, Rhamnosidase und Xylosidase. Romero et al. (1985) und Le Clinche et al. (1997) berichteten ebenfalls von keiner Beeinflussung der „Co-Enzyme“ durch in Fruchtsaft übliche Zucker-Konzentrationen [203, 204].

Allerdings zeigen die absoluten Aktivitätswerte der Glycosidasen (s. Kapitel 4.3.2, Tab. 22), dass die Arabinosidase und Rhamnosidase in deutlich geringerer Anzahl bzw. Aktivität an den Magnetit-Partikeln vorhanden waren. Dadurch weist das immobilisierte Enzymgemisch später im Wein im Vergleich zum freien Enzympräparat besonders geringere Arabinosidase- und Rhamnosidase-Aktivitäten auf. Wie bereits bei den Immobilisierungsausbeuten und -effizienzen zu erkennen war, hat sich das Verhältnis der Glycosidasen zueinander in Richtung β -Glucosidase verschoben (s. Kapitel 4.3.1). Folglich ist beim Immobilisat aufgrund des sequentiellen Mechanismus bei der Aromafreisetzung von einem etwas schlechteren Freisetzungspotential im Wein auszugehen.

Durch die Immobilisierung ändern sich zwar die Verhältnisse der einzelnen Glycosidasen zueinander, die Aktivitätsprofile der Enzyme bleiben aber nahezu identisch und die katalytischen Eigenschaften scheinen sich nicht signifikant zu ändern. Die verwendete Immobilisierungsmethode hatte dementsprechend keine negativen Einflüsse auf die Struktur der jeweiligen Glycosidase.

4.5 Enzymkinetik

Die kinetischen Messungen wurden unter verschiedenen Bedingungen mit der immobilisierten und der freien β -Glucosidase entsprechend Kapitel 3.4 durchgeführt.

Folgende Parameter wurden unter Betrachtung der Relevanz für Wein untersucht:

- pH 5,0 und pH 3,5 bei 37 °C
- pH 3,5 und 25 °C
- 5 g/l und 50 g/l Glucose
- 5 g/l Fructose
- 10 Vol.-% Ethanol
- 5 mg/l Eisen
- Modell-Wein (10 Vol.-% Ethanol, 5,4 g/l Fructose, 3,6 g/l Glucose, 9 g/l Weinsäure, pH 3,5)

Als Referenzpunkt wurde wieder pH 5,0 und 37 °C gewählt, d.h. sofern nichts anderes angegeben, wurden die beschriebenen Stoffe in dem Referenz-Puffer (pH 5,0) gelöst und bei 37 °C gemessen.

4.5.1 Michaelis-Konstante K_M

Üblicherweise liegen die K_M -Werte natürlich vorkommender Substrate und anderer guter Substrate bei 1 mM oder weniger [152]. In Tab. 23 sind die kinetischen Werte für die koppelte und die freie β -Glucosidase unter verschiedenen Bedingungen dargestellt.

Wie in Tab. 23 zu erkennen ist, unterscheiden sich die K_M -Werte zwischen immobilisierter und freier β -Glucosidase kaum signifikant voneinander. Daraus ist zu schließen, dass es zu keiner nennenswerten Konformationsänderung durch den Immobilisierungsprozess kommt. Je niedriger die Michaelis-Konstante ist, desto höher ist die Affinität der β -Glucosidase zum Substrat (pNPG), bzw. desto besser bindet das Substrat an das Enzym [137]. Die Struktur des Substratkanals und des aktiven Zentrums scheinen sich in Folge der Immobilisierung nicht zu ändern, somit bleibt die Affinität bzw. die Präferenz des Substrats ans aktive Zentrum zu binden erhalten.

Tab. 23 K_M -Werte der freien und immobilisierten β -Glucosidase bei verschiedenen Parametern

Parameter		K_M [mM]
pH 5,0, 37 °C	immobilisiert	0,51 ± 0,056
	frei	0,51 ± 0,068
pH 3,5, 37 °C	immobilisiert	1,01 ± 0,042
	frei	1,01 ± 0,052
pH 3,5, 25 °C	immobilisiert	0,97 ± 0,031
	frei	1,01 ± 0,017
5 g/l Glucose	immobilisiert	3,45 ± 0,261
	frei	3,84 ± 0,078
50 g/l Glucose	immobilisiert	21,36 ± 3,732
	frei	33,26 ± 9,149
5 g/l Fructose	immobilisiert	0,47 ± 0,027
	frei	0,59 ± 0,036
10 Vol.-% EtOH	immobilisiert	0,86 ± 0,057
	frei	0,89 ± 0,042
5 mg/l Eisen	immobilisiert	0,50 ± 0,045
	frei	0,56 ± 0,039
Modell-Wein	immobilisiert	5,61 ± 0,263
	frei	7,32 ± 0,577

Wie zu erwarten, war der K_M -Wert beim Referenzpunkt pH 5,0 und 37 °C mit 0,51 mM für die immobilisierte und freie β -Glucosidase am geringsten. Bei diesen Bedingungen lagen kaum störende Faktoren vor und das Substrat konnte optimal an das aktive Zentrum der β -Glucosidase binden. Die K_M -Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Erniedrigte man den pH auf 3,5, stiegen die K_M -Werte der immobilisierten und freien β -Glucosidase auf 1,01 mM. Auch hier lag kein signifikanter Unterschied zwischen gekoppelter und freier β -Glucosidase vor. Eine zusätzlich niedrigere Temperatur von 25 °C, eine übliche Temperatur beim Einsatz der Enzyme, unterschieden sich die K_M -Werte der immobilisierten und freien β -Glucosidase mit 0,97 und 1,01 mM ebenfalls nicht signifikant voneinander. Die Temperatur hat keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität des Substrates an das aktive Zentrum der β -Glucosidase. Da sich Glucose schon bei den vorherigen Untersuchungen (s. Kapitel 4.2.1.5) als hemmender Faktor zeigte, waren hier deutlich höhere K_M -Werte zu

erwarten. Die kinetischen Untersuchungen bestätigten diese Annahme. Bei 5 g/l Glucose erhöhte sich der K_M -Wert für die immobilisierte β -Glucosidase auf 3,45 mM und für die freie auf 3,84 mM. Noch deutlicher wurde der hemmende Einfluss der Glucose bei der Betrachtung der Werte bei 50 g/l Glucose. Hier stieg der K_M -Wert der immobilisierten β -Glucosidase auf 21,4 mM und auf 33,3 mM für die freie β -Glucosidase. Es kommt, wie bereits unter Punkt 4.2.1.5 und 0 experimentell gezeigt, zu einer deutlichen Hemmung durch eine steigende Glucose-Konzentration. Durch eine graphische Darstellung dieser Ergebnisse im Lineweaver-Burk-Diagramm (s. Abb. 66 und Abb. 67) kann man deutlich die kompetitive Hemmung durch die Glucose erkennen. Dabei schneiden sich im Lineweaver-Burk-Diagramm die Geraden bei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen auf der Ordinate. Sarry und Günata (2004) schätzen eine Inhibition durch Glucose in den meisten Fällen ebenfalls als kompetitiv ein [11]. Bei dieser Hemmung handelt es sich vermutlich um eine Sonderform der kompetitiven Hemmung, die Produkthemmung, das Produkt greift selbst regulierend in den enzymatischen Ablauf ein, indem es ein Enzym hemmt bzw. die katalytische Reaktion verlangsamt. Diese beeinflussen zwar den katalytischen Prozess nicht, v_{max} und damit auch k_{cat} , bleiben theoretisch somit nahezu unverändert. Allerdings wird durch den Inhibitor mehr Substrat benötigt, um die halbmaximale Geschwindigkeit zu erreichen und K_M wird daher (scheinbar) größer. Ein möglicher Mechanismus der Glucose-Hemmung ist in Kapitel 4.2.4 beschrieben.

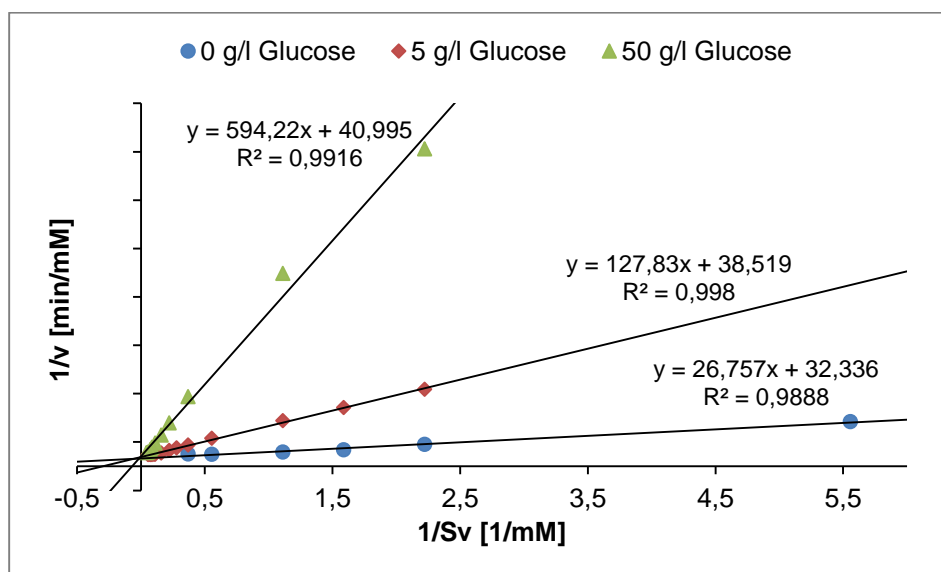


Abb. 66 Lineweaver-Burk-Diagramm der immobilisierten β -Glucosidase bei unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen

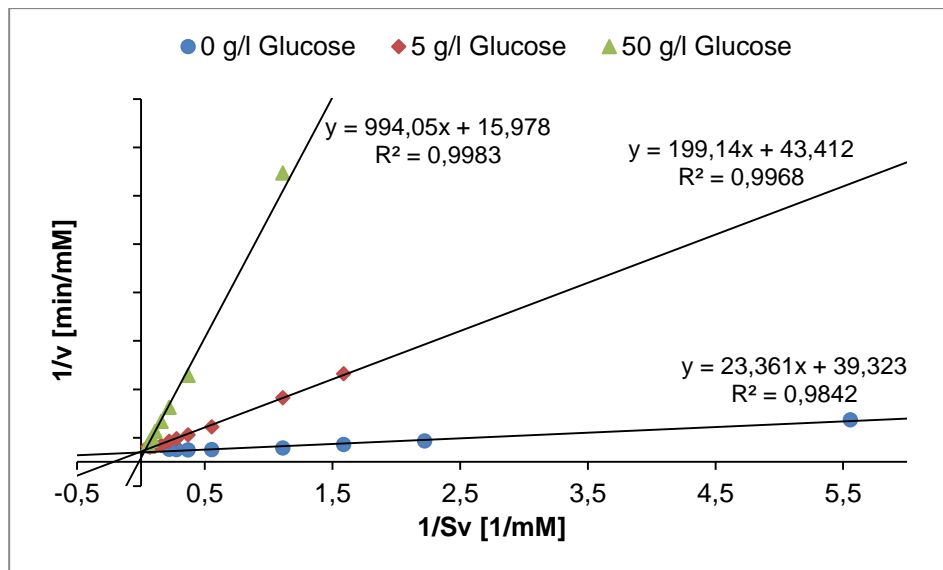


Abb. 67 Lineweaver-Burk-Diagramm der freien β -Glucosidase bei unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen

Interessanterweise beobachteten Gallifuoco et al. (1998) bei einer β -Glucosidase eine nicht-kompetitive Hemmung durch Glucose [23]. Mögliche Ursachen für diese unterschiedliche Beobachtung können zum einen die unterschiedliche Herkunft der β -Glucosidase sein, die Autoren verwendeten eine aufgereinigte β -Glucosidase aus dem Enzympräparat Cytolase PCL5 (Fa. Genencor), und zum anderen die unterschiedliche Immobilisierung, die β -Glucosidase wurde auf Chitosan adsorbiert und anschließend mit Glutaraldehyd quervernetzt. Leider machten die Autoren keine Angaben zur Art der Hemmung der freien, nicht-immobilisierten Glucosidase [23].

Zusätzlich zur Berechnung der K_M -Werte wurde die Inhibitor-Konstante K_i für Glucose bestimmt (s. Kapitel 3.4.3.2). K_i ist ein Maß für die Hemmqualitäten des Inhibitors und analog zur Michaelis-Konstanten K_M gilt, je kleiner der K_i -Wert ist, desto besser ist die Bindung an das Enzym und desto höher die Hemmqualität. Der Faktor α ist dabei ein Maß, um den sich K_M durch den Inhibitor erhöht. In Tab. 24 sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Gueguen et al. (1996) ermittelten ähnliche K_i -Werte für Glucose bei einer β -Glucosidase (*C. molischiana* 35M5N) mit 7,3 mM (frei) und 5,3 mM (immobilisiert) [238]. Die meisten mikrobiellen β -Glucosidasen besitzen eine Inhibitionskonstante (K_i) für Glucose von 0,6 bis 8 mM [206, 207]. Für β -Glucosidasen von Schimmelpilzen wurden in der Literatur K_i -Werte im Bereich von 0,6 bis 10 mM beschrieben [11, 201, 202]. Die erhaltenen Ergebnisse lagen im erwarteten Bereich. Der Unterschied zwischen freier und immobilisierter β -Glucosidase war nicht signifikant.

Tab. 24 K_i - und α -Werte für die freie und immobilisierte β -Glucosidase

		K_i [mM]	α
5 g/l Glucose	immobilisiert	4,23 ± 0,37	7,60 ± 0,58
	frei	4,96 ± 0,12	6,59 ± 0,14
50 g/l Glucose	immobilisiert	6,22 ± 1,11	47,1 ± 8,2
	frei	5,37 ± 1,50	57,1 ± 15,7

Eigentlich sollten die K_i -Werte bei einer Konzentration von 5 und 50 g/l Glucose ungefähr gleich sein. Da die Erfassung der kinetischen Werte bei dieser hohen Glucose-Konzentration schwierig war (aufgrund der deutlich verminderten Aktivität, sehr niedrige Extinktionswerte und lange Reaktionszeiten), was die hohen Standard-Abweichungen verdeutlichen, und weitere Faktoren, die die Berechnung der kinetischen Werte beeinflussen, kann dies eine mögliche Erklärung für die abweichenden K_i -Werte sein.

Durch eine Ethanol-Konzentration von 10 Vol.-% kam es zu einem leichten Anstieg der K_M -Werte, der Wert für die immobilisierte β -Glucosidase stieg auf 0,86 mM und für die freie β -Glucosidase auf 0,89 mM. Der Unterschied zwischen den beiden Glucosidasen war wieder nicht signifikant. Gleiches gilt für eine Fructose-Konzentration von 5 g/l, der K_M -Wert war im Vergleich zum Referenzpunkt leicht erhöht mit 0,47 mM für die immobilisierte und 0,59 mM für die freie β -Glucosidase.

Ein Eisengehalt von 5 mg/l hatte ebenfalls keinen bzw. lediglich einen geringen Einfluss auf die β -Glucosidase. Die immobilisierte β -Glucosidase wies einen K_M -Wert von 0,50 mM und die freie von 0,56 mM auf. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden β -Glucosidasen festgestellt werden. Eine von Ketudat Cairns und Esen (2010) beschriebene Hemmung durch Eisen konnte nicht bestätigt werden [11, 152]. Wie zu erwarten, führten die Messungen unter weinähnlichen Bedingungen (Modell-Wein) zu deutlich höheren K_M -Werten. Der K_M -Wert für die immobilisierte β -Glucosidase stieg auf 5,61 mM und für die freie β -Glucosidase auf 7,32 mM. Die Erhöhungen der beiden K_M -Werte sind auf den niedrigen pH (3,5) und die enthaltene Glucose (3,6 g/l) im Modell-Wein zurückzuführen.

4.5.1.1 Fazit

Durch die Immobilisierung kam es zu keinem signifikanten Anstieg der Michaelis-Konstanten. Die K_M -Werte der immobilisierten β -Glucosidase waren insbesondere bei

den hemmenden Faktoren, wie Glucose und niedriger pH, teilweise sogar geringfügig niedriger. D.h. die immobilisierte β -Glucosidase hatte somit teilweise eine etwas höhere Affinität zum Substrat was eventuell auf eine Stabilisierung der β -Glucosidase durch den Immobilisierungsprozess und somit auf eine teilweise höhere Affinität zum Substrat schließen lässt. Allerdings war der Unterschied nicht signifikant.

Bezieht man Werte aus der Literatur mit ein, so liegen die dort dokumentierten Daten in ähnlichen Bereichen. Caldini et al. (1994) beobachteten für ein kommerzielles Enzympräparat einen K_M -Wert von 0,60 mM für eine β -Glucosidase (*A. niger*, bei pH 4,8 und 25 °C) [36]. Gallifuoco et al. (1998) ermittelten für eine *A. niger* β -Glucosidase einen K_M -Wert von 1,3 mM (bei 25 °C und pH 3,5) [23]. Le Traon-Masson und Pellerin (1998) beobachteten einen K_M -Werte von 0,43 und 0,11 mM (*A. niger* β -Glucosidase, bei pH 4,2 und 40 °C) [373]. Spagna et al. (2002) verglichen eine freie und immobilisierte *A. niger* β -Glucosidase und ermittelten für die freie einen K_M -Wert von 0,63 mM und für die immobilisierte von 0,88 mM (bei pH 3,5 und 25 °C) [27].

Andere Immobilisierungsversuche von Enzymen hingegen ergaben zum Teil deutlich erhöhte K_M -Werte [374]. So fanden Handa et al. (1982) z.B. bei einer kovalenten Immobilisierung von α -Amylase eine Erhöhung des K_M -wertes um den Faktor 100 [375]. Ein höherer K_M -Wert bedeutet, dass die Affinität zwischen Enzym und Substrat erniedrigt ist. Treten durch die Immobilisation Konformationsänderungen des Enzyms auf, kann dies zu höheren K_M -Werten führen. Bleibt der K_M -Wert weitestgehend erhalten, so deutet dies darauf hin, dass es zu keiner Konformationsänderung kam, welche die Affinität beeinflussen könnte. Allerdings muss beim Vergleich mit Daten aus der Literatur beachtet werden, dass andere Enzyme und andere Methoden zur Konjugation verwendet wurden und so die Daten nur bedingt vergleichbar sind.

Folglich lässt sich aufgrund der K_M -Werte der freien und immobilisierten β -Glucosidase festhalten, dass es durch die Immobilisierung zu keinen bzw. nur geringen Konformationsänderung der β -Glucosidase kam und die Affinität zwischen Enzym und Substrat weitestgehend erhalten blieb.

4.5.2 Wechselzahl k_{cat}

Da die Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} nicht die bei der Messung eingesetzte Enzymmenge berücksichtigt, hat diese enzymkinetische Konstante nur eine geringe Aussagekraft. Daher ist die enzymkinetische Konstante k_{cat} besser geeignet, bei der die experimentell ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} ins Verhältnis zur

eingesetzten Enzymkonzentration gesetzt wird. Die Wechselzahl k_{cat} beschreibt in diesem Zusammenhang die Geschwindigkeitskonstante der enzymatischen Reaktion unter definierten Bedingungen. Da es sich bei den eingesetzten Enzymen nicht um reine, sondern um Enzymmischungen handelte, war die genaue (molare) Enzymkonzentration der β -Glucosidase in der Enzymmischung nicht bekannt und daher wurde k_{cat} über die eingesetzte Menge an Enzympräparat bzw. Immobilisat (mg_E) und den Proteingehalt des Präparates bzw. Immobilisats (mg_P) bestimmt. Die Aktivität bzw. Reaktionsgeschwindigkeit wurde daher in n_{kat} angegeben, da gerade für technische Anwendungen lediglich der Umsatz von Interesse ist. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass eine Vielzahl von experimentellen Größen, die mit möglichen Fehlern behaftet sein können, in die Berechnung von k_{cat} einfließt. Zusätzlich muss bei der Wechselzahl k_{cat} beachtet werden, dass es weiterhin schwierig ist die erhaltenen Ergebnisse zu vergleichen, da sich die Enzym-Zusammensetzung nach der Kopplung deutlich änderte und damit die Bezugspunkte Menge an eingesetztem Enzym bzw. der Proteingehalt dieser Enzymmischung dementsprechend nicht mehr einheitlich waren.

Nun zeigen sich aus den vorliegenden Daten (s. Tab. 25) sowohl hemmende als auch steigernde Effekte durch die geänderten Bedingungen auf die maximale Reaktionsgeschwindigkeit. Als Referenzpunkt wurde, wie bei allen anderen Aktivitätsbestimmungen, pH 5,0 und 37 °C gewählt.

Tab. 25 k_{cat} -Werte für die freie und immobilisierte β -Glucosidase bei unterschiedlichen Parametern

Parameter		k_{cat} [nkat/mg _E]	k_{cat} [nkat/mg _P]
pH 5,0, 37 °C	immobilisiert	2,16 ± 0,096	156,47 ± 8,95
	frei	2,94 ± 0,132	56,17 ± 2,51
pH 3,5, 37 °C	immobilisiert	1,15 ± 0,082	79,85 ± 1,86
	frei	2,35 ± 0,029	44,84 ± 0,55
pH 3,5, 25 °C	immobilisiert	0,99 ± 0,021	71,43 ± 2,40
	frei	1,81 ± 0,099	34,83 ± 1,90
5 g/l Glucose	immobilisiert	1,28 ± 0,042	94,00 ± 3,11
	frei	2,58 ± 0,035	49,39 ± 0,66
50 g/l Glucose	immobilisiert	0,85 ± 0,101	62,13 ± 7,42
	frei	2,26 ± 0,479	43,13 ± 9,15
5 g/l Fructose	immobilisiert	2,48 ± 0,063	181,82 ± 4,62
	frei	3,99 ± 0,112	76,20 ± 2,15
10 Vol.-% EtOH	immobilisiert	2,53 ± 0,073	185,01 ± 5,37
	frei	4,27 ± 0,095	81,66 ± 1,81
5 mg/l Eisen	immobilisiert	2,16 ± 0,092	158,23 ± 6,76
	frei	2,78 ± 0,096	53,15 ± 1,83
Modell-Wein	immobilisiert	1,50 ± 0,044	110,20 ± 3,26
	frei	2,63 ± 0,121	50,34 ± 2,31

Die immobilisierte β -Glucosidase wies bei pH 5,0 und 37 °C einen k_{cat} von 156,5 nkat/mg_P und die freie β -Glucosidase von 56,2 nkat/mg_P auf. Senkt man nun den pH auf 3,5, sank k_{cat} bei beiden β -Glucosidasen auf 51,0 % (immobilisiert) bzw. 79,8 % (frei). Es wurde also bei diesem pH weniger Substrat pro Zeit umgesetzt. Die immobilisierte β -Glucosidase wies einen Wert von 79,9 nkat/mg_P und die freie β -Glucosidase von 44,8 nkat/mg_P auf. Somit verlor die immobilisierte β -Glucosidase 49,0 % an Reaktionsgeschwindigkeit und die freie β -Glucosidase 20,2 %. Es ist also von einem Aktivitätsverlust durch den niedrigen pH von 3,5 auszugehen, wobei der Einfluss des niedrigeren pH auf die immobilisierte β -Glucosidase signifikant größer war. Von einem Aktivitätsverlust in Folge eines niedrigeren pH-Wertes von unter 4,0 wurde bereits berichtet (s. Kapitel 4.2.1.2). Durch den veränderten pH-Wert kommt es vermutlich zu Konformationsänderungen des Enzyms, wodurch das Substrat schlechter an das aktive Zentrum binden kann und dadurch die Geschwindigkeit der

katalytischen Reaktion herabgesetzt wird. Der pH-Wert hat mehrere Einflüsse auf die Enzymaktivität. Zum einen kommt es zu Protonierungen und Deprotonierung der reaktive Gruppen (Carboxyl-, Amino- und Thiol-Gruppen) im aktiven Zentrum, somit schwanken diese zwischen aktiven und inaktiven Zustand, zum anderen führen isolierte protonierbare Gruppen bei einem pH-Anstieg zur Steigerung der Enzymaktivität. Allerdings kann es ab einem gewissen Punkt zu einer Protonierung einer zweiten essentiellen Gruppe und daher zum Aktivitätsabfall kommen (pH-Optimumskurve) [376]. Aus diesem Grund kann man bei einem Aktivitätsverlust von Enzymen durch variierende pH-Werte auch nicht von einer direkten Hemmung sprechen, da diese Faktoren unspezifisch auf eine Vielzahl von Vorgängen, wie Konformationsänderungen des Enzyms, Veränderung der Löslichkeit des Substrats, etc., wirken. Der stärkere Verlust an Reaktionsgeschwindigkeit durch einen niedrigeren pH der immobilisierten β -Glucosidase kann eventuell auf eine stärkere Fixierung der β -Glucosidase durch die Immobilisierung zurückzuführen sein und einer damit geringeren Flexibilität auf pH-Wert-Änderungen zu reagieren.

Eine zusätzlich niedrigere Temperatur (25 °C) verminderte die Reaktionsgeschwindigkeit, entsprechend der RGT-Regel, noch einmal. Die gekoppelte Form wies einen Wert von 71,4 nkat/mg_P und die freie β -Glucosidase von 34,83 nkat/mg_P auf. Das entspricht, bezogen auf die Menge an Immobilisat bzw. Enzympräparat, 0,99 nkat/mg_E für die immobilisierte und 1,81 nkat/mg_E für die freie β -Glucosidase. Mit 1,33 nkat pro mg Immobilisat konnten Gallifuoco et al. (1998) eine vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeit bei pH 3,5 und 25 °C ermitteln (*A. niger* β -Glucosidase, aufgereinigt) [23]. Caldini et al. (1994) beobachteten einen etwas geringeren k_{cat} -Wert von 0,6 nkat/mg_E bei pH 4,8 und 25 °C (*A. niger* β -Glucosidase) [36]. Die Glucose-Konzentration hatte ebenfalls einen erniedrigenden Einfluss auf k_{cat} . Die immobilisierte β -Glucosidase hatte bei 5 g/l Glucose einen k_{cat} -Wert von 94,0 nkat/mg_P und die freie β -Glucosidase von 49,4 nkat/mg_P, was einer Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit um 39,9 % bzw. 5,8% bei der immobilisierten Variante entspricht. Somit hatte Glucose eine stärker erniedrigende Wirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit der immobilisierten β -Glucosidase. 50 g/l Glucose beeinflussten die Reaktionsgeschwindigkeit der freien β -Glucosidase nicht signifikant im Vergleich zu einer Konzentration von 5 g/l Glucose. Die immobilisierte β -Glucosidase zeigte hingegen eine weitere Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit auf 39,7 %. Theoretisch sollte der hemmende Faktor Glucose keinen Einfluss auf den

katalytischen Prozess haben, v_{\max} und damit auch k_{cat} sollten theoretisch nahezu unverändert bleiben und nur K_M sollte größer werden.

Wie zu erwarten war, führte eine Ethanol-Konzentration von 10 Vol.-% zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit k_{cat} . Die immobilisierte β -Glucosidase zeigte eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit auf 118,2 % und die freie auf 155,8 %. Die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Ethanol kann vermutlich auf die verbesserte Löslichkeit des Substrats und/oder eine Transglycosylierungsaktivität zurückzuführen sein (s. Kapitel 4.2.1.3). Eine Fructose-Konzentration von 5 g/l zeigte eine ähnliche Wirkung auf die β -Glucosidase. Für die immobilisierte β -Glucosidase war eine Steigerung von k_{cat} auf 116,2 % und für die freie β -Glucosidase auf 145,3 % festzustellen.

Eisen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Unter weinähnlichen Bedingungen (Modell-Wein) kam es für die gekoppelte β -Glucosidase zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit k_{cat} auf 70,4 %. Der Verlust an Aktivität bei der immobilisierten β -Glucosidase ist wahrscheinlich größtenteils auf den niedrigeren pH-Wert von 3,5 zurückzuführen. Bei der freien β -Glucosidase war kein signifikanter Unterschied festzustellen.

4.5.2.1 Fazit

Generell sind die erhaltenen kinetischen Werte schwierig zu interpretieren bzw. zu vergleichen, da die Art und Weise der Berechnung einen großen Einfluss auf die Werte hat und bereits kleine Änderungen zu signifikant anderen Werten führen können. Allerdings konnten durch die ermittelten kinetischen Werte Tendenzen aufgezeigt werden. Fructose und Ethanol führten zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit. Allerdings ließen die Werte aus Kapitel 4.4 daraus schließen, dass es bei der gekoppelten β -Glucosidase zu einer stärkeren Steigerung der Aktivität kommt. Die kinetischen Untersuchungen konnten dies allerdings nicht bestätigen. Glucose führte nur bei der immobilisierten β -Glucosidase zu einer deutlichen Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit. Bei einer Eisen-Konzentration von 5 mg/l kam es zu keiner signifikanten Änderung der Werte. Dieser Eisengehalt hatte somit keine bis nur geringere Auswirkung auf die β -Glucosidase.

4.6 Langzeitstabilität der immobilisierten Glycosidasen

Die Stabilität der immobilisierten Enzyme wurde unter Bedingungen, die ihre zukünftige Anwendung im Wein simulieren sollten, untersucht (s. Kapitel 3.6). Dazu wurden die gekoppelten Enzyme in verschiedene Medien gegeben und in regelmäßigen Abständen die Aktivität bestimmt.

4.6.1 Stabilität der β -Glucosidase

Abb. 68 zeigt die Rest-Aktivität der β -Glucosidase in einem Citrat/Phosphat-Puffer bei pH 5,0, in einem Modell-Wein (pH 3,5) und direkt in Wein (Gewürztraminer, Jahrgang 2014) nach 100 Tagen. Dabei wurde im Citrat/Phosphat-Puffer kein Abfall der Aktivität nach 100 Tagen festgestellt, auch im Wein wurde lediglich ein kleiner Aktivitätsverlust registriert. Es kam lediglich zu einer leichten Abnahme von ca. 10 % nach 14 Tagen. Gueguen et al. (1996) konnten ähnliche Stabilitätswerte für eine immobilisierte β -Glucosidase (*C. molischiana* 35M5N, immobilisiert auf Ionenaustauschern) mit 100 % Rest-Aktivität nach 6 Monaten bei 4 °C beobachten [238].

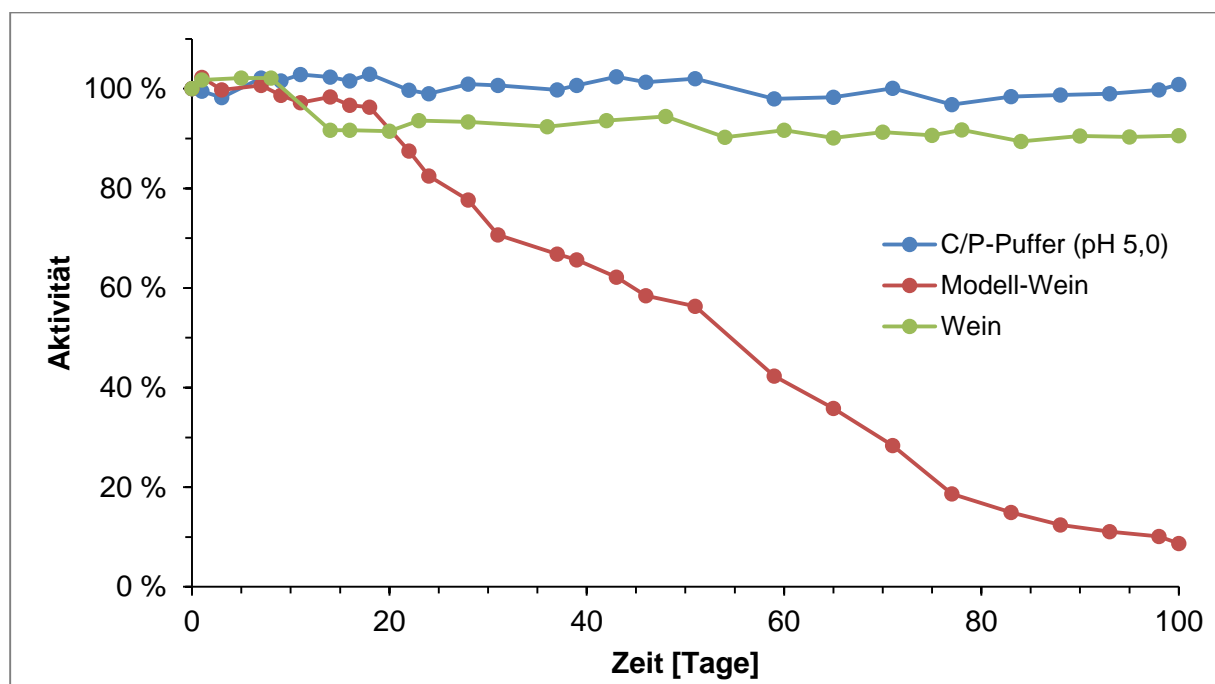


Abb. 68 Rest-Aktivität (%) der immobilisierten β -Glucosidase bei Lagerung im Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0), Modell-Wein und Wein (Gewürztraminer)

Allerdings kam es im Modell-Wein zu einem signifikanten Aktivitätsverlust von 92,3 % nach 100 Tagen. Der doch deutliche Verlust an Aktivität im Modell-Wein im Vergleich zur Stabilität der β -Glucosidase im Wein überrascht. Die relative hohe Menge an Weinsäure von 9 g/l im Modell-Wein könnte eine Erklärung für den signifikant höheren

Aktivitätsverlust im Vergleich zur Lagerung in „normalem“ Wein sein. Weinsäure scheint in dieser Konzentration einen negativen Effekt auf die immobilisierte β -Glucosidase zu haben.

4.6.2 Stabilität der anderen Glycosidasen

Neben der Stabilität der β -Glucosidase, wurde ebenfalls die Stabilität der anderen Glycosidasen untersucht. Abb. 69 zeigt die Rest-Aktivität der Glycosidasen Arabinosidase, Rhamnosidase und Xylosidase in Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0), Abb. 70 die Rest-Aktivität im Modell-Wein (pH 3,5) und Abb. 71 die Rest-Aktivität in Wein (Gewürztraminer, Jahrgang 2014) nach 70 Tagen.

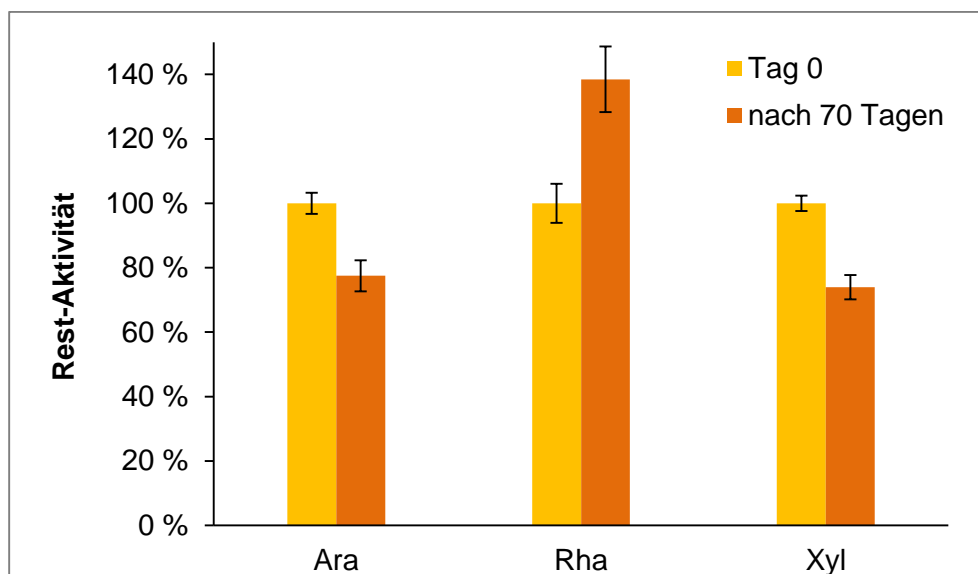


Abb. 69 Rest-Aktivität (%) der immobilisierten Glycosidasen nach 70 Tagen im Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0)

Im Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0) wies die immobilisierte Rhamnosidase nach 70 Tagen eine um 38,5 % höhere Aktivität auf. Arabinosidase und Xylosidase zeigten demgegenüber eine Abnahme von 22,5 % bzw. 26,1 % an Aktivität. Es wurde keine Freisetzung an Enzym aus dem Immobilisat beobachtet.

Auch die Stabilitätsuntersuchungen im Modell-Wein bzw. Wein (Gewürztraminer) ergaben eine analoge Tendenz.

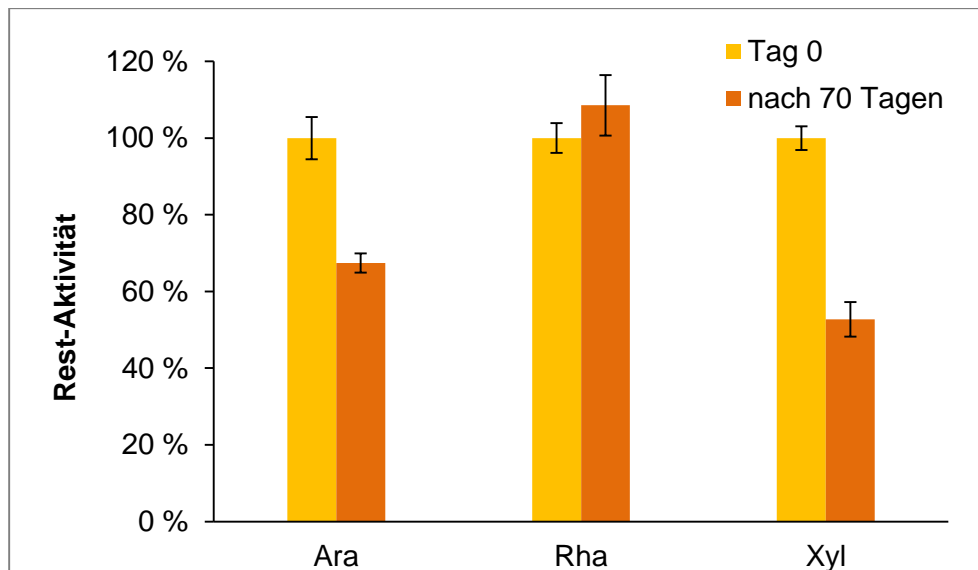


Abb. 70 Rest-Aktivität (%) der immobilisierten Glycosidasen nach 70 Tagen im Modell-Wein

Der Aktivitätsanstieg der immobilisierten Rhamnosidase im Modell-Wein war mit 8,6 % geringer und nicht signifikant im Vergleich zur Lagerung im Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0). Die Arabinosidase und Xylosidase zeigten mit 32,6 % und 47,7 % eine deutlich höhere Abnahme an Aktivität im Vergleich zur Lagerung im Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0).

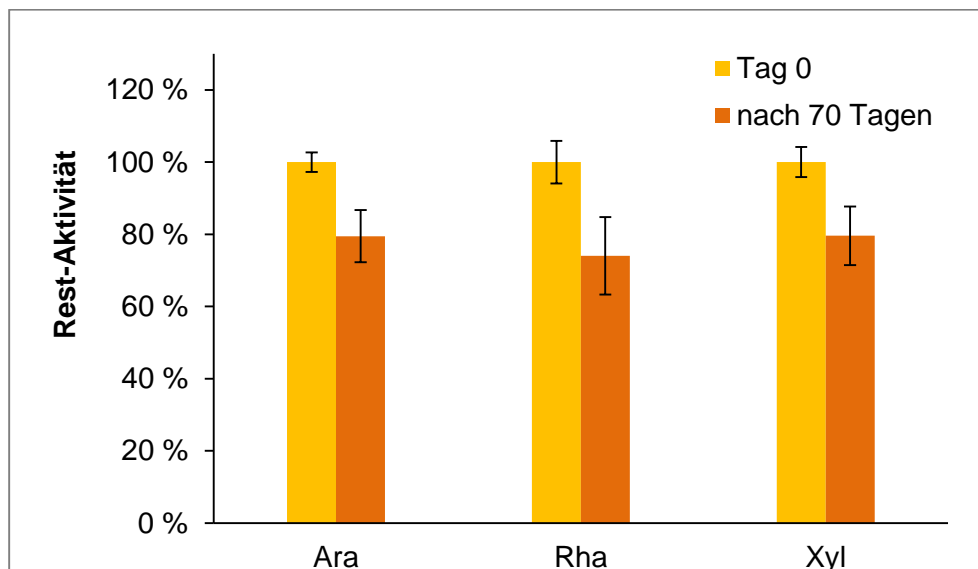


Abb. 71 Rest-Aktivität (%) der immobilisierten Glycosidasen nach 70 Tagen in Wein (Gewürztraminer)

Auch im Wein (Gewürztraminer) kam es zu einem leichten Verlust an Aktivität der Rhamnosidase von 26,0 % im Vergleich zur Ausgangsaktivität. Die Arabinosidase verlor 20,5 % und die Xylosidase 20,4 % Aktivität.

4.6.3 Fazit

Die Stabilität der einzelnen Glycosidasen war bei den untersuchten Bedingungen sehr unterschiedlich und hing natürlich mit den Eigenschaften, wie die isoelektrischen Punkte der entsprechenden Glycosidase, ab. Interessant war, dass die Rhamnosidase unter allen Bedingungen tendenziell an Aktivität gewann bzw. keine Aktivität verlor. Der Anstieg an Aktivität der Rhamnosidase im Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0) kann eventuell auf eine weitere Stabilisierung der Rhamnosidase in Folge der Lagerung im Citrat/Phosphat-Puffer und einer damit besseren Bindung des Substrats an das aktive Zentrum zurückzuführen sein. Allerdings muss beachtet werden, dass die Standardabweichung mit 10,2 % relativ hoch war. Die Arabinosidase und Xylosidase verloren, ähnlich wie die β -Glucosidase, im Modell-Wein stärker an Aktivität als im Wein. Somit scheint sich auch bei diesen Enzymen die erhöhte Konzentration an Weinsäure im Modell-Wein negativ auf die Aktivität auszuwirken. Die Migration von Eisen aus den Partikeln in den Modell-Wein könnte ebenfalls ein Grund für die geringere Rest-Aktivität sein (s. Kapitel 4.8.1).

Im Vergleich zu anderen Studien zeigten die hier immobilisierten Glycosidasen eine deutlich bessere Stabilität. Martino et al. (1996a) verwiesen auf eine Rest-Aktivität der immobilisierten β -Glucosidase in Wein (pH 3,2 und 25 °C) von 80 % nach 55 Tagen [22]. Bei Martino et al. (1996b) verloren die an Chitosan immobilisierten β -Glucosidasen bei pH 3,5 bereits nach 24 Stunden und bei pH 6,0 nach 80 Stunden 50 % Aktivität [237]. Spagna et al. (1996) ermittelten in Wein eine Stabilität von ca. 70 % nach 18 Tagen für eine Arabinosidase und eine Restaktivität von ca. 50 % für eine β -Glucosidase [24]. Für eine Rhamnosidase beobachteten Spagna et al. (2001) eine Abnahme an Aktivität in Wein (25 °C) von ca. 50 % nach 50 Tagen [26].

González-Pombo et al. (2014) untersuchten die Stabilität immobilisierter β -Glucosidasen, Arabinosidasen und Rhamnosidasen bei pH 3,5 und pH 4,0 (je 23 °C) über 70 Tagen [20]. Im Modell-Wein und bei pH 4,0 zeigten die β -Glucosidase und Arabinosidase keinen signifikanten Aktivitätsverlust. Die Rhamnosidase wies noch ca. 80 % Rest-Aktivität nach 70 Tagen auf. Spagna et al. (2002) beobachteten nach 50 Tagen eine Rest-Aktivität in Wein (25 °C) von 88 % für eine β -Glucosidase, 48,8 % für eine Arabinosidase und 43,5 % für eine Rhamnosidase [27].

Somit wiesen die in dieser Arbeit immobilisierten Glycosidasen eine höhere Aktivität bzw. Stabilität als vergleichbare Glycosidasen in anderen Studien auf. Pan et al. (2009) beobachtete wiederum eine ähnlich gute Stabilität von an magnetische Partikel

immobilisierten Enzymen [257]. Eine β -Galactosidase wurde mittels Glutaraldehyd an magnetische Fe_3O_4 -Chitosan-Nanopartikel immobilisiert und in einem Puffer bei pH 4,6 und Raumtemperatur gelagert, dabei wurde ein geringer Verlust von 12 % nach 60 Tagen registriert.

4.7 Glykosid-Gehalt in Wein

Um den Gehalt an gebundenen Komponenten im Wein zu bestimmen, wurde dieser indirekt über die freigesetzte Glucose mittels Glykosyl-Glucose-Assay bestimmt (s. Methode 3.7). Dies wurde anhand eines Gewürztraminers und eines Morio Muskats (beide Jahrgang 2014) untersucht. Dazu wurden in den Weinen die Bukettvorstufen- bzw. Glykosid-Gehalte vor und nach Enzymzusatz (immobilisierte Glycosidasen) gemessen und verglichen. Der größte Teil dieser Aromavorstufen werden durch traubeneigene und Hefe-Glucosidasen abgebaut. Vom Most bis zum Jungwein werden durchschnittlich über 50 % der Aromen-Vorstufen abgebaut. Die nach der Gärung bzw. dem fertigen Wein zugesetzten Enzympräparate führen i.d.R. zu einem zusätzlichen Abbau der Aromavorstufen von etwa 20 – 30 % [377].

Abb. 72 zeigt die Glykosid-Gehalte des Gewürztraminers und Morio Muskats vor und nach der Enzymbehandlung.

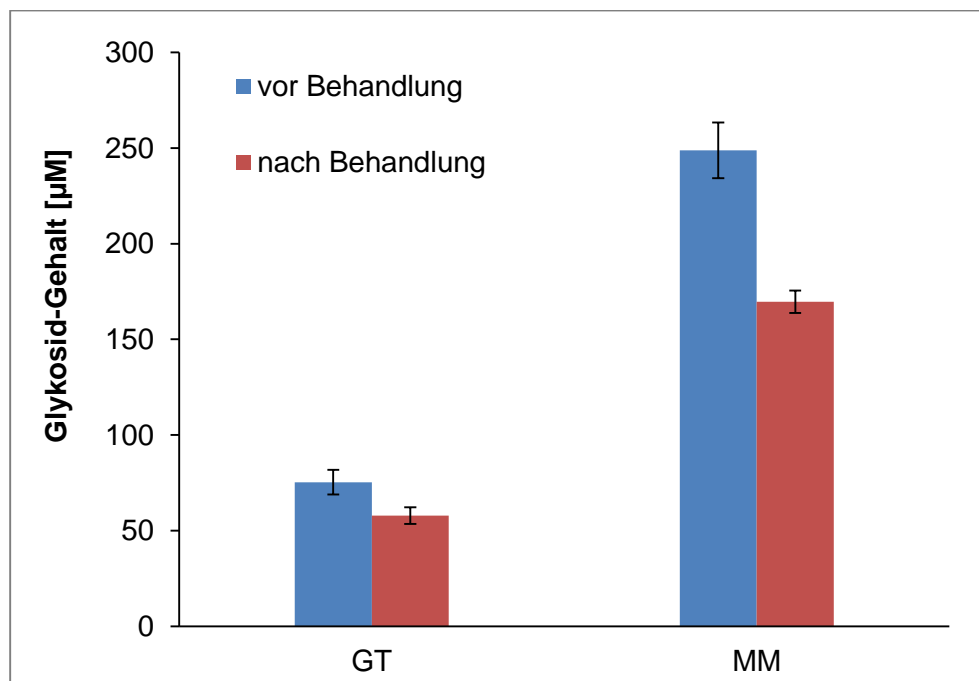


Abb. 72 Glykosid-Gehalt im Gewürztraminer (GT) und Morio Muskat (MM) vor und nach Enzymbehandlung

Für den Gewürztraminer wurde ein Gehalt an gebundenen Komponenten von 75,4 μM vor der Enzymbehandlung erfasst und der Morio Muskat hatte einen Glykosid-Gehalt von 248,8 μM . Wie erwartet, waren die Glykosid-Werte nach der Enzymbehandlung geringer. Der Gewürztraminer wies einen Glykosid-Gehalt von 57,9 μM und der Morio Muskat von 169,6 μM auf. Im Gewürztraminer konnte somit ein Abbau der Glykoside von 23,2 % und im Morio Muskat von 31,8 % verzeichnet werden. Damit lag die Reduktion des noch glykosidisch gebundenen Anteils durch einen Enzymeinsatz, wie erwartet, bei ca. 20 bis 30 %.

Als Aroma-Rebsorte mit einem hohen Anteil an gebundenen Aroma-Stoffen besaß der Morio Muskat einen deutlich höheren Glykosid-Anteil als der Gewürztraminer. Dementsprechend ist von einer höheren Aromafreisetzung beim Morio Muskat auszugehen.

Aus der eindeutigen Abnahme der Aromavorstufen und der damit verbundenen Zunahme an Terpenen in den enzymbehandelten Weinen lassen nachfolgende sensorische Untersuchungen auf eine ähnlich deutliche Differenzierung zwischen Kontrolle ohne Enzymzusatz und behandelten Weinen erwarten.

González-Pombo et al. (2011) beobachteten ebenfalls eine deutliche Reduktion der Glykoside in einem Muskateller-Wein [171]. Es wurde eine Reduktion von 130 μM auf 66 μM der Glykoside nach 16 Tagen festgestellt. In einem anderen Muskateller-Wein wurde eine Abnahme von 120 μM auf 80 μM nach 20 Tagen beobachtet [20].

4.8 Eisenmigration in Wein nach Magnetit-Partikel-Einsatz

Ziel dieser Untersuchungen war es eine mögliche Migration von Eisen aus den PVA-Magnetit-Partikeln zu erfassen, da erhöhte Eisengehalte in Wein zu Qualitätseinbußen führen können (s. Kapitel 2.1.7).

4.8.1 Eisenmigration in Wein

In Abb. 73 ist der Verlauf der Eisen-Konzentration in den unterschiedlichen Medien über 70 Tage dargestellt. Je länger die Magnetit-Partikel im entsprechenden Medium waren, desto höher stieg der Eisengehalt. Je nach Medium stiegen die Eisen-Konzentrationen stark an und es bildete sich teilweise ein weißlich-grauer Schleier (weißer Bruch), welcher typischerweise bei hohen Eisengehalten ab 5 bis 10 mg/l im Wein auftritt (s. Kapitel 2.1.7).

