

**FREISETZUNG GLYCOSIDISCH
GEBUNDENER AROMASTOFFE WÄHREND
DER WEIN- UND SEKTBEREITUNG:
CHEMISCHE, SENSORISCHE UND
MOLEKULARBIOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN**

Vom Fachbereich Chemie der
Universität Kaiserslautern zur Verleihung
des akademischen Grades
'Doktor der Naturwissenschaften' genehmigte Dissertation

D 386

vorgelegt von
Diplom-Biologin Doreen Schober

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 20.12.2016

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Thiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Fischer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 2011 bis November 2016 am Institut für Weinbau und Oenologie des DLR Rheinpfalz in Neustadt an der Weinstraße.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit Genehmigung des Instituts für Weinbau und Oenologie des DLR Rheinpfalz, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Schober, D., Wacker, M., Brüggemann, M., Fischer, U., 2015. Freisetzung von Aromastoffen bei der Versektung - Einfluss von Hefen und Enzymen. Das Deutsche Weinmagazin 6:12-16.

Mühlbeier, T., Schober, D., Wacker, M., Wegmann-Herr, P., 2015. Aromastoffvorläufer im Blickpunkt. Einfluss von Hefe, pH-Wert, Stickstoffversorgung und Gärtemperatur auf die Freisetzung. Das Deutsche Weinmagazin 15: 12-14.

Vorträge

Schober, D., Schmarr, H.-G., Fischer, U., 2013. High-Performance Analysis of Glycosylated Aromaprecursors in Must and Wine. 8th In Vino Analytica Scientia Symposium, 2.-5.07.2013, Reims, France.

Schober, D., Wacker, M., Schmar, H.-G. und Fischer, U., 2014. Analyse glykosidisch gebundener Aromastoffvorläufer während Traubenverarbeitung und Gärung. 7. Anwendertreffen Weinanalytik, 26.02.2014, Veitshöchheim.

Schober, D., Schmarr, H.-G., Fischer, U., 2014. Von der Traube zum Sekt: Analyse glykosidisch gebundener Aromastoffvorläufer während Traubenverarbeitung und Gärung. Regionalverbandstagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft - Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, 10.-11.03.2014, Neustadt/ Weinstraße.

Schober, D., Fischer, U., 2014. Analysis of glycosylated aroma compounds during grape processing & fermentation. Wine Active Compounds, 26.-28.03.2014, Beaune, France.

Schober, D., Wacker, M., Schmarr, H.-G., Fischer, U., 2014. Variation of glycosylated aroma precursors during grape processing, primary and secondary alcoholic fermentation. Macrowine conference, 7.-10.09.2014, Stellenbosch, South Africa.

Schober, D., Grein, B., 2015. Die Bedeutung der Hefe in der Weinbereitung. Seminar für Dozenten und Ausbilder des Deutschen Weininstitutes, 6.02.2015, Ingelheim.

Schober, D., Kritzinger, E., 2015. Freisetzung gebundener Aromastoffe bei der Weinbereitung. Mitgliederversammlung des Beratungsring RS - Selection Rheinhessen e.V., 17.06.2015, Alzey.

Schober, D., Wacker, M., Klink, S., Schmarr, H.-G., Fischer, U., 2015. Impact of grape processing and yeast strain selection on glycosylated aroma compounds and flavour of sparkling wine. 10th Oeno conference, 29.06.-1.07.2015, Bordeaux, France.

Schober, D., Wacker, M., Schmarr, H.-G., Fischer, U., 2015. Sensory impact of aroma precursors in wine and sparkling wine. Veranstaltung im Rahmen des OIV Weltkongress, 9.7.2015, Neustadt/ Weinstraße.

Schober, D., 2015. Extraktion und Freisetzung glykosidisch gebundener Aromastoffe in der Weinbereitung. Lallemand-Symposium, 3.9.2015, Wien, Austria.

Poster

Schober, D., Maronek, S., Fischer, U., 2013. Durchsatzoptimierte Analyse glykosidisch gebundener Aromastoffe in Traubenmost und Sektgrundwein. 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 16.-18.09.2013, Braunschweig.

Fischer U., Schober D., Schmarr H.-G., 2014. From Grape to Sparkling Wine: Analysis of glycosylated Aroma Compounds during Grape Processing and Fermentation. 248th ACS conference Advances in Wine Research, 10.-14.8.2014, San Francisco, USA.

Schober, D., Wacker, M., Schormann, A., Fischer, U., 2014. Optimierung des Sektaromas: gezielte Freisetzung glykosidisch gebundener Aromastoffvorläufer während erster und zweiter Gärung. 3rd Deutsche Sensoriktag der Deutschen Gesellschaft für Sensorik e.V., 6.-7. 11. 2014, Münster.

Schober, D., Wacker, M., Klink, S., Schmarr, H.-G., Fischer, U., 2015. Sensory impact of grape processing and yeast selection on sparkling wine flavor. 9th In Vino Analytica Scientia Symposium, 14.-17.7.2015, Trento, Italy.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank!

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Fischer danke ich für das Überlassen des vielfältigen spannenden Themas, die Betreuung und Unterstützung und zusätzlich den Freiraum und das Vertrauen eigene Ideen umsetzen zu dürfen.

Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Betreuung an der TU Kaiserslautern, ebenso Prof. Dr. Werner Thiel für die freundliche Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Bei PD Dr. habil. Hans-Georg Schmarr bedanke ich mich insbesondere für die Betreuung der gaschromatographischen Analytik und Vermittlung seines umfangreichen analytischen Wissens, aber auch für die interessanten Diskussionen über die Analytik hinaus.

Ein herzliches Dankeschön gebührt Michael Wacker! Lieber Michael, danke für deine unermüdliche Arbeit im Labor, das Aushalten meiner spontanen Ideen und zusätzlich die vielen aufmunternden Gespräche an schwierigen Tagen.

Vielen Dank an Dr. Pascal Wegmann-Herr und Sascha Wolz für die Unterstützung in der Wein- und Sektbereitung, außerdem an Florian Schraut und Benedikt Grein. Bei Anette Schormann und Sandra Klink bedanke ich mich für die Durchführung der sensorischen Analytik der zahlreichen Weine und Sekte, auch an die gewissenhaften und zuverlässigen Teilnehmer der Verkostungspanels! Danke an Manfred Jutzi für die vielen Lehrstunden zur statistischen Auswertung der Daten und die manchmal philosophische Betrachtung der Wissenschaft. Unbedingt geht ein Dankeschön an Dr. Stephan Sommer, der neben der Weitergabe seines Wissens zur Welt der FT-MIR-Spektroskopie für alle Laborprobleme eine interessante Lösung fand. Vielen Dank an Prof. Dr. Maren Scharfenberger-Schmeer und Christian Vogelei der Abteilung Mikrobiologie des DLR Rheinpfalz für die Kooperation zur Hefestammcharakterisierung, die wirklich produktiv war! Danke an die Diplom-, Bachelor- und Master- Studenten, die durch ihre Mitarbeit wesentlich zur Arbeit beigetragen haben, insbesondere an Tobias Volk und Sylvia Maronek. Ein herzliches und ausdrückliches Danke auch an alle anderen lieben Kollegen, die allesamt auf ihre eigene Art die Zeit am DLR zu einem Erlebnis gemacht haben, ganz besonders Janina Dorn, Engela Kritzinger, Anne Lena Wegmann, Susann Krautwald, Daniela Hoestermann, Marlene Nesper-Schimmel, Patrick Nickolaus, Petra Slabitzki, Johannes Langen, Charlotte Legrum, Patrick Staub und Martina Sokolowsky für Freundschaft, Zeit und Unterstützung!

Ich bedanke mich auch herzlich bei meinen Projektpartnern der TU Braunschweig, insbesondere Prof. Dr. Peter Winterhalter und Dr. Recep Gök für die interessanten Diskussionen zur Weiterentwicklung des Projektes und die Synthese von deuterierten Standards sowie bei Margret Brüggemann.

Vielen Dank desweiteren an die vielfältige Unterstützung der Mitglieder und Unternehmen im Projektbegleitenden Ausschuss des FEI-Projektes AiF 16627N.

Schlußendlich bin ich dankbar für viele Situationen und Begegnungen, die mich persönlich geprägt und weitergebracht haben. Danke an alle diese Momente!

*„Was uns im Leben am meisten durcheinander bringt ist das Bild in unseren Köpfen
das uns sagt wie es auszusehen hat.“ (Unbekannt)*

*„Binde zwei Vögel zusammen, sie werden nicht fliegen können obwohl sie nun vier
Flügel haben.“ (Rumi)*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XV
Probenbezeichnung und -interpretation	XVI
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Zielsetzung.....	2
2 Literaturübersicht	4
2.1 Glycosidisch gebundene Aromastoffvorläufer	4
2.1.1 Bedeutung, Bildung, Vorkommen und Einflussfaktoren.....	4
2.1.2 Aromastoffe.....	6
2.1.2.1 Monoterpene.....	8
2.1.2.2 C ₁₃ -Norisoprenoide	10
2.1.2.3 C ₆ -Alkohole (syn. aliphatische Alkohole)	12
2.1.2.4 Aromatische Alkohole (syn. Benzolderivate)	13
2.1.2.5 Flüchtige Phenole	14
2.1.3 Glycone in Trauben, Most und Wein	15
2.2 Hydrolyse der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer	16
2.2.1 Reaktionsmechanismus säure- und enzymkatalysierter Hydrolyse	16
2.2.1.1 Reaktionsmechanismus	16
2.2.1.2 Aktivitätsspektren der enzymatischen Aktivität abhängig der biologischen Herkunft.....	17
2.2.2 Hefen und Hydrolyse der Aromastoffvorläufer	18
2.2.2.1 Taxonomie, Vorkommen, Entwicklung und Relevanz in der Weinbereitung.....	18
2.2.2.2 Genetik, Enzymausstattung und Ausprägung der Glycosidase-Aktivität	20
2.2.3 Technische Enzyme aus <i>Aspergillus niger</i>	22
2.2.4 Weitere Einflussfaktoren auf die Gehalte glycosylierter und freier Aromastoffe.....	25
2.3 Wein- und Sektgärung im Kontext glycosylierter Aromastoffe	26
2.3.1 Weingärung.....	26
2.3.2 Sektgärung.....	27
2.4 Methoden zur Analyse glycosidisch gebundener Aromastoffe.....	29
3 Material und Methoden	31

3.1	Experimentelle Weinbereitung.....	31
3.1.1	Traubenmaterial.....	31
3.1.2	Verwendete Hefestämme und Enzympräparat.....	31
3.1.3	Modellgärungen im Labormaßstab.....	32
3.1.4	Experimentelle Weinbereitung mit verschiedenen Hefestämmen und Enzym.....	33
3.1.5	Experimentelle Sektbereitung mit verschiedenen Hefestammkombinationen und Enzym.....	33
3.1.6	Analyse der Traubenverarbeitung.....	35
3.1.6.1	Maischestandzeit.....	35
3.1.6.2	Pressfraktionen.....	35
3.2	Routineanalytik.....	35
3.2.1	Fourier Transformation Infrarot Spektroskopie (FTIR).....	35
3.2.2	Bestimmung von Schwefeldioxid (SO ₂).....	36
3.2.3	Zellzahlbestimmung der Hefen.....	36
3.3	Glycosyl-Glucose-Assay und Analyse von Zuckern.....	36
3.3.1	Glycosyl-Glucose-Assay.....	36
3.3.2	Analytik von Zuckern.....	37
3.3.2.1	Molisch-Test.....	37
3.3.2.2	Dünnschichtchromatographie.....	37
3.4	Aromastoffanalytik mittels SPE/GC-MS.....	38
3.4.1	Chemikalien und Referenzsubstanzen.....	39
3.4.2	Automatisierte SPE.....	39
3.4.3	Enzymatische Hydrolyse und Extraktion der hydrolysierten Aromastoffvorläufer.....	40
3.4.4	GC-MS mit Large-Volume-Injektion.....	41
3.4.5	Quantifizierung mit Stabilisotopenverdünnungsassay (SIVA) und Validierung.....	43
3.4.5.1	Vorgehen der Quantifizierung, Standards und massenspektrometrische Parameter.....	43
3.4.5.2	Validierung der GC-MS-Messung.....	45
3.5	Sensorische Analytik.....	46
3.6	Mikrobiologische und biochemische Analytik.....	47
3.6.1	Anzucht und Selektion der Hefen.....	47
3.6.2	Test auf Agar-Platten mit Arbutin und Cellobiose.....	48
3.6.3	pNPG-Assay.....	49
3.7	Genexpressionsanalyse.....	51

3.7.1.1	Auswahl der Kandidatengene	51
3.7.1.2	Durchführung	52
3.8	Kalibration des FT-MIR	52
3.8.1	Grundlagen und Funktionsweise der FT-MIR Spektroskopie.....	52
3.8.1.1	Physikalisch-chemischer Hintergrund.....	52
3.8.1.2	Technischer Hintergrund und speziell Aufbau des Foss FT 120.....	53
3.8.2	Probenmaterial.....	55
3.8.3	Probenvorbereitung und Korrelation mit der Referenzanalytik.....	56
3.8.4	Modifikation des Gerätes zur Probenaufgabe.....	57
3.8.5	Auswahl von Küvette und Lösungsmittel	58
3.8.6	Kalibration und statistische Parameter	58
3.9	Statistische Methoden	60
4	Ergebnisse.....	61
4.1	Eignung von Methoden zur chemischen Analyse glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer	61
4.1.1	Glycosyl-Glucose-Assay	61
4.1.1.1	Anwendbarkeit der enzymatischen Hydrolyse mit Enzympräparat AR2000.....	61
4.1.1.2	Vergleich von säure- und enzymkatalytischer Hydrolyse.....	62
4.1.2	Festphasenextraktion/ Gaschromatographie-Massenspektrometrie	63
4.1.2.1	Festphasenextraktion (SPE)	63
4.1.2.2	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).....	64
4.1.2.3	Gesamtmethode	65
4.1.3	Fourier-Transformation-Midinfrarot- (FT-MIR-) Spektroskopie.....	66
4.1.3.1	Standardisierung des modifizierten Geräteaufbaus	66
4.1.3.2	Auswahl des Lösungsmittels und der Messküvette	67
4.1.3.3	Basiskalibration	69
4.1.3.4	Fazit	71
4.2	Einflussfaktoren auf den Ausgangsgehalt glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer in Traubenmost und Wein	72
4.2.1	Rebsorte	72
4.2.1.1	Verteilung der Aromastoffvorläufer im Most.....	72
4.2.1.2	Verteilung der Aromastoffvorläufer im Wein	76
4.2.2	Verarbeitung des Traubenmaterials	80
4.2.2.1	Maischestandzeit	80
4.2.2.2	Pressfraktionen	84

4.3	Einfluss der Hefen auf die Freisetzung der Aromastoffvorläufer während der Gärung im Labormaßstab.....	88
4.3.1	Modellgärung 1	88
4.3.2	Modellgärung 2	89
4.3.3	Modellgärung 3	90
4.3.3.1	Zusammenfassung der Modellgärungen im Labormaßstab.....	91
4.4	Freisetzung der Aromastoffvorläufer in der experimentellen Weinbereitung: Einfluss von Hefe und Enzym.....	91
4.4.1	Chemische Analyse	91
4.4.1.1	Chardonnay	92
4.4.1.2	Riesling	96
4.4.2	Sensorische Analyse der Weine.....	100
4.4.2.1	Chardonnay	100
4.4.2.2	Riesling	101
4.4.3	Korrelation der analytischen und sensorischen Daten.....	102
4.4.3.1	Chardonnay	103
4.4.3.2	Riesling	104
4.4.4	Zusammenfassung der Modellgärung im Versuchsmaßstab	105
4.5	Freisetzung der Aromastoffvorläufer in der experimentellen Sektbereitung: Einfluss von Traubenmaterial, Hefe und Enzym	106
4.5.1	Einfluss der Hefe auf die Sektgrundweine	106
4.5.1.1	Chemische Analyse	106
4.5.1.2	Sensorische Analyse.....	112
4.5.1.3	Korrelation chemischer und sensorischer Daten	114
4.5.2	Einfluss von Hefekombination und Enzymeinsetz auf Sekte verschiedener Rebsorten unterschiedlicher Traubenverarbeitung.....	116
4.5.2.1	Chemische Analyse	116
4.5.2.2	Sensorische Analyse.....	129
4.5.3	Korrelation chemischer und sensorischer Daten	138
4.5.4	Zusammenfassung der experimentellen Sektbereitung	142
4.6	Bestimmung der β -D-Glucosidase- und Glycosidase-Aktivität als Freisetzungspotential der Hefen in Modellversuchen	143
4.6.1	Test auf Agar-Platten	143
4.6.1.1	Kontrollen.....	143
4.6.1.2	YNB-Medium mit Arbutin (mit und ohne Ammoniumeisen(III)-citrat).....	144
4.6.1.3	Substrat Cellobiose	145
4.6.2	pNPG-assay.....	146

4.6.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zur β -D-Glucosidase-Aktivität der Hefen	148
4.7	Genexpressionsanalysen	149
5	Diskussion	153
5.1	Angewandte Methoden zur Analytik der Aromastoffvorläufer	153
5.2	Einflussfaktoren auf den Ausgangsgehalt der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer	156
5.3	Einfluss auf die Hydrolyse der glycosylierten Aromastoffe.....	159
6	Zusammenfassung und Ausblick	170
6.1	Zusammenfassung.....	170
6.2	Ausblick	172
7	Anhang	174
8	Literatur	179

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Mögliche Reaktionsmechanismen der Monoterpene. Die Reaktivität der aus GPP bzw. LPP gebildeten Monoterpenole führt zu Isomerisierung und Biosynthese aromaaktiver Verbindungen, GPP Geranyldiphosphat, LPP Linalyldiphosphat, nach Wüst (2003) und Ilc et al. (2016).	9
Abb. 2-2: Carotinoid-Abbau über Intermediäre bis zum aromaaktiven C ₁₃ -Norisoprenoid am Beispiel von Neoxanthin zu β -Damascenon, nach Baumes et al. (2002) und (Mendes-Pinto, 2009).	11
Abb. 2-3: Strukturen der C ₆ -Alkohole n-Hexanol und (Z)-3-Hexen-1-ol.....	12
Abb. 2-4: Strukturen der Benzolderivate 2-Phenylethanol und Benzylalkohol.....	14
Abb. 2-5: Hydroxyzimtsäuren und Weinsäureester in Most und Wein weißer Trauben, nach Waterhouse (2002).	14
Abb. 2-6: Bildung der flüchtigen Phenole aus den Hydroxyzimtsäuren, nach Rapp und Versini (1996) und Sommer (2012).	15
Abb. 2-7: Mögliche Mono- und Disaccharid-Glycone zur Aromastoffvorläufer-Bildung in Weintrauben, nach Sarry und Günata (2004).	16
Abb. 2-8: Enzymatische Hydrolyse der Aromastoff (-R)-Glycoside. Die Spaltung von O- β -D-Glucosiden katalysiert die Aktivität einer β -Glucosidase (A), bei O-Diglycosiden findet eine in zwei Schritten ablaufende sequenzielle Hydrolyse statt (B), nach Sarry und Günata (2004).	17
Abb. 3-1: Schema der experimentellen Sektbereitung in 2012.	34
Abb. 3-2: SPE-Roboter-Systeme GX-271 ASPEC (A) und SmartPrepExtractor (B).....	40
Abb. 3-3: GC-MS-Messsystem für großvolumige Injektionen, Gesamtaufbau (A) und Injektion großvolumiger Proben in den gepackten Liner (B), nach Magni und Porzano (2003).	41
Abb. 3-4: Chromatogramme bei Anwendung unterschiedlicher Injektionstechniken der Volumina von 2 μ l (A), 22 μ l (B) und 22 μ l bei 1:10 Verdünnung (C) am Beispiel eines Airén-Weines.....	43
Abb. 3-5: Verwendete Substrate: Arbutin (4-Hydroxyphenyl- β -D-Glucopyranosid) und Cellobiose (4- β -D-Glucopyranosyl-Glucose), nach Rosi et al. (1994) und Daenen et al. (2008).	49
Abb. 3-6: Reaktionsmechanismus pNPG-Assay, nach Rosi et al. (1994) und Daenen et al. (2008).....	50
Abb. 3-7: Bereiche der Molekülschwingungen im MIR-Spektrum, nach Gottwald und Wachter (1997) und Vollhardt und Schore (2005).	53
Abb. 3-8: Schematischer Aufbau des Spektrometers Foss WineScan FT 120, nach Foss (2002a).....	54
Abb. 3-9: Schematischer Aufbau und Funktionsweise des Interferometer-Teils, nach Foss (2002a) (A), und technische Umsetzung bei Gerät Foss Wine Scan FT 120: 1 HeNe-Laser, 2 IR-Box mit Interferometer-Teil, IR-Quelle, 4 Aufbau befindlich hinter DTU (B).	55
Abb. 3-10: Schema der Kalibration der FT-MIR Analytik mit GC-MS.	56
Abb. 3-11: Umbau des FT-MIR-Spektrometers Foss Winescan FT 120. Hinter der zu öffnenden Frontklappe (a) befindet sich links die Detektoreinheit (b) mit Zulauf (Mitte) und Ablauf (Oben), was durch kurze Zugänge ersetzt werden kann (C und D).....	57

Abb. 4-1: GG-Gehalte in Abhängigkeit ansteigender Aufdotierung mit Enzympräparat AR2000 (A) und D-Glucose bei gleichbleibendem Enzymgehalt (B) in Hydrolyse-Puffer.	62
Abb. 4-2: Transmissionsspektren von Dimethylsulfoxid bei der Messung in den Küvettenstärken 37 μm , 50 μm , 100 μm und 150 μm . Darstellung des gesamten Spektrums (links) von 0-6000 cm^{-1} sowie der Ausschnitte 0-1400 cm^{-1} (mitte) und 2500-3900 cm^{-1} (rechts), AU Absorptionseinheiten.....	67
Abb. 4-3: Transmissionsspektren von Methanol bei der Messung in den Küvettenstärken 37 μm , 50 μm , 100 μm und 150 μm . Darstellung des gesamten Spektrums (links) von 0-6000 cm^{-1} sowie der Ausschnitte 0-1400 cm^{-1} (mitte) und 2500-3900 cm^{-1} (rechts), AU Absorptionseinheiten.....	68
Abb. 4-4: Absorptionsspektren von Extrakten glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer in Dimethylsulfoxid bei Messung in den Küvettenstärken 37 μm (A) und 150 μm (B).....	68
Abb. 4-5: Absorptionsspektren von Extrakten glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer in Methanol bei Messung in den Küvettenstärken 37 μm (A) und 150 μm (B).....	69
Abb. 4-6: Absorptionsspektren bei Aufdotieren von Aromavorläufer-Extrakten für Dimethylsulfoxid (A) und Methanol (B) in der 150 μm Küvette, E (Extrakt) 1x einfach, 2x zweifach, 4x vierfach.....	69
Abb. 4-7: Korrelation FT-MIR (x) zu Referenz (y) für glycosylierte aromatische Alkohole ($\mu\text{g/L}$) der Basiskalibrierung (A1) und Validierung (A2) in DMSO sowie Basiskalibrierung (B1) und Validierung (B2) in Methanol.....	71
Abb. 4-8: Verteilung der Aromavorläufer in Mosten verschiedener Rebsorten. Die Darstellung der Daten im Boxplot in Quartilen, Minimum sowie Maximum und Median, außerdem Mittelwerte (Kreuz).....	73
Abb. 4-9: Hauptkomponentenanalyse der glycosylierten Aromastoffvorläufer zu Mosten verschiedener Rebsorten. Projektion der Faktorwerte der Moste verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.....	74
Abb. 4-10: Diskriminanzanalyse zur Diskriminierung der Moste nach Rebsorte anhand der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer. Faktorwerte der Moste verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) für die Faktoren D1 und D2.	76
Abb. 4-11: Verteilung der Aromavorläufer in Weinen verschiedener Rebsorten. Die Darstellung der Daten im Boxplot in Quartilen, Minimum sowie Maximum und Median, außerdem Mittelwerte (Kreuz).....	77
Abb. 4-12: Hauptkomponentenanalyse der glycosylierten Aromastoffvorläufer zu Weinen verschiedener Rebsorten. Projektion der Faktorwerte der Weine verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.....	78
Abb. 4-13: Diskriminanzanalyse zur Diskriminierung der Weine nach Rebsorte anhand der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer. Faktorwerte der Weine verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) für die Faktoren D1 und D2.	80
Abb. 4-14: Einfluss der Maischestandzeit auf den Gehalt der Aromastoffvorläufer verschiedener Rebsorten. Hauptkomponentenanalyse der gebundenen Aromastoffvorläufer in den Mosten der verschiedenen Rebsorten der	

Jahrgänge 2013 und 2014 nach unterschiedlicher Maischestandzeit des Traubenmaterials. Projektion der Faktorwerte der Moste verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.....	81
Abb. 4-15: Einfluss der Maischestandzeit auf die Gehalte der Aromavorläufer nach Substanzgruppen (A) und Einzelsubstanzen (B) in Muskateller-Most 2014.....	82
Abb. 4-16: Einfluss der Maischestandzeit auf die Gehalte der Aromastoffvorläufer nach Substanzgruppen (A) und Einzelsubstanzen (B) in Riesling-Most 2014.....	83
Abb. 4-17: Einfluss des Pressdruckes auf den Gehalt der Aromastoffvorläufer verschiedener Rebsorten. Hauptkomponentenanalyse der gebundenen Aromastoffvorläufer in den Mosten der verschiedenen Rebsorten, für den Riesling unterschiedlicher Traubenverarbeitung. Projektion der Faktorwerte der Moste verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.	85
Abb. 4-18: Einfluss von ansteigenden Druckstufen auf die Gehalte gebundener Aromavorläufer ohne vorherige Maischestandzeit (A) und nach Maischestandzeit von 24 Stunden (B) im Riesling-Most.	86
Abb. 4-19: Einfluss von ansteigenden Druckstufen auf die Gehalte gebundener Aromastoffvorläufer zusammengefasst in Substanzgruppen (A) sowie Einzelsubstanzen (B) in Muskateller-Most.....	87
Abb. 4-20: Analyse der Aromavorläufer-Gehalte (A) unter Beachtung des Glucose-Gehaltes (B) während der Vergärung von Riesling Most mit den Hefestämmen EC1118 und QA23. (n=3).....	89
Abb. 4-21: Analyse der Aromavorläufer-Gehalte am Endpunkt der Gärung (A) und Glucose-Gehalt während der Gärung (B) von Riesling-Most bei Verwendung der Hefestämme Freddo und Siha Cryarome. (n=3).....	90
Abb. 4-22: Analyse der Aromavorläufer-Gehalte am Endpunkt der Gärung (A) und Glucose-Gehalt während der Gärung (B) von Muskateller-Most bei Verwendung der Hefestämme Freddo und Siha Cryarome. (n=3).....	91
Abb. 4-23: Einfluss von Weinhefen auf die Freisetzung glycosidisch gebundener Aromastoffe in Chardonnay. Vom Most zum Wein wurden C ₆ -Alkohole, Monoterpene und aromatische Alkohole signifikant freigesetzt (A). Der Faktor Hefestamm beeinflusste dabei die Freisetzung der C ₆ -Alkohole und Monoterpene signifikant (B).	92
Abb. 4-24: Einfluss von Enzymeinsatz auf die Chardonnay-Weine. Der Enzymeinfluss (+E) ist höchst signifikant verantwortlich für die weitere Freisetzung von C ₆ -Alkoholen, Monoterpenen und aromatischen Alkoholen im Vergleich zum ausschließlichen Hefeeinsatz (-E).....	93
Abb. 4-25: Einfluss von Hefestamm und Enzymeinsatz auf die Freisetzung gebundener Aromastoffvorläufer im Chardonnay. Hauptkomponentenanalyse der freigesetzten Vorläufer in den Weinen der Hefestammkombinationen ohne sowie mit Enzym AR2000 (E). Projektion der Faktorwerte der Chardonnay-Weine (links) und der Ladungen der freigesetzten Aromastoffe (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.....	96
Abb. 4-26: Einfluss von Weinhefen auf die Freisetzung glycosidisch gebundener Aromastoffe in Riesling. Vom Most zum Wein wurden die C ₆ -Alkohole, Monoterpene und aromatischen Alkohole signifikant freigesetzt (A). Die Hefe beeinflusste die Freisetzung der Monoterpene signifikant (B).	97

Abb. 4-27: Einfluss von Enzymeinsatz auf die Riesling-Weine. Der Enzymeinfluss (+E) ist höchst signifikant verantwortlich für die weitere Freisetzung von C ₆ -Alkoholen, Monoterpenen und aromatischen Alkoholen im Vergleich zum ausschließlichen Hefeinsatz (-E).	98
Abb. 4-28: Einfluss von Hefestamm und Enzymeinsatz auf die Freisetzung gebundener Aromastoffvorläufer im Riesling. Hauptkomponentenanalyse der freigesetzten Vorläufer in den Weinen der Hefestammkombinationen ohne sowie mit Enzym AR2000 (E). Projektion der Faktorwerte der Riesling-Weine (links) und der Ladungen der freigesetzten Aromastoffe (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.....	100
Abb. 4-29: Deskriptive sensorische Analyse der Chardonnay-Weine nach Einfluss Hefestamm (A) und Einfluss des Enzympräparates AR2000 (E) (B).	101
Abb. 4-30: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Weine nach Einfluss der Saccharomyces-Hefestämme Freddo, Heiligenstein, Siha7 und U228 (A) und Vergleich mit der Kombination aus den Nichtsaccharomyces-Stämmen Flavia und Biodiva, 100 % normiert auf die Weine aus Abb. A (B).	102
Abb. 4-31: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Weine im Kontext der Anwendung von Enzym Enzympräparates AR2000 (E). Hefestämme Freddo, Siha7 und Flavia/QA23 nach normal verlaufener Gärung (A) Hefestamm HPS nach spontanem BSA (B).....	102
Abb. 4-32: PLS-Regression der freigesetzten Aromastoffe (X) und sensorischen Geruchsattribute (Y) mit Darstellung der verwendeten Hefestämmen und Enzym AR2000 (E) bei der Vergärung von Chardonnay-Most.....	104
Abb. 4-33: PLS-Regression der freigesetzten Aromastoffe (X) und sensorischen Geruchsattribute (Y) mit Darstellung der verwendeten Hefestämmen und Enzym AR2000 (E) bei der Vergärung von Riesling-Most.	105
Abb. 4-34: Gehalte der Aromastoffvorläufer in den Chardonnay-Mosten und mit den Hefestämmen BC und DV10 hergestellten Grundweinen aus Normalklon (A) und Duftklon (B). (n=3).....	107
Abb. 4-35: Gehalte der Aromastoffvorläufer im Riesling-Most und in den Grundweinen der Hefestämme U228 und RC212 aus 2012. (n=3).....	109
Abb. 4-36: Gehalte der Aromastoffvorläufer in den Riesling-Mosten und den Grundweinen aus den Hefestämmen DV10 und IOC 18-2007 aus Ganztraubenpressung (A) und Standzeit 24 h (B). (n=3).....	110
Abb. 4-37: Gehalte der Aromastoffvorläufer im Muskateller-Most und in den mit Hefestämmen BC und DV10 hergestellten Grundweinen. (n=3).....	111
Abb. 4-38: Deskriptive sensorische Analyse der Chardonnay-Grundweine nach Normalklon (A) und Duftklon (B) unter Einfluss der Hefen DV10 und BC.	113
Abb. 4-39: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Grundweine aus 2012 unter Einfluss der Hefestämme U228 und RC212.	113
Abb. 4-40: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Grundweine nach Ganztraubenpressung (A) und Standzeit 24 h (B) unter Einfluss der Hefestämme DV10 und IOC 18-2007.....	114
Abb. 4-41: Deskriptive sensorische Analyse der Muskateller-Grundweine unter Einfluss der Hefestämme DV10 und BC.	114
Abb. 4-42: PLS-Regression der glycosylierten Aromastoffe (X) und sensorischen Geruchsattribute (Y) mit Darstellung der Sektgrundweine der Rebsorten	

Chardonnay, Riesling und Muskateller unter Einfluss von Traubenmaterial und Hefestamm.....	115
Abb. 4-43: Einfluss von Traubenmaterial (NK Normalklon, DK Duftklon), Hefestamm (Grundweihenefe/Sektheefe), Enzymeinsatz (E) und Säurehydrolyse (Sre) auf die gebundenen Aromastoffvorläufer in den Chardonnay-Sekten. Hauptkomponentenanalyse, Projektion der Faktorwerte der Chardonnay-Sekte (links) und der Faktorladungen der gebundenen Aromastoffe (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.....	118
Abb. 4-44: Gehalte glycosidisch gebundener Aromastoffe in den mit verschiedenen Kombinationen der Hefestämme U228 und RC212 hergestellten Riesling-Sekten in 2012.	121
Abb. 4-45: Einfluss von Traubenmaterial (GTP Ganztraubenpressung, StZt Standzeit), Hefestamm, Enzymeinsatz (E) und Säurehydrolyse (Sre) auf die gebundenen Aromastoffvorläufer in den Riesling-Sekten aus 2013. Hauptkomponentenanalyse, Projektion der Faktorwerte der Riesling-Sekte (links) und der Ladungen der gebundenen Aromastoffe (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.	123
Abb. 4-46: Einfluss von Hefestamm, Enzymeinsatz (E) und Säurehydrolyse (Sre) auf die gebundenen Aromastoffvorläufer in den Muskateller-Sekten. Hauptkomponentenanalyse, Projektion der Faktorwerte der Riesling-Sekte (links) und der Ladungen der gebundenen Aromastoffe (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.	127
Abb. 4-47 Einfluss von Hefestamm, Enzymeinsatz (E) und Klon-Variante (NK Normalklon, DK Duftklon) auf die Sensorik der Chardonnay-Sekte. Hauptkomponentenanalyse der sensorischen Merkmale und der Sektvarianten, Projektion der Faktorwerte der Chardonnay-Sekte (links) und der Ladungen der sensorischen Merkmale (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.	131
Abb. 4-48: Deskriptive sensorische Analyse der Chardonnay-Sekte, unterschieden nach den Klon-Varianten Normalklon (A) und Duftklon (B) unter Einfluss der Hefen DV10, BC und IOC 18-2007.	132
Abb. 4-49: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Sekte der verschiedenen Kombinationen der Hefestämme U228 und RC212.....	133
Abb. 4-50: Einfluss von Hefestamm, Enzymeinsatz (E) und Traubenverarbeitung (GTP Ganztraubenpressung, StZt Standzeit 24 h) auf die Sensorik der Riesling-Sekte. Hauptkomponentenanalyse der sensorischen Merkmale und der Sektvarianten, Projektion der Faktorwerte der Chardonnay-Sekte (links) und der Ladungen der sensorischen Merkmale (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.	135
Abb. 4-51: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Sekte, unterschieden nach Varianten Traubenverarbeitung Ganztraubenpressung (A) und Standzeit 24 h (B) unter Einfluss der Hefestämme DV10, IOC 18-2007 (IOC) und Siha4.	136
Abb. 4-52: Einfluss von Hefestamm-Kombination und Enzymeinsatz (E) auf die Sensorik der Muskateller-Sekte. Hauptkomponentenanalyse der sensorischen Merkmale und der Sektvarianten, Projektion der Faktorwerte der Muskateller-Sekte (links) und der Ladungen der sensorischen Merkmale (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.....	138

Abb. 4-53: Deskriptive sensorische Analyse der Muskateller-Sekte der verschiedenen Hefestamm-Kombinationen aus den Stämmen DV10 und BC (A) und Auswirkungen des Einsatzes von Enzympräparat AR2000 (E) in der zweiten Gärung (B).	138
Abb. 4-54: PLS-Regression der glycosidisch gebundenen Aromastoffe (X) und der olfaktorischen sensorischen Deskriptoren (Y) mit Darstellung der Chardonnay-Sektvarianten unter Einfluss der Faktoren Grundweinhafe, Sekthefe, Enzymeinsatz (E) und Klon-Variante (NK Normalklon, DK Duftklon).	140
Abb. 4-55: PLS-Regression der glycosidisch gebundenen Aromastoffe (X) und der olfaktorischen sensorischen Deskriptoren (Y) mit Darstellung der Riesling-Sektvarianten unter Einfluss der Faktoren Grundweinhafe, Sekthefe, Enzymeinsatz (E) und Traubenverarbeitung (GTP Ganztraubenpressung, StZt Standzeit).	141
Abb. 4-56: Partial Least Square Regression der glycosidisch gebundenen Aromastoffe (X) und der olfaktorischen sensorischen Deskriptoren (Y) mit Darstellung der Muskateller-Sektvarianten unter Einfluss der Faktoren Grundweinhafe, Sekthefe und Enzymeinsatz (E).	142
Abb. 4-57: Postivkontrolle der Platten-Tests, Ausstrich auf Vollmedium (YPD).....	144
Abb. 4-58: Negativkontrolle auf YNB-Medium ohne Zusatz einer Kohlenstoff-Quelle (A). Positives Wachstum der Stämme <i>Flavia</i> , H54 und H22 auf YNB+Arbutin zum Vergleich (B).....	144
Abb. 4-59: Plattentest auf YNB-Medium mit Arbutin und Ammoniumeisen(III)-citrat.	145
Abb. 4-60: Plattentest auf YNB-Medium mit Arbutin ohne Zusatz von Ammoniumeisen(III)-citrat.	145
Abb. 4-61: Plattentest auf YNB-Medium mit Cellobiose.	146
Abb. 4-62: β -D-Glucosidase-Aktivität von Hefen und Enzym. Zuordnung der Stämme: Saccharomyceten: ¹ <i>S. cerevisiae</i> , ² <i>S. bayanus</i> , Nichtsaccharomyceten: Biodiva <i>Torulasporea delbrueckii</i> , <i>Flavia Metschnikowia pulcherrima</i> , H22 <i>Debaromyces hansenii</i> , H54 <i>Pichia anomala</i>	147
Abb. 4-63: Relative Expression von EXG1, SPR1 und YIR007W anhand $\Delta\Delta$ ct nach Normalisierung auf <i>UBC6</i> und Δ ct der untersuchten Hefestämme EC1118 und QA23 (n=3). A exponentierte Daten, B logarithmierte Daten.	150
Abb. 4-64: Relative Expression von EXG1, SPR1 und YIR007W anhand $\Delta\Delta$ ct nach Normalisierung auf <i>UBC6</i> und den Zeitpunkt 17 Stunden im Gärverlauf (n=3). A exponentierte Daten, B logarithmierte Daten.	151
Abb. 4-65: Zusammenhang von Glucose, Genexpression von EXG1 und Aromastoffvorläufer-Gehalt während der Gärungen mit den Hefestämmen EC1118 (A) und QA23 (B) über die Zeit.	152

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1: Traubenmaterial, Lesedaten, Mostparameter und Behandlung für die Versuchsgärungen.	31
Tab. 3-2: In den Modellgärungen verwendete Hefestämme, Art und Hersteller.	32
Tab. 3-3: In der Versektung 2013 verwendete Kombinationen der Hefestämme.	35
Tab. 3-4: FTIR-Messprogramme mit deren Anwendung und erfasste Parameter.	36
Tab. 3-5: Materialien für den GG-Assay.	37
Tab. 3-6: Materialien für die DC.	38
Tab. 3-7: Qualifizierung der Zucker anhand Laufhöhe und Färbung mittels DC.	38
Tab. 3-8: Liste der verwendeten Chemikalien und Referenzsubstanzen.	39
Tab. 3-9: Arbeitsvorschrift Probenvorbereitung und Festphasenextraktion der Aromastoffvorläufer.	40
Tab. 3-10: Enzymatische Hydrolyse und Extraktion der hydrolysierten Aromavorläufer.	41
Tab. 3-11: GC-MS-Parameter zur Analyse glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer.	42
Tab. 3-12: Zur externen Kalibrierung der GC-MS Analytik verwendete Substanzen mit Substanzklasse, Kalibrierbereich und deuterierten internen Standards.	44
Tab. 3-13: Zusammensetzung der d-ISTD-Lösung ^a und Endkonzentration in der Probe zur Messung.	44
Tab. 3-14: Parameter zur massenspektrometrischen Detektion der Analyten bei der SPE/GC-MS.	45
Tab. 3-15: Validierung der Quantifizierung mittels GC-MS. Konzentration der Ausgangsprobe c0 und erwartete Konzentrationen (c1-c3) nach Aufdotieren.	46
Tab. 3-16: Validierung der Quantifizierung mittels GC-MS. Gemessene Konzentrationen nach Aufdotieren der Ausgangsprobe (c1-c3).	46
Tab. 3-17: Geruchs- und Geschmacksstandards für die sensorische Analyse.	47
Tab. 3-18: Mittels Plattentests und pNPG-Assay untersuchte Hefestämme mit Art-Zugehörigkeit, die jeweiligen Hersteller s. Tab. 3-2.	48
Tab. 3-19: Material pNPG-Assay.	50
Tab. 3-20: Kalibrierung pNPG-Assay.	51
Tab. 3-21: Probenmaterial zur Methodenentwicklung der FT-MIR-Analytik.	56
Tab. 3-22: Probenvorbereitung zur Analyse mit GC-MS und FT-MIR.	57
Tab. 3-23: Probenaufgabe nach Modifikation des Gerätes Foss Winescan FT120.	58
Tab. 3-24: Statistische Parameter zur Beurteilung einer Kalibrierung, nach Foss (2002b).	59
Tab. 3-25: Angewandte statistische Methoden (nach XLSTAT).	60
Tab. 4-1: Glycosyl-Glucose-Gehalte der Einzelschritte und Lösungen der Probenvorbereitung.	61
Tab. 4-2: Glycosyl-Glucose-Gehalte nach säure- und enzymkatalytischer Hydrolyse.	62
Tab. 4-3: Kapazität des Säulenmaterials Lichrolut EN 500mg bei Extraktion aus Most. Quantifizierung der Aroma-Glycoside nach erster (E1) und zweiter Elution (E2) aus einer Probe.	63
Tab. 4-4: Kapazität des Säulenmaterials Lichrolut EN 500mg bei Extraktion aus Wein. Quantifizierung der Aroma-Glycoside nach erster (E1) und zweiter Elution (E2) aus einer Probe.	64

Tab. 4-5: Validierung der Quantifizierung mittels GC-MS, Abweichung der Ist/ Soll-Werte (%).....	64
Tab. 4-6: Wiederholbarkeit der Messung mittels GC-MS.....	65
Tab. 4-7: Konzentrationsbereich, Standardabweichung und Variationskoeffizient Gesamtdatensatz ^a	66
Tab. 4-8: Geeignete Messbereiche im MIR-Spektrum abhängig der eingesetzten Küvetten-Lösungsmittel-Kombination.....	67
Tab. 4-9: Ergebnisse der Basiskalibration für DMSO (n=37).....	70
Tab. 4-10: Ergebnisse der Basiskalibration für Methanol (n=37).....	71
Tab. 4-11: Einfluss der Rebsorte auf die Aromastoffvorläufer im Most. Einfaktorielle Varianzanalyse mit F-Werten und zugehörige Signifikanzniveaus ^a , Paarweiser Vergleich nach Fisher´s LSD Test ^b	75
Tab. 4-12: Einfluss der Rebsorte auf die Aromastoffvorläufer im Wein. Einfaktorielle Varianzanalyse mit F-Werten und zugehörige Signifikanzniveaus ^a , Paarweiser Vergleich nach Fisher´s LSD Test ^b	79
Tab. 4-13: Mehrfaktorielle Varianzanalyse über die Faktoren Jahrgang, Rebsorte und Standzeit aller Varianten. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a	84
Tab. 4-14: Mehrfaktorielle Varianzanalyse über die Faktoren Rebsorte, Traubenverarbeitung und Pressdruck aller Varianten. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a	87
Tab. 4-15: Varianzanalyse über die Analytik der Aromastoffvorläufer der Riesling-Weine des Gärverlaufs und des Endpunktes der ersten Modellgärung. F-Werte und Signifikanzniveaus ^a	88
Tab. 4-16: Einfluss von Hefestamm und Enzym auf die Aromastoffvorläufer im Chardonnay-Wein. Einfaktorielle bzw. zweifaktorielle ^b Varianzanalyse, F-Werte und Signifikanzniveaus ^a	95
Tab. 4-17: Einfluss von Hefestamm und Enzym auf die Aromastoffvorläufer im Riesling-Wein. Einfaktorielle bzw. zweifaktorielle ^b Varianzanalyse, F-Werte und Signifikanzniveaus ^a	99
Tab. 4-18: Einfluss von Hefestamm und Klonvariante auf die glykosidisch gebundenen Aromavorläufer. Zweifaktorielle Varianzanalyse, F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a	107
Tab. 4-19: Einfluss des Hefestammes auf die glykosidisch gebundenen Aromavorläufer der Chardonnay-Sektgrundweine für Variante Normalklon und Duftklon. ^a Einfaktorielle Varianzanalyse mit F-Werten und zugehörige Signifikanzniveaus. Eingruppierung der mit Hefestamm BC bzw. DV10 hergestellten Grundweine. ^b Paarweiser Vergleichstest (Fisher´s LSD).....	108
Tab. 4-20: Einfluss des Hefestammes auf die glykosidisch gebundenen Aromavorläufer der Riesling-Sektgrundweine aus 2012. ^a Einfaktorielle Varianzanalyse mit F-Werten und zugehörige Signifikanzniveaus. Eingruppierung der mit Hefestamm U228 bzw. RC212 hergestellten Grundweine. ^b Paarweiser Vergleichstest (Fisher´s LSD).....	109
Tab. 4-21: Einfluss von Grundweinhefe und Traubenmaterial auf die glykosidisch gebundenen Aromavorläufer. Zweifaktorielle Varianzanalyse, F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a	109
Tab. 4-22: Einfluss des Hefestammes auf die glykosidisch gebundenen Aromavorläufer der Riesling-Sektgrundweine, getrennt nach Most-Variante Ganztraubenpressung und Standzeit. ^a Einfaktorielle Varianzanalyse: F-	

Werte und zugehörige Signifikanzniveaus. Eingruppierung der mit Hefestamm IOC 18-2007 (IOC) bzw. DV10 hergestellten Grundweine. ^b Paarweiser Vergleichstest (Fisher´s LSD).....	111
Tab. 4-23: Einfluss des Hefestammes auf die Aromavorläufer der Muskateller-Sektgrundweine. ^a Einfaktorielle Varianzanalyse: F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus. Eingruppierung der mit Hefestamm BC bzw. DV10 hergestellten Grundweine. ^b Paarweiser Vergleichstest (Fisher´s LSD).....	112
Tab. 4-24: Multifaktorielle Varianzanalyse über die Chardonnay-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a . Einfaktorielle Analyse für den Einfluss der Säurehydrolyse ^b	120
Tab. 4-25: Multifaktorielle Varianzanalyse über die 2012 Riesling-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a	122
Tab. 4-26: Multifaktorielle Varianzanalyse über die Riesling-Sekte aus 2013. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a . Einfaktorielle Analyse für den Einfluss der Säurehydrolyse ^b	126
Tab. 4-27: Multifaktorielle Varianzanalyse über die Muskateller-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a . Einfaktorielle Analyse für den Einfluss der Säurehydrolyse ^b	129
Tab. 4-28: Multifaktorielle <i>mixed model</i> Varianzanalyse der Ergebnisse der deskriptiven Analyse der Chardonnay-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a	130
Tab. 4-29: Multifaktorielle <i>mixed model</i> Varianzanalyse der Ergebnisse der deskriptiven Analyse der Riesling-Sekte aus 2012. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a	133
Tab. 4-30: Multifaktorielle <i>mixed model</i> Varianzanalyse der Ergebnisse der deskriptiven Analyse der Riesling-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a	134
Tab. 4-31: Multifaktorielle <i>mixed model</i> Varianzanalyse der Ergebnisse der deskriptiven Analyse der Muskateller-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus ^a	137
Tab. 4-32: β -D-Glucosidase-Aktivität des Enzympräparates AR2000, eigene Messungen und Literaturwerte.....	146
Tab. 4-33: β -D-Glucosidase-Aktivität ausgewählter Saccharomyces- (¹ <i>S. cerevisiae</i> ² <i>S. bayanus</i>) und Nichtsaccharomyces-Stämme ³	149
Tab. 7-1: Weinchemische Parameter 2013er Chardonnay- und Riesling-Wein	174
Tab. 7-2: Weinchemische Parameter 2013er Chardonnay Grundwein und Sekt	175
Tab. 7-3: Weinchemische Parameter 2012er Riesling Grundwein und Sekt.....	176
Tab. 7-4: Weinchemische Parameter 2013er Riesling Grundwein und Sekt.....	177
Tab. 7-5: Weinchemische Parameter 2013er Muskateller Grundwein und Sekt	178

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (engl. Analysis of Variance)
BSA/ MLF	Biologischer Säureabbau/ Milchsäuregärung (engl. Malolactic Fermentation)
CAS-Nr.	Chemical Abstracts Service-Registernummer
DA	Lineare Diskriminanzanalyse (engl. Linear Discriminant Analysis)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
deion.	deionisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	Elektronenstoßionisation
et al.	und andere (lat. et alia)
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
fl. Sre	Flüchtige Säure (v.a. Essig-, u.a. Ameisen-, Propion- u. Capronsäure)
Frc	Fructose
FT-MIR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometrie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-O	Gaschromatographie-Olfaktometrie
GG	Glycosyl-Glucose
Glc	Glucose
glyk.	glycosyliert bzw. glycosidisch gebunden
HKA	Hauptkomponentenanalyse
(HP) LC	Flüssigchromatographie (engl. (High Performance) Liquid Chromatography)
i.D.	Innendurchmesser
ISTD	Interner Standard
LSD	Geringste signifikante Differenz (engl. Least Significant Difference)
LV	großvolumig (engl. large volume), auf Injektionstechnik der GC-MS bezogen
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
OAV	Aromawert (engl. Odour Activity Value)
OIV	Internationale Organisation für Rebe und Wein
PLSR	Partial Least Squares Regression
pNPG	p-Nitrophenol- β -D-Glucopyranosid
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RT	Retentionszeit
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsassay
SPE	Festphasenextraktion (engl. Solid Phase Extraction)
Sre	Säure
TIC	Totalionenstrom (engl. Total Ion Current)

Probenbezeichnung und -interpretation

Probenbezeichnung

In den Probenbezeichnungen sind folgende Informationen enthalten:

Jahrgang	2012-2015
Rebsorte	
Chardonnay	Chdy
Gewürztraminer	GwTr
Muskateller	Musk
Riesling	Rslg
Traubenverarbeitung/ -klone	
Standzeit	StZt
Ganztraubenpressung	GTP
Normalklon	NK
(rekombinierter) Duftklon	DK
Säurehydrolyse(-Kontrolle)	Sre
Kontrolle (variiert)	Ktr
Hefe(stamm)	Alle verwendeten Hefen, Bezeichnungen und Erläuterungen s. Tab. 3-2. Bei Weinen ist jeweils der eingesetzte Hefe-Stamm in der Probenbezeichnung enthalten, bei Sekten bezeichnet der erste Stamm die Grundwein- und der zweite die Sektheife.
Enzym (abgekürzt mit E)	Enzympräparat AR 2000

Probeninterpretation

Die Ergebnisse für die Aroma-Glycoside aus der SPE/GC-MS-Analytik sind im Allgemeinen zu Gruppensummen zusammengefasst dargestellt. Im Fokus der Arbeit lagen die Einflussfaktoren auf den Reaktionsablauf der Hydrolyse von Aromastoffvorläufern, aus Gründen des Umfangs wurden die einzelnen Vorläufersubstanzen nur teilweise gezeigt. Die Aufschlüsselung der Einzelsubstanzen zu den Substanzgruppen findet sich in Tab. 3-14, als Abkürzung zur Bezeichnung der Aroma-Glycoside wird „glyk.“ vor der entsprechend Substanz- bzw. Substanzgruppe angegeben. Durch Berechnung der Differenz aus Ausgangs- und Endgehalt der Aroma-Glycoside, wie aus Most und daraus hergestelltem Wein, werden absolute Werte erhalten, die als freigesetzte Aromastoffe zu verstehen sind. Die entsprechenden Substanzen bzw. Substanzgruppen werden ohne Angabe eines Vorkürzels geführt.

Benennung der Enzymaktivität

Die enzymatische Aktivität zur Hydrolyse der Aroma-Glycoside wird in dieser Arbeit allgemein unspezifisch als Glycosidase-Aktivität bezeichnet, es sei denn Enzymaktivität konnte nachweislich auf ein spezifisches Enzym zurückgeführt werden.

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Das sortentypische Aroma von Wein und Sekt weißer Rebsorten wird maßgeblich durch eine Vielzahl Aromastoffe geprägt, welche hauptsächlich in glycosidisch gebundener und damit sensorisch nicht wahrnehmbarer Form vorliegen (Noble et al., 1987). Der Ausgangsgehalt dieses Aromareservoirs ist grundsätzlich durch die Rebsorte determiniert (Mateo und Jiménez, 2000) und kann durch diverse Faktoren im Verlauf der Traubenverarbeitung bis zum Most beeinflusst werden (Fischer et al., 2001; Papargyriou, 2003). Ausgehend von diesem Aromapotential kann die Spaltung der Aromastoffvorläufer säure- oder enzymkatalytisch erfolgen (Sarry und Günata, 2004) und damit die Freisetzung von geruchsaktiven Aromastoffen während der Wein- und Sektbereitung. Bedingt durch den geringen Most- und Wein-pH zwischen 2,8-3,4 findet die Säurehydrolyse fortlaufend statt, bei gleichzeitig stattfindenden Umlagerungsreaktionen der freien, durch höchst unterschiedliche Geruchsschwellenwerte gekennzeichnete Aromastoffe (Williams et al., 1982). Die enzymatische Hydrolyse ist abhängig von den an der Gärung beteiligten Mikroorganismen, kann grundsätzlich in der Most- und Weinumgebung durch den geringen pH, die niedrige Gärtemperatur sowie Ethanol- und Glucose-Konzentration nur limitiert stattfinden (Delcroix et al., 1994). Die aus Weintrauben stammenden Aroma-Glycoside können an das Monosaccharid Glucose gebunden als β -D-Glucopyranosid vorliegen, sowie gebunden an Disaccharide als β -D-Apiofuranosyl- β -D-Glucosid, α -L-Arabinofuranosyl- β -D-Glucosid oder α -L-Rhamnopyranosyl- β -D-Glucosid, deren zweistufige sequentielle Spaltung ein geeignetes Enzym sowie hohe Enzymaktivität voraussetzt (Sarry und Günata, 2004). Als typische Wein- und Sekthefen werden die gärstarken Arten *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* eingesetzt, von denen eine Vielzahl Sub-Arten bzw. Stämme verfügbar sind (Pretorius, 2000). Die Fähigkeit zur Spaltung von Aroma-Glycosiden innerhalb der Art *Saccharomyces* sowie die unterschiedliche Ausprägung zwischen den Sub-Arten werden in der Literatur bisher kontrovers diskutiert und es liegt keine abschließende Aussage vor. Für die Freisetzung von Aromastoffen durch *Saccharomyces*-Hefen in der Weinbereitung liegen widersprüchliche oenologische Studien vor, für die Sektbereitung liegen keine Daten vor. Zum einen ist eine vorhandene Glycosidase-Aktivität der Hefen mit signifikanten Unterschieden zwischen den Hefestämmen beschrieben (Delcroix et al., 1994; Chassagne et al., 2005a), während andere Studien keine Unterschiede zwischen den Stämmen feststellten (Zoecklein et al., 1997; Ugliano et al., 2006). Im Gegensatz dazu ist das Fehlen von Glycosidase-Aktivität aller untersuchten *Saccharomyces*-Stämme demonstriert worden (Ubeda Iranzo et al., 1998). Mikrobiologische Studien dagegen wiesen eindeutig nach, dass Hefen der Gattung *Saccharomyces* das Enzym 1,4- β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) nicht aufweisen, dagegen trat eine gering ausgeprägte unspezifische Glycosidase-Aktivität auf (Rosi et al., 1994; Spagna et al., 2002; Hernández et al., 2003; Fia et al., 2005; Daenen et al., 2008). Molekularbiologische Studien zeigten, dass im Genom der *Saccharomyces*-Hefen, bis auf eine bekannte Ausnahme des Stammes AL41 (Quatrini et al., 2008) kein Gen für das Enzym 1,4- β -Glucosidase vorhanden ist, dafür die Gene EXG1, SPR1 und YIR007W mit dem Auftreten von Glycosidase-Aktivität bei *Saccharomyces* in Zusammenhang stehen (Schmidt et al., 2011), von denen sich eine durch EXG1 exprimierte zellwandständige exo-1,3-Glucanase direkt für die Spaltung von Aroma-Glycosiden verantwortlich zeichnete (Gil et al., 2005; Schmidt et al., 2011). Daten bezüglich der Existenz und Aktivität von Disaccharidasen für *Saccharomyces*-Hefen liegen noch nicht vor. Im Gegensatz dazu ist für diverse *Nicht-saccharomyces* eindeutig β -Glucosidase-Aktivität beschrieben (Rosi et al.,

1994; Spagna et al., 2002; Fia et al., 2005; Daenen et al., 2008), damit einhergehend die erhöhte Freisetzung von Aroma-Glycosiden und veränderte Sensorik von Wein (Hernández-Orte et al., 2008). Diese Nachweise liegen für Milchsäurebakterien wie *Oenococcus oeni* (Palmeri und Spagna, 2007) sowie für den filamentösen Pilz *Aspergillus niger* und aus diesem gewonnene Enzympräparate (Günata et al., 1997) ebenfalls vor.

Die quantitative Analytik der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer ist gegenwärtig noch sehr aufwändig. Die prinzipiell mögliche Analyse der intakten Aroma-Glycoside wird bisher mangels Strukturkenntnissen und Standardsubstanzen zur Identifizierung nur selten für einige wenige Einzelsubstanzen und ausschließlich für Glucoside mittels HPLC-MS(-MS) durchgeführt (Hayasaka et al., 2010b; Stanitzek, 2014). Nach Spaltung der Glycoside kann über das Glycon indirekt die Summe aller glycosyliert vorliegenden Stoffe mittels dem sog. Glycosyl-Glucose- (GG-)Assay quantifiziert werden (Williams et al., 1995). Die differenzierte Analyse der einzelnen Aglycone erfolgt verbreitet mittels GC-MS(-MS) und erfordert intensive Probenvorbereitung (Robinson et al., 2014b). In der Literatur wurden vorläufige Ergebnisse einer vielversprechenden Schnellmethode mittels FT-MIR-Spektroskopie zur Quantifizierung von zu Substanzgruppen zusammengefassten Aroma-Glycosiden vorgestellt. Eine mittels GC-MS als Referenzanalytik etablierte Methode ergab für Trauben der Rebsorte Melon de Bourgogne gute bis akzeptable Vorhersage-Korrelationen (Schneider et al., 2004). Bisher ist diese Methode und das entsprechende Messgerät für Majorkomponenten als Routine-Messung in der Weinbereitung im Einsatz und damit bereits verbreitet in den Betrieben vorhanden (Patz et al., 2004; Fischer und Berger, 2006).

1.2 Zielsetzung

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war die bestmögliche Nutzung des Aromapotentials aus Trauben, Mosten und Grundweinen in der Wein- und Sektbereitung. Über vier Jahrgänge wurden anhand der verschiedenen aromatischen Rebsorten Chardonnay, Riesling, Muskateller und Gewürztraminer sowohl die Beeinflussung des Ausgangspotentials während der Traubenverarbeitung, als auch die gesteuerte Freisetzung dieser Aromastoffe aus ihrer geruchsinaktiven glycosidischen Bindung während der Gärung untersucht. Der Beitrag der zur Gärung eingesetzten *Saccharomyces*- und *Nicht-saccharomyces*-Hefen sowie Enzympräparate aus *Aspergillus niger* zur enzymatischen Freisetzung der Aromavorläufer ist bislang kontrovers diskutiert, wodurch es an Wissen zur deren gezielter Verwendung als Werkzeuge zur gesteuerten Freisetzung des Aromapotentials fehlt. Angestrebt war deshalb die Charakterisierung von Hefen und Enzympräparaten bezüglich ihrer Glycosidase-Aktivität. Neben experimentellen Modellgärungen erfolgten mikrobiologische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen.

Es mangelt weiterhin an einer verlässlichen und für Wein- und Sektkellereien praktiabilen Messmethode zur Quantifizierung des vorhandenen Ausgangsgehaltes von Aroma-Glycosiden, woraufhin eine Schnellmessmethode mittels FT-MIR-Spektroskopie unter Anwendung einer GC-MS Methode als Referenzanalytik etabliert werden sollte.

Es ergaben sich daraufhin folgende Versuche im Detail:

- Anwendung des Glycosyl-Glucose-Assay zur Bestimmung der Aroma-Glycoside im Summenparameter
- Etablieren einer SPE/GC-MS Methode für großvolumige Injektionen unter Anwendung des SIVA zur Quali- und Quantifizierung der Einzelaromastoffe

- Erstellen einer Kalibration zur Quantifizierung der Aroma-Glycoside mittels FT-MIR-Spektroskopie
- Untersuchung des Einfluss von verlängerter Maischestandzeit und ansteigendem Pressdruck während der Traubenverarbeitung auf die Extraktion der Aromastoffvorläufer als vorhandenes Aromapotential in den Most
- Experimentelle Weinbereitung mit verschiedenen Hefestämmen im Labormaßstab unter sterilen Bedingungen und mit unterschiedlichen Hefen und Enzym im Versuchsmaßstab unter Praxisbedingungen
- Experimentelle Sektherstellung in traditioneller Flaschengärung mit verschiedenen Hefestamm-Kombinationen und Enzym sowie Kontrolle der Säurehydrolyse unter Praxisbedingungen
- Untersuchung des Einfluss von Hefe und Enzym auf die Freisetzung der Aroma-Glycoside in den Weinen, Grundweinen und Sekten mittels GC-MS und die Ausprägung des Aromas mittels deskriptiver sensorische Analyse
- Charakterisierung der Enzytausstattung der Hefen nicht-quantitativ durch Plattentests mit Kohlenstoff-Mangelmedium und quantitativ mittels pNPG-Assay
- Vergleichende Untersuchung der relativen Genexpression der Gene EXG1, SPR1 und YIR007W von Hefen mittels qPCR

2 Literaturübersicht

2.1 Glycosidisch gebundene Aromastoffvorläufer

2.1.1 Bedeutung, Bildung, Vorkommen und Einflussfaktoren

Eine Vielzahl an sekundären Pflanzenstoffen, darunter Aromastoffe, kann neben der freien flüchtigen Form gebunden an Zuckerreste vorkommen. Der glycosidisch gebundene Aromastoff wird als Aromastoffvorläufer oder Aromaprecursor bezeichnet (Fischer et al., 2001). Die Mehrheit der Aromastoffe liegt als beträchtliches Aromapotential in der glycosylierten und damit geruchlosen Form vor (Noble et al., 1987) und weist ihnen nach ihrem Nachweis in Weintrauben (Cordonnier und Bayonove, 1974) eine bedeutende Stellung in der Weinbereitung zu. Die Glycosylierung ist durch die Art des Aromastoffes und weiteren beeinflussenden Faktoren wie die Rebsorte bedingt, in jedem ist Fall das Verhältnis von gebundenem zu freien Aromastoff größer als 1 (Dimitriadis und Williams, 1984). Bei einem Riesling und Muscat d`Alexandrie waren die gebundenen Aromastoffe insgesamt zu den frei vorliegenden um 3-5fach erhöht (Gunata et al., 1985b), in einer weiteren Studie für Muscat d`Alexandrie wurde ein Anteil von 90 % der als Aromastoffe dominierenden Monoterpene in gebundener Form nachgewiesen (Park et al., 1991).

Glycoside sind im Reich der Pflanzen weit verbreitet (Stahl-Biskup et al., 1993). Die Bildung durch Konjugation eines aktivierten Zuckermoleküls und eines Akzeptormoleküls wird durch Glycosyltransferasen katalysiert und dient vornehmlich chemischer Stabilisierung sowie Transport- und Entgiftungsmechanismen (Jones und Vogt, 2001; Gachon et al., 2005). Für *Vitis vinifera* sind unspezifische Glycosyltransferasen nachgewiesen worden, die diverse Substrate wie Monoterpene, Phenole und Anthocyanidine akzeptierten (Ford und HØJ, 1998). Charakterisierte Flavonol-Glycosyltransferasen wie VvGT5 und VvGT6 dagegen waren sowohl bezüglich des Zuckerrestes als auch der untersuchten Polyphenole, von denen das eingesetzte Quercetin zu 100%, Kaempferol zu 51,5% und Isorhamnetin zu 5,6% glycosyliert wurden, spezifisch (Ono et al., 2010). Die Glycosyltransferase VvGT7 wurde als verantwortlich für die Glycosylierung von Monoterpenen, darunter Nerol, Geraniol und Citronellol, gezeigt (Bönisch et al., 2014), momentan ist es Gegenstand der Forschung weitere potentielle UDP-Glucose:Monoterpenol- β -D-Glucosyltransferasen in *Vitis vinifera* funktionell zu charakterisieren (Stanitzek, 2014).

In der Rebpflanze sind die Glycoside der Aromastoffe in vielen Pflanzenteilen nachweisbar, darunter in Blättern, Stielen und Traubenbeeren (Winterhalter und Skouroumounis, 1997). Der Syntheseort dieser Glycoside in der Rebe ist bisher umstritten. Nach Aufpfropfen der terpenreichen Rebsorte Muscat d`Alexandrie auf die terpenarme Rebsorte Syrah bzw. umgekehrt konnte kein Austausch von glycosylierten Terpenen festgestellt werden (Gholami et al., 1995). In einer weiteren Studie mit der Rebsorte Cabernet Sauvignon wurde stabilisotopenmarkiertes Guaiacol-Glucosid in die Traubenbeeren injiziert und Blattgewebe untersucht bzw. im umgekehrten Fall in die Blätter injiziert und in den Traubenbeeren dieses versucht nachzuweisen, jedoch wurde das markierte Glucosid in beiden Fällen nicht gefunden (Hayasaka et al., 2010a). Diesen Ergebnissen folgend sollte der Syntheseort der Glycoside die Beere bzw. die Blätter selbst und damit unabhängig voneinander sein (Gholami et al., 1996). Andererseits wurden das Glucosid der Abscisinsäure in den Apoplasten der Gerste, was einen interzellularen Transportweg darstellt, nachgewiesen (Dietz et al., 2000).

Die Untersuchung glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer in reifen Traubenbeeren zeigt die Lokalisierung großer Teile des Gesamtgehaltes in der Beerenhaut, in den Muskat-Rebsorten Muscat d'Alexandrie und Muscat d'Frontignan (Gunata et al., 1985a) und ebenso in den Rebsorten Monastrell, Cabernet Sauvignon und Tempranillo (Gomez et al., 1994). Dagegen wurde in der Arbeit von Wilson et al. (1986) anhand der Rebsorten Muscat d'Alexandrie, Muscat blanc und Traminer eine gleichmäßigere Verteilung der Glycoside über die Beere gemessen, ebenso von Fischer et al. (2001) anhand Riesling und Gewürztraminer, die die Beerengröße verantwortlich für die Verschiebung des Verhältnis in Richtung Beerenfleisch ausmachten.

Diverse Faktoren bestimmen die Zusammensetzung der Aroma-Glycoside in den Traubenbeeren, welche als Ausgangspunkt des vorhandenen Aromapotentials stehen. Die Klassifizierung der Rebsorten basierend auf dem Vorkommen freier Aromastoffe kann auf die glycosidisch gebundenen Aromastoffe übertragen werden, auch anhand der Vorläufer konnten die Rebsorten unterschieden werden (Gunata et al., 1985b; Mateo und Jiménez, 2000). Inwieweit das Aromapotential ausgebildet wird, kann während der Traubenreife von Umwelteinflüssen wie Sonneneinstrahlung und Temperatur (Marais, 1992; Marais et al., 1999), mikrobiellem Befall wie beispielsweise durch *Botrytis cinera* (Gunata et al., 1989) sowie durch kultivierendes Einwirken mittels weinbaulichen Maßnahmen wie Entblätterung, Beschattung oder Reberziehung beeinflusst werden (Hernandez-Orte et al., 2015).

Die Extraktion des Aromapotentials in Form der Glycoside aus der Traubenbeere in den Most wird maßgeblich durch kellerwirtschaftliche Maßnahmen gesteuert. Dazu gehört die Verarbeitung der Trauben, welche Lese, Transport, Annahme, Maischebehandlung und Pressung umfasst. Dadurch können die Trauben verschieden stark beschädigt werden und den hergestellten Most optional und bei unterschiedlicher Dauer mit Traubenbestandteilen in Kontakt bringen. Eine umfangreiche und detaillierte Beschreibung aller Verfahren findet sich in der Publikation von Christmann (2001). Die Auswirkungen auf die Aroma-Glycoside sind bisher in vergleichsweise wenigen Studien untersucht worden. Das Durchführen einer Maischestandzeit bei Muskat-Trauben von 15 bzw. 23 Stunden erhöhte die Gehalte glycosidisch gebundener Monoterpene, aromatischer Alkohole und C₁₃-Norisoprenoide im Vergleich zur Kontrolle ohne Standzeit. Die sensorische Wahrnehmung von Frische, Fruchtigkeit und Körper war ebenfalls erhöht (Palomo et al., 2006). Für die Rebsorten Riesling, Müller-Thurgau, Gewürztraminer und Muskateller wurde, mittels Quantifizierung über Glycosyl-Glucose, ein Anstieg der Gesamt-Glycoside bei ansteigender Maischestandzeit bestimmt, in der sensorischen Analyse der Weine ermittelten die Autoren eine Zunahme in der Wahrnehmung vornehmlich der fruchtigen und blumigen Aromen (Fischer et al., 2001; Papargyriou, 2003). Allerdings ist die Verlängerung der Maischestandzeit limitiert, da sie zusätzlich mit dem Eintrag von weiteren Inhaltsstoffen in den Most verbunden ist. Polyphenole tragen potentiell zu Bitterkeit und Adstringenz bei und sind in reifen weißen Trauben hauptsächlich, neben dem Stielgerüst, in Kernen und Beerenhäuten lokalisiert (Singleton und Esau, 1969). Der Gehalt in weißen Traubensäften und Weinen ist zwar abhängig von Rebsorte und Traubenverarbeitung (Ritter, 1997; Nikfardjam, 2011), aber eher bezüglich Trübung und Nachbräunung relevant, da die Gehalte allgemein sehr gering sind, beispielsweise im Vergleich zu um 10 bis 20fach erhöhtem Gehalt bei Rotwein (Goldberg et al., 1999). Die Studien von Fischer et al. (2001) und Papargyriou (2003) konnten keine gesteigerte Bitterkeit in den Weinen nach Maischestandzeit zeigen, eine weitere sensorische Studie zur Untersuchung der Bitterkeit wies ebenfalls keine gesteigerte Wahrnehmung in nach Maischestandzeit hergestellten

Weinen der Rebsorten Riesling und Gewürztraminer nach (Sokolowsky, 2014; Sokolowsky et al., 2015). Auch Test et al. (1986) konnten keine gesteigerte Wahrnehmung der Bitterkeit oder Adstringenz trotz erhöhtem Eintrag von phenolischen Substanzen in Chardonnay-Weinen nach Maischestandzeit feststellen, ebenfalls keinen Einfluss stellten Arnold und Noble (1979) fest. Zudem erhöht werden kann die Extraktion flüchtiger Phenole wie von Phenol und 4-Vinylguaiacol, die negative Aromen ausbilden können (Marais und Rapp, 1988). Weiterhin zu beachten ist der verstärkte Übergang von Kalium aus den Beerenhäuten in den Most. Dieses bindet Weinsäure zu Kaliumhydrogentartrat, das als Weinstein in Form von Kristallen ausfällt. Durch die Abnahme der Weinsäure reduziert sich die Gesamtsäure mit Erhöhung des pH-Wertes (Test et al., 1986; Cheynier et al., 1989), was sensorisch nachteilig sein kann und während der Gärung das Risiko eines spontanen biologischen Säureabbaus durch Mikroorganismen birgt (Schneider, 2008). In einem ähnlichen Zusammenhang unter Abwägen der Vor- und Nachteile ist die Pressung der Trauben zu betrachten. Durch Erhöhung des Pressdruckes gelangen in den Beerenteilen lokalisierte Bestandteile stärker in den Most, vor allem phenolische Substanzen (Seckler et al., 2001), während Gesamtsäure, pH-Wert und Ethanol-Gehalt im fertigen Wein nicht beeinflusst werden (Reynolds et al., 1993). Wiederum unzureichend untersucht ist die Auswirkung auf die Aroma-Glycoside. In einer Studie von Reynolds et al. (1993) konnte für die Rebsorten Gewürztraminer und Muskat Ottonel eine Zunahme der gebundenen Monoterpene bei Pressung im Vergleich zum Ablauf festgestellt werden, nicht aber für Müller-Thurgau und Kerner. Dagegen ergab die sensorische Beurteilung Einfluss des Pressdruckes auf die Weine der Rebsorten Müller-Thurgau und Muskat Ottonel. In einer weiteren Untersuchung wurde mittels Glycosyl-Glucose-Messung ebenfalls ein Anstieg der Aroma-Glycoside insgesamt bei ansteigendem Pressdruck ab 1,5 bar verzeichnet, bei zusätzlicher vorheriger Maischestandzeit konnte die Extraktion maximiert werden (Papargyriou, 2003).

2.1.2 Aromastoffe

Eine Vielzahl lipophiler, niedermolekularer Substanzen ist als flüchtige Aromastoffe für die Ausbildung des Weinaromas verantwortlich. Der bereits als „Duftgestalt“ bezeichnete olfaktorische Gesamteindruck eines „Geruchsobjektes“ entsteht durch das komplexe Zusammenwirken der Aromastoffe (Gottfried, 2010). Die Abgrenzung von Weißwein gegenüber anderen Lebensmitteln erfolgte bereits über 22-27 aromabildende Stoffe, zu denen Fermentationsprodukte wie Essigsäure und Methionol gehörten sowie einige hoch spezifische Substanzen wie cis-Rosenoxid in der Rebsorte Gewürztraminer (Dunkel et al., 2014). Insgesamt sind mehrere hundert Aromastoffe in Weißwein identifiziert worden (Maarse und Visscher, 1994). Einige wenige davon rufen als Schlüssel bzw. „Impact“-Aromastoffe das charakteristische Aroma eines bestimmten Weines hervor. Der Beitrag eines Aromastoffes zum Gesamtaroma ist wesentlich von Konzentration und Geruchsschwellenwert abhängig. Die Geruchsschwelle beschreibt die Konzentration einer Substanz, die zur Erkennung ihres Geruches in der entsprechenden Matrix noch ausreichend ist (Würdig und Woller, 1989). Aus dem Quotient der vorliegenden Konzentration eines Aromastoffes und des individuellen Geruchsschwellenwert wird der Aromawert (engl. odour active value, OAV) ermittelt, wodurch der Beitrag eines Aromastoffes am Gesamtaroma in der vorliegenden Matrix bestimmt werden kann (Grosch, 2001). Allerdings werden bei der isolierten Betrachtung von Einzelsubstanzen Interaktionen mit anderen Substanzen und der Matrix nicht einbezogen. Für das C₁₃-Norisoprenoid β -Damascenon wurde gezeigt, dass es auch unterhalb seines Geruchsschwellenwertes als Verstärker für fruchtige Aromen wirkt (Barbe et al., 2008), allerdings wird der Beitrag der ubiquitär in Trauben und Weinen aller Rebsorten vorkommenden Substanz weiter kontrovers

diskutiert (Sefton et al., 2011). Die Bedeutung des Zusammenwirkens von Einzelsubstanzen demonstrierten Masanetz et al. an einem extremen Beispiel, indem sie zeigten dass die durch den Geruch nach Geranien charakterisierte Substanz (*Z*)-1,5-Octadien-3-on sowie Methanal mit einem Geruch nach Kartoffeln bei einem Verhältnis von 1:100 einen fischartigen Geruch verursachen (Masanetz et al., 1998). (Ferreira et al., 2002) rekonstruierten das Aromaprofil eines Grenache Roséweines in einem Modellwein aus den 24 Substanzen, die anhand Aromaverdünnungsanalyse (engl. aroma extract dilution analysis, AEDA) und OAV-Wert $> 0,5$ als Impact-Aromen für das Gesamtroma ermittelt worden waren und resultierten in einem vergleichbaren Wein. Als Schlüssel-Substanz wurde durch Weglass-Versuche 3-Mercapto-1-Hexanol, verantwortlich für die Attribute fruchtig und Zitrus, bestimmt. Das Fehlen von β -Damascenon hatte in dieser Studie kaum Auswirkungen, dagegen wurden synergische Effekte für Furaneol und Homofuraneol nachgewiesen. Die Zugabe von weiteren Substanzen zum Modellwein mit OAV-Werten $< 0,5$ führten zu keiner Verbesserung des Modells. In einer Studie mit den Rebsorten Gewürztraminer und Scheurebe wurden aus 43 Aromastoffen, welche zuvor mittels GC-O als aromaaktiv ermittelt worden waren, die Substanzen cis-Rosenoxid für Gewürztraminer und 4-Mercapto-4-Methylpentan-2-one für Scheurebe über die OAV-Werte der höchste Aroma-impact ermittelt. In einem anschließenden Rekonstruktionsversuch der Weine aus den einzelnen Aromastoffen führte das Fehlen der Substanz 4-Mercapto-4-Methylpentan-2-one in Scheurebe bereits zum vollständigen Verlust der Typizität, während bei Gewürztraminer durch Fehlen von cis-Rosenoxid zwar zur Verringerung der typischen Aromaeindrucks führte. Der Effekt war zusätzlich aber für weitere Substanzen wie Weinlacton und einige Ester feststellbar (Guth, 1997a; Guth, 1997b). Rekonstruktionsversuche von Rotwein, welche vordergründig die Nachbildung des Gesamteindrucks zum Ziel hatten, konnten den signifikanten Beitrag von Einzelsubstanzen auch unter deren Schwellenwert nachweisen, wie beispielsweise von 1,2-Propandiol und myo-Inositol, die signifikant zu Körper und Mundgefühl des Weines beitrugen (Hufnagel und Hofmann, 2008). Insgesamt ist eine hohe Komplexität des Weinaromas durch die Interaktion der vorhandenen Aromastoffe und deren Wahrnehmung gegeben. Dieser kann durch die kombinierte Auswertung aus den chemischen und sensorischen Analysen der Weine mittels multivariater Statistik Rechnung getragen werden. Durch beispielsweise PLS-Regressionsanalysen können über mathematische Modelle die Schlüsselaromastoffe identifiziert werden (Noble und Ebeler, 2002).

Die Weinaromastoffe werden aufgrund ihres Ursprungs unterschieden. Sie können als primäre Aromastoffe direkt der Traube entstammen, zudem entstehen sie auch während Traubenverarbeitung und Weinbereitung. Dazu zählen Umlagerungsreaktionen und Bildung durch enzymatische Vorgänge und chemische Prozesse wie beispielsweise durch Säure und Oxidation, desweiteren Metaboliten aus dem mikrobiologischen Stoffwechsel der alkoholischen und malolaktischen Gärung sowie Aromen aus der Lagerung, Reifung oder auch dem Holz (Robinson et al., 2014a).

Als Glycoside, d.h. in Form von gebundenen Vorläufer-Substanzen, die im Verlauf der Weinbereitung bei hydrolytischer Spaltung zum Sekundärbukett beitragen, wurden eine Vielzahl Substanzen zugehörig den Alkoholen, Terpenen, C_{13} -Norisoprenoiden, Shikimatweg-Metaboliten und Säuren identifiziert (Winterhalter und Skouroumounis, 1997). Die Einteilung in die Substanzklassen der Monoterpene, C_{13} -Norisoprenoide, C_6 -Alkohole syn. aliphatische Alkohole, Benzolderivate syn. aromatischen Alkohole und flüchtigen Phenole in der vorliegenden Arbeit erfolgte in Anlehnung an Schneider et al. und

berücksichtigte neben strukturemischer Verwandtschaft auch die sensorischen Eigenschaften der Substanzen und ihre Relevanz in Weißwein (Schneider et al., 2004).

2.1.2.1 Monoterpene

Die Gruppe der Monoterpene umfasst eine Vielzahl aromaaktiver Substanzen, die vor allem für den sensorischen Eindruck von floral, süß und würzig verantwortlich ist (Mateo und Jiménez, 2000). Sie sind insbesondere charakteristisch für die Muskat-Rebsorten. Bereits Rapp und Hastrich (1976) und Weitere (Schreier et al., 1976a; Schreier et al., 1976b) unterschieden sehr früh Rebsorten mittels gaschromatographischer Analyse und multivariaten statistischen Verfahren in mehr oder weniger aromabetonte Varietäten. Rapp et al. (1993) klassifizierte sie später anhand des Monoterpenmusters in Muskat-, Riesling- und den neutralen Silvaner- oder Weißburgunder-Typ, aber auch innerhalb dieser Gruppen konnten die Rebsorten anhand ausgewählter Monoterpene sowie zusätzlich einiger C₆-Alkohole unterschieden werden. Nach Strauss et al. (1986) liegen in Muskat-Rebsorten > 6 mg/L, in nicht-Muskatrebsorten wie Riesling, Scheurebe, Gewürztraminer oder Kerner 1-4 mg/L sowie in neutralen Rebsorten wie Chardonnay, Ugni blanc oder Grauburgunder < 1mg/L an Monoterpenen vor.