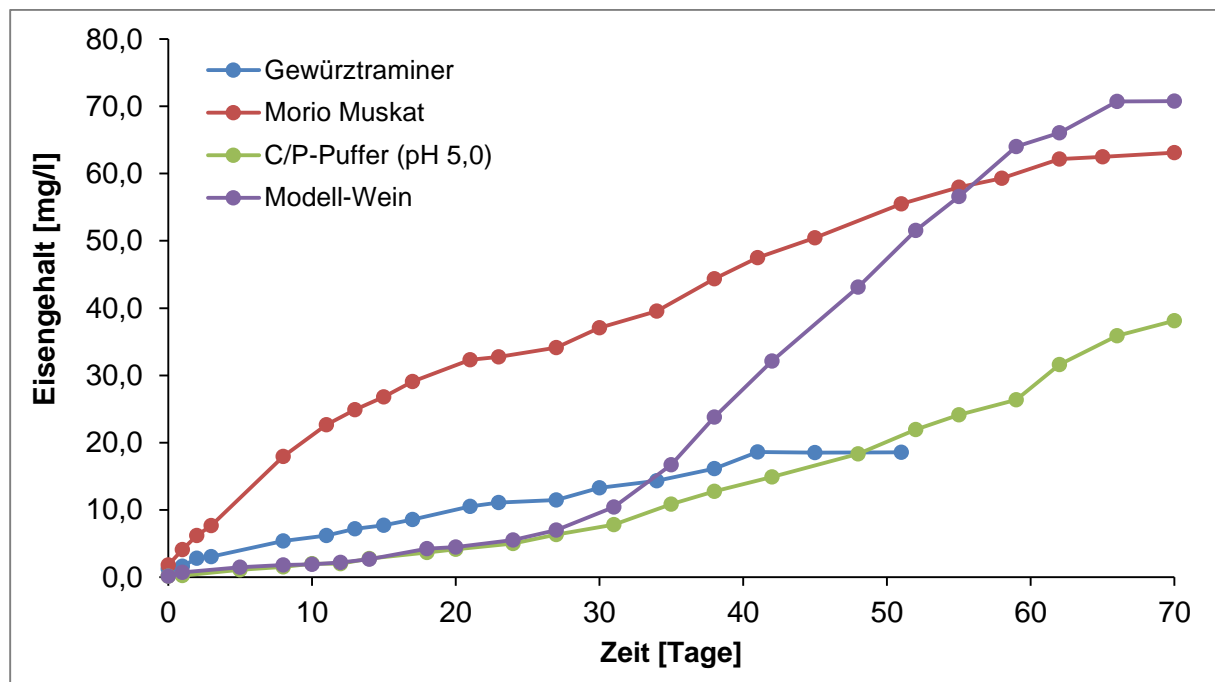


Abb. 73 Verlauf der Eisenmigration durch Magnetit-Partikel-Einsatz in verschiedenen Medien (Gewürztraminer, Morio Muskat, Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0) und Modell-Wein)

Im Morio Muskat stieg der Eisengehalt nach 70 Tagen auf 62,5 mg/l an, was eine erhebliche Steigerung von anfangs 1,9 mg/l Eisen entspricht. Im Gewürztraminer war die Steigerung zwar ebenfalls erheblich von 1,3 mg/l auf max. 18,7 mg/l, allerdings geringer als beim Morio Muskat. Die Migration des Eisens aus den Partikeln hängt somit stark von der Zusammensetzung des Weins ab. Eine mögliche Erklärung für die stärkere Migration im Morio Muskat könnte der geringere Ethanolgehalt von 69,5 g/l zu 104 g/l im Gewürztraminer sein. Da PVA nur schlecht in Ethanol löslich ist [378] und

somit eine höhere Ethanol-Konzentration eventuell die Löslichkeit der PVA-Matrix der Magnetit-Partikel durch Wasser reduziert [379], wodurch dann weniger Eisen aus den Partikel-Matrix gelöst werden kann. Zusätzlich spielen bei der Migration des Eisens noch andere Faktoren, wie Phenolgehalt, eine Rolle, weswegen eine Vorhersage über die Menge an migrierendem Eisen in den Wein nicht möglich ist. Interessant war, dass sich ab einem gewissen Punkt nicht mehr Eisen in den Wein löste. Der Gewürztraminer hatte nach ca. 40 Tagen eine maximale Eisen-Konzentration von ca. 20 mg/l erreicht, welche anschließend konstant blieb. Wie bereits in Kapitel 2.1.7 beschrieben, kann es bei erhöhten Eisenmigrationen zu einer sogenannten Schleier-Bildung im Wein kommen. Dabei oxidiert das gelöste Fe^{2+} zu Fe^{3+} und es bildet sich ein weißlich-schleieriger Eisen-III-Phosphat-Bruch, welcher als Trübung im Wein zu erkennen war (s. Abb. 74).

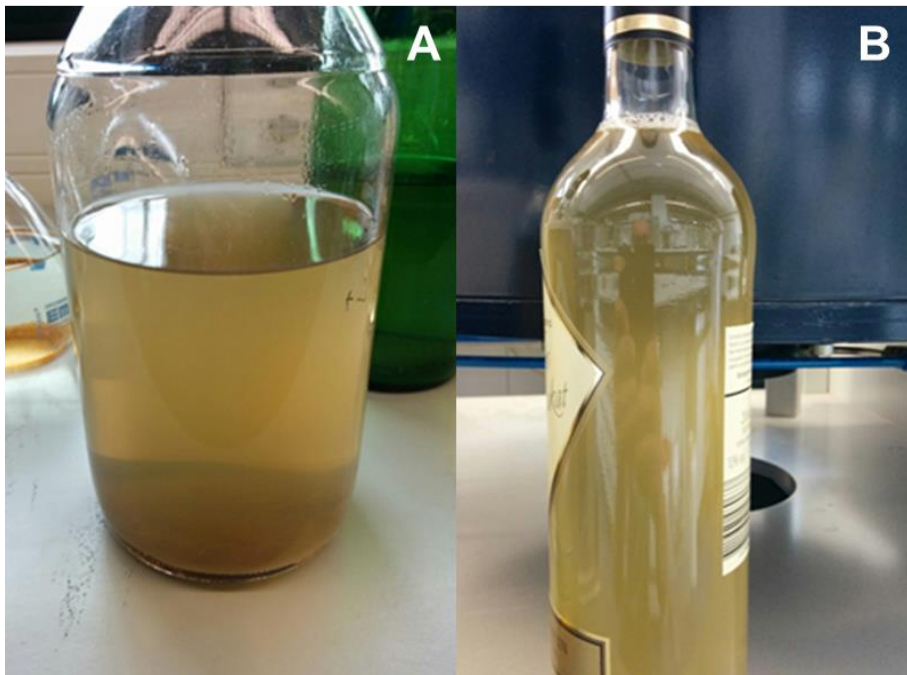


Abb. 74 Schleier-Bildung und Trübung im Wein nach Magnetit-Partikel-Einsatz, A: Gewürztraminer, B: Morio Muskat;

Im Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0) und im Modell-Wein (pH 3,5) stiegen die Eisengehalte anfangs geringer an als im Wein, was ebenfalls darauf schließen lässt, dass andere Faktoren, wie Säure, Phenole und Zucker, einen erheblichen Einfluss auf die Eisenmigration haben. Nach 27 Tagen stieg der Eisengehalt im Modell-Wein allerdings deutlich schneller an, von 6,3 mg/l auf 16,6 mg/l nach 35 Tagen und auf eine max. Konzentration von 70,8 mg/l nach 70 Tagen. Somit hatte sich Eisen bzw. Eisen-

Ionen nahezu vollständig aus der PVA-Matrix gelöst, was auch optisch zu erkennen war, da ein Bodensatz aus den weißlichen PVA-Hüllen sichtbar wurde (s. Abb. 75).

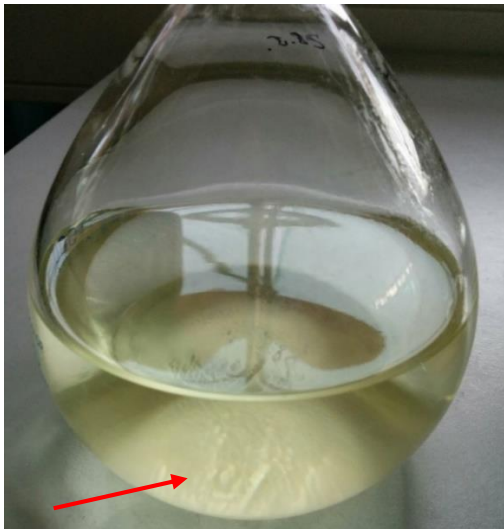


Abb. 75 Bodensatz im Modell-Wein nach Magnetit-Partikel-Einsatz

Wenn man die Werte der Eisenbestimmung und der Lagerstabilität der gekoppelten Enzyme im Wein verknüpft, fällt auf, dass die Eisengehalte zwar steigen, also Eisen aus den Magnetit-Partikel gelöst wurde, die Enzymaktivität aber anfangs nahezu konstant blieb und ebenfalls keine erhöhten Werte an ungebundenem Enzym im Wein festzustellen waren. D.h. dass die Partikel trotz Herauslösens des Eisens weiter in Grenzen stabil blieben. Wird allerdings deutlich mehr Eisen aus den Partikeln gelöst, vermindert dies auch deutlich die Aktivität, was den erheblichen Verlust an β -Glucosidase-Aktivität im Modell-Wein erklärt, die anderen Glycosidasen aber im geringeren Maße betraf. Die M-PVA C22 Magnetit-Partikel bestehen aus einer PVA-Matrix in der kristallin superparamagnetischer Magnetit gebunden ist. Teilweise scheint sich dieses Eisen daraus zu lösen, was allerdings, in Grenzen, nicht die Stabilität der PVA-Matrix bzw. die Kopplung der Enzyme auf der PVA-Matrix beeinträchtigt.

In den größeren Ansätzen für die nachfolgenden Sensorik-Proben des Morio Muskats und des Gewürztraminers migrierten nach 24 Tagen Enzymbehandlung 10,0 mg/l ($\pm 0,12$) Eisen in den Gewürztraminer und 32,6 mg/l ($\pm 0,42$) in den Morio Muskat, was die Werte aus der Langzeit-Lagerung auch erwarten ließen (s. Abb. 73).

4.8.2 Eisenmigration in Abhängigkeit der Weinsäure-Konzentration

Wie bereits angedeutet, wird vermutet, dass die Gesamtsäure eines Weins Einfluss auf die Eisenmigration nehmen kann. Eine weitere Untersuchung der Magnetit-Partikel

sollte daher den Einfluss unterschiedlicher Weinsäure-Konzentrationen auf die Eisenmigrationen zeigen (s. Abb. 76). Dazu wurden die Magnetit-Partikel bei unterschiedlichen Weinsäure-Konzentrationen in eine 10 Vol.-% Ethanol-Lösung geben (s. Kapitel 3.9.2) und der Eisengehalt entsprechend der Methode 3.10 über 70 Tage untersucht.

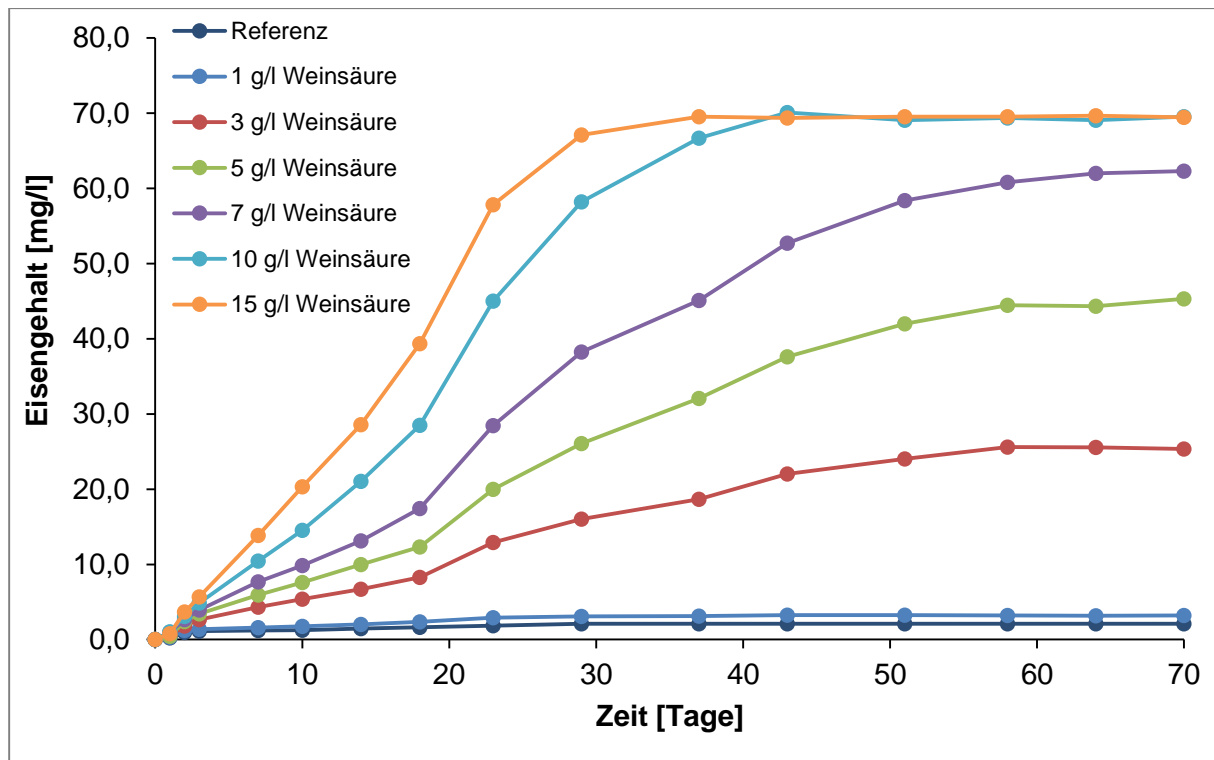


Abb. 76 Verlauf der Eisenmigration durch Magnetit-Partikel-Einsatz bei verschiedenen Weinsäure-Konzentrationen

Es zeigte sich eindeutig, dass mit steigender Weinsäure-Konzentration die Migration an Eisen aus den Partikeln in die Lösungen deutlich zunimmt. Der Gehalt und der damit verbundene niedrigere pH haben einen signifikanten Effekt auf die Eisenmigration. Bei der Referenz-Probe ohne Zusatz an Weinsäure stieg der Eisengehalt nach 29 Tagen auf 2,1 mg/l und blieb konstant. Bei 1 g/l Weinsäure erreichte die Eisen-Konzentration nach 43 Tagen mit 3,2 mg/l ihr Maximum. Bei 3 g/l Weinsäure stieg der Gehalt nach 58 Tagen auf 25,6 mg/l und blieb konstant. Bei 5 g/l Weinsäure wurde das Maximum nach 58 Tagen mit 44,5 mg/l erreicht und bei 7 g/l Weinsäure nach 64 Tagen mit 62,0 mg/l. Die beiden Weinsäure-Konzentrationen von 10 und 15 g/l wiesen jeweils eine maximale Konzentration von ca. 70 mg/l auf, bei 10 g/l Weinsäure wurde dieser Wert (70,1 mg/l) nach 43 Tagen und bei 15 g/l Weinsäure nach 37 Tagen (69,5 mg/l) erreicht.

4.8.3 Fazit

Es muss festgehalten werden, dass teilweise erhebliche Mengen Eisen aus den M-PVA C22 Magnetit-Partikeln gelöst wurden und die Eisen-Konzentration im Wein auf teilweise über 50 mg/l steigen ließ. Da Wein in aller Regel nicht mehr als 5 mg/l Eisen enthält, stellte dies eine erhebliche Steigerung dar, was einerseits zu organoleptischen Veränderungen im Wein führen und andererseits die Neigung zur Oxidation des Weins erhöhen kann. Die erhöhte Oxidation kann nachfolgend zu einem weiß-grauen oder schwarzen Bruch führen (s. Abb. 74). Die hier verwendeten Magnetit-Partikel (M-PVA C22) sind für einen Einsatz in Wein nur bedingt geeignet, da bereits kurze Kontaktzeiten zu einer erheblichen Steigerung an Eisen im Wein führen. Die erhöhten Eisengehalte führen dann zu den beschriebenen Qualitätseinbußen, wie Bildungen eines weiß-grauen Schleiers und einer erhöhten Oxidation im Wein. Dies ist insbesondere bei Weinen mit einer Gesamtsäure von >1 g/l zu berücksichtigen. Demzufolge sind die in dieser Arbeit verwendeten Partikel nicht für einen Einsatz im Wein geeignet, da mögliche Qualitätseinbußen durch eine Eisenmigration die Vorteile einer Aromaverbesserung wieder kompensieren und besonders eine Schleier-Bildung den Wein unverkäuflich machen würde. Daher sollten für einen weiteren Einsatz von magnetischen Partikeln im Wein, Partikel gewählt werden, die deutlich resistenter gegenüber einer Migration von Eisen aus den Partikeln sind. Da das Magnetit in den Partikeln lediglich in einer Matrix aus Polyvinylalkohol eingebettet war (s. Kapitel 3.5.2), kann so das entsprechende umgebende Medium, wie z.B. Wein, teilweise mit dem Magnetit in Kontakt kommen und so Eisen-Ionen daraus lösen. Daher wäre die Verwendung von Magnetit-Partikeln mit einer inerten Hülle, z.B. aus Siliziumdioxid, für einen Einsatz in Wein besser geeignet, um so eine Migration von Eisen zu verhindern bzw. zumindest deutlich zu reduzieren. Dabei könnten besonders magnetische Siliziumdioxid-Mikro- oder Nano-Partikel gute alternative Träger darstellen. Die Bildung von funktionalisierten Siliziumdioxid-Beschichtungen auf der Oberfläche der magnetischen Partikel kann deren Aggregation in Flüssigkeiten verhindern und zu einer verbesserten chemischen Stabilität sowie Biokompatibilität führen. Die hydrophile Oberfläche des Siliziumdioxid-Partikel kann ebenfalls die Bindung von Enzymen in wässrigen Lösungen erleichtern [231, 380].

4.9 Magnet-Separation der Magnetit-Partikel

Um den Einfluss der Separation und der dabei wirkenden Scherkräfte auf die Partikel abschätzen zu können, wurden ein und dieselben Magnetit-Partikel mehrmals mit einem Hochgradient-Magnet-Separator (HGMS, s. Kapitel 3.15) vom Wein (Weißwein-Verschnitt) separiert und nach jeder Separation die Enzymaktivität der Magnetit-Partikel gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 77 dargestellt.

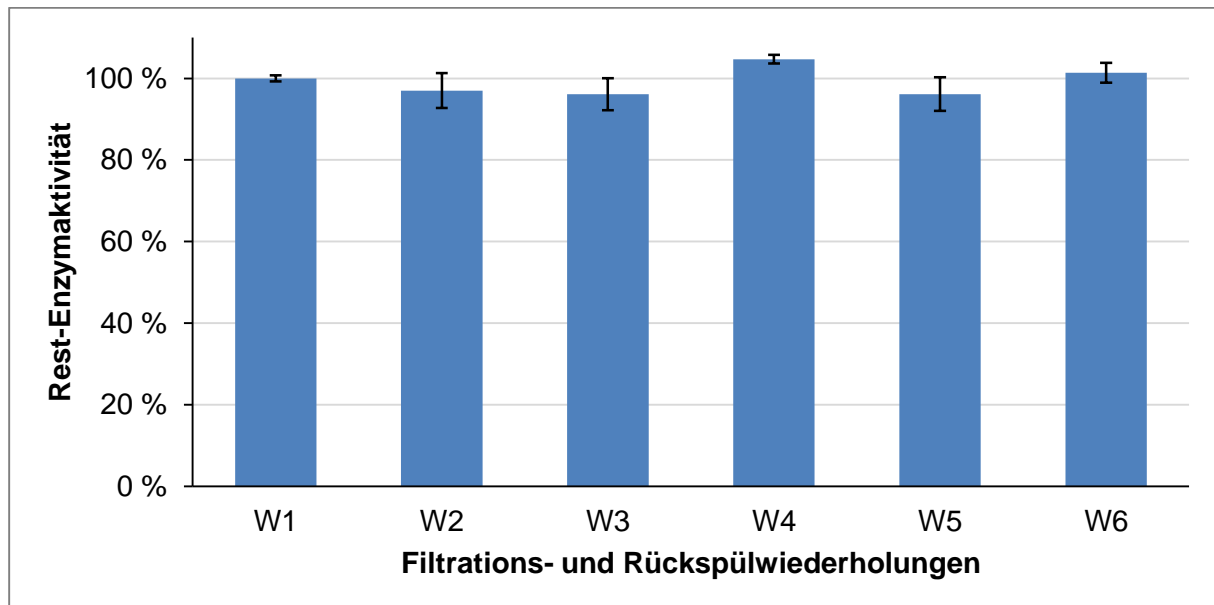


Abb. 77 Rest-Aktivität (%) der immobilisierten β -Glucosidase nach 6 Separationen aus Wein ($c_{\text{Partikel}} = 0,15 \text{ g/l}$) mittels Hochgradient-Magnet-Separator (HGMS, s. Kapitel 3.15)

Bei den Filtrations- und Rückspülwiederholungen war zu erkennen, dass es durch die Separation bzw. Filtration mit dem HGMS und die damit verbundenen Scherkräften, zu keinem signifikanten Aktivitätsverlust der gekoppelten β -Glucosidase kam. Nach 5 Filtrationen war die Aktivität der an Magnetit-Partikel gekoppelten β -Glucosidase immer noch bei nahezu 100 %. Pan et al. (2009) beobachteten eine ähnlich gute Wiederverwendbarkeit, nach 15 Zyklen wurde noch eine Rest-Aktivität von 92 % für eine an magnetische Chitosan-Partikel gekoppelte β -Galactosidase beobachtet [257]. Somit hatte die Separation keinen Einfluss auf die Aktivität der gekoppelten β -Glucosidase.

Die erhaltene Separationseffizienz lag bei 99,57 % ($\pm 0,098$), es konnten nahezu 100 % der eingesetzten Magnetit-Partikel wieder rückgewonnen werden.

Daher ist von keiner negativen Beeinflussung der Partikel durch eine Magnet-Separation auszugehen und die immobilisierten Enzyme können weit mehr als sechsmal wiederverwendet werden ohne einen Aktivitätsverlust erwarten zu müssen.

Außerdem konnten nahezu 100 % der zugesetzten Partikel aus dem Wein zurückgewonnen werden. Durch eine weitere, in der Weinherstellung übliche, Filtration kurz vor der Abfüllung sollten etwaige nicht zurückgehaltene Partikel restlos aus dem Wein entfernt werden, sodass der Wein dann den gesetzlichen Anforderungen entspricht.

4.10 Zucker, organische Säuren und Alkohol im Wein

Die Untersuchungen der Zucker, organischen Säuren und Alkohole im Wein sollten mögliche Unterschiede nach einer Behandlung der Weine mit Enzym-Magnetit-Partikeln aufzeigen. Die weinanalytischen Ergebnisse in Tab. 26 zeigen, dass es aufgrund des Enzymzusatzes innerhalb der untersuchten Weinhaltstoffe zu keinen signifikanten Veränderungen an Weinsäure, Äpfelsäure, Fructose, Glucose, Glycerin und Ethanol kam.

Tab. 26 Konzentrationen an Weinsäure, Äpfelsäure, Glucose, Fructose, Glycerin und Ethanol vor und nach Enzyminsatz im Gewürztraminer und Morio Muskat

Analyt	Gewürztraminer unbehandelt [g/l]	Gewürztraminer behandelt [g/l]	Morio Muskat unbehandelt [g/l]	Morio Muskat behandelt [g/l]
Weinsäure	3,0 ± 0,02	3,0 ± 0,03	2,8 ± 0,05	2,8 ± 0,04
Äpfelsäure	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,07	4,4 ± 0,24	4,4 ± 0,09
Glucose	0,5 ± 0,01	0,6 ± 0,05	15,1 ± 0,08	15,2 ± 0,14
Fructose	0,7 ± 0,02	0,7 ± 0,04	17,2 ± 0,22	17,1 ± 0,17
Glycerin	6,7 ± 0,16	6,7 ± 0,07	5,2 ± 0,08	5,15 ± 0,12
Ethanol	104,0 ± 0,9	104,1 ± 0,6	69,5 ± 1,2	70,4 ± 0,8

Beim Gewürztraminer (Jahrgang 2014) handelte es sich um einen trockenen und beim Morio Muskat (Jahrgang 2014) um einen lieblichen Weißwein. Außerdem enthielt der Morio Muskat einen höheren Anteil an Äpfelsäure, was eventuell ein Grund dafür sein könnte, dass die Eisenmigration aus den Magnetit-Partikeln in den Morio Muskat im Vergleich zum Gewürztraminer größer war.

4.11 Phenolische Inhaltsstoffe

Phenolische Inhaltsstoffe zählen zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und sind bei der Beurteilung der Qualität von Wein ein wichtiges Kriterium, da diese an der oxidativen Bräunung von Weinen, insbesondere bei Weißweinen, beteiligt sind [107] und somit die sensorischen Eigenschaften beeinflussen [108]. Gerade unter dem Gesichtspunkt einer möglichen Eisenmigration durch die Magnetit-Partikel in den Wein kann die Betrachtung der phenolischen Inhaltsstoffe wichtige Erkenntnisse liefern.

4.11.1 Gesamtphenolgehalte

Zur Untersuchung der Auswirkung einer Eisenmigration in den Wein wurden die Gesamtphenolgehalte in den Weinproben (Gewürztraminer und Morio Muskat) nach der Folin-Ciocalteu-Methode bestimmt und als Gallussäure-Äquivalente (GAE) berechnet (s. Kapitel 3.11). In Tab. 27 sind die Gesamtphenolgehalte der Versuche mit Gewürztraminer und Morio Muskat aufgeführt.

Tab. 27 Gesamtphenolgehalte (berechnet als Gallussäure-Äquivalente) der Weinproben vor und nach Enzymeinsatz (n=2)

	Gesamtphenol [mg GAE/l]
Gewürztraminer	
Kontrollprobe	223,5 ± 2,27
freie Glycosidasen	196,6 ± 0,90
immo. Glycosidasen	124,7 ± 2,67
Morio Muskat	
Kontrollprobe	285,4 ± 4,17
freie Glycosidasen	216,2 ± 4,13
immo. Glycosidasen	193,1 ± 2,37

Sowohl beim Gewürztraminer, als auch beim Morio Muskat konnte ein signifikant geringerer Gesamtphenolgehalt im Vergleich zur Kontrolle bei allen Proben festgestellt werden. Bei beiden mit Magnetit-Partikeln behandelten Weinen war ein deutlicher Verlust des Gesamtphenolgehalts festzustellen. Beim Gewürztraminer wies die Kontrollprobe einen Gehalt von 223,5 mg GAE/l auf, die mit Magnetit-Partikeln behandelte Probe hingegen lediglich einen Gehalt von 124,7 mg GAE/l, einen um ca. 100 mg GAE/l geringeren Gesamtphenolgehalt. Der unbehandelte Morio Muskat hatte einen Gesamtphenolgehalt von 285,4 mg GAE/l, nach der Behandlung mit den Magnetit-Partikeln lag der Wert ebenfalls um fast 100 mg GAE/l niedriger bei

193,1 mg GAE/l. Daraus ist zu schließen, dass es durch die erhöhte Eisenmigration zum oxidativen Abbau der phenolischen Komponenten im Wein kam, da Eisen zu erhöhter Oxidation führt [127].

Aber auch bei den mit freien Enzymen behandelten Weinen konnte ein signifikant geringerer Gesamtphenolgehalt im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Allerdings war der Verlust geringer als bei den mit immobilisierten Enzymen behandelten Weinen. Beim Gewürztraminer sank der Gesamtphenolgehalt auf 196,6 mg GAE/l und beim Morio Muskat auf 216,2 mg GAE/l. Der geringere Gesamtphenolgehalt bei den mit freien Enzymen behandelten Weinen kann eventuell mit dem Eintrag an Luft bzw. Sauerstoff durch die Enzymzugabe erklärt werden, wodurch eine Oxidation der enthaltenen Phenole begünstigt wird.

Ohne Phenole und/oder Metalle, wie Eisen, wird kein Sauerstoff im Wein gebunden. In den weißweintypischen Konzentrationsverhältnissen konkurrieren Phenole und Eisen um den Sauerstoff, welcher bevorzugt mit Eisen reagiert, da eine Reaktion mit den Phenolen langsamer abläuft. Im Weißwein reagieren 10 bis 30 % des Sauerstoffes üblicherweise mit Phenolen. Phenole können spontan oxidieren, allerdings wird durch die Anwesenheit metallischer Katalysatoren diese Oxidation erheblich erleichtert. Somit aktiviert Eisen diese Reaktion bzw. Oxidation [381]. Diese Erkenntnisse sind eine mögliche Erklärung für den verminderten Gesamtphenolgehalt der mit Magnetit-Partikeln behandelten Weine.

Ein weiteres Oxidationsproblem ist die Bildung von Aldehyden, welche zu einer sensorischen Beeinträchtigung führen können [382]. Zum Beispiel konnte Simpson (1978) in Riesling die Bildung einer Reihe von Substanzen infolge einer oxidativer Alterung nachweisen, die bei Alterung unter Luftabschluss nicht entstehen [383]. Zu solchen geruchlich aktiven Verbindungen zählten u.a. höhere Aldehyde einschließlich Benzaldehyd und Furfurale. Ferreira et al. (1997) sowie Silva Ferreira et al. (2002 und 2003) identifizierten Methional und Phenylacetaldehyd als mögliche Schlüsselkomponenten für den Charakter oxidativ verdorbener Weißweine [384–387]. Der durch Klärung der Weine aufgenommene Sauerstoff reagiert zunächst mit den Metall-Ionen und Phenolen und diese können den Sauerstoff wiederum auf andere Weininhaltsstoffe übertragen [127, 388]. Somit wird durch die bevorzugte Reaktion des Sauerstoffes mit Metallen und Phenolen ein bislang unbekannter Anteil des Sauerstoffes in Form von Peroxiden in das Oxidationsgeschehen eingebracht. Folgende Reaktionskette durchläuft der Sauerstoff in diesem Fall:

Sauerstoff → Superoxidradikal → Wasserstoffperoxid → Hydroxylradikal → Wasser

Dabei sind alle Intermediärprodukte stärkere Oxidanten als der ursprüngliche Sauerstoff. Im Wein konnten von diesen Intermediärprodukten bisher Peroxide direkt nachgewiesen werden [381, 388, 389].

4.11.2 Einzelphenolgehalte

Zur detaillierten Untersuchung bzw. Beurteilung der Auswirkung der Eisenmigration bzw. Enzymbehandlung auf phenolische Verbindungen im Wein wurden die Weinproben hinsichtlich einzelner Phenole mittels HPLC untersucht (s. Methode 3.12). Aufgrund der Vielzahl an Phenolen und der damit verbundenen komplizierten Analytik, war lediglich die Betrachtung einiger Phenole möglich. Daher sind die Ergebnisse als Screening anzusehen.

In Tab. 28 und Tab. 29 sind die Ergebnisse der erhaltenen Einzelphenole festgehalten. Zusätzlich wurden die Ergebnisse in Abb. 78 und Abb. 79 dargestellt.

Tab. 28 Einzelphenolgehalte (mg/l) im Gewürztraminer (Jahrgang 2014) vor und nach Enzymeinsatz (n=2; p=0,05)

Einzelphenole	Kontroll- Wein [mg/l]	Wein mit freien Glycosidasen		Wein mit immo. Glycosidasen	
		[mg/l]	Signifikanz (p-Wert)	[mg/l]	Signifikanz (p-Wert)
Gallussäure (GS)	1,0 ± 0,01	0,9 ± 0,02	n.s.	0,9 ± 0,01	n.s.
Protocatechusäure (PS)	1,2 ± 0,05	1,1 ± 0,1	n.s.	1,2 ± 0,01	n.s.
Tyrosol (T)	8,8 ± 0,12	9,1 ± 0,21	n.s.	9,0 ± 0,11	n.s.
Vanillinsäure (VS)	2,7 ± 0,04	2,7 ± 0,12	n.s.	2,7 ± 0,05	n.s.
Catechin (CH)	1,1 ± 0,01	1,0 ± 0,02	n.s.	0,5 ± 0,15	<0,001
Kaffeesäure (KS)	1,5 ± 0,01	3,0 ± 0,19	<0,001	2,3 ± 0,14	<0,005
Epicatechin (EC)	1,7 ± 0,07	1,7 ± 0,04	n.s.	1,7 ± 0,10	n.s.
p-Coumarsäure (CS)	1,0 ± 0,01	2,1 ± 0,21	<0,001	1,9 ± 0,13	<0,001
Ferulasäure (FS)	0,7 ± 0,01	0,8 ± 0,01	n.s.	0,7 ± 0,01	n.s.
Resveratrol (R)	0,4 ± 0,01	1,3 ± 0,11	<0,001	0,9 ± 0,05	<0,001

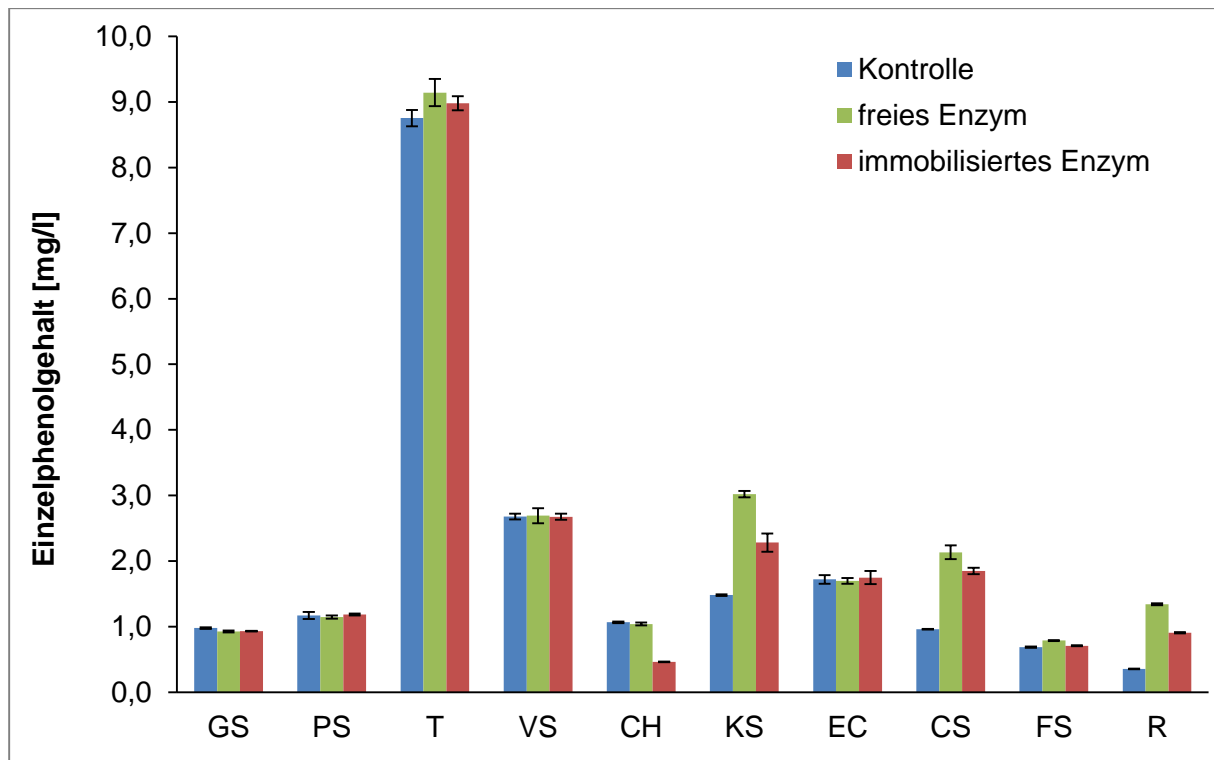


Abb. 78 Einzelphenolgehalte (mg/l) im Gewürztraminer (Jahrgang 2014) vor und nach Enzymeinsatz (n=2; p=0,05)

Tab. 29 Einzelphenolgehalte (mg/l) im Morio Muskat (Jahrgang 2014) vor und nach Enzymeinsatz (n=2; p=0,05)

Einzelphenole	Kontroll-Wein [mg/l]	Wein mit freien Glycosidasen		Wein mit immo. Glycosidasen	
		[mg/l]	Signifikanz (p-Wert)	[mg/l]	Signifikanz (p-Wert)
Gallussäure (GS)	1,7 ± 0,01	1,7 ± 0,01	n.s.	1,6 ± 0,05	n.s.
Protocatechusäure (PS)	1,1 ± 0,02	1,1 ± 0,03	n.s.	1,1 ± 0,02	n.s.
Tyrosol (T)	21,6 ± 0,94	21,6 ± 1,03	n.s.	21,7 ± 0,13	n.s.
Vanillinsäure (VS)	3,9 ± 0,10	3,8 ± 0,05	n.s.	3,0 ± 0,21	<0,001
Catechin (CH)	1,5 ± 0,08	1,5 ± 0,05	n.s.	1,1 ± 0,11	<0,05
Kaffeesäure (KS)	0,8 ± 0,01	4,0 ± 0,24	<0,001	2,6 ± 0,17	<0,001
Epicatechin (EC)	1,8 ± 0,05	1,7 ± 0,05	n.s.	0,8 ± 0,14	<0,001
p-Coumarsäure (CS)	0,9 ± 0,05	4,0 ± 0,15	<0,001	2,6 ± 0,11	<0,001
Ferulasäure (FS)	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01	n.s.	0,2 ± 0,01	n.s.
Resveratrol (R)	0,2 ± 0,02	1,6 ± 0,13	<0,001	0,9 ± 0,10	<0,001

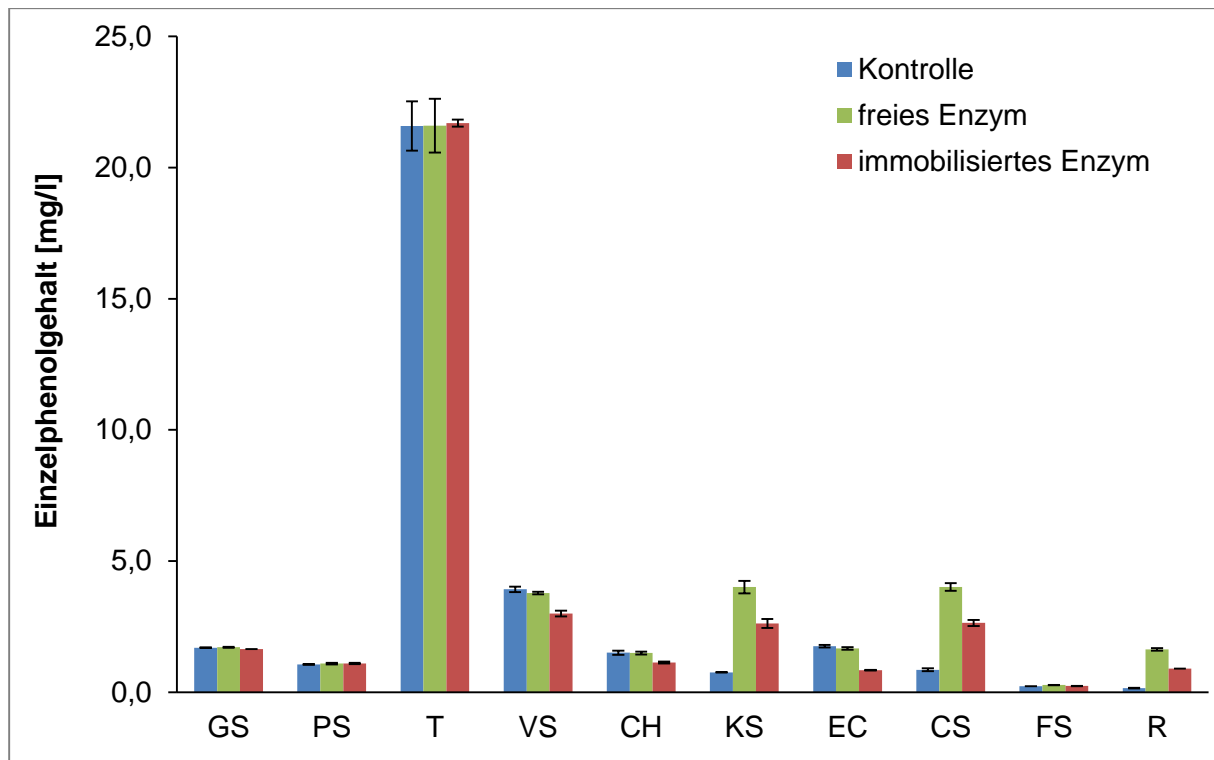


Abb. 79 Einzelphenolgehalte (mg/l) im Morio Muskat (Jahrgang 2014) vor und nach Enzymeinsatz (n=2; p=0,05)

Tyrosol kam mit 8,8 bis 21,6 mg/l in den höchsten Konzentrationen vor. Allerdings gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und mit Enzym behandelten Weinproben. Im Gewürztraminer wurde ein Gehalt von ca. 9 mg/l gefunden und im Morio Muskat von ca. 22 mg/l. **Gallussäure** wurde im Gewürztraminer mit einem Gehalt von 1,0 mg/l und im Morio Muskat von 1,7 mg/l ermittelt. Die Konzentrationen in den mit Magnetit-Partikeln behandelten Weinen waren etwas niedriger, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

Die **Vanillinsäure** wurde im Gewürztraminer mit 2,7 mg/l detektiert. Es konnte kein Unterschied zwischen behandelter und unbehaltener Probe festgestellt werden. Der unbehaltene Morio Muskat wies eine Konzentration von 3,9 mg/l Vanillinsäure auf. Es wurde kein Unterschied zur mit dem freien Enzym behandelten Probe festgestellt, allerdings war der Gehalt in den mit Magnetit-Partikeln behandelten Morio Muskat mit 3,0 mg/l signifikant niedriger.

Catechin wurde mit 1,1 mg/l in der Kontrollprobe des Gewürztraminers und 1,5 mg/l in der des Morio Muskats bestimmt. Die mit dem freien Enzym behandelten Weinproben wiesen keinen Unterschied in den Konzentrationen auf, wohingegen die mit Magnetit-Partikeln behandelten Weine signifikant niedrigere Werte besaßen. Im Gewürztraminer wurde nach der Behandlung mit den an Magnetit-Partikel gekoppelten Enzymen eine Konzentration von 0,5 mg/l und im Morio Muskat von 1,1 mg/l detektiert.

Die **Kaffeensäure**-Konzentrationen zeigten ein konträreres Bild. In den enzymbehandelten Proben stieg der Gehalt an Kaffeensäure signifikant an. Die Kontrollprobe beim Gewürztraminer wies einen Gehalt von 1,5 mg/l auf, die mit dem freien Enzym behandelte Probe zeigte einen Anstieg an Kaffeensäure auf 3,0 mg/l und durch das konjugierte Enzym stieg der Gehalt auf 2,3 mg/l. Beim Morio Muskat wurde ebenfalls eine deutliche Steigerung festgestellt, durch das freie Enzym stieg der Gehalt von 0,8 mg/l auf 4,0 mg/l und durch das gekoppelte Enzym auf 2,6 mg/l. Die Steigerung an Kaffeensäure im Morio Muskat war dementsprechend größer als im Gewürztraminer, was mit dem höheren Anteil an glykosidisch gebundenen Komponenten zu erklären ist (s. Kapitel 4.7).

Die Konzentrationen an **Epicatechin** unterschieden sich beim Gewürztraminer nicht signifikant voneinander, der Gehalt lag bei 1,7 mg/l. Beim Magnetit-Partikel behandelten Morio Muskat wurde hingegen mit 0,8 mg/l zu 1,8 mg/l signifikant niedrigere Wert detektiert.

Die **Coumarsäure** in den Weinproben konnte ebenfalls durch einen Enzymeinsatz gesteigert werden, beim Gewürztraminer von 1,0 mg/l auf 2,1 mg/l durch das freie Enzym und auf 1,9 mg/l durch das gekoppelte Enzym. Im Morio Muskat stiegen die Gehalte von 0,9 mg/l auf 4,0 mg/l und 2,6 mg/l.

Für die **Ferulasäure** wurde bei allen Weinproben kein signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe festgestellt.

Für **Resveratrol** konnten wiederum für alle mit Enzym behandelten Weine eine signifikante Steigerung festgestellt werden. Im Gewürztraminer stieg der Gehalt an Resveratrol von 0,4 mg/l auf 1,3 mg/l durch die freien Glycosidasen und auf 0,9 mg/l durch das gekoppelte Enzym. Im Morio Muskat stieg der Gehalt an Ferulasäure von 0,2 mg/l auf 1,6 mg/l, respektive 0,9 mg/l.

Die Einzelphenol-Werte der behandelten Weine für die vorgesehene sensorische Verkostung lagen in einem ähnlichem Bereich (s. Tab. 30 und Tab. 31), allerdings war die Steigerung an Kaffeensäure, p-Coumarsäure und Resveratrol etwas geringer, was der Tatsache geschuldet sein dürfte, dass die Weine nicht bei 25 °C, sondern bei Raumtemperatur inkubiert wurden und somit die Aktivität der Glycosidasen etwas vermindert war.

Tab. 30 Einzelphenolgehalte im Gewürztraminer vor und nach Enzymeinsatz (n=2; p=0,05)

Einzelphenole	Wein mit immo.		Signifikanz (p-Wert)
	Kontroll-Wein [mg/l]	Glycosidasen [mg/l]	
Gallussäure (GS)	1,0 ± 0,01	0,9 ± 0,02	n.s.
Protocatechusäure (PS)	1,2 ± 0,05	1,2 ± 0,1	n.s.
Tyrosol (T)	8,8 ± 0,12	8,8 ± 0,21	n.s.
Vanillinsäure (VS)	2,7 ± 0,04	2,8 ± 0,12	n.s.
Catechin (CH)	1,1 ± 0,01	0,6 ± 0,02	n.s.
Kaffeensäure (KS)	1,5 ± 0,01	2,0 ± 0,19	<0,001
Epicatechin (EC)	1,7 ± 0,07	1,7 ± 0,04	n.s.
p-Coumarsäure (CS)	1,0 ± 0,01	1,4 ± 0,21	<0,001
Ferulasäure (FS)	0,7 ± 0,01	0,8 ± 0,01	n.s.
Resveratrol (R)	0,4 ± 0,01	0,7 ± 0,11	<0,001

Tab. 31 Einzelphenolgehalte im Morio Muskat vor und nach Enzymeinsatz (n=2; p=0,05)

Einzelphenole	Wein mit immo.		Signifikanz (p-Wert)
	Kontroll-Wein [mg/l]	Glycosidasen [mg/l]	
Gallussäure (GS)	1,7 ± 0,01	1,6 ± 0,01	n.s.
Protocatechusäure (PS)	1,1 ± 0,02	1,1 ± 0,03	n.s.
Tyrosol (T)	21,6 ± 0,94	21,7 ± 1,03	n.s.
Vanillinsäure (VS)	3,9 ± 0,10	3,2 ± 0,05	n.s.
Catechin (CH)	1,5 ± 0,08	1,0 ± 0,05	n.s.
Kaffeensäure (KS)	0,8 ± 0,01	1,8 ± 0,24	<0,001
Epicatechin (EC)	1,8 ± 0,05	1,0 ± 0,05	n.s.
p-Coumarsäure (CS)	0,9 ± 0,05	2,2 ± 0,15	<0,001
Ferulasäure (FS)	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	n.s.
Resveratrol (R)	0,2 ± 0,02	0,8 ± 0,13	<0,001

4.11.2.1 Diskussion

4.11.2.1.1 Nichtflavonoide

Tyrosol ist in vielen Weißweinen die Haupt-Phenolkomponente (6 – 25 mg/l) [390]. Die Ergebnisse der untersuchten Weine mit vergleichbaren Konzentrationen von bis zu 22 mg/l bestätigten dies. Tyrosol wird während der Gärung aus der Aminosäure Tyrosin gebildet [391].

Vanillinsäure stellte mit bis zu knapp 4 mg/l ebenfalls ein mengenmäßig wichtiges Phenol in den untersuchten Weinproben dar. Komes et al. (2007) fanden u.a. Vanillinsäure-Konzentrationen von 12 mg/l in Weißweinen [108]. Die ermittelten

Vanillinsäure-Konzentrationen in der mit Magnetit-Partikeln behandelten Morio Muskat-Probe wies einen signifikant niedrigeren Gehalt auf, was auf einen möglichen oxidativen Abbau der Vanillinsäure durch den erhöhten Eisengehalt schließen lässt.

Die Hydroxyzimtsäuren Kaffee-, p-Coumar- und Ferulasäure zählen innerhalb der nicht-flavanoiden Polyphenole ebenfalls zu den Hauptkomponenten im Weißwein [392–394]. Die geringen Gehalte an Kaffee-, p-Coumar- und Ferulasäure in den Weinproben sind vergleichbar mit den von Ritter et al. (1994) gefundenen Konzentrationen, die ebenfalls bei durchschnittlich 0,8 bis 1,5 mg/l der Phenolcarbonsäuren in Riesling-Weinen lagen [395]. Durch den Enzymeinsatz (frei und immobilisiert) konnte eine signifikante Steigerung an Kaffee- und p-Coumarsäure festgestellt werden. Die Steigerungsrate durch den Einsatz des freien Enzyms war höher, als durch das gekoppelte Enzym, wie in einem vorherigen Abschnitt (s. Kapitel 4.3) bereits beschrieben, kann dies mit den geringeren Anteilen an anderen Glycosidasen (Arabinosidase, Rhamnosidase, Xylosidase) neben der β -Glucosidase erklärt werden. Die erhaltene Steigerung war beim Morio Muskat stärker als beim Gewürztraminer, was mit dem höheren Gehalt an glykosidisch gebundenen Komponenten im Morio Muskat erklärt werden kann.

Resveratrol wurde in den unbehandelten Proben mit unter 0,5 mg/l detektiert. Dies deckt sich mit Beobachtungen aus der Literatur, in der sehr geringe Gehalte an Resveratrol von weniger als 1 mg/l im Weißwein beschrieben wurden [396, 397]. Pour Nikfardjam et al. (1999) fanden z.B. in 120 deutschen Weinen durchschnittlich lediglich Resveratrol-Konzentrationen von 0,3 mg/l im Weißwein [398]. Allerdings konnte durch Enzymeinsatz auch der Gehalt an Resveratrol signifikant gesteigert werden.

4.11.2.1.2 Flavanoide

Catechine zählen zu den sensorisch wichtigen Phenolen, da diese für die Bitterkeit und Adstringenz eines Weins verantwortlich sind [399]. In den Weinproben lagen die Konzentrationen der untersuchten Catechin-Verbindungen bei 0,5 bis 1,1 mg/l. Peña-Neira et al. (2000) fanden ebenfalls Catechin-Gehalte von nur 0,4 mg/l in den von ihnen untersuchten Weißweinproben [391]. Epicatechin wurde ebenfalls nur in geringen Konzentrationen von 1,8 mg/l ermittelt. Allerdings wurde bei den mit Magnetit-Partikeln behandelten Weinen ein signifikant geringerer Gehalt an Catechin detektiert, gleiches gilt für die erhaltenen Epicatechin-Gehalte aus dem Morio Muskat. In Abb. 80 und Abb. 81 sind Chromatogramme des Gewürztraminers und Morio Muskat bei 320 nm dargestellt, jeweils als Vergleich unbehandelte zu behandelte (an

Magnetit-Partikel konjugierte Glycosidasen) Proben. Dabei kann man für Kaffeesäure, p-Coumarsäure und Resveratrol die gesteigerten Peaks gut erkennen, außerdem ist bei der Retentionszeit 24,8 min die Steigerung eines unbekannten Peaks festzustellen. Neben den erhöhten Peaks kann man allerdings ebenfalls drei unbekannte Peaks (Retentionszeiten bei ca. 10 min, 11,5 min und 13,7 min) erkennen, die durch den Einsatz der gekoppelten Enzyme niedriger im Vergleich zur Ausgangsprobe waren, was eine Folge der erhöhten Eisenmigration und einer damit verbundenen Oxidation sein kann.

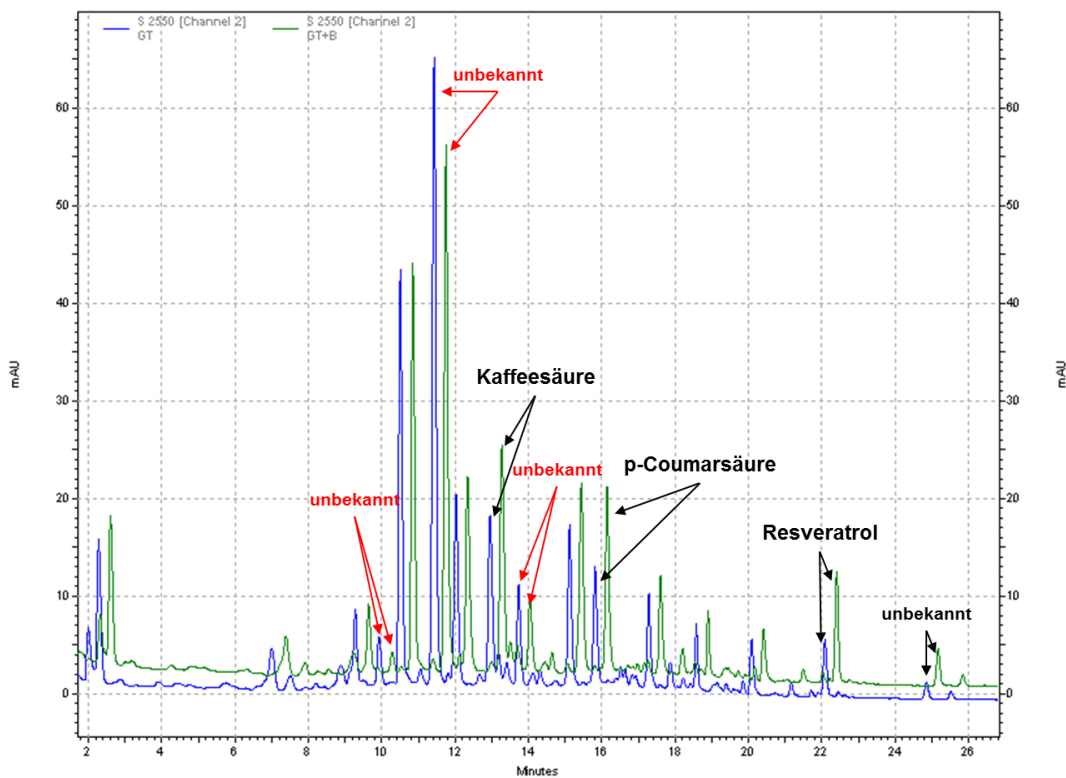


Abb. 80 HPLC-Chromatogramm Gewürztraminer bei 320 nm: Vergleich unbehandelte (blau) und behandelte (immobilisiertes Enzym; grün) Weinprobe

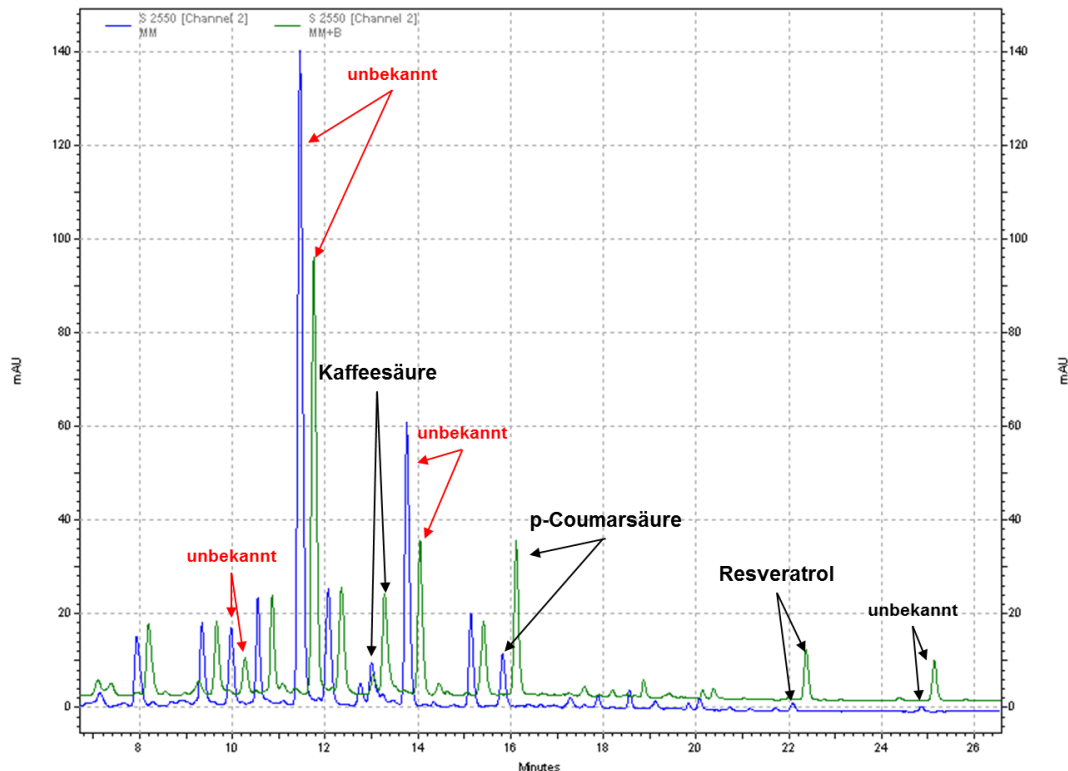


Abb. 81 HPLC-Chromatogramm Morio Muskat bei 320 nm: Vergleich unbehandelte (blau) und behandelte (immobilisiertes Enzym; grün) Weinprobe

Besonders Polyphenole mit einem ortho-Dihydroxybenzol-Rest (Catechol-Ring) oder eine 1,2,3-Trihydroxybenzol-Gruppierung (Galloyl-Gruppe), wie Catechin, Epicatechin, Gallussäure und Kaffeesäure gehören zu den am ehesten leicht oxidierten Weinbestandteilen [400–403]. Diese Stoffe werden sequentiell zu Semichinon-Radikalen und Benzochinonen oxidiert, während Sauerstoff zu Hydrogenperoxiden reduziert wird. Dieser Prozess wird besonders durch den Redox-Zyklus von $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ und $\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^+$ vermittelt (s. Abb. 82) [404]. Andere Komponenten, die stärker von den Phenolgruppen isoliert sind, wie p-Coumarsäure oder Resveratrol, werden erst bei höheren Potentialen oxidiert [401].

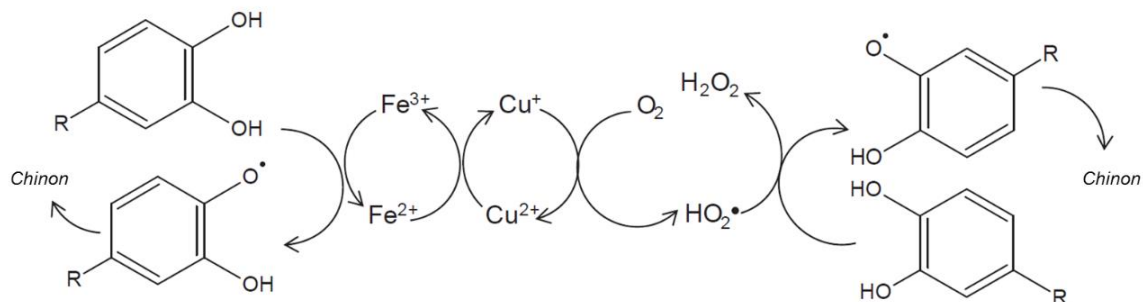
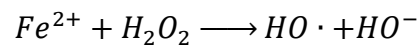


Abb. 82 Postulierte katalytische Wirkung von Eisen- und Kupfer-Ionen bei der Oxidation von Catechinen zu Chinonen und Wasserstoffperoxid (modifiziert nach [405])

Wasserstoffperoxide in Verbindung mit Eisen-Ionen erzeugen Hydroxyl-Radikale ($\text{HO}\cdot$), was auch als Fenton-Reaktion bekannt ist:



Die Hydroxyl-Radikale sind ein Reduktionsprodukt des Sauerstoffs und es ist weitläufig anerkannt, dass sie fast jedes organische Molekül im Wein oxidieren können [388, 402, 403, 406].

4.11.3 Fazit

Trotz des geringeren Gesamtphenolgehalts in den behandelten Proben, konnte beim Gewürztraminer nur für Catechin eine signifikant geringere Konzentration festgestellt werden und lediglich beim Morio Muskat zusätzlich auch für Vanillinsäure und Epicatechin in den Magnetit-Partikel behandelten Proben. Dafür konnte eine Steigerung bei drei anderen Phenolen, Kaffeesäure, p-Coumarsäure und Resveratrol, festgestellt werden. Allerdings wurden bei beiden Weinen drei unbekannte Peaks entdeckt, die nach Einsatz der Magnetit-Partikel niedriger im Vergleich zur Ausgangsprobe waren.

Die geringeren Catechingehalte in den Magnetit-Partikel-Proben lassen allerdings auf einen oxidativen Abbau schließen, da besonders Catechine anfällig für einen oxidativen Abbau sind. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich ein erster möglicher Einfluss auf die einzelnen Phenole durch eine erhöhte Eisenmigration auf den Wein ableiten. Trotz dessen konnte durch den Enzymeinsatz auch eine Steigerung einiger Phenole festgestellt werden.

4.12 Aromafreisetzung nach Enzymeinsatz

Zur Untersuchung der Auswirkung der Enzymbehandlung von Wein wurden die Terpenegehalte in den mit Enzym behandelten und unbehandelten Proben gaschromatographisch bestimmt (s. Kapitel 3.8 und 3.14). Im Aromaprofil aller behandelten Proben konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein höherer Terpenegehalte festgestellt werden.

4.12.1 Aromatisierung

Zuerst wurde der aus Kapitel 3.8 gewonnene Glykosid-Extrakt entsprechend in einem synthetischen Modell-Wein gelöst und mit dem kommerziellen, freien Enzympräparat (Rapidase) und den gekoppelten Enzymen versetzt. In Abb. 83 ist exemplarisch ein Gaschromatogramm einer unbehandelten und mit Enzym behandelten Probe dargestellt. In Tab. 32 sind die erhaltenen Terpenegehalte nach 24 Stunden Enzymbehandlung dargestellt.

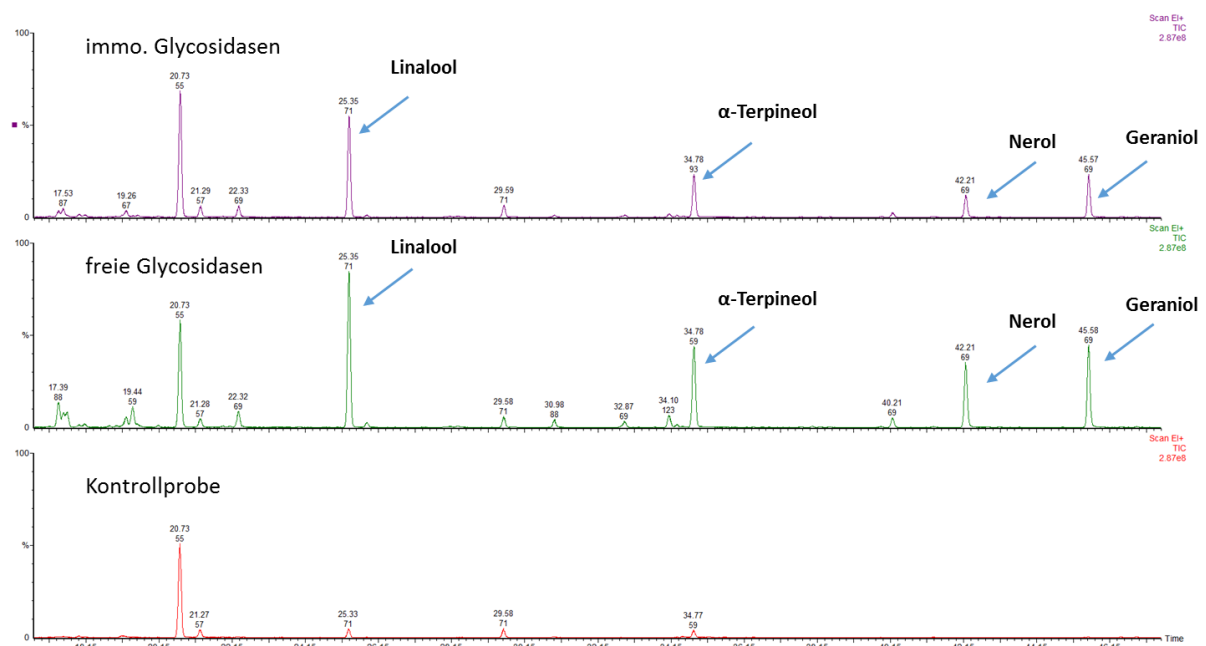


Abb. 83 GC/MS-Chromatogramm: Vergleich der mit immobilisiertem und freiem Enzym behandelten Glykosid-Extrakte (gelöst in Modell-Wein) im Vergleich zur Kontrollprobe

Tab. 32 Terpengehalt im Glykosid-Extrakt vor und nach Enzymeinsatz (n=2)

Aromastoff	Kontrolle [µg/l]	freies Enzym [µg/l]	immo. Enzym [µg/l]
cis-Linalooloxid	n.d.	85,7 ± 7,3	8,3 ± 2,5
trans-Linalooloxid	n.d.	149,0 ± 5,5	8,4 ± 3,3
Linalool	n.d.	32,4 ± 3,1	16,6 ± 1,2
α-Terpineol	n.d.	51,6 ± 4,6	13,1 ± 2,5
β-Citronellol	n.d.	58,9 ± 5,1	30,3 ± 3,7
Nerol	n.d.	1315,9 ± 13,6	566,2 ± 8,0
Geraniol	n.d.	2217,6 ± 29,1	1322,8 ± 15,3
Gesamt-Terpene		3912,9 ± 68,3	1965,7 ± 36,5

Für alle untersuchten Terpene konnte ein deutlicher Anstieg festgestellt werden. Allerdings waren die Steigerungsraten zwischen freiem Enzym und gekoppeltem Enzym unterschiedlich. Das freie Enzym setzte insgesamt deutlich mehr Terpene frei als das gekoppelte Enzym. Die Steigerungsrate war um das Doppelte höher: 1987,3 µg/l durch die immobilisierten zu 3912,9 µg/l durch die freien Glycosidasen. Besonders Nerol und Geraniol konnten in erheblichem Maße gesteigert werden. Nerol konnte auf 566,2 µg/l durch die immobilisierten und auf 1315,9 durch die freien Glycosidasen gesteigert werden. Bei Geraniol wurde ein Anstieg auf 1322,8 µg/l bzw. 2217,6 µg/l festgestellt. Die unterschiedlichen Steigerungsraten der einzelnen Terpene hingen natürlich von der verwendeten Glykosid-Zusammensetzung ab. In diesem Fall wurde der verwendete Glykosid-Extrakt aus einem Morio Muskat gewonnen, da diese Rebsorte besonders reich an glykosidisch gebundenen Bukettstoffen ist.

Somit waren sowohl die freien, als auch die immobilisierten Enzyme fähig eine hohe Menge an Terpenen aus der Modell-Wein-Lösung freizusetzen, obwohl die Terpen-Freisetzung des immobilisierten Enzyms im Vergleich zum freien um ca. 45 % niedriger war. Auch Spagna et al. (1998 und 2002) konnten in einem Modell-Wein eine erhöhte Steigerungsrate der freien Glycosidasen im Vergleich zu den gekoppelten feststellen [24, 27]. Allerdings war der Unterschied mit ca. 10 % deutlich geringer, Spagna et al. (2001) beobachteten lediglich einen Unterschied von ca. 5 % [26]. Die niedrigere Freisetzung durch die in dieser Arbeit immobilisierten Enzyme könnte damit erklärt werden, dass bei der Immobilisierung besonders die β-Glucosidase eine hohe Affinität hatte an die Partikel zu koppeln. Somit änderte sich das Verhältnis der Glycosidasen im Vergleich zum Ausgangsprodukt. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die gefundenen Terpengehalte einerseits von der zur Quantifizierung verwendeten Methode (Auswahl der Standards, Probenvorbereitung,

gaschromatographische Methode, etc.) abhängen, andererseits natürlich von den Eigenschaften des verwendeten Modell-Weins (Glykosid-Gehalt, pH, etc.) und der verwendeten Enzyme (Immobilisierungsmethode, Zusammensetzung der Glycosidasen).

4.12.2 Enzymbehandlung von Wein

Für eine mögliche Freisetzung an Aromen durch Enzyme wurden nachfolgend zwei Weine, Gewürztraminer und Morio Muskat (beide Jahrgang 2014), mit dem kommerziellen und dem immobilisierten Enzymen für 24 Tage versetzt und anschließend der Anteil der Terpene bestimmt (s. Kapitel 3.14 und 7.4.7).

Bei nahezu allen untersuchten Terpenen konnte ein Anstieg nach einer Enzymbehandlung festgestellt werden. Die Zunahme der Gesamt-Terpenegehalte verlief bei beiden Sorten nicht gleichmäßig, sondern hing stark vom Rebsortentyp und dem Anteil an natürlich vorhandenen Bukettvorstufen bzw. glykosidisch gebundenen Aromastoffen ab. Aufgrund der teilweise erheblichen Steigerungsraten in den enzymbehandelten Weinen, kann eine entsprechende sensorische Verbesserung der geruchlichen und geschmacklichen Eigenschaften erwartet werden.

In Tab. 33 und Abb. 84 sind die Ergebnisse für den Morio Muskat und in Tab. 34 und Abb. 85 für den Gewürztraminer dargestellt.

Tab. 33 Terpenegehalt ($\mu\text{g/l}$) im Morio Muskat vor und nach Enzymeinsatz ($n=2$; $p=0,05$)

Aromastoff	Kontroll-	Wein mit	Signifikanz (p-Wert)	Wein mit	Signifikanz (p-Wert)
	Wein [$\mu\text{g/l}$]	freien Glycosidasen [$\mu\text{g/l}$]		immo. Glycosidasen [$\mu\text{g/l}$]	
cis-Linalooloxid	55,8 \pm 1,7	56,4 \pm 1,3	n.s.	59,7 \pm 6,6	n.s.
trans-Linalooloxid	26,0 \pm 1,3	27,5 \pm 2,1	n.s.	26,4 \pm 1,3	n.s.
Linalool	97,4 \pm 2,2	111,6 \pm 5,7	<0,01	110,7 \pm 6,0	<0,05
α -Terpineol	83,9 \pm 3,8	93,9 \pm 2,3	<0,01	102,2 \pm 15,9	n.s.
β -Citronellol	17,3 \pm 0,6	20,8 \pm 0,8	<0,001	21,5 \pm 4,5	n.s.
Nerol	14,7 \pm 0,3	50,8 \pm 2,4	<0,001	42,8 \pm 8,8	<0,01
Geraniol	41,5 \pm 1,3	198,7 \pm 10,6	<0,001	149,7 \pm 32,3	<0,01
Gesamt-Terpene	336,6 \pm 11,1	559,9 \pm 23,2	<0,001	512,9 \pm 75,4	<0,01

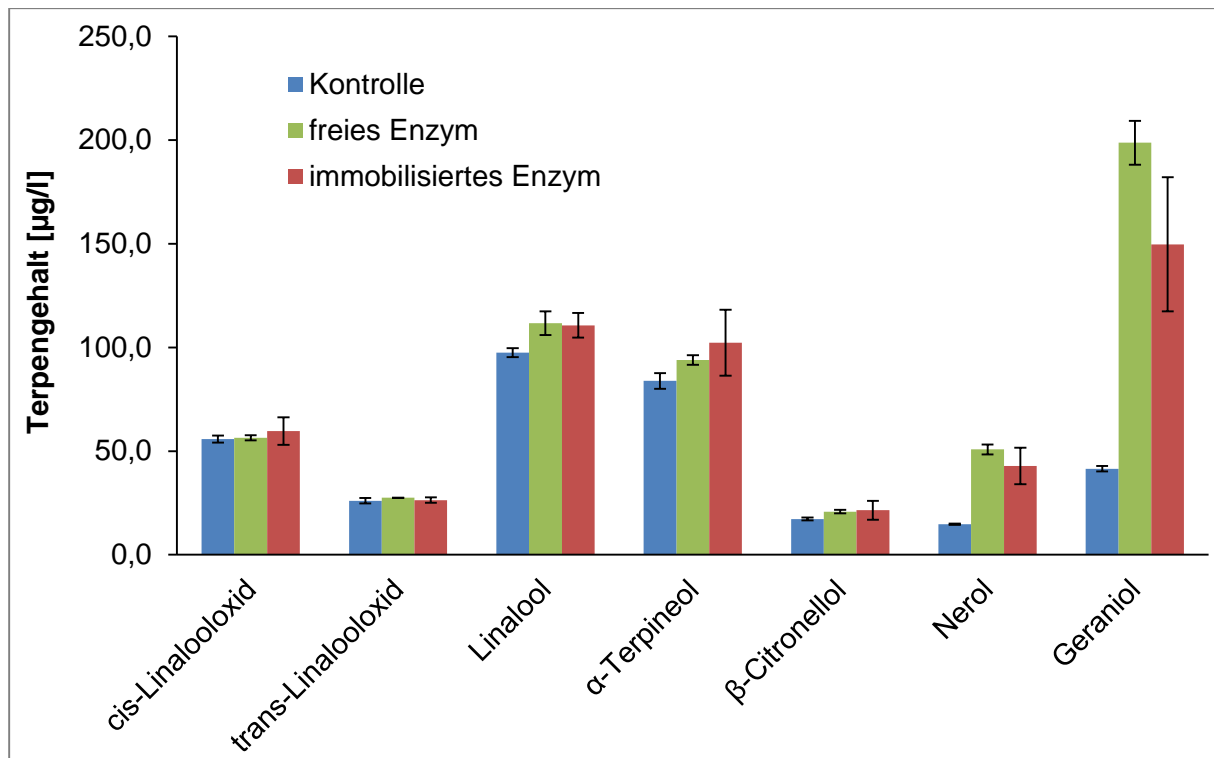


Abb. 84 Terpenegehalt (µg/l) im Morio Muskat vor und nach Enzyemeinsatz (n=2; p=0,05)

Tab. 34 Terpenegehalt (µg/l) im Gewürztraminer vor und nach Enzyemeinsatz (n=2; p=0,05)

Aromastoff	Wein mit freien Glycosidasen		Signifikanz (p-Wert)	Wein mit immo. Glycosidasen	
	Kontroll-Wein [µg/l]	[µg/l]		[µg/l]	Signifikanz (p-Wert)
cis-Linalooloxid	9,4 ± 1,4	8,9 ± 0,8	n.s.	9,3 ± 0,5	n.s.
trans-Linalooloxid	6,5 ± 0,2	6,5 ± 0,1	n.s.	6,6 ± 0,5	n.s.
Linalool	19,5 ± 0,5	22,2 ± 1,3	<0,01	20,4 ± 0,3	<0,05
α-Terpineol	13,7 ± 1,2	13,9 ± 0,8	n.s.	13,6 ± 0,1	n.s.
β-Citronellol	18,2 ± 3,3	18,8 ± 0,3	n.s.	18,0 ± 0,9	n.s.
Nerol	7,8 ± 1,1	10,9 ± 0,7	<0,005	8,5 ± 0,2	n.s.
Geraniol	19,4 ± 2,0	78,8 ± 5,6	<0,001	42,1 ± 2,5	<0,001
Gesamt-Terpene	94,4 ± 9,9	160,1 ± 9,5	<0,001	118,5 ± 5,0	<0,001

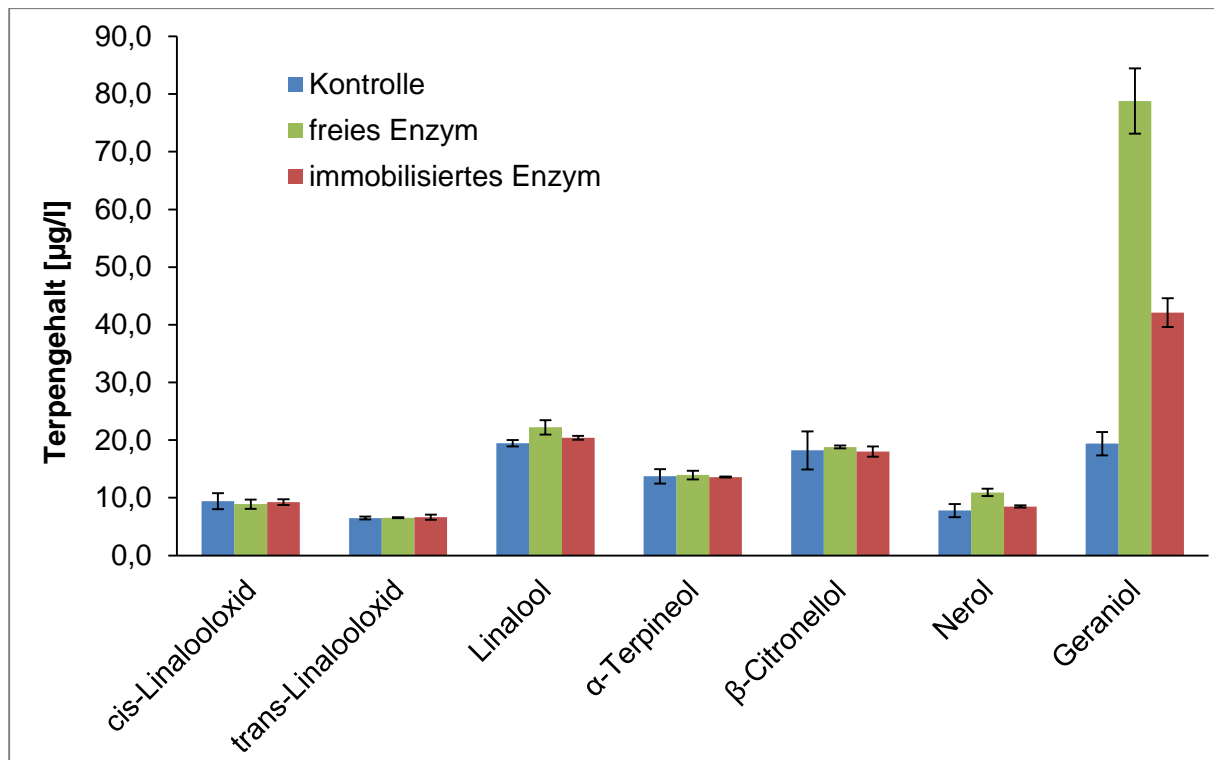


Abb. 85 Terpenegehalt (µg/l) im Gewürztraminer vor und nach Enzymeinsatz (n=2; p=0,05)

Bei beiden Weinen konnte eine signifikante Steigerung des Gesamt-Terpenegehalts durch Enzymeinsatz (frei und gekoppelt) festgestellt werden. Im Gewürztraminer konnte dieser von 94,4 µg/l auf 160,1 µg/l durch die freien und auf 118,5 µg/l durch die immobilisierten Glycosidasen gesteigert werden. Im Morio Muskat wurde der Gesamt-Terpenegehalt von 336,6 µg/l auf 559,9 µg/l (166,3 %) bzw. 512,9 µg/l (152,4 %) gesteigert. Auch González-Pombo et al. (2014) konnten im Wein eine ähnliche Steigerung der Gesamt-Terpene von 1119 µg/l auf 2132 µg/l (190,5 %) durch immobilisierte Glycosidasen beobachten [20].

Sowohl beim Gewürztraminer als auch beim Morio Muskat konnten für **cis-** und **trans-Linalooloxid** keine signifikanten Änderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe festgestellt werden. **Linalool** konnte durch Enzymeinsatz beim Morio Muskat signifikant von 97,4 µg/l auf 111,6 µg/l durch die freien und 110,7 durch die immobilisierten Glycosidasen gesteigert werden. Die Steigerungsrate von Linalool beim Morio Muskat mit 114,6 % durch die freien Glycosidasen, respektive 113,7 % durch die gekoppelten Glycosidasen, ist vergleichbar mit der von González-Pombo et al. (2014) beobachteten Steigerungsrate von 110,8 % [20]. Auch beim Gewürztraminer war ein Anstieg im Vergleich zur Kontrollprobe festzustellen. Dort wurde eine Steigerung von 19,5 µg/l auf 22,2 durch die freien und auf 20,4 durch die immobilisierten Glycosidasen detektiert. Beim Gewürztraminer wurden sowohl für

Terpineol als auch für **Citronellol** keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur Kontrollprobe festgestellt. Beim Morio Muskat hingegen konnten für beide Aromastoffe eine Steigerung detektiert werden. Terpeneol konnte von 83,9 µg/l auf 93,9 µg/l durch die freien und auf 102,2 µg/l durch die immobilisierten Glycosidasen gesteigert werden. Bei Citronellol wurde eine Steigerung von 17,3 auf 20,8 µg/l (frei) bzw. auf 21,5 µg/l (immobilisiert) festgestellt. Im Morio Muskat konnte der Gehalt an **Nerol** und **Geraniol** durch die Glycosidasen deutlich gesteigert werden. Bei Nerol wurde eine Steigerung von 14,7 µg/l auf 50,8 µg/l durch die freien und auf 42,8 µg/l durch die gekoppelten Glycosidasen festgestellt. Geraniol konnte von 41,5 µg/l auf 198,7 µg/l (478,8 %) bzw. 149,7 µg/l (360,7 %) gesteigert werden. González-Pombo et al. (2014) beobachteten ebenfalls eine deutliche Steigerung an Geraniol von 98 µg/l auf 438 µg/l (446,9 %) [20]. Beim Gewürztraminer wurde eine deutlich geringere Steigerung für Nerol festgestellt bzw. beim immobilisierten Enzym war diese nicht signifikant (von 7,8 µg/l auf 10,9 µg/l bzw. 8,5 µg/l). Geraniol hingegen konnte auch beim Gewürztraminer wieder signifikant gesteigert werden, von 19,4 µg/l auf 78,8 µg/l durch die freien und auf 42,1 µg/l durch die immobilisierten Glycosidasen.

4.12.2.1 Fazit

Wie gezeigt werden konnte, hatte die Behandlung von Weißwein mit Glycosidasen eine signifikante Wirkung auf die Freisetzung der Aromen aus den Glykosiden und es konnte ein Anstieg der Terpene im Vergleich zum Kontrollwein festgestellt werden. Es wurde eine größere relative Steigerung der primären Terpenalkohole (Nerol, Geraniol) im Vergleich zu den tertiären Alkoholen (Linalool, α -Terpineol) festgestellt. Dieses Verhalten kann der Tatsache zugeschrieben werden, dass die primären Terpenalkohole, welche in Muskateller-Trauben enthalten sind, hauptsächlich in gebundener Form vorkommen [407] und dass die β -Glucosidase weniger selektiv gegenüber den tertiären Alkoholen ist [167]. Tertiäre Alkohole führen zu einer größeren sterischen Hinderung beim Enzymangriff im Vergleich zu den primären Alkoholen und sind daher weniger zugänglich für die katalytische Stelle des Enzyms [218].

Die Zunahme an Aromastoffen durch Einsatz der immobilisierten Enzyme war beim Morio Muskat geringfügig niedriger im Vergleich zum freien Enzym. Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Beim Gewürztraminer hingegen konnte ein signifikanter Unterschied ($<0,001$) bei der Steigerung der Terpenegehalte zwischen freien und gekoppelten Glycosidasen festgestellt werden. Ursache dafür könnte die geänderte Zusammensetzung der immobilisierten Glycosidasen im Vergleich zum

Ausgangsprodukt sein. Der relative Anteil der β -Glucosidase im immobilisierten Biokatalysator war nach der Immobilisierung höher und besonders die Arabinosidase wies einen deutlich geringeren Anteil auf. Die Freisetzung der aromatischen Aglyka hingegen ist ein sequentieller Mechanismus (s. Kapitel 2.1.6). Die anderen Glycosidasen, wie Arabinosidase und Rhamnosidase, sind für die Spaltung der aromatischen Vorstufen hin zum Monoglukosid, an dem dann die β -Glucosidase angreifen kann, ebenfalls wichtig. Da die Zusammensetzung der Glykoside im jeweiligen Wein nicht bekannt ist, kann dadurch auch nicht auf die zur Freisetzung der Aglyka benötigten Glycosidasen geschlossen werden.

Betrachtet man nun die Menge an freigesetzten Gesamt-Terpenen (durch immo. Glycosidasen), 24,1 $\mu\text{g/l}$ beim Gewürztraminer und 176,3 $\mu\text{g/l}$ beim Morio Muskat, ergibt sich anhand der molaren Massen der Terpene (154,3 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ für Linalool, Terpeneol, Nerol und Geraniol, sowie 156,3 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ für Citronellol) eine molare Freisetzung an Aglyka von ca. 0,16 μM für den Gewürztraminer und ca. 1,14 μM für den Morio Muskat. Allerdings wurde in Kapitel 4.7 festgestellt, dass es zu einer Reduktion der Glykoside von 17,5 μM (Gewürztraminer) bzw. 79,2 μM (Morio Muskat) durch den Einsatz der immobilisierten Enzyme kam. Es wurde also eine deutlich größere Anzahl an Aglyka freigesetzt. Diese Erkenntnis zeigt, dass neben den glykosidisch gebundenen Aromastoffen, auch eine hohe Anzahl anderer Stoffe glykosidisch gebunden im Wein vorkommen. Die Steigerung einiger Phenole (Kaffee-, p-Coumarsäure und Resveratrol) bestätigen diese Annahme. Aus der Menge an freigesetzten Einzelphenolen ergibt sich eine weitere Freisetzung an Aglyka von 12,1 μM (Gewürztraminer) und 22,2 μM (Morio Muskat). Somit scheint der Anteil glykosidisch gebundener Phenole höher als der Anteil glykosidisch gebundener Aromastoffe zu sein. Dies zeigt wiederum, wie komplex die Hydrolyse der glykosidischen Komponenten im Wein ist und dass eine Vorhersage bzw. Abschätzung der Freisetzung an Aromastoffen durch einen Enzyemeinsatz aufgrund der Komplexität nur sehr schwer möglich ist.

4.12.2.2 Terpengehalte der behandelten Weine für die Sensorik-Versuche

In den für die nachfolgenden Sensorik-Versuche behandelten Weinen wurde ein etwas geringer Gehalte an Terpenen freigesetzt (s. Tab. 35), was damit erklärt werden kann, dass aufgrund der größeren Ansätze (10 l) keine Lagerung bei 25 °C möglich war, diese daher bei Raumtemperatur gelagert wurden und aufgrund der geringeren Temperatur die katalytische Aktivität der Enzyme niedriger war. In Tab. 35 sind die

Ergebnisse der Terpen-Bestimmung dargestellt, die Signifikanz bezieht sich auf die Terpen-Werte der Kontrollweine ohne Enzymbehandlung (s. Tab. 33 und Tab. 34).

Tab. 35 Terpengehalt ($\mu\text{g/l}$) der behandelten Weine für Sensorik-Versuche ($n=2$, $p=0,05$)

Aromastoff	Morio Muskat	Signifikanz (p-Wert)	Gewürztraminer	Signifikanz (p-Wert)
	behandelt [$\mu\text{g/l}$]		behandelt [$\mu\text{g/l}$]	
cis-Linalooloxid	59,5 \pm 5,0	n.s.	8,3 \pm 0,6	n.s.
trans-Linalooloxid	27,1 \pm 0,8	n.s.	6,4 \pm 0,3	n.s.
Linalool	99,9 \pm 3,7	n.s.	22,2 \pm 0,3	<0,005
α -Terpineol	110,9 \pm 4,7	<0,005	14,5 \pm 0,3	n.s.
β -Citronellol	19,1 \pm 2,1	n.s.	18,3 \pm 1,3	n.s.
Nerol	22,8 \pm 0,8	<0,001	8,4 \pm 0,6	n.s.
Geraniol	83,7 \pm 4,2	<0,001	27,3 \pm 1,1	<0,005
Gesamt-Terpene	423,0 \pm 21,3	<0,005	105,4 \pm 4,6	<0,05

4.12.3 Oxidations- und Alterungsaromen

Durch die erhöhte Eisenmigration der Magnetit-Partikel in den Wein, war von einer erhöhten Oxidationsneigung der Weine auszugehen. Daher wurden die Weine zusätzlich auf einige Reifearomen untersucht. Flak et al. (2011) nannten u.a. Diethylsuccinat, Isobutylacetat, Ethylcaprat, iso-Butanol, n-Butylacetat, 3-Hexen-1-ol, Ethyllactat, n-Octanol, Isobuttersäure und Benzaldehyd als mögliche Alterungs- bzw. Oxidationsaromen [408]. Daneben identifizierten Ferreira et al. (1997) sowie Silva Ferreira et al. (2002 und 2003) Methional und Phenylacetaldehyd ebenfalls als mögliche Oxidationsaromen [384–387]. Dabei wurden folgende Aromen in den Proben detektiert:

- Ethyllactat
- Benzaldehyd
- Isobuttersäure
- Ethylcaprat
- Diethylsuccinat

In Tab. 36 und Abb. 86, sowie Tab. 37 und Abb. 87 sind die erhaltenen Werte als 4-Nonanol-Äquivalente, entsprechend der Methode 3.14.3, dargestellt.

Tab. 36 Gehalt an Alterungs- bzw. Oxidationsaromen (als 4-Nonanol-Äquivalente, µg/l) im Gewürztraminer vor und nach Enzymeinsatz

Aromastoff	Kontrollwein [µg/l]	Wein mit immo. Glycosidasen [µg/l]
Ethyllactat	140,3 ± 16,0	214,2 ± 14,1
Benzaldehyd	4,4 ± 0,5	15,5 ± 1,6
Isobuttersäure	17,3 ± 1,5	28,1 ± 1,4
Ethylcaprat	413,3 ± 20,3	525,7 ± 37,5
Diethylsuccinat	685,6 ± 34,2	1564,9 ± 114,2

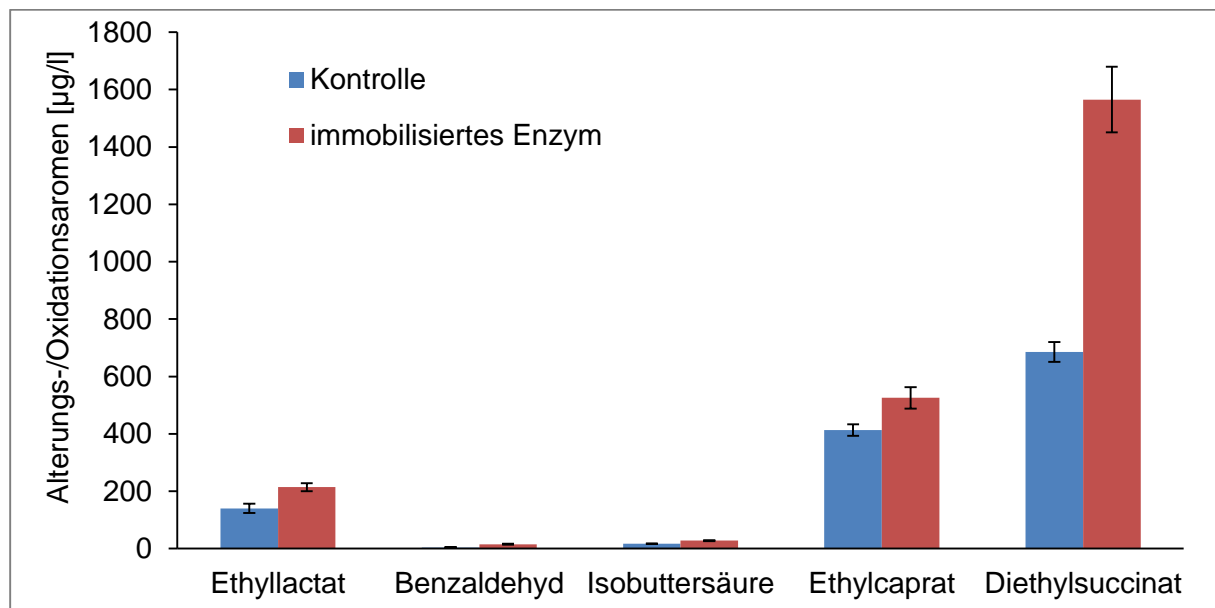


Abb. 86 Gehalt an Alterungs- bzw. Oxidationsaromen (als 4-Nonanol-Äquivalente, µg/l) im Gewürztraminer vor und nach Enzymeinsatz

Tab. 37 Gehalt an Alterungs- bzw. Oxidationsaromen (als 4-Nonanol-Äquivalente, µg/l) im Morio Muskat vor und nach Enzymeinsatz

Aromastoff	Kontrollwein [µg/l]	Wein mit immo. Glycosidasen [µg/l]
Ethyllactat	295,6 ± 35,3	293,8 ± 29,3
Benzaldehyd	5,2 ± 1,7	4,0 ± 1,0
Isobuttersäure	11,3 ± 4,4	8,0 ± 1,4
Ethylcaprat	134,9 ± 1,4	122,2 ± 18,7
Diethylsuccinat	659,9 ± 12,2	1069,5 ± 51,3

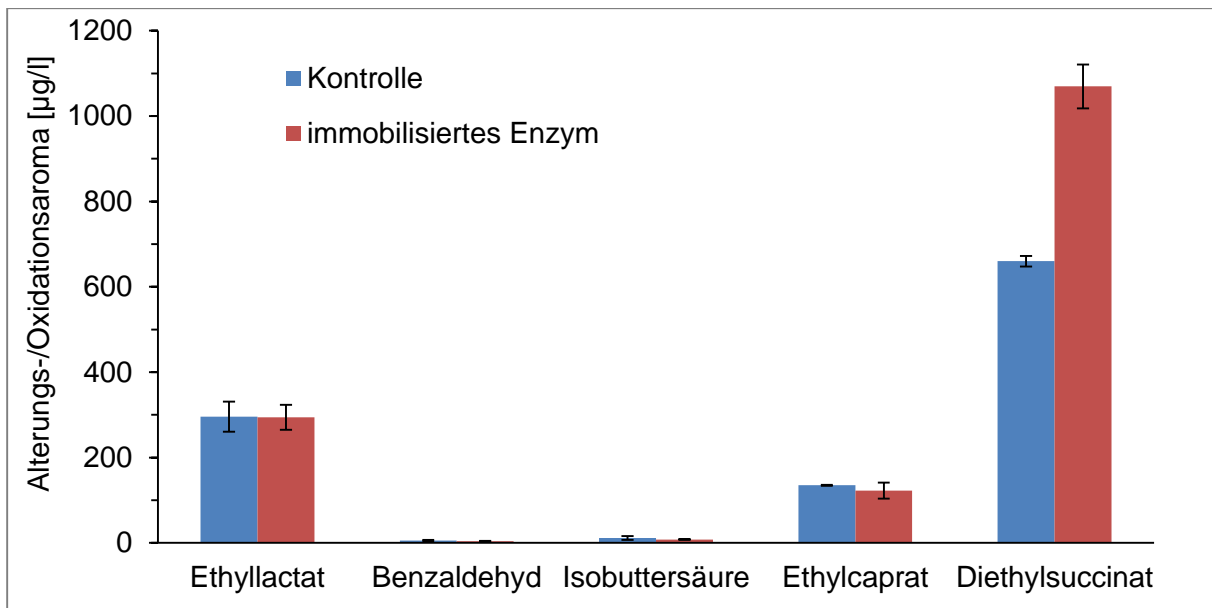


Abb. 87 Gehalt an Alterungs- bzw. Oxidationsaromen (als 4-Nonanol-Äquivalente, µg/l) im Morio Muskat vor und nach Enzymeinsatz

Für den behandelten Gewürztraminer konnte ein signifikant höherer Gehalt an **Ethyllactat** festgestellt werden, die Konzentration stieg von 140,3 µg/l auf 214,2 µg/l. Ethyllactat wird mit einem leicht ätherisch, buttrigen Geruch assoziiert [409]. Für den Morio Muskat konnte keine Änderung beim Gehalt an Ethyllactat festgestellt werden. Auch für **Benzaldehyd**, welches ein charakteristischen Geruch und aromatischen Geschmack ähnlich wie Bittermandel aufweist [409], wurde für den behandelten Gewürztraminer ein signifikant höherer Gehalt detektiert. Beim Morio Muskat wurden keine Unterschiede festgestellt.

Isobuttersäure wurde im behandelten Gewürztraminer mit einer signifikant höheren Konzentration detektiert, der Gehalt stieg von 17,3 µg/l auf 28,1 µg/l. Isobuttersäure hat einen stark penetranten Geruch nach ranziger Butter [409]. Auch hier wurden für den Morio Muskat keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Für **Ethylcaprat** wurde im behandelten Gewürztraminer ebenfalls eine Steigerung festgestellt, der Gehalt stieg von 413,3 µg/l auf 525,7 µg/l. Ethylcaprat hat einen fruchtigen Geruch, der an Trauben (Cognac) erinnernd. Außerdem wurde ebenfalls von einem öligen, Brandy-artigen Geruch berichtet [409]. Im behandelten Morio Muskat wurde keine Änderung der Konzentration festgestellt.

Diethylsuccinat wurde in beiden behandelten Weinen in einer deutlich höheren Konzentration detektiert, im Gewürztraminer stieg die Konzentration von 685,6 µg/l auf 1564,9 µg/l und im Morio Muskat von 659,9 µg/l auf 1069,5 µg/l. Allerdings wird Diethylsuccinat nur mit einem schwachen, angenehmen Geruch assoziiert [409].

4.12.3.1 Fazit

Aufgrund der höheren Konzentrationen an Ethyllactat, Benzaldehyd, Isobuttersäure und Ethylcaprat im Gewürztraminer ist von einer negativen sensorischen Beeinträchtigung durch die Behandlung mit Magnetit-Partikeln auszugehen. Besonders die höheren Gehalte an Ethyllactat und Isobuttersäure dürften zu wahrnehmbaren Fehlparomen führen. Außerdem lassen die erhöhten Konzentrationen an Oxidations- bzw. Alterungsaromen auf oxidative Vorgänge in Folge der erhöhten Eisengehalte im Wein schließen. Vor allem im Gewürztraminer konnte eine deutliche Steigerung an Oxidations- bzw. Alterungsaromen festgestellt werden. Trotz der deutlich höheren Eisen-Konzentration nach dem Einsatz der Magnetit-Partikel im Morio Muskat, konnten lediglich für Diethylsuccinat erhöhte Werte festgestellt werden. Allerdings sollte der höhere Gehalt an Diethylsuccinat aufgrund der schwachen sensorischen Wirkung keinen Einfluss auf die Sensorik haben. Somit ist beim Morio Muskat von keinen negativen sensorischen Beeinträchtigungen durch die beschriebenen Alterungsaromen auszugehen.

Die unterschiedlichen Konzentrationen an Oxidations- bzw. Alterungsaromen im Gewürztraminer und Morio Muskat sowie, trotz der höheren Eisenmigration im Morio Muskat deutlich geringeren Werte, lassen darauf schließen, dass eine Oxidation der Weininhaltsstoffen von einer Vielzahl von Faktoren abhängt und eine Vorhersage über das Ausmaß der Oxidation, z.B. in Folge erhöhter Eisen-Werte, nicht möglich ist.

4.13 Sensorik

Die Ergebnisse der sensorischen Analysen der einzelnen Weine sollte die Auswirkung der Enzymbehandlung verdeutlichen. Dies wurde von 10 geschulten Prüfern mit dem in Kapitel 3.16 beschriebenen Sensorik-Test untersucht. Zur Verkostung standen Morio Muskat (MM) und Gewürztraminer (GT), jeweils eine unbehandelte Kontrollprobe (MM Kontrolle bzw. GT Kontrolle) und eine mit Magnetit-Enzymen behandelte Prüfprobe (MM behandelt bzw. GT behandelt).

4.13.1 Geruch

In Tab. 38 und Abb. 88 sowie Abb. 89 sind die Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung für den Geruch der Weinproben dargestellt.

Tab. 38 Ergebnisse der Signifikanzprüfungen der deskriptive Sensorik-Intensitätsprüfung „Geruch“ (Prüferpanel, n=10; Fisher-LSD-Signifikanzniveau: A<99,9 %, B<99 %, a<95 %, b<90 %)

Geruch	MM Kontrolle	MM behandelt	GT Kontrolle	GT behandelt
Geruchsintensität	40,31	64,58	68,07	48,87
Apfel	39,04	56,36B	57,07b	36,79
Maracuja	37,4	59,09B	44,19	47,89
Zitrone	28,67	53,5A	57,77a	28,94
Blumig	38,85	68,25A	61,37	40,15
Würzig	49,35	63,69	47,8	51,8
Rauchig	55,42B	32,76	26,11	57,35A
Fruchtig	40,58	58,88	66,73b	35,77

Beide behandelten Weine konnten signifikant von der Kontrollprobe unterschieden werden. Der behandelte **Morio Muskat** wies mit 64,6 eine höhere Geruchsintensität auf als die Kontrollprobe mit 40,3. Besonders die Attribute „Apfel“ mit 56,4 zu 39,0 „Maracuja“ mit 59,1 zu 37,4, „Zitrone“ mit 53,5 zu 28,7 und „Blumig“ mit 68,3 zu 38,9 waren im Vergleich zur Kontrollprobe signifikant stärker ausgeprägt. Die Kontrollprobe hingegen hatte ein deutlich rauchigeres Aroma mit 55,4 zu 32,8. Gerade die Geruchsattribute „Zitrone“ und „Blumig“ werden mit Terpenen in Verbindung gebracht und durch den Enzymeinsatz konnten diese im Vergleich zur Kontrollprobe deutlich gesteigert werden, was mit der experimentell ermittelten Steigerung des Gesamt-Terpengehalts durch die Enzymbehandlung von 336,6 µg/l auf 422,8 µg/l korreliert. Dabei waren im behandelten Morio Muskat insbesondere Terpeneol, Nerol und Geraniol in höheren Konzentrationen enthalten. Geraniol und Terpeneol weisen ein blumiges Aroma auf und Nerol besitzt Citrus-Akzente. Der rauchigere

Geruchseindruck der Kontrollprobe wurde wahrscheinlich durch das blumigere Aroma der enzymbehandelten Probe in den Hintergrund gedrängt.

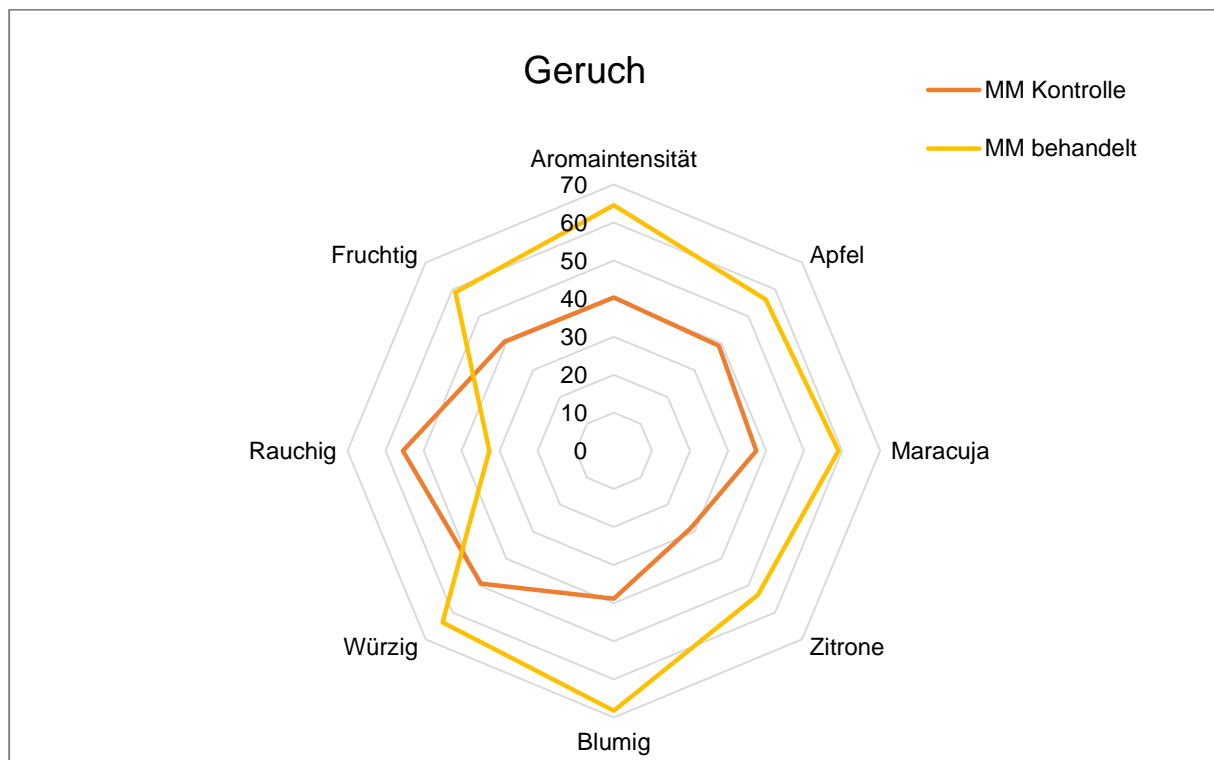


Abb. 88 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung „Geruch“ für den Morio Muskat (Prüferpanel, n=10)

Der **Gewürztraminer** zeigte hingegen konträre Ergebnisse. Insgesamt wies die Kontrollprobe eine höhere Geruchs- bzw. Aromaintensität auf, besonders die Attribute „Apfel“ mit 57,1 zu 36,8, „Zitrone“ mit 57,8 zu 28,9 und „Fruchtig“ mit 66,7 zu 35,8 waren signifikant stärker ausgeprägt. Das Geruchsattribut „Rauchig“ hingegen war beim behandelten Gewürztraminer mit 57,4 zu 26,1 signifikant stärker ausgeprägt, was mit den gestiegenen Konzentrationen an vermeintlichen Oxidationsstoffen korreliert.