Die Monoterpene bestehen im Grundgerüst aus zwei Isopren-Einheiten, deren Synthese im Cytosol über den Mevalonat (MVA)-Weg oder in Plastiden über den 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP)-Weg erfolgen kann. Im MVA-Weg entstehen ausgehend von drei Molekülen Acetyl-Coenzym A über mehrere Zwischenprodukte Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), aus denen durch Geranylpyrophosphat (GPP)- Synthase GPP und nach Umlagerung Linalylpyrophosphat (LPP) als Monoterpen-Vorstufe entsteht. Im DOXP-Weg stellen D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat die Ausgangsmoleküle dar, aus welchen über DOXP zunächst IPP und DMAPP und aus diesen final GPP und LPP gebildet wird. Der Aufbau der Monoterpene erfolgt nach heutigem Kenntnisstand über den DOXP-Weg in den Plastiden autonom in der Traubenbeere (Wüst, 2003). Ausgehend vom GPP und LPP erfolgt die Bildung der Monoterpen-Alkohole, -Polyole, -Ether und -Lactone über verschiedene Mechanismen. In einer Studie wurde die Korrelation der Bildung von Linalool und der Expression einer Linalool-Synthase während der Beerenreife nachgewiesen (Wüst, 2003). Mittlerweile sind für *Vitis vinifera* 39 Terpen-Synthasen identifiziert und charakterisiert worden, darunter zur Synthese von Linalool, Geraniol und α -Terpineol (Martin et al., 2010). Durch die Reaktivität der Moleküle aufgrund der Hydroxygruppen treten weitere, insbesondere säurekatalysierte Reaktionen auf. Neben Isomerisierung der Monoterpenalkole untereinander finden weitere Umwandlungen wie Oxidation und Glycosylierung statt (Ilc et al., 2016). Wie in der folgenden Abb. 2-1 gezeigt kann Geraniol zu Nerol isomerisieren, desweiteren zu Citronellol enzymatisch reduziert werden, welches anschließend säurekatalytisch zu cis-Rosenoxid zyklisiert. Durch die Lagerung und Reifung von Wein, begünstigt durch den niedrigen Wein-pH sowie auch enzymatisch katalysiert, können die Linalooloxide entstehen. Desweiteren entsteht aus Linalool über Glucoseester das Weinlacton (Wüst, 2003).

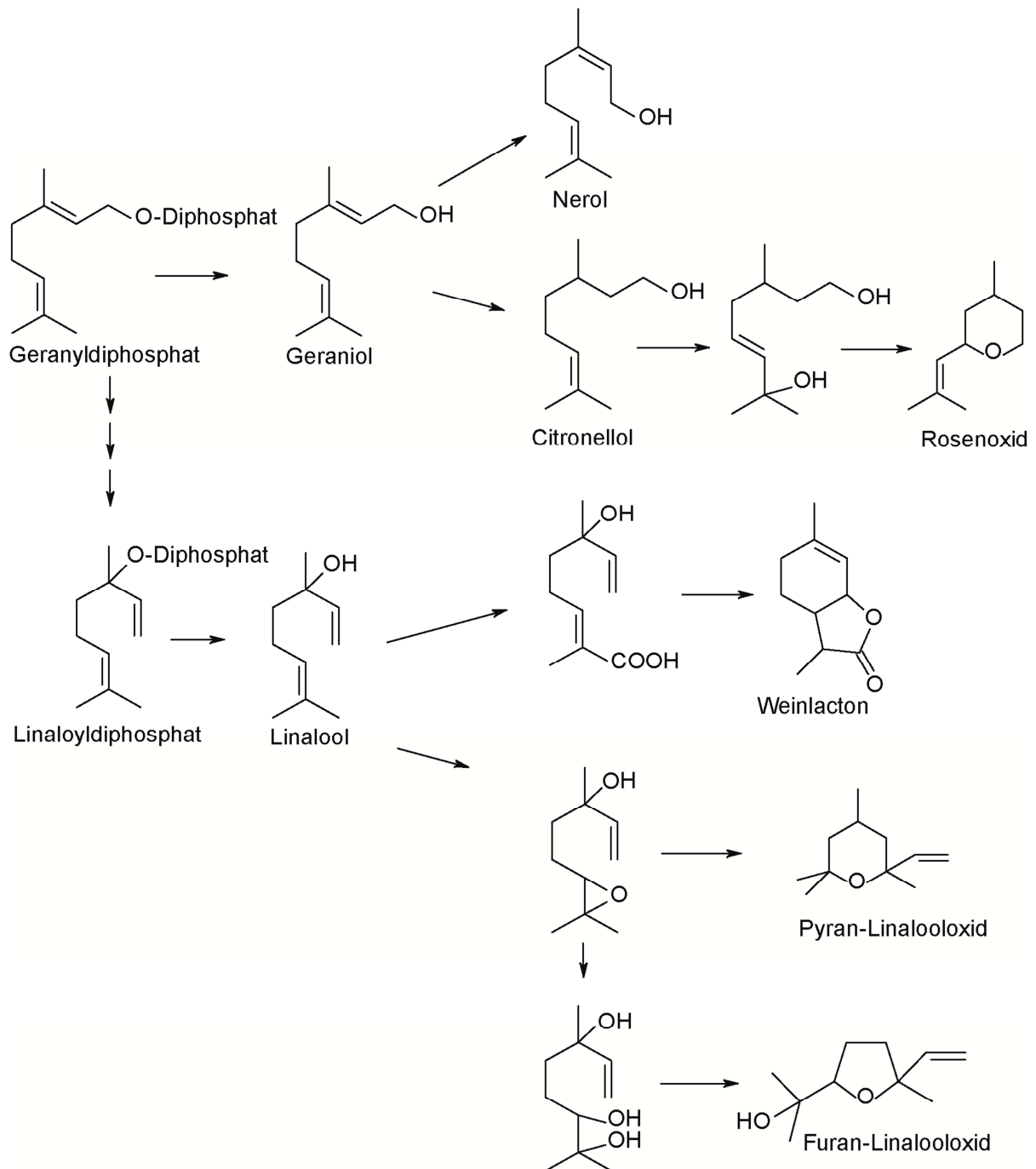


Abb. 2-1: Mögliche Reaktionsmechanismen der Monoterpene. Die Reaktivität der aus GPP bzw. LPP gebildeten Monoterpenole führt zu Isomerisierung und Biosynthese aromaaktiver Verbindungen, GPP Geranyldiphosphat, LPP Linalyldiphosphat, nach Wüst (2003) und Ilc et al. (2016).

Als bedeutsam für die Weinbereitung, wo aufgrund des geringen pH-Wertes die Voraussetzungen für eine hohe Reaktivität der Monoterpene gegeben ist, stellt sich neben den unterschiedlichen durch die Substanzen hervorgerufenen Aromaeindrücken vor allem der Geruchsschwellenwert dar. Durch den Aromawert der Substanzen ergibt sich deren unterschiedlicher Impact zum Weinroma. Die Monoterpenalkohole weisen im Wein vergleichsweise geringe Geruchsschwellenwerte auf. Beispielsweise liegt der Wert für das nach Maiglöckchen riechende Linalool sowie für das kräftige, den Geruch von Zitrus hervorrufende Citronellol bei 15 µg/L, das blumig-süß riechende Nerol bei 110 µg/L und für α-Terpineol wurde der Wert von 400 µg/L ermittelt. Die Enantiomere Geraniol syn. (*E*)-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol und Nerol syn. (*Z*)-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol

unterscheiden sich stark in Schwellenwert sowie Geruchseindruck. Geraniol verursacht einen süßlichen Duft nach Rosen bei einer Geruchsschwelle von 30 µg/L, während Nerol einen Geruch nach Rose, Pflaume und Zitrus bei einer Geruchsschwelle von 400 µg/L verursacht (Wüst, 2003). Die Polyole besitzen allgemein höhere Geruchsschwellenwerte die ihre Aromaaktivität herabsetzen, wie beispielsweise der für die Linalooloxide zwischen 3000-5000 µg/L (Rapp und Mandery, 1986). Äußerst geringe Werte charakterisieren den Monoterpen-Ether cis-Rosenoxid bei 0,2 µg/L sowie Weinlacton bei 0,01 µg/L (Wüst, 2003).

2.1.2.2 C₁₃-Norisoprenoide

C₁₃-Norisoprenoide entstammen, über den Weg des Carotinoid-Abbaus, wie die Monoterpene dem DOXP-Weg in den Plastiden und bestehen im Grundgerüst damit ebenfalls aus Isopren-Einheiten. Der Aufbau der C₄₀-Körper der Carotinoide in der Traubenbeere erfolgt bis zur *véraison*. Ab diesem Zeitpunkt bis hin zur Reife werden Carotinoide proportional zum Abbau des Chlorophylls neben C₉-, C₁₀- und C₁₁-Körpern vor allem zu C₁₃-Norisoprenoiden abgebaut (Baumes et al., 2002). In Weinbeeren ist das Vorkommen mehrerer Carotinoide beschrieben: β-Carotin sowie die Xanthophylle Lutein, Zeaxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin. Deren Abbau zu C₁₃-Norisoprenoiden durch Carotinoid-Dioxygenasen (engl. carotenoid cleavage dioxygenase, CCD) zwischen C₉ und C₁₀ kann ungerichtet auftreten, allerdings wurden auch spezifische Dioxygenasen wie VvCCD1 zur Spaltung von Zeaxanthin zu 3-Hydroxy-β-Ionon nachgewiesen (Mathieu et al., 2005). Die entstehenden Verbindungen der Megastigman-Struktur sind als intermediäre Vorläufer in glycosylierter oder freier Form anschließend weiteren, säurekatalytischen Umwandlungen ausgesetzt und führen zur Biosynthese von aromaaktiven Substanzen.

Am Beispiel von Neoxanthin (s. Abb. 2-2), welches enzymatisch zunächst zum Grashüpfer-Keton abgebaut wird, entsteht säurekatalysiert über ein Triol erst 3-Hydroxy-β-Damascon in glycosylierter und freier Form und anschließend die aromaktive Substanz β-Damasconen (Mendes-Pinto, 2009).

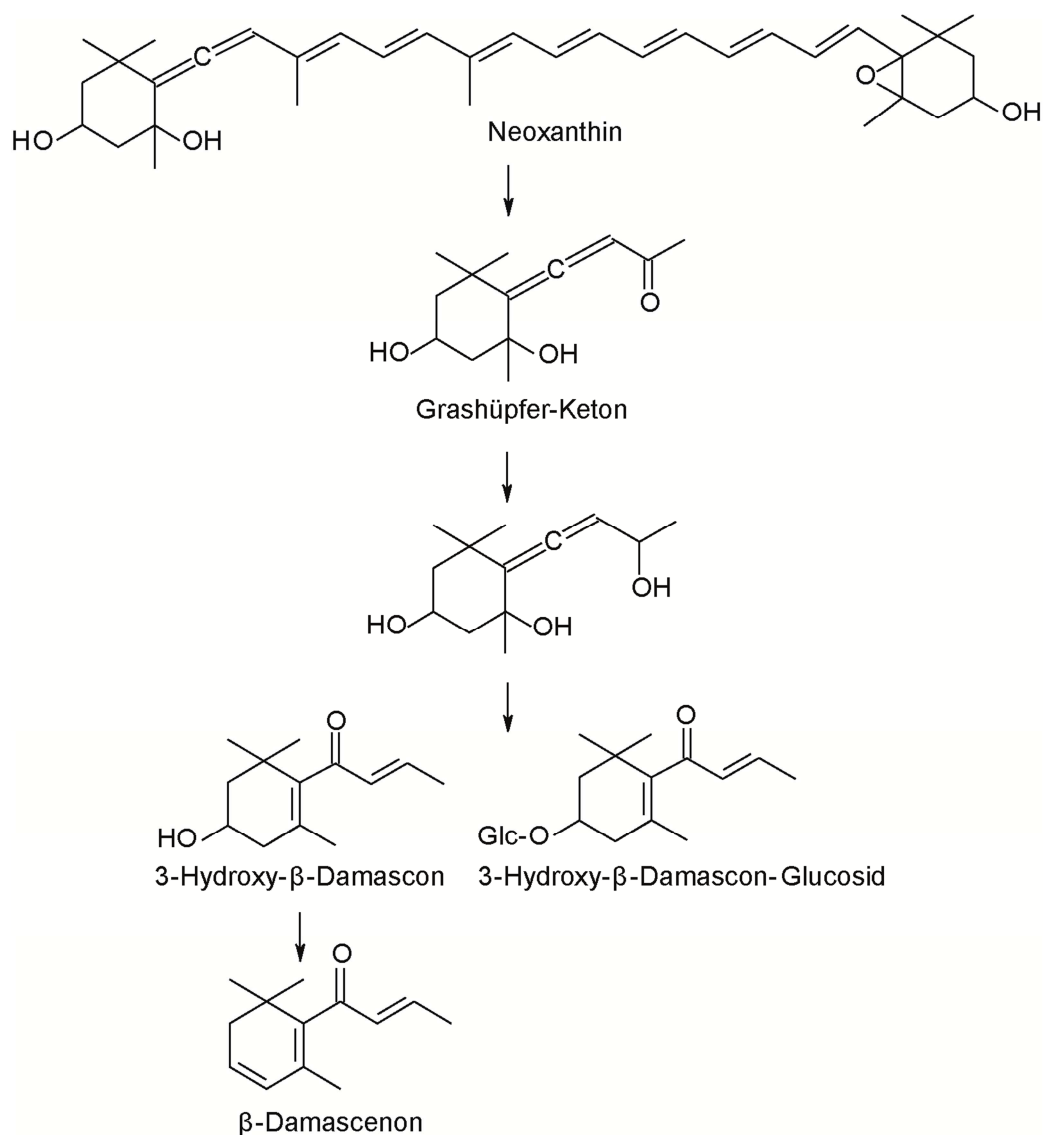


Abb. 2-2: Carotinoid-Abbau über Intermediäre bis zum aromaaktiven C_{13} -Norisoprenoid am Beispiel von Neoxanthin zu β -Damascenon, nach Baumes et al. (2002) und (Mendes-Pinto, 2009).

In Versuchen an Zellkulturen der Rebsorte Gamay wurde die Beteiligung von Hydrolasen, Oxidoreduktasen und Glycosyltransferasen an den Umwandlungs-Mechanismen der C_{13} -Norisoprenoide nachgewiesen, die Substanz β -Ionon transformierte zu 14 nachfolgenden C_{13} -Norisoprenoiden wie 3-Oxo- α -Ionol, 3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol und 3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -ionon in freier und glycosylierter Form, die Transformation der Substanz Dehydrovomifoliol ergab oxidierten und reduzierte Derivate (Mathieu et al., 2009).

Das Vorkommen der C_{13} -Norisoprenoide ist als rebsortenabhängig beschrieben und vor allem in nicht-aromatischen Rebsorten wie Riesling und Chardonnay relevant (Winterhalter et al., 1990; Razungles et al., 1993). Auf das Vorkommen der Carotinoide und darausfolgend der C_{13} -Norisoprenoide besteht vor allem Einfluss durch das Klima, aufgrund der photoprotektiven Wirkung insbesondere durch die Sonneneinstrahlung (Demmig-Adams und Adams, 1996). Carotinoide akkumulieren entsprechend ihrer physiologischen Funktion in der Beerenhaut (Guedes de Pinho et al., 2001). Es wurde am Beispiel von Muskat- und Syrah-Trauben nachgewiesen, dass durch erhöhte Sonneneinstrahlung im Vergleich zu beschatteten Trauben höhere Carotinoid-Gehalte auftreten und ihr anschließender Abbau forciert wird, weswegen im Gegenzug umgekehrt proportional der Gehalt an

C_{13} -Norisoprenoiden zunimmt (Bureau et al., 2000; Baumes et al., 2002). Im Detail wurde beispielsweise eine Zunahme des die Petrolnote in Riesling-Wein verursachenden 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphtalin (TDN) in Korrelation mit warmem Klima und erhöhter Sonneneinstrahlung beschrieben, was sich sensorisch vermehrt als problematisch für die Weine darstellt. Die Substanz wird durch säuraktalytische Umlagerung während der Lagerung gebildet und stellt einen Indikator für die Weinreifung dar. Mit Erhöhung der durchschnittlichen Temperatur und Sonneneinstrahlung allerdings erfolgt die Bildung von TDN in zunehmend hohen Konzentrationen, was bei einem Geruchsschwellenwert der Substanz von 2 $\mu\text{g/L}$ (Sacks et al., 2012) kritisch ist (Gerdes et al., 2001; Winterhalter und Gök, 2013).

Allgemein verursachen C_{13} -Norisoprenoide neben dem eben genannten TDN ein süß-fruchtiges Aroma, weitere Impact-Substanzen sind β -Damascenon mit einer Geruchsschwelle im Wein bei 50 $\mu\text{g/L}$, β -Ionon bei 800 $\mu\text{g/L}$ sowie das Kampfer riechende Vitispiran bei ebenfalls 800 $\mu\text{g/L}$ (Wüst, 2003), desweiteren wurde das den Geruch nach Geranien bis Tabak verursachende (*E*)-1-(2,3,6-trimethylphenyl)buta-1,3-dien (TBP) bei einer Geruchsschwelle von 40 ng/L in neutralem Weißwein nachgewiesen (Janusz et al., 2003).

2.1.2.3 C_6 -Alkohole (syn. aliphatische Alkohole)

Für das Weinaroma im Kontext der vorliegenden Arbeit relevant sind aliphatische Alkohole mit C_6 -Körpern, diese werden in der vorliegenden Arbeit weiterführend als C_6 -Alkohole bezeichnet. Sie stammen aus über den Lipoxygenase-Weg abgebauten Membranlipiden, insbesondere nach mechanischer Verletzung. Die Fettsäuren Linol- und Linolensäure werden enzymatisch katalysiert über ihr Hydroperoxid zum Aldehyd gespalten, welches final über Alkoholdehydrogenasen zum Alkohol reduziert wird. Beschrieben wurde der Abbau Linolensäure über (*Z*)-3-Hexanal zu (*Z*)-3-Hexenol bzw. über (*E*)-2-Hexenal und (*E*)-2-Hexenol zu *n*-Hexanol, desweiteren ausgehend von Linolsäure über *n*-Hexanal zu *n*-Hexanol (Joslin und Ough, 1978), während die Biosynthese von (*E*)-3-Hexen-1-ol in Wein bisher unklar ist (Oliveira et al., 2006). Einflussfaktoren auf den Ausgangsgehalt der Fettsäuren waren Rebsorte, Reifegrad der Trauben und Klima. Die Enzymaktivität war ebenfalls abhängig von der Rebsorte und dem Reifegrad sowie von der Temperatur, dem pH, der Traubenverarbeitung, der Hefe und dem Inhibitor SO_2 (Joslin und Ough, 1978). Aus C_6 -Alkoholen können desweiteren aromaktive Ester gebildet werden, beispielsweise wurden Hexylacetat und 3-Hexenylacetat beschrieben (Sánchez und Harwood, 2002).

C_6 -Alkohole rufen allgemein den Aromaeindruck von grün, grasig bis harzig hervor. Als Geruchsschwellenwerte in 10 % ethanolisch/wässriger Lösung ist für (*Z*)-3-Hexen-1-ol, charakterisiert durch einen grün-grasigen Geruch, bei 400 $\mu\text{g/L}$ ermittelt worden, für das harzig-blumig-grüne *n*-Hexanol bei 8000 μg (Guth, 1997a; Francis und Newton, 2005).

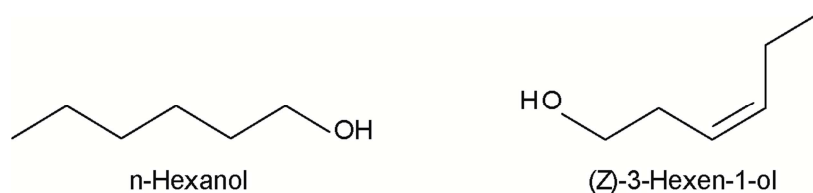


Abb. 2-3: Strukturen der C_6 -Alkohole *n*-Hexanol und (*Z*)-3-Hexen-1-ol.

Rapp et al. (1993) diskriminierten Weine der nicht-Muskat-Sorten Riesling, Scheurebe, Kerner und Müller-Thurgau anhand des quantitativen Verhältnis von (*Z*)-3-Hexen-1-ol und

(*E*)-3-Hexen-1-ol. Oliveira et al. (2006) unterschieden anhand dieser Substanzen Weine der *Vinhos Verde* Region nach Rebsorte und Region. In Weinen der amerikanischen *Vitis*-Arten *V. cinerea* mit 3990 µg/L sowie der Art *V. riparia* mit 205 µg/L sind im Vergleich zu der europäischen Rebe *V. vinifera* bei 40-240 µg/L signifikant höhere Gehalte an (*Z*)-3-Hexen-1-ol nachgewiesen worden (Sun et al., 2011). Einflüsse auf C₆-Alkohole sind vor allem mit Traubenverarbeitung und Weinherstellung assoziiert, wie Art der Traubenmazeration oder Enzymeinsatz (Oliveira et al., 2006). Durch verlängerte Maischstandzeit erhöhte sich der extrahierte Gehalt von n-Hexanol, (*E*)-3-Hexen-1-ol und (*Z*)-3-Hexen-1-ol in Emir-Weinen höchst signifikant (Cabaroglu et al., 1997).

2.1.2.4 Aromatische Alkohole (syn. Benzolderivate)

Benzolderivate, in der vorliegenden Arbeit synonym als aromatische Alkohole geführt, bezeichnet durch eine Phenylgruppe charakterisierte Benzenoid- und Phenylpropanoid-Verbindungen und Derivate. Die genaue Biosynthese der finalen Strukturen ist bisher nicht abschließend geklärt, insbesondere von Substanzen die sich von der gut untersuchten Phenylpropanoid-Struktur mit einem C₆-C₃ Gerüst unterscheiden (Vogt, 2010). Die Biosynthese in der Pflanze beginnt über den Shikimisäureweg, der vermutlich vollständig in den Plastiden abläuft und die Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin als Ausgangssubstanzen liefert (Schmid und Amrhein, 1995). Der Ursprung der Phenylpropanoide und ihrer Derivate ist das Phenylalanin, das enzymatisch über die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) zur *trans*-Zimtsäure als Ausgangspunkt zur Bildung der Phenylpropanoide desaminiert wird (Ritter und Schulz, 2004).

Der Abbau der Kohlenstoff-Seitenkette zur Bildung der flüchtigen Benzenoid- und Phenylpropanoid-Derivate kann entweder nicht-oxidativ über Benzaldehyd und Benzoesäure zu Benzoyl-Coenzym A (BenzoylCoA) oder über β-Oxidation zu BenzylCoA und Benzoesäure stattfinden (Boatright et al., 2004). Es sind bisher einige Transferasen identifiziert und charakterisiert worden, beispielsweise wurden in der Modellpflanze *Petunia hybrida* Benzylalkohol und 2-Phenylethanol als Intermediate zwischen BenzylCoA und Benzoesäurebenzylester über das Enzym BenzoylCoA: Phenylethanol/ Benzylalkohol-Benzoyltransferase (BPBT) nachgewiesen (Orlova et al., 2006).

Während der Gärung werden durch *Saccharomyces cerevisiae*-Hefen im Ehrlich-Weg bei Verstoffwechslung von Aminosäuren, insbesondere bei Stickstoff-Mangel, durch Desaminierung und Decarboxylierung höhere Alkohole gebildet. Aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin entsteht so beispielsweise der „aromatische Alkohol“ 2-Phenylethanol (Swiegers et al., 2005). Die genauen Mechanismen sind nicht abschließend geklärt, bei Überexpression von Genen codierend für Enzyme diverser Enzymfamilien wie aromatische Enzymtransferasen (ARO), Aldehyddehydrogenasen (ALD) und Arylalkoholdehydrogenasen (AAD) sind positiv korrelierend höhere Gehalte an 2-Phenylethanol nachgewiesen wurden (Rossouw et al., 2008).

Bei den entstandenen Benzyl- bzw. Phenylpropanoiden handelt es sich um flüchtige Substanzen, die den Geruchseindruck von süß, floral bis Rose hervorrufen (Knudsen et al., 1993). Die Geruchsschwelle des den Geruch von Honig, würzig bis hin zu Rose und Flieder verursachenden 2-Phenylethanol liegt bei vergleichsweise hohen Gehalten von 14000 µg/L in Modelwein und 10000 µg/L in 10% ethanolisch/wässriger Lösung. Die Substanz wurde dafür in Weißwein bei Konzentrationen zwischen 13974 und 86800 µg/L nachgewiesen (Francis und Newton, 2005).

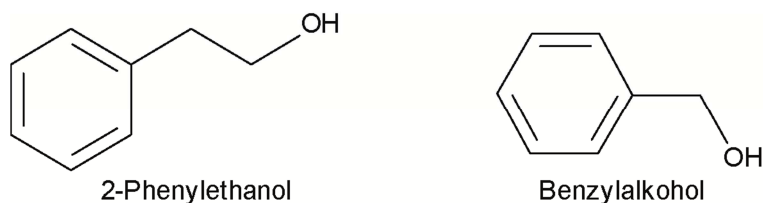


Abb. 2-4: Strukturen der Benzolderivate 2-Phenylethanol und Benzylalkohol.

2.1.2.5 Flüchtige Phenole

Flüchtige Phenole entstehen aus dem Abbau der Phenolcarbonsäuren und Lignin, deren Ursprung, wie der Benzolderivate, im Shikimisäure-Weg liegt. Die nativen Gehalte der flüchtigen Phenole selbst im Most sind sehr gering, da die Bildung während der Gärung erfolgt (Rapp und Versini, 1996).

Die Phenolcarbonsäuren sind den nichtflavanoiden Polyphenolen zugehörig, darunter die Hydroxymizmsäuren mit C_6-C_3 -Grundgerüst und Hydroxybenzoesverbindungen der Struktur C_6-C_1 . In Weißweinen dominieren die für die Bildung der flüchtigen Phenole relevanten Hydroxymizmsäuren bei im Mittel 154 mg/L gegenüber den Hydroxybenzoesäureverbindungen bei mittleren Gehalten von 10 mg/L. Die Hydroxymizmsäure-Verbindungen kommen hauptsächlich als Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure vor, die in der Weinmatrix aber verestert mit Weinsäure als Coutarsäure, Caftarsäure und Fertarsäure vorliegen (s. Abb. 2-5). In allen Früchten außer Weintrauben ist sonst die Chlorogensäure, der Ester aus Kaffeesäure und Chinasäure, am häufigsten vertreten (Singleton et al., 1978; Waterhouse, 2002). Desweiteren sind Glucoside der Hydroxymizmsäuren aus Riesling-Wein isoliert und beschrieben worden (Baderschneider und Winterhalter, 2001).

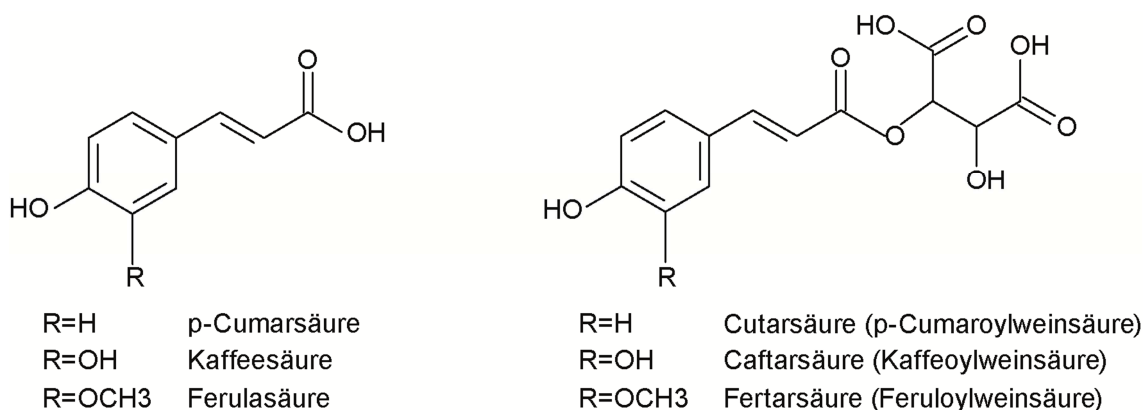


Abb. 2-5: Hydroxymizmsäuren und Weinsäureester in Most und Wein weißer Trauben, nach Waterhouse (2002).

Die Hydroxymizmsäuren bzw. deren Ester dienen als Vorläufersubstanzen für die Bildung flüchtiger Phenole. Die Esterbindung wird während der Reifung bei niedrigem Wein-pH enzymatisch durch saure Hydrolyse gespalten (Somers et al., 1987). Ausgehend von den Hydroxymizmsäuren entstehen durch nicht-oxidative Decarboxylierung sowie thermisch katalysiert die Vinylphenole und die Ethylphenole durch deren weitere Reduktion (Rapp und Versini, 1996; Sommer, 2012), s. Abb. 2-6. Die Bildung der flüchtigen Phenole aus Hydroxymizmsäuren im Wein wird durch die Mikroorganismen während der Gärung verursacht. Die Decarboxylierung zu Vinylphenolen ist für eine Vielzahl Hefen und Bakterien beschrieben, darunter für *Saccharomyces cerevisiae* (Chatonnet et al., 1993). Reduktion zu

Ethylphenolen dagegen ist nur für wenige Mikroorganismen möglich, insbesondere dokumentiert ist die Bildung für die Gattung *Brettanomyces/ Dekkera* (Chatonnet et al., 1992; Suárez et al., 2007). Der Eintrag von flüchtigen Phenolen aus dem Holz ist ebenfalls vergleichsweise gering, es wurden nur minimale Konzentrationen von 4-Ethylguaiaicol nachgewiesen, und ist deshalb vermutlich auf Kontamination der Fässer mit den entsprechenden Mikroorganismen zurückzuführen (Chatonnet et al., 1992).

In aktuellen Studien wurden in Trauben von Rebpflanzen der Sorten Chardonnay und Cabernet Sauvignon in Australien, die Buschbränden ausgesetzt waren, vermehrt Glycoside der flüchtigen Phenole als Bildungsquelle nachgewiesen. Zwei Studien wiesen Mono- und Diglycoside von Guaiaicol nach (Hayasaka et al., 2010a; Hayasaka et al., 2010b), desweiteren glycosyliertes Phenol, *o*-, *m*- und *p*-Cresol, Syringol, Methylsyringol und Methylguaiaicol (Hayasaka et al., 2010c). Es wurde gezeigt, dass der sensorisch nachteilige rauchig-aschige Eindruck durch die Kombination aus den glycosylierten und freien der durch den Rauch der Buschbrände eingetragenen flüchtigen Phenole verursacht wird, da bereits im Mund die enzymatische Hydrolyse dieser Substanzen stattfindet (Parker et al., 2012; Mayr et al., 2014).

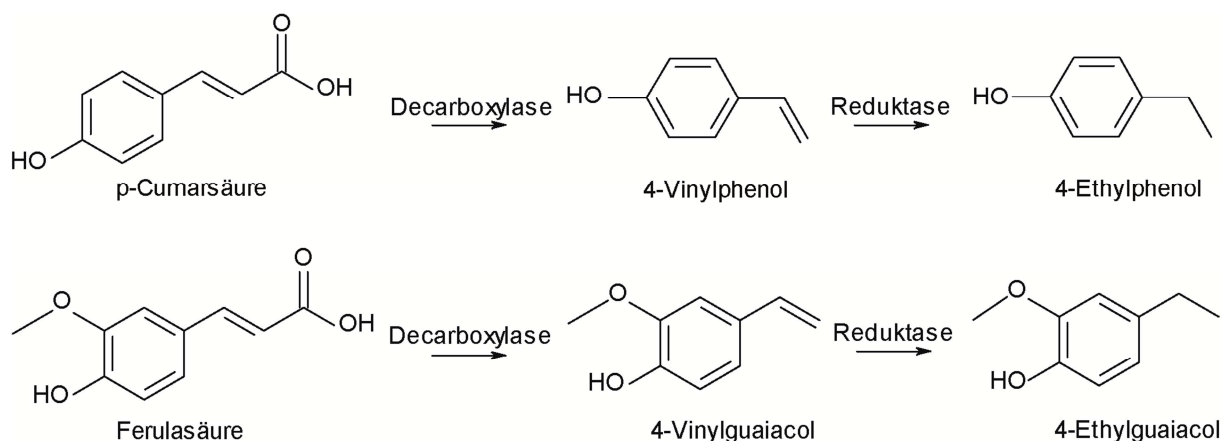


Abb. 2-6: Bildung der flüchtigen Phenole aus den Hydroxycimtsäuren, nach Rapp und Versini (1996) und Sommer (2012).

Flüchtige Phenole sind vor allem als Verursacher negativer Aromaeindrücke mit geringen Geruchsschwellenwerten bekannt, obwohl sie vereinzelt durch den Geruch von würzig, Nelke und Rauch positiv zum typischen Aroma einiger Rebsorten wie Gewürztraminer sowie Weinen einiger roter Rebsorten beitragen. Die vier wichtigsten in Most und Wein sind 4-Vinylphenol, 4-Vinylguaiaicol, 4-Ethylphenol und 4-Ethylguaiaicol. Vinyl- und Ethylphenol verursachen die als Weinefehler anerkannten Gerüche nach Pferdeschweiß und Heftpflaster, Vinyl- und Ethylguaiaicol verursachen den Eindruck nach rauchig, Nelke und medizinisch. Die Bedeutung der Substanzen wird durch ihre niedrigen Geruchsschwellenwerte unterstrichen, diese finden sich in 10% ethanolisch-wässriger Lösung für 4-Ethylphenol bei 440 µg/L, für 4-Ethylguaiaicol bei 33 µg/L sowie in Wasser für 4-Vinylphenol bei 20 µg/L und für 4-Vinylguaiaicol bei 40 µg/L (Francis und Newton, 2005; Swiegers et al., 2005).

2.1.3 Glycone in Trauben, Most und Wein

Die aus Weintrauben stammenden Aromavorläufer können als β -D-Glucopyranosid sowie an Disaccharide gebunden als β -D-Apiofuranosyl- β -D-Glucosid, α -L-Arabinofuranosyl- β -D-Glucosid und α -L-Rhamnopyranosyl- β -D-Glucopyranosid vorliegen (Günata et al., 1998; Sarry und Günata, 2004), s. Abb. 2-7. Die Häufigkeit deren Vorkommens kann variieren,

vermutlich hängt sie stark von der Rebsorte und damit verbunden mit den vorhandenen Aglyconen zusammen. Die Disaccharide kommen jedoch allgemein deutlich häufiger vor als das Monosaccharid, welches mit bis zu 9 % Anteil an den Gesamtglycosiden angegeben wird (Maicas und Mateo, 2005).

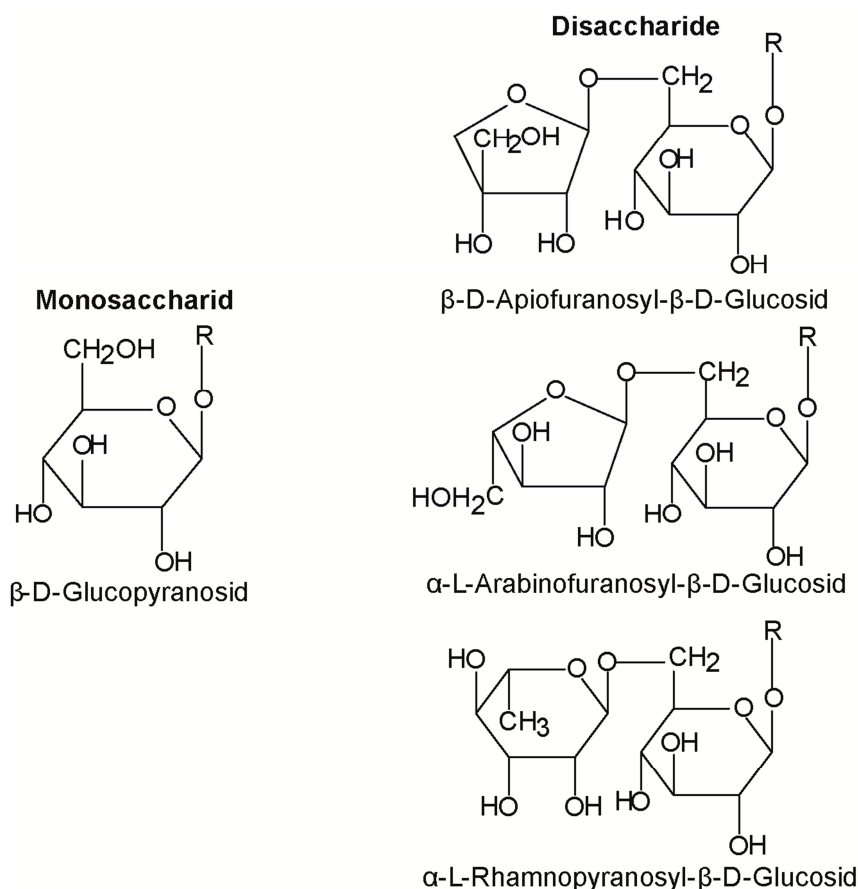


Abb. 2-7: Mögliche Mono- und Disaccharid-Glycone zur Aromastoffvorläufer-Bildung in Weintrauben, nach Sarry und Günata (2004).

2.2 Hydrolyse der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer

2.2.1 Reaktionsmechanismus säure- und enzymkatalysierter Hydrolyse

2.2.1.1 Reaktionsmechanismus

Die Aromastoff-Glycoside liegen als Vorläufer in der Form von O- β -D-Glucosiden oder O-Diglycosiden vor, die hydrolytische Spaltung kann säure- und enzymkatalytisch stattfinden (Sarry und Günata, 2004). Die saure Hydrolyse ist abhängig von pH, Temperatur und der Struktur des Aglycons und läuft dennoch aufgrund des niedrigen Most- und Wein-pH fortführend ab. Insbesondere die Spezifität der Spaltung von Monoterpenalkoholen in Wein ist untersucht worden und es wurde nachgewiesen, dass tertiäre Alkohole wie Linalool, die Linalooloxide und α -Terpineol im Vergleich zu primären Alkoholen wie Geraniol und Nerol häufiger vom Zuckerrest abgespalten wurden (Günata et al., 1986; Park und Noble, 1993). Prinzipiell verläuft der Mechanismus der Spaltung analog der enzymatisch katalysierten Reaktion (Sinnott, 1990). Bei saurer Hydrolyse bei sehr niedrigem pH treten allerdings durch Umlagerungen starke Veränderungen des Aglycons auf. Die Hydrolyse von Linalyl-, Geranyl- und Neryl-Glucosid bei pH 3 ergab hauptsächlich die Produkte Linalool, α -Terpineol und Nerol, während bei pH 1 völlig untypische Substanzen entstanden (Williams et al., 1982). Die enzymatische Hydrolyse von Monoglucosiden erfordert die Aktivität einer β -Glucosidase,

s. Abb. 2-8 A, für Diglycoside sind zwei Szenarien publiziert worden. Bei der sequentiellen, zweistufigen Hydrolyse wird im ersten Schritt die 1,6-O-Bindung zwischen dem zweiten Zucker, d.h. Apiofuranose, Arabinofuranose oder Rhamnopyranose, und dem β -D-Glucopyranosid durch das entsprechende Enzym abgespalten. Im zweiten Schritt erfolgt die Freisetzung des Aglycons durch Abspaltung der 1,4-O-gebundenen Glucose mittels β -D-Glucosidase katalysierter Hydrolyse (Gunata et al., 1988). Die einstufige Hydrolyse resultiert, katalysiert durch eine Disaccharidase, in das freigesetzte Aglycon und Disaccharid (Günata et al., 1998). Da das zweite Modell für aus Traubenhaut extrahierte Endoglycosidasen unter optimierten Umständen durchgeführt wurde, wird das Modell der zweistufigen Hydrolyse unter realen Bedingungen in Most und Wein angenommen, s. Abb. 2-8 B am Beispiel des α -L-Rhamnopyranosyl- β -D-Glucopyranosids. Ein Vergleich von saurer Hydrolyse bei pH 2,5 und enzymatischer Hydrolyse mit Präparat AR2000 der synthetischen Glucoside von Geraniol, Nerol, Citronellol und Myrtenol ergab eine fast vollständige Spaltung der Verbindungen bei 85-91% Wiederfindung des Ausgangsglycons, während bei der Säurehydrolyse eine hoch selektive Spaltung stattfand sowie starke Umlagerung der Substanzen bei maximal 1,3% Wiederfindung der eingesetzten Ausgangssubstanz (Dziadas und Jeleń, 2016).