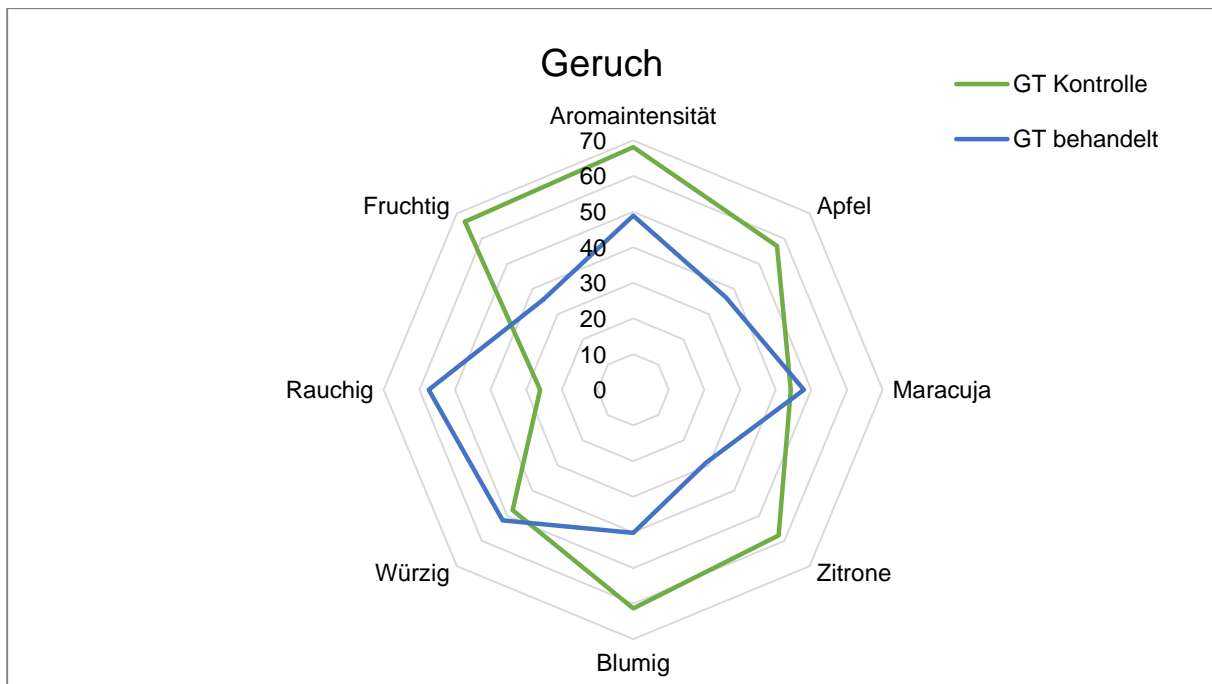


Abb. 89 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung „Geruch“ für den Gewürztraminer (Prüferpanel, n=10)

4.13.2 Geschmack

In Tab. 39 sowie Abb. 90 und Abb. 91 sind die Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung für den Geschmack der Weinproben dargestellt. Auch hier wiesen beide Weine wieder teilweise signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrollprobe auf.

Tab. 39 Ergebnisse der Signifikanzprüfungen der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung „Geschmack“ (Prüferpanel, n=10; Fisher-LSD-Signifikanzniveaus: A<99,9 %, B<99 %, a<95 %, b<90 %)

Geschmack	MM	MM	GT	GT
	Kontrolle	behandelt	Kontrolle	behandelt
Geschmacksintensität	65,07	64,48	69,04	50,35
Apfel	54,27	62,06	52,17	46,2
Maracuja	45,41	59,18	50,51	37,53
Zitrone	51,44	51,48	53,17	35,74
Blumig	44,4	69,87A	59,18	35,08
Honig	44,18	56,69	50,04	42,49
Würzig	53,82	52,16	50,69	53,06
Rauchig	53,33b	34,19	29,15	58,98B
Fruchtig	52,86	56,26	71,14a	32,00
Reifeentwicklung	54,32	48,46	32,6	78,63a
Nachgeschmack	46,4	35,18	47,26	65,93

Bei der geschmacklichen Beurteilung des **Morio Muskats** waren die Unterschiede nicht so deutlich, wie beim Geruch. Die Geschmacksintensität der beiden Weine (behandelt und unbehandelt) war ungefähr identisch. Dafür war das Attribut „Blumig“ wieder signifikant stärker mit 69,9 zu 44,4 beim behandelten Morio Muskat ausgeprägt. Das Attribut „Rauchig“ war bei der Kontrollprobe mit 53,3 zu 34,2 stärker ausgeprägt. Beim Geschmack führte eine Behandlung mit Enzymen ebenfalls zu einer blumigeren Note des Weins, allerdings nicht so deutlich wie beim Geruch. Bei einer Nachbesprechung deutete ein Prüfer ebenfalls an, dass dieser den behandelten Wein als etwas süßer empfand, was eventuell auf den höheren Gehalt an Geraniol zurückzuführen ist, da gerade Geraniol mit einem süßlichen Geschmackseindruck in Verbindung gebracht wird.

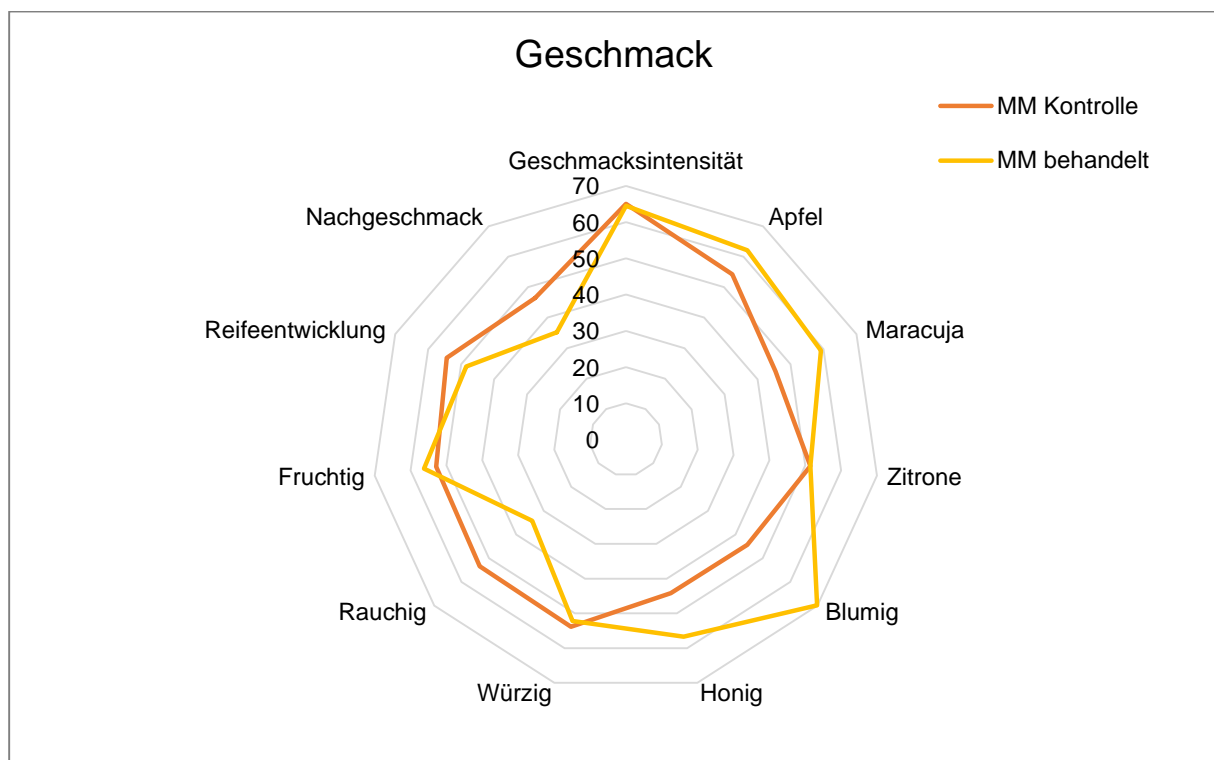


Abb. 90 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung „Geschmack“ für den Morio Muskat (Prüferpanel, n=10)

Der behandelte **Gewürztraminer** wies mit 50,4 zu 69,0 eine geringere Geschmacksintensität auf. Auch die anderen Attribute (Apfel, Maracuja, Zitrone, Blumig, Honig) waren, wenn auch nicht signifikant, bei der Kontrollprobe stärker ausgeprägt. Das Attribut „Fruchtig“ war mit 71,1 zu 32,0 signifikant stärker in der Kontrollprobe ausgeprägt. Der behandelte Gewürztraminer hingegen zeigte deutlich stärkere Ausprägungen bei den Attributen „Rauchig“ mit 59,0 zu 29,2 und „Reifeentwicklung“ mit 78,6 zu 32,6. Besonders die stärkere Ausprägung der

Reifeentwicklung lässt auf oxidative Vorgänge im Wein schließen, welche wahrscheinlich auf den deutlich höheren Eisengehalt durch den Einsatz der Magnetit-Partikel zurückzuführen ist und mit der experimentell ermittelten Steigerung an Oxidationsaromen korreliert.

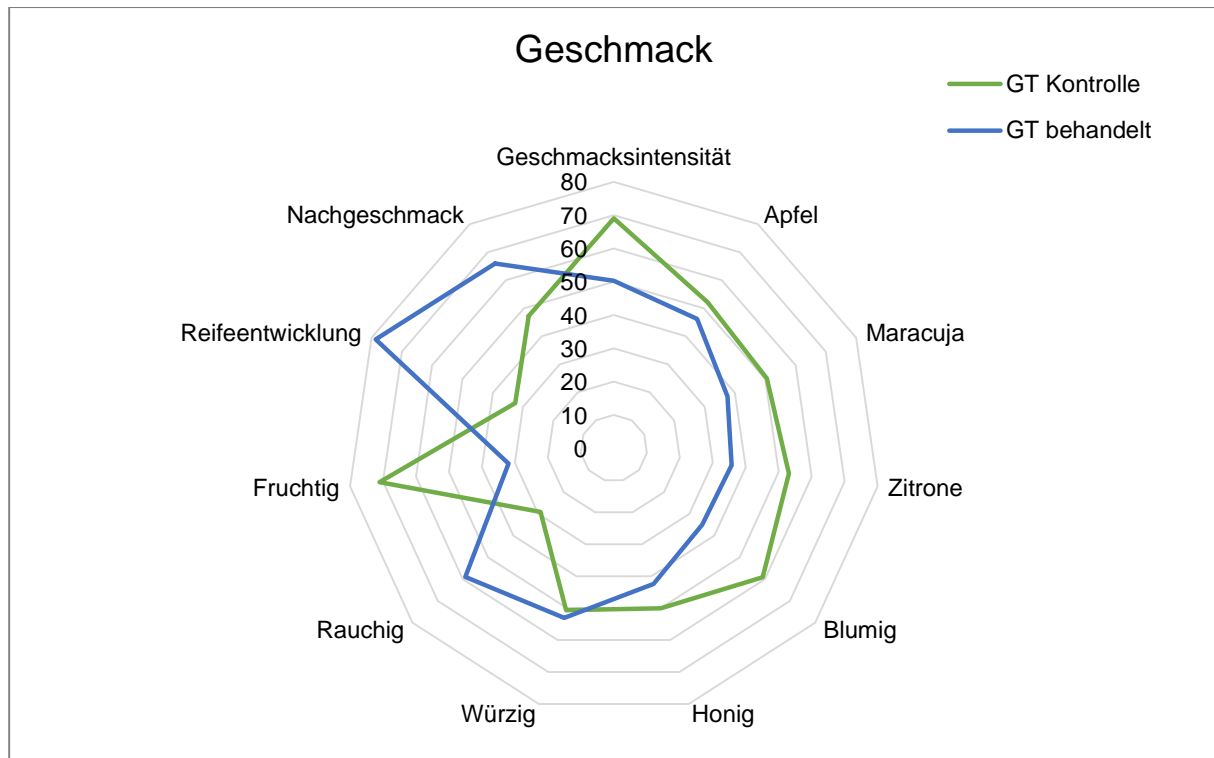


Abb. 91 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung „Geschmack“ für den Gewürztraminer (Prüferpanel, n=10)

4.13.3 Rangordnungsprüfung

In Tab. 40 sind Ergebnisse der Rangordnungsprüfung für den Morio Muskat (unbehandelt und behandelt) sowie den Gewürztraminer (unbehandelt und behandelt) dargestellt.

Tab. 40 Ergebnisse der Rangordnungsprüfung „Geruch“ (Prüferpanel, n=10; Fisher-LSD-Signifikanzniveaus: A<99,9 %, B<99%, a<95 %, b<90 %)

Rangordnung	MM Kontrolle	MM behandelt	GT Kontrolle	GT behandelt
1	30%	70%	90%	10%
2	70%	30%	10%	90%
Rang Summe	17	13	11	19
Durchschnittsrang	1,7	1,3	1,1B	1,9
Std.-Abw.	0,48	0,48	0,32	0,32

Bei der **Rangordnungsprüfung Geruch** gab es 70 % Präferenz für den enzymbehandelten Morio Muskat, wobei diese Rangordnung nicht signifikant war. Für

den Gewürztraminer hingegen gab es eine signifikante Rangordnung zu Gunsten des unbehandelten Gewürztraminers, 90% der Prüfer präferierten diesen Wein.

Bei der **Rangordnungsprüfung Geschmack** gab es lediglich eine 60 %ige Präferenz für den behandelten Morio Muskat, wobei auch diese Rangordnung nicht signifikant war. Beim Geschmack war der Unterschied zwischen den beiden Weinen somit noch geringer, als beim Aroma bzw. Geruch. Für den Gewürztraminer gab es auch beim Geschmack eine signifikante Rangordnung zu Gunsten des unbehandelten Gewürztraminers, wieder präferierten 90% der Prüfer diesen Wein.

Tab. 41 Ergebnisse der Rangordnungsprüfung „Geschmack“ (Prüferpanel, n=10; Fisher-LSD-Signifikanzniveaus: A<99,9 %, B<99%, a<95 %, b<90 %)

Rangordnung	MM Kontrolle	MM behandelt	GT Kontrolle	GT behandelt
1	40%	60%	90%	10%
2	60%	40%	10%	90%
Rang Summe	16	14	11	19
Durchschnittsrang	1,6	1,4	1,1B	1,9
Std.-Abw.	0,52	0,52	0,32	0,32

4.13.4 Diskussion

Die sensorischen Ergebnisse brachten zwei interessante Erkenntnisse, zum einen konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz der immobilisierten Glycosidasen Wein signifikant mehr geruchsintensives Aroma freigesetzt werden kann und zum anderen kann es durch die erhöhte Eisenmigration zu Oxidationsreaktionen im Wein kommen, womit dieser Wein anschließend sensorisch schlechter beurteilt wurde.

Neben der in Kapitel 4.11.1 festgestellten Reduktion des Gesamtphenolgehalts nach Magnetit-Partikel-Behandlung, kann ein weiteres Oxidationsproblem die Bildung von Aldehyden sein, welche zu sensorischen Beeinträchtigungen führen [382]. Das könnte eine Erklärung für die deutlich wahrnehmbare Reifeentwicklung beim Gewürztraminer sein. Zum Beispiel konnte Simpson (1978) in Riesling die Bildung einer Reihe von Substanzen infolge einer oxidativen Alterung nachweisen [383]. Zu solchen geruchlich aktiven Verbindungen zählten u.a. höhere Aldehyde einschließlich Benzaldehyd und Furfurale. Flak et al. (2011) nannten u.a. die in Kapitel 4.12.3 identifizierten Aromakomponenten Diethylsuccinat, Ethylcaprat, Ethyllactat, Isobuttersäure und Benzaldehyd als mögliche Alterungs- bzw. Oxidationsaromen [408].

Bei der Oxidation von Wein reagiert der aufgenommene Sauerstoff zunächst mit den Metall-Ionen und Phenolen [127, 388]. Diese können den Sauerstoff wiederrum auf andere Weinhaltstoffe übertragen. Wie bereits beschrieben, durchläuft der Sauerstoff dabei eine Reaktionskette (s. Abb. 92) [406].

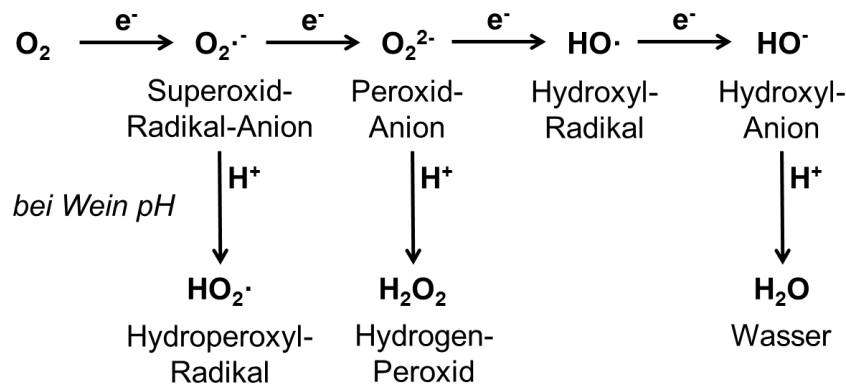


Abb. 92 Reaktionskette der Sauerstoffreduktion nach [406]

Demgegenüber sind alle Zwischenstufen bzw. Intermediärprodukte stärkere Oxidanten als der ursprüngliche Sauerstoff. Von diesen konnten im Wein bisher Peroxide direkt nachgewiesen werden [381, 388, 389].

Im Gewürztraminer konnte eine Reihe an möglichen Oxidationssubstanzen in der behandelten Probe gefunden werden (vgl. Kapitel 4.12.3). Besonders der stark erhöhte Gehalt an Ethylcaprat könnte eine mögliche Erklärung für die deutlich stärkere Wahrnehmung des Attributs „Reifeentwicklung“ sein. Interessant war weiterhin, dass es lediglich beim Gewürztraminer mit einer deutlich geringeren Konzentration an Eisen (10,0 mg/l) im Vergleich zum Morio Muskat (32,6 mg/l) zu negativen sensorischen Beeinträchtigungen kam. Somit scheinen viele Faktoren die Oxidation der Weinhaltstoffe zu beeinflussen bzw. eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst die sensorischen Wahrnehmungen.

Die sensorischen Untersuchungen der Weine zeigten ebenfalls, dass diese ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Weine darstellen, da zwar ohne Probleme die freigesetzten Aromastoffe bestimmt werden konnten, aber mögliche Fehlgerüche durch die Eisenmigration aufgrund der Vielzahl möglicher Oxidationsprodukte nur schwer zu erfassen sind.

4.14 Prozessbetrachtung

Es gibt mehrere Aspekte, die beim Einsatz von Enzymen zur Weinaromaverbesserung berücksichtigt werden müssen bzw. weswegen der Einsatz handelsüblicher Enzympräparate bislang noch begrenzt ist. Da wäre zum einen der Traditionalismus der Winzer zu nennen sowie der Einfluss der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Traubenmost und Wein (pH, Temperatur, Ethanol, Zucker, Phenole, etc.) auf die Enzymaktivitäten [13]. Diese Aspekte treffen ebenfalls auf immobilisierte Enzyme zur Weinaromaverbesserung zu. Trotz allem existieren zahlreiche Studien, die sich mit der Immobilisierung von Glycosidasen zur Aromaverbesserung befassen. Kommerzielle Enzympräparate werden in aller Regel am Ende oder nach der Gärung eingesetzt. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um Batch-Prozesse, d.h. die Enzyme werden dem Wein zugesetzt, zwei bis drei Wochen im Wein belassen und anschließend mit Betonit inaktiviert sowie ausgefällt. Es gibt kaum Publikationen, die eine Freisetzung der Aromastoffe mit Hilfe von kontinuierlichen Reaktoren, z.B. Fest- oder Fließbettreaktoren, darstellen. Bei der Verwendung immobilisierter Enzyme in einem Festbettreaktor durchströmt der Wein ein Festbett mit immobilisierten Biokatalysatoren und entsprechend der Verweilzeit des Weins im Festbett wird kontinuierlich Aroma freigesetzt. Gueguen et al. (1997) verglichen einen Festbett- (mit einem Volumen von 60 ml) und Fließbettreaktor (mit einem Volumen von 200 ml) zur enzymatischen Aromafreisetzung [28]. Mit Hilfe dieser Reaktoren im Labormaßstab wurden durch eine Gesamt-Aktivität an immobilisierten Enzymen von 6,67 μkat im jeweiligen Reaktor kontinuierlich Aromen in einem Liter Wein (Muskateller) freigesetzt. Anhand der Flussrate des Weins durch die Reaktoren konnte die Menge an freigesetzten Aromastoffen gesteuert werden. Der Fließbettreaktor wurde dabei im Recycling-Modus betrieben, d.h. der Produktstrom wurde mit dem Substratstrom gemischt. Über diesen Versuchsaufbau konnten Aromen mittels immobilisierten Glycosidasen erfolgreich im Wein freigesetzt werden. Im Festbettreaktor konnte dabei eine nahezu maximale Hydrolyse-Rate an Aromapräkursoren nach ca. 17 Stunden erreicht werden. Bei der Variante Fließbettreaktor war nach ca. 6 Stunden das Maximum an Aromen freigesetzt.

Durch die Verwendung eines kontinuierlichen Reaktors ist demnach eine bessere Kontrolle der erhaltenen Hydrolyse-Rate der Aromapräkursoren gegeben. Die Intensität der Aroma-Freisetzung kann so über die Länge des Betts und den Produkt-Durchfluss reguliert werden [29], somit bietet der kontinuierliche Prozess gute

Steuerungsmöglichkeiten. Außerdem entfällt ein nachgeschalteter Klärungs- bzw. Filtrationsschritt, um die Enzyme wieder vom Wein abzutrennen. Nachteile der Reaktoren sind zum einen der Energieeintrag (Strömungen im Reaktor), besonders beim Fließbettreaktor, und die dadurch hervorgerufenen Scherkräfte bzw. der Lufteintrag (mögliche Schaumbildung), welcher beim Wein unerwünscht ist [410]. Ein Lufteintrag kann außerdem zu Aromaverlusten und erhöhter Oxidation führen [41, 410]. Die anschließende Reinigung des Reaktorbettes kann ein weiteres Problem darstellen. Zum Beispiel kann es durch die vergrößerte Oberfläche der Enzym-Träger zu Mikroorganismen-Wachstum kommen und aus diesem Grund zu einer möglichen Kontamination des Endprodukts. Ferner muss entsprechendes Prozess-Know-how vorhanden sein, um den Prozess gezielt steuern zu können, womit ein hoher Analyse-Aufwand einhergeht. Die Investitionskosten in neue Reaktor-Behälter sind ein zusätzlicher Nachteil für die Winzer. Ein weiteres Hindernis, bei einem kontinuierlichen Prozess müsste der Winzer seinen gewohnten Prozess-Ablauf und seine vorhandenen Anlagen ändern. Die Kosten und der Traditionalismus dürften die Winzer davon abhalten solche alternativen Verfahren anzuwenden.

Eine Alternative bietet die Implementierung immobilisierter Enzyme in die bestehenden Batch-Prozesse der Weinherstellung. Dabei stellen besonders an Magnetit-Partikel gekoppelte Enzyme eine gute Möglichkeit dar, solche Enzyme in den vorhandenen Prozess zu integrieren. Die Verwendung an magnetische Partikel gekoppelter Enzyme könnte ähnlich der Anwendung handelsüblicher Enzympräparate erfolgen. Nach der Reaktion der Enzyme im Wein, können diese, anstatt einer anschließenden Inaktivierung und Fällung mittels Betonit, mit einem Hochgradient-Magnet-Separator vor einer bestehenden Filtration entfernt werden. Die separierten Magnetit-Partikel können anschließend regeneriert und beim nächsten Wein-Ansatz wiederverwendet werden. Somit wäre, abgesehen vom Magnet-Separator, keine größere Investition und Änderung am Prozess notwendig. Allerdings ist selbst die Investition in einen Hochgradient-Magnet-Separator für kleine Winzer eine große Hürde, dementsprechend wäre ein solches Verfahren besonders bei größeren Weinkellereien denkbar. Zusätzlich könnte die Vermietung bei Bedarf einer solchen Anlage durch eine Weingenossenschaft oder andere externe Firmen an kleinere Winzer eine Option darstellen.

Bei der Implementierung der an Magnetit-Partikel immobilisierten Enzyme als Batch-Prozess besteht weiterhin das Problem der Abschätzung von Verweilzeit und Menge

an Immobilisat, sowie die Kontrolle der Reaktion bzw. der Hydrolyse-Rate. Dabei wird seit einiger Zeit Forschung betrieben, um die Anwesenheit von Terpenen und deren Glykoside in Trauben bzw. Wein zu verstehen und vorhersagen zu können. Bisher ist es noch nicht möglich die erworbenen Kenntnisse den Weingütern effizient zur Verfügung zu stellen. Zum Beispiel existiert noch keine geeignete Methodik, um den Terpengehalt auf dem Markt präserter Weine effektiv steuern und damit das Aroma gezielt zu verbessern [8, 19]. Ein entscheidender Grund dafür ist unter anderem die Komplexität dieses Themas. Wein ist ein sich über die Zeit stark änderndes Lebensmittel, zum einen hängt die Zusammensetzung stark von der Rebsorte ab, zum anderen haben Parameter, wie Klima, Boden, Lage, Art und Behandlung von Trauben, Most und Wein, einen großen Einfluss [5, 6]. Ebenso ist die sensorische Wahrnehmung von Wein äußerst komplex, eine Vielzahl von geschmacks- und geruchsaktiven Verbindungen prägen das Aroma [6]. Somit ist es nur schwer möglich ein allgemeingültiges Tool zur Aromaverbesserung von Wein zu entwickeln, um den Einsatz der Enzyme abschätzen und kontrollieren zu können. Besonders kleinere Winzer haben nicht die technischen Voraussetzungen, um Parameter wie Glykosid-Gehalt des Mostes bzw. Weins, die Enzymaktivität oder Gehalt an relevanten Aromastoffen vor, während und nach dem Einsatz zu bestimmen. Da sich verschiedene Weinsorten stark voneinander unterscheiden, sind für jede Charge und jeden neuen Wein in Abhängigkeit von Jahrgang und Lage aufwendige Analysen notwendig. Aus diesem Grund kann ein solcher Prozess auf absehbare Zeit nicht genau gesteuert und ein Enzymeinsatz weiterhin nur anhand bestehender Daten abgeschätzt werden. Besonders die notwendigen Analysen zur genauen Prozesssteuerung würden die Kosten für den Winzer deutlich erhöhen und damit verbundene Preisaufschläge beim Wein eventuell die Akzeptanz beim Konsumenten verringern.

Aus genannten Gründen wird daher ein Batch-Prozess zur Aromaverbesserung mittels an Magnetit-Partikel gekoppelter Glycosidasen abgeschätzt und dargestellt. In Abb. 93 ist eine mögliche Implementierung der an Magnetit-Partikel immobilisierten Glycosidasen in einen üblichen Weinherstellungsprozess dargestellt.

Da die immobilisierten Enzyme nicht mittels Betonit inaktiviert und ausgefällt werden müssen, erfolgt die Enzymzugabe im dargestellten Prozess erst nach dem Schönen bzw. Stabilisieren des Weins. Dadurch wird zusätzlich verhindert, dass andere Zusätze, wie Schönungs- und Stabilisationsmittel, die Enzyme negativ beeinflussen.

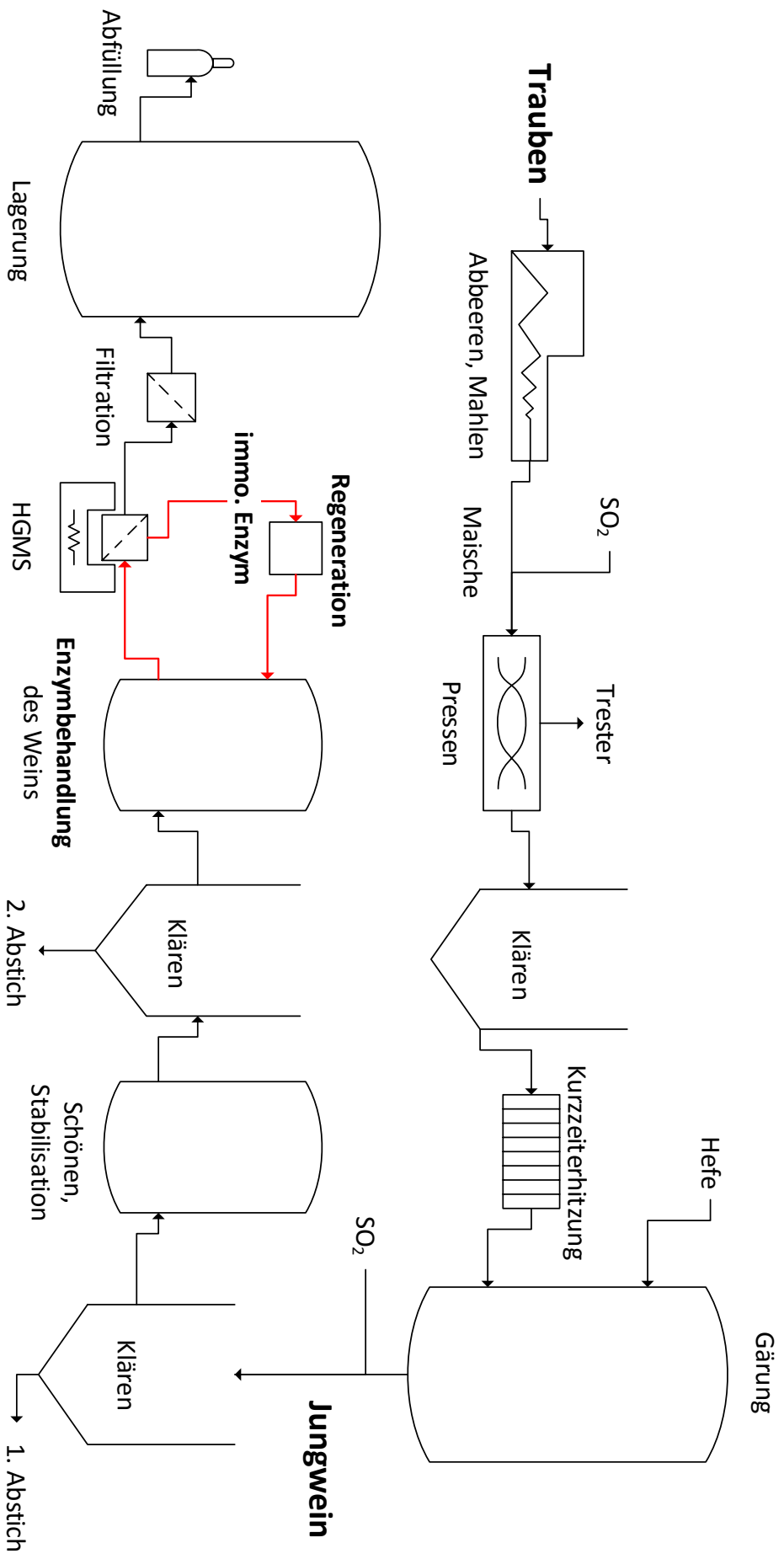


Abb. 93 Schematische Darstellung des Weinherstellungsprozesses mit entsprechender Implementierung magnetischer Enzyme

Die Hydrolyse der Glykoside kann dementsprechend über die Verweilzeit und Menge der immobilisierten Enzyme gesteuert werden. Da nicht bekannt ist, welche Glykoside im Wein vorhanden sind und welche Glycosidasen im Einzelnen wirken müssen, um den entsprechenden Aromastoff freizusetzen, wird vereinfachend nur die Aktivität der β -Glucosidase zur Berechnung der freigesetzten Aglyka herangezogen. Die Menge an freigesetzten Aglyka kann über die ermittelten kinetischen Werte (k_{cat}) anhand folgender Formel vereinfachend berechnet werden (s. Gl. 22):

$$\text{freigesetzte Aglyka} = \frac{k_{cat} * m_E * t}{V_{Wein}} \quad \text{Gl. 22}$$

k_{cat} = ermittelte Wechselzahl

m_E = Menge an eingesetztem Enzym

t = Verweilzeit der Enzyme

V_{Wein} = Volumen des Weins

Anhand der zur Verfügung stehenden Daten wird ein Glykosid-Gehalt von ca. 160 μM (Durchschnitt Gewürztraminer und Morio Muskat, s. Kapitel 4.7) im unbehandelten Wein angenommen. Ausgehend von einer 20 bis 30 %igen Hydrolyse-Rate der im Wein befindlichen Glykoside [20, 377], entspricht das ca. 40 μM freigesetzter Aglyka. Hersteller kommerzieller Enzympräparate schlagen meist eine Verweilzeit von ca. 2 Wochen und den Einsatz von ca. 3 bis 5 g Enzympräparat pro Hektoliter vor. Für die β -Glucosidase des kommerziellen Enzympräparates wurde bei pH 3,5 und 25 °C ein k_{cat} -Wert von 1,8 nkat/mg_E ermittelt (s. Tab. 25, Kapitel 4.5.2). Anhand dieser Annahmen kann die Freisetzung an Aglyka aus einem Liter Wein für ein solches Enzympräparat über Gl. 22 berechnet werden:

$$\begin{aligned} \text{freigesetzte Aglyka} &= \frac{\frac{1,8 \text{ nkat}}{\text{mg}} * 30 \text{ mg} * 336 \text{ h}}{1 \text{ l}} \\ \text{freigesetzte Aglyka} &= \frac{\frac{6,48 \text{ } \mu\text{mol}}{\text{h} * \text{mg}} * 30 \text{ mg} * 336 \text{ h}}{1 \text{ l}} = 65318,4 \text{ } \mu\text{M} \end{aligned}$$

Dieses Ergebnis zeigt, wie schwierig die verfahrenstechnische Betrachtung der Glykosid-Hydrolyse im Wein ist. Ein Glykosid-Gehalt im Wein liegt i.d.R. in einem Bereich von 50 bis 400 μM und somit müsste es aufgrund der ermittelten Menge an freigesetzten Aglyka durch den Enzymeinsatz von ca. 65000 μM immer zu einer Total-Hydrolyse der im Wein enthaltenen Glykoside kommen. Dem ist aber nicht so, i.d.R.

werden lediglich maximal 20 bis 30 % der Glykoside hydrolysiert und diese maximale Rate wird meist erst nach 2 bis 3 Wochen erreicht [20, 377]. Somit scheinen zum einen Glykoside im Wein vorhanden zu sein, die durch die eingesetzten Enzympräparate nicht gespalten werden können und zum anderen kann über die ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit der β -Glucosidase nicht auf die spätere Hydrolyse-Rate der Glykoside im Wein geschlossen werden. Ein möglicher Grund für die enorme Abweichung zwischen tatsächlicher und berechneter Menge an freigesetzten Aglyka könnte die Verwendung eines synthetischen Glykosids zur Ermittlung der kinetischen Daten sein. Dieses Substrat besitzt wahrscheinlich eine deutlich höhere Affinität an das aktive Zentrum der β -Glucosidase zu binden, als natürliche Glykoside und führt dadurch zu deutlich verzerrten Ergebnissen [152, 366, 369, 411]. Der Unterschied in der Aktivität zwischen synthetischem Glykosid als Substrat (pNPG) und natürlichen Glykosiden ist in aller Regel deutlich. Zum Beispiel besaß eine β -Glucosidase lediglich eine 5,8 %ige Aktivität ein Quercetin-7-O- β -D-Glukosid im Vergleich zu pNPG zu spalten [152]. Die Affinität an das aktive Zentrum zu binden war dementsprechend deutlich vermindert. Allerdings müsste es mit dieser verminderten Aktivität immer noch zu einer Total-Hydrolyse der Glykoside im Wein kommen. Da es sich bei der Hydrolyse der Glykoside im Wein aber um einen sequentiellen Mechanismus unterschiedlicher Glycosidasen und verschiedenartigster natürlicher Glykoside handelt, spielt eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle bei der Hydrolyse der Glykoside. Ein weiterer Beleg für die Komplexität der Glykosid-Hydrolyse ist die Reduktion der Glykoside durch Behandlung mit den konjugierten Glycosidasen im Gewürztraminer und Morio Muskat und der Menge an freigesetzten Aglyka. So wurden insgesamt 12,26 μ M (0,16 μ M Terpene und 12,1 μ M Phenole) an freigesetzten Aglyka im Gewürztraminer und 23,34 μ M (1,14 μ M Terpene und 22,2 μ M Phenole) im Morio Muskat detektiert. Demgegenüber steht eine gemessene Reduktion an Glykosiden durch den Einsatz der immobilisierten Enzyme von 17,5 μ M im Gewürztraminer und 79,2 μ M im Morio Muskat (s. Kapitel 4.7, 4.11.2 und 4.12.2). Somit wurde eine deutlich größere Anzahl an Aglyka freigesetzt, als entsprechend detektiert werden konnten. Neben den glykosidisch gebundenen Terpenen kommt ebenfalls eine hohe Anzahl anderer Stoffe glykosidisch gebundenen im Wein vor. Die Steigerung einiger Phenole, wie Kaffee-, p-Coumarsäure und Resveratrol, bestätigen diese Annahme. Das zeigt wiederum, wie komplex die Hydrolyse der glykosidischen Komponenten im Wein ist und das eine Vorhersage bzw. Abschätzung der Freisetzung an Aromastoffen durch einen

Enzymeinsatz aufgrund der Komplexität nicht möglich ist. Eine Abschätzung der Verweilzeit und Menge an gekoppelten Enzyme über die ermittelten kinetischen Daten macht folglich keinen Sinn. Allerdings können diese Parameter anhand der für die kommerziellen Enzympräparate vorgeschlagenen Herstellerdaten und den Vergleichswerten des kommerziellen Enzympräparates mit dem Immobilisat abgeschätzt werden.

Die ermittelten kinetischen Daten (s. Kapitel 4.5) ergaben eine etwa um die Hälfte reduzierte Reaktionsgeschwindigkeit des Immobilisats pro mg Partikel. Außerdem war der Anteil der Arabinosidase im Immobilisat im Vergleich zum Ausgangs-Enzympräparat deutlich vermindert (s. Kapitel 4.3). Dementsprechend war, auf die Masse der Partikel bezogen, von einer mindestens doppelt so großen Menge an Immobilisat auszugehen, um eine ähnliche Hydrolyse-Rate zu erreichen. Bei den in dieser Arbeit behandelten Weinen, wurde anhand dieses Aspektes die dreifache Menge, auch um die deutliche Reduktion an Arabinosidase auszugleichen, an Immobilisat im Vergleich zum kommerziellem Enzympräparat eingesetzt (s. Kapitel 3.9). Die erhaltenen Aroma-Freisetzungsraten der Enzyme unterschieden sich beim Morio Muskat demnach nicht signifikant voneinander, beim Gewürztraminer konnte dagegen ein geringer Unterschied zwischen freien und immobilisierten Glycosidasen festgestellt. So dass diese Annahme in Teilen bestätigt werden konnte.

Daraus ergibt sich eine Menge von ca. 15 g Immobilisat um einen Hektoliter Wein zu behandeln mit einer ungefähren Verweilzeit von 2 Wochen. Bei „Standard“-Weinen werden Gärungen meist in Stahltanks in einer Größenordnung von 200 bis mehr als 2000 hl eingesetzt [39]. Ausgehend von einer Enzymbehandlung von 500 hl Wein in einer größeren Weinkellerei, müssten in einem 500 hl-Behälter demzufolge 7,5 kg des Immobilisats eingesetzt werden. Zur Verkürzung der Verweilzeit könnte die Menge an Immobilisat auch entsprechend erhöht werden, da diese wieder mittels Hochgradient-Magnet-Separator abgetrennt und wiederverwendet werden können. Bei den kommerziellen Enzympräparaten wäre dies nicht ohne Probleme möglich, zum einen würde der erhöhte Enzymzusatz die Kosten steigern und zum anderen müsste anschließend ebenfalls die Menge an Bentonit erhöht werden, um die Enzyme zu inaktivieren und auszufällen. Dabei ist als besonders problematisch anzusehen, das Bentonit nicht nur Enzyme bindet und inaktiviert, sondern ebenfalls Aromastoffe und andere Stoffe binden kann, was wiederum den Wein negativ beeinflusst.

In dieser Arbeit konnten die Magnetit-Partikel ohne Probleme mit dem eingesetzten Hochgradient-Magnetfeld-Separator wieder vom Wein abgetrennt werden (s. Kapitel 4.9). Bei dem eingesetzten Magnet-Separator handelte es sich um einen Prototypen, so dass u.a. keine Aussage zu den späteren Herstellungskosten des Separators gemacht werden kann. Die Flussrate mit 400 ml/min ist für einen späteren Einsatz in der Weinherstellung ebenfalls zu gering. Bei einer Behandlung von den genannten 500 hl Wein würde die Separation der Magnetit-Partikel unter diesen Voraussetzungen 2083 Stunden dauern. Zum Vergleich, übliche Pumpen in der Weinherstellung besitzen eine Leistung von bis zu 600 hl/h bzw. 60 m³/h. Der Magnet-Separator sollte so ausgelegt werden, dass eine Separation mit den vorhandenen Pumpen möglich und in ca. 2 bis 4 Stunden abgeschlossen ist, bei 500 hl behandeltem Wein entspricht das einer Flussrate von ca. 200 hl/h bzw. 20 m³/h.

Am Ende der Separation der Magnetit-Partikel aus dem Wein wird das Hochgradient-Magnetfeld des Separators ausgeschaltet und die Partikel können mit Hilfe von Wasser wieder aus der Filtermatrix ausgespült werden.

Zur Reinigung sollten die Partikel nochmals aus der Rückspül-Flüssigkeit separiert und abermals aus der Filtermatrix ausgespült werden, um die Partikel anschließend entsprechend lagern zu können. Dabei hat sich gezeigt, dass die an Magnetit-Partikel gekoppelten Enzyme in einem 0,1 M Citrat/Phosphat-Puffer äußerst stabil sind und kaum an Aktivität verloren haben (s. Kapitel 4.6). Die separierten Partikel können somit in einem geeigneten Puffer ohne Probleme bis zum nächsten Einsatz gelagert werden. Kurz vor der Abfüllung findet i.d.R. eine weitere Filtration des Weins statt, somit würden durch diese abschließende Filtration eventuell nicht-separierte Magnetit-Partikel vollständig entfernt und das Endprodukt wäre restlos frei von Enzymen und Partikeln. Vorteile des postulierten Prozesses sind die gute Integration in bestehende Weinherstellungsprozesse, im Vergleich zum kontinuierlichen Prozess geringere Investitionen in neue Anlagen, eine gute Abtrennung und Wiederverwendbarkeit der gekoppelten Enzyme, enzymfreies Endprodukt, nahezu identische Anwendung im Vergleich zu bestehenden Enzympräparaten und es ist kaum neue Prozess-Expertise für die Winzer notwendig. Außerdem ist eine solche Verfahrensweise auch auf andere Herstellungsprozesse adaptierbar, z.B. zur Verwendung immobilisierter pektolytischer Enzympräparate in der Saft-Herstellung.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der Winzertechnik werden bereits zahlreiche Enzympräparate für diverse Anwendungen und Ziele eingesetzt. So werden u.a. Pektinasen zur Erhöhung der Saftausbeute und zur besseren Filtrierbarkeit verwendet. Daneben gibt es viele kommerzielle Enzyme zur Verbesserung bzw. Freisetzung von Aroma speziell für Weißwein. Damit jedoch eine gewisse Aromabalance gehalten werden kann, muss das Enzymgemisch nach einiger Zeit durch eine Bentonitschönung inaktiviert bzw. ausgefällt werden und geht damit verloren. Neben dem Verlust an aktivem Enzym ist hierbei besonders nachteilig, dass bei jedem weiterem Gärungsansatz neues Enzympräparat eingesetzt werden muss. Darüber hinaus besteht die Gefahr, dass eine gewisse Rest-Enzymaktivität im Wein erhalten bleibt. Letzteres führt dazu, dass derart behandelte Weine sensorisch nach einem halben bis einem Jahr abbauen. Da gesetzliche Anforderungen die Anwesenheit von exogenen Proteinen im Wein verbietet, ist eine vollständige Entfernung der Enzyme unerlässlich. Eine Immobilisierung solcher eingesetzten Enzyme stellt eine Möglichkeit dar, die genannten Probleme zu lösen.

Aufgrund bekannter Vorteile gegenüber löslichen Enzympräparaten, bietet eine Enzym-Immobilisierung an magnetische Träger viele Vorteile für industrielle Prozesse, wie die Kontrolle der enzymatischen Reaktion und enzymfreie Produkte, wobei die Führung der enzymatischen Reaktion ein wichtiger Faktor für die Behandlung von Weinen für eine schnelle und gezielte Freisetzung der Aromavorstufen ist. Bislang wurden noch keine Enzyme an magnetische Träger für einen Einsatz im Wein gekoppelt. Besonders die vollständige Entfernung mittels Magnet-Separation und die anschließende Wiederverwendung sind dabei wichtige Vorteile solcher an Magnetit-Partikel immobilisierten Enzyme.

Bei Enzympräparaten zur Weinaromaverbesserung handelt es sich um pektolytische Enzymmischungen mit einer β -Glucosidase-Nebenaktivität. Gerade in Weißweinsorten, wie Morio Muskat und Gewürztraminer, kommen viele Aromen glykosidisch gebunden vor und sind in dieser Form sensorisch nicht wirksam. Die glykosidischen Verbindungen können durch eine β -Glucosidase-Aktivität gespalten und das entsprechende Aroma-Aglykon freigesetzt werden, um so die Anzahl und Menge an sensorisch aktiven Verbindungen im Wein zu erhöhen. Dabei kommen speziell Terpene, wie Linalool, Terpineol, Citronellol, Nerol und Geraniol, als glykosidisch gebundene Verbindungen im Wein vor. Als freie Aglyka rufen sie ein

blumig-fruchtiges Aroma hervor. Allerdings sind die Aroma-Vorstufen in aller Regel nicht an einen einfachen Glucose-Rest als Monoglukosid gebunden, sondern kommen größtenteils als Diglykoside vor. Die β -Glucosidase kann allerdings das Aglykon bzw. den Aromastoff lediglich von einem Monoglukosid abspalten. Daher müssen andere Enzyme vorgeschaltet sein, um weitere Zucker vorher abzuspalten. Bei der Freisetzung der Aromastoffe liegt ein sequentieller Mechanismus vor, d.h. es werden ebenfalls andere Glycosidasen, wie Arabinosidase, Rhamnosidase oder Xylosidase, benötigt, um das Aroma freizusetzen. Aufgrund dessen muss es sich bei den für die Aromafreisetzung eingesetzten Enzymen immer um eine Mischung aus diesen Glycosidasen handeln. Gerade die Immobilisierung mehrerer Enzyme auf einen Träger ist dabei eine Herausforderung, da jedes Enzym andere Bedingungen benötigt, um erfolgreich an den Träger koppeln zu können. Die simultane Immobilisierung mehrere Enzyme kann daher immer nur einen Kompromiss darstellen. Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich war mehrere Glycosidasen verschiedener Spezifität erfolgreich aus einem kommerziellen, önologischen Enzympräparat an Magnetit-Partikel zu koppeln und dadurch die Aromaausprägung von Wein positiv zu beeinflussen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Enzyme erfolgreich an magnetische Partikel zu koppeln und mittels analytischer und sensorischer Untersuchungen die Wirksamkeit und Eigenschaften der Enzyme hinsichtlich eines Einsatzes in der Winzertechnik zu bewerten. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der β -Glucosidase und der damit verbundenen Aromafreisetzung in Weißwein.

Als magnetische Partikel wurden superparamagnetische Magnetit-Partikel, die in einer Matrix aus Polyvinylalkohol (PVA) eingeschlossen waren, verwendet. Die **Immobilisierung** der Enzyme an Magnetit-Partikel wurde bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt, um die optimalen Bedingungen zu evaluieren, unter denen ein möglichst hoher Anteil der Glycosidasen aktiv an die Träger gekoppelt werden konnte. Dabei stellten sich pH-Werte 3,8 bis 4,0 als optimal heraus, um möglichst viele Glycosidasen aktiv an den Träger zu konjugieren. Generell hatte die β -Glucosidase eine relativ hohe Kopplungs-Affinität zum Träger, so dass im immobilisierten Enzymgemisch andere Mengenverhältnisse der einzelnen Glycosidase vorlagen als im Ausgangsprodukt. Die Arabinosidase und Rhamnosidase kamen in deutlich geringeren und die Xylosidase in leicht reduzierten Anteilen vor. Vorteil der angewendeten Immobilisierungsmethode ist, dass keine Aufreinigung des

kommerziellen Enzympräparates notwendig sowie die Methode schnell und einfach in der Durchführung ist.

Nach der erfolgreichen Immobilisierung wurden die Eigenschaften der Glycosidasen hinsichtlich einer möglichen Änderung im **Aktivitätsprofil** untersucht. Bei den untersuchten Bedingungen (pH, Temperatur, Ethanol-, Glucose-, Fructose-Gehalt) konnte für die β -Glucosidase kein signifikant verändertes Aktivitätsprofil festgestellt werden, somit kam es zu keiner negativen Beeinträchtigung der β -Glucosidase durch die Kopplungsreaktion. Ähnliches gilt für die anderen drei Glycosidasen Arabinosidase, Rhamnosidase und Xylosidase. Auch dort blieb die spezifische enzymatische Aktivität erhalten. Allerdings kam es bei allen Enzympräparaten zu einer deutlichen Inhibition der β -Glucosidase-Aktivität durch Glucose, weswegen die Enzyme erst am Ende oder nach der Gärung dem Wein zugesetzt werden sollten, wenn die Glucose-Konzentration möglichst gering ist. Bei den **kinetischen Untersuchungen** wurden anhand der K_M -Werte keine signifikanten Änderungen der β -Glucosidase im Vergleich immobilisiert zu frei festgestellt. Die Wechselzahl k_{cat} war bei der gekoppelten β -Glucosidase bei einigen Bedingungen (Glucose) vermindert bzw. wurde stärker durch die Variation dieser Bedingungen reduziert. Allerdings muss hinsichtlich der Wechselzahl k_{cat} beachtet werden, dass es schwierig war die erhaltene Ergebnisse zu vergleichen, da sich die Enzym-Zusammensetzung nach der Kopplung deutlich änderte und damit die Bezugspunkte, Menge an eingesetztem Enzym bzw. der Proteingehalt dieser Enzymmischung, dementsprechend nicht mehr einheitlich waren. Durch die Immobilisierung änderten sich zwar die Verhältnisse der einzelnen Glycosidasen zueinander, die Aktivitätsprofile der Glycosidasen blieben aber nahezu identisch und die katalytischen Eigenschaften schienen sich nicht signifikant zu ändern. Die verwendete Immobilisierungsmethode hatte folglich keine negativen Einflüsse auf die Struktur der jeweiligen Glycosidase und es kam zu keinen signifikanten Konformationsänderungen.

Neben einer möglichen Änderung des Aktivitätsprofils der Glycosidasen durch die Kopplung, ist natürlich auch die **Stabilität** der gekoppelten Enzyme besonders im Wein interessant und galt es zu bewerten. Dabei wurden bei einer Lagerung der an Magnetit-Partikel konjugierten Enzyme im Wein lediglich leichte Verluste an Aktivität nach 100 Tagen detektiert. Die β -Glucosidase wies auch nach diesem Zeitraum eine Aktivität von ca. 90 % im Vergleich zur Anfangsaktivität auf, die Arabinosidase und Xylosidase von je ca. 80 % und die Rhamnosidase von 74 % nach 70 Tagen. Somit

war die Kopplung auch im Wein stabil und stellte kein Hindernis für einen Einsatz im Wein dar. Eine Lagerung im Modell-Wein (10 Vol.-% Ethanol, 9 g/l Weinsäure, pH 3,5) hingegen führte zu deutlichen Aktivitätsverlusten, 8,7 % Rest-Aktivität der β -Glucosidase nach 100 Tagen. Die anderen drei Glycosidasen waren hingegen stabiler, Arabinosidase wies eine Rest-Aktivität von 67,4 %, Xylosidase von 52,7 % und Rhamnosidase keinen Verlust nach 70 Tagen auf. Der deutliche Verlust an Aktivität im Modell-Wein im Vergleich zur Stabilität der β -Glucosidase im Wein (enthielt 3,0 g Weinsäure) könnte mit der höheren Konzentration an Weinsäure von 9 g/l im Modell-Wein erklärt werden. Die Gesamtsäure schien in höheren Konzentrationen einen negativen Effekt auf die immobilisierte β -Glucosidase zu haben.