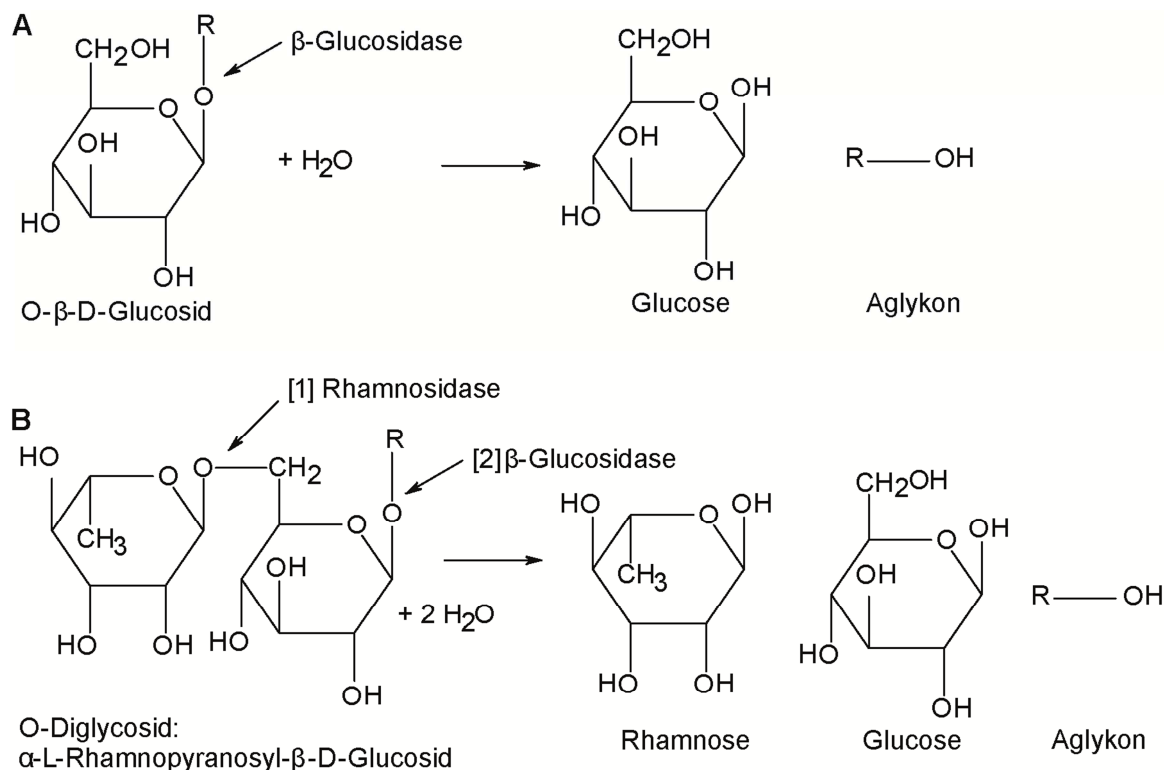


Abb. 2-8: Enzymatische Hydrolyse der Aromastoff (-R)-Glycoside. Die Spaltung von O- β -D-Glucosiden katalysiert die Aktivität einer β -Glucosidase (A), bei O-Diglycosiden findet eine in zwei Schritten ablaufende sequenzielle Hydrolyse statt (B), nach Sarry und Günata (2004).

2.2.1.2 Aktivitätsspektren der enzymatischen Aktivität abhängig der biologischen Herkunft

Das Aktivitätsspektrum potentiell Glycosidase-aktiver Enzyme ist hochgradig abhängig von ihrer biologischen Herkunft. Die aus der Rebpfanze stammenden, endogenen β -Glucosidasen sind für die Freisetzung der Aromastoffe während der Weinbereitung unbedeutend. Die Enzyme waren bei untersuchten Wein-Bedingungen zwischen pH 2,8 bis 3,8 instabil (Lecas et al., 1991) und blieben unter Weinbereitungs-Konditionen inaktiv, da ihr Optimum bei pH 5 festgestellt wurde, desweiteren zeigten sie sich als von Glucose und

Ethanol gehemmt. Unter idealen Bedingungen waren die aktiven Enzyme hochspezifisch und dadurch unfähig tertiäre Terpenalkohole wie Linalool vom Zuckerrest abzuspalten, während primäre wie Geraniol, Nerol und Citronellol hydrolysiert wurden (Aryan et al., 1987; Gunata et al., 1990a). In gesunden Trauben wurden neben der β -Glucosidase die vergleichsweise gering aktiven Enzyme α -Arabinosidase und α -Rhamnosidase identifiziert, durch Befall von *Botrytis cinerea* stieg die Aktivität der Disaccharidasen an (Aryan et al., 1987; Gunata et al., 1989). Desweiteren fraglich ist der Übergang der hauptsächlich in der Traubenhaut lokalisierten Enzyme in den Most (Sarry und Günata, 2004). Eigenschaften und Vorkommen der Glycosidasen mikrobieller Herkunft sind höchst unterschiedlich. Über die Enzymausstattung und –aktivität von Hefen der Gattung *Saccharomyces* ist generell wenig bekannt und wird kontrovers diskutiert (Maicas und Mateo, 2005), die Ausführungen zur Glycosidase-Aktivität der Hefen findet sich in Kap. 2.2.2.2. Eine Studie wies mittels biochemischem Assay vorhandene Glycosidase-Aktivität unter Fermentationsbedingungen nach, die durch Wein-pH zwischen 2,8 und 3,8 und Gärtemperatur von 18°C bis 20 °C aber auf 10-15% der maximalen Aktivität reduziert war. Das Optimum der Aktivität lag bei pH 5-6 bei einer Temperatur von 40-50 °C. Die Hemmwirkung von 15% Ethanol dagegen verursachte einen Rückgang der Aktivität von nur 10%, die Anwesenheit von Glucose einen Verlust von 20-30% der Maximalaktivität (Delcroix et al., 1994). Für *Nicht-saccharomyces*-Hefen diverser Gattungen wurde dagegen ausgeprägte Glycosidase-Aktivität zweifelsfrei nachgewiesen (Rosi et al., 1994). Die Optima der daran beteiligten Enzyme sind allerdings ebenfalls unterschiedlich und nicht zu verallgemeinern. Für einen Stamm der Gattung *Debaromyces hansenii* wurde beispielsweise eine stabile β -Glucosidase-Aktivität bei Wein-pH nachgewiesen, trotz Optimum bei pH 7 und 25 °C, zusätzlich war das Enzym tolerant gegenüber Glucose und Ethanol (Yanai und Sato, 1999). Für einen weiteren *Debaromyces hansenii*-Stamm wurde ein Optimum für die β -Glucosidase bei pH 5 bei 40 °C gezeigt, dabei war das Enzym durch Glucose gehemmt (Riccio et al., 1999). Weiterhin aufgrund der Enzymausstattung relevant zur Hydrolyse der Aromastoffvorläufer ist der filamentöse Pilz *Aspergillus niger*, der neben natürlichem Eintrag als Sekundärinfektion vor allem aufgereinigt in Form von Präparaten als exogene Glycosidase eingesetzt wird. Unter Weinbedingungen verliert er nur 20% seiner Enzymaktivität, trotz präparatabhängigem Optimum bei pH 5-6 sowie starker Hemmung durch Glucose (Günata et al., 1997; Cabaroglu et al., 2003). Die Spaltung der Vorläufer durch Hefen und filamentöse Pilze ist bezüglich β -Glucosidase-Aktivität ebenfalls als substratspezifisch beschrieben. Während Hefen primäre und sekundäre Terpenalkohole akzeptieren, erfolgt die Spaltung der tertiären Terpenalkohole bevorzugt durch filamentöse Pilze. Es besteht zudem ein Einfluss der Strukturisomerie, beispielsweise wurde für die Diastereomere Linalool, α -Terpineol und Citronellol sowie für die Isomere Geraniol und Nerol unterschiedliche Freisetzungsraten aus ihrem Glucosid festgestellt (Gunata et al., 1990a). Die Abspaltung des äußeren Zuckerrestes bei Vorliegen von Disacchariden ist dagegen unabhängig vom Aglycon (Sarry und Günata, 2004).

2.2.2 Hefen und Hydrolyse der Aromastoffvorläufer

2.2.2.1 Taxonomie, Vorkommen, Entwicklung und Relevanz in der Weinbereitung

Es existiert eine Vielzahl der umgangssprachlich verallgemeinerten „Hefen“. Allen gemein ist ihre Zugehörigkeit zum Reich der Pilze, welches sich zunächst in die Abteilungen der Ascomycota und Basidiomycota sowie Deuteromycota teilt. Für Ascomyceten und Basidiomyceten existieren jeweils teleomorphe und anamorphe Formen, die durch die Verwendung unterschiedlicher Artnamen gekennzeichnet sind (Kurtzmann et al., 2011). Die weitere taxonomische Einordnung erfolgt aufgrund diverser Eigenschaften wie Morphologie,

Physiologie und genetischen Merkmalen (Walker, 1998; McLaughlin et al., 2009). Die für die Weinbereitung relevanten Hefen sind überwiegend den Gattungen *Dekkera* bzw. *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hanseniaspora* bzw. *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* und *Zygosaccharomyces* innerhalb des Reiches zuzuordnen (Pretorius et al., 1999), was durch Weiterentwicklung moderner molekularbiologischer Methoden zur Identifizierung laufend erweitert wird (Jolly et al., 2014). Diese Diversität der Hefen spiegelt sich in der genetischen Ausstattung und somit im Phänotyp der Arten wider, zusätzlich kann eine Art durch diverse Sub-Arten, als Stämme bezeichnet, vertreten sein.

Zur Gattung *Saccharomyces* gehören die als typische Weinhefen eingesetzten Arten *S. cerevisiae* und *S. bayanus* (Pretorius, 2000). Vermutlich haben sie sich durch Domestizierung entwickelt (Naumov, 1996) und sind deshalb an die Kellerbedingungen angepasst, mit zum Beispiel hoher Toleranz gegenüber Alkohol, Zucker und Schwefeldioxid (Bauer und Pretorius, 2000). *Saccharomyces*-Hefen werden heutzutage üblicherweise in Form von kultivierten Reinzuchthefen in den zu vergärenden Most gebracht (Boulton et al., 1996). Im 19. Jahrhundert wurde die Hefe als Gärungserreger erkannt (Barnett, 1998) und im Jahr 1890 von Hermann Müller-Thurgau das Verfahren der Beimpfung mit kultivierten Hefestämmen erstmals angewandt (Schaller, 2000). Anfang des 20. Jahrhunderts wurden nachfolgend Flüssigkulturen eingesetzt, mittlerweile sind Trockenhefepräparate etabliert und eine Vielzahl an Weinhefestämmen ist erhältlich, deren Entwicklung ständig voranschreitet. Dazu sind Methoden mit und ohne Einsatz von Gentechnik verfügbar, wobei mit Ausnahme der als GRAS-eingestuften Stämme ECMo01 und ML01 in den USA diese nicht angewendet bzw. gänzlich abgelehnt werden. Industriestämme werden unter gezielten Bedingungen selektioniert oder auf Grundlage von bereits vorhandenen erwünschten Merkmalen innerhalb der Art aber auch intraspezifisch zu Hybriden gekreuzt (Borneman et al., 2009). Durch den Einsatz von Reinzuchthefen bleibt eine planbare, sichere Endvergärung mit reproduzierbarem Endprodukt gewährleistet. Ursprünglich aufgrund technologischer Eigenschaften selektioniert, wie beispielsweise Gärfähigkeit bei geringen Temperaturen, verringerte Schaumbildung oder verbessertes Absetzverhalten, stehen heutzutage Eigenschaften wie spezifische Enzymausstattung zur Aromabildung im Vordergrund (Degre, 1993). Die Anforderungen an die moderne Hefe bestehen vor allem an ihre Aromacharakteristik wie hohe Glycerinbildung, Glycosidase-, Lyase- und Esterase-Aktivität ohne Bildung von Off-Flavor-Komponenten wie bestimmte Thiol-Verbindungen oder flüchtige Säure sowie zusätzlich an gesundheitliche Aspekte wie reduzierte Bildung von biogenen Aminen oder Sulfit (Pretorius, 2000).

Die Reinzuchthefen werden, bei ca. $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml bzw. 20 g/hl Trockenpräparat, in so großer Zahl appliziert, dass die Gärung dominiert werden kann (Degre, 1993). Allerdings wurde nachgewiesen, dass der gezielt beimpfte Hefestamm tatsächlich erst drei bis vier Tage nach Inokulation den indigenen *Nicht-saccharomyces*-Wildhefen überlegen ist (Querol et al., 1992). Dabei sind hauptsächlich Arten von *Kloeckera* und *Candida* gefunden worden, einzelne Stämme waren bis zum Ende der Gärung vorzufinden (Heard und Fleet, 1985). Auch der Einsatz der praxisüblichen Konzentrationen von 50-150 mg/L SO_2 war nicht zur Inhibierung des Wachstums dieser Hefen ausreichend (Fleet, 1990; Fleet und Heard, 1993).

Wird nicht beimpft, bei sogenannter Spontanvergärung, dominiert die aus Weinberg und Keller stammende Flora, die aus diversen *Nicht-saccharomyces*- und *Saccharomyces*-Arten besteht. Die Hefepopulation auf den Traubenbeeren im Weinberg wird durch ein geringes Vorkommen von *Saccharomyces*-Hefen charakterisiert, welche vermutlich ausschließlich

aufgrund Verschleppung durch beispielsweise Insekten aus domestizierten Habitaten wie dem Keller dort auftreten (Mortimer und Polsinelli, 1999). Dafür spricht zusätzlich das fast ausschließliche Auffinden an verletzten Beeren (Barata et al., 2012). Die Arten *Hanseniaspora* bzw. *Kloeckera*, *Metschnikowia* und *Candida* sind dagegen hauptsächlich vertreten (Prakitchaiwattana et al., 2004). Die einsetzende Gärung im Keller wird anfangs von dieser Weinbergsflora dominiert. Mit ansteigendem Ethanolgehalt treten weitere Arten, beispielsweise *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* und *Torulaspota* auf. Die ethanoltoleranten *Saccharomyces*-Hefen dominieren die Gärung erst ab weiter erhöhten Gehalten (Fleet und Heard, 1993). Die Kellerumgebung ist in diversen Studien eindeutig als Ursprung der *Saccharomyces*-Population nachgewiesen worden (Rosini, 1984; Martini, 1993; Renouf et al., 2007). Wurden beispielsweise Fermentationen mit der Weinbergsflora unter sterilen Bedingungen durchgeführt, konnten sich die in geringen Zellzahlen vorliegenden *Saccharomyces*-Hefen nicht gegen Hefen anderer Gattungen durchsetzen. Unter unsterilen Bedingungen dagegen dominierten *Saccharomyces*-Hefen der Kellerflora die fortschreitende Gärung (Martini et al., 1996).

Momentan steigt die Bedeutung der *Nichtsaaccharomycten* in der Weinbereitung. Der verbreitete Einsatz von *Saccharomyces*-Reinzuchtstämmen führte zu wachsender Kritik an den erzeugten Weinen, die unter anderem als eindimensional oder wenig abwechslungsreich und aromatisch beschrieben wurden, während die Gärung unter Einfluss von anderen Hefe-Arten zu beispielsweise höherer Komplexität der Weine insgesamt führten (Varela et al., 2009). Eine vollständige Spontangärung ist aufgrund möglicher Bildung von Fehlparomen vor allem aufgrund der weit verbreiteten Bildung hoher Gehalte flüchtiger Säure durch *Nichtsaaccharomycten* sehr risikoreich (Ciani und Maccarelli, 1997). Desweiteren sind diese Hefen, die an die Most- und Weinumgebung geringer adaptiert sind, beispielsweise durch geringe Ethanoltoleranz bedingt und so durch mangelnde Gärstärke charakterisiert (Fleet und Heard, 1993). In der Praxis etablieren sich momentan sogenannte „Multistarter-Fermentationen“, die eine kontrollierte, aus *Nichtsaaccharomyces*- und *Saccharomyces*-Hefen kombinierte Fermentation darstellt (Ciani et al., 2010). Das Angären des Mostes kann spontan erfolgen, um dann von gärstarken *Saccharomyces*-Hefen überimpft zu werden, desweiteren sind im Handel bereits kultivierte *Nichtsaaccharomyces*-Hefen erhältlich, die mit entsprechend empfohlenen *Saccharomyces*-Hefen in Kombination angewendet werden können, wie beispielsweise Stämme von *Torulaspota delbruckii*, *Metschnikowia pulcherrima* oder *Pichia kluyveri* (Jolly et al., 2014).

2.2.2.2 Genetik, Enzymbausstattung und Ausprägung der Glycosidase-Aktivität

Unbedingt differenziert zu interpretieren sind die Begrifflichkeiten der enzymatischen Aktivität und des aktiven Enzyms. Im Zusammenhang mit der Aromafreisetzung während der Weinbereitung wird desöfteren von Aktivität einer β -Glucosidase der Hefen berichtet, ohne jedoch das entsprechende Enzym zu identifizieren.

Für *Saccharomyces*-Hefen werden Grundlagen und Fähigkeit zur enzymatischen Hydrolyse der Aroma-Glycoside kontrovers diskutiert. Im Genom von *Saccharomyces*-Hefen kann allgemein kein Gen für das Enzym 1,4- β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) innerhalb der β -Glucosidase (β -GH)-Genfamilie gefunden werden (Gil et al., 2005). Nur in Einzelfällen, wie beispielsweise bei dem aus sizilianischem Most und Wein isolierten Stamm AL41, wurde eine Übereinstimmung mit der Sequenz für 1,4- β -Glucosidase nachgewiesen (Quatrini et al., 2008). Allerdings sind drei Gene identifiziert worden, die mit der β -Glucosidase-Aktivität in Zusammenhang stehen, EXG1, SPR1 und YIR007W. Die Paralogen EXG1 und SPR1 codieren für zwellwandständige exo-1,3- β -Glucanasen (Schmidt et al., 2011). Die Funktion

des im Cytoplasma lokalisierten YIR007W, auch EGH1, wurde von Watanabe et al. (2015) als unspezifische Ergosteryl- β -Glucosidase charakterisiert. In isolierter, aufgereinigter Form hydrolysierte das korrespondierende Protein unspezifisch Glucoside, darunter das p-Nitrophenol-Glucosid (pNPG) und 4-Methylumbelliferol-Glucosid (4-MUG). Alle drei korrespondierenden Enzyme führten zur Hydrolyse von 7-O- β -Glucosiden und 4-O- β -Glucosiden von Flavanonen, Flavonen und Flavanolen und Isoflavonolen während keine Hydrolyse von 3-O- β -Glucosiden von Flavonolen und Anthocyanidinen stattfand. Der jeweilige *knockout* von EXG1, SPR1 und YIR007W in *Saccharomyces cerevisiae* führte dagegen nur für Gen EXG1 zu vollständigem Verlust der Hydrolysefähigkeit von Flavonoid-Glucosiden. Das Enzym Exg1p wurde konstitutiv sekretiert und akkumulierte extrazellulär, wo es vermutlich die Glucoside hydrolysierte (Schmidt et al., 2011). Die Isoformen EXG1 und EXG2 wurden jeweils in *Saccharomyces cerevisiae* überexprimiert, was im Fall von EXG1 zu gesteigerter Freisetzung von Terpen- und Alkohol-Glucosiden in einer Microvinifikation mit Muskateller führte. Das korrespondierende Enzym Exg1p hatte seine optimale Aktivität bei pH 4-5, einer Temperatur von 55 °C und war nicht von Ethanol, SO₂, Glucose oder Fructose gehemmt (Gil et al., 2005). Bezüglich des Vorkommens der zur Hydrolyse der Aromastoff-Glycoside in Wein nötigen Disaccharidasen liegen für *Saccharomyces*-Hefen kaum Ergebnisse aus der Literatur vor. Die Studie von Delcroix et al. (1994) wies zwar die Freisetzung von α -Rhamnosyl- und α -Arabinosylglycosiden nach, möglicherweise aber durch die unspezifische hydrolytische Aktivität der β -Glucanase oder anderer Enzyme bedingt.

Die Aktivität der exo-Glucanase EXG1p wurde durch Spaltung diverser Substrate bzw. durch unterschiedliche glycosidische Bindung charakterisierte Substrate als unspezifisch charakterisiert, darunter Laminaribiose, Gentiobiose, pNPG, 4-MUG und Cellobiose in absteigender Intensität (Suzuki et al., 2001). Dagegen spezifisch ausschließlich durch 1,4- β -Glucosidase hydrolysiert werden kann beispielsweise das Substrat Arbutin (Rodríguez et al., 2004). Die Gesamtheit der Studien demonstriert damit eine unspezifische, nicht eindeutig zuzuordnende Glycosidase-Aktivität der *Saccharomyces*-Hefen, die im Vergleich zu *Nichtsaccharomyceten* schwächer ausgeprägt ist. Durch die Ergebnisse der genetischen, mikrobiologischen und biochemischen Analysen ist die enzymatische Aktivität der *Saccharomyces*-Hefen, eventuell mit wenigen Ausnahmen, nicht auf die Existenz einer β -Glucosidase, sondern auf unspezifische Enzyme zurückzuführen, wie eindeutig belegt die exo-1,3- β -Glucanase Exg1p.

In einer Studie von Rosi et al. (1994) wurde bei der Durchführung von mikrobiologischen Plattentests mit Arbutin und biochemischen Aktivitäts-Assays von 153 *Saccharomyces*-Weinhefestämmen nur ein Stamm positiv auf β -Glucosidase-Aktivität getestet, während ein Großteil der untersuchten *Nichtsaccharomyceten* wie beispielsweise Stämme von *Debaromyces hansenii*, *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Klyuveromyces thermotolerans* durch exo- und endozelluläre Aktivität charakterisiert waren.

Daenen et al. (2008) untersuchten Brauhefen der Gattungen *Saccharomyces* und *Brettanomyces* mittels Platten- und Aktivitätstests mit den Substraten Arbutin, Cellobiose, Salicin, pNPG und 4-MUG. Für *Saccharomyces* konnte keine β -Glucosidase-Aktivität, allerdings für alle Stämme β -Glucanase-Aktivität nachgewiesen werden, dagegen für *Brettanomyces* abhängig vom Hefestamm hohe β -Glucosidase-Aktivität die zur erhöhten Freisetzung von Hopfen-Monoterpen-Glycosiden in Microvinifikationen führte.

Fia et al. (2005) untersuchten *Saccharomyces*- und diverse *NichtSaccharomyces*-Hefestämme der Gattungen *Torulaspora*, *Debaromyces*, *Brettanomyces*, *Hanseniaspora* und *Metschnikowia* unter Verwendung unterschiedlicher Substrate. Arbutin als Indikator für β -Glucosidase-Aktivität verursachte negative Resultate für alle *Saccharomyces*, während *NichtSaccharomyces* positiv getestet wurden. Bei Verwendung von 4-MUG, welches von der unspezifischeren *exo*- β -Glucanase EXG1p akzeptiert wird, wurden alle untersuchten Hefen positiv auf mittlere bis sehr hohe Aktivität getestet.

Spagna et al. (2002) untersuchten 361 Hefen verschiedener Gattungen, davon 80 *Saccharomyces cerevisiae*, mittels Arbutin und pNPG, wovon ein *Saccharomyces*-Hefestamm positiv für β -Glucosidase-Aktivität wurde charakterisiert. Hernández et al. (2003) detektierten unter 60 untersuchten *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen einen Stamm positiv für pNPG, dieser war allerdings nicht auf Arbutin zum Wachstum fähig. Mateo und Di Stefano (1997) demonstrierten die Existenz einer durch β -D-glycosidisch gebundenes Substrat induzierbaren Enzymaktivität für aus *Saccharomyces*-Hefen isolierte Enzymfraktionen, welche in der Hydrolyse von vorher isolierten Monoterpenglycosid-Extrakten resultierte. Der genaue Hintergrund blieb allerdings ungeklärt.

Für diverse *NichtSaccharomyces*-Hefen konnte dagegen sowohl eindeutig β -Glucosidase-Aktivität (Rosi et al., 1994; Spagna et al., 2002; Fia et al., 2005; Daenen et al., 2008), als auch erhöhte Freisetzung von Aroma-Glycosiden mit Auswirkungen auf die Sensorik der hergestellten Weine (Hernández-Orte et al., 2008) nachgewiesen werden. Diese Hefen sind seit den letzten Jahren verstärkt Gegenstand der Forschung. Während *Saccharomyces cerevisiae* bereits 1996 komplett sequenziert war (Goffeau et al., 1996), wird das Genom von *NichtSaccharomyces*-Hefen vieler Gattungen momentan analysiert oder ist erst seit kurzem bekannt wie die Sequenzierung von *Schizosaccharomyces pombe* in 2002 und von *Torulaspora delbrueckii* in 2011 (Jolly et al., 2014), weswegen erst wenig Hintergrundinformationen über diese heterogene Gruppe von Hefen vorliegen.

Desweiteren wurden Stämme des Milchsäure-Bakteriums *Oenococcus oeni*, welche bei spontaner sowie aktiv beimpfter malolaktischen Gärung (engl. malolactic fermentation, MLF oder syn. biologischer Säureabbau, BSA) vorkommen, im Labormaßstab positiv auf vorhandene β -Glucosidase-Aktivität sowie Hydrolyse von Aroma-Glycosiden getestet. Allerdings ist der tatsächliche Einfluss auf Wein und weitere hergestellte Getränke nicht abschließend geklärt (Palmeri und Spagna, 2007). Es liegen kontrovers zu diskutierende Studien vor, während beispielsweise eine signifikante Freisetzung von Aromastoffen und dem Anthocyan Malvidin-3-Glucosid in Wein der Rebsorte Tannat gezeigt wurde, war in Viognier kein Effekt feststellbar. Die Datenlage für weitere MLF-Bakterien wie *Lactobacillus*, *Pedococcus* und *Leuconostoc*, für die teilweise β -Glucosidase-Aktivität demonstriert wurde, lässt ebenfalls keine abschließende Aussage zu (Maicas und Mateo, 2016).

2.2.3 Technische Enzyme aus *Aspergillus niger*

Enzyme aus filamentösen Pilzen, zumeist *Aspergillus niger*, werden in der Weißweinbereitung zur gesteigerten Freisetzung der Aroma-Glycoside eingesetzt. Das Aroma von Weinen weißer Rebsorten wird wesentlich durch Aromastoffe geprägt, die in großer Zahl als Glycoside vorliegen, wodurch dieses gesteigert bzw. gezielt freigesetzt werden kann. In Weinen roter Rebsorten kommen die Enzyme nicht zum Einsatz, zum einen aufgrund geringerer Relevanz der Aroma-Glycoside als Beitrag zum Aroma. Desweiteren würden die Enzympräparate auch zusätzlich Anthocyane hydrolysieren und die Instabilität der resultierenden Anthocyanidine zum Farbverlust führen (Maicas und Mateo, 2005).

Enzyme aus *Aspergillus niger* sind „allgemein als sicher anerkannt“ (engl. generally recognized as safe, GRAS) und verbreitet in Anwendung (Schuster et al., 2002). Mit der EG-Verordnung Nr. 606/2009 bzw. mit Änderungen von Nr. 53/2011 zu oenologischen Verfahren ist die Verwendung von „pektolytischen Enzymen und enzymatischen Zubereitungen“ auch zur „Feststellung von im Traubenmost und im Wein anwesenden aromatischen Vorgängern der Traube“ zur Verwendung erlaubt (Amtsblatt der Europäischen Union, 21. Januar 2011). Die Verordnung folgt Richtlinien der Internationalen Organisation für Rebe und Wein (OIV), nach Resolution OIV-OENO-498-2013 ist die Zugabe von Enzympräparaten zu Most und Wein zur „Hydrolyse von glycosylierten Aromastoffen“ aus Traube, Most und Wein erlaubt (OIV Oenologie Resolutionen, 07.07.2013). Ursprünglich während der Traubenverarbeitung als Pektinasen und Hemicellulasen zur erhöhten Saftausbeute sowie erhöhter Extraktion der Traubenbestandteile aus der Maische eingesetzt, werden heute aufgereinigte Enzyme, zumeist aus dem filamentösen Pilz *Aspergillus niger*, zur Aromasteigerung in der Wein- und Sektbereitung als exogene Enzyme eingesetzt. Eine Vielzahl von Präparaten ist kommerziell erhältlich, die als „Nebenaktivitäten“ neben der β -Glucosidase-Aktivität nachgewiesen über α -Arabinosidase-Aktivität, α -Rhamnosidase-Aktivität und β -Apiosidase-Aktivität verfügen, genannt seien an dieser Stelle beispielsweise AR2000, Pectinase 263, Pektolase 3PA. Weitere verfügen teilweise über Glycosidase-Aktivität, wie Cellulose A ohne β -Apiosidase oder Ultrazym 100 ohne α -Rhamnosidase (Sarry und Günata, 2004). Es wurden in *Aspergillus niger* nach Chromatofokussierung multiple Formen aller vier Enzyme nachgewiesen (Günata et al., 1997). Weitere Produzenten solcher potenter Enzyme sind beispielsweise *Aspergillus oryzae* für β -Glucosidase, *Trichoderma sp.* für β -Glucanase und *Penicillium sp.* für α -Rhamnosidase, spielen aber eine untergeordnete Rolle (Maicas und Mateo, 2016).

Die Glycosidasen aus *Aspergillus niger* sind neben den nicht idealen Bedingungen wie pH-Wert, Ethanol und Temperatur während der Weinbereitung vor allem durch ihre starke Hemmung durch Glucose limitiert (Aryan et al., 1987), weswegen sie zum Ende der Gärung eingesetzt werden und bei der Herstellung von Süßweinen nicht geeignet sind. Die Enzympräparate sind in der Anwendung zur Hydrolyse von Aroma-Glycosiden in Wein unterschiedlich geeignet, was hauptsächlich auf spezifische Wirkungsoptima abhängig des ursprünglichen *Aspergillus niger*-Stammes zurückzuführen ist. Beispielsweise wurde Linalyl- β -D-Glucosid durch das Präparat Hemicellulase innerhalb 24 Stunden Inkubation vollständig hydrolysiert, während durch Präparat Pectinol VP nur zu einem Drittel hydrolysiert wurde (Gunata et al., 1990b). Ungeachtet dessen sind die Präparate grundsätzlich durch sehr hohe Aktivität gekennzeichnet, was durch diverse Studien belegt wurde. Zwei Studien stellten in Modellwein angereichert mit Aroma-Glycosiden extrahiert aus Moscato-Trauben eine um 2,3fach erhöhte Freisetzung von Monoterpenalkoholen bei Einsatz einer aus dem Enzympräparat AR 2000 aus *Aspergillus niger* isolierten α -Arabinosidase und β -Glucosidase (Spagna et al., 1998) sowie α -Rhamnosidase (Spagna et al., 2000) fest. Binder (1998) stellte eine signifikante erhöhte Freisetzung der Monoterpen-Glycoside durch Enzymeinsatz fest. Diese war abhängig von der Rebsorte und damit verbunden mit der Quantität der vorliegenden Aromastoffvorläufer. Für die aromatische Rebsorte Morio Muskat wurde eine Steigerung der Gesamtterpen-Freisetzung um 40% erreicht, bei Riesling dagegen um 12%. Ähnliches galt für die Sensorik der fertigen Weine, bei Riesling bestand geringfügig Einfluss, während beim Gewürztraminer durch Enzymeinsatz die blumig-würzigen und exotischen Attribute signifikant erhöht waren. Zwischen den untersuchten Enzympräparaten AR2000, Sihazym A und Trenolin Bukett bestanden leichte Unterschiede, die dem Autor nach aber nachfolgend untersucht werden sollten. Die allgemeinen Weinparameter waren durch die

Enzyme nicht verändert. Fischer et al. (2001) erzielten ähnliche Ergebnisse, da sie ebenfalls die Rebsorte als wesentlichen Faktor zur erhöhten Freisetzung sowie Intensivierung des Aromas herausstellten. Zudem hoben die Autoren das Enzym AR2000 als effektivstes Enzympräparat heraus. Es wurde außerdem kein Verlust der Sortentypizität festgestellt, da die erhöhte Freisetzung symmetrisch für alle Substanzen auftrat und zu keiner Verschiebung zugunsten bestimmter Substanzen führte. In beiden Studien wurden keine sensorisch nachteiligen Effekte auf die Alterung der Weine festgestellt (Binder, 1998; Fischer et al., 2001). Cabaroglu et al. (2003) stellten bei Emir-Weinen, welche unter Einsatz des Enzympräparates AR2000 hergestellt worden waren, eine signifikant gesteigerte Freisetzung von Monoterpen-, C₁₃-Norisoprenoid- und Benzolderivat-Glycosiden fest, desweiteren eine erhöhte Wahrnehmung der Attribute Honig, Limone und rauchig in den entsprechenden Weinen. Der Effekt war zusätzlich durch Maischestandzeit, welche in erhöhten Vorläufer-Gehalten resultierte, gesteigert.

Als Nebenwirkung ist allerdings zu beachten, dass die erhöhte Glycosid-Freisetzung ebenfalls die flüchtigen Phenole aus ihren glycosylierten Vorstufen freisetzt. Zusätzlich kann in den Enzympräparaten als weitere Nebenaktivität Cinnamyl-Esterase vorhanden sein, welche die Hydroxycimtsäuren aus ihren Weinsäureestern freisetzt, aus denen wiederum durch Hefen die Bildung der Ethylphenole und anschließend der Vinylphenole erfolgen kann (Dugelay et al., 1993). Diese vermutlich aufgrund geringer Aufreinigung durch sehr hohe Aktivitäten charakterisierten Präparate wie AR2000, Panzym Arome G und Sihazym A sollten deshalb nicht zur Maischeenzymierung sondern zur gesteigerten Hydrolyse der Aroma-Glycoside am Ende der Gärung eingesetzt werden (Sigler et al., 2000). In der Studie von Cabaroglu et al. (2003) wurden signifikant erhöhte Gehalte an freiem 4-Vinylphenol in den Weinen nach Enzymbehandlung nach der abgeschlossenen Gärung nachgewiesen, allerdings wurde neben erhöhter Ausbildung eines Geruches von rauchig keine Off-Flavor-Bildung festgestellt. Desweiteren wurde unter Verwendung der Enzympräparate Rohapect C, Rohapect D5L und Novoferm 12 die Oxidation von C₁₃-Norisoprenoiden beobachtet, aus dem 3-Hydroxy- β -Damascon- β -D-Glucosid entstanden das korrespondierende Aglycon und Oxo-Damascon. Das Enzym Emulsin aus Mandeln verursachte diesen Effekt dagegen nicht (Sefton und Williams, 1991).

Zur Inaktivierung der Enzyme wird die Möglichkeit der Bentonit-Schönung diskutiert. Diese Methode birgt allerdings den Nachteil der gleichzeitigen Adsorption von Aromastoffvorläufern, wodurch diese ebenfalls reduziert werden. Desweiteren wurde festgestellt, dass keine vollständige Inaktivierung der Glycosidasen herbeigeführt werden konnte (Köhler et al., 2000; Fischer et al., 2001). Desweiteren wurde die Immobilisierung an Magnetit-Nanopartikeln untersucht, was erfolgreich zur Inaktivierung der Enzymaktivität führte, allerdings zusätzlich zu erhöhtem Eisen-Eintrag in den Wein, wodurch neben sensorischen Problemen vermehrte Oxidation von Weininhaltsstoffen wie Phenolen und Trübungen zu erwarten sind (Ferner, 2016).

Die Labor-Anwendung der Enzympräparate aus *Aspergillus niger*, speziell das Präparat AR2000, ist in der weinchemischen Analytik zur Freisetzung der Aglycone, speziell vor der gaschromatographischen Messung, weit verbreitet. Das Enzym ist durch die relevanten Glycosidase-Aktivitäten gekennzeichnet (Sarry und Günata, 2004) und verursacht im Gegensatz zur Säurehydrolyse keine Umlagerungsreaktionen (Williams et al., 1982). In einem Vergleich zur Säurehydrolyse, die in nur geringer Wiederfindung der Aglycone aus der glycosidischen Verbindung resultierte, wurden die synthetischen Monoterpenalkohole durch das Enzympräparat AR2000 fast vollständig hydrolysiert (Dziadas und Jeleń, 2016).

Stanitzek (2014) dagegen zeigte eine unvollständige und Aglycon-abhängige Hydrolyse, das Präparat AR2000 war am effektivsten.

2.2.4 Weitere Einflussfaktoren auf die Gehalte glycosylierter und freier Aromastoffe

Einige relevante Mechanismen, die eine Hydrolyse der Aromastoffe während der Gärung vortäuschen oder maskieren sowie weitere unkalkulierbare Effekte werden in der Literatur beschrieben. Günata et al. wiesen mangelnde Korrelation des theoretisch aus der glycosidischen Bindung freigesetzten Aglycons und dessen tatsächlicher Wiederfindung als freier Aromastoff nach. Bei der Gärung eines Muskatellers wurde insgesamt eine Abnahme der Monoterpen- und Benzolderivat-Glycoside gezeigt. Allerdings wurde beispielsweise bei einem sich konstant verringernenden Linalool-Glycosid keine Zunahme des freien Linalool gemessen, während der Gehalt an freiem α -Terpineol um 400% zunahm obwohl der glycosidisch gebundene Vorläufer der Substanz nur geringfügig abgenommen hatte (Günata et al., 1986). Zoecklein et al. bestätigten diese Untersuchung durch Feststellung der Abnahme von Monoterpen-Glycosiden, welche als freie Monoterpene nicht nachweisbar waren (Zoecklein et al., 1997). Als weiterer Grund der mangelnden Nachweisbarkeit freier Aromastoffe trotz Abnahme der korrespondierenden Aroma-Glycoside wird der Austritt durch CO_2 während der Gärung, insbesondere bei hohen Temperaturen, genannt (Fischer et al., 2001). Ein weiterhin ständig ablaufender Prozess durch den pH des Weines ist die Säurehydrolyse, welche ebenfalls zur Freisetzung der Aroma-Glycoside führt (Sarry und Günata, 2004) und was dementsprechend bei Aussagen zur Ursache der Freisetzung von Aromastoffvorläufern, die ausschließlich anhand von deren Abnahme getroffen werden, beachtet werden muss. Desweiteren führt der geringe Wein-pH zu Umlagerungsreaktionen, insbesondere bei Monoterpenalkoholen und C_{13} -Norisoprenoiden, welche zu anderen freien Aromastoffen als den direkt gebundenen Aromastoffvorläufern führt (Williams et al., 1982). Umlagerungsreaktionen wurden verursacht durch den Metabolismus von *Saccharomyces*-Hefen dokumentiert. Muskateller Fernández-González et al. (2003) beispielsweise beschrieben die Transformation von Geraniol zu Citronellol während der Gärung von. Das wurde von King und Richard Dickinson (2000) bestätigt, die zusätzlich die Bildung von Linalool aus Geraniol und Nerol sowie von α -Terpineol aus Linalool und Nerol nachwiesen. Die Nichtsaccharomyceten *Kluyveromyces lactis* und *Torulaspota delbrueckii* katalysierten ebenfalls diese Transformationen. Carrau et al. (2005) wiesen auch in Abwesenheit von Aroma-Glycosiden als Vorläufer eine Neubildung von Monoterpenen, insbesondere Linalool mit hohem sensorischen Impact sowie α -Terpineol, durch verschiedene Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* während einer Gärung mit Modellmost ohne Sekundärmetabolite nach. Die Autoren hypothetisierten zwei Biosynthesewege in Mitochondrien und Cytosol der Hefen, analog zur bekannten Synthese in Pflanzen. Für eine Vielzahl *Nichtsaccharomyceten*, darunter *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima* und *Candida stellata* ist die Neubildung von Terpenen ebenfalls beschrieben. Zur Verringerung der Aroma-Glycoside während der Gärung wurde desweiteren die Option von Adsorption durch Hefen in Betracht gezogen. Die aufgrund des Farbverlustes während der Gärung von Rotweinen durchgeführte Untersuchung ergab die Adsorption von Anthocyanen durch reversible Interaktion mit der Hefezellwand, die abhängig insbesondere von der Polarität des Anthocyans sowie pH, Temperatur, Ethanol und SO_2 bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes stattfand. Relativ zum Ausgangsgehalt waren abhängig der Polarität 25-50% der Anthocyane adsorbiert (Vasserot et al., 1997). Razmkhab et al. (2002) wiesen die Hefezellwand als verantwortliches Kompartiment für die Adsorption phenolischer Substanzen in gebräunten Weißweinen nach. Der Grad der Adsorption war allerdings stark abhängig von der Art und Konzentration des Polyphenols und das Verfahren insgesamt

ineffektiv. Die Hydroxyzimtsäuren wurden beispielsweise nicht durch Adsorption reduziert, Catechin dagegen beispielsweise signifikant aber absolut vergleichsweise gering bei in leicht gebräuntem Wein von 29,6 mg/L auf 26,5 mg/L sowie in stark gebräuntem Wein von 27,2 mg/L auf 23,8 mg/L. Die Adsorption der die negativen Aromaeindrücke verursachenden flüchtigen Phenole 4-Ethylguaiaicol und 4-Ethylphenol wurde dagegen abhängig von Ethanol, weiteren Weininhaltsstoffen und Autolyse-Grad der Hefezellen als effizient beschrieben (Chassagne et al., 2005b). In einer weiteren Studie extrahierten die Autoren aus Hefezellen nach der Gärung von Modellwein mit Glycosid-Zusatz einen Anteil von 5% der Aroma-Glycoside relativ zum Ausgangsgehalt, womit dieser Effekt einen geringen Anteil an der Abnahme dieser Glycoside insgesamt ausmachte (Chassagne et al., 2005a).

2.3 Wein- und Sektgärung im Kontext glycosylierter Aromastoffe

Analog zur Grundsatzdiskussion bezüglich der genetischen und enzymatischen Ausstattung von *Saccharomyces*-Hefen als Werkzeuge zur Freisetzung der geruchlosen, glycosylierten Form, wird die praktische Bedeutung ihrer Anwendung in der Wein- und Sektbereitung kontrovers diskutiert. Eine Vielzahl von Studien mit zum Teil höchst unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Auswirkungen auf die Chemie und Sensorik zeigen den weiteren Bedarf der Klärung. Zusätzlich ungeklärt bleibt eine reproduzierbare Charakterisierung der verfügbaren *Saccharomyces*-Hefestämme bezüglich des Freisetzungsvermögens von Aromastoffvorläufern. Momentan werden verstärkt *NichtSaccharomyceten* zur Gärung untersucht, um durch vielversprechende Resultate eingesetzt zu werden, ebenso wie Enzympräparate zur Intensivierung des Weinaromas.

2.3.1 Weingärung

Eine begrenzte Zahl an Studien zur Freisetzung der glycosylierten Aromastoffe während der Gärung und die Auswirkung auf die Sensorik von Wein liegen vor. Diese sind sowohl bezüglich der generellen Bedeutung von *Saccharomyces*-Hefen als auch deren stammabhängigen Unterschieden untereinander kontrovers.

Günata et al. (1986) wiesen eine geringfügige Hydrolyse der Monoterpenol-Glycoside während der Gärung von Muskateller-Most mit einem unbenannten *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm nach, der Gehalt des Linalool-Glycosids nahm von Beginn bis Ende der Gärung von 1310 µg/L auf 1154 µg/L ab, der von α -Terpineol von 86 µg/L auf 66 µg/L und der Gesamtgehalt aller Monoterpenvorläufer von 3069 µg/L auf 2687 µg/L. Fischer et al. (2001) zeigten bei der Gärung eines Gewürztraminers und eines Müller-Thurgau mit dem Hefestamm Siha 3 bei 15°C über ca. zwei Wochen eine Abnahme der Glycosyl-Glucose auf ca. 15 bzw. 30% des Ausgangswertes proportional zur Abnahme der Zuckerkonzentration. Delcroix et al. (1994) stellten für drei unbenannte, kommerziell erhältliche *Saccharomyces cerevisiae*-Reinzuchthefestämme während des Gärverlaufes mittels pNPG-Aktivitäts-Assay positive Glycosidase-Aktivität fest. Die hergestellten Weine einer Modellgärung waren chemisch und sensorisch zwischen den Hefestämmen nicht unterschiedlich. Zoecklein et al. (1997) untersuchten den Einfluss von vier *Saccharomyces*-Reinzuchthefestämmen sowie einer Spontangärung mit nativer Hefeflora auf den hergestellten Riesling-Wein. Die nativen Hefen verursachten die signifikant erhöhte Freisetzung der Gesamt- sowie Monoterpen- und Benzolderivat-Glycoside, während zwischen den *Saccharomyces*-Hefen nur geringe Unterschiede unterhalb der Geruchsschwellenkonzentration der Substanzen lagen. Ubeda Iranzo et al. (1998) charakterisierten 74 *Saccharomyces*-Kellerisolate aus der Valdepenas-Region in Spanien und stellten für einige Stämme Esterase- aber keine β -Glucosidase-Aktivität fest. Chassagne et al. (2005a) untersuchten via Glycosyl-Glucose das

Freisetzungsvermögen unterschiedlicher *Saccharomyces cerevisiae*-Hefestämme bei der Fermentation von Chardonnay. Im Ergebnis zeigten die Autoren, dass Unterschiede zwischen den Hefen bestanden, da stammabhängig 17-57% der Gesamt-Glycoside gespalten wurden. Eglinton et al. (2000) untersuchten die Aromaprofile von Chardonnay nach Gärung mit drei unterschiedlichen *Saccharomyces*-Hefestämmen, davon ein Stamm *S. cerevisiae* und zwei Stämme *S. bayanus*. Ein *S. bayanus*-Stamm unterschied sich von den beiden anderen Stämmen in reduzierter Ausprägung der Attribute esterig, Pfirsich und Zitrus, eine Analyse der Aromastoffe lag nicht vor. Ugliano et al. (2006) studierten drei *Saccharomyces*-Hefestämmen unter Verwendung von synthetischen und aus der Rebsorte Gelber Muskateller extrahierten Glycosiden im Modellsystem mit pNPG als Substrat und während einer Gärung. Die Hefen waren zur Spaltung von unter anderem Monoterpen-, C₁₃-Norisoprenoid-Glycosiden fähig, zwischen ihnen bestand ein marginaler Unterschied.

Im Gegensatz dazu wurde durch eine Vielzahl von Studien eindeutig der Einfluss von *Nicht-saccharomyceten* diverser Gattungen, insbesondere *Debaromyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Pichia* und *Kloeckera* sowohl auf die Vorläufer-Freisetzung als auch die Aromausprägung der Weine belegt. Einen guten Überblick gibt die Publikation von Jolly et al. (2014), als Beispiele genannt seien die erhöhte Konzentration der Monoterpene Citronellol, Nerol und Geraniol in Chardonnay-Wein nach kombinierter Gärung aus *Debaromyces pseudopolymorphus* und *Saccharomyces cerevisiae* sowie von diversen Monoterpenen in Muskateller-Wein nach Einsatz von *Debaromyces vanriji* in Kombination mit *Saccharomyces cerevisiae* im Vergleich zur alleinigen Anwendung von *Saccharomyces cerevisiae*. Der Einsatz von Aroma-Enzymen aus filamentösen Pilzen in der Weinbereitung ist ebenfalls beschrieben und führte zur signifikant erhöhten Freisetzung der glycosylierten Aromastoffe sowie Intensivierung des Weinaromas (Binder, 1998; Fischer et al., 2001).

Desweiteren relevant in der Weinbereitung sind Milchsäure-Bakterien, die spontan oder zugesetzt den biologischen Säureabbau (BSA) durchführen. Boido et al. (2002) beobachteten die signifikante Abnahme von Aroma-Glycosiden in Tannat-Weinen bei BSA. Mansfield et al. (2002) charakterisierten mittels pNPG-Assay für sieben Stämme positive Aktivität, allerdings konnten diese Bakterien aus der Rebsorte Viognier extrahierte natürliche Glycoside nicht spalten. Ugliano et al. (2003) untersuchten vier kommerziell erhältliche Stämme von *Oenococcus oeni* im Modellweinen mit zugesetztem Muskateller-Extrakt und wiesen die Hydrolyse von Linalool, α -Terpineol, Nerol und Geraniol nach, wobei sich die Stämme in der Freisetzungsratesignifikant unterschieden.

2.3.2 Sektgärung

Durch das intensive Herstellungsverfahren von Sekt über zwei Gärungen sowie weinrechtlich vorgeschriebenen langen Lagerzeiten auf der Hefe, für Flaschengärung mindestens 90 Tage bei einer insgesamten Produktionsdauer von mindestens 9 Monaten (Bach et al., 2010), ist ein starker Einfluss verschiedener Faktoren auf glycosylierte Aromavorläufer anzunehmen. Desweiteren sind den Sekt als Gesamtprodukt betreffend diverse sensorische und organoleptische Eigenschaften einzuhalten, zu denen neben dem Aroma insbesondere das Mundgefühl durch Schaumqualität und Perlage zählen (Kemp et al., 2015). Für die Sektherstellung im Kontext glycosylierter Aromastoffe allgemein sowie insbesondere bezüglich des Einfluss von Hefen und weiteren Möglichkeiten wie Enzymeinsatz auf deren Freisetzung im Herstellungsprozess herrscht bisher eine geringe Datenlage.

Es gibt bisher wenige Studien, die sich mit dem Hefe-Einfluss auf das Aroma von Sektgrundweinen beschäftigen und keine Daten bezüglich glycosylierter Aromastoffe oder

deren Freisetzung. Die Ergebnisse aus der Stillweinherstellung können vermutlich auf die Anwendung zum Grundwein übertragen werden. Da die Trauben zur Grundweinherstellung für einen höheren Säure- und geringeren Zuckergehalt zum Ziel einer Aromatik von „Frische“ sowie eines geringen Alkoholgehaltes früher geerntet werden, sollte der daraus resultierende geringere Gehalt an Aromastoffvorläufern als Einschränkung beachtet werden (Robinson et al., 2014a). Torrens et al. (2008) verwendeten zur Herstellung von Cava-Grundweinen sechs verschiedene kommerziell erhältliche Hefestämme. Ihre Analysen der Weine ergaben unterschiedliche Konzentrationen an Estern, Alkoholen, Glycerin, mittelkettigen Fettsäuren und Monoterpenen, allerdings wurde keine Untersuchung bezüglich glycosylierter Vorläufersubstanzen durchgeführt. González-Royo et al. (2015) untersuchten den Einfluss von der kombinierten Anwendung der *Nichtsaccharomyces*-Reinzuchtheferpräparate Biodiva (*Torulaspora delbrueckii*) und Flavia (*Metschnikowia pulcherrima*) in Kombination mit einem *Saccharomyces*-Hefestamm in der ersten Gärung zur Herstellung von Cava. Der Grundwein aus der kombinierten Gärung mit Biodiva war durch erhöhte Glycerin- und Proteinbildung zur Schaumstabilität charakterisiert, während Flavia das Aromaprofil zugunsten blumiger und rauchiger Noten veränderte. Die Auswirkungen auf die Schaumweine waren in der Publikation allerdings nicht weiter beschrieben.

Die Auswahl des Hefestammes für die zweite Gärung berücksichtigt insbesondere technologische Kriterien, wie hohe Toleranz gegenüber Ethanol, Druck und gute Absetzeigenschaften. Obligat ist eine gute Autolyse-Kapazität, da durch die Freisetzung von einer Vielzahl von Substanzen die sensorischen und organoleptischen Eigenschaften des Schaumweines wesentlich steigern. Hefen wurden daraufhin im Kontext der Sektherstellung bisher vornehmlich bezüglich der Ausbildung organoleptischer Eigenschaften sowie Optimierung der Autolyse mit einhergehenden Aromaanalysen untersucht. Desweiteren untersucht wurde die Aromaveränderung vom Grundwein zum Sekt (Torresi et al., 2011). Keine der Studien nahm allerdings Bezug zur Freisetzung glycosidisch gebundener Aromastoffe. Einzig die Studie von Ganß et al. (2011) stellte erstmals die Bedeutung der Aromavorläufer für das Sektaroma in einem Aufdotierungsversuch heraus. Die Autoren untersuchten anhand der Rebsorten Chardonnay und Riesling die Aromaveränderungen durch die zweite Gärung und wiesen den aromaintensivierenden Einfluss von Aroma-Glycosiden nach. Mit zuvor extrahierten Aromavorläufer-Extrakten angereicherte Sektgrundweine resultierten im Vergleich zur nicht angereicherten Kontrolle in signifikant aromaintensiveren Sekten, Riesling insbesondere in den Attributen Pfirsich, Holunder und grüne Banane sowie in Chardonnay die Wahrnehmung von Honigmelone. Die aromachemische Analyse zeigte erneut Umlagerungsreaktionen der Aromastoffe auf, da die quantitative Korrelation von zudotierten Aromavorläufern zu freigesetzten Aromastoffen nicht stimmig war. Fischer et al. (2009) stellten für die Rebsorten Chardonnay und Riesling durch die zweite Gärung eine Zunahme der fruchtigen Aromen fest, beim Chardonnay von Honigmelone und Eisbonbon sowie Pfirsich und Apfel und beim Riesling, während die grünen Noten wie grüne Bohne, grünes Gras und grüne Banane abnahmen. Den aromenchemischen Grund für die nach eigener Aussage Veredelung durch die zweite Gärung nannten die Autoren allerdings nicht. Torrens et al. (2010) stellten bei einem Vergleich von Grundweinen und korrespondierenden Cavas der Rebsorten Macabeu, Xarello und Parellada über drei Jahrgänge eine Zunahme der Komplexität des Aromas mit Noten von Brioche und getoastet fest sowie eine Zunahme der C₁₃-Norisoprenoide, Diacetyl und Furane sowie eine Abnahme der Ester. Die Studie beinhaltete keine Analytik der glycosylierten Aromavorläufer. Welke et al. (2014) erstellten nach GCxGC-Analytik ein Profil zur Abgrenzung von Grundweinen und korrespondierenden Sekten der Rebsorte

Chardonnay anhand der flüchtigen Substanzen. Die größten Unterschiede waren durch die C₁₃-Norisoprenoide TDN, Vitispiran und β -Damascenon sowie Ester, Alkohole, Aldehyde, Säuren und Phenole verursacht.

Der Einsatz von Enzympräparaten in der Sektherstellung erfolgt zur verbesserten Autolyse-Fähigkeit durch Spaltung der Hefezellwand bestehend aus Mannoproteinen, Glucan und Chitin und damit einhergehend mit der Freisetzung von Autolyse-Komponenten, in Anwendung wurden beispielsweise die Präparate Lallzyme MMX und Enartis Zym Target aus *Trichoderma sp.* beschrieben (Torresi et al., 2011). Glycosidase-Aktivität wurde bisher für das Bakterium *Oenococcus oeni* bei stattfindendem biologischen Säureabbau beschrieben (Bartowsky und Borneman, 2011).

2.4 Methoden zur Analyse glycosidisch gebundener Aromastoffe

Die Analyse der nicht-flüchtigen Aromastoffvorläufer kann auf verschiedene Wege erfolgen, prinzipiell möglich ist die Messung des intakten Aroma-Glycosids oder des flüchtigen Aglycons sowie des Glycons nach Spaltung.

Bisher bleibt die Messung der intakten Aroma-Glycoside schwer umsetzbar. Die Kenntnisse über deren Struktur sind unzureichend, weswegen kommerziell kaum Standard-Substanzen erhältlich sind und es an Vollständigkeit der Datenbanken bezüglich spektraler Daten zur Identifizierung der Analyten mangelt (Hjelmeland und Ebeler, 2015). Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) bzw. tandem-MS-gekoppelt HPLC-MS/MS werden deshalb selten und ausschließlich zur Analyse von Einzel- oder wenigen Komponenten eingesetzt, bisher konnte zudem ausschließlich die Analyse von Glucosiden durchgeführt werden, da Standards der Disaccharide nicht verfügbar waren. Hayasaka et al. (2010b) identifizierten das Guaiacol- β -D-Glucopyranosid in Traubenmost im Zusammenhang mit durch Buschfeuer verursachte Rauchbelastung der Trauben mittels HPLC-MS/MS. Das Glucosid als Standardsubstanz zur Identifizierung und Quantifizierung synthetisierten die Autoren zuvor selbst. Stanitzek (2014) untersuchte die Bildung von Monoterpen-Glucosiden durch Monoterpenglycosyltransferasen aus *Vitis vinifera*. Die Analyse der Glucoside erfolgte mittels HPLC-MS/MS unter Verwendung der mittels Königs-Knorr-Methode selbst synthetisierten Standardsubstanzen von vier Monoterpen- β -D-Glucosiden, eines Monoterpdiol-Glucosides und eines deuterierten Monoterpen-Glucosides. Die Analyse der Aroma-Glycoside nach Derivatisierung durch Acetylierung, Methylierung oder Silylierung mit anschließender gaschromatographischer (GC-) Trennung gilt insbesondere aufgrund unvollständiger Derivatisierung, Nebenreaktionen und fehlender Standards als ungenau und wird kaum durchgeführt (Hjelmeland und Ebeler, 2015).

Die unspezifische Quantifizierung der Aromastoffvorläufer über die Analyse des Glycons nach säurehydrolytischer Spaltung ist als Glycosyl-Glucose-Methode beschrieben und basiert darauf, dass jedes Aroma-Glycosid ein Molekül Glucose enthält, welches mittels enzymatischer Bestimmung quantifiziert wird (Williams et al., 1995). Mit dieser Methode kann allerdings weder zwischen den Aromastoffen differenziert werden, desweiteren werden alle glycosyliert vorliegenden Substanzen erfasst wie Polyphenole oder Anthocyane. Zoecklein et al. (2000) entwickelten deshalb aus der bestehenden Technik die „phenol-free-GG“-Methode, mit der mittels Folin-Ciocalteu-Assay die Phenol-Glycoside bestimmt und vom Gesamt-GG abgezogen werden. Iland et al. (1996) entwickelten die „red-free-GG“-Methode, bei der spektralphotometrisch die Anthocyane quantifiziert werden um dann vom Gesamt-GG subtrahiert zu werden.

Zur Analyse der Aglycone nach Spaltung des Glycosids wird verbreitet Gaschromatographie (GC), unter einer Vielzahl möglicher Detektoren zumeist an Massenspektrometrie (MS) und mitunter an tandem MS (MS/MS) gekoppelt durchgeführt, da die Methode Analysen komplexer Proben zur Qualifizierung und Quantifizierung der Analyten erlaubt (Robinson et al., 2014b). Die vorherige Spaltung des Glycosids kann säure- oder enzymkatalytisch durchgeführt werden, bei beiden Methoden müssen Nebeneffekte beachtet werden. Die saure Hydrolyse führt mit sinkendem pH zu ansteigenden Umlagerungsreaktionen und Artefakt-Bildung der Aglycone (Williams et al., 1982). Die enzymatische Freisetzung ist abhängig vom eingesetzten Enzympräparat und dessen substratspezifischer Aktivität (Gunata et al., 1990a).

Allgemein sind diese Methoden, zu denen aufgrund der geringen Konzentrationen der Aromastoffe weitere Probenvorbereitung wie Festphasenextraktion (engl. Solid Phase Extraction, SPE), Gegenstromchromatographie (engl. Countercurrent chromatography, CCC) oder präparative HPLC eingesetzt werden, sehr aufwendig (Winterhalter und Skouroumounis, 1997). Neben den genannten GC- und HPLC-Methoden stehen weitere Methoden in der Weinaromastoffanalytik zur Verfügung, wie beispielsweise Kernspinresonanzspektroskopie (engl. Nuclear Magnetic Resonance, NMR), welche bisher insbesondere zur Differenzierung von Weinen anhand Rebsorte, geographische Herkunft und Jahrgang eingesetzt wird (Godelmann et al., 2013), Potential zur quantitativen Analyse von Aroma-Glycosiden zeigte sich bisher alleinig bei IR-spektroskopischen Methoden.

Schneider et al. (2004) stellten eine in der Entwicklung stehende Messmethode mittels Fourier-Transformation-Mittelinfrarot- (FT-MIR)-Spektroskopie zur Quantifizierung der Aroma-Glycoside vor aus Trauben der Rebsorte Melon de Bourgogne vor, die sie in die Gruppen nicht-terpenoide Alkohole, Säuren, C₆-Alkohole, C₁₃-Norisoprenoide, flüchtige Phenole und Monoterpene einteilten. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung wies der aus 39 Proben bestehende Datensatz der Kalibrierung mit einer GC-MS-Referenzmethode vielversprechende Korrelationen für die Quantifizierung der Monoterpen- und C₁₃-Norisoprenoid-Glycoside bei statistischen Vorhersagefehlern von 14 bzw. 15% auf, für die weiteren Substanzgruppen lagen deutlich schlechtere Werte vor. Für Minorkomponenten war bis dahin keine solche Methode bekannt, während NIR- und MIR-Spektroskopie bereits zur Quantifizierung von Majorcomponenten eine breite Anwendung in der Lebensmittelindustrie fand, entsprechend verhielt es sich für Trauben, Most und Wein (Berger, 2013). In Anwendung ist eine FT-MIR-Analytik für Most und Wein zur Bestimmung diverser weinchemischer Parameter wie Glucose, Fructose, Gesamtzucker, Ethanol, Glycerin, Gesamtsäure, pH, Weinsäure, Äpelsäure, Milchsäure, flüchtige Säure, Dichte und zuckerfreier Extrakt zur Bestimmung der Traubenreife und Überwachung der Gärung (Patz et al., 2004) sowie zur Beurteilung der Traubengesundheit unter den Parametern Gluconsäure, flüchtige Säure, Glycerin, Ethanol und dem Glucose/Fructose-Verhältnis (Fischer und Berger, 2006). Diese Methode ist als „Winescan“ (Foss A/S, Hilerød, Dänemark) heute zur amtlichen Prüfung (AP) für einige Weinparameter wie Alkohol, Zucker und Gesamtsäure in Rheinland-Pfalz zugelassen (Patz und Dietrich, 2005). Nieuwoudt et al. (2004) erstellten desweiteren Vorhersage-Modelle zur Bestimmung des Glyceringehaltes für Weine aus gesunden und edelfaulen Trauben und identifizierten mittels multivariater Statistik reduzierende Zucker und Ethanol als Störfaktoren bei der Kalibration. In einer weiteren Studie etablierten sie eine Kalibration zur Bestimmung einiger Hauptgärprodukte verschiedener *Saccharomyces*-Hefen wie flüchtige Säure, Ethanol, Glucose und Glycerin zu deren Charakterisierung (Nieuwoudt et al., 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Experimentelle Weinbereitung

3.1.1 Traubenmaterial

Trauben und Most wurden vom Staatsweingut mit Johannitergut des Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz in Neustadt an der Weinstraße bezogen, in dessen Versuchstechnikum auch die Wein- und Sektbereitung stattfand. Für die Weingärungen im Labormaßstab wurde durch das Weingut Friedolin Schwaab in Kirrweiler pasteurisierter Most eingesetzt. Nach Bentonit-Behandlung und Filtration wurde der Most 1-2 Minuten bei 83 °C erhitzt und anschließend warmsteril gefüllt.

Tab. 3-1: Traubenmaterial, Lesedaten, Mostparameter und Behandlung für die Versuchsgärungen.

Rebsorte/ Variante	Lesetermin	Traubenmaterial	Mostgewicht (°Oe)	Mostsäure (g/L)	Filtration Kohle
Riesling ^a	15.10.2013	40% Botrytis Maschinenlese	89	10,7	Flotation, Filtration 50g/hl
Chardonnay ^a	16.10.2013	Mürbe Handlese, GTP	93	9,1	Filtration 30g/hl
2012 Riesling ^b	10.10.2012	15% Botrytis Maschinenlese	84	8,1	Flotation, Filtration 20g/hl
2013 Riesling (StZt) ^b	21.10.2013	gesund, unreif Handlese 24 h Standzeit	79	10,6	Filtration
2013 Riesling (GTP) ^b	21.10.2013	40% Botrytis, reif GTP	88	10,5	Filtration 60g/hl
2013 Chardonnay (Normalklon) ^b	16.10.2013	mürbe, gesund Handlese GTP	93	9,1	Filtration 30g/hl
2013 Chardonnay (Duftklon) ^{b, c}	17.10.2013	Chdy: mürbe, faul	94	9,1	Filtration 30g/hl
		GwTr: gesund, 14 h Standzeit	85	9,1	Filtration
2013 Muskateller ^b	04.10. 2013	gesund Handlese Standzeit 24 h	73 ^d	8,6	Filtration 10g/hl
Riesling		Sterilmost 2014	90,9	9,0	Bentonit Filtration
Muskateller		Sterilmost 2014	76,5	7,5	Bentonit Filtration

a Weingärung im Versuchsmaßstab

b Versektung in der Flaschengärung

c Chardonnay-Duftklon (terpenreicher Klon): 100L Chardonnay Standardklon+30L Gewürztraminer, rekombiniert da jahrgangsbedingter Ausfall des Duftklons, Versuchsdesing erforderte eine zum Standard-Chardonnay-Klon aromareiche Variante

d angereichert mit 20 g/L Saccharose

3.1.2 Verwendete Hefestämme und Enzympräparat

Die Modellgärungen wurden unter Verwendung von Reinzuchthefestämmen durchgeführt, die direkt über den Hersteller und in Einzelfällen über den Fachhandel (Reinhardt Kellereibedarf GmbH, Deidesheim) bezogen wurden.

Tab. 3-2: In den Modellgärungen verwendete Hefestämme, Art und Hersteller.

Hefestamm	Art	Versuchsteil Modellgärung ^b
IOC 18-2007 ²	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Sekt VMF
Lalvin Biodiva TD ^{a,1}	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	Wein VM
Lalvin CEG ¹	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wein VM
Lalvin CY 3079 ¹	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wein VM
Lalvin DV10 ¹	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Sekt VMF
Lalvin EC1118 ¹	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Wein LM
Lalvin Flavia MP ^{a,1}	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Wein VM
Lalvin ICV D-47 ¹	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wein VM
Lalvin RC 212 ¹	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Sekt VMF
Lalvin R-HST ¹	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wein VM
Lalvin QA23 ¹	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Wein LM, VM
Oenoferm Freddo ²	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Wein LM, VM
Siha Cryarome ³	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wein LM
Siha 4 ³	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Sekt VMF
Siha 7 ³	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wein VM
Uvaferm BC ¹	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Sekt VMF
Uvaferm HPS ¹	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wein VM
Uvaferm 228 ¹	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wein VM, Sekt VMF
Enzympräparat	biol. Herkunft	
AR 2000 ⁴	<i>Aspergillus niger</i>	Wein VM, Sekt VMF

^a Gärung bis ca. 4 % Alkohol dann Überimpfung mit *Saccharomyces* Stamm QA23

^b Maßstab: LM Labormaßstab, VM Versuchsmaßstab, VMF Versuchsmaßstab Flaschengärung

Hersteller: ¹Lallemand Inc., Montreal, Kanada, ²Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim, ³Eaton Begerow GmbH, Langenlonsheim ⁴DSM N.V., Herleen, Niederlande

3.1.3 Modellgärungen im Labormaßstab

Die Modellgärungen im Labormaßstab wurden unter sterilen Bedingungen mit pasteurisiertem Most (Sterilmost) aus 2014 durchgeführt. Beimpfung und Probenentnahme erfolgten unter der Sterilbank (microflow laminar flow workstation, W.H. Mahl Reinraum- und Labortechnik GmbH, Magdeburg) im Labor um den Eintrag fremder Mikroorganismen auszuschließen. Die Hefestämme waren bei der Anzucht einer Einzelklonselektion unterzogen worden und wurden zur Beimpfung ausgezählt. Die Gärungen liefen bei ca. 18 °C in einem Kellerraum. Der Versuch erfolgte in jeweils dreifacher biologischer Replikation der Varianten.

Modellgärung 1 bestand aus je 3 Ansätzen á 5 L pasteurisiertem Riesling-Most, die Ansätze wurden jeweils mit $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL der Hefestämme EC1118 und QA23 beimpft und vergoren. Die Ansätze wurden während der Gärung an Tag 1, 14, 19 und 21 beprobt und es erfolgte neben weiteren weinchemischen Routineparametern die Bestimmung des Glucose-Gehaltes mittels FTIR Winescan, die Quantifizierung der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer mittels GC-MS sowie die relative Genexpression der drei putativ Glycosidase-aktiven Gene mittels qPCR.

Modellgärung 2 erfolgte mit je 3 Ansätzen á 1 L pasteurisiertem Riesling-Most, welche mit $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL der Hefestämme Siha Cryarome und Freddo beimpft wurden. Während des Gärverlaufes sind die weinchemischen Routineparameter bestimmt sowie am Endpunkt der Gärung die Gehalte der Aromastoffvorläufer quantifiziert worden.

Modellgärung 3 bestand aus 3 Ansätzen á 1 L pasteurisiertem Muskateller-Most unter Vergärung mit je $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL der Hefestämme Freddo und Siha Cryarome. Zur kontinuierlichen Messung der weinchemischen Parameter erfolgte die Endpunktbestimmung der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer.

3.1.4 Experimentelle Weinbereitung mit verschiedenen Hefestämmen und Enzym

Die Durchführung der Modellgärungen erfolgte im Versuchstechnikum des DLR Rheinpfalz nicht steril unter praxisnahen Bedingungen. Während der Gärung wurden die weinchemischen Parameter mittels FTIR Winescan bestimmt, die fertigen Weine wurden sensorisch deskriptiv analysiert und die Gehalte glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer mittels GC-MS quantifiziert.

Riesling- und Chardonnay-Most aus 2013 wurde im 25 L Maßstab im Glasballon in jeweils zweifacher biologischer Replikation mit verschiedenen kommerziellen Reinzuchthefestämmen sowie davon jeweils eine Variante zusätzlich mit dem Enzympräparat AR 2000 bei 16 °C vergoren. Die Gärungen mit *NichtSaccharomyceten* sind aufgrund deren geringer Toleranz bis ca. 4% Ethanol mit einer gärstarken *Saccharomyces*-Hefe überimpft worden. Resultat waren acht Chardonnay- und 16 Riesling-Varianten.

Die Moste wurden mit Kaliumhydrogencarbonat (Kalinat, Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim) entsäuert und mit Saccharose auf eine Endkonzentration von 12,5 % Alkohol angereichert. Für den Hefeansatz wurden jeweils 20 g/hl Hefe in 37 °C warmen Wasser unter Beigabe von 30 g/hl Go Ferm (Lallemand Inc., Montreal, Kanada) rehydratisiert und vor der Zugabe zum Most vermehrt. Innerhalb von 10 Minuten wurde der Hefeansatz durch langsame Mostbeigabe auf die Mosttemperatur eingestellt. Entsprechend der während der Gärung kontrollierten Weinparameter kamen als Nährstoffpräparate Diammoniumhydrogenphosphat (Vitamon Combi, Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim) sowie Fermaid K (Lallemand Inc., Montreal, Kanada) zum Einsatz. Für die Enzym-Varianten wurde das Präparat AR2000 nach Ende der Gärung zugegeben. Nach Gärende und Absetzen der Hefe wurden die Weine abgezogen, mit 80 mg/L SO₂ (Solution sulfureuse, La Littorale S.A.S., Servian, Frankreich) geschwefelt und ohne Zutritt von Sauerstoff gelagert. Nach 3 Monaten Lagerzeit erfolgten eine Cross-Flow-Filtration und die Abfüllung der Flaschen.

3.1.5 Experimentelle Sektbereitung mit verschiedenen Hefestammkombinationen und Enzym

Die Durchführung der Modellversektungen erfolgte im Versuchstechnikum des DLR Rheinpfalz nicht steril unter praxisnahen Bedingungen. Während der Gärung der Grundweine wurden die weinchemischen Parameter mittels FTIR bestimmt und der Druckanstieg während der Versektung mittels Manometer kontrolliert. Die fertigen Grundweine und Sekte wurden sensorisch deskriptiv analysiert und die Gehalte glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer mittels GC-MS quantifiziert.

In den Jahrgängen 2012 und 2013 wurden Moste der Rebsorten Chardonnay, Riesling und Muskateller mit verschiedenen Hefestammkombinationen zur Grundwein- und Sektherstellung, sowie jeweils eine zusätzliche Variante unter Einsatz von Enzympräparat AR2000, versektet. Desweiteren ist jeweils eine Kontrolle hergestellt worden, um den Einfluß der sauren Hydrolyse auf die Freisetzung der Aromastoffvorläufer während der Versektung

zu untersuchen. Diese wurden mit Dimethyldicarbonat (Velcorin, Drinkstar GmbH, Rosenheim) stabilisiert und wie die unter Hefezugabe gärenden Varianten gelagert.

Die Grundweinherstellung erfolgte analog zur experimentellen Weinbereitung, allerdings ohne Entsäuerung der Moste, in 34 L bzw. 54 L Glasballon. Die Grundweine wurden beim Abstich mit 40 mg/L SO₂ (Solution sulfureuse) geschwefelt. Die Versektung erfolgte in Flaschen (0,75 L Sektflaschen, grün, 650 g, 297 mm, Flaschen Wittmer GmbH & Co KG, Kirrweiler) nach der Methode der traditionellen Flaschengärung (Méthode Champenoise). Der Grundwein wurde mit 24 g Saccharose/L auf eine Erhöhung um 1,5% Alkohol auf eine Endkonzentration von 12,5 % Alkohol angereichert. Für den Hefeansatz wurden 50 g/hL Hefe mit der zehnfachen Menge Wasser (35°C) versetzt und 15 Minuten stehen gelassen, anschließend 1% angereicherter Grundwein und 5 g Hefenährsalz/hl (Vitamon Ultra, Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim) zum Hefeansatz zudosiert. Der Hefeansatz blieb anschließend 12 h bei 22°C im Brutschrank. Danach wurde der Hefeansatz mit temperiertem Sektgrundwein (2 L/hL) und Wasser (1 L/hL) aufgefüllt und für weitere 6 Stunden bei 22°C belassen. Der Hefeansatz wurde, entsprechend auf das Flaschenvolumen umgerechnet, mit dem Sektgrundwein auf die Flaschen gefüllt und diese mit Kronkorken verschlossen, etikettiert und bei 18-20°C gelagert. Die Kontrolle der Versektung erfolgte über den Anstieg des Drucks mit Manometern, die auf die Sektflaschen geschraubt wurden. Insgesamt blieben die Sekte im Jahrgang 2012 für vier bzw. 2013 für neun Monate auf der Flasche. Nach Ablauf der Zeit wurden die Flaschen in Rüttelpulte eingesetzt, um die Hefe für das spätere Degorgieren im oberen Flaschenhals zu sammeln. Über 21 Tage wird dabei unter „rütteln“, d.h. eine tägliche kleine Drehung der Flaschen um ein Zehntel, der Winkel der Flaschen im Pult von fast waagrecht bis fast senkrecht verändert. Die Sekte wurden warm degorgiert (Sektkellerei Am Turm Deidesheim-Speyer GmbH, Speyer). Durch Öffnen des Kronkorkens der waagrecht gehaltenen Flasche beförderte der in der Flasche aufgebaute Druck den Hefepfropf mit einem Teil der Flüssigkeit in einen Auffangbehälter. Die Sekte wurden anschließend mit 80 mg/L SO₂ geschwefelt. Um die Restsüße der Sektvarianten innerhalb einer Rebsorte anzugleichen, wurde gegebenenfalls über die betriebsintern vertrauliche Dosage, welche vor allem Wein und Zucker enthält, angereichert.

3.1.5.1.1 Versektung 2012

Die Versektung 2012 erfolgte ausgehend von Riesling-Most, der im Staatsweingut mittels Ganztraubenpressung (GTP) verarbeitet worden war. Die erste und zweite Gärung erfolgte jeweils mit den Hefestämmen U228 und RC212, so dass vier Sektvarianten aus den Kombinationen entstanden. Die Bezeichnungen wurden analog weiter verwendet.

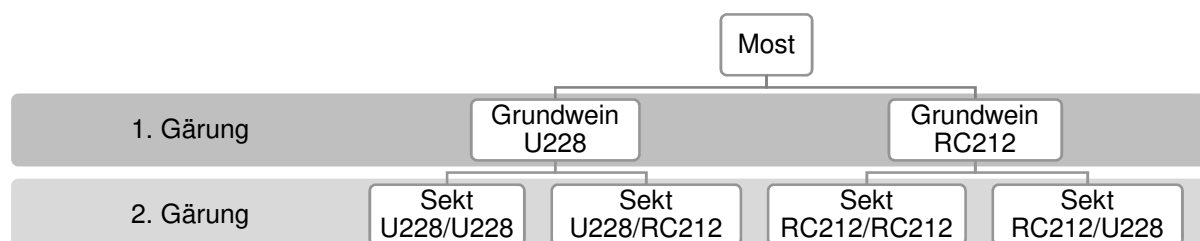


Abb. 3-1: Schema der experimentellen Sektbereitung in 2012.

3.1.5.1.2 Versektung 2013

Die Versuche in 2013 wurden mit den Rebsorten Chardonnay, Riesling und Muskateller durchgeführt, die durch verschiedenen hohe Ausgangsgehalte glycosidisch gebundener

Aromastoffvorläufer charakterisiert sind. Zur zusätzlichen Variation des natürlichen Ausgangsgehaltes an Vorläufern wurde das Ausgangstraubenmaterial innerhalb der Rebsorten unterschieden. Beim Chardonnay umfasste die Erzeugung der Grundweine und Sekte sowohl die Verarbeitung eines Standardklones, als auch eines aufgrund höherer Gehalte an Monoterpenen charakterisierten, aufgrund Ernetausfalls aus Chardonnay und Gewürztraminer rekombinierten, Duftklones und beim Riesling wurde für zwei verschiedene Traubenpartien eine Ganztraubenpressung sowie eine Standardpressung mit anschließender 24stündiger Maischestandzeit durchgeführt. Die erste und zweite Gärung erfolgte unter Verwendung verschiedener Hefestamm-Kombinationen zur Herstellung von Grundweinen und Sekten, so dass für jede Rebsorte zwei Grundwein-Varianten und acht Sekt-Varianten entstanden (s. Tab. 3-3), der Aufbau ist analog zu dem aus der Versektung in 2012 zu verstehen. Unter Einsatz des Enzympräparates AR2000 zur zweiten Gärung entstand eine zusätzliche Variante für jede Hefekombination. Das Enzym wurde mit der Tirage vor der zweiten Gärung eingesetzt (3 g/hL).

Tab. 3-3: In der Versektung 2013 verwendete Kombinationen der Hefestämme.

Chardonnay	Duftklon/Standzeit		Normalklon/GTP	
1. Gärung	DV 10	BC	DV 10	BC
2. Gärung	IOC 18-2007	BC	IOC 18-2007	BC
	BC		BC	
	Siha 4		Siha 4	
Riesling	Standzeit 24 h/unreif		GTP/reif	
1. Gärung	DV 10	IOC 18-2007	DV 10	IOC 18-2007
2. Gärung	IOC 18-2007	IOC 18-2007	IOC 18-2007	IOC 18-2007
	BC		BC	
	Siha 4		Siha 4	
Muskateller	ohne Variation des Traubenmaterials			
1. Gärung	DV 10		BC	
2. Gärung	DV 10	BC	DV 10	BC

3.1.6 Analyse der Traubenverarbeitung

3.1.6.1 Maischestandzeit

Gesundes Traubenmaterial der Rebsorten Riesling, Muskateller und Gewürztraminer wurde nach Entrappen eingemaischt und für 24 Stunden abgedeckt in der Presse stehen gelassen. Die Aromastoffvorläufer der nach 4, 8, 12, 16, 20 und 24 Stunden entnommenen Proben wurden mittels GC-MS quantifiziert.

3.1.6.2 Pressfraktionen

Trauben der Rebsorten Riesling, Muskateller und Gewürztraminer wurden nach Entrappen, mit oder ohne Absolvieren von Standzeit von 24 Stunden, mit einer Willmes-Presse (Willmes Anlagentechnik GmbH, Lampertheim) bei ansteigenden Druckstufen gepresst und der entstandene Most der jeweiligen Fraktionen mittels GC-MS analysiert. Die erste Fraktion, der Vorlauf, repräsentiert den freien Saftablauf der Maische, die folgenden Fraktionen entstehen durch steigende Druckstufen bis 1,5 bar.

3.2 Routineanalytik

3.2.1 Fourier Transformation Infrarot Spektroskopie (FTIR)

Die Bestimmung der weinchemischen Routineparameter (s. Tab. 3-4) erfolgte mittels Foss WineScan FT120 (Foss A/S, Hilerød, Dänemark), mit den für die Most- und Weinmatrix

kalibrierten Programmen Grape- und WineScan. Zur Probenvorbereitung wurde, wenn notwendig, Zentrifugation zur Entfernung von Hefetrub sowie Ausschütteln zum Ausgasen von vorhandenem CO₂ durchgeführt.

Tab. 3-4: FTIR-Messprogramme mit deren Anwendung und erfasste Parameter.

Grape Scan (Most, bis 40 g/ L Ethanol)	Wine Scan (Wein, ab 40 g/ L Ethanol)
Dichte	Dichte
Ethanol	Ethanol
Glucose	vergärbare Zucker
Fructose	Glucose
Titrierbare Gesamtsäure	Fructose
pH	Titrierbare Gesamtsäure
flüchtige Säure	pH
Weinsäure	flüchtige Säure
Äpfelsäure	Weinsäure
Gluconsäure	Milchsäure
Glycerin	Äpfelsäure
NOPA	Zitronensäure
NH ⁴⁺	Glycerin
	zuckerfreier Extrakt
	NOPA
	NH ⁴⁺

3.2.2 Bestimmung von Schwefeldioxid (SO₂)

Die Sicherstellung der mikrobiologischen Stabilität erfolgte über die Gabe von Schwefeldioxid (Solution sulfureuse, La Littorale S.A.S., Servian, Frankreich), das als Gesamtschwefeldioxid in freier und gebundener Form vorliegen kann. Grundsätzlich wurden Grundweine auf 40 mg/L sowie Weine und Sekte auf 80 mg/L SO₂ eingestellt. Freie und gesamte SO₂ und Reduktone wurden im Analyse-Labor des DLR Rheinpfalz nach der Normmethode OIV MA-E-AS323-04-DIOSOU mittels iodometrischer Titration nachbestimmt, da Reduktone, pH, Temperatur den Status des SO₂ beeinflussen.