Neben der Langzeitstabilität war auch die Beeinflussung der **Magnet-Separation** im Hinblick auf die Enzymaktivität interessant und ließ Rückschlüsse auf die Wiederverwendbarkeit der Enzyme zu. Bei den durchgeführten Separationsversuchen mit einem entsprechenden Hochgradient-Magnet-Separator der Magnetit-Partikel aus einem handelsüblichen Wein, konnte nach 5-maliger Separation kein signifikanter Verlust an Aktivität festgestellt und die Magnetit-Partikel konnten mit nahezu 100 % aus dem Wein rückgewonnen werden.

Da die Enzyme an Magnetit-Partikel gekoppelt wurden, ist eine mögliche **Eisenmigration** aus den Partikeln in den Wein ebenfalls ein wichtiges Kriterium und wurde entsprechend untersucht. Erhöhte Eisengehalte können zu drastischen Qualitätseinbußen und zu erhöhter Oxidation im Wein führen. Durch den Einsatz der Magnetit-Partikel konnten teilweise stark erhöhte Eisen-Konzentrationen mit bis zu über 60 mg/l im Wein festgestellt werden. Übliche Konzentrationen sollten im Wein unter 5 mg/l liegen, da bereits durch 5 bis 10 mg/l Eisen ein weiß-grauer Schleier im Wein auftreten kann. Es wurde vermutet, dass die Gesamtsäure eines Weins Einfluss auf die Eisenmigration nehmen kann. Untersuchungen dazu zeigten eindeutig, dass mit steigender Weinsäure-Konzentration die Migration an Eisen aus den Partikeln in die Lösungen deutlich zunahm. Der Gehalt und der damit verbundene niedrigere pH-Wert hatten einen signifikanten Einfluss auf die Eisenmigration. Bei der Referenz-Probe ohne Zusatz von Weinsäure stieg der Eisengehalt nach 29 Tagen auf 2,1 mg/l und blieb konstant. Bei 1 g/l Weinsäure erreichte die Eisen-Konzentration nach 43 Tagen mit 3,2 mg/l ihr Maximum, bei einer Konzentration von 15 g/l Weinsäure stieg diese bereits nach 37 Tagen auf die maximale Konzentration von 69,5 mg/l an. Somit

stellt die Eisenmigration aus den Partikeln noch ein erhebliches Problem beim späteren Einsatz in der Winzertechnik dar.

Da zum einen phenolische Verbindungen ebenfalls glykosidisch gebunden vorkommen und zum anderen die erhöhten Eisengehalte im Wein durch den Enzymeinsatz möglicherweise zu einer erhöhten Oxidation führen können, war die Untersuchung der **phenolischen Inhaltsstoffe** ebenfalls relevant, um einen Einsatz der Magnetit-Partikel bewerten zu können. Die Untersuchungen zum Gesamtphenolgehalt ergaben bei den mit Magnetit-Partikel behandelten Weinen geringere Werte. Infolgedessen kann von einem oxidativen Abbau durch die erhöhte Eisen-Konzentration ausgegangen werden. Weitere Untersuchungen einiger Einzelphenole bestätigten diese Annahme, für Catechin und Epicatechin wurden in den behandelten Weinen signifikant geringere Gehalte gefunden. Insbesondere Catechine sind oxidationsanfällig und stellen somit einen möglichen Indikator für oxidative Vorgänge im Wein dar. Neben verminderten Phenolgehalten konnten allerdings auch einige Phenole durch den Enzymeinsatz gesteigert werden. Unter anderem konnte durch einen Enzymeinsatz die Konzentration an Kaffeesäure, p-Coumarsäure und Resveratrol signifikant gesteigert werden. Dabei zeigte ein Vergleich zwischen Immobilisat und freiem Enzympräparat, dass durch das nicht-immobilisierte Enzym bzw. die freien Glycosidasen etwas mehr der untersuchten Phenole freigesetzt werden konnte. Dieser Effekt kann mit der durch die Kopplung veränderten Enzym-Zusammensetzung erklärt werden. Ein geringer Anteil an Arabinosidase, Rhamnosidase und Xylosidase koppelte an die Magnetit-Partikel, aber aufgrund des sequentiellen Mechanismus sind mehrere Glycosidasen von Bedeutung, um das entsprechende Aglykon freizusetzen.

Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die gekoppelten Enzyme fähig sind, **Aromastoffe** aus Wein freizusetzen. Die Terpen-Konzentration konnte im Gewürztraminer und Morio Muskat, sowohl frei als auch immobilisiert, durch Enzymeinsatz signifikant gesteigert werden. Dies betraf besonders die Monoterpene Nerol und Geraniol. Auch hier war die Steigerungsrate beim nicht-immobilisierten Enzympräparat etwas höher als bei der immobilisierten Variante.

Zusätzlich wurden **sensorische Untersuchungen** der mit dem Immobilisat behandelten Weine einbezogen. Es ergaben sich zwei konträre Ergebnisse. Beim behandelten Morio Muskat konnten die Prüfer signifikant höhere Werte für die Geruchsattribute „Apfel“, „Maracuja“, „Zitrone“, „Blumig“ sowie bei den

Geschmacksattributen „Apfel“ und „Blumig“ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe feststellen. Der behandelte Gewürztraminer dagegen wurde signifikant niedriger bewertet. Besonders die Geruchsattribute „Apfel“, „Zitrone“ sowie „Fruchtig“ wurden weniger intensiv, das Attribut „Rauchig“ dagegen höher bewertet. Die beiden Geschmacksattribute „Reifeentwicklung“ und „Rauchig“ wurden beim behandelten Gewürztraminer ebenfalls höher bewertet, was auf oxidative Abbauvorgänge bedingt durch die erhöhte Eisenmigration schließen lässt. Eine weitere gaschromatographische Untersuchung auf mögliche **Oxidations- und Alterungssubstanzen** ergab insbesondere für Ethylcaprat signifikant höhere Werte. Speziell dieser Stoff wird mit einem Alterungston in Verbindung gebracht.

Eine **Prozessbetrachtung** der Magnetit-Partikel in der Weinherstellung zeigte, dass diese gut in existierende Batch-Prozesse integriert werden können und sich kaum Änderungen zum bestehenden Einsatz kommerzieller Enzympräparate ergeben. Ein kontinuierlicher Einsatz der immobilisierten Enzyme bietet zwar gute Steuerungsmöglichkeiten und ein nachgeschalteter Klärungs- bzw. Filtrationsschritt zum Entfernen der Enzyme könnte entfallen. Allerdings sind der Energieeintrag und die dadurch hervorgerufenen Scherkräfte bzw. Lufteintrag, die beim Wein unerwünscht sind, nachteilig. Die Investitionskosten in neue Reaktor-Behälter sind ein zusätzlicher Nachteil für die Winzer. Ein weiteres Hindernis, bei einem kontinuierlichen Prozess müsste der Winzer seinen gewohnten Prozessablauf und seine vorhandenen Anlagen ändern sowie über entsprechende Prozess-Expertise verfügen, um den Prozess gezielt steuern zu können. Vorteile eines Batch-Prozesses sind die gute Integration in bestehende Weinherstellungsprozesse, im Vergleich zu einem kontinuierlichen Prozess geringere Investitionen in neue Anlagen, eine gute Abtrennbarkeit und Wiederverwendbarkeit der gekoppelten Enzyme, enzymfreies Produkt, nahezu identische Anwendung im Vergleich zu bestehenden Enzympräparaten und es ist kaum neues Prozess-Know-how für die Winzer notwendig. Die Prozessbetrachtung zeigte allerdings auch, wie komplex die Hydrolyse der glykosidisch gebundenen Stoffe im Wein ist, da eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle bei der Hydrolyse der Glykoside spielt. So wurde eine deutlich größere Menge Aglyka im Wein freigesetzt, als entsprechend detektiert werden konnte. Neben den glykosidisch gebundenen Terpenen kamen ebenfalls eine hohe Anzahl anderer Stoffe glykosidisch gebunden im Wein vor. Die Steigerung einiger Phenole, wie Kaffee-, p-Coumarinsäure und Resveratrol, konnten diese Annahme bestätigen. Außerdem scheint der Anteil

glykosidisch gebundener Phenole höher als der Anteil glykosidisch gebundener Aromastoffe zu sein. Eine exakte Vorhersage der Freisetzung von Aromastoffen durch einen Enzymeinsatz ist aufgrund der Komplexität des Weins und der Glykosid-Hydrolyse nur sehr schwer durchführbar und es ist zurzeit noch nicht möglich, die erworbenen Kenntnisse zur Hydrolyse der Glykoside den Weingütern effizient zur Verfügung zu stellen. Die Enzymmenge und Verweilzeit kann allerdings anhand der Herstellerangaben für die kommerziellen Enzympräparate und den Vergleichswerten des kommerziellen Enzympräparates mit dem Immobilisat abgeschätzt werden.

Insgesamt konnten die Glycosidasen β -Glucosidase, Arabinofuranosidase, Rhamnosidase und Xylosidase erfolgreich an die verwendeten Magnetit-Partikel immobilisiert und deren mögliche Wiederverwendbarkeit gezeigt werden. Außerdem konnte durch den Einsatz dieser Enzyme der Gehalt an Terpenen und einiger Phenole im Wein signifikant gesteigert werden. Diese Erkenntnisse zeigen, dass ein Einsatz der an Magnetit-Partikel gekoppelten Glycosidasen in der Winzertechnik möglich ist und zu den gewünschten Ergebnissen führen kann. Allerdings führt diese Anwendung auch zu deutlich höheren Eisen-Konzentrationen in den behandelten Weinproben, was wiederum zu Qualitätseinbußen führen kann. Aus diesem Grund sind die in dieser Arbeit verwendeten Partikel nicht für einen Einsatz in der Winzertechnik geeignet. Diese bedürfen weiterer Entwicklung, da für einen erfolgreichen Einsatz möglichst inerte Partikel vorliegen sollten, um jegliche negativen Effekte auszuschließen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Verdú Jover A J, Lloréns Montes F J & Fuentes Fuentes, María del Mar (2004). Measuring perceptions of quality in food products. The case of red wine. *Food Quality and Preference*, **15** (5), S. 453–469.
- [2] Charters S & Pettigrew S (2007). The dimensions of wine quality. *Food Quality and Preference*, **18** (7), S. 997–1007.
- [3] King E S, Kievit R L, Curtin C, Swiegers J H, Pretorius I S, Bastian S E & Leigh Francis I (2010). The effect of multiple yeasts co-inoculations on Sauvignon Blanc wine aroma composition, sensory properties and consumer preference. *Food Chemistry*, **122** (3), S. 618–626.
- [4] Villamor R R & Ross C F (2013). Wine Matrix Compounds Affect Perception of Wine Aromas. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **4** (1), S. 1–20.
- [5] Rapp A (1992). Aromastoffe des Weines. *Chemie in unserer Zeit*, **26** (6), S. 273–284.
- [6] Styger G, Prior B & Bauer F F (2011). Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38** (9), S. 1145–1159.
- [7] Günata Y Z, Bayonove C L, Baumes R L & Cordonnier R E (1985). THE AROMA OF GRAPES. I. EXTRACTION AND DETERMINATION OF FREE AND GLYCOSIDICALLY BOUND FRACTIONS OF SOME GRAPE AROMA COMPONENTS. *J. Chromatogr. A*, **331**, S. 83–90.
- [8] Mateo J J & Jiménez M (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr. A*, **881**, S. 557–567.
- [9] Bourquelot E & Bridel M (1913). Synthèse du géranylglucoside β à l'aide de l'émulsine: sa présence dans les végétaux. *CR Acad. Sci. Paris*, **157**, S. 72–74.
- [10] Goris A (1924). Sur la composition chimique des fruits verts de Vanille et le mode de formation du parfum de la Vanille. *CR Acad. Sci. Paris*, **179**, S. 70–72.
- [11] Sarry J-E & Günata Y Z (2004). Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry*, **87** (4), S. 509–521.
- [12] Günata Y Z, Bitteur S, Brillouet J M, Bayonove C L & Cordonnier R E (1988). SEQUENTIAL ENZYMIC HYDROLYSIS OF POTENTIALLY AROMATIC GLYCOSIDES FROM GRAPE. *Carbohydrate Research*, **184**, S. 139–149.
- [13] Colagrande O, Silva A & Fumi M D (1994). Recent applications of biotechnology in wine production. *Biotechnology Progress. Biotechnol. Prog.*, **10** (1), S. 2–18.

- [14] Mendes Ferreira A, Clímaco M C & Mendes Faia A (2001). The role of non-Saccharomyces species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - a preliminary study. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, S. 67–71.
- [15] Hernández L F, Espinosa J C, Fernández-González M & Briones A (2003). β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, **80** (2), S. 171–176.
- [16] Meinel J, Röhrig G, Meyers J P, Adam L & Engel K-H (2009). Freisetzung von Aromastoffen in Obstmaischen. *Kleinbrennerei*, S. 12–14.
- [17] Rosi I, Villena M A & Domizio P (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Microbiology*, **77** (5), S. 519-527.
- [18] Cabaroglu T, Selli S, Canbas A, Lepoutre J P & Günata Y Z (2003). Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enzym. Microb. Tech.*, **33** (5), S. 581–587.
- [19] Palmeri R & Spagna G (2007). β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzym. Microb. Tech.*, **40**, S. 382–389.
- [20] González-Pombo P, Fariña L, Carrau F, Batista-Viera F & Brena B M (2014). Aroma enhancement in wines using co-immobilized *Aspergillus niger* glycosidases. *Food Chemistry*, **143**, S. 185–191.
- [21] Gallifuoco A, Alfani F, Cantarella M, Spagna G & Pifferi P G (1999). Immobilized β -glucosidase for the winemaking industry: study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors. *Process Biochemistry*, **35**, S. 179–185.
- [22] Martino A, Pifferi P G & Spagna G (1996). Immobilization of β -glucosidase from a commercial preparation. Part 2. Optimization of the immobilization process on chitosan. *Process Biochemistry*, **31** (3), S. 287–293.
- [23] Gallifuoco A, D'Ercole L, Alfani F, Cantarella M, Spagna G & Pifferi P G (1998). On the use of chitosan-immobilized β -glucosidase in wine-making: kinetics and enzyme inhibition. *Process Biochemistry*, **33** (2), S. 163–168.
- [24] Spagna G, Andreani F, Salatelli E, Romagnoli D, Casarini D & Pifferi P G (1998). Immobilization of the glycosidases: α -l-arabinofuranosidase and β -d-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* on a chitosan derivative to increase the aroma of wine. Part II. *Enzym. Microb. Tech.*, **23** (7–8), S. 413–421.

- [25] Martino A, Schiraldi C, Di Lazzaro A, Fiume I, Spagna G, Pifferi P G & Rosa M de (2000). Improvement of the flavour of Falanghina white wine using a purified glycosidase preparation from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, **36** (1–2), S. 93–102.
- [26] Spagna G, Barbagallo R N, Casarini D & Pifferi P G (2001). A novel chitosan derivative to immobilize α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. *Enzym. Microb. Tech.*, **28** (4–5), S. 427–438.
- [27] Spagna G, Barbagallo R N, Greco E, Manenti I & Pifferi P G (2002). A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilised by inclusion in chitosan gels. *Enzym. Microb. Tech.*, **30** (1), S. 80–89.
- [28] Gueguen Y, Chemardin P, Pien S, Arnaud A & Galzy P (1997). Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. *Journal of Biotechnology*, **55**, S. 151–156.
- [29] Lasanta C, Caro I & Pérez L (2009). β -glucosidase immobilization on ion exchange resins for using as aromatic enhancement of wines. *Chemical Engineering Transactions*, **17**, S. 897–902.
- [30] Khoshnevisan K, Bordbar A-K, Zare D, Davoodi D, Noruzi M, Barkhi M & Tabatabaei M (2011). Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. *Chemical Engineering Journal*, **171** (2), S. 669–673.
- [31] Clarke R J & Bakker J (2004). *Wine flavour chemistry*, Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK, Ames, Iowa, S. 3–5.
- [32] Berger R G (Hrsg.) (2007). *Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability*, Springer-Verlag: Berlin, S. 241 ff.
- [33] Bhat M K (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, **18** (5), S. 355–383.
- [34] Galante Y M, Conti A de & Monteverdi R. (1998). Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: Harman G E & Kubicek C P (Hrsg.). *Trichoderma and gliocladium. Enzymes, Biological Control and commercial applications*. (Volume 2). Taylor & Francis Ltd: London [u.a.], S. 286–301.

- [35] Günata Y Z, Bayonove C L, Cordonnier R E, Arnaud A & Galzy P (1990). Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii* β -glucosidases. *J. Sci. Food Agric.*, **50**, S. 499–506.
- [36] Caldini C, Bonomi F, Pifferi P G, Lanzarini G & Galante Y M (1994). Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. *Enzym. Microb. Tech.*, **16** (4), S. 286–291.
- [37] Belitz H-D, Grosch W & Schieberle P (2001). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Mit über 900 Formeln und 620 Tabellen*. 5. Aufl., Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg [u.a.], S. 102–103, 139, 894, 901 ff.
- [38] Bergner K-G (1993). *Weinkompandium. Für Apotheker, Ärzte und Naturwissenschaftler*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, S. 105–136, 193, 207 ff.
- [39] Jackson R S (2008). Fermentation. In: Jackson R S (Hrsg.). *Wine Science. Principles and Applications*. Elsevier, S. 332–417.
- [40] Krämer J (2007). *Lebensmittel-Mikrobiologie. 49 Tabellen*. 5. Aufl., Verlag Ulmer: Stuttgart, S. 245 ff.
- [41] Jackson R S (2008). Postfermentation Treatments and Related Topics. In: Jackson R S (Hrsg.). *Wine Science. Principles and Applications*. Elsevier, S. 418–519.
- [42] Würdig G, Woller R & Breitbach K (1989). *Chemie des Weines*, Verlag Ulmer: Stuttgart, S. 101, 466, 484-516, 540 ff.
- [43] Sumbly K M, Grbin P R & Jiranek V (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine. Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, **121** (1), S. 1–16.
- [44] Jackson R S (2008). Chemical Constituents of Grapes and Wine. In: Jackson R S (Hrsg.). *Wine Science. Principles and Applications*. Elsevier, S. 270–331.
- [45] Nagel C W, Amistoso J L & Bendel R B (1982). The Effect of pH and Titratable Acidity on the Quality of Dry White Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **33** (2), S. 75–79.
- [46] Rapp A & Versini G (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence, Proceedings of the 8th International Flavor Conference*. (Developments in Food Science). Elsevier, S. 1659–1694.

- [47] Guitart A, Orte P H, Ferreira V, Peña C & Cacho J F (1999). Some Observations About the Correlation Between the Amino Acid Content of Musts and Wines of the Chardonnay Variety and Their Fermentation Aromas. *American Journal of Enology and Viticulture*, **50** (3), S. 253–258.
- [48] Hernández-Orte P, Ibarz M J, Cacho J F & Ferreira V (2006). Addition of amino acids to grape juice of the Merlot variety. Effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation. *Food Chemistry*, **98** (2), S. 300–310.
- [49] Garde-Cerdán T & Ancín-Azpilicueta C (2008). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, **41** (3), S. 501–510.
- [50] ter Schure E G, Flikweert M T, van Dijken J P, Pronk J T & Verrips C T (1998). Pyruvate Decarboxylase Catalyzes Decarboxylation of Branched-Chain 2-Oxo Acids but Is Not Essential for Fusel Alcohol Production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (4), S. 1303–1307.
- [51] Bloem A, Bertrand A, Lonvaud-Funel A & Revel G de (2007). Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, **44** (1), S. 62–67.
- [52] Park Y, Shaffer C & Bennett G (2009). Microbial formation of esters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85** (1), S. 13–25.
- [53] Schmarr H-G, Slabiziki P, Legrum C & Langen J (2014). Wenn Nanogramm das Aroma verändern. *Nachrichten aus der Chemie*, **62**, S. 1192–1196.
- [54] Rapp A, Hastrich H & Engel L (1976). Gaschromatographische Untersuchungen über die Aromastoffe von Weinbeeren. I. Anreicherung und kapillar-chromatographische Auftrennung. *Vitis*, **15**, S. 29–36.
- [55] Wüst M (2003). Wein — Qualität entscheidet sich in Nanogramm: Zur Biochemie des sortentypischen Weinaromas. *Chemie in unserer Zeit*, **37** (1), S. 8–17.
- [56] Lund S T & Bohlmann J (2006). The molecular basis for wine grape quality - a volatile subject. *Science*, **311** (5762), S. 804–805.
- [57] Pisarnitskii A F (2001). Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, **37** (6), S. 552-560.

- [58] Strauss C R, Wilson B, Gooley P R & Williams P J (1986). Role of Monoterpenes in Grape and Wine Flavor. *In: Parliment T H & Croteau R (Hrsg.). Biogenesis of Aromas. (ACS Symposium Series). American Chemical Society, S. 222-242.*
- [59] Rapp A (2005). Alkohole und alkoholische Getränke: Herstellung, Eigenschaften und Zusammensetzung. Inhaltsstoffe des Weines. *In: Singer M & Teyssen S (Hrsg.). Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten. Grundlagen — Diagnostik — Therapie. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, S. 70–83.*
- [60] Guth H (1997). Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *J. Agric. Food Chem., 45 (8), S. 3027–3032.*
- [61] Williams P J, Strauss C R & Wilson B (1980). Hydroxylated Linalool Derivatives as Precursors of Volatile Monoterpenes of Muscat Grapes. *J. Agric. Food Chem., 28, S. 766–771.*
- [62] Rapp A & Mandery H (1986). Wine aroma. *Experientia, 42, S. 873–884.*
- [63] Rusjan D, Strlic M, Kosmerl T & Prosen H (2009). The response of Monoterpenes to different enzyme preparations in Gewürztraminer (*Vitis vinifera* L.) wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic., 30 (1), S. 56–64.*
- [64] Sánchez-Palomo E, Alonso-Villegas R & González Viñas, M. A. (2015). Characterisation of free and glycosidically bound aroma compounds of La Mancha Verdejo white wines. *Food Chemistry, 173, S. 1195–1202.*
- [65] Ebeler S E (2001). ANALYTICAL CHEMISTRY: UNLOCKING THE SECRETS OF WINE FLAVOR. *Food Reviews International. Food Reviews International, 17 (1), S. 45–64.*
- [66] Razungles A, Bayonove C L, Cordonnier R E & Sapis J C (1988). Grape Carotenoids: Changes During the Maturation Period and Localization in Mature Berries. *American Journal of Enology and Viticulture, 39 (1), S. 44–48.*
- [67] Skouroumounis G K & Sefton M A (2002). The Formation of beta-Damascenone in Wine. *In: Winterhalter P & Rouseff R L (Hrsg.). Carotenoid-derived aroma compounds. (ACS Symposium Series; 802). American Chemical Society; Distributed by Oxford University Press: Washington, DC, S. 241-254.*
- [68] Günata Y Z, Wirth J L, Guo W & Baumes R L (2002). C₁₃-Norisoprenoid Aglycon Composition of Leaves and Grape Berries from Muscat of Alexandria and Shiraz Cultivars. *In: Winterhalter P & Rouseff R L (Hrsg.). Carotenoid-derived aroma compounds. (ACS Symposium Series; 802). American Chemical Society; Distributed by Oxford University Press: Washington, DC, S. 255-261.*

- [69] Escudero A, Gogorza B, Melús M A, Ortín N, Cacho J F & Ferreira V (2004). Characterization of the Aroma of a Wine from Maccabeo. Key Role Played by Compounds with Low Odor Activity Values. *J. Agric. Food Chem.*, **52** (11), S. 3516–3524.
- [70] Fischer U (1995). *Mass balance of aroma compounds during the dealcoholization of wine: Correlation of chemical and sensory data*. Dissertation, Universität Hannover.
- [71] Simpson R F & Miller G C (1983). Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis*, **22**, S. 51–63.
- [72] Winterhalter P (1992). Oxygenated C₁₃-Norisoprenoids. In: Teranishi R, Takeoka G R & Güntert M (Hrsg.). *Flavor Precursors. Thermal and Enzymatic Conversions*. (ACS Symposium Series). American Chemical Society, S. 98-115.
- [73] Francis M & Allcock C (1969). Geraniol β-d-glucoside; occurrence and synthesis in rose flowers. *Phytochemistry*, **8** (8), S. 1339–1347.
- [74] Cordonnier R E & Bayonove C L (1974). Mise en évidence dans la baie de raisin, variété muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *CR Acad. Sci. Paris* (274), S. 3387–3390.
- [75] Williams P J, Strauss C R, Wilson B & Massy-Westropp R A (1982). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*, **21** (8), S. 2013–2020.
- [76] Noble A C, Strauss C R, Williams P J & Wilson B (1987). Sensory evaluation of non-volatile flavour precursors in wine. In: Martens M, Dalen G A & Russwurm H (Hrsg.). *Flavour science and technology. Proceedings of the 5th Weurman Flavour Research Symposium, held at the Sara Hotel, Voksenasen, Oslo, 23rd-25th March, 1987*. WILEY-VCH Verlag: Chichester, UK, New York, S. 383–391.
- [77] Park S K, Morrison J C, Adams D O & Noble A C (1991). Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during development. *J. Agric. Food Chem.*, **39** (3), S. 514–518.
- [78] Voirin S G, Baumes R L, Sapis J C & Bayonove C L (1992). Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine: II. Qualitative and quantitative determination of monoterpene glycosides in grape. *J. Chromatogr. A*, **595** (1–2), S. 269–281.

- [79] Stahl-Biskup E, Intert F, Holthuijzen J, Stengele M & Schulz G (1993). Glycosidically bound volatiles-a review 1986-1991. *Flavour Fragr. J.*, **8**, S. 61–80.
- [80] Mateo J J & Di Stefano R (1997). Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiol.*, **14** (6), S. 583–591.
- [81] Winterhalter P & Skouroumounis G K (1997). Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation. In: Berger R G et al. (Hrsg.). *Biotechnology of Aroma Compounds*. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology). Springer-Verlag, S. 73–105.
- [82] Maicas S, González-Cabo P, Ferrer S & Pardo I (1999). Production of *Oenococcus oeni* biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition. *Biotechnology Letters*, **21**, S. 349–353.
- [83] Stevens K L, Bomben J, Lee A & McFadden W H (1966). Volatiles from Grapes. Muscat of Alexandria. *J. Agric. Food Chem.*, **14** (3), S. 249–252.
- [84] Günata Y Z, Brillouet J M, Voirin S G, Baumes R L & Cordonnier R E (1990). Purification and some properties of an α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides. *J. Agric. Food Chem.*, **38** (3), S. 772–776.
- [85] Voirin S G, Baumes R L, Bitteur S, Günata Y Z & Bayonove C L (1990). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **38** (6), S. 1373–1378.
- [86] Williams P J (1993). Hydrolytic Flavor Release in Fruit and Wines through Hydrolysis of Nonvolatile Precursors. In: Acree T E & Teranishi R (Hrsg.). *Flavor science. Sensible principles and techniques*. American Chemical Society: Washington, DC, S. 287–308.
- [87] Castro Vázquez L, Pérez-Coello M S & Cabezudo M D (2002). Effects of enzyme treatment and skin extraction on varietal volatiles in Spanish wines made from Chardonnay, Muscat, Airén, and Macabeo grapes. *Anal. Chim. Acta*, **458** (1), S. 39–44.
- [88] Diéguez S C, Lois L C, Gómez E F & de la Peña, M. Luisa G. (2003). Aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Albariño. *LWT - Food Science and Technology*, **36** (6), S. 585–590.

- [89] Schwab W & Schreier P (1990). Vomifoliol 1-O- β -d-xylopyranosyl-6-O- β -d-glucopyranoside: A disaccharide glycoside from apple fruit. *Phytochemistry*, **29** (1), S. 161–164.
- [90] Fenoll J, Manso A, Hellín P, Ruiz L & Flores P (2009). Changes in the aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Muscat Hamburg during ripening. *Food Chemistry*, **114** (2), S. 420–428.
- [91] García E, Chacón, J. L., Martínez J & Izquierdo, P. M. (2003). Changes in Volatile Compounds during Ripening in Grapes of Airén, Macabeo and Chardonnay White Varieties Grown in La Mancha Region (Spain). *Food Science and Technology International*, **9** (1), S. 33–41.
- [92] Vasserot Y, Arnaud A & Galzy P (1995). Monoterpenol glycosides in plants and their biotechnological transformation. *Acta Biotechnologica*, **15** (1), S. 77-95.
- [93] Bayonove C L, Günata Y Z, Sapis J C, Baumes R L, Dugelay I & Grassin C (1992). Augmentation des arômes dans le vin et utilisation d'enzymes. *Rev. Oenol.*, **64**, S. 15–18.
- [94] Hjelmeland A K & Ebeler S E (2015). Glycosidically Bound Volatile Aroma Compounds in Grapes and Wine: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **66** (1), S. 1–11.
- [95] Marty F (1999). Plant Vacuoles. *Plant Cell*, **11** (4), S. 587–599.
- [96] Martinoia E, Klein, E. M. M., Geisler M, Sánchez-Fernández R & Rea P (2000). Vacuolar transport of secondary metabolites and xenobiotics. In: Robinson D G & Rogers J C (Hrsg.). *Vacuolar compartments. Annual Plant Reviews*. (Annual plant reviews; 5). Sheffield Academic Press; CRC Press: Sheffield, England, Boca Raton, S. 221–253.
- [97] Ferreres F, Figueiredo R, Bettencourt S, Carqueijeiro I, Oliveira J, Gil-Izquierdo A, Pereira D M, Valentão P, Andrade P B, Duarte P, Barceló A R & Sottomayor M (2011). Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H₂O₂ affair? *J. Exp. Bot.*, **62** (8), S. 2841–2854.
- [98] Zhao J, Huhman D, Shadle G, He X-Z, Sumner L W, Tang Y & Dixon R A (2011). MATE2 Mediates Vacuolar Sequestration of Flavonoid Glycosides and Glycoside Malonates in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, **23** (4), S. 1536–1555.

- [99] Koundouras S, Hatzidimitriou E, Karamolegkou M, Dimopoulou E, Kallithraka S, Tsialtas J T, Zioziou E, Nikolaou N & Kotseridis Y (2009). Irrigation and Rootstock Effects on the Phenolic Concentration and Aroma Potential of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon Grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **57** (17), S. 7805–7813.
- [100] Bowles D & Lim E-K (2001). Glycosyltransferases of Small Molecules: Their Roles in Plant Biology. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0021537]
- [101] Sikkema J, de Bont, J A & Poolman B (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, **59** (2), S. 201–222.
- [102] Hösel W (1981). Glycosylation and glycosidases. In: Conn E E, Stumpf W & Conn P M (Hrsg.). *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise: Secondary Plant Products*. (Biochemistry of Plants; Volume 7). Academic Press: New York, S. 725–753.
- [103] Jones P & Vogt T (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*, **213** (2), S. 164-174.
- [104] Wink M & Roberts M F (1998). Compartmentation of Alkaloid Synthesis, Transport, and Storage. In: Roberts M F & Wink M (Hrsg.). *Alkaloids*. Springer-Verlag: Boston, MA, S. 239-262.
- [105] Williamson G, Plumb G W, Uda Y, Price K R & Rhodes M J (1996). Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalcl7 cells. *Carcinogenesis*, **17** (11), S. 2385–2387.
- [106] Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee M-J & Yang C S (2004). Urinary and Plasma Levels of Resveratrol and Quercetin in Humans, Mice, and Rats after Ingestion of Pure Compounds and Grape Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. J. Agric. Food Chem.*, **52** (4), S. 935–942.
- [107] Cheynier V, Owe C & Rigaud J (1988). Oxidation of Grape Juice Phenolic Compounds in Model Solutions. *Journal of Food Science*, **53** (6), S. 1729–1732.
- [108] Komes D, Ulrich D, Kovacevic Gnic K & Lovrik T (2007). Study of phenolic and volatile composition of white wine during fermentation and a short time of storage. *Vitis*, **46** (29), S. 77–84.

- [109] Simon B F, Hernandez T, Estella I & Gomez-Cordoves C (1992). Variation in phenol content in grapes during ripening: low molecular- weight phenols. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **194**, S. 351–354.
- [110] Visioli F, Borsani L & Galli C (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc. Res.*, **47** (3), S. 419–425.
- [111] Greenwald P, Clifford C K & Milner J A (2001). Diet and cancer prevention. *Eur. J. Cancer*, **37** (8), S. 948–965.
- [112] Whitehurst R J & Oort M v (2010). *Enzymes in food technology*. 2nd ed., Wiley-Blackwell: Chichester, S. 203.
- [113] Alonso E, Estrella M & Revilla E (1986). HPLC separation of flavonol glycosides in wines. *Chromatographia*, **22** (7), S. 268–270.
- [114] Lermusieau G, Liegeois C & Collin S (2001). Reducing power of various hop varieties. *Cerevisia*, **26** (1), S. 33–41.
- [115] Capaldo A, Walker M E, Ford C M & Jiranek V (2011). β -Glucoside metabolism in *Oenococcus oeni*: Cloning and characterization of the phospho- β -glucosidase CelD. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **69**, S. 27–34.
- [116] Wightman J D, Price S F, Watson B T & Wrolstad R E (1997). Some Effects of Processing Enzymes on Anthocyanins and Phenolics in Pinot noir and Cabernet Sauvignon Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **48** (1), S. 39–48.
- [117] Barbagallo R N, Palmeri R, Fabiano S, Rapisarda P & Spagna G (2007). Characteristic of β -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzym. Microb. Tech.*, **41**, S. 570–575.
- [118] Wightman J D & Wrolstad R E (1996). β -glucosidase Activity in Juice-Processing Enzymes Based on Anthocyanin Analysis. *Journal of Food Science*, **61** (3), S. 544–548.
- [119] Williams P J, Strauss C R, Wilson B & Massy-Westropp R A (1982). Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene .beta.-D glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *J. Agric. Food Chem.*, **30** (6), S. 1219–1223.
- [120] Park S K & Noble A C (1993). Monoterpenes and Monoterpene Glycosides in Wine Aromas. *In: Gump B H & Pruet D J (Hrsg.). Beer and Wine Production.*

- Analysis, Characterization, and Technological Advances*. (ACS Symposium Series; 536). American Chemical Society, S. 98-109.
- [121] Aryan A P, Wilson B, Strauss C R & Williams P J (1987). The Properties of Glycosidases of *Vitis vinifera* and a Comparison of Their β -Glucosidase Activity with that of Exogenous Enzymes. An Assessment of Possible Applications in Enology. *American Journal of Enology and Viticulture*, **38** (3), S. 182–188.
- [122] Günata Y Z, Blondeel C, Vallier M J, Lepoutre J P, Sapis J C & Watanabe N (1998). An Endoglycosidase from Grape Berry Skin of Cv. M. Alexandria Hydrolyzing Potentially Aromatic Disaccharide Glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *J. Agric. Food Chem.*, **46** (7), S. 2748–2753.
- [123] Riganakos K (2003). Comparative spectrophotometric determination of the total iron content in various white and red Greek wines. *Food Chemistry*, **82** (4), S. 637–643.
- [124] Zoecklein B W, Fugelsang K C, Gump B H & Nury F S (1995). *Wine Analysis and Production*, Springer-Verlag: Boston, MA, S. 202–203
- [125] Thoukis G & Amerine M A (1956). The Fate of Copper and Iron During Fermentation of Grape Musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, **7** (2), S. 45–52.
- [126] Überegger E (2008). Die Bedeutung einiger analytischer Kennzahlen. *obstbau weinbau* (1), S. 25.
- [127] Cacho J F, Castells J E, Esteban A, Laguna B & Sagristá N (1995). Iron, Copper, and Manganese Influence on Wine Oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, **46** (3), S. 380–384.
- [128] Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) (2015). *International Code of Oenological Practices*: Paris.
- [129] Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) (2015). *World vitiviniculture situation. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture*: Paris.
- [130] Statistisches Bundesamt (2015). *Land- und Forstwirtschaft, Fischerei. Weinerzeugung*. Fachserie 3 Reihe 3.2.2 - 2014: Wiesbaden.
- [131] Statistisches Bundesamt (2014). *Land- und Forstwirtschaft, Fischerei. Betriebe mit Weinbau, Landwirtschaftszählung / Agrarstrukturerhebung*. Fachserie 3 Reihe 2.2.3 - 2013: Wiesbaden.
- [132] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *Agribusiness Handbook: Grapes Wine*: Rom.

- [133] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2006). *COMPENDIUM OF FOOD ADDITIVE SPECIFICATIONS. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 67th meeting 2006: Rom, S. 64.*
- [134] Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) (2012). ÜBERARBEITUNG DER MONOGRAPHIE ZU ENZYMPRÄPARATEN (OIV-OENO 365-2009). RESOLUTION OIV-OENO 485-2012.
- [135] Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (2011). Verordnung über die Verwendung von Extraktionslösungsmitteln und anderen technischen Hilfsstoffen bei der Herstellung von Lebensmitteln. Technische Hilfsstoff-Verordnung - TVH.
- [136] Frank H K (1990). *Lexikon Lebensmittel-Mikrobiologie*, Behr's Verlag: Hamburg, S. 91–92.
- [137] Aehle W (2007). *Enzymes in industry. Production and applications*. 3rd ed., WILEY-VCH Verlag: Weinheim, S. 1, 13–21, 29–30, 36, 48 ff.
- [138] van Rensburg P & Pretorius I S (2000). Enzymes in winemaking: Harnessing natural catalysts for efficient Biotransformations - A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **21** (Special Issue), S. 52–73.
- [139] Chatonnet P, Barbe C, Canal-Llaubères R-M, Dubourdieu D & Boidron J N (1992). Incidences de certaines préparations pectolytiques sur la teneur en phénols volatils des vins blancs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **26**, S. 253–269.
- [140] Dugelay I, Günata Y Z, Sapis J C, Baumes R & Bayonove C (1993). Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *J. Agric. Food Chem.*, **41** (11), S. 2092–2096.
- [141] Günata Y Z, Dugelay I, Sapis J C, Baumes R L & Bayonove C L (1993). Role of the enzymes in the use of the flavour potential from grape glycosides in winemaking. In: Schreier P & Winterhalter P (Hrsg.). *Progress in flavour precursor studies. Analysis, generation, biotechnology: proceedings of the International Conference, Würzburg, Germany, September 30-October 2, 1992*. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, S. 219–234.
- [142] Bertrand A & Anocibar Beloqui A (1996). Essais d'utilisation d'enzymes pectolytiques à activités complémentaires de type glucosidase dans les vins: Influence sur l'arôme. *Revue française d'oenologie*, **157**, S. 19–24.

- [143] Rogerson F S S, Grande H J & Silva M C M (1995). Enzymatic enhancement of the free monoterpenol content of a Portuguese wine from a single, native grape variety; "Trajadura". *Biotechnol Lett*, **17** (1), S. 35-40.
- [144] Dugelay L, Günata Y Z, Sapis J C, Baumes R L & Bayonove C L (1992). ÉTUDE DE L'ORIGINE DU CITRONELLOL DANS LES VINS. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **26**, S. 177–184.
- [145] Günata Y Z, Bayonove C L, Baumes R L & Cordonnier R E (1986). Stability of Free and Bound Fractions of Some Aroma Components of Grapes cv. Muscat During the Wine Processing: Preliminary Results. *American Journal of Enology and Viticulture*, **37** (2), S. 112–114.
- [146] Dale M P, Kopfler W P, Chait I & Byers L D (1986). beta-Glucosidase: substrate, solvent, and viscosity variation as probes of the rate-limiting steps. *Biochemistry*. *Biochemistry*, **25** (9), S. 2522–2529.
- [147] Wöhler F & Liebig J (1837). Ueber die Bildung des Bittermandelöls. *Annalen der Pharmacie*, **22** (1), S. 1-24.
- [148] Fischer E (1898). Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **26**, S. 60–87.
- [149] Bhatia Y, Mishra S & Bisaria V S (2002). Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. Critical Reviews in Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, **22** (4), S. 375–407.
- [150] Bisaria V S, Mishra S & Eveleigh D E (1989). Regulatory Aspects of Cellulase Biosynthesis and Secretion. Critical Reviews in Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, **9** (2), S. 61–103.
- [151] Kubicek C P, Messner R, Gruber F, Mach R L & Kubicek-Pranz E M (1993). The Trichoderma cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzym. Microb. Tech.*, **15** (2), S. 90–99.
- [152] Ketudat Cairns J R & Esen A (2010). β -Glucosidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, **67** (20), S. 3389–3405.
- [153] Hösel W, Surholt E & Borgmann E (1978). Characterization of β -Glucosidase Isoenzymes Possibly Involved in Lignification from Chick Pea (*Cicer arietinum* L.) Cell Suspension Cultures. *European Journal of Biochemistry*, **84** (2), S. 487–492.

- [154] Leah R, Kigel J, Svendsen I & Mundy J (1995). Biochemical and Molecular Characterization of a Barley Seed β -Glucosidase. *Journal of Biological Chemistry*, **270** (26), S. 15789–15797.
- [155] Duroux L, Delmotte F M, Lancelin J M, K eravis G & Jay-Allemand C (1998). Insight into naphthoquinone metabolism: beta-glucosidase-catalysed hydrolysis of hydrojuglone beta-D-glucopyranoside. *Biochem. J.*, **333** (2), S. 275–283.
- [156] Henrissat B (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **280** (2), S. 309–316.
- [157] Henrissat B & Davies G (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, **7** (5), S. 637–644.
- [158] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, Bernard T, Lombard V & Henrissat B (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, **37** (suppl 1), S. D233.
- [159] Brunner F, Wirtz W, Rose J K C, Darvill A G, Govers F, Scheel D & N urnberger T (2002). A β -glucosidase/xylosidase from the phytopathogenic oomycete, *Phytophthora infestans*. *Phytochemistry*, **59** (7), S. 689–696.
- [160] Opassiri R, Pomthong B, Akiyama T, Nakphaichit M, Onkoksoong T, Ketudat Cairns M & Ketudat Cairns J R (2007). A stress-induced rice (*Oryza sativa* L.) beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain. *Biochem. J.*, **408** (2), S. 241–249.
- [161] Withers S G (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate Polymers*, **44** (4), S. 325–337.
- [162] Shoseyov O, Bravdo B-A, Ikan R & Chet I (1988). Endo- β -glucosidase from *Aspergillus niger* grown on a monoterpene glycoside-containing medium. *Phytochemistry*, **27** (7), S. 1973–1976.
- [163] Henrissat B & Bairoch A (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, **316** (2), S. 695–696.
- [164] Beguin P (1990). Molecular Biology of Cellulose Degradation. Annual Review of Microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, **44** (1), S. 219–248.
- [165] Rojas A, Arola L & Romeu A (1995). beta-Glucosidase families revealed by computer analysis of protein sequences. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **35** (6), S. 1223–1231.
- [166] Marana S R (2006). Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases. *IUBMB Life*, **58** (2), S. 63–73.

- [167] Günata Y Z, Bayonove C L, Tapiero C & Cordonnier R E (1990). Hydrolysis of Grape Monoterpenyl β -D-Glucosides by Various β -Glucosidases. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, S. 1232–1236.
- [168] Maicas S & Mateo J J (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67** (3), S. 322–335.
- [169] Lecas M, Günata Y Z, Sapis J C & Bayonove C L (1991). Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape. *Phytochemistry*, **30** (2), S. 451–454.
- [170] Grossmann C, Rapp A & Rieth W (1987). Enzymatische Freisetzung gebundener Aromastoffe in Wein. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, **83**, S. 7–12.
- [171] González-Pombo P, Farina L, Carrau F, Batista-Viera F & Brena B M (2011). A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*, **46**, S. 385–389.
- [172] Delcroix A, Günata Y Z, Sapis J-C, Salmon J-M & Bayonove C L (1994). Glycosidase Activities of Three Enological Yeast Strains During Winemaking: Effect on the Terpenol Content of Muscat Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **45** (3), S. 291–296.
- [173] Maicas S, Gil J-V, Pardo I & Ferrer S (1999). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International*, **32** (7), S. 491–496.
- [174] Barbagallo R N, Spagna G, Palmeri R, Restuccia C & Giudici P (2004). Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzym. Microb. Tech.*, **35**, S. 58–66.
- [175] D’Incecco N, Bartowsky E, Kassara S, Lante A, Spettoli P & Henschke P (2004). Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiol.*, **21** (3), S. 257–265.
- [176] Mansfield A K, Zoecklein B W & Whiton R S (2002). Quantification of Glycosidase Activity in Selected Strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, **53** (4), S. 303–307.

- [177] Cordonnier R E, Günata Y Z, Baumes R L & Bayonove C L (1989). Recherche d'un matériel enzymatique adapté a l'hydrolyse des précurseurs d'arôme de nature glycosidique du raisin. *Conn. Vigne Vin*, **23**, S. 7–23.
- [178] Günata Y Z (1994). Etude de exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'arômes du raisin de nature glycosidique. *Rev. Oenol. Tech. Vitivinic. Oenol.*, **74**, S. 22–27.
- [179] Günata Y Z, Dugelay I, Sapis J C, Baumes R L & Bayonove C L (1990). Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **24**, S. 133–144.
- [180] Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornon J P & Davies G (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92** (15), S. 7090–7094.
- [181] Jenkins J, Lo Leggio L, Harris G & Pickersgill R (1995). β -Glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold β/α architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. *FEBS Letters*, **362** (3), S. 281–285.
- [182] Sanz-Aparicio J, Hermoso J A, Martínez-Ripoll M, Lequerica J L & Polaina J (1998). Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *Journal of Molecular Biology*, **275** (3), S. 491–502.
- [183] Varghese J N, Hrmova M & Fincher G B (1999). Three-dimensional structure of a barley β -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. *Structure*, **7** (2), S. 179–190.
- [184] Hrmova M, Varghese J N, Gori R de, Smith B J, Driguez H & Fincher G B (2001). Catalytic Mechanisms and Reaction Intermediates along the Hydrolytic Pathway of a Plant β -D-glucan Glucohydrolase. *Structure*, **9** (11), S. 1005–1016.
- [185] Thongpoo P, McKee L S, Araújo A C, Kongsaree P T & Brumer H (2013). Identification of the acid/base catalyst of a glycoside hydrolase family 3 (GH3) β -glucosidase from *Aspergillus niger* ASKU28. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830** (3), S. 2739–2749.

- [186] Park J K, Wang L-X, Patel H V & Roseman S (2002). Molecular Cloning and Characterization of a Unique β -Glucosidase from *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.*, **277** (33), S. 29555–29560.
- [187] Rye C S & Withers S G (2000). Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, **4** (5), S. 573–580.
- [188] Qi M, Jun H-S & Forsberg C W (2008). Cel9D, an Atypical 1,4- β -d-Glucan Glucohydrolase from *Fibrobacter succinogenes*: Characteristics, Catalytic Residues, and Synergistic Interactions with Other Cellulases. *Journal of Bacteriology*, **190** (6), S. 1976–1984.
- [189] Dupin I, Günata Y Z, Sapis J C, Bayonove C L, M'Bairaroua O & Tapiero C (1992). Production of β -glucosidase by *Aspergillus niger*: partial purification, properties, and effect on terpenyl apiosylglucosides from grape. *J. Agric. Food Chem.*, **40** (10), S. 1886–1891.
- [190] Voirin S G, Baumes R L, Bayonove C L, M'Bairaroua O & Tapiero C (1990). Synthesis and n.m.r. spectral properties of grape monoterpenyl glycosides. *Carbohydrate Research*, **207** (1), S. 39–56.
- [191] Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Bevan D R, Henrissat B & Esen A (2000). The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97** (25), S. 13555–13560.
- [192] Verdoucq L, Czjzek M, Morinière J, Bevan D R & Esen A (2003). Mutational and Structural Analysis of Aglycone Specificity in Maize and Sorghum β -Glucosidases. *J. Biol. Chem.*, **278** (27), S. 25055–25062.
- [193] Cicek M, Blanchard D, Bevan D R & Esen A (2000). The Aglycone Specificity-determining Sites Are Different in 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (Maize β -Glucosidase) and Dhurrinase (Sorghum β -Glucosidase). *J. Biol. Chem.*, **275** (26), S. 20002–20011.
- [194] Verdoucq L, Morinière J, Bevan D R, Esen A, Vasella A, Henrissat B & Czjzek M (2004). Structural Determinants of Substrate Specificity in Family 1 β -Glucosidases. *J. Biol. Chem.*, **279** (30), S. 31796–31803.
- [195] Turan Y & Zheng M (2005). Purification and Characterization of an Intracellular β -Glucosidase from the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry (Moscow)*, **70** (12), S. 1363–1368.

- [196] Leclerc M, Gondé P, Arnaud A, Ratomahenina R, Galzy P & Nicolas M (1984). THE ENZYME SYSTEMS IN A STRAIN OF *CANDIDA WICKERHAMII* MEYER AND YARROW PARTICIPATING IN THE HYDROLYSIS OF CELLODEXTRINS. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **30** (6), S. 509–521.
- [197] Günata Y Z & Vallier M-J (1999). Production of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase by three *Aspergillus* strains. *Biotechnology Letters*, **21** (3), S. 219-223.
- [198] Heyworth R & Walker P G (1962). Almond-emulsin β -d-glucosidase and β -d-galactosidase. *Biochem. J.*, **83** (2), S. 331–335.
- [199] Inamdar A N & Kaplan J G (1966). PURIFICATION AND PROPERTIES OF AN INDUCIBLE β -GLUCOSIDASE OF BAKERS' YEAST. *Can. J. Biochem.*, **44** (8), S. 1099–1108.
- [200] Gondé P, Ratomahenina R, Arnaud A & Galzy P (1985). Purification and properties of an exocellular β -glucosidase of *Candida molischiana* (Zikes) Meyer and Yarrow capable of hydrolyzing soluble cellodextrins. *Biochem. Cell Biol.*, **63** (11), S. 1160–1166.
- [201] Dekker R F H (1986). Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial β -D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, **28** (9), S. 1438–1442.
- [202] Hoh Y, Yeoh H-H & Tan T (1992). Properties of β -glucosidase purified from *Aspergillus niger* mutants USDB 0827 and USDB 0828. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37** (5).
- [203] Le Clinche F, Piñaga F, Ramón D & Vallés S (1997). α -L-Arabinofuranosidases from *Aspergillus terreus* with Potential Application in Enology. Induction, Purification, and Characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **45** (7), S. 2379–2383.
- [204] Romero C, Manjón A, Bastida J & Iborra J (1985). A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Analytical Biochemistry*, **149** (2), S. 566–571.
- [205] Watanabe T, Sato T, Yoshioka S, Koshijima T & Kuwahara M (1992). Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. *European Journal of Biochemistry*, **209** (2), S. 651–659.
- [206] Wright R M, Yablonsky M D, Shalita Z P, Goyal A K & Eveleigh D E (1992). Cloning, Characterization, and Nucleotide Sequence of a Gene Encoding

- Microbispora bispora BglB, a Thermostable β -Glucosidase Expressed in Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58** (11), S. 3455–3465.
- [207] Saha B C & Bothast R J (1996). Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from Candida peltata. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (9), S. 3165–3170.
- [208] Sánchez-Torres P, González-Candelas L & Ramón D (1996). Expression in a wine yeast strain of the Aspergillus niger abfB gene. *FEMS Microbiology Letters*, **145** (2), S. 189-194.
- [209] Zollner H (1990). *Handbook of enzyme inhibitors*, WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 94–95.
- [210] Leclerc M, Chemardin P, Arnaud A, Ratomahenina R & Galzy P (1987). Exocellular β -glucosidase inducibility in a mutant strain of *Candida wickerhamii* derepressed for endocellular β -glucosidase production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **3** (1), S. 87–90.
- [211] Günata Y Z, Dugelay I, Vallier M J, Sapis J C & Bayonove C L (1997). Multiple forms of glycosidases in an enzyme preparation from Aspergillus niger: Partial characterization of a β -apiosidase. *Enzym. Microb. Tech.*, **21** (1), S. 39–44.
- [212] Nisius A (1988). The stromacentre in Avena plastids: an aggregation of β -glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta*, **173** (4), S. 474–481.
- [213] Dharmawardhana D P, Ellis B E & Carlson J E (1995). A [β]-Glucosidase from Lodgepole Pine Xylem Specific for the Lignin Precursor Coniferin. *Plant Physiology*, **107** (2), S. 331–339.
- [214] Chuankhayan P, Hua Y, Svasti J, Sakdarat S, Sullivan P A & Ketudat Cairns J R (2005). Purification of an isoflavonoid 7-O- β -apiosyl-glucoside β -glycosidase and its substrates from Dalbergia nigrescens Kurz. *Phytochemistry*, **66** (16), S. 1880–1889.
- [215] Nagano A J, Matsushima R & Hara-Nishimura I (2005). Activation of an ER-body-localized β -Glucosidase via a Cytosolic Binding Partner in Damaged Tissues of Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, **46** (7), S. 1140–1148.
- [216] Chi Y-I, Martinez-Cruz L A, Jancarik J, Swanson R V, Robertson D E & Kim S-H (1999). Crystal structure of the β -glycosidase from the hyperthermophile

- Thermosphaera aggregans: insights into its activity and thermostability. *FEBS Letters*, **445** (2–3), S. 375–383.
- [217] Himmel M, Adney W, Fox J, Mitchell D & Baker J (1993). Isolation and characterization of two forms of β -d-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **39-40**, S. 213–225.
- [218] Spagna G, Romagnoli D, Martino A, Bianchi G & Pifferi P G (1998). A simple Method for Purifying Glycosidases: α -l-arabinofuranosidase and β -d-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* to Increase the Aroma of Wine. Part I. *Enzym. Microb. Tech.*, **22** (5), S. 298–304.
- [219] Kaji A (1984). L-Arabinosidases. In: R. Stuart Tipson and Derek Horton (Hrsg.). *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, S. 383–394.
- [220] v. d. Veen P, Flipphi M A, Voragen A J & Visser J (1991). Induction, purification and characterisation of arabinases produced by *Aspergillus niger*. *Arch. Microbiol.*, **157** (1), S. 23-28.
- [221] Vries R P de & Visser J (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65** (4), S. 497-522, table of contents.
- [222] Rodionova N A, Im Tavobilov & Am Bezborodov (1983). beta-Xylosidase from *Aspergillus niger* 15: purification and properties. *J. Appl. Biochem.*, **5** (4-5), S. 300–312.
- [223] Kamiya S, Esaki S & Hama M (1967). Glycosides and Oligosaccharides in the L-Rhamnose Series. Part I. Enzymatic Partial Hydrolysis of Flavonoid-glycosides. *Agricultural and Biological Chemistry*, **31** (2), S. 133–136.
- [224] Kurosawa Y, Ikeda K & Egami F (1973). α -L-Rhamnosidases of the Liver of *Turbo cornutus* and *Aspergillus niger*. *Journal of Biochemistry*, **73** (1), S. 31–37.
- [225] Spagna G, Barbagallo R N, Martino A & Pifferi P G (2000). A simple method for purifying glycosidases: α -l-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine. *Enzym. Microb. Tech.*, **27** (7), S. 522–530.
- [226] Knob A, Terrasan, C. R. F. & Carmona E C (2010). β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **26** (3), S. 389-407.