3.2.3 Zellzahlbestimmung der Hefen

Vor Beimpfung der Modellgärungen erfolgte die Bestimmung der Hefezellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe) unter dem Mikroskop (Typ BHT, Olympus, Hamburg), die Ermittlung der lebend-tot-Zellzahl wurde optional über Anfärbung mit 10% Methylenblau-Lösung durchgeführt.

3.3 Glycosyl-Glucose-Assay und Analyse von Zuckern

3.3.1 Glycosyl-Glucose-Assay

Der Glycosyl-Glucose-Assay (GG-Assay) ist eine Methode zur indirekten quantitativen Bestimmung von glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufern nach Williams et al., 1995. Jedes Glycosid enthält immer genau ein Molekül D-Glucose, d.h. ein Mol eines Aromastoffes ist mit einem Mol D-Glucose verbunden. Aufgrund dieses bekannten Verhältnisses wird über enzymatische D-Glucose-Bestimmung auf den Gehalt an Aglyconen umgerechnet und die Summe aller glycosidisch gebunden vorliegenden Stoffe erfasst. Es kann damit keine Zuordnung der Aromastoffe erfolgen, zudem schließen die Resultate neben den Aromastoffen weitere Substanzen, wie beispielsweise Polyphenole, mit ein.

Materialien und Durchführung

Tab. 3-5: Materialien für den GG-Assay.

Glucose Test-Kit:	Enzytec fluid D-Glucose (R-Biopharm AG, Darmstadt)
Standard:	Standard-Testlösung Deutsche Weinanalytiker (Deutsche Weinanalytiker e.V., Aspisheim)
Säurehydrolyse:	2,25 mol/L Schwefelsäure-Lösung (AppliChem GmbH, Darmstadt)
Enzymatische Hydrolyse:	14 mg Enzympräparat AR 2000/Probe
Kontrolle	H ₂ O deion.

Die Aromastoffvorläufer wurden über SPE und aufgereinigt, anschließend erfolgte die hydrolytische Spaltung der Glycoside über saure Hydrolyse (0,5 ml Eluat mit 1 ml 2,25 mol/L Schwefelsäure-Lösung, 1h bei 100°C) oder enzymatische Hydrolyse AR2000 (14 mg Enzympräparat/Pellet in 300µl Phosphat-Citrat-Puffer, 16h bei 40°C). Für SPE und enzymatische Hydrolyse wurde vorgegangen wie in Kap. 3.4.2 und 3.4.3 beschrieben. Kontroll-Lösungen (jeweils Eluate mit H₂O deion.) dienen der Bestimmung eventuell frei vorhandener Glucose. Nach Abkühlen der Proben auf RT erfolgte die enzymatische Bestimmung der freigesetzten Glucose mit dem EnzytecTM fluid D-Glucose-Kit am Automaten Konelab Arena 7.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

D-Glucose wird durch das Enzym Hexokinase zu D-Glucose-6-Phosphat umgesetzt. Danach findet in Anwesenheit von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase eine Oxidation von D-Glucose-6-Phosphat zu D-Gluconat-6-Phosphat statt. Dabei wird NADP⁺ zu NADPH reduziert. Die Menge an gebildetem NADPH entspricht der Menge an Glucose, die umgesetzt wird und wird bei $\lambda=340$ nm photometrisch (Photometer Nanocolor UV/vis, Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren) gemessen

Der ermittelte D-Glucose-Gehalt (in mg/L) wird über die molare Masse ($M=180,16$) in die Teilchenzahl umgerechnet (in µmol/L). Das sogenannte Aromapotential wird als Glycosyl-Glucose in µmol/L angegeben. Die Kalibration erfolgte über den Glucose-Gehalt der zertifizierten Standard-Testlösung der Deutschen Weinanalytiker (Deutsche Weinanalytiker e.V., Aspisheim, Deutschland).

3.3.2 Analytik von Zuckern

3.3.2.1 Molisch-Test

Als allgemeiner Zuckernachweis diente die Reaktion nach Molisch (Acker, 1967a). Aus Pentosen und Hexosen bildet sich unter Zugabe von starker Säure durch intramolekulare Dehydratisierung Furfural bzw. 5-Hydroxymethylfurfural, welche mit α -Naphthol zu einem violetten Triphenylmethanfarbstoff kondensieren.

Zur Probe im Reagenzglas werden einige Tropfen Molisch-Reagenz (10% α -Naphthol in acetonfreiem Alkohol, hier Ethanol absolut, beides Carl Roth, Karlsruhe) gegeben, dieses eventuell im Ultraschallbad oder Wärmebad gelöst. Bei schräg gehaltenem Reagenzglas wird vorsichtig mit konzentrierter Schwefelsäure (AppliChem GmbH, Darmstadt) unterschichtet. Bei rotvioletter Ringbildung bzw. nach vorsichtigem Schütteln violetter Färbung ist die Probe positiv, während ein negatives Ergebnis durch eine leicht gelbliche Färbung angezeigt wird.

3.3.2.2 Dünnschichtchromatographie

Der qualitative Nachweis der Zucker erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) (Acker, 1967b). Die Zucker werden dünnschichtchromatographisch getrennt und anhand

ihrer Laufweite ($r_f = \text{Probenspot/Laufmittelfront}$) und der nach Umsetzung mit den Sprühreagenzien charakteristischen Färbung identifiziert.

Materialien und Durchführung

Tab. 3-6: Materialien für die DC.

DC-Platten:	Fertigplatten 10x20 cm (Macherey Nagel, GmbH & Co. KG, Düren) behandelt mit 1% Natriumazid-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe)
Laufmittel:	n-Butanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) / Eisessig (neoLab Migge GmbH, Heidelberg)/ deion. Wasser (8:3:3 (v/v)), immer frisch anzusetzen
Sprühreagenz 1:	10 g Trichloressigsäure (Bayer AG, Leverkusen), 5 g Phthalsäure (Fluka, Buchs, Schweiz), 1,2 g p-Aminohippursäure (Carl Roth, Karlsruhe) in 200 ml Ethanol (96 vol.%, Carl Roth, Karlsruhe), Haltbarkeit 1 Woche in dunkler Flasche im Kühlschrank
Sprühreagenz 2:	15 g Harnstoff (Riedel-de Haen AG, Seelze) in 45 ml Salzsäure (2 mol/l, AppliChem GmbH, Darmstadt), Haltbarkeit 2 Tage
Standardlösungen:	je 0,2 g Glucose, Fructose und Saccharose (einzeln und mix, alles Merck KGaA, Darmstadt) auf 50 ml Ethanol (20 vol.%)

2-10 μl der Proben sowie 5 μl der Standardlösungen werden mittels Kapillare (Megabore GC-Säule, Phenomenex Inc., Torrance, USA) auf die DC-Platte aufgetragen. Die Platte wird in einer Glaskammer mit dem Laufmittel bis zu einer Laufhöhe von ca. 10 cm stehen gelassen, anschließend an der Luft unter dem Abzug trocknen gelassen und nachfolgend zunächst mit Reagenz I besprüht und 15 min bei 135 °C im Trockenschrank erwärmt. Die noch heißen Platten werden danach mit Reagenz II besprüht und erneut auf 135 °C erwärmt. Nach einigen Minuten ist die charakteristische Färbung erkennbar (s. Tab. 3-7).

Tab. 3-7: Qualifizierung der Zucker anhand Laufhöhe und Färbung mittels DC.

Zucker	Laufhöhe	Reagenz I	Reagenz II
Glucose	mittig	rotbraun	braunrot
Fructose	oben	bräunlich	graublau
Saccharose	unten	bräunlich	grauschwarz

3.4 Aromastoffanalytik mittels SPE/GC-MS

Die Untersuchung der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer erfolgte in Anlehnung an publizierte Methoden. Die Gesamtmethode basiert auf dem Protokoll von Schneider et al. (2004) und Ibarz et al. (2006), das GC-MS-System für Injektion großvolumiger Proben wurde in Anlehnung von Magni und Porzano (2003) eingerichtet. Nach Festphasenextraktion und enzymatischer Hydrolyse der Aroma-Glycoside erfolgte die Analyse der freigesetzten Aromastoffe mittels GC-MS unter Anwendung des Stabilisotopenverdünnungs-Assay. Die einzelnen Schritte werden in den folgenden Unterkapiteln näher erläutert. Die Moste, Weine, Sektgrundweine und Sekte sind über die gesamte Dauer der Arbeit laufend gemessen worden. Um den Nebeneffekt der Säurehydrolyse der Aromavorläufer so gering wie möglich zu halten wurden die Proben schnellstmöglich zu den entsprechenden Versuchen analysiert.

Es wurden insgesamt 24 glycosidisch gebundene Aromastoffe quantifiziert, welche den Substanzgruppen Monoterpene, C₁₃-Norisoprenoide, C₆-Alkohole, aromatischen Alkoholen und flüchtigen Phenolen zugeordnet wurden, ähnlich ist die Einteilung bei Schneider et al. (2004) vorgenommen worden. Durch diese Gruppierung konnte auch bei zusammengefasster Darstellung neben der strukturellen Verwandtschaft zusätzlich dem hervorgerufenen Geruchseindruck Rechnung getragen werden. Es handelte sich bei allen Einzelsubstanzen um die direkten Vorläufer und nicht um Umlagerungsprodukte.

3.4.1 Chemikalien und Referenzsubstanzen

Tab. 3-8: Liste der verwendeten Chemikalien und Referenzsubstanzen.

Chemikalie	CAS-Nr.	Reinheit	Bezugsquelle
Dichlormethan	75-09-2	≥ 99,9 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>n</i> -Hexan	110-54-3	≥ 95 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	67-56-1	≥ 99,9 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Wasser (deionisiert)	7732-18-5	Hergestellt mit der Anlage Purelab flex, Elga Labwater, High Wycombe, UK.	
PVPP	9003-39-8	110 µm ^a	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumsulfat	7487-88-9	≥ 98 %	VWR International, Leuven, Belgien
<i>n</i> -Hexanol	111-27-3	≥ 98 %	Fluka, Buchs, Schweiz
Linalool	78-70-6	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
trans/cis-Linalooloxid (fur)	60047-17-8	≥ 97 %	Fluka, Buchs, Schweiz
β-Damascenon	23726-93-4	92 %	Haarmann&Reimer (jetzt Symrise), Holzminden
2-Phenylethanol	60-12-8	99 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
4-Ethylguaiaicol	2785-89-9	≥ 98 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
<i>d</i> 13- <i>n</i> -Hexanol	204244-84-8	99,2 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg
<i>d</i> 5-Linalool	159592-39-9	1,47 µg µl ^{-1 c1}	Synthese DLR Rheinland und TU Braunschweig ^b
<i>d</i> 5-trans-Linalooloxid (fur)		3,41 µg µl ^{-1 c1}	Synthese DLR Rheinland und TU Braunschweig ^b
<i>d</i> 4-β-Damascenon		12,5 mg ml ^{-1 c2}	Synthese DLR Rheinland ^d
<i>d</i> 5-2-Phenylethanol	35845-63-7	99,6 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg
<i>d</i> 3-4-Ethylguaiaicol	204244-84-8	99,2 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg
<i>n</i> -Decan	124-18-5	≥99,8%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Octyl-β-D-glucopyranosid	29836-26-8	≥ 98 %	Fluka, Buchs, Schweiz
Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5:			
Natriumhydrogenphosphat	10028-24-7	≥ 98 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumcitratdihydrat	6132-04-3	≥ 99 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
AR2000	s. Tab. 3-2		

a Partikelgröße

b nach Klein et al. (1964)

c1 Konzentration der Stammlösung in Hexan/Dichlormethan

c2 Konzentration der Stammlösung in *n*-Pentan/MTBE

d nach Kotseridis et al. (1998)

3.4.2 Automatisierte SPE

Die Festphasenextraktion (engl. solid phase extraction, SPE) der Proben erfolgte an den Extraktionssäulen Lichrolut EN (500 mg in 6 ml PP-Kartuschen, Merck, Darmstadt) bzw. im Laufe der vorliegenden Arbeit zu späterem Zeitpunkt am gleichwertigen Material Bekolut EN (500mg in 6 ml PP-Kartuschen, Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe), ein Polymermaterial zur Adsorption polarer und unpolarer Substanzen welches für Aromavorläufer als am besten geeignet getestet wurde (Ibarz et al., 2006; Stanitzek, 2014). Aufgrund des großen Probenaufkommens im Projekt und der notwendigen bestmöglichen Wiederholbarkeit wurde dieser zeit- und arbeitsintensive Schritt automatisiert. Es kamen zwei verschiedene Geräte zum Einsatz: das Roboter-System GX-271 ASPEC (Gilson Inc., Middleton, USA) und das System SmartPrepExtractor (Horizon Technology, Salem, USA), s. Abb. 3-2. Beide arbeiteten reproduzier- und vergleichbar, aufgrund der zuverlässigeren und praktikableren Handhabung wurde das zweite System als das Bevorzugte eingestuft. Zu beachten war ein

höheres benötigtes Ausgangsvolumen an Probe, da die Geräte technisch bedingt Totvolumen verursachen, konkret für Gerät GX-271 ASPEC 50 ml, bei Gerät SmartPrepExtractor 10 ml, was in der Probenvorbereitung beachtet werden musste.

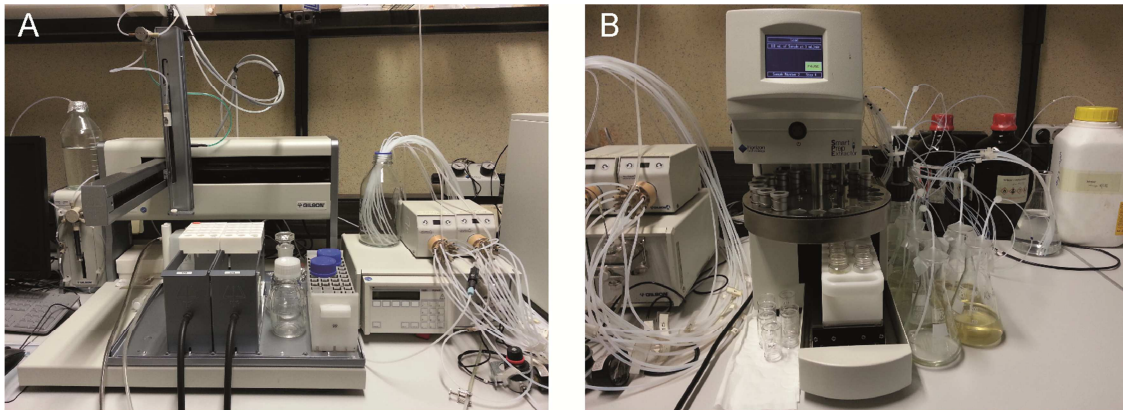


Abb. 3-2: SPE-Roboter-Systeme GX-271 ASPEC (A) und SmartPrepExtractor (B).

Die Extraktion der Aromavorläufer erfolgte aus 100 ml Probe nach Vorbereitung, und wurde nach Optimierung in Anlehnung an die Arbeitsvorschrift von Schneider et al. (2004) durchgeführt (s. Tab. 3-9). Die Wiederfindung der gesamten Aufarbeitung wurde über die Zugabe des internen Standards Octyl- β -D-Glucopyranosid über die spätere Quantifizierung des Hydrolyseproduktes *n*-Octanol kontrolliert.

Tab. 3-9: Arbeitsvorschrift Probenvorbereitung und Festphasenextraktion der Aromastoffvorläufer.

1	100 ml ¹ Probe, Zugabe von 10 μ g/100ml ² ISTD Octyl- β -D-Glucopyranosid
2	Zugabe von 1 g/100ml PVPP, 10 min rühren
3	Filtration über Büchnertrichter und Papierfilter unter Verwendung einer Vakuumpumpe
4	Konditionieren der SPE-Säule: 10 ml Hexan/Dichlormethan (2:1), 10 ml MeOH, 20 ml H ₂ O deion.
5	Probenaufgabe auf die SPE-Säule, Tropfgeschwindigkeit 3ml/min
6	Waschschritt 30 ml H ₂ O deion.
7	Trocknen unter N ₂ - oder Luftstrom ³ , 30 min
8	Waschschritt 15 mL Hexan/Dichlormethan (2:1)
9	Elution 10 ml MeOH

¹ bei automatisierter Aufarbeitung geräteabhängig Totvolumen zusätzlich

² errechnete Zielkonzentration, variiert je ISTD-Ansatz

³ bei Automatisierung technisch nur unter Luftstrom realisierbar

3.4.3 Enzymatische Hydrolyse und Extraktion der hydrolysierten Aromastoffvorläufer

Das nach Festphasenextraktion erhaltene methanolische Eluat wurde mittels Rotationsverdampfer (Vacuubrand GmbH & Co KG, Wertheim) vollständig bis zum Pellet eingengt und die Proben anschließend mit dem Enzympräparat AR2000 hydrolysiert. Die freigesetzten Aromastoffe wurden nach Extraktion mit deuterierten Standards sowie *n*-Decan als Injektionskontrolle zur späteren Analyse mittels GC-MS für großvolumige Injektionen versetzt. Die genaue Versuchsvorschrift s. in der folgenden Tab. 3-10.

Tab. 3-10: Enzymatische Hydrolyse und Extraktion der hydrolysierten Aromavorläufer.

1	Einengen des methanolischen Eluats mittels Rotationsverdampfer
2	Lösen des Pellets in 200 µl Phosphat-Citrat-Puffer
3	Waschschritt mit Hexan/Dichlormethan (2:1), 3x1 ml
4	Lösen von 14 mg/100 µl Enzympräparat AR2000 in Phosphat-Citrat-Puffer, Zugabe zur Probe
5	Inkubation im Trockenschrank bei 40°C für 16h
6	Nach Abkühlen auf RT Zugabe der d-ISTD-Lösung ¹
7	Extraktion der hydrolysierten Vorläufer mit 3x1 ml Hexan/Dichlormethan (2:1), organ. Phase überführen
8	Trocknen über MgSO ₄ , überführen in GC-vials

¹s. Tab. 3-13

3.4.4 GC-MS mit Large-Volume-Injektion

Zur Analytik der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer wurde eine Methode zur großvolumigen Injektion etabliert, da die Quantifizierung der höchst unterschiedlichen Gehalte der chemisch diversen Vorläufer gewährleistet werden konnte. Diese können beispielsweise abhängig von der Rebsorte stark variieren, desweiteren werden durch die Vielfalt an Aromastoff-Vorläufern in Most und Wein weite Konzentrationsbereiche abgedeckt. Mit der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methode konnten durch Injektion von 22 µl Probe bei Einsparung weiter Aufkonzentrierungsschritte Minor Komponenten quantifiziert werden, zudem bei Verdünnung der Probe um 1:10 in einem zweiten Lauf ohne Umbaumaßnahmen am Gerät Major Komponenten unter Umgehen von Detektorsättigung. Dazu wurden das gesamte GC-MS-Meßsystem sowie die Injektionstechnik in Anlehnung an Magni und Porzano (2003) angepasst (s. Abb. 3-3).

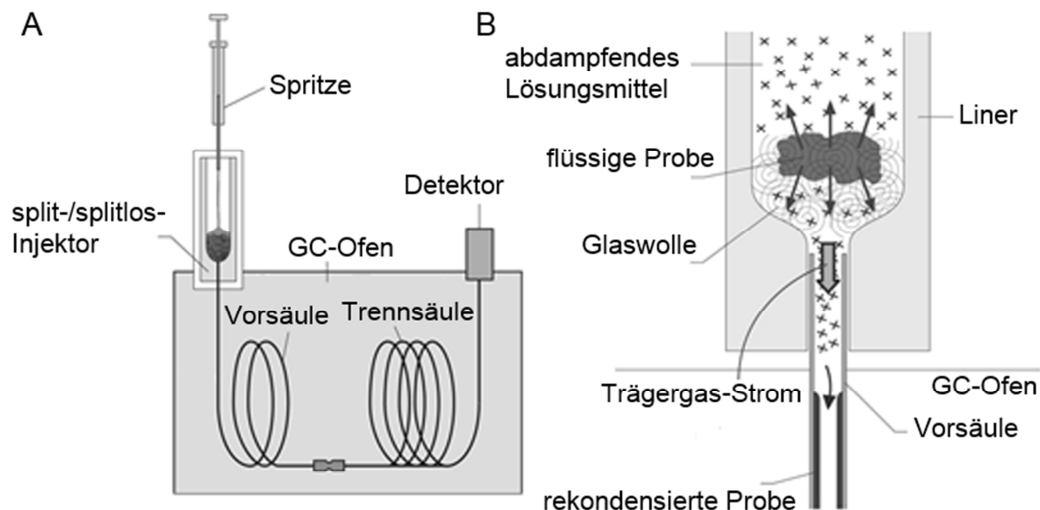


Abb. 3-3: GC-MS-Messsystem für großvolumige Injektionen, Gesamtaufbau (A) und Injektion großvolumiger Proben in den gepackten Liner (B), nach Magni und Porzano (2003).

Das System bestand aus dem Autosampler AS 3000 und einem Trace GC Chromatographen, gekoppelt an ein Trace GC Massenspektrometer (beides Thermo Fisher Scientific, früher Finning, Waltham, USA). Die Injektion der großvolumigen Probe von 22 µL erfolgt schnell als flüssige Bande („jet injection“), benetzt den mit Glaswolle und Carbofrit gepackten split-splitlos-Liner und erreicht dann durch die Temperatur des Injektors von 220 °C den gasförmigen Zustand. Das 30 Sekunden geöffnete Splitventil führte zum Entweichen überschüssigen Lösungsmittels, welches störende Signale im Chromatogramm verursachte.

Das Kapillarsystem bestand aus einer desaktivierten Vorsäule (4 m x 0.53 mm i.D., phenylmethylsilyliert, Phenomenex Inc., Torrance, USA) gekoppelt an eine polare analytische Trennsäule (ZB-Wax, 30 m x 0.25 mm i.D., Belegung 0.5µm, Phenomenex Inc., Torrance, USA). Als Trägergas diente Helium unter konstantem Druck von 75 kPa. Durch die anfängliche Temperatur des Gaschromatographen von 47 °C knapp unter dem Siedepunkt des Trägerlösungsmittels Hexan/Dichlormethan rekondensierte die Probe in der Vorsäule und die Analyten wurden durch solvent trapping-Effekte fokussiert. Das System wurde nach 8 Minuten Isotemperatur bei einem Temperaturanstieg von 5° min⁻¹ auf 240°C geheizt, was 15 Minuten gehalten wurde. Die Detektion der Analyten erfolgte über das Massenspektrometer im TIC-Modus. Die Zusammenfassung der Parameter des Systems s. folgende Tab. 3-11.

Die Qualität der Trennsäule wurde regelmäßig mittels Grob 1-Test für polare Säulen überprüft (Grob et al., 1981). Als Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Injektion wurde *n*-Decan als Standard mitgeführt, welches chromatographisch anhand Retentionszeit ausgewertet wurde.

Tab. 3-11: GC-MS-Parameter zur Analyse glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer.

Autosampler AS 3000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)	
Injektion	22 µl, flüssig
Injektor	Temperatur: 220°C Liner: splitlos, gepackt (desaktivierte Glaswolle + Carbofrit®), i.D. 4mm Split: 30 s splitlos, dann Splitfluss 12 ml/min
Trace GC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)	
Trennsystem	Vorsäule: 4 m x 0.53 mm i.D. phenylmethylsilyliert (Phenomenex Inc., Torrance, USA) Trennsäule: ZB-Wax 30 m x 0.25 mm i.D. Belegung 0.5µm (PEG) (Phenomenex Inc., Torrance, USA)
Temperaturprogramm	47°C (8min), 5°/min 240°C (15 min)
Trägergas	Helium Isobar mit 75 kPa
Trace MS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)	
MS	Temp. der Ionenquelle: 230°C EI+; 70eV, TIC (<i>m/z</i> = 29-350);
Quantifizierung	extracted ions; deuterierte interne Standards

Die folgende Abb. 3-4 zeigt den Effekt der unterschiedlichen Injektionsvolumina. Es war nicht möglich, Minorcomponenten durch eine gewöhnliche Injektion von 2 µl zu quantifizieren (Abb. 3-4, A). Die großvolumige Injektion von 22 µl unter Verwendung des oben beschrieben etablierten Systems führt dagegen zur Auswertbarkeit dieser gering konzentrierten Analyten, allerdings erreichen Majorcomponenten eine Sättigung des Detektors (Abb. 3-4, B). Die Verdünnung der Proben um 1:10 und erneute Messung nach Injektion von 22 µl löste das Problem (Abb. 3-4, C).

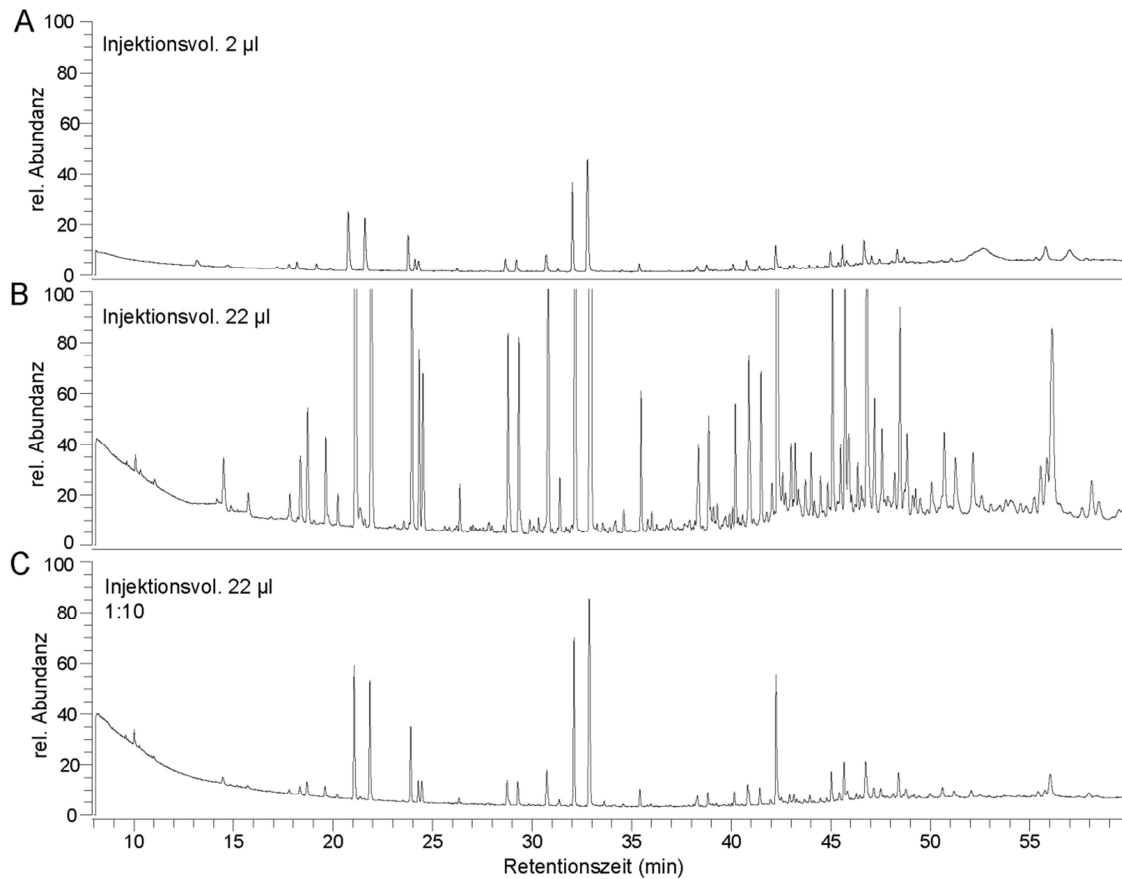


Abb. 3-4: Chromatogramme bei Anwendung unterschiedlicher Injektionstechniken der Volumina von 2 µl (A), 22 µl (B) und 22 µl bei 1:10 Verdünnung (C) am Beispiel eines Airén-Weines.

3.4.5 Quantifizierung mit Stabilisotopenverdünnungsassay (SIVA) und Validierung

3.4.5.1 Vorgehen der Quantifizierung, Standards und massenspektrometrische Parameter

Die Quantifizierung der Analyten erfolgte über den Vergleich der Massenspektren mit den Datenbanken mainlib (National Institute of Standards Technology, NIST) und aroma (Institut für Lebensmittelchemie, TU Braunschweig) sowie über die Kováts-Indices, welche über Interpolation einer gemessenen *n*-Alkanreihe nach van Den Dool und Kratz (1963) mittels eines für Microsoft verfügbaren Excel-Makros (Autoren: Sebastian Ganß, Theodoros Potouridis, Abteilung Oenologie, DLR Rheinpfalz) berechnet wurde. Die Quantifizierung wurde unter Anwendung des Stabilisotopenverdünnungsassay (SIVA) durchgeführt. Die 24 zu bestimmenden Aromastoffvorläufer waren strukturell fünf Substanzgruppen zugeordnet worden, für je eine bzw. im Fall der Monoterpene zwei Substanzen je Gruppe wurde unter Verwendung des jeweiligen Isotopologen eine externe 5-Punkt-Kalibration erstellt und zur Quantifizierung der gruppenzugehörigen weiteren Analyten verwendet. Zur Quantifizierung wurde jeweils der Quotient der Peakflächen von Analyt zu dem gruppenzugehörigen deuterierten Standard bestimmt und das Flächenverhältnis in die entsprechende umgestellte Kalibrierfunktion als *y*-Wert eingesetzt um die zu quantifizierende Konzentration als *x*-Wert zu erhalten. Die Kalibrationen waren lineare Kalibrierfunktionen und wurden im Verlauf nie durch den Koordinatenursprung gezwungen. Sie wurden in regelmäßigem Abstand bei Abweichungen der Kontrollprobe erneuert sowie generell bei der Wartung des Gerätes.

Die Qualität der Quantifizierung wurde über einen Kalibrierstandard im mittleren Konzentrationsbereich während der Messserien kontrolliert. Als Detektionslimit (engl. limit of

detection, LOD) und Quantifikationslimit (engl. limit of quantification, LOQ) wurde eine Peakhöhe 3fach über der Basislinie festgelegt nach Boqué und Heyden (2009). Die Methode wurde über eine Quantifizierung aufdotierter Proben bekannter Konzentration nach López et al. (2002) validiert.

Für die Monoterpene, deren Konzentrationen sich über einen weiten Konzentrationsbereich erstrecken, wurden zwei Standards ausgewählt. Für die höher konzentrierten Substanzen wurde eine Kalibrierung mit trans-Linalooloxid (furanoid) erstellt, als deuterierter interner Standard diente *d5*-trans-Linalooloxid. Für die geringer konzentrierten Analyten wurde Linalool mit *d5*-Linalool als deuteriertem Standard eingesetzt. Die Quantifizierung der C₆-Alkohole erfolgte über *n*-Hexanol mit internem Standard *d13*-Hexanol, die der aromatischen Alkohole über 2-Phenylalkohol mit internem Standard *d5*-2-Phenylethanol. Zur Quantifizierung der C₁₃-Norisoprenoide kam β -Damascenon mit seinem Isotopolog *d4*- β -Damascenon zum Einsatz. Für die Analyse der flüchtigen Phenole wurde 4-Ethylguaiaicol mit internem Standard *d3*-4-Ethylguaiaicol verwendet (s. Tab. 3-12).

Tab. 3-12: Zur externen Kalibrierung der GC-MS Analytik verwendete Substanzen mit Substanzklasse, Kalibrierbereich und deuterierten internen Standards.

Substanz	Substanzklasse	Konzentration ^a	Kalibrierbereich ^b	d-ISTD ^c
<i>n</i> -Hexanol	C ₆ -Alkohole	1,03 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$	0,05-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	<i>d13-n</i> -Hexanol
Linalool	Monoterpene	1,62 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$	0,05-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	<i>d5</i> -Linalool
trans-Linalooloxid (fur)	Monoterpene	15,36 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$	1-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$	<i>d5</i> -trans-Linalooloxid (fur)
β -Damascenon	C ₁₃ -Norisoprenoide	1,18 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$	0,05-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	<i>d4</i> - β -Damascenon
2-Phenylethanol	aromat. Alkohole	1,50 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$	1-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$	<i>d5</i> -2-Phenylethanol
4-Ethylguaiaicol	fl. Phenole	1,20 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$	0,05-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	<i>d3</i> -4-Ethylguaiaicol

^a ergibt sich rechnerisch aus der Einwaage

^b 5-Punkt-Kalibrierungen: für *n*-Hexanol, Linalool, β -Damascenon, 4-Ethylguaiaicol Punkte 0,05/0,1/1/5/10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ und für trans-Linalooloxid (fur), 2-Phenylethanol Punkte 1/5/10/20/30 $\mu\text{g ml}^{-1}$

^c Konzentrationen s. Tab. 3-13

Die Zusammensetzung der d-ISTD-Lösung kann der folgenden Tabelle Tab. 3-13 entnommen werden. Diese beinhaltet die deuterierten internen Standards sowie die Injektionskontrolle *n*-Decan und wurde den Kalibrierstandards und den Proben nach der enzymatischen Hydrolyse zur Extraktion in der Endkonzentration zugeben.

Tab. 3-13: Zusammensetzung der d-ISTD-Lösung^a und Endkonzentration in der Probe zur Messung.

Substanz	Konz. Stammlösung ^b mg ml^{-1}	Konz. d-ISTD-Lösung ^c mg ml^{-1}	Endkonzentration ^d $\mu\text{g ml}^{-1}$
<i>d13-n</i> -Hexanol	1,14	0,05	0,9
<i>d5</i> -Linalool ^e	1,47	0,22	4,4
<i>d5</i> -trans-Linalooloxid(fur) ^e	3,41	0,51	10,2
<i>d4</i> -beta-Damascenon	12,5	0,25	5,0
<i>d2</i> -2-Phenylethanol	1,40	0,50	10,1
<i>d4</i> -Ethylguaiaicol	1,27	0,05	1,0
<i>n</i> -Decan	0,83	0,02	0,5

^a Lösung in Hexan/Dichlormethan (2:1)

^b Konzentration ergibt sich rechnerisch aus Einwaage

^c Konzentration in der d-ISTD-Anwendungslösung

^d Endkonzentration in der Probe (Zugabe 20 $\mu\text{l/ml}$ d-ISTD-Lösung)

^e gleiche Stammlösung

Die Erstellung der Messprogramme sowie qualitative und quantitative Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Eine Übersicht über die Zugehörigkeit der Einzelsubstanzen zu den Substanzklassen sowie Parameter zur massenspektrometrischen Detektion finden sich in der folgenden Tab. 3-14. Angeben sind die Quantifier- und Qualifier-Ionen der zur externen Kalibrierung eingesetzten Substanzen, die automatische Qualifizierung der zuvor über ihre Massenspektren unter Abgleich mit den Datenbanken NIST und aroma sowie den Kováts-Indices abgesichert identifizierten Analyten erfolgte über Vollspektrum und Retentionszeit, die Quantifizierung extern über die erstellten Kalibrierungen entsprechend der Substanzgruppenzugehörigkeit.

Tab. 3-14: Parameter zur massenspektrometrischen Detektion der Analyten bei der SPE/GC-MS.

Substanzgruppe (glyk. Vorläufer)	Einzelsubstanzen (glyk. Vorläufer)	ESTD ^a ISTD, quantitativ ^b	Quantifier/ Qualifier Ionen (m/z) (%)
C ₆ -Alkohole	<i>n</i> -Hexanol	<i>n</i> -Hexanol	56 (100), 69 (85) , 84 (15)
	(<i>Z</i>)-3-Hexen-1-ol	<i>d</i> 13- <i>n</i> -Hexanol	64 (100) , 78 (32), 96 (7)
	(<i>E</i>)-2-Hexen-1-ol		
	<i>n</i> -Octanol ^c		
Monoterpene	Linalool	Linalool	71 (100), 93 (100), 121 (16) , 141 (8)
	α -Terpineol		
	Nerol	<i>d</i> 5-Linalool	74 (100), 98 (59), 126 (16) , 141 (8)
	Geraniol		
	3,7-Dimethyl-1,5-octadien-3,7-diol		
	(<i>E</i>)-Linalooloxid (fur)	trans-	59 (100), 93 (37), 111 (31) , 155 (43)
	(<i>Z</i>)-Linalooloxid (fur)	Linalooloxid (fur)	
	(<i>E</i>)-Linalooloxid (pyr)		
	(<i>Z</i>)-Linalooloxid (pyr)	<i>d</i> 5-trans-	59 (100), 98 (60), 116 (45) , 160 (4)
	(<i>E</i>)-8-Hydroxylinalool	Linalooloxid (fur)	
(<i>Z</i>)-8-Hydroxylinalool			
C ₁₃ -Norisopr.	3-Hydroxy- β -damascon	β -Damascon	41 (20), 69 (100) , 190 (50)
	3-Hydroxy- β -ionol		
	3-Oxo- α -ionol		
	3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol	<i>d</i> 4- β -Damascon	73 (94) , 105 (33), 121 (100), 194 (12)
	3-Oxo-7,8-dihydro- α -ionol		
	3-Hydroxy-7,8-didehydro- β -ionol		
aromat. Alk.	Benzylalkohol	2-Phenylethanol	65 (66), 91(100), 122 (80) , 127 (31)
	2-Phenylethanol	<i>d</i> 5-2-Phenylethanol	96 (100), 122 (54), 127 (83)
fl. Phenole	4-Vinylguaiacol	4-Ethylguaiacol	122 (40) , 137 (100), 152 (90)
		<i>d</i> 3-4-Ethylguaiacol	125 (12), 140 (100), 155 (38)

^a zur Erstellung einer externen Kalibration verwendeter Analyt

^b Isotopolog als quantitativer ISTD

^c Spaltprodukt von Octyl- β -D-Glucopyranosid, Kontrolle der gesamten Aufarbeitung

3.4.5.2 Validierung der GC-MS-Messung

Die Validierung wurde anhand der Substanzen *n*-Hexanol, Linalool, β -Damascenon, 2-Phenylethanol und 4-Ethylguaiacol, welche jeweils eine Substanzgruppe der Vorläufer repräsentierten und ebenfalls zur externen Kalibrierung verwendet wurden, durchgeführt. Als Basis diente ein Muskateller-Wein mit bekannter Ausgangskonzentration der zu überprüfenden Substanzen. Aufdotiert wurde mit drei ansteigenden Konzentrationen, welche den Kalibrierbereich der Quantifizierung abdeckten. Die Messungen wurden jeweils für unverdünnte und 1:10 verdünnte Proben durchgeführt. In den folgenden Tab. 3-15 und Tab.

3-16 finden sich die erwarteten und gemessenen Konzentrationen, aus welchen die prozentuale Abweichung zur Validierung berechnet wurde.

Tab. 3-15: Validierung der Quantifizierung mittels GC-MS. Konzentration der Ausgangsprobe c0 und erwartete Konzentrationen (c1-c3) nach Aufdotieren.

Substanz // Probe Verdünnung	c0 ^a (µg ml ⁻¹)		c1 ^b (µg ml ⁻¹)		c2 ^c (µg ml ⁻¹)		c3 ^d (µg ml ⁻¹)	
	unverd	1:10	unverd	1:10	unverd	1:10	unverd	1:10
n-Hexanol	1,9	1,9	2,2	2,2	4,2	4,2	8,8	8,8
Linalool	0,9	0,9	1,5	1,5	4,3	4,3	7,6	7,6
β-Damascenon	0,0	0,0	0,5	0,5	2,3	2,3	6,9	6,9
2-Phenylethanol	10,0	9,8	9,6	9,4	12,5	12,3	14,7	14,5
4-Ethylguaiacol	0,0	0,0	0,5	0,5	2,4	2,4	7,2	7,2

^a nativer Gehalt der Ausgangsprobe Muskateller-Wein

^b rechnerisch aufdotiert mit (µg ml⁻¹): n-Hexanol 0,48/ Linalool 0,68/ β-Damascenon 0,46/ 2-PhEtOH 0,60/ 4-Ethylguaiacol 0,48/ Unter Berücksichtigung der Verdünnung durch Ansatz 450 µl native Probe+je 10 µl Standardlösung der 1:50 Verdünnung aus Stammlösung s. Tab. 3-13 Kali-Stds

^c rechnerisch aufdotiert mit (µg ml⁻¹): n-Hexanol 2,35/ Linalool 3,42/ β-Damascenon 2,31/ 2-PhEtOH 2,99/ 4-Ethylguaiacol 2,40/ Unter Berücksichtigung der Verdünnung durch Ansatz 475 µl native Probe+je 5 µl Standardlösung der 1:5 Verdünnung aus Stammlösung s. Tab. 3-13 Kali-Stds

^d rechnerisch aufdotiert mit (µg ml⁻¹): n-Hexanol 7,13/ Linalool 6,84/ β-Damascenon 6,92/ 2-PhEtOH 5,97/ 4-Ethylguaiacol 7,19/ Unter Berücksichtigung der Verdünnung durch Ansatz 435 µl native Probe+je 10 µl (Linalool, 4-Ethylguaiacol) bzw. 15 µl (n-Hexanol, β-Damascenon, 2-PhEtOH) Standardlösung der 1:5 verdünnung aus Stammlösung s. Tab. 3-13 Kali-Stds

Tab. 3-16: Validierung der Quantifizierung mittels GC-MS. Gemessene Konzentrationen nach Aufdotieren der Ausgangsprobe (c1-c3).

Substanz // Probe Verdünnung	c1 (µg ml ⁻¹)		c2 (µg ml ⁻¹)		c3 (µg ml ⁻¹)	
	unverd	1:10	unverd	1:10	unverd	1:10
n-Hexanol	2,5	2,5	4,5	4,5	10,5	10,7
Linalool	1,8	1,8	4,6	5,0	8,5	9,5
β-Damascenon	0,5	0,5	2,4	2,6	7,9	8,6
2-Phenylethanol	10,8	10,7	13,5	13,8	17,6	18,7
4-Ethylguaiacol	0,6	0,6	2,7	2,8	8,4	9,3

3.5 Sensorische Analytik

Die hergestellten Weine, Grundweine und Sekte sind sensorisch mittels Deskriptiver Analyse (DA) bewertet worden. Ausgewählte Geruchs- und Geschmacksattribute sowie trigeminale Wahrnehmung und Farbe werden bei dieser Methode, wenn nicht explizit anders benannt, auf einer Intensitätsskala von 0 (nicht vorhanden) bis 10 (stark vorhanden) beurteilt. Um möglichst objektiv und sensibilisiert zu sein wurden die Prüfer zunächst mit Aromastandards trainiert, die mit einem neutralen Weißwein hergestellt und in verschiedenen hohen Konzentrationen gereicht wurden. Die eigentliche Verkostung fand voll randomisiert in zweifacher Wiederholung statt. Die Weine wurden bei 12°C, die Sekte jeweils direkt vor der Probe für jeden Prüfer frisch eingeschenkt bei 10°C verkostet. Die Verkostungen fanden in Einzelkabinen unter weißem Licht in einem ruhigen, temperierten und geruchsneutralen Raum statt. Spucknapfe sowie stilles Wasser standen bereit. Die Prüfer übermittelten ihre Bewertungen über einen in der Kabine befindlichen Computeranschluß, diese konnten

später insgesamt ausgewertet werden (Software Fizz Sensory Version 2.45A, Biosystèmes, Couternon, Frankreich).

Tab. 3-17: Geruchs- und Geschmacksstandards für die sensorische Analyse.

Geruchsstandards	Assoziation	Rezept (auf 100 ml)
Zitrusfrüchte	Zitrone, Grapefruit, Orangenschale	20 ml Saft frischer Zitrone, Grapefruitsaft, Orangenschale
frischer Apfel	grüner, frischer Apfel	1 Tropfen Apfelaroma ^b
reifer Apfel ^a	reifer Apfel, mostig	25 ml Apfelsaft naturtrüb (Lindavia)
gelbe Früchte	Pfirsich, Aprikose, Trockenfrüchte	20 ml Pfirsichsaft, 20 ml Aprikosensaft (Granini)
Honigmelone	süßlich, reif	frische Honigmelone, 15 min extrahieren
blumig	blumig, parfümig	4 Tropfen Blumenaroma ^b bzw. 75 ml Muskateller Wein (Staatsweingut)
Honig	Honig, süßlich	1 TL Honig (Lagnese)
rauchig, Honig ^a	rauchig	1 TL Honig (Vitaquell), 50 µl Vinylguaiacol
grün, grasig, Heu	frisch gemähtes Gras, Heu	5 Tropfen Grasaroma ^b , handvoll Heu 10 min extrahieren
grasig, grün ^a	Gras, grün	handvoll frisches Gras, 10 min extrahieren
hefig	hefig, brotig, böcksrig	0,2 g Hefe Lalvin CY3079
Geschmacksstandards	Assoziation	Rezept
süß	süßer Geschmack (sofortiger Eindruck)	Auerbach Sekt, halbtrocken (Aldi Süd, Mülheim an der Ruhr, Deutschland)
sauer	saurer Geschmack (sofortiger Eindruck)	Erlenbrunn Deutscher Riesling Sekt, extra trocken (Aldi Süd, Mülheim an der Ruhr, Deutschland) + 1,5 g/L Weinsäure
bitter	im Abgang nach ca. 10 Sekunden v.a. am hinteren Gaumen	Auerbach Sekt, halbtrocken (Aldi Süd, Mülheim an der Ruhr, Deutschland) + 1,0 g/L Coffein
fruchtig	fruchtig insgesamt	ohne Standard
Sonstige Standards	Assoziation	
Mundgefühl	keine Intensitätsmessung hart=stumpfes, metallisches, adstringierendes Gefühl auf der Zunge cremig=auf der Zunge weich, viskos, leicht belegend (wie Schlagsahne)	
Gesamteindruck	keine Intensitätsmessung gereift=dumpf, mostig, Karamell frisch=fruchtig, sortentypisch	
Farbe	keine Intensitätsmessung von hellgelb nach goldgelb	

a verwendet ausschließlich in Versuchen 2012, b Standard von Leslie Norris, Flavor Sense, USA

3.6 Mikrobiologische und biochemische Analytik

3.6.1 Anzucht und Selektion der Hefen

Die Hefen lagen als Reinzuchthefer-Trockenpräparate vor und sind zunächst als Vorkultur in YPD-Medium (10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Pepton, 20 g/L Glucose, 20 g/L Agar; alles AppliChem GmbH, Darmstadt) angezogen worden. Dazu wurde je 1 g Trockenpräparat in 10 ml autoklaviertem Leitungswasser (37°C) rehydratisiert, nach 15 min mit 10 ml

autoklaviertem YPD-Medium (37°C) aufgefüllt und der Ansatz weitere 15 min auf dem Schüttler (Schüttler: KS-15, Inkubationshaube: TH-15, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, 100 Umdrehungen/min, 30 °C) belassen. Aus diesen Ansätzen wurden anschließend jeweils 1 ml/100 ml in frisches YPD-Medium überführt und diese so über Nacht bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Desweiteren wurden Nichtsaccharomyceten verwendet, welche als Glycerol-Stock (700 µl Glycerin, 300 µl YPD-Hefeansatz) bei -80 °C gelagert worden waren. Diese wurden durch Überführen des Stocks in frisches YPD-Medium (1 ml/100 ml) und Inkubation über Nacht (Schüttler, 30°C) angezogen.

Die Selektion von Einzelkolonien erfolgte optional durch fraktionierten Ösenausstrich aus dem ersten Ansatz auf YPD-Platten. Diese wurden nach zwei Tagen Inkubation bei 30 °C im Wärmeschrank mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, jeweils in 10 ml YPD-Medium in Falcons überführt und im pNPG-assay verwendet.

Es wurden die folgenden in Tab. 3-18 gelisteten Hefen mittels Plattentests und pNPG-Assay auf ihre β -Glucosidase-Aktivität analysiert.

Tab. 3-18: Mittels Plattentests und pNPG-Assay untersuchte Hefestämme mit Art-Zugehörigkeit, die jeweiligen Hersteller s. Tab. 3-2.

Art	Stamm
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1895C, CEG, CY3097, HPS, ICVD47, RC212, R-HST, Siha7, SihaCryarome, U228, X5
<i>Saccharomyces bayanus</i>	BC, DV10, EC1118, Freddo, IOC 18-2007, QA23, Siha4
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	Biodiva
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Flavia
<i>Debaromyces hansenii</i>	H22 ^a
<i>Pichia anomala</i>	H54 ^a

a Laborstämme (Stammsammlung Abteilung Mikrobiologie, DLR Rheinpfalz)

3.6.2 Test auf Agar-Platten mit Arbutin und Cellobiose

Der nicht quantitative Test auf β -Glucosidase-Aktivität wurde auf Agar-Platten mit den Substraten Arbutin syn. 4-Hydroxyphenyl- β -D-Glucopyranosid und Cellobiose syn. 4- β -D-Glucopyranosyl-Glucose als unterschiedliche Kohlenstoff-Quellen auf YNB-Mangelmedium durchgeführt (s. Abb. 3-5) nach Rosi et al. (1994) und Daenen et al. (2008) durchgeführt. Hefestämme mit vorhandener Aktivität hydrolysieren das Substrat und wachsen unter Nutzung der freien Glucose auf den Platten.

Material und Durchführung

Arbutin-Platten (Rosi et al., 1994; Daenen et al., 2008): 6,7 g/L YNB-Medium (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 5 g/L Arbutin (Carl Roth, Karlsruhe), 20 g/L Agar (Sigma Aldrich, St. Louis, USA); auf pH 5 eingestellt. Nach Rosi et al. wurde dem sterilisierten, flüssigen Medium 2 ml/100 ml einer 1% Ammonium Eisen(III)-citrat-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) zugegeben, aufgrund von Daenen et al. diskutierter wachstumshemmender Wirkung des Ammonium Eisen(III)-citrat wurden zusätzlich Platten ohne die Substanz hergestellt.

Cellobiose-Platten (Daenen et al., 2008): 6,7 g/L YNB-Medium (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 5 g/L Cellobiose (Carl Roth, Karlsruhe); auf pH 5 einstellen.

Nach Gießen in Petrischalen (92x16 mm, Sarstedt AG & Co) wurden die getrockneten Platten mit den angezogenen Hefen mittels Ösenausstrich inokuliert, bei 30 °C inkubiert und über mehrere Tage beobachtet.

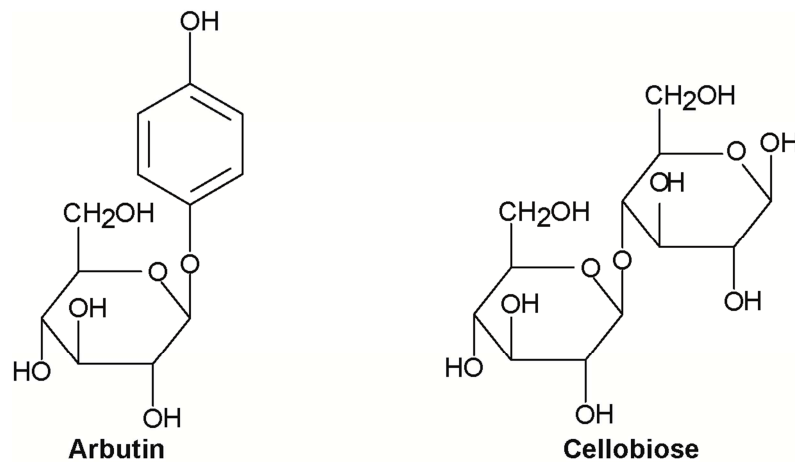


Abb. 3-5: Verwendete Substrate: Arbutin (4-Hydroxyphenyl- β -D-Glucopyranosid) und Cellobiose (4- β -D-Glucopyranosyl-Glucose), nach Rosi et al. (1994) und Daenen et al. (2008).

3.6.3 pNPG-Assay

Die β -Glucosidase-Aktivität, welche als Maß für die Fähigkeit zur Spaltung von glycosidischer Bindung und damit als Freisetzungsvermögen glycosidisch gebundener Aromastoffe verstanden werden kann, wurde für die innerhalb des Projektes verwendeten kommerziell erhältlichen Reinzuchthefestämme und das aus *Aspergillus niger* stammende Enzympräparat AR2000 durchgeführt. Zusätzlich wurden aus der Literatur für vorhandene hohe β -Glucosidase-Aktivität bekannte Nichtsaccharomyceten (*Debaromyces hansenii* Stamm H22, *Pichia anomala* Stamm H54, aus der Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie, DLR Rheinpfalz) in den Assay aufgenommen und diese sowie das Enzympräparat als Positivkontrolle beibehalten.

Die Messung erfolgte photometrisch mittels pNPG-Assay nach Rosi et al. (1994) und Daenen et al. (2008). Das Substrat p-Nitrophenol- β -D-glucopyranosid (pNPG) wird durch β -Glucosidase in p-Nitrophenol (pNP) und Glucose gespalten. Nach Alkalisieren wird das Spaltprodukt pNP in sein Anion p-Nitrophenolatanion überführt, die Extinktion bei 400 nm bestimmt und darüber auf die β -Glucosidase-Aktivität umgerechnet (s. Abb. 3-6). Mittels Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) erfolgte die Permeabilisierung der Hefezellwand zur Untersuchung intrazellulärer Enzymaktivität nach Gowda et al. (1991).

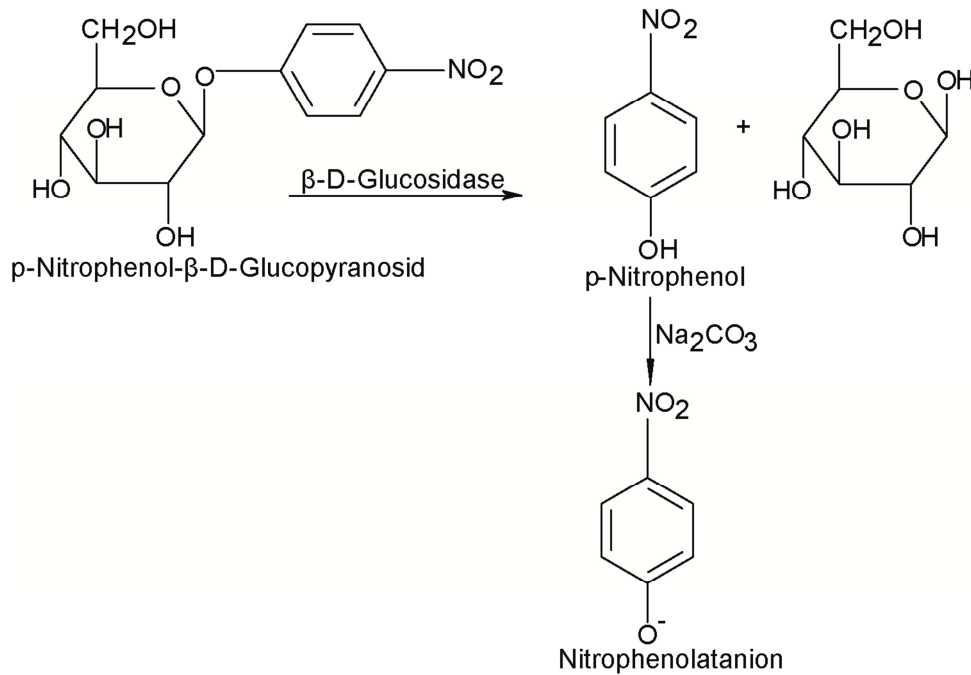


Abb. 3-6: Reaktionsmechanismus pNPG-Assay, nach Rosi et al. (1994) und Daenen et al. (2008).

Material und Durchführung

Tab. 3-19: Material pNPG-Assay.

Lösung	Herstellung
Reaktions-Puffer:	Na-Acetat-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) 0,1 mol/L (pH 5)
Standardlösung:	p-Nitrophenol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 5 mmol/L in Na-Acetat-Puffer
Reaktionslösung:	p-Nitrophenol-β-D-glucopyranosid (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 5 mmol/L in Reaktions-Puffer (bei Raumtemperatur 1 Tag haltbar)
Stop-Puffer:	Natriumcarbonatlösung (Carl Roth, Karlsruhe) 0,2 mol/L (pH 9)
Positiv-Probe:	10 mg AR2000 in 5 ml Reaktionspuffer Stammlösung
CTAB-Permeabilisierungs-Lösung:	Natriumhydrogenphosphat-Puffer (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 1 mol/L (pH 7), 0,2% CTAB (w/v) (Carl Roth, Karlsruhe)

Die angezogenen Hefen wurden zentrifugiert (4500 rpm, 5 min), der Überstand verworfen und das Pellet mit dem 10fachen Volumen deionisiertem Wasser gewaschen. Nach Überführen in ein vorher tariertes Probengefäß ist erneut zentrifugiert (4500 rpm, 5 min), der Überstand verworfen und das Pelletgewicht bestimmt worden. Zur Bestimmung der extrazellulären Enzymaktivität wurde direkt nach Resuspendieren des Pellets in 10 ml Reaktions-Puffer (Na-Acetat-Lösung 0,1 mol/L, pH 5) entsprechend verdünnt (Lösung A 1:10, Lösung B 1:5). Für die Messung der intrazellulären Aktivität wurden die Zellen zunächst nach der Methode von Gowda et al. (1991) permeabilisiert. Dazu inkubierten die Zellen bei 24 °C für 15 min in CTAB-Permeabilisierungs-Lösung (Na-Phosphat-Puffer 0,1 mol/L (pH 7), 0,2% CTAB (w/v)), wurden anschließend zentrifugiert, einmal gewaschen und erneut in Reaktionspuffer aufgenommen. Anschließend wurden je 2 ml der Hefesuspension mit 1 ml Reaktionslösung versetzt, als Blindprobe dienten 1 ml Hefesuspension mit 0,5 ml Reaktionslösung und 1,5 ml Stop-Puffer. Als Positiv-Kontrolle dient das Enzym AR2000 in Reaktionspuffer. Die Proben inkubierten bei 37 °C für 2 Stunden im Wärmeschrank, wurden

anschließend sofort mit 3 ml Stop-Puffer abgestoppt, zentrifugiert und der Überstand bei 400 nm am Photometer (Nanocolor UV/vis, Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren) in Polystyrol-Halbmikroküvetten (Schichtdicke 1 cm, Probevolumen 1 mL) gegen Stop-Puffer gemessen.

Zur Erstellung der Kalibriergerade wurden 200 µl der Standardlösung zu 9800 µl Stop-Puffer gegeben, was eine Lösung mit der Konzentration von 100 µmol/L ergab. Von dieser Lösung A sind die weiteren Verdünnungen hergestellt worden (s. Tab. 3-20). Die Verdünnungs-Ansätze erfolgten direkt in den Messküvetten, die Messung ebenfalls bei 400 nm photometrisch. Als Nullwert wurde der Stop-Puffer verwendet.

Tab. 3-20: Kalibrierung pNPG-Assay.

Konzentration (µmol/L)	Menge Lösung A (µL)	Menge Stop-Puffer (µL)
100	1000	0
80	800	200
60	600	400
40	400	600
20	200	800
10	100	900
0	0	1000

Die Berechnung der β -Glucosidase-Aktivität der Proben erfolgt mittels folgender Formel:

$$\beta\text{-D-Glucosidaseaktivität} \left[\frac{mU}{mL} \right] = \frac{\frac{1}{m} \cdot \Delta E \cdot V}{120 \text{ min} \cdot v}$$

U:	β -D-Glucosidaseaktivität [µmol/min]
m:	Anstieg der Standardkalibriergeraden
ΔE :	Extinktionsdifferenz von Probe und Blindwert
V:	Gesamtvolumen (6 mL)
v:	Probevolumen (2 mL)

Anschließend wurde das Pelletgewicht der Probe (Hefemenge mg/ml) einberechnet und das Ergebnis als β -D-Glucosidase-Aktivität in µU/mg für die Hefen und in mU/mg für das Enzym angegeben.

3.7 Genexpressionsanalyse

Die Freisetzung glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer sollte hypothetisch mit der Expression der Kandidatengene EXG1, SPR1 und YIR007W in Zusammenhang stehen, was mittels relativer quantitativer Genexpressionsanalyse untersucht wurde. Dieser Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Mikrobiologie des DLR Rheinland im Rahmen der Masterarbeit von Volk (2015) durchgeführt.

3.7.1.1 Auswahl der Kandidatengene

Im Rahmen der Arbeit sollte sich auf die Glucosidase-Aktivität der Hefen beschränkt werden. Der Abgleich des Hefegenoms mit der Sequenz des Gens für β -Glucosidase aus *Aspergillus niger* sowie der Vergleich der Aminosäuresequenzen mittels Saccharomyces Genome Database (SGD) ergab keine Übereinstimmung. Die Literatursuche ergab die Funktion der

Gene EXG1, SPR1 und YIR007W in Zusammenhang mit Aromavorläuferfreisetzung, welche daraufhin untersucht wurden. Als Referenzgen diente das Haushaltsgen UBC6.

3.7.1.2 Durchführung

RNA der aus den Gäransätzen entnommenen Hefen wurde zu den Zeitpunkten 17, 168, 336 und 504 Stunden extrahiert (RNeasy Mini Kit, Quiagen), die Konzentration bestimmt (UV-Vis, Nanodrop 2000, Thermo Scientific) und in cDNA transkribiert (cDNA Synthese Kit für RT-qPCR, Thermo Scientific). Die Quantifizierung der DNA der Zielgene erfolgte mittels quantitativer real time PCR (qPCR) unter Verwendung der Kits Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) und Rotor-Gene Q (Quiagen), das Primerdesign war mittels Software Primer3 durchgeführt worden. Die Analyse der Daten erfolgte als relative Expression durch Normierung auf die Expression des Haushaltsgens UBC6 und auf einen Bezugspunkt nach $2^{-\Delta\Delta ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001), für den in der vorliegenden Arbeit Hefestamm und Zeitpunkt gewählt wurden.

3.8 Kalibration des FT-MIR

Die Kalibration zur indirekten Messung glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer mittels FT-MIR sollte für den Gerätetyp FT120 der Firma FOSS (Foss A/S, Hilerød, Dänemark) etabliert werden. Das Gerät ist bereits in vielen Betrieben zur Analytik von Majorcomponenten in Most und Wein in Anwendung und dadurch verfügbar. Die Möglichkeit der Entwicklung einer Analytik von Minorcomponenten in Wein mittels FT-MIR wurde von Schneider et al. (2004) anhand einer vielversprechenden Basiskalibration für Aroma-Glycoside aus 39 Most-Proben der Rebsorte Melon de Bourgogne vorgestellt, allerdings wurde die Entwicklung nicht weiter verfolgt. Die Analyse ist unkompliziert, innerhalb von wenigen Minuten durchführbar und zudem kostengünstig. Der Aufwand für die Analytik der Aromastoffvorläufer ist mit der bisher verwendeten Methode mittels GC-MS sehr hoch, was einer praxisorientierten Anwendung trotz der Bedeutung der glycosidisch gebundenen Vorläufer wichtiges Aromapotential im Wege steht. Die vereinfachte Quantifizierung der Aromastoffvorläufer, im Gegensatz zur Bestimmung über die Glycosyl-Glucose nach Williams et al., 1995 mit Unterscheidung der Einzelsubstanzen oder Substanzgruppen zur Abgrenzung zu- und abträglicher Aromapotentiale ist insbesondere für Moste sowie für Sektgrundweine interessant. Es wäre grundsätzlich möglich, die anstehende Gärung unter Einbezug der Kenntnis um das vorhandene Potential durchzuführen. Desweiteren könnte der Aromavorläufergehalt als weiteres Qualitätskriterium im Handel eingesetzt werden.

Die Aroma-Glycoside wurden aufgrund ihrer geringen Konzentrationen und der zusätzlich zu ihrer Komplexität hohen Schwankungen unterliegenden Most- oder Weinmatrix einer zunächst intensiven Probenvorbereitung unterzogen. Vor der eigentlichen Kalibrationsarbeit sind deshalb diverse technische Anpassungen etabliert und überprüft worden.

3.8.1 Grundlagen und Funktionsweise der FT-MIR Spektroskopie

3.8.1.1 Physikalisch-chemischer Hintergrund

Die FT-MIR-Technologie basiert auf der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Molekülen. Spektroskopisch kann der IR (Infrarot)- Bereich in die drei Bereiche NIR (nahes Infrarot), MIR (mittleres Infrarot) und FIR (fernes Infrarot) unterteilt werden, der für organische Analysen relevante Bereich des MIR deckt den Bereich der Wellenlänge λ von 2,5-16,5 μm bzw. umgerechnet in die in der IR-Spektroskopie gebräulichen Wellenzahl $\tilde{\nu}$ von 600-4000 cm^{-1} ab ($\tilde{\nu}=1000/\lambda$). Wellenzahl und Frequenz sind proportional, Wellenlänge und Frequenz reziprok zueinander (Gottwald und Wachter, 1997).

Durch die spezifische Absorption bei definierten Wellenlängen werden Moleküle zu verschiedenen Schwingungen angeregt. Durch NIR werden vor allem Oberton- und Kombinationsschwingungen angeregt, welche eine hohe Komplexität bei geringer Intensität beinhalten (Cen und He, 2007). Durch MIR werden Grundschiebungen verursacht, welche in Form von Valenzschwingungen und Deformationsschwingungen auftreten. Durch schärfere Absorptionsbanden mit hohem Informationsgehalt ist die MIR-Spektroskopie als die empfindlichere Methode zur Analyse von Minorkomponenten demnach vorzuziehen. Durch die Kombination mit FT (Fouriertransformation)-Technologie kann der Messbereich zusätzlich erweitert werden (Gottwald und Wachter, 1997). Bei Valenz- bzw. Streckerschwingungen verändert sich die Bindungslänge bei konstantem Bindungswinkel, bei symmetrischer Valenzschwingung erfolgt eine gleiche und bei asymmetrischer Valenzschwingung eine unterschiedliche Veränderung der Bindungslängen im Molekül. Bei Deformations- bzw. Beugeschwingungen variiert der Bindungswinkel bei gleichbleibender Bindungslänge, was sich auf verschiedenen Ebenen vollziehen kann. Die maximal mögliche Anzahl der Schwingungen eines Moleküls kann berechnet werden, ausgehend von der Annahme von drei möglichen Bewegungsrichtungen jedes Atoms im Molekül (Gottwald und Wachter, 1997; Vollhardt und Schore, 2005).

Aus spektroskopischer Sicht relevant sind die durch die Molekülschwingungen verursachten Signale. Die spezifische Schwingungsfrequenz einer Bindung ist abhängig von der atomaren Masse der Atome und der Stärke der Bindung, bei steigender Bindungsstärke und sinkender atomarer Masse steigt die Frequenz. Dadurch lassen sich insbesondere funktionelle Gruppen anhand des Spektrums zuordnen und verteilen sich auf spezifische Bereiche (s. Abb. 3-7). Allerdings sind nur Schwingungen IR-aktiv, die das Dipolmoment des Moleküls verändern. Zur Darstellung des IR-Spektrums wird auf der Abszissenachse die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ und auf der Ordinatenachse die Intensität der Transmission oder Absorption dargestellt. Durch Eigenabsorption des Trägermittels entsteht eine Basislinie, durch Interaktion von Analyten-Molekülen mit der IR-Strahlung entstehen die entsprechenden spezifischen Banden bei charakteristischen Wellenzahlen (Gottwald und Wachter, 1997; Vollhardt und Schore, 2005).

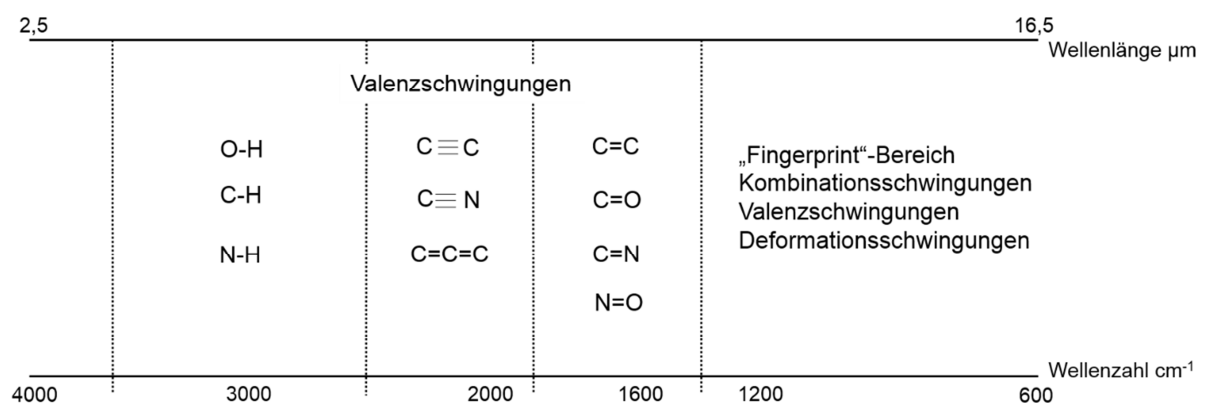


Abb. 3-7: Bereiche der Molekülschwingungen im MIR-Spektrum, nach Gottwald und Wachter (1997) und Vollhardt und Schore (2005).

3.8.1.2 Technischer Hintergrund und speziell Aufbau des Foss FT 120

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem FT-MIR-Spektrometer Foss WineScan FT 120 gearbeitet. In der Standardausführung besteht das Gerät aus einem Durchfluss-System, über welches die Proben automatisch angesaugt und unter Gewährleistung eines

Vorspülvolumens sowie nach dem Passieren eines Wärmeaustauschers in die Küvette, welche sich hinter der Detektoreinheit (DTU) befindet, überführt werden (s. Abb. 3-8). Über den Wärmeaustauscher wird dabei die standardisierte Temperatur von 42 °C eingehalten, ein Rückschlagventil sichert einen konstanten Druck von 1,5 bar. Die Reinigung mit Hypochlorid erfolgt zwischen den Proben automatisch, ebenso eine regelmäßige Kontrolle und gegebenenfalls Erneuerung des Nullpunktes (Foss, 2002a).

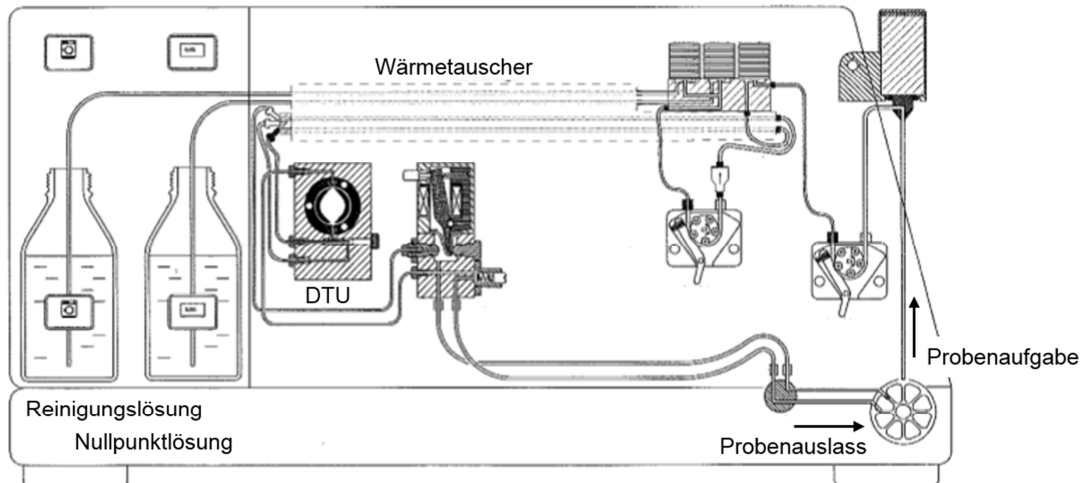


Abb. 3-8: Schematischer Aufbau des Spektrometers Foss WineScan FT 120, nach Foss (2002a).

Die funktionellen Elemente zur IR-Spektroskopie finden sich hinter der Detektoreinheit und Küvette, wo sich IR-Strahlenquelle, Interferometer-Teil und Detektor befinden (s. Abb. 3-9, B). Das Prinzip des Gerätes folgt dem Prinzip des Michelson-Interferometers. Die IR-Strahlung trifft auf den Strahlenteiler, jeweils die Hälfte wird auf den unbeweglichen und den beweglichen Spiegel geleitet. Die Position des beweglichen Spiegels wird dabei durch den Helium-Neon (HeNe)- Laser ($\lambda=632\text{ nm}$) überprüft. Nach Reflexion vereinigen sich die Teilstrahlen, durchstrahlen die CaF_2 -Küvette (Schichtdicke 37-150 μm , Fensterstärke 2 mm, Durchmesser 10 mm) mit der Probe und treffen auf den Detektor. Abhängig der Position des beweglichen Spiegels entsteht zwischen den beiden Strahlenteilen eine variierende Laufzeitdifferenz, was zu spezifischer Interferenzbildung führt (s. Abb. 3-9, A). Es werden bei der Messung alle IR-Frequenzen gleichzeitig aufgezeichnet, wodurch das Detektorrauschen über den gesamten Spektralbereich verteilt und somit im Vergleich zum Signal verringert werden kann.

Mittels Fourier-Transformation (FT) erfolgt die Umwandlung des Interferogramms als Funktion der Gesamtinformation über die Zeit mathematisch in das Spektrum, welches die Intensität optional der Transmission oder Absorption über die Frequenz darstellt. Das Interferogramm wird aufgrund des Signals des Nullpunktdurchgangs des HeNe-Lasers als Referenz punktuell ausgelesen (Gottwald und Wachter, 1997; Foss, 2002a).

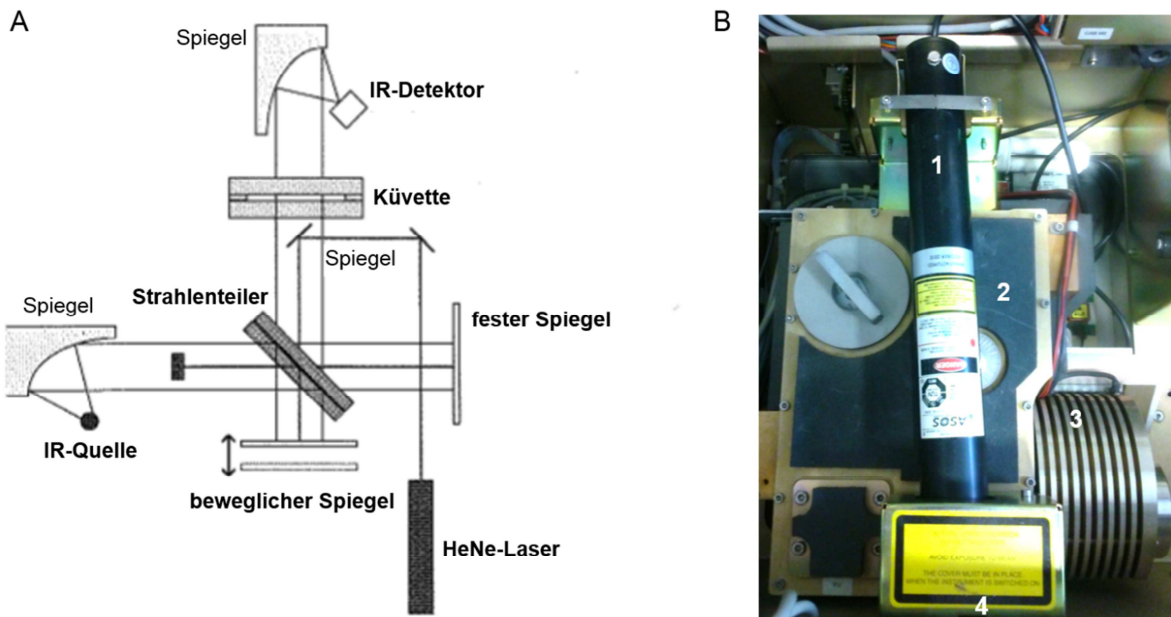


Abb. 3-9: Schematischer Aufbau und Funktionsweise des Interferometer-Teils, nach Foss (2002a) (A), und technische Umsetzung bei Gerät Foss Wine Scan FT 120: 1 HeNe-Laser, 2 IR-Box mit Interferometer-Teil, 3 IR-Quelle, 4 Aufbau befindlich hinter DTU (B).

3.8.2 Probenmaterial

Es wurden Moste verschiedener Rebsorten von kooperierenden Ausbildungsbetrieben des Dualen Studienganges Weinbau und Oenologie des DLR Rheinpfalz bezogen. Damit stammten sie aus diversen Weingütern unterschiedlicher Regionen Deutschlands. Weine und Sektgrundweine wurden durch die Kooperationspartner innerhalb des durchgeführten Projektes (AiF 16627 N, gefördert durch AiF-Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen e.V. und FEI-Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.) in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit angefertigt entstand, zur Verfügung gestellt und stammten aus Europa. Die für die Vorversuche eingesetzten Proben stammten vom Staatsweingut des DLR Rheinpfalz (s. Tab. 3-21).

Tab. 3-21: Probenmaterial zur Methodenentwicklung der FT-MIR-Analytik.

Versuchsteil	Proben	
Temperaturstabilität, Spülschritte	Riesling Wein, Staatsweingut DLR Rheinland	
Löslichkeit der Extrakte	Riesling Grundwein, Heim'sche Sektkellerei	
Konzentration (1-4 Extrakte)	Riesling Wein, Staatsweingut DLR Rheinland, Muskateller Wein, Staatsweingut DLR Rheinland	
Basiskalibrationen: Probenanzahl insgesamt (Most/Wein)		
Rebsorte	vorläufige	finale
Riesling	54 (22/32)	6 (2/4)
Chardonnay	18 (4/14)	4 (0/4)
Airén	11 (1/10)	4 (0/4)
Muskateller	4 (3/1)	2 (0/2)
Morio Muskat	1 (0/1)	
Scheurebe	2 (2/0)	1 (0/1)
Sauvignon blanc	3 (1/2)	
Gewürztraminer	7 (3/4)	
Ugni blanc	1 (0/1)	1 (0/1)
Müller-Thurgau	2 (2/0)	1 (1/0)

3.8.3 Probenvorbereitung und Korrelation mit der Referenzanalytik

Zur Kalibration der FT-MIR-Methode wurde als Referenzanalytik die bereits etablierte GC-MS-Aromastoffanalytik eingesetzt. Proben wurden jeweils in sechs Replikate aufgeteilt, je drei Replikate wurden mittels FT-MIR und je drei Replikate mittels GC-MS gemessen. Die aufgezeichneten Spektren wurden anschließend mit den quantitativen Daten aus der Referenzanalytik korreliert (s. Schema in Abb. 3-10).

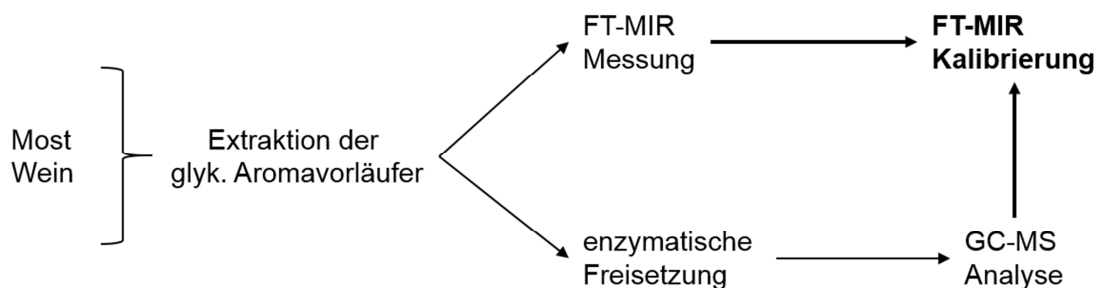


Abb. 3-10: Schema der Kalibration der FT-MIR Analytik mit GC-MS.

Die Probenvorbereitung für die Messung mittels FT-MIR und GC-MS unterschied sich bis zur Festphasenextraktion und dem anschließenden Einrotieren bis zur Trockene nicht (s. Kap. 3.4). Die Extrakte für GC-MS wurden anschließend mittels enzymatischer Hydrolyse gespalten, erneut extrahiert und anschließend gemessen. Für die Messung mittels FT-MIR wurden die Extrakte in je 1 ml Lösungsmittel aufgenommen und nach direkter Injektion in die Messzelle des Gerätes gemessen. Einen Vergleich der Methoden s. Tab. 3-22.

Tab. 3-22: Probenvorbereitung zur Analyse mit GC-MS und FT-MIR.

GC-MS	FT-MIR
Festphasenextraktion Einrotieren bis zum trockenen Extrakt	
Enzymatische Hydrolyse <ul style="list-style-type: none"> - Aufnahme in Puffer+Enzym AR2000 - Inkubation 16 h bei 40 °C 	Aufnahme des Extrakts in 1 ml Lösungsmittel
Flüssig-Flüssig Extraktion <ul style="list-style-type: none"> - 3x1 ml Dichlormethan - Zugabe deuterierter Standards 	
Trocknen über MgSO ₄	
Messung <ul style="list-style-type: none"> - ca. eine Stunde/ Probe 	Messung <ul style="list-style-type: none"> - ca. 3 min/Probe
Auswertung mittels XCalibur	

3.8.4 Modifikation des Gerätes zur Probenaufgabe

Das Gerät ist in seiner normalen Anwendung für Probenvolumina von circa 30 mL konzipiert. Die Proben gelangen mittels Autosampler über PTFE-Schläuche in die Messzelle, wodurch ein großes Totvolumen entsteht. Um diesen Weg zu umgehen, wurde eine Probenaufgabe direkt in die Messzelle etabliert (s. Abb. 3-11).