- [227] Brena B M & Batista-Viera F (2006). Immobilization of Enzymes. *In: Guisan J M (Hrsg.). Immobilization of enzymes and cells. (Methods in biotechnology; 22). Humana Press Inc, S. 15–30.*
- [228] DLR Rheinland-Pfalz (Hrsg.) (2010). 14. *Oenologisches Symposium*. Tagungsband.
- [229] Nelson J M & Griffin E G (1916). ADSORPTION OF INVERTASE. *J. Am. Chem. Soc.*, **38** (5), S. 1109–1115.
- [230] Grubhofer N & Schleith L (1953). Modifizierte Ionenaustauscher als spezifische Adsorbentien. *Naturwissenschaften*, **40** (19), S. 508-508.
- [231] Netto C G, Toma H E & Andrade L H (2013). Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **85-86**, S. 71–92.
- [232] Scouten W H (1987). A survey of enzyme coupling techniques. *In: Mosbach K (Hrsg.). Methods in Enzymology: Immobilized Enzymes and Cells Part B. Academic Press, S. 30–65.*
- [233] O'Driscoll K F (1976). Techniques of enzyme entrapment in gels. *In: Mosbach K (Hrsg.). Methods in Enzymology: Immobilized Enzymes. Academic Press, S. 169–183.*
- [234] Gupta M N & Mattiasson B (1992). Unique Applications of Immobilized Proteins in Bioanalytical Systems. *In: Suelter C H (Hrsg.). Methods of Biochemical Analysis. John Wiley & Sons Inc, S. 1–34.*
- [235] Avineri-Goldman R, Kedem O, Silman H I, Caplan S R & Katchalski E (1968). Papain-collodion membranes. I. Preparation and properties. *Biochemistry*, **7** (2), S. 486–500.
- [236] Goldstein L (1972). Microenvironmental effects on enzyme catalysis. Kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin. *Biochemistry*, **11** (22), S. 4072–4084.
- [237] Martino A, Durante M, Pifferi P G, Spagna G & Bianchi G (1996). Immobilization of β -glucosidase from a commercial preparation. Part 1. A comparative study of natural supports. *Process Biochemistry*, **31** (3), S. 281–285.
- [238] Gueguen Y, Chemardin P, Janbon G, Arnaud A & Galzy P (1996). A Very Efficient β -Glucosidase Catalyst for the Hydrolysis of Flavor Precursors of Wines and Fruit Juices. *J. Agric. Food Chem.*, **44** (8), S. 2336–2340.

- [239] Spagna G, Barbagallo R N, Pifferi P G, Blanco R M & Guisan J M (2000). Stabilization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **11** (2–3), S. 63–69.
- [240] Xu J, Huo S, Yuan Z, Zhang Y, Xu H, Guo Y, Liang C & Zhuang X (2011). Characterization of direct cellulase immobilization with superparamagnetic nanoparticles. *Biocatal Biotransformation*, **29** (2-3), S. 71–76.
- [241] Liao H, Chen D, Yuan L, Zheng M, Zhu Y & Liu X (2010). Immobilized cellulase by polyvinyl alcohol/Fe₂O₃ magnetic nanoparticle to degrade microcrystalline cellulose. *Carbohydrate Polymers*, **82** (3), S. 600–604.
- [242] Alftrén J & Hobley T J (2014). Immobilization of cellulase mixtures on magnetic particles for hydrolysis of lignocellulose and ease of recycling. *21st European Biomass Conference*, **65**, S. 72–78.
- [243] Chen T, Yang W, Guo Y, Yuan R, Xu L & Yan Y (2014). Enhancing catalytic performance of β -glucosidase via immobilization on metal ions chelated magnetic nanoparticles. *Enzym. Microb. Tech.*, **63**, S. 50–57.
- [244] Dekker R F H (1989). Immobilization of a lactase onto a magnetic support by covalent attachment to polyethyleneimine-glutaraldehyde-activated magnetite. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **22** (3), S. 289-310.
- [245] Dekker R F H (1990). Application of a magnetic immobilized β -glucosidase in the enzymatic saccharification of steam-exploded lignocellulosic residues. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **23** (1), S. 25-39.
- [246] Verma M L, Chaudhary R, Tsuzuki T, Barrow C J & Puri M (2013). Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis. *Biorefineries*, **135**, S. 2–6.
- [247] Mateo C, Abian O, Fernandez–Lafuente R & Guisan J M (2000). Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment☆. *Enzym. Microb. Tech.*, **26** (7), S. 509–515.
- [248] Tu M, Zhang X, Kurabi A, Gilkes N, Mabee W & Saddler J (2006). Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for Lignocellulose Hydrolysis. *Biotechnol Lett*, **28** (3), S. 151-156.
- [249] Kondo A & Fukuda H (1997). Preparation of thermo-sensitive magnetic hydrogel microspheres and application to enzyme immobilization. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **84** (4), S. 337–341.

- [250] Bílková Z, Slováková M, Horák D, Lenfeld J & Churáček J (2002). Enzymes immobilized on magnetic carriers. Efficient and selective system for protein modification. *Journal of Chromatography B*, **770** (1-2), S. 177–181.
- [251] Demirel D (2004). Performance of immobilized Pectinex Ultra SP-L on magnetic duolite-polystyrene composite particles Part I. A batch reactor study. *Journal of Food Engineering*, **64** (4), S. 417–421.
- [252] Demirel D & Mutlu M (2005). Performance of immobilized pectinex ultra SP-L on magnetic duolite-polystyrene composite particles. Part II. A magnetic fluidized bed reactor study. *Journal of Food Engineering*, **70** (1), S. 1–6.
- [253] Pan C, Hu B, Li W, Sun Y, Ye H & Zeng X (2009). Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄–chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **61** (3-4), S. 208–215.
- [254] Šulek F, Drogenik M, Habulin M & Knez Ž (2010). Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **322** (2), S. 179–185.
- [255] Holovská K, Lenártová V, Holovská K & Javorský P (2002). Characterization of superoxide dismutase in the rumen bacterium *Streptococcus bovis*. *Vet. Med. – Czech*, **47** (2-3), S. 38–44.
- [256] Netto C G, Nakamatsu E H, Netto L E S, Novak M A, Zuin A, Nakamura M, Araki K & Toma H E (2011). Catalytic properties of thioredoxin immobilized on superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105** (5), S. 738–744.
- [257] Pan C, Hu B, Li W, Sun Y, Ye H & Zeng X (2009). Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄–chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **61** (3-4), S. 208–215.
- [258] Kim J, Grate J W & Wang P (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, **61** (3), S. 1017–1026.
- [259] Jia H, Zhu G & Wang P (2003). Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. *Biotechnology and Bioengineering*, **84** (4), S. 406–414.
- [260] Takigawa T & Endo Y (2006). Effects of glutaraldehyde exposure on human health. *Journal of occupational health*, **48** (2), S. 75–87.

- [261] Mahmoudi M, Shokrgozar M A, Simchi A, Imani M, Milani A S, Stroeve P, Vali H, Häfeli U O & Bonakdar S (2009). Multiphysics Flow Modeling and in Vitro Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles Coated with Poly(vinyl alcohol). *J. Phys. Chem. C*, **113** (6), S. 2322–2331.
- [262] Mahmoudi M, Simchi A, Milani A S & Stroeve P (2009). Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.*, **336** (2), S. 510–518.
- [263] Karlsson H L, Cronholm P, Gustafsson J & Möller L (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.*, **21** (9), S. 1726–1732.
- [264] Mahmoudi M, Simchi A & Imani M (2009). Cytotoxicity of Uncoated and Polyvinyl Alcohol Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, **113** (22), S. 9573–9580.
- [265] Mahmoudi M, Simchi A, Vali H, Imani M, Shokrgozar M A, Azadmanesh K & Azari F (2009). Cytotoxicity and Cell Cycle Effects of Bare and Poly(vinyl alcohol)-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Mouse Fibroblasts. *Adv. Eng. Mater.*, **11** (12), S. B243-B250.
- [266] Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Shokrgozar M A, Milani A S, Häfeli U O & Stroeve P (2010). A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **75** (1), S. 300–309.
- [267] Lynch I (2007). Are there generic mechanisms governing interactions between nanoparticles and cells? Epitope mapping the outer layer of the protein–material interface. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, **373**, S. 511–520.
- [268] Mahmoudi M, Sant S, Wang B, Laurent S & Sen T (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63** (1-2), S. 24–46.
- [269] Lynch I & Dawson K A (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*, **3** (1-2), S. 40–47.
- [270] Nel A E, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek E M V, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V & Thompson M (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.*, **8** (7), S. 543–557.

- [271] Funk W, Dammann V & Donnevert G (2005). *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*, WILEY-VCH Verlag: Weinheim.
- [272] Kromidas S (2011). *Validierung in der Analytik*. 2. Aufl., WILEY-VCH Verlag: Weinheim. (Die Praxis der instrumentellen Analytik).
- [273] Dörner K (2006). *Klinische Chemie und Hämatologie*, Thieme-Verlag, S. 106.
- [274] Bradford M M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72** (1–2), S. 248–254.
- [275] Compton S J & Jones C G (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, **151** (2), S. 369–374.
- [276] Blondin B, Ratomahenina R, Arnaud A & Galzy P (1983). Purification and properties of the β -glucosidase of a yeast capable of fermenting cellobiose to ethanol: Dekkera intermedia van der Walt. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, S. 1–6.
- [277] Dopico B, Nicolás G & Labrador E (1989). Partial purification of cell wall β -galactosidases from *Cicer arietinum* epicotyls. Relationship with cell wall autolytic processes. *Physiologia Plantarum*, **75** (4), S. 458-464.
- [278] Barbagallo R N, Spagna G, Abbate C, Azzaro G & Palmeri R (2002). Inexpensive isolation of β -d-glucopyranosidase from α -l-arabinofuranosidase, α -l-rhamnopyranosidase, and o-acetylerase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **101**, S. 1–13.
- [279] Fia G, Giovani G & Rosi I (2005). Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *Journal of Applied Microbiology*, **99**, S. 509–517.
- [280] Gautam S & Simon L (2006). Partitioning of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature. *Biochem. Eng. J.*, **30**, S. 104–108.
- [281] Chang M-Y & Juang R-S (2007). Use of chitosan–clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase. *Biochem. Eng. J.*, **35**, S. 93–98.
- [282] Sigma-Aldrich (1994). *Enzymatic Assay of β -Glucosidase (EC 3.2.1.21)*.
[WWW]
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/bglicosidcolor.Par.0001.File.dat/bglicosidcolor.pdf. (10. März 2012).

- [283] Nelson N (1944). A PHOTOMETRIC ADAPTATION OF THE SOMOGYI METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE. *J. Biol. Chem.*, **153** (2), S. 375–380.
- [284] Somogyi M (1952). NOTES ON SUGAR DETERMINATION. *J. Biol. Chem.*, **195** (1), S. 19–23.
- [285] Martino A, Pifferi P G & Spagna G (1994). Production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* using carbon sources derived from agricultural wastes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **60** (3), S. 247-252.
- [286] McIlvaine T C (1921). A BUFFER SOLUTION FOR COLORIMETRIC COMPARISON. *J. Biol. Chem.*, **49** (1), S. 183–186.
- [287] Michlmayr H, Schümann C, Barreira Braz da Silva N, Kulbe K & del Hierro A M (2010). Isolation and basic characterization of a β -glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture. *Journal of Applied Microbiology*, **108** (2), S. 550-559.
- [288] Martino A, Pifferi P G & Spagna G (1994). The separation of pectinlyase from β -glucosidase in a commercial preparation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **61** (3), S. 255–260.
- [289] Copeland R A (2000). *Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2nd ed., WILEY-VCH Verlag: New York, S. 113–131, 137, 275–276.
- [290] Briggs G E & Haldane, John Burdon Sanderson (1925). A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochemical Journal*, **19** (2), S. 338–339.
- [291] Lineweaver H & Burk D (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **56** (3), S. 658–666.
- [292] Preston J F, Hencin R S & Gabbay E J (1981). Preparation and characterization of an α -amanitin azo derivative with a free carboxyl group and its bovine serum albumin conjugate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **209** (1), S. 63–71.
- [293] Yamaguchi R, Arai Y, Kaneko T & Itoh T (1982). Utilization of partially N-succinylated derivatives of chitosan and glycolchitosan as supports for the immobilization of enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, **24** (5), S. 1081–1091.
- [294] Janolino V G & Swaisgood H E (1982). Analysis and optimization of methods using water-soluble carbodiimide for immobilization of biochemicals to porous glass. *Biotechnol. Bioeng.*, **24** (5), S. 1069–1080.

- [295] Williams A & Ibrahim I T (1981). A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3'-(dimethylamino)propyl)carbodiimide (EDC). *J. Am. Chem. Soc.*, **103** (24), S. 7090–7095.
- [296] Domínguez E, Nilsson M & Hahn-Hägerdal B (1988). Carbodiimide coupling of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* to alginate. *Enzym. Microb. Tech.*, **10** (10), S. 606–610.
- [297] chemicell GmbH. *Covalent Coupling Procedure on SiMAG-Carboxyl by Carbodiimide Method. Protocol A1. Coupling Protocol • SiMAG-Carboxyl 1.2.* [WWW] <http://www.chemicell.com/products/protocols/docs/SiMAG-Carboxyl.pdf>. (15. September 2015).
- [298] PerkinElmer chemagen Technologie GmbH (2013). *Specification M-PVA C2x. Highly carboxylated M-PVA Magnetic beads.* [WWW] http://www.chemagen.com/fileadmin/downloads/2013/M-PVA/Download_C2x.pdf. (11. Oktober 2014).
- [299] PerkinElmer chemagen Technologie GmbH (2014). *Brochure chemagen Technology.* [WWW] http://www.chemagen.com/fileadmin/downloads/2014/CT652130-0714-01_BRO_chemagen_Technology_ROW_lowres.pdf. (15. September 2015).
- [300] Cao L (2005). *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*, WILEY-VCH Verlag: Weinheim, S. 20 ff.
- [301] Williams P J, Cynkar W, Francis I L, Gray J D, Iland P G & Coombe B G (1995). Quantification of Glycosides in Grapes, Juices, and Wines through a Determination of Glycosyl Glucose. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, S. 121–128.
- [302] Iland P G, Cynkar W, Francis I L, Williams P J & Coombe B G (1996). Optimisation of methods for the determination of total and red-free glycosyl glucose in black grape berries of *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2** (3), S. 171–178.
- [303] Schneider R, Charrier F, Moutounet M & Baumes R L (2004). Rapid analysis of grape aroma glycoconjugates using Fourier-transform infrared spectrometry and chemometric techniques. *Anal. Chim. Acta*, **513** (1), S. 91–96.
- [304] Arévalo Villena M, Díez Pérez J, Úbeda J, Navascués E & Briones A (2006). A rapid method for quantifying aroma precursors: Application to grape extract,

- musts and wines made from several varieties. *Food Chemistry*, **99** (1), S. 183–190.
- [305] Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) (2015). *Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts. Volume 1 and 2*: Paris.
- [306] Waterhouse A L (2002). Determination of Total Phenolics. In: Wrolstad R E et al. (Hrsg.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Inc, S. I1.1.1–I1.1.8.
- [307] Singleton V L, Orthofer R & Lamuela-Raventós R M (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: Packer L (Hrsg.). *Methods in Enzymology: Oxidants and Antioxidants Part A*. Academic Press, S. 152–178.
- [308] Singleton V L & Rossi J A (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16** (3), S. 144–158.
- [309] Hausinger K, Raddatz H, Rudy H, Scholten G & Schrenk D (2012). Optimierte Methode zur Quantifizierung der wichtigsten Polyphenole in Weißwein mittels HPLC mit UV-Detektion. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, **108** (12), S. 635–638.
- [310] Marten S (2007). *Determination of ingredients in wine. Application Note VFD6*, Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH (Knauer) (Hrsg.).
- [311] VWR (2012). *Separation of Organic acids in wine with the Chromaster HPLC System. Application Note C-10222*, VWR (Hrsg.).
- [312] Calull M, Marcé R M & Borrull F (1992). Determination of carboxylic acids, sugars, glycerol and ethanol in wine and grape must by ion-exchange high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*, **590** (2), S. 215–222.
- [313] Hüther F-J, Gangluff G & Lewits P (1997). Kohlenhydrat- und Alkoholbestimmung in Wein mittels HPLC-Ionenaustauschchromatographie und RI-Detektion. *GIT - Labor-Fachzeitschrift* (9), S. 882–886.
- [314] Ferreira V, López R & Aznar M (2002). Olfactometry and Aroma Extract Dilution Analysis of Wines. In: Jackson J F & Linskens H F (Hrsg.). *Analysis of Taste and Aroma*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, S. 89-122.

- [315] Smith R M (2003). Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *A Century of Chromatography 1903-2003*, **1000** (1–2), S. 3–27.
- [316] Wille S R & Lambert W E (2007). Recent developments in extraction procedures relevant to analytical toxicology. *Anal. Bioanal. Chem.*, **388** (7), S. 1381-1391.
- [317] Ingels A-S M E, Neels H, Lambert W E & Stove C P (2013). Determination of gamma-hydroxybutyric acid in biofluids using a one-step procedure with “in-vial” derivatization and headspace-trap gas chromatography–mass spectrometry. *Microreactions in Separation Science: Reagents and Techniques*, **1296**, S. 84–92.
- [318] Rapp A (1988). Wine Aroma Substances from Gas Chromatographic Analysis. *In: Linskens H F, Jackson J F & Conte L S (Hrsg.). Wine analysis. (Molecular Methods of Plant Analysis; 6). Springer-Verlag: Berlin, New York, S. 29–66.*
- [319] Chaintreau A (2001). Simultaneous distillation–extraction: from birth to maturity—review. *Flavour Fragr. J.*, **16** (2), S. 136–148.
- [320] Likens S T & Nickerson G B (1964). Determination of certain hop oil constituents in brewing products. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, S. 5–13.
- [321] Hofer M (2009). *Apfelaroma – Analytik*. 26. Fachbereichstag – Lebensmitteltechnologie und Verpackungstechnik. Beuth Hochschule für Technik. [WWW] http://prof.beuth-hochschule.de/fileadmin/user/kabbert/pdf_s/Hofer_Apfelaroma-Analytik.pdf. (16. Mai 2012).
- [322] Nickerson G B & Likens S T (1966). Gas Chromatography evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *Journal of Chromatography A*, **21**, S. 1–5.
- [323] Godefroot M, Sandra P & Verzele M (1981). New method for quantitative essential oil analysis. *Journal of Chromatography A*, **203**, S. 325–335.
- [324] Barani F, Dell'Amico N, Griffone L, Santoro M & Tarabella C (2006). Determination of Volatile Organic Compounds by Headspace Trap. *Journal of Chromatographic Science*, **44** (10), S. 625–630.
- [325] Matz G, Kibelka G, Dahl J & Lennemann F (1999). Experimental study on solvent-less sample preparation methods. *Journal of Chromatography A*, **830** (2), S. 365–376.

- [326] Nedjma M & Maujean A (1995). Improved chromatographic analysis of volatile sulfur compounds by the static headspace technique on water-alcohol solutions and brandies with chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, **704** (2), S. 495–502.
- [327] Miller M E & Stuart J D (1999). Comparison of Gas-Sampled and SPME-Sampled Static Headspace for the Determination of Volatile Flavor Components. *Anal. Chem.*, **71** (1), S. 23–27.
- [328] Villamor R R, Evans M A, Mattinson, D. Scott & Ross C F (2013). Effects of ethanol, tannin and fructose on the headspace concentration and potential sensory significance of odorants in a model wine. *Food Research International*, **50** (1), S. 38–45.
- [329] Mazza C & Tipler A (2005). *System and method for extracting headspace vapor*. United States of America US 11/251,310.
- [330] Helms H & Felix U (2004). Neue Headspace-Trap verbessert Nachweisgrenzen. *Labor Praxis*, **28**, S. 46.
- [331] AL-Kateb H, Lacy Costello B de & Ratcliffe N (2013). An investigation of volatile organic compounds from the saliva of healthy individuals using headspace-trap/GC-MS. *Journal of Breath Research*, **7** (3), S. 036004.
- [332] Musshoff F, Lachenmeier D W, Kroener L & Madea B (2002). Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples. *Journal of Chromatography A*, **958** (1-2), S. 231–238.
- [333] Schulz K, Dreßler J, Sohnius E-M & Lachenmeier D W (2007). Determination of volatile constituents in spirits using headspace trap technology. *Journal of Chromatography A*, **1145** (1–2), S. 204–209.
- [334] Helms H, Felix U & Platthaus M (2004). *Neue Headspace-Trap verbessert Nachweisgrenzen*. LABORPAXIS.de. [WWW]
<http://www.laborpraxis.vogel.de/labortechnik/articles/106461/>.
- [335] Köhling R & Wehner H-D (2006). Begleitalkoholanalyse: Erfahrungen mit der Adsorbensfalle in der Headspace-Gaschromatographie. *T + K*, **73** (1), S. 2–7.
- [336] Nikfardjam M P & Maier D (2011). Development of a headspace trap HRGC/MS method for the assessment of the relevance of certain aroma compounds on the sensorial characteristics of commercial apple juice. *Food Chemistry*, **126** (4), S. 1926–1933.

- [337] Arthur C L & Pawliszyn J (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry. Anal. Chem.*, **62** (19), S. 2145–2148.
- [338] Zhang Z Y, Yang M J & Pawliszyn J (1994). Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.*, **66** (17), S. 844A-853A.
- [339] Chen J & Pawliszyn J B (1995). Solid Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, **67** (15), S. 2530–2533.
- [340] Lord H & Pawliszyn J (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, **885** (1-2), S. 153–193.
- [341] De la Calle García D, Reichenbacher M, Danzer K, Hurlbeck C, Bartsch C & Feller K-H (1998). Analysis of Wine Bouquet Components Using Headspace Solid-Phase Microextraction-Capillary Gas Chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.*, **21** (7), S. 373–377.
- [342] De la Calle García D, Reichenbacher M, Danzer K, Hurlbeck C, Bartsch C & Feller K-H (1998). Use of solid-phase microextraction-capillary-gas chromatography (SPME-CGC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **360**, S. 784–787.
- [343] Bonino M, Schellino R, Rizzi C, Aigotti R, Delfini C & Baiocchi C (2003). Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS–SPME analysis coupled with GC–ITMS. *Food Chemistry*, **80**, S. 125–133.
- [344] Rodríguez-Bencomo J J, Conde J E, García-Montelongo F & Pérez-Trujillo J P (2003). Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **991** (1), S. 13–22.
- [345] Fan W, Xu Y & Yu A (2006). Influence of Oak Chips Geographical Origin, Toast Level, Dosage and Aging Time on Volatile Compounds of Apple Cider. *J. Inst. Brew.*, **112**, S. 255–263.
- [346] Prosen H, Janeš L, Strlič M, Rusjan D & Kočar D (2007). Analysis of free and bound aroma compounds in grape berries using headspace solid-phase microextraction with GC-MS and a preliminary study of solid-phase extraction with LC-MS. *Acta chimica slovenica*, **54**, S. 25–32.
- [347] Canuti V, Conversano M, Calzi M L, Heymann H, Matthews M A & Ebeler S E (2009). Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass

- spectrometry for profiling free volatile compounds in Cabernet Sauvignon grapes and wines. *J. Chromatogr. A*, **1216** (15), S. 3012–3022.
- [348] Kang W, Xu Y & Qin L W Y (2010). Effects of Different β -D-Glycosidases on Bound Aroma Compounds in Muscat Grape Determined by HS-SPME and GC-MS. *J. Inst. Brew.*, **116** (1), S. 70–77.
- [349] Baltussen E, Sandra P, David F & Cramers C (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *J. Micro. Sep.*, **11** (10), S. 737–747.
- [350] Schneider R, Razungles A, Augier C & Baumes R L (2001). Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines. *J. Chromatogr. A*, **936**, S. 145–157.
- [351] Skoog D A & Leary J J (1996). *Instrumentelle Analytik. Grundlagen, Geräte, Anwendungen ; mit 86 Tabellen*, Springer-Verlag: Berlin [u.a.], S. 647.
- [352] Parker M R (1977). The physics of magnetic separation. *Contemporary Physics*, **18** (3), S. 279–306.
- [353] Pieters B R, Williams R A & Webb C (1992). Magnetic carrier technology. In: Williams R A (Hrsg.). *Colloid and surface engineering. Applications in the process industries*. (Colloid and surface engineering series). Butterworth-Heinemann: Oxford, Boston, S. 246–286.
- [354] Borlido L, Azevedo A M, Roque, A. C. A. & Aires-Barros M R (2013). Magnetic separations in biotechnology. *Biotechnology Advances*, **31** (8), S. 1374–1385.
- [355] Dunnill P & Lilly, M. D. (1974). Purification of enzymes using magnetic bio-affinity materials. *Biotechnol. Bioeng.*, **16** (7), S. 987–990.
- [356] Gelf G & Boudrant J (1974). Enzymes immobilized on a magnetic support. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, **334** (2), S. 467–470.
- [357] van Leemputten E & Horisberger M (1974). Immobilization of enzymes on magnetic particles. *Biotechnol. Bioeng.*, **16** (3), S. 385–396.
- [358] Chaplin M F & Kennedy J F (1976). Magnetic, immobilised derivatives of Enzymes. *Carbohydrate Research*, **50** (2), S. 267–274.
- [359] Munro P A, Dunnill P & Lilly, M. D. (1977). Nonporous magnetic materials as enzyme supports: studies with immobilized chymotrypsin. *Biotechnol. Bioeng.*, **19** (1), S. 101–124.
- [360] Adalsteinsson O, Lamotte A, Baddour R F, Colton C K, Pollak A & Whitesides G M (1979). Preparation and magnetic filtration of polyacrylamide gels

- containing covalently immobilized proteins and a ferrofluid. *Journal of Molecular Catalysis*, **6** (3), S. 199–225.
- [361] Halling P J & Dunnill P (1979). Improved nonporous magnetic supports for immobilized enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, **21** (3), S. 393–416.
- [362] Moeser G D, Roach K A, Green W H, Alan Hatton T & Laibinis P E (2004). High-gradient magnetic separation of coated magnetic nanoparticles. *AIChE J.*, **50** (11), S. 2835–2848.
- [363] Ditsch A, Lindenmann S, Laibinis P E, Wang D I C & Hatton T A (2005). High-Gradient Magnetic Separation of Magnetic Nanoclusters. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **44** (17), S. 6824–6836.
- [364] Holschuh K & Schwämmle A (2005). Preparative purification of antibodies with protein A—an alternative to conventional chromatography. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **293** (1), S. 345–348.
- [365] Wiberg E & Wiberg N (1995). *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. 101. Aufl., Walter de Gruyter: Berlin, S. 198.
- [366] Yan T-R & Lin C-L (2014). Purification and Characterization of a Glucose-tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **61** (6), S. 965–970.
- [367] Reshmi R & Sugunan S (2013). Improved biochemical characteristics of crosslinked β -glucosidase on nanoporous silica foams. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **85–86**, S. 111–118.
- [368] Kennedy J F & Cabral, J. M. S. (1987). Enzyme immobilization. In: Rehm H J & Reed G (Hrsg.). *Biotechnology. - 7a. Enzyme Technology*. WILEY-VCH Verlag: Weinheim, S. 347–404.
- [369] Riou C, Salmon J-M, Vallier M J, Günata Y Z & Barre P (1998). Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (10), S. 3607–3614.
- [370] Yang Y, Zhang X, Yin Q, Fang W, Fang Z, Wang X, Zhang X & Xiao Y (2015). A mechanism of glucose tolerance and stimulation of GH1 β -glucosidases. *Scientific reports*, **5**, S. 17296.
- [371] Gossauer A (2006). *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle. Eine Einführung in die organische Chemie*, Helvetica Chimica Acta: Zürich, S. 361.

- [372] Nakajima N & Ikada Y (1995). Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjugate Chem.*, **6** (1), S. 123–130.
- [373] Le Traon-Masson M-P & Pellerin P (1998). Purification and Characterization of Two β -d-Glucosidases from an *Aspergillus Niger* Enzyme Preparation: Affinity and Specificity Toward Glucosylated Compounds Characteristic of the Processing of Fruits. *Enzym. Microb. Tech.*, **22** (5), S. 374–382.
- [374] Arica M, Alaeddinoğlu N G & Hasirci V (1998). Immobilization of glucoamylase onto activated pHEMA/EGDMA microspheres. Properties and application to a packed-bed reactor. *Enzym. Microb. Tech.*, **22** (3), S. 152–157.
- [375] Handa T, Hirose A, Yoshida S & Tsuchiya H (1982). The effect of methylacrylate on the activity of glucomylase immobilized on granular polyacrylonitrile. *Biotechnol. Bioeng.*, **24** (7), S. 1639–1652.
- [376] Bisswanger H (2015). *Enzyme: Struktur, Kinetik und Anwendungen*, WILEY-VCH Verlag: Weinheim, S. 83–84.
- [377] Binder G (1998). Steigerung der Weinqualität durch Aromaenzyme. *In: Weinbau und Gartenbau Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau (Hrsg.). SLFA Neustadt Aktuell*, S. 64–79.
- [378] Lopes J F A & Simoneau C (2014). Solubility of Polyvinyl Alcohol in Ethanol. *EFSA supporting publication*, **EN-660**, S. 20 pp.
- [379] EFSA (2005). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to the use of polyvinyl alcohol as a coating agent for food supplements. *The EFSA Journal* (294), S. 1–15.
- [380] Chen X, Zhao T & Zou J (2009). A novel mimetic peroxidase catalyst by using magnetite-containing silica nanoparticles as carriers. *Microchim Acta*, **164** (1-2), S. 93-99.
- [381] Schneider V (2006). Alterung von Weißwein. II. Die Reaktionen des Sauerstoffs. *Der Winzer* (01), S. 8–11.
- [382] Jaime Baro A L & Quiros Carrasco J A (1977). Les conditions de formation des aldehydes dans les vins. Relation et importance en rapport avec les phenomenes d'oxydation et les caracteristiques organoleptiques. *Bulletin de l'OIV*, **50** (554), S. 242–253.
- [383] Simpson R F (1978). Aroma and compositional changes in wine with oxidation, storage, and ageing. *Vitis*, **17**, S. 274–287.

- [384] Ferreira V, Escudero A, Fernández P & Cacho J F (1997). Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **205** (5), S. 392–396.
- [385] Silva Ferreira A C, Guedes de Pinho P, Rodrigues P & Hogg T (2002). Kinetics of Oxidative Degradation of White Wines and How They Are Affected by Selected Technological Parameters. *J. Agric. Food Chem.*, **50** (21), S. 5919–5924.
- [386] Silva Ferreira A C, Hogg T & Guedes de Pinho P (2003). Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *J. Agric. Food Chem.*, **51** (5), S. 1377–1381.
- [387] Silva Ferreira A C, Oliveira C, Hogg T & Guedes de Pinho P (2003). Relationship between potentiometric measurements, sensorial analysis, and some substances responsible for aroma degradation of white wines. *J. Agric. Food Chem.*, **51** (16), S. 4668–4672.
- [388] Danilewicz J C (2007). Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine-Model System: Central Role of Iron and Copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, **58** (1), S. 53–60.
- [389] Temple D & Ough C S (1975). Inhibition of Catalase Activity in Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **26** (2), S. 92–96.
- [390] Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A & Dubourdieu D (2006). *Handbook of enology Volume 2. The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*. 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd: England, S. 199–200.
- [391] Peña-Neira A, Hernández T, García-Vallejo C, Estrella I & Suarez J A (2000). A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *European Food Research and Technology*, **210** (6), S. 445–448.
- [392] Lee C Y & Jaworski A (1987). Phenolic Compounds in White Grapes Grown in New York. *American Journal of Enology and Viticulture*, **38** (4), S. 277–281.
- [393] Adams D O (2006). Phenolics and Ripening in Grape Berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, **57** (3), S. 249–256.
- [394] Mozetic B, Tomazic I, Skvarc A & Trebse P (2006). Determination of Polyphenols in White Grape Berries cv. Rebula. *Acta chimica slovenica*, **53** (1), S. 58–64.
- [395] Ritter G, Götz L & Dietrich H (1994). Untersuchung der phenolischen Substanzen in Theingauer Rieslingweinen. *Wein-Wiss.*, **49** (2), S. 71–77.

- [396] Waterhouse A L (2002). Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **957** (1), S. 21–36.
- [397] Vitrac X, Monti J-P, Vercauteren J, Deffieux G & Mérillon J-M (2002). Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, **458** (1), S. 103–110.
- [398] Pour Nikfardjam M, Rechner A R, Patz C D & Dietrich H (1999). Trans-resveratrol content of German wines. *Wein-Wiss.*, **54** (1), S. 17–20.
- [399] Kennedy J A (2008). Grape and wine phenolics. Observations and recent findings. *Cienc. Inv. Agr.*, **35** (2).
- [400] Singleton V L (1987). Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, **38** (1), S. 69–77.
- [401] Kilmartin P A, Zou H & Waterhouse A L (2001). A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, **49** (4), S. 1957–1965.
- [402] Danilewicz J C (2003). Review of Reaction Mechanisms of Oxygen and Proposed Intermediate Reduction Products in Wine: Central Role of Iron and Copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, **54** (2), S. 73–85.
- [403] Li H, Guo A & Wang H (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, **108** (1), S. 1–13.
- [404] Danilewicz J C, Seccombe J T & Whelan J (2008). Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfur Dioxide in Model Wine and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **59** (2), S. 128–136.
- [405] Oliveira C M, Ferreira A C S, Freitas V de & Silva A M (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, **44** (5), S. 1115–1126.
- [406] Waterhouse A L & Laurie, V. Felipe (2006). Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, **57** (3), S. 306–313.
- [407] Günata Y Z, Bayonove C L, Baumes R L & Cordonnier R E (1985). The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food Agric.*, **36** (9), S. 857-862.

- [408] Flak W, Tiefenbrunner W, Krizan R, Wallner E & Wuketich A (2011). Die vergleichende Bewertung von Geschmacksprofilen im Weinbereich mittels deskriptiver und statistischer Verfahren. *Mitteilungen Klosterneuburg*, **61**, S. 101–110.
- [409] Fenaroli G & Burdock G A (2010). *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*. 6th ed., CRC Press: Boca Raton, London, New York, S. 134, 419, 581, 616, 1001.
- [410] Schandelmaier B (2013). Auf der Suche nach der richtigen Weinpumpe. Pumpen für die Kellerwirtschaft im Vergleich. *LW* (50), S. 38–40.
- [411] Kudo K, Watanabe A, Ujiie S, Shintani T & Gomi K (2015). Purification and enzymatic characterization of secretory glycoside hydrolase family 3 (GH3) aryl β -glucosidases screened from *Aspergillus oryzae* genome. *J. Biosci. Bioeng.*, **120** (6), S. 614–623.
- [412] López R, Aznar M, Cacho J F & Ferreira V (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **966** (1–2), S. 167–177.
- [413] Piñeiro Z, Palma M & Barroso C G (2004). Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography. *Papers presented at the 3rd Symposium In Vino Analytica Scientia Aveiro, Portugal, 10-12 July 2003*, **513** (1), S. 209–214.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung eines möglichen Einsatzes von an Magnetit-Partikel immobilisierter Glycosidasen im Wein	3
Abb. 2	Schematische Darstellung der Weinherstellung	6
Abb. 3	Chemische Zusammensetzung von Wein inklusive der durchschnittlichen Mengen der wichtigsten Weinhaltstoffe	11
Abb. 4	Grundgerüst der Isoprene und Terpene	16
Abb. 5	Mono- und Disaccharid-Zuckerreste, die als Aroma-Präkursoren in Trauben identifiziert wurden	21
Abb. 6	Sequentieller Mechanismus der Glycosidasen	25
Abb. 7	Prozess-Schema Weißweinherstellung mit Enzymzugabe	28
Abb. 8	Strukturelle Überlagerung des dreidimensionalen Modells einer <i>A. niger</i> ASKU28 β -Glucosidase (cyan) mit der Kristallstruktur einer β -D-Glucan Exohydrolase (Exol) aus Gerste im Komplex mit Glucose	42
Abb. 9	Abstand zwischen den sauren und nukleophilen Resten beim Inverting-Mechanismus (A) und Retaining-Mechanismus (B)	43
Abb. 10	Mechanismus von (A) Inverting und (B) Retaining-Glucosidasen	44
Abb. 11	Verfahrensschritte bei der Herstellung von Enzymen	50
Abb. 12	Schematische Darstellung einer Fermentation in der Enzymherstellung	51
Abb. 13	Schematische Darstellung des Enzymgewinnungsprozesses	52
Abb. 14	Schematische Darstellung des Granulationsprozesses von Enzymen	52
Abb. 15	Irreversible Methoden der Enzym-Immobilisierung	54
Abb. 16	Reversible Methoden der Enzym-Immobilisierung	56
Abb. 17	Schematische Darstellung des Lineweaver-Burk-Diagramms	80
Abb. 18	Mechanismus der Enzym-Kopplung mit Carbodiimid	84
Abb. 19	Schematische Darstellung der M-PVA C22 Magnetit-Partikel	85
Abb. 20	HPLC-Chromatogramm der Phenol-Standardlösung der Konzentration 10 mg/l bei 280 nm	93
Abb. 21	HPLC-Chromatogramm der Phenol-Standardlösung der Konzentration 10 mg/l bei 320 nm	94
Abb. 22	HPLC-Chromatogramme der Standardaddition (10 mg/l) bei 280 nm überlagert: Wein (blau) und Wein plus Phenol-Standards (grün)	94
Abb. 23	HPLC-Chromatogramme der Standardaddition (10 mg/l) bei 320 nm überlagert: Wein (blau) und Wein plus Phenol-Standards (grün)	95
Abb. 24	HPLC-Chromatogramm der Standards: 1 Weinsäure, 2 Äpfelsäure, 3 Glucose, 4 Fructose, 5 Glycerin, 6 Ethanol	96
Abb. 25	Schematische Darstellung der SDE nach Likens und Nickerson (1964)	98

Abb. 26 GC/MS-Chromatogramm der Terpen-Standards der Konzentration 20 mg/l	104
Abb. 27 Hochgradient-Magnet-Separator (A) und Rotor-Stator-Filtermatrix (B)	107
Abb. 28 Verwendete Rotor-Stator-Filtermatrix	107
Abb. 29 Proteingehalte der Enzympräparate nach Kjeldahl	111
Abb. 30 Proteingehalte der Enzympräparate nach Bradford	112
Abb. 31 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Temperatur	115
Abb. 32 Aktivität (nkat/mg _E) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Temperatur	115
Abb. 33 Aktivität (nkat/mg _P) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Temperatur	115
Abb. 34 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit des pH-Wertes	117
Abb. 35 Aktivität (nkat/mg _E) der Enzympräparate in Abhängigkeit des pH-Wertes	117
Abb. 36 Aktivität (nkat/mg _P) der Enzympräparate in Abhängigkeit des pH-Wertes	117
Abb. 37 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Ethanol-Konzentration	119
Abb. 38 Aktivität (nkat/mg _E) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Ethanol-Konzentration	119
Abb. 39 Aktivität (nkat/mg _P) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Ethanol-Konzentration	119
Abb. 40 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Fructose-Konzentration	121
Abb. 41 Aktivität (nkat/mg _E) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Fructose-Konzentration	121
Abb. 42 Aktivität (nkat/mg _P) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Fructose-Konzentration	121
Abb. 43 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Glucose-Konzentration	123
Abb. 44 Aktivität (nkat/mg _E) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Glucose-Konzentration	123
Abb. 45 Aktivität (nkat/mg _P) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Glucose-Konzentration	123
Abb. 46 Relative Aktivität (%) der Enzympräparate in Abhängigkeit der Kaliumdisulfit-Konzentration bei pH 3,2	125
Abb. 47 Schematische Darstellung des nach Yang et al. (2015) vorgeschlagenen Mechanismus für Glucose-Effekte auf GH1 β -Glucosidasen	127
Abb. 48 Immobilisierungsausbeute (%) der β -Glucosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5	130
Abb. 49 Immobilisierungseffizienz der β -Glucosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5	130
Abb. 50 Immobilisierungsausbeute der Arabinosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5	131
Abb. 51 Immobilisierungseffizienz der Arabinosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5	132

Abb. 52 Immobilisierungsausbeute der Rhamnosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5	132
Abb. 53 Immobilisierungseffizienz der Rhamnosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5	133
Abb. 54 Immobilisierungsausbeute der Xylosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5	133
Abb. 55 Immobilisierungseffizienz der Xylosidase im pH-Bereich 3,0 bis 6,5	134
Abb. 56 Immobilisierungsausbeute der Glycosidasen im pH-Bereich 3,0 bis 6,5	134
Abb. 57 Immobilisierungseffizienz der Glycosidasen im pH-Bereich 3,0 bis 6,5	135
Abb. 58 Relative Aktivität (%) der freien und immobilisierten β -Glucosidase in Abhängigkeit des pH-Werts	139
Abb. 59 Relative Aktivität (%) der freien und immobilisierten β -Glucosidase in Abhängigkeit der Temperatur	140
Abb. 60 Relative Aktivität (%) der freien und immobilisierten β -Glucosidase in Abhängigkeit der Ethanol-Konzentration	141
Abb. 61 Relative Aktivität (%) der freien und immobilisierten β -Glucosidase in Abhängigkeit der Glucose-Konzentration	141
Abb. 62 Relative Aktivität (%) der freien und immobilisierten β -Glucosidase in Abhängigkeit der Fructose-Konzentration	142
Abb. 63 Relative Aktivität der freien und immobilisierten Arabinosidase	143
Abb. 64 Relative Aktivität der freien und immobilisierten Rhamnosidase	143
Abb. 65 Relative Aktivität der freien und immobilisierten Xylosidase	144
Abb. 66 Lineweaver-Burk-Diagramm der immobilisierten β -Glucosidase bei unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen	148
Abb. 67 Lineweaver-Burk-Diagramm der freien β -Glucosidase bei unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen	149
Abb. 68 Rest-Aktivität (%) der immobilisierten β -Glucosidase bei Lagerung im Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0), Modell-Wein und Wein (Gewürztraminer)	156
Abb. 69 Rest-Aktivität (%) der immobilisierten Glycosidasen nach 70 Tagen im Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0)	157
Abb. 70 Rest-Aktivität (%) der immobilisierten Glycosidasen nach 70 Tagen im Modell-Wein	158
Abb. 71 Rest-Aktivität (%) der immobilisierten Glycosidasen nach 70 Tagen in Wein (Gewürztraminer)	158
Abb. 72 Glykosid-Gehalt im Gewürztraminer und Morio Muskat vor und nach Enzymbehandlung	160
Abb. 73 Verlauf der Eisenmigration durch Magnetit-Partikel-Einsatz in verschiedenen Medien (Gewürztraminer, Morio Muskat, Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0) und Modell-Wein)	162
Abb. 74 Schleier-Bildung und Trübung im Wein nach Magnetit-Partikel-Einsatz	163

Abb. 75 Bodensatz im Modell-Wein nach Magnetit-Partikel-Einsatz	164
Abb. 76 Verlauf der Eisenmigration durch Magnetit-Partikel-Einsatz bei verschiedenen Weinsäure-Konzentrationen	165
Abb. 77 Rest-Aktivität (%) der immobilisierten β -Glucosidase nach 6 Separationen aus Wein ($c_{\text{Partikel}} = 0,15 \text{ g/l}$) mittels Hochgradient-Magnet-Separator	167
Abb. 78 Einzelphenolgehalte (mg/l) im Gewürztraminer (Jahrgang 2014) vor und nach Enzymeinsatz ($n=2$; $p=0,05$)	172
Abb. 79 Einzelphenolgehalte (mg/l) im Morio Muskat (Jahrgang 2014) vor und nach Enzymeinsatz ($n=2$; $p=0,05$)	173
Abb. 80 HPLC-Chromatogramm Gewürztraminer bei 320 nm: Vergleich unbehandelte (blau) und behandelte (immobilisiertes Enzym; grün) Weinprobe	177
Abb. 81 HPLC-Chromatogramm Morio Muskat bei 320 nm: Vergleich unbehandelte (blau) und behandelte (immobilisiertes Enzym; grün) Weinprobe	178
Abb. 82 Postulierte katalytische Wirkung von Eisen- und Kupfer-Ionen bei der Oxidation von Catechinen zu Chinonen und Wasserstoffperoxid	178
Abb. 83 GC/MS-Chromatogramm: Vergleich der mit immobilisiertem und freiem Enzym behandelten Glykosid-Extrakte (gelöst in Modell-Wein) im Vergleich zur Kontrollprobe	180
Abb. 84 Terpenegehalt ($\mu\text{g/l}$) im Morio Muskat vor und nach Enzymeinsatz	183
Abb. 85 Terpenegehalt ($\mu\text{g/l}$) im Gewürztraminer vor und nach Enzymeinsatz	184
Abb. 86 Gehalt an Alterungs- bzw. Oxidationsaromen (als 4-Nonanol-Äquivalente, $\mu\text{g/l}$) im Gewürztraminer vor und nach Enzymeinsatz	188
Abb. 87 Gehalt an Alterungs- bzw. Oxidationsaromen (als 4-Nonanol-Äquivalente, $\mu\text{g/l}$) im Morio Muskat vor und nach Enzymeinsatz	189
Abb. 88 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung „Geruch“ für den Morio Muskat (Prüferpanel, $n=10$)	192
Abb. 89 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung „Geruch“ für den Gewürztraminer (Prüferpanel, $n=10$)	193
Abb. 90 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung „Geschmack“ für den Morio Muskat (Prüferpanel, $n=10$)	194
Abb. 91 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung „Geschmack“ für den Gewürztraminer (Prüferpanel, $n=10$)	195
Abb. 92 Reaktionskette der Sauerstoffreduktion	197
Abb. 93 Schematische Darstellung des Weinherstellungsprozesses mit entsprechender Implementierung magnetischer Enzyme	201

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Durchschnittliche Zusammensetzung von Traubenmost	10
Tab. 2	Strukturen, Geruchseigenschaften und Geruchsschwellenwerte einiger wichtiger Monoterpene in Wein	17
Tab. 3	Strukturen, Geruchseigenschaften und Geruchsschwellenwerte einiger wichtiger C ₁₃ -Norisoprenoide im Wein	19
Tab. 4	Zulässige Höchstwerte für Schwefeldioxid in Wein	31
Tab. 5	Erhöhung ausgewählter Terpenegehalte vor und nach enzymatischer Behandlung	34
Tab. 6	Verwendete Enzympräparate in dieser Arbeit	36
Tab. 7	Inhibition der β -Glucosidase durch Glucose	46
Tab. 8	Charakteristika verschiedener Glycosidasen vom Typ <i>A. niger</i>	48
Tab. 9	Zusammensetzung fester und flüssiger Enzympräparate	53
Tab. 10	Klassifizierung von Trägermaterialien zur Immobilisierung	58
Tab. 11	Literaturdaten zur Immobilisierung von Glycosidasen	59
Tab. 12	Photometrie-Parameter zur Bestimmung der Enzymaktivität	72
Tab. 13	Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze für p-Nitrophenol	74
Tab. 14	Wiederholstandardabweichung/Variationskoeffizient von p-Nitrophenol	74
Tab. 15	Photometrie-Parameter zur Bestimmung der Enzymaktivität	79
Tab. 16	Parameter zur Immobilisierung und Bestimmung der Immobilisierungsausbeute/-effizienz	84
Tab. 17	Parameter zur Bestimmung der Stabilität gekoppelter Enzyme	87
Tab. 18	Parameter zur Isolierung von Glykosiden aus Wein	89
Tab. 19	Semiquantitative Bestimmung möglicher Alterungs- bzw. Oxidationsstoffe	104
Tab. 20	Parameter der Hochgradient-Magnet-Separations-Laboranlage	106
Tab. 21	Glycosidase-Aktivitäten bei pH 3,5 und 25 °C	126
Tab. 22	Aktivitäten der freien und immobilisierten Glycosidasen bei pH 5,0 und 37 °C, Kopplungs-pH 3,8	136
Tab. 23	K _M -Werte der freien und immobilisierten β -Glucosidase bei verschiedenen Parametern	147
Tab. 24	K _i - und α -Werte für die freie und immobilisierte β -Glucosidase	150
Tab. 25	k _{cat} -Werte für die freie und immobilisierte β -Glucosidase bei unterschiedlichen Parametern	153
Tab. 26	Konzentrationen an Weinsäure, Äpfelsäure, Glucose, Fructose, Glycerin und Ethanol vor und nach Enzymeinsatz im Gewürztraminer und Morio Muskat	168
Tab. 27	Gesamtphenolgehalte der Weinproben vor und nach Enzymeinsatz	169
		255

Tab. 28 Einzelphenolgehalte (mg/l) im Gewürztraminer vor und nach Enzymeinsatz	171
Tab. 29 Einzelphenolgehalte (mg/l) im Morio Muskat vor und nach Enzymeinsatz	172
Tab. 30 Einzelphenolgehalte im Gewürztraminer vor und nach Enzymeinsatz	175
Tab. 31 Einzelphenolgehalte im Morio Muskat vor und nach Enzymeinsatz	175
Tab. 32 Terpenegehalt im Glykosid-Extrakt vor und nach Enzymeinsatz	181
Tab. 33 Terpenegehalt ($\mu\text{g/l}$) im Morio Muskat vor und nach Enzymeinsatz	182
Tab. 34 Terpenegehalt ($\mu\text{g/l}$) im Gewürztraminer vor und nach Enzymeinsatz	183
Tab. 35 Terpenegehalt ($\mu\text{g/l}$) der behandelten Weine für Sensorik-Versuche	187
Tab. 36 Gehalt an Alterungs- bzw. Oxidationsaromen im Gewürztraminer vor und nach Enzymeinsatz	188
Tab. 37 Gehalt an Alterungs- bzw. Oxidationsaromen im Morio Muskat vor und nach Enzymeinsatz	188
Tab. 38 Ergebnisse der Signifikanzprüfungen der deskriptive Sensorik- Intensitätsprüfung „Geruch“	191
Tab. 39 Ergebnisse der Signifikanzprüfungen der deskriptiven Sensorik- Intensitätsprüfung „Geschmack“	193
Tab. 40 Ergebnisse der Rangordnungsprüfung „Geruch“	195
Tab. 41 Ergebnisse der Rangordnungsprüfung „Geschmack“	196
Tab. 42 Standards zur Terpen-Bestimmung (GC)	261
Tab. 43 Standards zur Bestimmung der Einzelphenole (HPLC)	261
Tab. 44 Verwendete Enzympräparate	261
Tab. 45 Verwendete Geräte zur Bestimmung des Proteingehalts nach Kjeldahl	263
Tab. 46 Wiederholstandardabweichung und Verfahrenskoeffizient von Ammoniumsulfat	264
Tab. 47 Photometrie-Parameter zur Bestimmung des Proteingehalts mittels Bradford-Methode	264
Tab. 48 Validierungsparameter der Protein-Bestimmung	265
Tab. 49 Wiederholstandardabweichung und Verfahrenskoeffizient von BSA	265
Tab. 50 Parameter zur Bestimmung des Glykosid-Gehalts	265
Tab. 51 Pipettierschema zur Bestimmung der Glucose-Konzentration	266
Tab. 52 Wiederholstandardabweichung und Verfahrenskoeffizient von n-OG	267
Tab. 53 Parameter zur Bestimmung des Eisengehalts	268
Tab. 54 Validierungsparameter der Eisen-Bestimmung	269
Tab. 55 Wiederholstandardabweichung/Variationskoeffizient der Eisen-Bestimmung	269
Tab. 56 Parameter zur Bestimmung des Gesamtphenolgehalts	270
Tab. 57 Validierungsparameter der Gesamtphenol-Bestimmung	270

Tab. 58 Wiederholstandardabweichung/Variationskoeffizient der Gesamtphenol- Bestimmung	270
Tab. 59 Chromatographische Parameter zur Bestimmung der Einzelphenole	271
Tab. 60 Detektionswellenlängen und Retentionszeiten der Einzelphenole	271
Tab. 61 Kalibrierfunktionen der Einzelphenol-Bestimmung	272
Tab. 62 Wiederholstandardabweichungen/Variationskoeffizienten Einzelphenol- Bestimmung	272
Tab. 63 Chromatographische Parameter zur Bestimmung der Zucker, organischen Säuren und Alkohol im Wein	273
Tab. 64 Retentionszeiten und Kalibrierfunktionen der Zucker, organischen Säuren und Alkohol	273
Tab. 65 Wiederholstandardabweichungen/Variationskoeffizienten der Zucker, organischen Säuren und Alkohol-Bestimmung	274
Tab. 66 Parameter zur Festphasenextraktion der Aromastoffe	274
Tab. 67 Gaschromatographische Parameter zur Bestimmung der Aromastoffe	275
Tab. 68 Parameter zur Bestimmung der Terpene	276
Tab. 69 Kalibrierfunktionen der Terpen-Bestimmung	276
Tab. 70 Wiederholstandardabweichungen/Variationskoeffizienten der Terpen- Bestimmung	277
Tab. 71 Proteingehalt der Enzympräparate und des Immobilisats	278
Tab. 72 Aktivitätswerte der immo. β -Glucosidase in Abhängigkeit der Magnet- Separationen	278
Tab. 73 Glykosid-Gehalt des Gewürztraminers und Morio Muskats vor und nach Enzymbehandlung	278
Tab. 74 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Rapidase, Lallzyme, Natuzym) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Temperatur, pH, Ethanol, Glucose)	279
Tab. 75 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Rapidase, Lallzyme, Natuzym) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Fructose, Kaliumdisulfit)	280
Tab. 76 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Panzym, Lafazym, VinoTaste) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Temperatur, pH, Ethanol, Glucose)	281
Tab. 77 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Panzym, Lafazym, VinoTaste) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Fructose, Kaliumdisulfit)	282
Tab. 78 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Everzym, Zimarom, Novarom) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Temperatur, pH, Ethanol, Glucose)	283

Tab. 79	Aktivitätswerte der Enzympräparate (Everzym, Zimarom, Novarom) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Fructose, Kaliumdisulfit)	284
Tab. 80	Aktivitätswerte der Enzympräparate (Trenolin) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter	285
Tab. 81	Immobilisierungsausbeute der Glycosidasen in Abhängigkeit des pH-Wertes	286
Tab. 82	Immobilisierungseffizienz der Glycosidasen in Abhängigkeit des pH-Wertes	286
Tab. 83	Aktivitätswerte der freien und immo. β -Glucosidase in Abhängigkeit von Temperatur, pH, Ethanol, Glucose und Fructose	287
Tab. 84	Aktivitätswerte der freien und immo. Glycosidasen in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter	288
Tab. 85	Aktivitätswerte der immo. β -Glucosidase über 100 Tage im C/P-Puffer	289
Tab. 86	Aktivitätswerte der immo. β -Glucosidase über 100 Tage im Modell-Wein	290
Tab. 87	Aktivitätswerte der immo. β -Glucosidase über 100 Tage im Wein	291
Tab. 88	Aktivitätswerte der immo. Glycosidasen über 70 Tage im C/P-Puffer	291
Tab. 89	Aktivitätswerte der immo. Glycosidasen über 70 Tage im Modell-Wein	292
Tab. 90	Aktivitätswerte der immo. Glycosidasen über 70 Tage im Wein	292
Tab. 91	Eisen-Konzentrationen der mit Magnetit-Partikel behandelten Lösungen über 70 Tage	293
Tab. 92	Eisen-Konzentrationen der mit Magnetit-Partikel behandelten Weinsäure-Lösungen über 70 Tage	294
Tab. 93	pH-Werte der verwendeten Lösungen	294
Tab. 94	Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung des unbehandelten Gewürztraminers	295
Tab. 95	Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung des behandelten Gewürztraminers	295
Tab. 96	Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung des unbehandelten Morio Muskats	296
Tab. 97	Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung des behandelten Morio Muskats	296

7 Anhang

7.1 Geräte

HPLC-System, Fa. Knauer	Smartline Manager 5000 Smartline Pump 1000 Smartline Autosampler 3800 Smartline JetStream Oven Software: Chromgate Client/Server, Version: 3.3.1
HPLC-UV	Smartline UV Detector 2550, Fa. Knauer
HPLC-RI	Smartline RI Detector 2300, Fa. Knauer
GC/MS, Fa. PerkinElmer	GC: Clarus GC 680 MS: Clarus SQ 8 Software: TurboMass, Version: 6.1.0.1963
pH-Meter	SevenEasy, Fa. Mettler Toledo
Photometer	Lambda 25, Fa. PerkinElmer Software: UV WinLab, Version 6.0.4.0738
Ultraschallbad	Emmi 30, Fa. EMAG Sonorex RK 31, Fa. Bandelin S50 R Elmasonic, Fa. Elma
Waagen	Präzisionswaage: XS105 DualRange, Fa. Mettler Toledo
Wasseraufbereitungsanlage	Puranity TU 3 UV, Fa. VWR
thermostatisches Wasserbad	T100, 18 L, Digital, Kunststofftank, Fa. Grant Instruments
Rotationsverdampfer, Fa. Büchi	Rotavapor R-215 Heating Bath B-491
Vakuumpumpe, Fa. Büchi	Vacuum Pump V-710 Vacuum Controller V-855
Vakuumkammer	Chromabond Vakuumkammer, Fa. Macherey-Nagel
Heizblock	SpeedDigester K-425, Fa. Büchi
Destillationsapparatur für Kjeldahl-Bestimmung	Distillation Unit K-355, Fa. Büchi
Heizblock	Dri-Block DB200/3, Fa. Techne
Vortex	MS 3 basic, Fa. IKA
Titration	T82/50, Fa. Schott Geräte
HGMS-Laboranlage	
Förderpumpen	peristaltische Pumpe: Ismatec MCP, Fa. IDEX Health & Science GmbH Pumpenkopf: Easy-Load 2, Fa. Masterflex SE Pumpenkopf: MS und CA 4-12, Fa. IDEX Health & Science GmbH
Schläuche	Pumpenschlauch: Innendurchmesser 8 mm; Rohrleitungen der Anlage: aus Polyurethan Innendurchmesser 6 mm und Schnellkupplungen aus Polyoxymethylen Fa. Riegler & Co. KG
Hochgradient-Magnet-Separator	Vulkan Technic GmbH, Fa. Wiesbaum und Fa. PerkinElmer chemagen Technology GmbH
Durchflusszytometer	cytometer CyFlow Space, Fa. Sysmex Partec GmbH

7.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril, für LC/MS	VWR Chemicals
Albumin Fraktion V für biochemische Zwecke (BSA)	Merck
Ammoniumacetat, zur Analyse	Merck Millipore
Ammoniumhydroxid, Ammoniaklösung 20 %, zur Analyse	VWR Chemicals
Borsäure, zur Analyse	Merck Millipore
Brilliant Blue G250 (Coomassie)	Sigma-Aldrich
Citronensäure-Monohydrat, zur Analyse	VWR Chemicals
D(-)-Fructose, für biochemische Zwecke	Merck Millipore
D(+)-Glucose, für biochemische Zwecke	Merck Millipore
Dichlormethan für die HPLC	Merck Millipore
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, zur Analyse	VWR Chemicals
DL-Äpfelsäure, für biochemische Zwecke	Merck Millipore
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, zur Analyse	Merck Millipore
Essigsäure 100 % (Eisessig), zur Analyse	Merck Millipore
Ethanol 96 %, zur Analyse	VWR Chemicals
Ethanol absolut	VWR Chemicals
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (2 M)	Merck Millipore
Glucose (HK) Assay Kit	Sigma-Aldrich
Glycerin, zur Analyse	Merck Millipore
Helium, Reinheit 6.7	Tyczka Industrie-Gase
Hydroxylammoniumchlorid, zur Analyse	Merck Millipore
Kaliumdisulfit, zur Analyse	Merck Millipore
Kjeldahl-Tabletten, 3,5 g	Merck Millipore
L(+)-Weinsäure, zur Analyse	Merck Millipore
Methanol, HPLC	VWR Chemicals
Natriumcarbonat, wasserfrei, zur Analyse	Merck Millipore
Natriumhydrogenphosphat, zur Analyse	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid, zur Analyse	Merck Millipore
Natronlauge, 1 M, Titrisol	Merck Millipore
n-Pentan, zur Analyse	VWR Chemicals
ortho-Phosphorsäure 85 %, HPLC	VWR Chemicals
1,10-Phenanthroliniumchlorid-Monohydrat, zur Analyse	Merck Millipore
p-Nitrophenol, zur Analyse	Merck
p-Nitrophenyl- α -L-Arabinofuranosid	Carbosynth
p-Nitrophenyl- α -L-Rhamnopyranosid	Carbosynth
p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid, für die Biochemie	Carl Roth
p-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranosid	Roth
Schwefelsäure 95 %, zur Analyse	VWR Chemicals
Schwefelsäure, 0,1 M, Titrisol	Merck Millipore
Tashiro-Indikator-Lösung	Fluka Analytical
Wasserstoffperoxid 30 %, zur Analyse	Merck Millipore

Tab. 42 Standards zur Terpen-Bestimmung (GC)

Standard	Hersteller
Linalooloxid, cis/trans	Sigma-Aldrich
4-Nonanol, 95 %	ALFA AESAR
Linalool, 97 %	Sigma-Aldrich
α -Terpineol, 95 %	ABCR
β -Citronellol, 95 %	Sigma-Aldrich
β -Damascenon	Sigma-Aldrich
Nerol, 97 %	Sigma-Aldrich
Geraniol, 98 %	Sigma-Aldrich
β -Ionon	Sigma-Aldrich

Tab. 43 Standards zur Bestimmung der Einzelphenole (HPLC)

Standard	Hersteller
Gallussäure, 98,5 %	Sigma-Aldrich
Protocatechusäure, 97 %	Sigma-Aldrich
Tyrosol, 98 %	Sigma-Aldrich
Protocatechualdehyd, HPLC	Fluka
(+)-Catechinhydrat, > 98 %, HPLC	Sigma-Aldrich
Vanilinsäure, > 97 %, HPLC	Fluka
Kaffeensäure, > 98 %, HPLC	Sigma-Aldrich
Syringasäure, > 95 %	Sigma-Aldrich
(-)-Epicatechin, > 90 %, HPLC	Sigma-Aldrich
p-Coumarsäure, > 98 %, HPLC	Sigma-Aldrich
Syringaaldehyd, 98 %	Sigma-Aldrich
trans-Ferulasäure, 99 %	Sigma-Aldrich
trans-Resveratrol, 98 %	ABCR

Tab. 44 Verwendete Enzympräparate

Enzym	LOT-Nr.	Einsatz
Rapidase Revelation Aroma, Fa. Oenobrandis	91215160C	2-3 g/hl, 2-10 Wochen
Lallzyme Beta, Fa. Lallemand	672940610740F	5 g/hl
Panzym Arome G, Fa. SIHA	12 099601	4-5 g/hl, 10-15 Tage
VinoTaste Pro, Fa. Novozymes	KM24501101	6 g/hl
Natuzym Arom MG, Fa. Schliessmann Kellerei-Chemie	2345	3-5 g/hl, 2-3 Wochen
Trenolin Bukett DF, Fa. Erbslöh	14389	10 ml/hl
Novarom Blanc, Fa. Novozymes	KJ51000401	5 g/hl
Lafazym Arom, Fa. Laffort	KJ51000501L	3-5 g/hl, 3-5 Wochen
Everzym Arom, Fa. Ever Intec		1-3 g/hl
Zimarom, Fa. Vason Group		1-3 g/hl

7.3 Verbrauchsmaterialien

Einmalküvetten	PMMA, 2,5 ml makro, Fa. Brand PMMA, halbmikro, Fa. VWR
Filterpapier	Faltenfilter, Sorte 313, 125 mm, Fa. VWR
Glas-Pasteurpipetten	150 mm, Fa. VWR
Membranfilter	CHROMAFIL Xtra PET-20/25, 0,2 µm, Fa. Macherey-Nagel
Vials	1,5 ml Rollrandflasche, Aluminium Bördelkappe, Septen Naturkautschuk rot-orange/Butyl rot/PTEF transparent, Fa. VWR 1,5 ml Gewindeflasche, Schraubkappen ND8, Septen Silikon weiß/PTFE rot, Fa. VWR
SPE-Säulen	Bond Elut ENV, 200 mg, 3 ml Bond Elut C18, 500 mg, 3 ml beide Fa. Agilent Technologies
Reaktionsgefäße	1,7 ml (Eppendorf Tubes), Fa. VWR
GC-Säule	Kapillarsäule Zebtron ZB-WAX (30 m x 0,25 mm ID; 0,25 µm Film) Polyethylenglykol, Fa. Phenomenex
HPLC-Säulen	Kinetex PFP (Pentafluorphenyl) TMS encapped, 75 x 4,6 mm, 2,6 µm, Fa. Phenomenex Eurokat H, 300 x 8 mm, 10 µm mit Vorsäule gleichen Materials, Fa. Knauer

7.4 Methoden

7.4.1 Proteinbestimmung

7.4.1.1 Kjeldahl-Methode

7.4.1.1.1 Durchführung

Tab. 45 Verwendete Geräte zur Bestimmung des Proteingehalts nach Kjeldahl

Destillationsapparatur zur Bestimmung des Gesamtstickstoff-Gehalt (Kjeldahl)	Distillation Unit K-355, Fa. Büchi
Heizblock	SpeedDigester K-425, Fa. Büchi
Titратор	T82/50, Fa. Schott Geräte

Die Einwaage der Probe wurde quantitativ in ein Aufschlussglas überführt. Hinzu wurde 1 Tablette des Kjeldahl-Katalysators (Missouri-Katalysator) und 10 ml Schwefelsäure (96 %ig) dazugeben. Die Aufschlussgläser wurden in den Ausschussblock eingesetzt und solange erhitzt bis eine klare Schmelze entstanden war. Anschließend wurden die Gläser abgekühlt und schließlich 50 ml Wasser dazugegeben.

In einen 250 ml Erlenmeyerkolben (Vorlage) wurden 50 ml Borsäure (4 %ig) gegeben, mit Wasser auf ca. 100 ml aufgefüllt, ca. 1 ml Tashiro-Indikator dazugegeben und in die Destillationsapparatur eingesetzt. Zur Probe im Aufschlussglas wurden zügig ca. 40 ml Natronlauge (33 %ige) dazugegeben und anschließend ebenfalls in die Destillationsapparatur eingesetzt. Die Wasserdampf-Destillation wurde gestartet und so lange destilliert bis ca. 150 ml in der Vorlage des Erlenmeyerkolbens waren. Die Vorlage wurde anschließend mit 0,1 M Schwefelsäure-Lösung bis zum Umschlagspunkt titriert und der Verbrauch notiert.

7.4.1.1.2 Auswertung

Aus dem Verbrauch an Schwefelsäure-Lösung konnte der Stickstoffgehalt bestimmt werden (s. Gl. 23):

$$\% \text{ Stickstoff } (N) = \frac{(a - b) * 14,008 * 0,1 * t * 100}{E} \quad \text{Gl. 23}$$

a = Verbrauch an Schwefelsäure im Hauptversuch

b = Verbrauch an Schwefelsäure im Blindversuch

t = Titer der Schwefelsäure

E = Probeneinwaage in g

Über den berechneten Stickstoffgehalt der Probe konnte der Proteingehalt der Probe über den entsprechenden Faktor 6,9 (reine *A. niger* β -Glucosidase, Fa. Sigma-Aldrich) berechnet werden (s. Gl. 24).

$$\% \text{ Protein} = \% N * F \quad \text{Gl. 24}$$

F = Umrechnungsfaktor zur Errechnung des Proteingehalts

Tab. 46 Wiederholstandardabweichung und Verfahrenskoeffizient von Ammoniumsulfat

Präzision		
Analyt	WF	VK [%]
(NH ₄) ₂ SO ₄	100,1 %	2,6

7.4.1.2 Bradford-Methode

7.4.1.2.1 Durchführung

Tab. 47 Photometrie-Parameter zur Bestimmung des Proteingehalts mittels Bradford-Methode

Photometer	Lambda 25, Fa. PerkinElmer
Wellenlänge	595 nm
Küvetten	1 cm PP-Makroküvette
Messung	gegen Wasser

Für das Bradford-Reagenz wurden 40 mg Brilliant Blue G250 in 50 ml Ethanol (96%) in 1 l Kolben gelöst und 100 ml o-Phosphorsäure (85%ig) dazugegeben. Anschließend wurde mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert. Die Lösung wurde dunkel und kühl aufbewahrt und war etwa einen Monat haltbar.

100 μ l der Probe-Lösung wurden mit 5 ml Brilliant Blue-Lösung versetzt, mit dem Vortex gemischt und bei Raumtemperatur für ca. 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Probe-Lösung in einer Makroküvette bei 595 nm gemessen. Für die Blanklösung wurden 100 μ l Wasser/Puffer mit 5 ml des Bradford-Reagenz versetzt.

7.4.1.2.2 Kalibrierung

Für die Standard-Lösung wurde eine 1,0 mg/ml BSA-Lösung angesetzt, dazu wurde die entsprechende Menge BSA in Wasser oder Puffer der Probenlösungen gelöst.

Folgende Standardkonzentrationen wurden angesetzt:

Protein (BSA) mg/ml	200	300	400	500	750	1000
μ l Standardlösung	200	300	400	500	750	1000
μ l Wasser/Puffer	800	700	600	500	250	0

100 µl Standardlösung wurden mit 5 ml Brilliant Blue-Lösung versetzt, mit dem Vortex gemischt und für ca. 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Extinktion der Probe-Lösung in einer Makroküvette bei 595 nm gemessen. Für die Blanklösung wurden 100 µl Wasser/Puffer mit 5 ml des Bradford-Reagenz versetzt.

Tab. 48 Validierungsparameter der Protein-Bestimmung

Konzentrationen Kalibrierstandard [mg/ml]	Kalibrierfunktion	NG [mg/ml]	EfG [mg/ml]	BG [mg/ml]
0,2 / 0,3 / 0,4 / 0,5 / 0,75 / 1,0	$y = 0,7416x + 0,0826$ $R^2 = 0,9995$	0,023	0,046	0,085

Tab. 49 Wiederholstandardabweichung und Verfahrenskoeffizient von BSA (n=10)

Präzision				
Analyt	WF	MW [mg/ml]	s [mg/ml]	VK [%]
BSA	99,3 %	29,8	1,2	3,9

7.4.1.2.3 Auswertung

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde über die externe Kalibrierung mit BSA im Bereich von 0,2 – 1,0 mg/ml durchgeführt.

7.4.2 Glycosyl-Glucose-Assay

7.4.2.1 Durchführung

Tab. 50 Parameter zur Bestimmung des Glykosid-Gehalts

Vakuunkammer	Chromabond Vakuunkamer, Fa. Macherey-Nagel
Vakuumpumpe	Vacuum Pump V-710, Fa. Büchi
Vakuunkontrollgerät	Vacuum Controller V-855, Fa. Büchi
Festphasenkartusche	Bond Elut C18, Fa. Agilent Technologies
Heizblock	Dri-Block DB200/3, Fa. Techne
Photometer	Lambda 25, Fa. PerkinElmer
Wellenlänge	340 nm
Küvetten	1 cm PP-Makroküvette
Messung	gegen Wasser

7.4.2.1.1 Isolation der Glykoside

Zuerst wurde die SPE-Säule (Festphasenextraktion, engl. solid phase extraction) konditioniert. Dazu wurde die Säule mit 10 ml Methanol, anschließend mit 10 ml Wasser gespült. Danach wurde eine entsprechende Menge der zu untersuchenden

Probe über die Säule eluiert. Die beladene Säule wurde mit 50 ml Wasser gespült, um unerwünschte Fremdstoffe zu entfernen. Die festgehaltenen Glykoside der Probe wurden mit 1,5 ml Ethanol eluiert und mit 3 ml Wasser nachgewaschen. Das Eluat wurde mit Wasser auf 5 ml aufgefüllt.

7.4.2.1.2 Hydrolyse der Glykoside

1 ml des Eluats wurde mit 2 ml einer 2,25 M H_2SO_4 versetzt, um eine Lösung für die Hydrolyse zu erhalten, die 1,5 M H_2SO_4 und 10 % EtOH enthielt. Eine Kontrollprobe wurde ebenso mit Wasser anstatt des Glykosid-Eluat angesetzt, zur Bestimmung der freien (nicht-glykosidischen gebundenen) Glucose-Konzentration im Eluat. Die Blank-Probe wurde mit einer 30 %igen EtOH anstelle des Eluats hergestellt.

Die Proben wurden in Schraubverschluss-Reagenzgläser gegeben und für 1 h bei 100 °C erhitzt, die Kontrolle wurde bei Raumtemperatur gehalten. Nach dem Erhitzen wurden die Proben abgekühlt. Die Versuche wurden im Duplikat durchgeführt.

7.4.2.2 Bestimmung der Glucose

Die D-Glucose-Konzentration der Proben wurde mittels HK/G-6-PDH/Glucose Enzym-Assay-Kit entsprechend der Hersteller-Anleitung bestimmt. Dazu wurden 80 µl der jeweiligen Probe in eine Küvette gegeben und mit 120 µl 2 M NaOH versetzt. Anschließend wurde 1 ml des Glucose-Assay-Reagent (1,5 mM NAD, 1,0 mM ATP, 1,0 U/ml Hexokinase und 1,0 U/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) dazugegeben. Für die Kontrolle wurde Wasser anstelle der NaOH-Lösung dazugegeben. Das Ganze wurde gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 340 nm gegen Wasser gemessen. Proben-Blank des Assay-Kits: Probenvolumen mit 1,0 ml Wasser; Reagent-Blank: 1,0 Glucose-Assay-Reagent mit Probenvolumen an Wasser.

Tab. 51 Pipettierschema zur Bestimmung der Glucose-Konzentration

	Leerversuch [ml]	Probe [ml]
Wasser	0,2	/
Probe	/	0,08
NaOH	/	0,12
Glucose-Assay-Reagent	1,0	1,0

Mischen, nach 15 min die Extinktion der Lösung messen

7.4.2.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte über die Berechnung der freigesetzten Glucose (s. Gl. 25).

$$Total\ GG\ [\mu M] = \frac{(\Delta A)(TV)(F)}{(\varepsilon)(d)(SV)} \quad \text{Gl. 25}$$

Variablen:

A = Absorption

$\Delta A = A_{\text{Test}} - A_{\text{Total Blank}}$

$A_{\text{Total Blank}} = A_{\text{Sample Blank}} + A_{\text{Reagent Blank}}$

TV = Total Assay Volumen (ml)

SV = Sample Volumen (ml)

F = Verdünnungsfaktor durch Probenvorbereitung

ε = Molarer Extinktionskoeffizient für NADH bei 340 nm = 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹

d = Schichtdicke Küvette = 1 cm

7.4.2.4 Wiederholstandardabweichung und Verfahrenskoeffizient

Für die Präzision wurde ein eine 200 μ M n-Octyl- β -D-Glucopyranosid-Lösung (n-OG) 10-fach vermessen.

Tab. 52 Wiederholstandardabweichung und Verfahrenskoeffizient von n-OG (n=10)

Präzision				
Analyt	WF	MW [μ M]	s [μ M]	VK [%]
n-OG	90,1 %	180,3	10,73	5,95

7.4.3 Eisenbestimmung

7.4.3.1 Durchführung

Tab. 53 Parameter zur Bestimmung des Eisengehalts

Heizblock	SpeedDigester K-425, Fa. Büchi
Photometer	Lambda 25, Fa. PerkinElmer
Wellenlänge	508 nm
Küvetten	1 cm PP-Makroküvette
Messung	gegen Wasser

verwendete Reagenzien

- Wasserstoffperoxid, 30% (m/v), eisenfrei.
- Salzsäure, 1 M, eisenfrei.
- Ammoniumhydroxid ($\rho_{20} = 0,92$ g/ml).
- Hydroxylammoniumchlorid 20 % (m/v)
- ortho-Phenanthrolin-Lösung: 1,10-Phenanthroliniumchlorid-Monohydrat in Wasser, 0,5% (m/v)
- Ammoniumacetatlösung: 200 g Ammoniumacetat + 250 ml Eisessig auf 500 ml.
- Fe^{3+} -Lösung, 1 g Eisen pro Liter. Auflösen von 4,84 g Eisen(III)chlorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in Wasser.

Bei Weinen mit einem Zuckergehalt unter 50 g/l wurden 20 ml Wein (bei höheren Eisengehalten konnte die Probenmenge reduziert werden) mit 5 ml Wasserstoffperoxid-Lösung H_2O_2 (30 %, m/v) in einen Kjeldahl-Kolben gegeben. Das Ganze wurde durch Erhitzen aufgeschlossen und auf ein Volumen von 2 bis 3 ml konzentriert. Anschließend wurde das Gemisch abgekühlt und eine ausreichende Menge an Ammoniumhydroxid dazugegeben, um den erhaltenen Rückstand zu alkalisieren, wodurch Hydroxide ausfallen. Dabei musste beachtet werden, dass die Wände des Kjeldahl-Kolbens nicht mit dem Ammoniumhydroxid benetzt wurden. Danach wurde vorsichtig Salzsäure (1 M) dazugegeben, um die ausgefallenen Hydroxide zu lösen, die resultierende Lösung wurde dann in einen 20 ml Messkolben quantitativ überführt und mit der Salzsäure auf 20 ml aufgefüllt. Der Blindversuch wurde mit der gleichen Menge Wasser durchgeführt.

Bei den Proben zur Migration in Abhängigkeit der Weinsäure-Konzentration konnte auf den Aufschluss verzichtet werden, da keine störenden Stoffe, wie Zucker, in den Lösungen vorhanden war.

Die 20 ml der Lösungen wurden in einen separaten 50 ml Messkolben gegeben und mit 2 ml Ammonium-Acetat-Eisessiglösung, 1 ml Hydroxyl-Ammonium-Chloridlösung

und 2 ml ortho-Phenanthrolin versetzt. Die Lösungen wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei dann das Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert. Die Lösungen wurden anschließend bei einer Wellenlänge von 508 nm vermessen. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

7.4.3.2 Kalibrierung

Für die Kalibration wurde eine 1 g/l Eisen-Standardlösungen aus Eisen-III-chlorid hergestellt. Aus der Standardlösung wurden anschließend die Standardlösungen für die Kalibrierreihe hergestellt. Dazu wurden aus der Standardlösung entsprechende Verdünnungen in 1 M Salzsäure hergestellt. 20 ml der entsprechenden Konzentration wurden in je einen 50-ml-Messkolben und wie oben beschrieben weiterverfahren. Die entsprechende Absorption der Standardlösungen wurde vermessen.

7.4.3.3 Auswertung

Die Bestimmung des Eisengehalts wurde über eine externe Kalibrierung mit Eisen im Bereich von 0,5 – 10 mg/l durchgeführt.

7.4.3.4 Validierungsparameter

Tab. 54 Validierungsparameter der Eisen-Bestimmung

Konzentrationen Kalibrierstandard [mg/l]	Kalibrierfunktion	NG [mg/l]	EfG [mg/l]	BG [mg/l]
0,5 / 1,0 / 2,0 / 3,0 / 4,0 / 5,0 / 10,0	$y = 0,1097x + 0,00$ $R^2 = 0,9999$	0,086	0,171	0,323

Tab. 55 Wiederholstandardabweichung/Variationskoeffizient der Eisen-Bestimmung (n=10)

Präzision				
Analyt	WF	MW [mg/l]	s [mg/l]	VK [%]
Eisen(III)chlorid	100,8 %	4,0	0,07	1,8

7.4.4 Gesamtphenolgehalt

7.4.4.1 Durchführung

Tab. 56 Parameter zur Bestimmung des Gesamtphenolgehalts

Photometer	Lambda 25, Fa. PerkinElmer
Wellenlänge	750 nm
Küvetten	1 cm PP-Makroküvette
Messung	gegen Wasser

Die Weinproben wurden vor der Bestimmung membranfiltriert. Anschließend wurden in eine 100 ml Messkolben 1 ml Probe, 50 ml Wasser, 5 ml Folin-Ciocalteau-Reagenz und 20 ml Natriumcarbonat-Lösung (gesättigt) in dieser Reihenfolge pipettiert, auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt und geschüttelt. Die Proben wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 750 nm gegen Wasser gemessen. Bei jeder Bestimmung wurde ein Leerwert, d.h. nur Reagenzien, bestimmt. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.4.4.2 Auswertung

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehalts als GAE wurde über eine externe Kalibrierung mit Gallussäure im Bereich von 25 – 300 mg/l durchgeführt.

7.4.4.3 Kalibrierung/Validierungsparameter

Die Kalibriergerade und die Validierungsparameter des Gesamtphenolgehalts sind in Tab. 57 und Tab. 58 dargestellt. Für die Präzision wurde ein Wein 10-fach vermessen.

Tab. 57 Validierungsparameter der Gesamtphenol-Bestimmung

Konzentrationen Kalibrierstandard [mg/l]	Kalibrierfunktion	NG [mg/l]	EfG [mg/l]	BG [mg/l]
25 / 50 / 75 / 100 / 200 / 300	$y = 0,0009x + 0,0083$ $R^2 = 0,9997$	5,6	11,2	21,3

Tab. 58 Wiederholstandardabweichung/Variationskoeffizient der Gesamtphenol-Bestimmung (n=10)

Präzision				
Analyt	WF	MW [mg/l]	s [mg/l]	VK [%]
Gallussäure	99,9 %	199,8	4,1	2,0

7.4.5 Einzelphenol-Bestimmung

Tab. 59 Chromatographische Parameter zur Bestimmung der Einzelphenole

HPLC-System	HPLC-UV, Fa. Knauer		
Säule	Phenomenex Kinetex PFP		
Säulen-Material	Pentafluorphenyl, TMS encapped, 75 x 4,6 mm, 2,6 µm		
Säulentemperatur	25 °C		
Flussrate	1 ml/min		
Fließmittel	A: Wasser/Phosphorsäure (99,5/0,5 % v/v) B: Acetonitril/Wasser/Phosphorsäure (50/49,5/0,5 % v/v)		
Injektionsvolumen	20 µl		
Gradient	Zeit [min]	% A	% B
	0	95	5
	3	95	5
	11	80	20
	25	30	70
	26	0	100
	31	0	100
	32	95	5
41	95	5	
Detektionswellenlängen	280 / 320 nm		

Die Proben und Kalibrierstandards wurden membranfiltriert (PET-Membran; 0,2 µm; VWR) und anschließend direkt injiziert.

7.4.5.1 Kalibrierung

Tab. 60 Detektionswellenlängen und Retentionszeiten der Einzelphenole

Analyt	Wellenlänge [nm]	Retentionszeit [min]
Gallussäure	280	2,95
Protocatechusäure	280	5,95
Tyrosol	280	7,05
Protocatechualdehyd	320	8,45
Vanillinsäure	280	12,0
(+)-Catechin	280	12,4
Kaffeesäure	320	13,0
Syringasäure	280	13,4
(-)-Epicatechin	280	15,0
p-Coumarsäure	320	15,9
Syringaldehyd	320	16,1
Ferulasäure	320	17,0
trans-Resveratrol	320	21,7

Tab. 61 Kalibrierfunktionen der Einzelphenol-Bestimmung

Analyt	Konzentrationen Kalibrierstandard [mg/l]	Kalibrierfunktion	R ²
Gallussäure	0,5 / 1,0 / 10 / 20 / 50	$y = 51091,8x + 12514,5$	0,9998
Protocatechusäure	0,5 / 1,0 / 2,0 / 10 / 20	$y = 31918,8x - 3552,1$	0,9999
Tyrosol	0,5 / 1,0 / 10 / 20 / 50	$y = 11186,9x - 2111,1$	0,9999
Protocatechualdehyd	0,5 / 1,0 / 10 / 20 / 50	$y = 82927,8x - 17049,0$	0,9998
Vanilinsäure	0,5 / 1,0 / 10 / 20 / 50	$y = 38348x + 659,8$	1
(+)-Catechin	0,5 / 1,0 / 10 / 20 / 50	$y = 55863,8x + 24716,2$	0,9999
Kaffeesäure	0,5 / 1,0 / 10 / 20 / 50	$y = 95349,2x - 13236,2$	0,9999
Syringasäure	0,5 / 1,0 / 10 / 20 / 50	$y = 53314,4x + 13477,1$	0,9999
(-)-Epicatechin	0,5 / 1,0 / 10 / 20 / 50	$y = 12761,8x - 2546,8$	0,9999
p-Coumarsäure	0,5 / 1,0 / 10 / 20 / 50	$y = 114896,3x - 30918,1$	0,9999
Syringaaldehyd	0,5 / 1,0 / 10 / 20 / 50	$y = 65067,4x + 1053,9$	0,9999
Ferulasäure	0,2 / 1,0 / 2,0 / 10 / 20	$y = 89829,2x - 11948,7$	0,9998
trans-Resveratrol	0,2 / 1,0 / 2,0 / 10 / 20	$y = 116879,2x - 8407,1$	1

Tab. 62 Wiederholstandardabweichungen/Variationskoeffizienten Einzelphenol-Bestimmung (n=10)

Analyt	WF	MW [mg/l]	s [mg/l]	VK [%]
Gallussäure	100,1 %	5,00	0,071	1,42
Protocatechusäure	99,4 %	4,97	0,137	2,76
Tyrosol	99,1 %	14,86	0,574	3,86
Protocatechualdehyd	100,1 %	5,01	0,116	2,32
Vanilinsäure	99,7 %	4,98	0,105	2,11
(+)-Catechin	101,1 %	5,05	0,077	1,53
Kaffeesäure	100,5 %	5,02	0,110	2,19
Syringasäure	100,5 %	5,03	0,132	2,63
(-)-Epicatechin	99,4 %	4,97	0,107	2,05
p-Coumarsäure	100,4 %	5,02	0,124	2,48
Syringaaldehyd	101,1 %	5,05	0,150	2,96
Ferulasäure	101,1 %	2,53	0,094	3,70
trans-Resveratrol	100,3 %	2,51	0,095	3,79

7.4.6 Zucker, organische Säuren und Alkohol im Wein

Tab. 63 Chromatographische Parameter zur Bestimmung von Zucker, organischen Säuren und Alkohol im Wein

HPLC-System	HPLC mit RI-Detektor, Knauer
Säule	Eurokat H, 300 x 8 mm, 10 µm mit Vorsäule gleichen Materials, Fa. Knauer
Säulentemperatur	80 °C
Flussrate	0,4 ml/min
Fließmittel	0,0006 M H ₂ SO ₄
Injektionsvolumen	20 µl

7.4.6.1 Probenvorbereitung

Zur Aufarbeitung wurden die Proben membranfiltriert (0,2 µm PET) und anschließend direkt injiziert, falls nötig wurden die Proben entsprechend verdünnt. Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.4.6.2 Kalibrierung

Zur quantitativen Bestimmung der Zucker und Säuren wurden Stammlösungen der Konzentration für Weinsäure, Äpfelsäure, Glucose, Fructose und für Ethanol und Glycerin in Wasser hergestellt. Aus den Stammlösungen wurden Verdünnungen in den Konzentrationen 0,2 / 1 / 5 / 7,5 und 10 g/l (Glucose, Fructose, Weinsäure und Äpfelsäure) und 2 / 9,6 / 48 / 96 und 160 g/l (Ethanol und Glycerin) hergestellt.

7.4.6.3 Auswertung

Aus den Regressionsgeraden der Auftragung der Konzentration gegen die jeweiligen Peakflächen wurden die Gehalte der entsprechenden Analyten in den Proben ermittelt. Die jeweiligen Retentionszeiten und Kalibrierfunktionen sind in Tab. 64 dargestellt.

Tab. 64 Retentionszeiten und Kalibrierfunktionen der Zucker, organische Säuren und Alkohol

Analyt	Retentionszeit [min]	Kalibrierfunktion	Bestimmtheitsmaß R²
Weinsäure	12,5	$y = 379415x + 31012$	0,9991
Äpfelsäure	13,5	$y = 342094x + 6393$	0,9999
Glucose	14,8	$y = 359567x + 51561$	0,9974
Fructose	15,6	$y = 348724x + 11938$	0,9999
Glycerin	21,3	$y = 319635x + 49165$	0,9998
Ethanol	34,7	$y = 170696 - 143184$	0,9993

7.4.6.4 Standardabweichung/Variationskoeffizienten

Zur Bestimmung der Standardabweichung (s) und des Variationskoeffizienten wurde ein Wein zehnfach gemessen.

Tab. 65 Wiederholstandardabweichungen/Variationskoeffizienten der Zucker, organischen Säuren und Alkohol-Bestimmung (n=10)

Analyt	WF	MW [g/l]	s [g/l]	VK [%]
Weinsäure	100,6 %	2,52	0,045	1,78
Äpfelsäure	100,5 %	2,51	0,056	2,24
Glucose	100,2 %	8,02	0,100	1,25
Fructose	99,8 %	7,99	0,206	2,58
Glycerin	100,3 %	10,03	0,118	1,18
Ethanol	99,9 %	79,92	1,872	2,34

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden gemäß Kapitel 3.1.2.3 ermittelt. Hierbei wurden die Peakhöhen des Grundrauschens des jeweiligen kleinsten Standards betrachtet und das jeweilige Signal/Rausch-Verhältnis bestimmt. Dabei erfüllten alle Standards bereits bei der kleinsten Konzentration das erforderliche S/N-Verhältnis für die Bestimmungsgrenze.

7.4.7 Terpen-Bestimmung mittels GC/MS

7.4.7.1 Probenvorbereitung

Die flüchtigen Aromakomponenten wurden mittels Festphasenextraktion (SPE) mit einer Bond Elut-ENV Patrone (200 mg) nach López et al. (2002) und Piñeiro et al. (2004) isoliert und für die GC/MS-Messung vorbereitet [412, 413].

Tab. 66 Parameter zur Festphasenextraktion der Aromastoffe

Vakuunkammer	Chromabond Vakuunkamer, FA. Macherey-Nagel
Vakuumpumpe	Vacuum Pump V-710, Fa. Büchi
Vakuum-Kontrollgerät	Vacuum Controller V-855, Fa. Büchi
Festphasenkartusche	Bond Elut ENV (200 mg), Fa. Agilent Technologies

Dazu wurden die SPE-Kartuschen nacheinander mit je 4 ml Dichlormethan, Methanol und schließlich mit einem Wasser-Ethanol-Gemisch (12 Vol.-%) konditioniert. Anschließend wurden 50 ml der Probe mit 100 µl einer internen Standardlösung (Konzentration 50 µg/ml) versetzt, um eine Konzentration von 100 µg/l des internen

Standards in der Probe zu erhalten. Die Probe wurde durch die bereits vorkonditionierte SPE-Säule mit ca. 2 – 3 ml/min mittels Vakuum gesaugt und anschließend wurde die Kartusche mit 10 ml Wasser gewaschen, um störende Stoffe wie Zucker zu eliminieren. Danach wurde das Sorbens getrocknet indem 10 min Luft bei -0,6 bar durch die Kartusche gesaugt wurden. Die Elution der freien flüchtigen Aromaverbindungen wurde mit 2 ml Dichlormethan durchgeführt. Der erhaltene Extrakt wurde dann verschlossen und bei -26 °C bis zur GC-MS-Analyse gelagert.

7.4.7.2 Parameter GC/MS

Tab. 67 Gaschromatographische Parameter zur Bestimmung der Aromastoffe in Wein

GC-System	GC: Clarus GC 680, Fa. PerkinElmer MS: Clarus SQ 8, Fa. PerkinElmer
Trennsäule:	Kapillarsäule Zebron ZB-WAX (30 m x 0,25 mm ID; 0,25 µm Film) Polyethylenglykol, Fa. Phenomenex
Injektor:	180°C, splitless
Injektionsvolumen:	1,0 µl
Temperaturprogramm:	5 min 60°C 1,5 °C/min bis 120 °C 5 °C/min bis 180 °C 20 °C/min bis 220°C 10 min 220°C
Trärgas:	Helium, 1,0 ml/min
Detektor:	Transfer-Line 200 °C Quelle 220 °C Elektronenstoßionisation (positiv), 70 eV

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt über die Software TurboMass (Version 6.1.0.1963) und die Stoffdatenbank NIST (National Institute of Standards and Technology) von 2011. Über den internen Standard werden die Verhältnisse der gefundenen Komponenten dargestellt. Die Verbindungen wurden auf Basis ihrer Retentionszeiten und Spektren unter Verwendung der durchsuchbaren MS-Spektren Bibliothek identifiziert.

7.4.7.3 Kalibration

Zur quantitativen Bestimmung der Aromastoffe wurden (Mix)-Stammlösungen der Konzentration 1 g/l in MeOH der Aromastoffe hergestellt. Der interne Standard 4-Nonanol wurde ebenfalls mit 1 g/l in MeOH gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden Verdünnungen in den Konzentrationen 0,22 – 50 mg/l in Pentan/DCM und einer festen Konzentration von 10 mg/l des internen Standard angesetzt, diese Konzentrationen

entsprechen dann den Konzentrationen 2,2 – 500 µg/l und 100 µg/l des internen Standards in Wein. Die entsprechenden Konzentrationen sind in Tab. 69 aufgeführt. Identifizierung der Verbindungen wurde durch Vergleichen Retentionszeiten und Massenspektren (NIST 11.0) mit denen von Standards erreicht. Quantitative Daten wurden durch Berechnung der relativen Peakfläche im Verhältnis zu der des internen Standards (4-Nonanol) erhalten. Die zur Quantifizierung verwendeten Ionen/Fragmente und ermittelten Retentionszeiten der Standards sind in Tab. 68 aufgeführt. Bestimmung der verschiedenen Verbindungen wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt.

Tab. 68 Parameter zur Bestimmung der Terpene

Standard	R _t [min]	Ions monitored [m/z]	Quantifier Ion [m/z]
cis-Linalooloxid	17,5	94, 111	59
trans-Linalooloxid	19,4	94, 111	59
4-Nonanol*	20,7	73, 83	55
Linalool	25,3	71, 69, 121	93
α-Terpineol	34,8	93, 121, 136	59
β-Citronellol	40,3	81, 95	69
β-Damascenon	41,8	69, 123, 192	177
Nerol	42,3	93, 121	69
Geraniol	45,7	69	69
β-Ionon	49,8	177	177

* interner Standard

Die ermittelten Kalibriergeraden der einzelnen Standards werden im Folgenden dargestellt.

Tab. 69 Kalibrierfunktionen der Terpen-Bestimmung

Standard	Konzentrations- bereich [mg/l]	Kalibrierfunktion	R ²
cis-Linalooloxid	0,28 – 28	y = 0,0477x - 0,0181	0,9988
trans-Linalooloxid	0,22 – 22	y = 0,0549x - 0,0257	0,997
4-Nonanol*	-	-	-
Linalool	0,5 – 50	y = 0,0332x - 0,0285	0,9976
α-Terpineol	0,46 – 46,1	y = 0,062x - 0,056	0,9968
β-Citronellol	0,5 – 50	y = 0,0476x - 0,0628	0,9949
β-Damascenon	0,5 – 50	y = 0,0557x - 0,0804	0,9942
Nerol	0,5 – 50	y = 0,0683x - 0,0313	0,9995
Geraniol	0,5 – 50	y = 0,0757x - 0,0051	0,9996
β-Ionon	0,5 – 50	y = 0,1039x - 0,1036	0,9976

* interner Standard

7.4.7.4 Auswertung

Aus den Regressionsgeraden der Auftragung der Konzentration gegen die jeweiligen Peakflächen wurden die Gehalte der entsprechenden Analyten in den Proben ermittelt.

7.4.7.5 Standardabweichung/Variationskoeffizienten

Zur Bestimmung der Standardabweichung (s) und des Variationskoeffizienten wurde die Analyten in Modell-Wein (9 g/l Weinsäure in 10 Vol.-% Ethanol und auf pH 3,5 mit Natronlauge (2 M) eingestellt) gegeben und entsprechend zehnfach gemessen.

Tab. 70 Wiederholstandardabweichungen/Variationskoeffizienten der Terpen-Bestimmung (n=10)

Analyt	WF	MW [µg/l]	s [g/l]	VK [%]
cis-Linalooloxid	89,8 %	25,1	1,46	5,81
trans-Linalooloxid	87,2 %	19,2	1,19	6,22
Linalool	91,7 %	45,9	2,99	6,51
α-Terpineol	90,7 %	41,8	2,48	5,93
β-Citronellol	86,6 %	43,3	2,14	4,94
β-Damascenon	90,2 %	45,1	3,02	6,70
Nerol	94,4 %	47,2	2,28	4,82
Geraniol	94,3 %	47,2	2,07	4,38
β-Ionon	89,6 %	44,8	2,00	4,46

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden gemäß Kapitel 3.1.2.3 ermittelt. Hierbei wurden die Peakhöhen des Grundrauschens des jeweiligen kleinsten Standards betrachtet und das jeweilige Signal/Rausch-Verhältnis bestimmt. Dabei erfüllten alle Standards bereits bei der kleinsten Konzentration das erforderliche S/N-Verhältnis für die Bestimmungsgrenze.

7.5 Ergebnisse

7.5.1 Proteinbestimmung handelsüblicher Enzympräparate

Tab. 71 Proteingehalt der Enzympräparate und des Immobilisats

	Protein-Gehalt (w/w)			
	Kjeldahl		Bradford	
	MW	s	MW	s
Everzym	7,2 %	0,59 %	3,21 %	0,004%
Lafazym	12,0 %	0,42 %	4,40 %	0,16 %
Lallzyme	2,6 %	0,05 %	1,09 %	0,004 %
Natuzym	8,3 %	0,61 %	3,23 %	0,04 %
Novarom	8,2 %	0,54 %	2,69 %	0,13 %
Panzym	7,4 %	0,31 %	4,14 %	0,15 %
Rapidase	4,9 %	0,24 %	2,40 %	0,03 %
Trenolin	8,7 %	0,08 %	2,37 %	0,07 %
VinoTaste	3,6 %	0,34 %	1,63 %	0,09 %
Zimarom	5,6 %	0,30 %	2,49 %	0,08 %
immo. Rapidase	3,1 %	0,19 %	-	-

7.5.2 Magnet-Separation der Magnetit-Partikel

Tab. 72 Aktivitätswerte der immo. β -Glucosidase in Abhängigkeit der Magnet-Separationen

Separation [Anzahl]	immo. Rapidase [nkat/mgE]	Rest- Aktivität	VK	Überstand [nkat/mg]	Filtrat
1	1,066	100,00%	0,72%	< BG	< BG
2	1,037	97,02%	4,30%	< BG	< BG
3	1,027	96,10%	3,91%	< BG	< BG
4	1,101	104,69%	1,05%	< BG	< BG
5	1,022	96,13%	4,12%	< BG	< BG
6	1,085	101,38%	2,43%	< BG	< BG

7.5.3 Glykosid-Gehalt in Wein

Tab. 73 Glykosid-Gehalt des Gewürztraminers und Morio Muskats vor und nach Enzymbehandlung

Enzymeinsatz	Gewürztraminer		Morio Muskat	
	MW [μ M]	s	MW [μ M]	s
vor	75,4	6,4	248,8	14,5
nach	57,9	4,4	169,6	5,9

7.5.4 Aktivitätsbestimmungen

7.5.4.1 Charakterisierung verschiedener Enzympräparate

Tab. 74 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Rapidase, Lallzyme, Natuzym) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Temperatur, pH, Ethanol, Glucose)

Temperatur [°C]	Rapidase [Inkat/mgE]	Rapidase [Inkat/mgP]	[%]	VK	Lallzyme [Inkat/mgE]	Lallzyme [Inkat/mgP]	[%]	VK	Natuzym [Inkat/mgE]	Natuzym [Inkat/mgP]	[%]	VK
37	2,698	55,4	100,0%	2,69%	1,184	45,1	100,0%	1,41%	0,452	6,1	100,0%	1,08%
25	0,819	16,8	30,4%	1,02%	0,362	13,8	30,6%	4,97%	0,129	1,7	28,5%	1,46%
20	0,529	10,9	19,6%	1,36%	0,225	8,6	19,0%	3,87%	0,089	1,2	19,6%	1,77%
15	0,339	7,0	12,6%	1,42%	0,117	4,4	9,8%	1,43%	0,049	0,7	10,9%	1,18%
pH-Wert												
5,0	2,698	55,4	100,0%	0,71%	1,184	45,1	100,0%	1,41%	0,452	6,1	100,0%	1,08%
4,0	2,647	54,3	98,1%	0,93%	1,088	41,4	91,9%	1,05%	0,504	6,8	111,6%	0,23%
3,5	1,271	26,1	47,1%	2,02%	0,616	23,5	52,1%	1,46%	0,281	3,8	62,1%	1,46%
3,2	1,120	23,0	41,5%	2,12%	0,492	18,8	41,6%	3,38%	0,185	2,5	40,9%	1,78%
3,0	0,832	17,1	30,8%	1,94%	0,463	17,6	39,1%	3,69%	0,153	2,1	33,8%	1,36%
2,8	0,640	13,1	23,7%	1,73%	0,301	11,4	25,4%	2,91%	0,116	1,6	25,6%	1,01%
Ethanol [Vol.-%]												
0%	2,698	55,4	100,0%	0,71%	1,184	45,1	100,0%	1,41%	0,452	6,1	100,0%	1,08%
5%	3,000	61,6	111,2%	1,45%	1,361	51,8	115,0%	1,68%	0,495	6,7	109,5%	2,90%
10%	3,322	68,2	123,1%	1,63%	1,619	61,7	136,8%	2,01%	0,540	7,3	119,4%	3,95%
15%	3,470	71,2	128,6%	0,90%	1,628	62,0	137,6%	1,56%	0,564	7,6	124,8%	3,08%
Glucose [g/l]												
0	2,698	55,4	100,0%	0,71%	1,184	45,1	100,0%	1,41%	0,452	6,1	100,0%	1,08%
5	1,101	22,6	40,8%	1,22%	0,619	23,6	52,3%	1,77%	0,193	2,6	42,8%	7,26
10	0,785	16,1	29,1%	1,32%	0,368	14,0	31,1%	5,30%	0,124	1,7	27,4%	3,20
20	0,537	11,0	19,9%	1,92%	0,201	7,7	17,0%	3,66%	0,089	1,2	19,6%	2,23
50	0,231	4,7	8,6%	1,90%	0,078	3,0	6,6%	1,63%	0,031	0,4	6,9%	0,73
100	0,131	2,7	4,9%	2,12%	0,047	1,8	4,0%	6,02%	0,015	0,2	3,4%	0,81

Tab. 75 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Rapidase, Lallzyme, Natuzym) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Fructose, Kaliumdisulfid)

Fructose [g/l]	Rapidase [nkat/mgE]	Rapidase [nkat/mgP]	[%]	VK	Lallzyme [nkat/mgE]	Lallzyme [nkat/mgP]	[%]	VK	Natuzym [nkat/mgE]	Natuzym [nkat/mgP]	[%]	VK
0	2,698	55,4	100,0%	0,71%	1,184	45,1	100,0%	1,41%	0,452	6,1	100,0%	1,08%
5	2,977	61,1	110,3%	1,07%	1,397	53,2	118,0%	2,27%	0,543	7,3	120,1%	4,68%
10	3,328	68,3	123,3%	1,82%	1,423	54,2	120,2%	3,39%	0,576	7,8	127,4%	0,88%
20	3,679	75,5	136,4%	1,67%	1,650	62,9	139,4%	0,51%	0,545	7,3	120,5%	1,59%
50	3,812	78,3	141,3%	1,25%	1,640	62,5	138,6%	1,42%	0,442	6,0	97,7%	1,20%
100	3,303	67,8	122,4%	0,71%	1,455	55,4	122,9%	0,57%	0,339	4,6	75,0%	0,77%
200	2,020	41,5	74,9%	0,70%	1,026	39,1	86,7%	1,26%	0,212	2,9	46,9%	1,08%
Kaliumdisulfid pH 3,2 [mg/l]												
0	1,120	23,0	100,0%	0,71%	0,492	18,8	100,0%	1,41%	0,272	3,7	100,0%	2,99%
100	1,198	24,6	107,0%	2,60%	0,546	20,8	110,9%	2,16%	0,269	3,6	99,2%	2,05%
200	1,262	25,9	112,7%	2,86%	0,572	21,8	116,3%	1,93%	0,270	3,6	99,2%	3,38%
300	1,304	26,8	116,5%	1,57%	0,607	23,1	123,3%	1,90%	0,284	3,8	104,5%	0,91%
400	1,255	25,8	112,1%	2,08%	0,588	22,4	119,4%	1,95%	0,282	3,8	103,9%	2,12%
500	1,267	26,0	113,2%	3,23%	0,563	21,4	114,4%	2,07%	0,307	4,1	113,0%	1,87%

Tab. 76 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Panzym, Lafazym, VinoTaste) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Temperatur, pH, Ethanol, Glucose)

Temperatur [°C]	Panzym [nkat/mgE]	Panzym [nkat/mgP]	[%]	VK	Lafazym [nkat/mgE]	Lafazym [nkat/mgP]	[%]	VK	VinoTaste [nkat/mgE]	VinoTaste [nkat/mgP]	[%]	VK
37	0,503	6,0	100,0%	3,84%	1,795	14,9	100,0%	2,88%	1,102	31,0	100,0%	1,26%
25	0,213	2,6	42,2%	3,17%	0,530	4,4	29,5%	0,94%	0,301	8,5	27,3%	5,65%
20	0,129	1,5	25,7%	2,18%	0,321	2,7	17,9%	4,41%	0,213	6,0	19,3%	0,98%
15	0,077	0,9	15,4%	2,45%	0,204	1,7	11,3%	7,60%	0,143	4,0	12,9%	1,23%
pH-Wert												
5,0	0,503	6,0	100,0%	3,84%	1,795	14,9	100,0%	2,88%	1,102	31,0	100,0%	1,26%
4,0	0,553	6,6	109,9%	1,09%	1,889	15,7	105,2%	2,84%	0,480	13,5	43,6%	2,65%
3,5	0,324	3,9	64,3%	1,07%	1,096	9,1	61,1%	3,56%	0,166	4,7	15,1%	2,92%
3,2	0,216	2,6	42,9%	1,23%	0,721	6,0	40,2%	2,59%	0,088	2,5	8,0%	5,12%
3,0	0,177	2,1	35,1%	2,95%	0,571	4,8	31,8%	1,01%	0,071	2,0	6,5%	3,72%
2,8	0,137	1,6	27,3%	2,73%	0,434	3,6	24,2%	1,39%	0,055	1,5	4,9%	5,67%
Ethanol [Vol.-%]												
0%	0,503	6,0	100,0%	3,84%	1,795	14,9	100,0%	2,88%	1,102	31,0	100,0%	1,26%
5%	0,708	8,5	140,7%	4,57%	2,445	20,4	136,2%	0,78%	1,459	41,1	132,4%	1,26%
10%	0,757	9,1	150,6%	3,86%	2,479	20,6	138,1%	5,83%	1,726	48,6	156,6%	1,00%
15%	0,803	9,6	159,6%	4,16%	2,679	22,3	149,2%	4,36%	1,854	52,2	168,2%	1,43%
Glucose [g/l]												
0	0,503	6,0	100,0%	3,84%	1,795	14,9	100,0%	2,88%	1,102	31,0	100,0%	1,26%
5	0,253	3,0	50,2%	11,18	0,736	6,1	41,0%	3,32	0,595	16,7	54,0%	2,40
10	0,151	1,8	30,0%	6,48	0,449	3,7	25,0%	1,30	0,433	12,2	39,3%	1,34
20	0,108	1,3	21,4%	5,46	0,254	2,1	14,2%	3,46	0,312	8,8	28,3%	0,60
50	0,043	0,5	8,6%	2,96	0,110	0,9	6,1%	0,82	0,130	3,7	11,8%	0,93
100	0,011	0,1	2,1%	1,82	0,055	0,5	3,0%	1,25	0,057	1,6	5,2%	0,79

Tab. 77 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Panzym, Lafazym, VinoTaste) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Fructose, Kaliumdisulfid)

	Panzym [nkat/mgE]	Panzym [nkat/mgP]	[%]	VK	Lafazym [nkat/mgE]	Lafazym [nkat/mgP]	[%]	VK	VinoTaste [nkat/mgE]	VinoTaste [nkat/mgP]	[%]	VK
Fructose [g/l]												
0	0,503	6,0	100,0%	3,84%	1,795	14,9	100,0%	2,88%	1,102	31,0	100,0%	1,26%
5	0,5219	6,3	103,8%	5,73%	2,003	16,7	111,6%	6,10%	1,071	30,1	97,2%	3,97%
10	0,5406	6,5	107,5%	4,91%	2,160	18,0	120,3%	4,61%	1,110	31,2	100,7%	10,98%
20	0,5305	6,4	105,5%	6,69%	2,469	20,6	137,5%	2,87%	1,169	32,9	106,1%	4,68%
50	0,4508	5,4	89,6%	6,07%	1,705	14,2	95,0%	8,86%	1,341	37,7	121,7%	4,05%
100	0,3479	4,2	69,2%	3,02%	1,484	12,4	82,7%	4,51%	1,369	38,5	124,2%	6,69%
200	0,2268	2,7	45,1%	2,31%	1,001	8,3	55,8%	4,34%	1,233	34,7	111,9%	5,61%
Kaliumdisulfid pH 3,2 [mg/l]												
0	0,2707	3,2	100,0%	1,35%	0,721	6,0	100,0%	2,59%	0,054	1,5	100,0%	0,93%
100	0,2442	2,9	90,2%	2,16%	0,637	5,3	88,3%	4,60%	0,065	1,8	120,9%	2,35%
200	0,311	3,7	114,9%	2,40%	0,788	6,6	109,3%	2,35%	0,050	1,4	92,4%	3,10%
300	0,2865	3,4	105,8%	2,36%	0,627	5,2	87,0%	1,74%	0,053	1,5	98,2%	3,90%
400	0,2851	3,4	105,3%	3,03%	0,635	5,3	88,0%	1,66%	0,055	1,6	102,7%	4,39%
500	0,3142	3,8	116,1%	1,38%	0,829	6,9	114,9%	1,56%	0,057	1,6	105,1%	4,97%

Tab. 78 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Everzym, Zimarom, Novarom) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Temperatur, pH, Ethanol, Glucose)

Temperatur [°C]	Everzym [Inkat/mgE]	Everzym [Inkat/mgP]	[%]	VK	Zimarom [Inkat/mgE]	Zimarom [Inkat/mgP]	[%]	VK	Novarom [Inkat/mgE]	Novarom [Inkat/mgP]	[%]	VK
37	0,467	6,5	100,0%	0,52%	2,584	45,8	100,0%	1,35%	1,506	18,5	100,0%	12,21%
25	0,148	2,1	31,7%	4,20%	0,956	17,0	37,0%	1,63%	0,483	5,9	32,0%	3,31%
20	0,096	1,3	20,6%	1,41%	0,599	10,6	23,2%	5,20%	0,249	3,1	16,5%	2,38%
15	0,059	0,8	12,7%	2,95%	0,308	5,5	11,9%	4,56%	0,176	2,2	11,7%	3,95%
pH-Wert												
5,0	0,467	6,5	100,0%	0,81%	2,584	45,8	100,0%	1,35%	1,506	18,5	100,0%	12,21%
4,0	0,464	6,4	99,3%	2,12%	2,245	39,8	86,9%	3,10%	1,415	17,4	94,0%	6,09%
3,5	0,306	4,2	65,4%	1,15%	1,675	29,7	64,8%	1,22%	0,944	11,6	62,7%	0,27%
3,2	0,188	2,6	40,3%	1,55%	1,004	17,8	38,9%	1,79%	0,591	7,2	39,2%	4,94%
3,0	0,169	2,3	36,2%	0,42%	0,954	16,9	36,9%	2,69%	0,531	6,5	35,3%	0,31%
2,8	0,138	1,9	29,5%	0,72%	0,782	13,9	30,2%	3,05%	0,436	5,3	28,9%	0,38%
Ethanol [Vol.-%]												
0%	0,467	6,5	100,0%	0,52%	2,584	45,8	100,0%	1,35%	1,506	18,5	100,0%	12,21%
5%	0,606	8,4	129,7%	4,54%	3,540	62,8	137,0%	0,89%	1,559	19,1	103,5%	2,24%
10%	0,661	9,2	141,6%	6,16%	3,836	68,0	148,5%	1,45%	1,752	21,5	116,3%	1,02%
15%	0,702	9,7	150,4%	6,55%	4,133	73,3	159,9%	1,17%	1,838	22,5	122,0%	1,27%
Glucose [g/l]												
0	0,467	6,5	100,0%	0,52%	2,584	45,8	100,0%	1,35%	1,506	18,5	100,0%	12,21%
5	0,237	3,3	50,8%	3,96	1,320	23,4	51,1%	3,81	0,661	8,1	43,9%	3,21
10	0,151	2,1	32,4%	4,08	0,874	15,5	33,8%	1,44	0,458	5,6	30,4%	3,28
20	0,094	1,3	20,2%	1,60	0,509	9,0	19,7%	1,31	0,242	3,0	16,0%	2,39
50	0,032	0,4	6,9%	1,38	0,217	3,8	8,4%	0,83	0,095	1,2	6,3%	3,18
100	0,015	0,2	3,2%	0,58	0,120	2,1	4,6%	1,12	0,049	0,6	3,2%	1,22

Tab. 79 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Everzym, Zimarom, Novarom) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter (Fructose, Kaliumdisulfit)

Fructose [g/l]	Everzym [nkat/mgE]	Everzym [nkat/mgP]	[%]	VK	Zimarom [nkat/mgE]	Zimarom [nkat/mgP]	[%]	VK	Novarom [nkat/mgE]	Novarom [nkat/mgP]	[%]	VK
0	0,467	6,5	100,0%	0,52%	2,584	45,8	100,0%	1,35%	1,506	18,5	100,0%	12,21%
5	0,572	7,9	122,5%	3,04%	3,257	57,8	126,0%	1,69%	1,962	24,1	130,3%	2,75%
10	0,602	8,3	129,0%	2,08%	3,521	62,4	136,3%	2,29%	2,181	26,8	144,8%	3,16%
20	0,583	8,1	124,8%	4,39%	3,931	69,7	152,1%	1,91%	2,447	30,0	162,5%	1,80%
50	0,505	7,0	108,1%	3,40%	3,860	68,5	149,4%	6,15%	2,009	24,6	133,4%	3,20%
100	0,373	5,2	79,9%	2,56%	3,318	58,8	128,4%	5,01%	1,703	20,9	113,1%	1,42%
200	0,248	3,4	53,0%	2,01%	2,188	38,8	84,7%	5,14%	1,206	14,8	80,1%	2,77%
Kaliumdisulfit pH 3,2 [mg/l]												
0	0,2208	3,1	100,0%	3,28%	1,112	19,7	100,00%	2,32%	0,591	7,2	100,0%	4,94%
100	0,2253	3,1	102,0%	1,52%	1,042	18,5	93,71%	1,70%	0,5384	6,6	91,1%	3,50%
200	0,2444	3,4	110,7%	5,71%	1,109	19,7	99,73%	0,77%	0,4838	5,9	81,9%	1,13%
300	0,2614	3,6	118,4%	1,00%	1,176	20,9	105,76%	1,19%	0,4457	5,5	75,4%	1,34%
400	0,2597	3,6	117,6%	0,49%	1,139	20,2	102,43%	1,47%	0,6125	7,5	103,7%	4,41%
500	0,2506	3,5	113,5%	2,37%	1,126	20,0	101,26%	0,45%	0,4854	6,0	82,1%	2,68%

Tab. 80 Aktivitätswerte der Enzympräparate (Trenolin) in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter

Temperatur [°C]	Trenolin [nkat/mgE]	Trenolin [nkat/mgP]	[%]	VK
37	0,801	9,2	100,0%	0,34%
25	0,345	4,0	43,1%	1,55%
20	0,237	2,7	29,6%	4,74%
15	0,162	1,9	20,2%	8,25%
pH-Wert				
5,0	0,801	9,2	100,0%	0,34%
4,0	0,539	6,2	67,3%	2,16%
3,5	0,278	3,2	34,7%	1,86%
3,2	0,172	2,0	21,5%	0,41%
3,0	0,146	1,7	18,3%	1,49%
2,8	0,118	1,4	14,8%	1,18%
Ethanol [Vol.-%]				
0%	0,801	9,2	100,0%	0,34%
5%	1,016	11,7	126,8%	2,25%
10%	1,056	12,2	131,8%	2,25%
15%	1,198	13,8	149,6%	0,88%
Glucose [g/l]				
0	0,801	9,2	100,0%	0,34%
5	0,235	2,7	29,4%	2,06
10	0,153	1,8	19,1%	0,62
20	0,098	1,1	12,2%	1,04
50	0,062	0,7	7,7%	6,15
100	0,041	0,5	5,2%	1,67
Fructose [g/l]				
0	0,801	9,2	100,0%	0,34%
5	0,814	9,4	101,6%	2,24%
10	0,846	9,7	105,6%	2,20%
20	0,863	9,9	107,8%	0,29%
50	0,871	10,0	108,7%	3,53%
100	0,878	10,1	109,7%	1,87%
200	0,746	8,6	93,2%	3,50%
Kaliumdisulfit pH 3,2 [mg/l]				
0	0,1775	2,0	100,0%	4,14%
100	0,1847	2,1	104,1%	3,94%
200	0,1892	2,2	106,6%	2,86%
300	0,1751	2,0	98,6%	1,19%
400	0,1841	2,1	103,7%	3,46%
500	0,1863	2,1	105,0%	5,08%

7.5.5 Immobilisierung der Glycosidasen an Magnetit-Partikel

7.5.5.1 Immobilisierungsausbeute

Tab. 81 Immobilisierungsausbeute der Glycosidasen in Abhängigkeit des pH-Wertes

pH	Glucosidase		Arabinosidase		Rhamnosidase		Xylosidase	
	MW	s	MW	s	MW	s	MW	s
3,0	84,2%	4,5%	12,6%	2,1%	16,0%	2,9%	14,0%	2,1%
3,5	95,4%	4,2%	8,5%	2,3%	23,1%	3,5%	55,0%	3,4%
3,8	92,0%	3,5%	11,7%	2,7%	16,3%	1,2%	59,2%	2,6%
4,0	91,7%	5,7%	14,3%	2,6%	56,2%	3,1%	66,0%	1,9%
4,2	84,4%	4,0%	18,6%	2,4%	56,6%	4,4%	66,7%	3,7%
4,5	25,4%	2,4%	27,3%	2,5%	48,6%	3,6%	26,9%	2,5%
5,0	4,5%	1,9%	13,0%	2,3%	47,6%	2,1%	3,5%	1,4%
6,0	3,6%	2,3%	3,8%	2,0%	48,6%	1,5%	2,0%	2,0%
6,5	2,9%	3,1%	4,0%	1,5%	49,4%	1,2%	0,0%	2,5%

7.5.5.2 Immobilisierungseffizienz

Tab. 82 Immobilisierungseffizienz der Glycosidasen in Abhängigkeit des pH-Wertes

pH	Glucosidase		Arabinosidase		Rhamnosidase		Xylosidase	
	MW	s	MW	s	MW	s	MW	s
3,0	63,4%	5,2%	5,5%	1,4%	38,2%	2,3%	93,5%	6,5%
3,5	44,8%	3,5%	9,0%	1,5%	40,7%	3,1%	69,9%	4,1%
3,8	67,9%	4,9%	6,8%	1,1%	72,7%	2,9%	57,3%	2,9%
4,0	32,6%	5,0%	3,4%	0,6%	25,1%	4,2%	59,1%	3,4%
4,2	36,8%	4,3%	2,8%	0,8%	25,1%	3,3%	72,2%	2,8%
4,5	36,7%	2,1%	0,8%	0,1%	8,5%	1,9%	57,3%	3,2%
5,0	4,4%	2,4%	0,1%	0,1%	1,2%	2,1%	11,1%	2,1%
6,0	3,8%	1,1%	1,3%	0,1%	0,7%	3,5%	0,9%	1,8%
6,5	3,8%	1,6%	0,9%	0,2%	6,0%	1,0%	0,0%	1,6%

7.5.6 Vergleich freies zu immobilisiertem Enzym

Tab. 83 Aktivitätswerte der freien und immo. β -Glucosidase in Abhängigkeit von Temperatur, pH, Ethanol, Glucose und Fructose

Temperatur [°C]	Rapidase [nkat/mg _E]	Rapidase [nkat/mg _P]	[%]	VK	immo. Rapidase [nkat/mg _E]	immo. Rapidase [nkat/mg _P]	[%]	VK
100	0,014	0,3	0,1%	2,59%	0,009	0,3	0,1%	2,12%
90	0,164	3,4	1,3%	12,58%	0,277	8,8	4,2%	2,61%
80	2,186	44,9	17,2%	1,55%	1,200	38,2	18,0%	0,04%
70	12,715	261,0	100,0%	1,03%	6,678	212,7	100,0%	2,33%
60	12,046	247,3	94,7%	2,36%	5,520	175,8	82,7%	3,76%
50	7,220	148,2	56,8%	2,74%	3,362	107,1	50,4%	2,25%
40	3,079	63,2	24,2%	0,28%	1,750	55,7	26,2%	0,02%
37	2,615	53,7	20,6%	0,02%	1,463	46,6	21,9%	0,6%
30	1,411	29,0	11,1%	5,23%	0,804	25,6	12,0%	3,0%
25	0,940	19,3	7,4%	2,58%	0,493	15,7	7,4%	2,0%
20	0,537	11,0	4,2%	0,59%	0,318	10,1	4,8%	4,0%
15	0,334	6,8	2,6%	4,05%	0,203	6,5	3,0%	9,8%
pH-Wert								
8,0	0,028	0,6	1,0%	2,01%	0,028	0,9	2,0%	2,20%
7,0	0,215	4,4	7,8%	7,28%	0,130	4,1	9,5%	1,59%
6,0	1,246	25,6	45,2%	5,24%	0,686	21,8	50,0%	3,16%
5,0	2,756	56,6	100,0%	3,60%	1,370	43,7	100,0%	0,56%
4,0	2,656	54,5	96,3%	5,35%	1,236	39,4	90,2%	2,54%
3,5	1,454	29,9	52,8%	3,32%	0,793	25,2	57,8%	6,78%
3,2	1,056	21,7	38,3%	6,59%	0,545	17,4	39,8%	1,65%
3,0	0,797	16,4	28,9%	5,75%	0,464	14,8	33,9%	6,19%
2,8	0,681	14,0	24,7%	7,30%	0,355	11,3	25,9%	1,19%
Ethanol [Vol.-%]								
0%	2,593	53,2	100,0%	4,43%	1,370	43,7	100,0%	0,56%
5%	2,941	60,4	113,4%	3,37%	1,711	54,5	124,9%	2,74%
10%	3,450	70,8	133,1%	4,75%	1,998	63,6	145,8%	5,08%
15%	3,455	70,9	133,3%	4,71%	2,068	65,9	150,9%	9,07%
Glucose [g/l]								
0	2,573	52,8	100,0%	4,43%	1,370	43,7	100,0%	0,56%
5	1,283	26,3	49,9%	2,84%	0,729	23,2	53,2%	1,21%
10	0,838	17,2	32,6%	2,24%	0,468	14,9	34,2%	1,16%
20	0,509	10,5	19,8%	1,62%	0,285	9,1	20,8%	0,50%
50	0,249	5,1	9,7%	3,73%	0,124	4,0	9,1%	1,70%
100	0,151	3,1	5,9%	2,58%	0,065	2,1	4,7%	0,66%
Fructose [g/l]								
0	2,593	53,2	100,0%	4,43%	1,370	43,7	100,0%	0,56%
5	2,985	61,3	115,1%	7,07%	1,782	56,8	130,1%	0,25%
10	3,624	74,4	139,8%	5,24%	2,045	65,1	149,2%	0,52%
20	3,806	78,1	146,8%	1,79%	2,221	70,8	162,1%	1,95%
50	4,003	82,2	154,4%	5,03%	2,330	74,2	170,0%	3,76%
100	3,367	69,1	129,9%	4,63%	1,993	63,5	145,5%	0,65%
200	2,356	48,4	90,9%	4,70%	1,339	42,7	97,7%	3,00%

7.5.6.1 Weitere Glycosidase-Aktivitäten

Tab. 84 Aktivitätswerte der freien und immo. Glycosidasen in Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter

Temperatur [°C]	Rapidase [nkat/mg _E]	Rapidase [nkat/mg _P]	[%]	VK	immo. Rapidase [nkat/mg _E]	immo. Rapidase [nkat/mg _P]	[%]	VK
Arabinosidase								
pH 5,0 & 37°C	5,696	116,9	100,0%	7,53%	0,061	1,93	100,0%	3,32%
pH 3,5 & 25°C	3,573	73,4	62,7%	6,49%	0,030	0,96	49,6%	5,45%
10 Vol.-% EtOH	3,613	74,2	63,4%	3,32%	0,035	1,11	57,7%	6,79%
5 g/l Fructose	5,325	109,3	93,5%	5,45%	0,059	1,88	97,2%	3,51%
5 g/l Glucose	5,426	111,4	95,3%	1,06%	0,063	2,01	103,8%	7,22%
Rhamnosidase								
pH 5,0 & 37°C	0,059	1,22	100,0%	3,52%	0,012	0,390	100,0%	6,06%
pH 3,5 & 25°C	0,016	0,34	27,7%	2,77%	0,004	0,119	30,5%	3,33%
10 Vol.-% EtOH	0,026	0,53	43,8%	6,06%	0,006	0,188	48,2%	4,21%
5 g/l Fructose	0,061	1,25	102,5%	3,33%	0,012	0,379	97,1%	2,74%
5 g/l Glucose	0,058	1,20	98,2%	1,02%	0,012	0,366	93,9%	3,98%
Xylosidase								
pH 5,0 & 37°C	0,268	5,49	100,0%	2,99%	0,113	3,60	100,0%	2,37%
pH 3,5 & 25°C	0,066	1,36	24,7%	2,85%	0,058	1,86	51,9%	0,57%
10 Vol.-% EtOH	0,564	11,57	210,6%	2,37%	0,241	7,69	213,2%	1,97%
5 g/l Fructose	0,363	7,44	135,5%	0,57%	0,152	4,82	134,2%	4,62%
5 g/l Glucose	0,322	6,61	120,3%	0,16%	0,126	3,99	111,2%	3,16%

7.5.7 Langzeitstabilität der immobilisierten Glycosidase

7.5.7.1 Stabilität der β -Glucosidase

7.5.7.1.1 Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0)

Tab. 85 Aktivitätswerte der immo. β -Glucosidase über 100 Tage im C/P-Puffer (pH 5,0)

Zeit [Tag]	immo. Rapidase [nkat/mgE]	Rest-Aktivität	VK	Überstand [nkat/mg]	VK
0	1,141	100,0%	1,5%	< BG	
1	1,135	99,5%	3,8%	< BG	
3	1,121	98,2%	1,2%	< BG	
7	1,165	102,1%	2,3%	< BG	
9	1,159	101,5%	1,5%	< BG	
11	1,174	102,9%	4,5%	< BG	
14	1,168	102,3%	1,8%	< BG	
16	1,159	101,5%	1,3%	< BG	
18	1,174	102,9%	2,3%	< BG	
22	1,138	99,7%	2,7%	< BG	
24	1,129	99,0%	1,5%	< BG	
28	1,151	100,9%	1,3%	< BG	
31	1,149	100,7%	2,4%	< BG	
37	1,138	99,7%	1,7%	< BG	
39	1,149	100,7%	2,3%	< BG	
43	1,169	102,4%	3,9%	< BG	
46	1,156	101,3%	1,8%	< BG	
51	1,164	102,0%	2,1%	0,053	1,0%
59	1,118	98,0%	4,0%	0,054	1,9%
65	1,121	98,3%	1,5%	0,053	2,8%
71	1,142	100,1%	2,3%	0,056	2,0%
77	1,105	96,8%	4,7%	0,053	3,1%
83	1,123	98,4%	2,0%	0,053	3,7%
88	1,127	98,7%	1,4%	0,060	2,1%
93	1,130	99,0%	3,1%	0,062	3,0%
98	1,139	99,8%	0,9%	0,060	1,1%
100	1,151	100,9%	1,9%	0,059	1,7%

7.5.7.1.2 Modell-Wein

Tab. 86 Aktivitätswerte der immo. β -Glucosidase über 100 Tage im Modell-Wein (pH 3,5)

Zeit [Tag]	immo. Rapidase [nkat/mgE]	Rest-Aktivität	VK	Überstand [nkat/mg]
0	1,168	100,0%	0,7%	< BG
1	1,194	102,3%	5,6%	< BG
3	1,165	99,7%	2,1%	< BG
7	1,175	100,6%	0,9%	< BG
9	1,153	98,7%	1,2%	< BG
11	1,135	97,2%	2,1%	< BG
14	1,148	98,3%	1,6%	< BG
16	1,129	96,7%	1,0%	< BG
18	1,125	96,3%	3,5%	< BG
22	1,022	87,5%	2,9%	< BG
24	0,963	82,5%	3,1%	< BG
28	0,907	77,7%	2,0%	< BG
31	0,825	70,7%	2,7%	< BG
37	0,780	66,8%	1,1%	< BG
39	0,766	65,6%	1,7%	< BG
43	0,726	62,2%	0,7%	< BG
46	0,682	58,4%	1,1%	< BG
51	0,657	56,3%	3,8%	< BG
59	0,494	42,3%	7,5%	< BG
65	0,419	35,9%	1,3%	< BG
71	0,332	28,4%	6,4%	< BG
77	0,218	18,7%	3,8%	< BG
83	0,174	14,9%	1,3%	< BG
88	0,145	12,4%	1,1%	< BG
93	0,129	11,1%	2,4%	< BG
98	0,118	10,1%	1,2%	< BG
100	0,102	8,7%	2,0%	< BG

7.5.7.1.3 Wein

Tab. 87 Aktivitätswerte der immo. β -Glucosidase über 100 Tage im Wein (Gewürztraminer)

Zeit [Tag]	immo. Rapidase [nkat/mgE]	Rest-Aktivität	VK	Überstand [nkat/mg]
0	1,154	100,0%	2,0%	< BG
1	1,175	101,8%	2,6%	< BG
5	1,179	102,1%	3,1%	< BG
8	1,179	102,2%	2,4%	< BG
14	1,058	91,7%	5,8%	< BG
16	1,058	91,7%	2,3%	< BG
20	1,056	91,5%	4,7%	< BG
23	1,081	93,6%	1,4%	< BG
28	1,077	93,3%	3,7%	< BG
36	1,066	92,4%	5,8%	< BG
42	1,080	93,6%	1,1%	< BG
48	1,090	94,4%	3,6%	< BG
54	1,042	90,2%	4,1%	< BG
60	1,058	91,7%	1,5%	< BG
65	1,040	90,1%	2,6%	< BG
70	1,053	91,2%	2,8%	< BG
75	1,046	90,6%	6,2%	< BG
78	1,059	91,7%	5,1%	< BG
84	1,032	89,4%	4,1%	< BG
90	1,045	90,5%	4,0%	< BG
95	1,043	90,3%	2,4%	< BG
100	1,045	90,6%	1,9%	< BG

7.5.7.2 Stabilität der anderen Glycosidasen

7.5.7.2.1 Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0)

Tab. 88 Aktivitätswerte der immo. Glycosidasen über 70 Tage im C/P-Puffer (pH 5,0)

Zeit [Tag]	immo. Rapidase [nkat/mgE]	Rest-Aktivität	VK	Überstand [nkat/mg]
Arabinosidase				
0	0,061	100,0%	3,3%	< BG
31	0,040	65,5%	2,5%	< BG
70	0,047	77,5%	4,8%	< BG
Rhamnosidase				
0	0,012	100,0%	6,1%	< BG
31	0,012	97,4%	7,5%	< BG
70	0,017	138,5%	10,2%	< BG
Xylosidase				
0	0,382	100,0%	2,4%	< BG
31	0,272	71,1%	5,8%	< BG
70	0,283	73,9%	3,8%	< BG

7.5.7.2.2 Modell-Wein

Tab. 89 Aktivitätswerte der immo. Glycosidasen über 70 Tage im Modell-Wein (pH 3,5)

Zeit [Tag]	immo. Rapidase [nkat/mgE]	Rest-Aktivität	VK	Überstand [nkat/mg]
Arabinosidase				
0	0,061	100,0%	5,5%	< BG
31	0,040	66,1%	3,6%	< BG
70	0,041	67,4%	2,5%	< BG
Rhamnosidase				
0	0,012	100,0%	3,9%	< BG
31	0,011	85,8%	9,7%	< BG
70	0,013	108,6%	7,9%	< BG
Xylosidase				
0	0,382	100,0%	3,1%	< BG
31	0,368	96,3%	2,7%	< BG
70	0,201	52,7%	4,5%	< BG

7.5.7.2.3 Wein

Tab. 90 Aktivitätswerte der immo. Glycosidasen über 70 Tage im Wein (Gewürztraminer)

Zeit [Tag]	immo. Rapidase [nkat/mgE]	Rest-Aktivität	VK	Überstand [nkat/mg]
Arabinosidase				
0	0,061	100,0%	2,7%	< BG
31	0,051	83,6%	3,5%	< BG
70	0,049	79,5%	7,2%	< BG
Rhamnosidase				
0	0,012	100,0%	5,9%	< BG
31	0,010	81,6%	4,9%	< BG
70	0,009	74,0%	10,7%	< BG
Xylosidase				
0	0,382	100,0%	4,2%	< BG
31	0,356	93,2%	5,5%	< BG
70	0,304	79,7%	8,1%	< BG

7.5.8 Eisenmigration in Wein nach Magnetit-Partikel-Einsatz

Tab. 91 Eisen-Konzentrationen der mit Magnetit-Partikel behandelten Lösungen über 70 Tage

Gewürztraminer		Morio Muskat		Citrat/Phosphat-Puffer (pH 5,0)		Modell-Wein			
Zeit [Tag]	MW [mg/l]	s	MW [mg/l]	s	Zeit [Tag]	MW [mg/l]	s		
0	1,2	0,03	1,8	0,05	0	< BG	< BG		
1	1,6	0,04	4,1	0,10	1	< BG	0,7	0,01	
2	2,8	0,05	6,2	0,11	5	1,1	0,03	1,4	0,02
3	3,0	0,07	7,6	0,03	8	1,5	0,05	1,8	0,06
8	5,3	0,06	17,9	0,27	10	2,0	0,05	1,9	0,05
11	6,2	0,07	22,6	0,19	12	2,0	0,05	2,2	0,05
13	7,2	0,07	24,9	0,25	14	2,7	0,06	2,7	0,05
15	7,7	0,10	26,8	0,23	18	3,6	0,02	4,2	0,08
17	8,6	0,11	29,1	0,21	20	4,1	0,09	4,5	0,08
21	10,5	0,11	32,3	0,52	24	5,0	0,02	5,5	0,07
23	11,1	0,14	32,8	1,01	27	6,3	0,11	7,0	0,14
27	11,5	0,10	34,1	0,42	31	7,8	0,10	10,4	0,08
30	13,3	0,10	37,1	0,60	35	10,8	0,16	16,7	0,12
34	14,3	0,24	39,6	0,49	38	12,7	0,16	23,8	0,02
38	16,1	0,47	44,3	0,39	42	14,9	0,38	32,1	0,25
41	18,6	0,15	47,5	0,71	48	18,3	0,18	43,1	0,46
45	18,5	0,19	50,5	0,74	52	21,9	0,24	51,5	0,54
51	18,6	0,55	55,5	0,46	55	24,1	0,34	56,6	0,68
55	18,6	0,42	58,0	0,64	59	26,4	0,11	64,0	0,68
58	18,7	0,52	59,3	0,43	62	31,6	0,38	66,1	0,57
62	18,6	0,71	62,1	0,36	66	35,9	0,27	70,7	0,43
65	18,7	0,58	62,5	0,36	70	38,1	0,51	70,8	0,67
70	18,6	0,86	63,1	0,46					

7.5.8.1 Eisenmigration in Abhängigkeit der Weinsäure

Tab. 92 Eisen-Konzentrationen der mit Magnetit-Partikel behandelten Weinsäure-Lösungen über 70 Tage

Zeit [Tag]	0 g/l Weinsäure		1 g/l Weinsäure		3 g/l Weinsäure		5 g/l Weinsäure		7 g/l Weinsäure		10 g/l Weinsäure		15 g/l Weinsäure	
	MW [mg/l]	s	MW [mg/l]	s	MW [mg/l]	s	MW [mg/l]	s	MW [mg/l]	s	MW [mg/l]	s	MW [mg/l]	s
0	< BG		< BG		< BG		< BG		< BG		< BG		< BG	
1	< BG		< BG		0,5	0,01	0,5	0,01	1,0	0,01	1,0	0,03	0,8	0,03
2	0,9	0,05	1,2	0,04	1,8	0,02	2,4	0,04	2,7	0,03	3,1	0,07	3,7	0,08
3	1,1	0,03	1,4	0,01	2,7	0,05	3,4	0,05	3,9	0,07	4,9	0,07	5,7	0,07
7	1,2	0,10	1,6	0,10	4,3	0,13	5,9	0,06	7,7	0,11	10,5	0,13	13,9	0,14
10	1,3	0,07	1,8	0,01	5,4	0,11	7,6	0,07	9,9	0,15	14,5	0,13	20,3	0,22
14	1,5	0,06	2,0	0,01	6,7	0,10	10,0	0,16	13,1	0,23	21,1	0,25	28,6	0,38
18	1,7	0,02	2,3	0,05	8,3	0,11	12,3	0,10	17,4	0,23	28,5	0,50	39,3	0,58
23	1,9	0,02	2,9	0,02	12,9	0,12	20,0	0,17	28,4	0,25	45,0	0,51	57,8	0,29
29	2,1	0,05	3,1	0,03	16,0	0,54	26,1	0,40	38,3	0,35	58,2	0,65	67,1	1,08
37	2,1	0,08	3,1	0,03	18,7	0,41	32,1	0,14	45,1	0,49	66,7	0,65	69,5	1,88
43	2,1	0,07	3,2	0,04	22,0	0,41	37,6	0,55	52,7	0,67	70,1	0,87	69,4	1,30
51	2,1	0,03	3,2	0,05	24,0	0,52	42,0	0,17	58,4	0,60	69,1	1,30	69,5	1,73
58	2,1	0,04	3,2	0,03	25,6	0,45	44,5	0,52	60,8	0,36	69,4	0,14	69,5	0,29
64	2,1	0,05	3,2	0,08	25,6	0,21	44,3	0,66	62,0	0,50	69,1	1,30	69,7	1,59
70	2,1	0,06	3,2	0,05	25,4	0,41	45,3	0,42	62,3	0,21	69,5	0,29	69,4	1,66

7.5.9 pH-Werte der verwendeten Lösungen

Tab. 93 pH-Werte der verwendeten Lösungen

	pH
Gewürztraminer	3,39
Morio Muskat	3,59
1 g/l Weinsäure-Lösung	2,79
3 g/l Weinsäure-Lösung	2,49
5 g/l Weinsäure-Lösung	2,36
7 g/l Weinsäure-Lösung	2,30
10 g/l Weinsäure-Lösung	2,20
15 g/l Weinsäure-Lösung	2,11

7.5.10 Sensorik

7.5.10.1.1 Gewürztraminer

7.5.10.1.1.1 Kontrollprobe

Tab. 94 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung des unbehandelten Gewürztraminers

	N	Missing	Min	Max	Mean	SD	Median	Variance
Geruchsintensität	10	0	21.4	96	68.07	28.37	79.3	805.06
Apfel	10	0	12.5	76	57.07	19.56	63.65	382.4
Maracuja	10	0	1.6	89.1	44.19	28.46	53.75	810.03
Zitrone	10	0	13.9	88	57.77	24.6	59.85	605.38
Blumig	10	0	0.1	99.6	61.37	38.92	82.05	1514.56
Würzig	10	0	0.4	78.5	47.8	24.27	55.05	588.88
Rauchig	10	0	0.4	72.1	26.11	24.46	17.2	598.43
Fruchtig	10	0	11.4	95	66.73	23.95	70.55	573.59
Geschmacksintensität	10	0	17.4	89.6	69.04	21.46	76.45	460.49
Apfel_Q11	10	0	18.5	74	52.17	18.33	57.6	336.13
Maracuja_Q12	10	0	17.3	82.6	50.51	22.82	51.55	520.77
Zitrone_Q13	10	0	23	78.4	53.17	20.11	51.9	404.35
Blumig_Q14	10	0	0.1	94.6	59.18	34.98	76.45	1223.9
Honig	10	0	13.4	86.5	50.04	22.39	45.8	501.23
Würzig_Q16	10	0	15.5	91.5	50.69	27.74	47.65	769.53
Rauchig_Q17	10	0	0.1	62.1	29.15	17.85	26.45	318.73
Fruchtig_Q18	10	0	23	90.5	71.14	19.71	76.8	388.29
Reifeentwicklung	10	0	4.9	97.5	32.6	34.01	18.25	1156.5
Nachgeschmack	10	0	13	86.4	47.26	25.18	48.65	633.92

7.5.10.1.1.2 Behandelte Probe

Tab. 95 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung des behandelten Gewürztraminers

	N	Missing	Min	Max	Mean	SD	Median	Variance
Geruchsintensität	10	0	9.4	97.5	48.87	31.35	48.6	982.68
Apfel	10	0	8	90.7	36.79	28.44	24.15	808.74
Maracuja	10	0	6.1	91	47.89	30.71	47.35	942.89
Zitrone	10	0	3.8	77.1	28.94	21.83	26.75	476.48
Blumig	10	0	0.3	88.6	40.15	34.9	28.15	1218.05
Würzig	10	0	15.8	77.7	51.8	22.83	53.45	521.14
Rauchig	10	0	18.9	88.6	57.35	26.59	65.3	706.98
Fruchtig	10	0	3.8	91.6	35.77	32.52	25.2	1057.57
Geschmacksintensität	10	0	24.8	94.7	50.35	26.31	45.25	692.3
Apfel_Q11	10	0	5.4	87.2	46.2	28.3	47.85	800.9
Maracuja_Q12	10	0	5.1	86.1	37.53	27.98	34.95	782.83
Zitrone_Q13	10	0	6.9	93.1	35.74	28.54	29.6	814.46
Blumig_Q14	10	0	0.1	94.9	35.08	36.23	19.35	1312.43
Honig	10	0	4.3	96.2	42.49	35.89	28.35	1288.04
Würzig_Q16	10	0	22.1	90.4	53.06	25.14	49.45	632.25
Rauchig_Q17	10	0	0.3	87.9	58.98	25.19	65	634.34
Fruchtig_Q18	10	0	6.3	88	32	23.65	29.25	559.5
Reifeentwicklung	10	0	33.8	99.7	78.63	21.17	82.75	448.13
Nachgeschmack	10	0	18.5	97.1	65.93	26.14	72.15	683.3

7.5.10.1.2 Morio Muskat

7.5.10.1.2.1 Kontrollprobe

Tab. 96 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung des unbehandelten Morio Muskats

	N	Missing	Min	Max	Mean	SD	Median	Variance
Geruchsintensität	10	0	3.3	79.2	40.31	26.62	36.5	708.58
Apfel	10	0	5.4	80.5	39.04	24.05	37.75	578.17
Maracuja	10	0	8.4	68.1	37.4	22.59	38.85	510.28
Zitrone	10	0	5.8	54	28.67	17.63	31.8	310.65
Blumig	10	0	0.4	93.6	38.85	27.53	35.8	757.78
Würzig	10	0	16	86	49.35	22.03	45.15	485.33
Rauchig	10	0	7.6	73.6	55.42	21.25	64.3	451.62
Fruchtig	10	0	10	76.2	40.58	24.4	40.25	595.42
Geschmacksintensität	10	0	19.1	93.9	65.07	27.51	72	756.82
Apfel_Q11	10	0	23.8	86.7	54.27	22.78	49.75	518.96
Maracuja_Q12	10	0	11.4	93	45.41	28.14	38.15	791.61
Zitrone_Q13	10	0	17	97.5	51.44	25.47	43.45	648.54
Blumig_Q14	10	0	14.5	91	44.4	23.9	44	571.25
Honig	10	0	15.4	76.1	44.18	19.06	41.9	363.11
Würzig_Q16	10	0	9.5	85	53.82	27.74	62.15	769.26
Rauchig_Q17	10	0	3	86.2	53.33	26.85	60.95	720.9
Fruchtig_Q18	10	0	8.6	82	52.86	27.39	58.15	750.32
Reifeentwicklung	10	0	21.8	84	54.32	21.04	56.75	442.77
Nachgeschmack	10	0	10.3	75.1	46.4	24.39	42	594.63

7.5.10.1.2.2 Behandelte Probe

Tab. 97 Ergebnisse der deskriptiven Sensorik-Intensitätsprüfung des behandelten Morio Muskats

	N	Missing	Min	Max	Mean	SD	Median	Variance
Geruchsintensität	10	0	1	95.1	64.58	35.8	79.7	1281.74
Apfel	10	0	35.6	90.1	56.36	17.61	58.2	310.09
Maracuja	10	0	16.1	93.1	59.09	26.84	58.45	720.57
Zitrone	10	0	19.1	83.9	53.5	20.46	55.6	418.46
Blumig	10	0	0.3	99.9	68.25	36.6	82.3	1339.25
Würzig	10	0	8.4	85.9	63.69	22.75	70.9	517.5
Rauchig	10	0	10.1	61	32.76	17.63	28.2	310.78
Fruchtig	10	0	7.2	89.9	58.88	28.18	63.7	794.09
Geschmacksintensität	10	0	28.7	81.9	64.48	17.5	67.75	306.3
Apfel_Q11	10	0	22.9	97.2	62.06	18.76	60.3	352.01
Maracuja_Q12	10	0	0.4	83.6	59.18	23.05	63.35	531.12
Zitrone_Q13	10	0	24.1	66.2	51.48	13.03	52.75	169.72
Blumig_Q14	10	0	6.5	89.4	69.87	27.05	83	731.49
Honig	10	0	16	87.7	56.69	25.44	60.8	647.32
Würzig_Q16	10	0	9.6	83.1	52.16	23.21	60	538.76
Rauchig_Q17	10	0	1.5	65.2	34.19	22.67	36.95	514.08
Fruchtig_Q18	10	0	9	91.5	56.26	30.13	56.45	907.72
Reifeentwicklung	10	0	5.6	96.5	48.46	34.02	38.3	1157.03
Nachgeschmack	10	0	12.8	63.1	35.18	17.54	32.35	307.74

Danksagung

Zu allererst möchte ich Frau Prof. Dr. Heike Raddatz und Herrn Prof. Dr. Roland Ulber danken, die mir finanziell als auch durch die Bereitstellungen der modernen Systeme die Promotion ermöglichten und mir dieses spannende Thema zur Verfügung gestellt haben.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Heike Raddatz für die Betreuung an der Hochschule Trier. Für die zahlreichen Anregungen, Denkanstöße und Hilfestellungen bei der wissenschaftlichen Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ebenfalls ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roland Ulber für die Betreuung der Dissertation seitens der TU Kaiserslautern.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Werner Thiel bedanken, für die Bereiterklärung, als Berichterstatter zu fungieren.

Des Weiteren geht mein Dank an meine Arbeitskollegen/innen, den Mitarbeitern der Fachrichtung Lebensmitteltechnik an der Hochschule Trier, welche meinen Arbeitstag bereicherten und mir immer moralisch und wissenschaftlich zur Seite standen. Besonders möchte ich mich bei Oli Michel für eine angenehme Zusammenarbeit und die vielen hilfreiche Tipps sowie Anregungen bedanken.

Dann möchte ich mich natürlich auch beim gesamten MAGNENZ Team und allen Kollegiaten bedanken, mit denen immer ein spannender Erfahrungs- und Wissensaustausch möglich war. Besonderer Dank gilt dabei dem Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik am Umweltcampus Birkenfeld mit Herrn Prof. Dr.-Ing. Percy Kampeis für die gemeinsam durchgeführten Versuche. Besonders zu nennen sind da Yonas Shaikh, Christiane Schumann, Gabi Müller und Sabrina König.

Außerdem danke ich dem DLR Mosel in Bernkastel-Kues in Persona Achim Rosch für die zahlreiche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Dann möchte ich mich natürlich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mich während der Promotion immer unterstützten!

Angaben zur Person

Liste der Abschlussarbeiten

Folgende Masterarbeit hat einen Beitrag zu den Ergebnissen dieser Arbeit geliefert:

Ferner M J Untersuchungen und Charakterisierung ausgewählter
 β -Glucosidase-Varietäten mit dem Ziel einer
 Weinaromaverbesserung (2012)
 (HAW Hamburg / Hochschule Trier)

Betreute Forschungs- und Abschlussarbeiten

Fuentes Ruiz J G Application and testing of methods for determination of
 pectinolytic enzyme activity in wine, Diplomarbeit (2014)
 (TU Dresden / Hochschule Trier)

Schmidt N H Ermittlung glykosidischer Aroma-Präkursoren mittels FTIR,
 Diplomarbeit (2014)
 (TU Dresden / Hochschule Trier)

Veröffentlichungen

- **Artikel**

Ferner M J, Müller G, Schumann C, Kampeis P, Ulber R, Raddatz H (2016). Immobilisation of glycosidases from commercial preparation on magnetic beads. Part 2. Aroma enhancement in wine using immobilised glycosidases on magnetic beads. *eingereicht*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

Shaikh Y, Seibert C, Ferner M J, Schumann C, Raddatz H, Kampeis P (2016). Optimization of High Gradient Magnetic Separation in a rotor-stator filter matrix. *eingereicht*, Journal of Separation and Purification Technology

Ferner M J, Müller G, Schumann C, Kampeis P, Ulber R, Raddatz H (2016). Immobilisation of glycosidases from commercial preparation on magnetic beads. Part 1. Characterisation of immobilised glycosidases with a particular emphasis on β -glucosidase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 123, Seiten 23-28

Ferner M J, Ulber R, Raddatz H (2015). Aromaenzympräparate steigern die antioxidativen Eigenschaften von Weißwein. *der Food-Lab*, 15 (1), Seiten 16-19

Ferner M J, Fritsche J, Raddatz H (2013) Aktivitätseinflüsse auf terpen- bzw. aromenfreisetzende β -Glucosidasen für die Winzertechnik. *Lebensmittelchemie*, 67 (3), Seiten 76-77

- **Vorträge**

Ferner M J. Magnetische Enzyme zur Verbesserung des Weinaromas (2015). 11. Trierer Lebensmitteltag am 08.05.2015

Ferner M J, Raddatz H, Fritsche J (2013). Aktivitätseinflüsse auf terpen- bzw. aromenfreisetzende β -Glucosidasen für die Winzertechnik. LChG Regionalsverbandstagung Nord vom 18.-19.02.2013 in Hamburg

- **Posterbeiträge**

Ferner M J, Ulber R, Raddatz H (2013). Overview and activity influences of available enzyme products with β -glucosidases site activity to enhance the polyphenol content in grape juice or wine. 3. NULUX-Konferenz am 25.10.2013 in Luxemburg-Stadt

Ferner M J, Ulber R, Raddatz H (2013). Overview and activity influences of available enzyme products with β -glucosidases site activity for the winery technology. Forum Life Science vom 13.-14.03.2013 in München

Ferner M J, Raddatz H, Ulber R (2012). Activity influences on terpene respectively flavor releasing β -glucosidases for the winery technology. Konferenz "Patholux - Grapelux" vom 22. bis 23.10.2012 in Mondorf-les-Bains, Luxemburg

Ferner M J, Raddatz H, Ulber R (2012) terpen- bzw. aromenfreisetzende Glykosidhydrolasen für die Winzertechnik auf Basis von Au-Eisenoxid-Partikeln. GDL-Kongress "Lebensmitteltechnologie 2012" vom 27.-29.09.2012 in Dresden

Lebenslauf

Marvin J. Ferner

BERUFLICHE STATIONEN

09/2012 – 12/2015 **TU Kaiserslautern - Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik**
Doktorand im Forschungskolleg MAGNENZ
Thema: Immobilisierung von Glycosidasen an magnetische
Partikel mit dem Ziel einer Weinaromaverbesserung

09/2012 – 08/2015 **Hochschule Trier - Fachrichtung Lebensmitteltechnik**
wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Hochschule Trier

STUDIUM

09/2010 – 08/2012 **HAW Hamburg – Fakultät Life Science**
Food Science (Master of Science)
Abschluss: Master of Food Science

03/2012 – 08/2012 Verfassen der **Master-Thesis** an der Hochschule Trier –
Fachrichtung Lebensmitteltechnik
Thema: Untersuchungen und Charakterisierung ausgewählter
 β -Glucosidase-Varietäten mit dem Ziel einer
Weinaromaverbesserung

10/2006 – 02/2010 **Hochschule Trier - Fachrichtung Lebensmitteltechnik**
Lebensmitteltechnik (Bachelor of Engineering)
Abschluss: Bachelor of Food Technology

08/2009 – 02/2010 Verfassen der **Bachelor-Thesis** bei der Bitburger
Braugruppe GmbH, Bitburg – TQZ/Zentrallabor
Thema: Quantitative und sensorische Untersuchungen zu den
säurekatalytischen Abbauprodukten der trans-iso- α -Säuren

SCHULABSCHLUSS

03/2006 **Allgemeine Hochschulreife**

PRAKTIKA/PROJEKTE

11/2011 – 01/2012 **HAW Hamburg – Fakultät Life Science**
Scientific Project „Farbstoffbestimmung mit Hilfe der
Dünnschichtchromatographie“

05/2006 – 06/2006 **Bitburger Braugruppe GmbH, Bitburg –**
TQZ/Zentrallabor
Sechswöchiges Vorpraktikum für das Bachelor-Studium

ZUSATZQUALIFIKATION

02/2010 Ausbildereignung (IHK)