Dazu sind zunächst, befindlich an der Detektoreinheit hinter der Frontklappe, die Schläuche die als Zu- bzw. Ablauf zur Messküvette dienen, abgeschraubt worden. Das im Normalbetrieb durch die Software des Gerätes gesteuerte Pumpensystem wurde vorher deaktiviert. Anstelle des vorherigen Kreislaufes wurden nun kurze PE-Schläuche zur Probenaufgabe sowie ein zweiter Schlauch, während der Messung zur Erzeugung von Gegendruck verschließbar, als Probenablauf installiert. So konnten die Proben mittels 1 mL Spritze (Einmalspritzen mit Luer-Anschluss, neoLab, Heidelberg) injiziert werden.

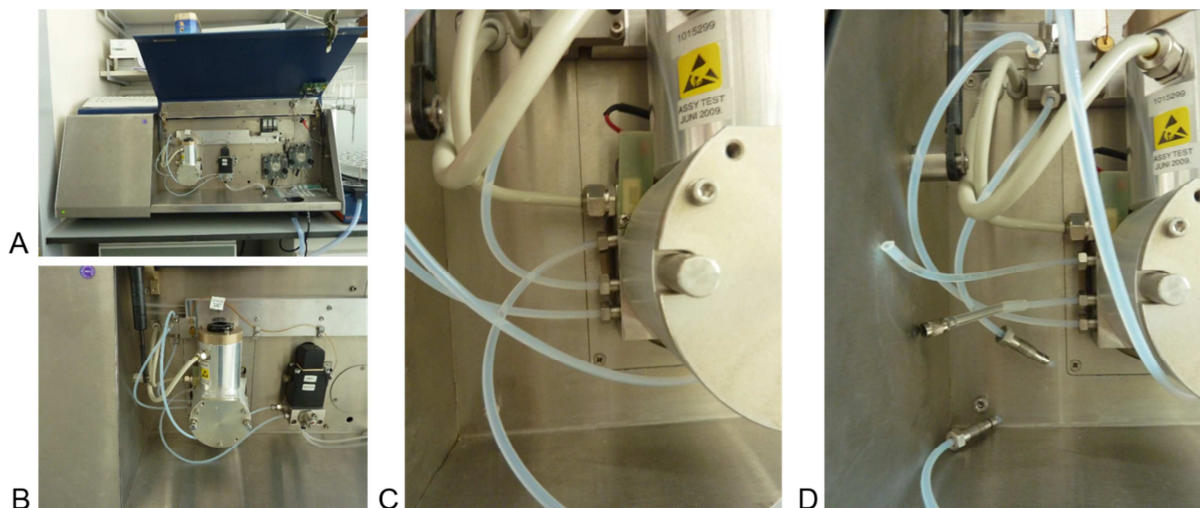


Abb. 3-11: Umbau des FT-MIR-Spektrometers Foss Winescan FT 120. Hinter der zu öffnenden Frontklappe (a) befindet sich links die Detektoreinheit (b) mit Zulauf (Mitte) und Ablauf (Oben), was durch kurze Zugänge ersetzt werden kann (C und D).

Der Umbau des Gerätes erforderte die Überprüfung des Systems. Während der vom Hersteller vorgesehene automatisierte Probenaufgabe über eine Probenschleife wird die Temperaturstabilität der Küvette von 42 °C durch Vorwärmung gewährleistet, desweiteren verhindern automatisierte Spülschritte das Auftreten von Verdünnungs- und

Verschleppungseffekten zwischen den Proben. Zur Überprüfung der Temperaturstabilität wurden Aromavorläufer-Extrakte in Lösungsmittel bei Raumtemperatur gelöst, injiziert und nach 0, 30 und 60 Sekunden Wartezeit zur Vorwärmung in der Messküvette gemessen. Die Kontrolle erfolgte über die aufgezeichneten Spektren, fand keine Veränderung mehr statt war von konstanter Temperatur auszugehen. Zur Überprüfung der Spülschritte wurde nach Injektion und Messung einer Probe gespült und anschließend entweder reines Lösungsmittel injiziert oder eine weitere Probe, anhand der Spektren war auf eine Verschiebung des Nullspektrums oder Akkumulation von Information im Spektrum zu achten.

Tab. 3-23: Probenaufgabe nach Modifikation des Gerätes Foss Winescan FT120.

-
- Injektion des Trägerlösungsmittels in Reinform
 - Verschluss der Probenausgangs (Gegendruck)
 - 30 sec Wartezeit bis zur Temperaturstabilität^a
 - Anpassen der Laserintensität des Gerätes
 - Nullpunktmessung
 - Injektion der gesamten Probe (1 ml)
 - Verschluss der Probenausgangs (Gegendruck)
 - 30 sec Inkubationszeit bis zur Temperaturstabilität^a
 - Messung der Probe im Kalibriermodus (Abspeichern des Spektrums)
 - Spülen der Messküvette mit je 3x Luft und je 3x Lösungsmittel^b
-

^a Lösungsmittel bei Raumtemperatur

^b Vermeidung von Verdünnung und Verschleppung

3.8.5 Auswahl von Küvette und Lösungsmittel

Aufgrund der geringen Konzentrationen der Aromavorläufer unterhalb der normalerweise Nachweisgrenze der MIR-Spektroskopie sollte das Verhältnis der Signalintensitäten von Analyten zu durch den durch Trägerlösungsmittel verursachten Hintergrund optimiert werden. Die Standard-CaF₂-Messküvette des Gerätes FT120 weist eine optische Pfadlänge von 37 µm auf. Zusätzlich wurden Küvetten der Stärke 50 µm, 100 µm und 150 µm eingesetzt. Die Messung der Lösungsmittel Wasser, Methanol, Acetonitril, Aceton, Nitromethan und Dimethylsulfoxid (DMSO), welche aufgrund ihrer Polarität und chemisch-struktureller Divergenz zu den Analyten ausgewählt und untersucht wurden, erfolgte in diesen verschiedenen Küvettenstärken. Vor der Anwendung war für jede Küvetten-Lösungsmittel-Kombination die von der geräteeigenen Software vorgeschlagene Signalverstärkung des Lasers zu akzeptieren und ein Nullpunkt zu erstellen. Die Analyse der durchgeführten Vorversuche erfolgte über die aufgezeichneten Spektren.

3.8.6 Kalibration und statistische Parameter

Die Berechnung der Kalibration erfolgte über die Korrelation der mit FT-MIR Analytik aufgezeichneten Spektren mit den quantitativen Daten aus der GC-MS Referenzanalytik entsprechender Proben mit der geräteeigenen Software (WineScanTM, Foss) unter Berücksichtigung der entsprechenden Anweisungen (Foss, 2002b).

Es wurden zur Entwicklung der geeignetsten Kombination aus Küvettenstärke und Träger-Lösungsmittel mehrere Basiskalibrationen erstellt, für die zu messenden Substanzgruppen, d.h. Glycoside der Monoterpene, C₁₃-Norisoprenoide, C₆-Alkohole, aromatischen Alkohole und flüchtigen Phenole sowie alle Einzelsubstanzen als Komponenten neu angelegt wurden. Für jede dieser Basiskalibrationen aus den verschiedenen Küvetten-Lösungsmittel-Kalibrationen wurde ein eigener Probensatz angelegt. Die Probensätze wurden vor dem Hintergrund eines ebenfalls neu angelegten Produktes, d.h. eines für diesen Probentyp neu erstellten Messprogrammes angelegt. Dieses definierte über Filterselektion die relevanten

Wellenlängen des Spektrums unter Ausschluß derer des Lösungsmittels. Die Proben wurden im Kalibriermodus des Gerätes gemessen, die so aufgezeichneten Spektren in den Probensatz geladen und den quantitativen Daten aus der Referenzanalytik mittels GC-MS zugeordnet. Die Berechnung des Modells erfolgte mittels PLS-Regression. Um die bestmögliche Näherung an die ideale Regressionsgleichung zu erhalten, waren einzuberechnende Filter und Hauptkomponenten manuell auszuwählen. Die Filter bezeichnen die Wellenlängen, die Hauptkomponenten erklären das mathematische Kalibriermodell. Die höchste Varianz der Referenz- zu Spektrum-Daten erklärt die erste Hauptkomponente, was sich mit den weiteren Hauptkomponenten verringert. Ihre Addition erreicht bis zu einer gewissen Anzahl eine Verbesserung des Modells, wobei die Anzahl der einbezogenen Hauptkomponenten die Anzahl der verwendeten Filter nicht übersteigen darf, da es sonst durch Einkalibrieren von spektralem Rauschen zur Überinterpretation des Modells kommt.

Die Qualität der erstellten Kalibration kann anhand mehrerer statistischer Kenngrößen beurteilt werden, wobei ausschließlich die des Standardfehlers der Kreuzvalidierung (RMSECV) als tauglich zur Beurteilung der Qualität der Kalibrierung und erst die Kenngröße des Standardfehlers der Vorhersage (RMSEP) unter Verwendung eines unabhängigen Datensatzes zur Validierung als final aussagekräftig gilt, während beispielsweise die alleinige Angabe des Bestimmtheitsmaßes R^2 nicht ausreicht (Foss, 2002b; Patz et al., 2004; Berger, 2013). Die Kenngrößen werden durch die Foss-Software berechnet (s.Tab. 3-24).

Tab. 3-24: Statistische Parameter zur Beurteilung einer Kalibrierung, nach Foss (2002b).

Stat. Parameter	Aussage
Bestimmtheitsmaß ^a (R^2)	Beschreibt als Korrelationskoeffizient zwischen 0,0 und 1,0 den Zusammenhang zwischen den Daten aus der Messung mittels FT-MIR und Referenzanalytik GC-MS. Im Idealfall beträgt er 1,0 bei einer Regressionsgleichung $y=1x+0$. Je höher die Streuung der Daten um die Gerade, desto größer die Abweichung vom Idealwert.
Standardfehler der Kalibrierung ^a (SEC)	Genauigkeit der Vorhersage der Referenzdaten mit dem vorhandenen Kalibrationsdatensatz. Gefahr des overfittings, da nur der vorhandene Kalibrationsdatensatz repräsentiert wird. Die Abweichung sollte so niedrig wie möglich sein.
Standardfehler ^b (SE)	Genauigkeit der Vorhersage der Referenzdaten mit dem vorhandenen Kalibrationsdatensatz. Wenn $SEC < SE$, ist die Kalibration über slope/intercept-Korrektur anzupassen
Standardfehler der Kreuzvalidierung (RMSECV)	Beschreibt die Qualität der Kalibrierung durch Validierung mit dem vorliegenden Datensatz. Jedes Viertel des Datensatzes wird einmal aus dem Modell entfernt und auf Grundlage der Kalibration aus den verbliebenen Werten berechnet, der mittlere Fehler für alle Proben wird ausgegeben. Die Abweichung sollte so niedrig wie möglich sein. Die Berechnung erfolgt über die Wurzel der Quadratsumme aller Differenzen der Werte aus FT-MIR und GC-MS.
Standardfehler der Vorhersage (RMSEP)	Beschreibt die Qualität der Kalibrierung durch Validierung mit einem unabhängigen Datensatz. Berechnung und Interpretation wie RMSECV.
Bias	Systematische Abweichung, die mittlere Differenz zwischen den Daten aus Datensatz der Kalibrierung gegen Validierung
Slope/ Intercept	Die individuelle Anpassung über slope/ Intercept-Korrektur kann systematische Abweichungen der Kalibration ausgleichen. Slope ist die Steigung, Intercept der Achsenabschnitt der Regressionsgeraden.

a Ausgabe für von der Software vorgeschlagene Kalibrierung

b Ausgabe für aktuell vorhandene Kalibrierung

3.9 Statistische Methoden

Die Analyse und Visualisierung von Datensätzen der vorliegenden Arbeit erfolgte mittels Standard-Statistikverfahren, welche im Folgenden kurz erläutert werden. Die Berechnungen wurden mittels Microsoft® Office Excel (Excel 2007, Microsoft, Redmond, USA) und der Software XLSTAT (Version 2011.4.04, Addinsoft, Paris, Frankreich), welche als Add-In für Excel zur Verfügung steht, durchgeführt. Die Methoden werden hier kurz und im Kontext der Anwendung in der vorliegenden Arbeit mit den angegebenen Programmen erläutert.

Tab. 3-25: Angewandte statistische Methoden (nach XLSTAT).

Stat. Methode	Aussage
Boxplots	Boxplots visualisieren die Verteilung eines Datensatzes durch Aufteilung der absoluten Daten in Quantile bei Darstellung der mittleren 50% in einer Box, die vom Median geteilt wird. Zusätzlich angegeben ist der Mittelwert. Die unteren und oberen 25% sind als Antennen eingezeichnet.
Varianzanalyse (ANOVA) u. paarweiser Vergleich	Die ANOVA erklärt die Varianz abhängiger Variablen durch unabhängige Variablen. Die unabhängigen Variablen werden Faktoren genannt, und entsprechend ihrer Anzahl spricht man von einfaktorieller oder multifaktorieller Varianzanalyse. Die Analyse errechnet anhand des Modells des Datensatzes, ob die Varianz zwischen den Faktorstufen größer ist als diese innerhalb einer Faktorstufe, was durch den F-Wert ausgegeben wird, die Höhe des F-Wertes gibt zusätzlich eine relative Wichtung des Einfluss des Faktors aus. Die Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit erfolgt durch den Signifikanzwert (p-Wert). Der paarweise Vergleich stellt fest, welche Faktorstufen sich unterscheiden und teilt diese entsprechend in Gruppen. Speziell in der Auswertung der Sensorik werden sogenannte mixed models mit Auswirkung auf den F-Wert berechnet, da die Prüfer als zufällig gewertet werden um deren Wertung als allgemein repräsentativ auszusagen.
Hauptkomponentenanalyse (HKA)	Die HKA bildet die Varianz eines Datensatzes durch neu berechnete Variablen ab, die einen Großteil der Information enthalten, sie werden als Hauptkomponenten bezeichnet. In der graphischen Darstellung werden diese gegeneinander aufgetragen, die Projektion der Beobachtungen bzw. Faktorwerte ergeben die Achsenwerte, die Variablen bzw. Faktorladungen werden als Vektoren zu diesen dargestellt. Lage und Länge der Vektoren gibt die Beziehung der Variablen zueinander an, die Lage der Faktorladungen zu den Beobachtungen deren Zusammenhang.
Diskriminanzanalyse (DA)	Die DA errechnet zum Erreichen der größtmöglichen Diskriminierung von Beobachtungen anhand von Wichtung maximaler Unterschiede zwischen den Gruppen und minimaler Unterschiede innerhalb von Gruppen eine Diskriminanzfunktion. Die graphische Darstellung funktioniert ähnlich zur HKA, Konfidenzintervalle zeigen optisch die Bereiche der Gruppenzugehörigkeit an.
Partial Least Squares Regression (PLS-R)	Die PLS-R bestimmt die Beziehung von zwei Datensätzen, einem erklärenden und einem abhängigen zu von beiden abhängige Beobachtungen. Die graphische Darstellung erfolgt ähnlich zur HKA, die zwei Datensätze werden als X- und Y-Variablen dargestellt und erklären über Vektoren die Beziehung untereinander und zu den Beobachtungen.
Heat Maps	Heatmaps unterstreichen graphisch durch Farbabstufung die Verteilung einer Datentabelle, normiert wird auf einen Standardwert, in der vorliegenden Arbeit symmetrisch auf 0.

4 Ergebnisse

4.1 Eignung von Methoden zur chemischen Analyse glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer

4.1.1 Glycosyl-Glucose-Assay

Der Summenparameter aller glycosidisch gebundenen Substanzen sollte mittels Glycosyl-Glucose- (GG-) Assay bestimmt werden. Um die Vergleichbarkeit mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS-) Aromastoffanalytik zu gewährleisten und keinen Mehraufwand zu verursachen, war Voraussetzung zur Anwendung der Methode auf die etablierte Probenvorbereitung mit Festphasenextraktion (SPE) und enzymatischer Hydrolyse zurückgreifen zu können.

4.1.1.1 Anwendbarkeit der enzymatischen Hydrolyse mit Enzympräparat AR2000

Im Standard-Assay nach Williams et al. (1995) erfolgt die Spaltung der Glycoside zur Messung der freisetzbaren D-Glucose über Säurehydrolyse. In dieser Arbeit sollte hingegen die etablierte enzymatische Freisetzung der Aromastoffvorläufer mit dem Enzympräparat AR2000 angewendet werden. Aufgrund auffällig hoher gemessener D-Glucose-Gehalte in den Proben wurden die Einzelschritte der Probenvorbereitung und die eingesetzten Lösungen überprüft (s. Tab. 4-1). Es stellte sich das Enzympräparat als Ursache heraus. Ersichtlich wurde das an den Wasser und Wasser/Ethanol-Proben, welche anstelle realer Proben unter enzymatischer Hydrolyse mit AR2000 aufgearbeitet wurden, da die ermittelten Glycosyl-Glucose- (GG-) Gehalte mit $34 \cdot 10^6$ bzw. $33 \cdot 10^6$ $\mu\text{mol/L}$ vorhandene D-Glucose anzeigten. Die Messung von analog verarbeiteten, aber ohne Enzym hydrolysierten Proben sowie Proben des im Versuch eingesetzten Wassers und Hydrolysepuffers ergaben keine messbaren GG-Gehalte. Bei Enzymlösungen, welche eingewogen und direkt gemessen wurden, wurden sehr hohe Gehalte in Höhe von $6564 \cdot 10^6$ $\mu\text{mol/L}$ bzw. $6935 \cdot 10^6$ $\mu\text{mol/L}$ bestimmt.

Tab. 4-1: Glycosyl-Glucose-Gehalte der Einzelschritte und Lösungen der Probenvorbereitung.

Fraktion	D-Glc ($\mu\text{mol/L}$)
Enzymlösung1 ^b	$6564,1 \cdot 10^6$
Enzymlösung2 ^b	$6934,9 \cdot 10^6$
Wasser+Enzym/SPE ^c	$34,1 \cdot 10^6$
Wasser/EtOH+Enzym/SPE ^c	$33,5 \cdot 10^6$
Wasser (SPE) ^c	0,0
Wasser/EtOH (SPE) ^c	0,0
Wasser	0,0
Hydrolyse-Puffer	0,0

^b 14 mg/ml in wässriger Lösung, rechnerisch auf 1 L

^c Anfangsvolumen 100 ml, Hydrolyseschritt mit 14 mg/mL Enzym, Elution mit 10 mL Methanol

Die Ergebnisse eines Aufdotier-Versuches mit dem Enzympräparat AR2000 in einem ersten Versuchsteil und mit D-Glucose zusätzlich zum Enzym in einem zweiten Versuchsteil bestätigten die Beobachtung. Die Messung der Enzymlösung mit ansteigender Konzentration von 14, 28, 42, 56, 70 und 84 mg/ml ergab einen linearen Anstieg des GG-Gehaltes (s. Abb. 4-1, A). Das Aufdotieren einer Enzymlösung der Konzentration von 14 mg/L mit D-Glucose von 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 mg/L resultierte ebenfalls in einem linearen Anstieg des GG-Gehaltes (Abb. 4-1, B). Diese Gegenüberstellung unterstreicht die Vermutung, dass im

Enzympräparat D-Glucose enthalten ist. Die Enzymlösungen wurden zusätzlich mittels Dünnschichtchromatographie und Molish-Test positiv auf Glucose getestet.

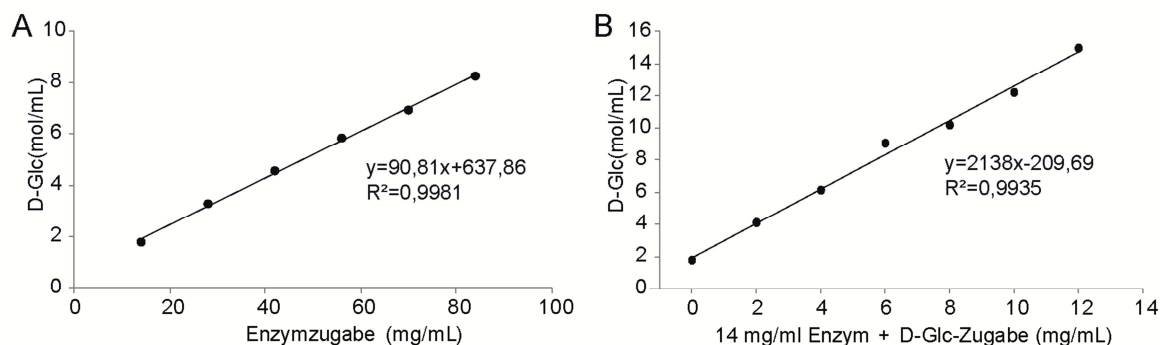


Abb. 4-1: GG-Gehalte in Abhängigkeit ansteigender Aufdotierung mit Enzympräparat AR2000 (A) und D-Glucose bei gleichbleibendem Enzymgehalt (B) in Hydrolyse-Puffer.

Das Enzympräparat führte demzufolge aufgrund vorhandener abspaltbarer D-Glucose zu falschpositiven Ergebnissen im GG-Assay. Der Assay kann somit unter enzymatischer Spaltung der Glycoside, zumindest für Enzym AR2000, nicht angewendet werden. Vermutlich bedingt die Trägermatrix des Präparates, die Maltodextrin beinhaltenden kann, den Effekt.

4.1.1.2 Vergleich von säure- und enzymkatalytischer Hydrolyse

Reale Most- und Weinproben wurden unter Anwendung der Säure- und enzymatischen Hydrolyse aufgearbeitet (s. Tab. 4-2). Die GG-Bestimmung nach Säurehydrolyse ergab 297 bzw. 294 $\mu\text{mol/L}$ an glycosidisch gebundenen Substanzen im Riesling- bzw. Muskateller-Wein sowie 826 bzw. 834 $\mu\text{mol/L}$ im Riesling- bzw. Muskateller-Most. Die Größenordnungen stimmen vergleichsweise mit Literaturwerten überein (Fischer et al., 2001; Papargyriou, 2003). In den Weinen sind deutlich geringere GG-Gehalte als in den Mosten nachweisbar, da während der Gärung Glycoside hydrolysiert werden. Eine deutliche Unterscheidbarkeit war mittels dem Assay ermittelbar. Allerdings konnten anhand die Rebsorten Riesling und Muskateller, die normalerweise anhand ihrer typischen Aromaprofile differenzierbar sind, nicht unterschieden werden. Die gezeigte geringe Auflösung des Assay sprach daraufhin gegen die weitere Anwendung in dieser Arbeit. Die überhöhten GG-Gehalte eines Riesling- und Chardonnay-Weines nach enzymatischer Hydrolyse demonstrierten erneut, dass der Assay unter Einsatz des Enzympräparates AR2000 nicht durchführbar ist. Die Werte lagen bei $40 \cdot 10^6$ bzw. $51 \cdot 10^6$ $\mu\text{mol/L}$ und lagen außerhalb eines möglichen Messbereiches, im direkten Vergleich zur Säurehydrolyse waren die Werte um ca. 10^5 erhöht.

Tab. 4-2: Glycosyl-Glucose-Gehalte nach säure- und enzymkatalytischer Hydrolyse.

Saure Hydrolyse ^a		Enzymatische Hydrolyse ^b	
Fraktion	D-Glc ($\mu\text{mol/L}$)	Fraktion	D-Glc ($\mu\text{mol/L}$)
Riesling-Wein	297,3	Riesling-Wein	$39,8 \cdot 10^6$
Muskateller-Wein	294,5	Chardonnay-Wein	$51,3 \cdot 10^6$
Riesling-Most	825,7		
Muskateller-Most	834,4		

^a Probevolumen 100 ml, SPE, Hydrolyseschritt mit 1,5 M H_2SO_4 , 1 h bei 100 °C

^b Probevolumen 100 ml, SPE, Hydrolyseschritt mit 14 mg/ml Enzym, 16 h bei 40 °C

4.1.2 Festphasenextraktion/ Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Mit dem Ziel der Quali- und Quantifizierung der glycosidisch gebundenen Aromastoffe sollte eine Analytik basierend auf Festphasenextraktion (SPE) und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) in Adaption bereits publizierter Methoden nach Magni und Porzano (2003), Schneider et al. (2004) und Ibarz et al. (2006) entwickelt werden.

4.1.2.1 Festphasenextraktion (SPE)

Zur Festphasenextraktion der Aromastoffvorläufer aus 100 ml Probe wurde aufgrund seiner Kapazität und Polarität das polymerbasierte Lichrolut EN-Material der Größe 500 mg gewählt (Ibarz et al., 2006; Stanitzek, 2014). Die Wiederfindung nach der Elution wurde durch die wiederholte Aufgabe einer Probe nach Passieren des Säulenmaterials überprüft. Abhängig der Probenmatrix, d.h. bei der Extraktion aus Most oder Wein, war ein Durchbruch des Säulenmaterials feststellbar. Für Most-Proben (s. Tab. 4-3). waren insbesondere Verluste der glycosylierten C₁₃-Norisoprenoide feststellbar, von denen beim Riesling bei der zweiten Elution noch 16,1% sowie beim Muskateller noch 25,7% des Gesamtanteils nachweisbar waren. Bei Wein-Proben (s. Tab. 4-4) kam es vor allem zu Verlusten an C₆-Alkohol-Vorläufern bei 30,6% für den Riesling bzw. 55,0% für den Muskateller und der aromatischen Alkoholen mit 80,2% bzw. 78,0%. Weiterhin auffällig war die Durchbruchrate für die Monoterpen-Glycoside des Muskateller-Weines, für die in der ersten Elution 268±13 µg/L und in der anschließenden zweiten Elution noch 49±0 µg/L bestimmt wurden. Dieser Effekt war für den Riesling-Wein mit der deutlich geringeren Ausgangskonzentration von 40±9 µg/L nicht feststellbar. Nach zwei Elutionen war kein weiterer Durchbruch feststellbar. Die Beobachtungen weisen zum einen auf eine Sättigung des Säulenmaterials bei hohen Konzentrationen an Analyten hin, zum anderen sind insbesondere bei Extraktion aus Wein Lösungsmittelleffekte aufgrund der Ethanol-Wasser-Matrix zu beachten. Die Durchführung der Elution mit dem Volumen von 10 ml Methanol war hingegen ausreichend, ebenso die weiteren Schritte der SPE. Durch Automatisierung mit den Systemen GX-271 ASPEC (Gilson Inc.) und SmartPrepExtractor (Horizon Technology) traten keine Abweichungen zur manuellen Probenvorbereitung auf, die Automaten unterschieden sich desweiteren untereinander nicht.

Tab. 4-3: Kapazität des Säulenmaterials Lichrolut EN 500mg bei Extraktion aus Most. Quantifizierung der Aroma-Glycoside nach erster (E1) und zweiter Elution (E2) aus einer Probe.

glyk. Vorläufer	Riesling-Most			Muskateller-Most		
	E1 (µg ml ⁻¹)	E2 (µg ml ⁻¹)	Verlust ^a	E1 (µg ml ⁻¹)	E2 (µg ml ⁻¹)	Verlust ^a
C ₆ -Alkohole	41±4	1±1	2,8%	84±5	7±1	8,0%
Monoterpene	184±6	8±2	4,1%	1053±33	109±23	10,3%
C ₁₃ -Norisoprenoide	87±11	14±2	16,1%	127±8	33±6	25,7%
aromatische Alkohole	587±9	39±8	6,6%	579±30	78±13	13,5%
flüchtige Phenole	2±0	0,0±0	0,0%	3±0	0,0±0	0,0%

a prozentualer Verlust aufgrund noch messbarer Analyten in E2

Tab. 4-4: Kapazität des Säulenmaterials Lichrolut EN 500mg bei Extraktion aus Wein. Quantifizierung der Aroma-Glycoside nach erster (E1) und zweiter Elution (E2) aus einer Probe.

glyk. Vorläufer	Riesling-Wein			Muskateller-Wein		
	E1 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	E2 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Verlust ^a	E1 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	E2 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Verlust ^a
C ₆ -Alkohole	31±9	10±1	30,6%	28±2	15±0	55,0%
Monoterpene	40±9	3±0	7,6%	268±13	49±0	18,4%
C ₁₃ -Norisoprenoide	94±13	2±0	2,1%	155±0	5±0	3,1%
aromatische Alkohole	323±20	259±4	80,2%	209±4	163±7	78,0%
flüchtige Phenole	3±1	0,1±0	3,2%	3±0	0,0±0	0,0%

a prozentualer Verlust aufgrund noch messbarer Analyten in E2

4.1.2.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Um die Quantifizierung der GC-MS-Methode zu validieren, wurde nach der Methode von (López et al., 2002) eine Probe mit bekannten Ausgangsgehalten der zu überprüfenden Substanzen in drei ansteigenden Konzentrationen innerhalb des Kalibrierbereiches aufdotiert. Es wurde dazu ein zufällig ausgewählter Muskateller-Wein verwendet, aufdotiert wurde mit den zur externen Kalibration eingesetzten Substanzen. Die angesetzten Validierungsproben wurden unverdünnt sowie nach 1:10 Verdünnung gemessen, wie in der Methode zur Quantifizierung realer Proben vorgesehen. Angegeben ist jeweils die prozentuale Abweichung der gemessenen Konzentration von der rechnerisch aufdotierten Konzentration (s. Tab. 4-5). Die absoluten Ist- und Soll-Werte sind in Kapitel 3.4.5. zu finden. Im Mittel ergab sich eine Abweichung von $\pm 16\%$, die vor allem durch die höheren Konzentrationen im oberen Bereich des Kalibrierbereiches zustande kam.

Tab. 4-5: Validierung der Quantifizierung mittels GC-MS, Abweichung der Ist/ Soll-Werte (%).

Substanz//Probe Konzentration	Abweichung von c1 ^a		Abweichung von c2 ^b		Abweichung von c3 ^c	
	unverd	1:10	unverd	1:10	unverd	1:10
n-Hexanol	14,5%	15,2%	8,1%	8,2%	19,1%	21,7%
Linalool	17,1%	17,5%	7,9%	17,7%	11,8%	24,9%
β -Damascenon	11,1%	1,5%	5,9%	12,5%	14,6%	24,6%
2-Phenylethanol	12,2%	14,0%	7,8%	12,0%	19,8%	28,7%
4-Ethylguaiaicol	30,1%	25,3%	14,0%	14,9%	17,0%	29,4%

^a Konzentration1 (c1): rechnerisch aufdotiert mit ($\mu\text{g ml}^{-1}$): n-Hexanol 0,48/ Linalool 0,68/ β -Damascenon 0,46/ 2-PhEtOH 0,60/ 4-Ethylguaiaicol 0,48

^b Konzentration2 (c2): rechnerisch aufdotiert mit ($\mu\text{g ml}^{-1}$): n-Hexanol 2,35/ Linalool 3,42/ β -Damascenon 2,31/ 2-PhEtOH 2,99/ 4-Ethylguaiaicol 2,40

^c Konzentration3 (c3): rechnerisch aufdotiert mit ($\mu\text{g ml}^{-1}$): n-Hexanol 7,13/ Linalool 6,84/ β -Damascenon 6,92/ 2-PhEtOH 5,97/ 4-Ethylguaiaicol 7,19

Die Wiederholbarkeit der GC-MS-Messung wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen überprüft, bei jeweils dreimaliger Messung einer Probe (s. Tab. 4-6). Eingesetzt wurde ein zufällig ausgewählter Riesling-Wein. Die Ergebnisse zeigen durch die geringen Abweichungen von - 4,9% bis + 3,7% um die gemittelten absoluten Konzentrationen der untersuchten Analyten, dass die Wiederholbarkeit der Messung über die Zeit sehr stabil ist.

Tab. 4-6: Wiederholbarkeit der Messung mittels GC-MS.

glyk.	Konz. ^a (µg/L)	Messtag 1 ^c			Messtag 2			Messtag 3		
		Wh1 ^b	Wh 2	Wh3	Wh1	Wh 2	Wh3	Wh1	Wh 2	Wh3
C ₆ -Alk.	23,4±0,3	-0,7%	-0,3%	-0,3%	-1,1%	-0,7%	-0,7%	+0,1%	+1,0%	+2,7%
Monotr.	33,4±0,6	+1,0%	+2,5%	+2,2%	-1,2%	-0,5%	-0,2%	-2,3%	+1,1%	-1,7%
C ₁₃ -N.	80,4±2,5	-4,9%	-1,0%	-2,7%	-1,2%	+2,6%	+2,3%	-2,3%	+3,5%	+3,7%
ar. Alk.	305,4±0,9	-0,5%	+0,1%	+0,4%	-1,2%	-0,1%	-0,2%	+0,3%	+0,3%	-0,1%
fl. Ph.	2,7±0,1	-4,1%	+3,3%	+3,3%	+3,3%	-0,4%	+3,3%	-4,1%	-4,1%	-0,4%

a gemittelte Konzentration mit absoluter Abweichung über alle Messtage- und wiederholungen (Riesling-Wein)

b prozentuale Abweichung von der absoluten Konzentration

c Messdaten 09.05.2016, 10.05.2016, 11.05.2016

4.1.2.3 Gesamtmethode

Die Validierung der Gesamtmethode aus SPE, enzymatischer Spaltung der Glycoside und GC-MS-Messung war nur semiquantitativ durchführbar. Die Wiederfindungsrate der Analyten erfolgte anhand der Quantifizierung des internen Standard Octyl-β-D-Glucopyranosid bzw. dessen Spaltprodukt n-Octanol und betrug über die Gesamtheit der Proben (n=441, je n=3) im Mittel 93±30 %. Bei der Interpretation des Wertes sollte die bedingt gegebene Übertragbarkeit auf die Einzelaromastoffe berücksichtigt werden, da ausschließlich die Analyse eines Stoffes und eines möglichen Zuckerrestes erfolgen konnte.

Um Fehler in der Quantifizierung zu minimieren wurde jede Probe in dreifacher technischer Replikation gemessen, d.h. von Beginn der Probenvorbereitung getrennt aufgearbeitet und gemessen. Die folgende Tab. 4-7 bildet im oberen Teil den gesamten Messbereich des Datensatzes aller Einzelproben für die Gruppensummen der Aromastoffvorläufer ab. Im unteren Teil ist die mittlere Standardabweichung Replikation aller Proben, die aus den Standardabweichungen der drei technischen Replikate je Probe gemittelt wurde, dargestellt. Zusätzlich erfolgt die Angabe des konzentrationsunabhängigen Variationskoeffizienten (CV). Die Abweichungen in der Replikation waren substanzgruppenabhängig. Für Vorläufer der C₆-Alkohole ergab sich bei einer mittleren Konzentration von 48,3 µg/L die mittlere Standardabweichung von 3,6 µg/L, während für die Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide bei einem Mittelwert von 182,9 µg/L die mittleren Standardabweichung von 18,9 µg/L bestimmt wurde. Der relative Variationskoeffizient (CV) erlaubte eine übersichtliche Evaluierung der Güte der Replikation durch direkte Vergleichbarkeit. Dieser verdeutlichte, für die vorher im Kontext der Konzentrationsbereiche beschriebenen Beispiele, anhand des CV von 5,7% für die Vorläufer der C₆-Alkohole sowie des CV von 10,3% für die der C₁₃-Norisoprenoide eine höhere Abweichung in der Replikation für letztere Substanzgruppe. Die Wiederholbarkeit der Messung ergab weiterhin einen CV von 11,1% für die Vorläufer der Monoterpene, für die glycosyliert vorliegenden aromatischen Alkohole von 5,7% sowie der gebundenen flüchtigen Phenole von 12,9%.

Tab. 4-7: Konzentrationsbereich, Standardabweichung und Variationskoeffizient Gesamtdatensatz^a.

glyk. Vorläufer	C ₆ -Alkohole	Monoterpene	C ₁₃ -Norisopr.	aromat. Alkohole	fl. Phenole
Min. c (µg/L)	4,3	0,0	3,9	38,5	0,1
Max. c (µg/L)	255,2	1862,2	683,6	1929,3	59,6
MW. c (µg/L)	48,3	196,2	182,9	475,5	3,4
mittlere Stabw (µg/L) ^b	3,6	12,0	18,9	25,8	0,4
mittlerer CV ^c	7,8%	11,1%	10,3%	5,7%	12,9%

a n= 441 Ausgangsproben, techn. Replikate von diesen je dreifach

b mittlere Standardabweichung, rechnerisch aus den Stabw der drei tech. Replikate je Probe

c mittlerer Variationskoeffizient, rechnerisch aus den Variationskoeffizienten der techn. Replikate je Probe

Die Ursachen der schwankenden Wiederfindung sowie Replikation können nicht abschließend geklärt werden. Vermutlich waren die Schritte SPE und enzymatische Hydrolyse in der Probenvorbereitung die Hauptursachen dieser Effekte. Die GC-MS-Methode wurde bezüglich Wiederfindung und Wiederholbarkeit als zuverlässig validiert. Unter Einbezug aller Teile der Methode, war die etablierte SPE/(LV-)GC-MS-Methode zur Quantifizierung der enzymatisch hydrolysierten Aromastoffvorläufer geeignet. Ein systematischer Fehler der absoluten Werte sollte in Betracht gezogen werden, die vergleichende Analyse von Proben, insbesondere bei Vorliegen gleicher Probenmatrix, ist aber zuverlässig möglich.

4.1.3 Fourier-Transformation-Midinfrarot- (FT-MIR-) Spektroskopie

Die Entwicklung einer Schnellmethode zur Quantifizierung der Aromastoffvorläufer sollte unter Anwendung der etablierten GC-MS-Analytik als Referenzanalytik durchgeführt werden. Die Methode baut auf einer von Schneider et al. (2004) publizierten und vorläufigen Analytik für Minorkomponenten in Mosten der Rebsorte Melon de Bourgogne auf.

4.1.3.1 Standardisierung des modifizierten Geräteaufbaus

Der Umbau des Messgerätes FT 120 zur manuellen Probenaufgabe erforderte die Kontrolle der Applikation, einschließlich Temperaturstabilität und Spülschritten, zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit. Über die Kontrolle der aufgezeichneten Spektren wurde die Temperaturstabilität bei 42 °C nach 30 Sekunden ermittelt und entsprechend vor jeder Messung eingehalten. Die Wiederholbarkeit der Messung der Einzelproben war zum Teil nicht vollständig gegeben. Als erste Ursache war die nicht uneingeschränkte Übereinstimmung der Extrakte auszumachen, welche jeweils aus den technischen Replikaten einer Probe stammten. Dieser Umstand wurde durch das Zusammenführen der Extrakte vor der Messung behoben. Zwischen den Messungen von unterschiedlichen Proben trat allerdings weiterhin Kumulation von Information in den Spektren auf. Diese waren in nachfolgend gemessenen Proben detektierbar und ebenfalls bei der nachfolgenden Messung von reinem Lösungsmittel. Möglicherweise waren Verschleppungseffekte zwischen Proben trotz intensiver Spülschritte mit der verwendeten Probenaufgabe nicht zu vermeiden. Eventuell war die Küvettentemperatur über die Messzeit doch Schwankungen unterworfen, die aufgrund der geöffneten Detektoreinheit, in der sich die Küvette befindet, zustande kamen. Durch diese Faktoren konnte vermutlich kein über mehrere Messungen stabiler Nullpunkt erreicht werden. Eventuell ließen sich diese Probleme lösen, indem die Probenaufgabe in die Messküvette automatisiert, beispielsweise über einen HPLC-Probengeber, durchgeführt würde. Desweiteren muss die Temperaturstabilität gewährleistet sein, was durch bessere Isolation der Messküvette im Zuge einer automatisierten Probenaufgabe möglich sein sollte.

4.1.3.2 Auswahl des Lösungsmittels und der Messküvette

Es bestand ein problematisches Signal-zu-Hintergrundverhältnis aufgrund der geringen Konzentrationen glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer. Durch die Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels als Träger sowie die Erhöhung der optischen Pfadlänge der Küvette sollte das Hintergrundsignal minimiert werden. Die Anforderungen an das Lösungsmittel waren geeignete Polarität, vollständige Lösung der Extrakte, chemisch-strukturelle Unähnlichkeit zu den Analyten und die praktische Anwendbarkeit in Bezug auf Gesundheitsrisiko, Handhabung und Preis. Aufgrund der Polarität kamen folgende Lösungsmittel in Frage: Wasser, Methanol, Acetonitril, Aceton, Nitromethan und Dimethylsulfoxid (DMSO), wobei nur Methanol und DMSO eine vollständige und sofortige Lösung der Extrakte erbrachten. DMSO brachte die vorteilhafte chemische Divergenz zu den Analyten sowie die nachteilige bei Raumtemperatur gegebenen Viskosität als Schwierigkeit in der Handhabung mit sich, während Methanol geeigneter in der Anwendung aber strukturell den Analyten ähnlicher war. Zudem war bereits eine auf methanolischer Matrix erstellte Basiskalibration für glycosylierte Aromastoffvorläufer in Most aus Melon de Bourgogne Trauben publiziert worden (Schneider et al., 2004). Die Auswahl der Messküvette erfolgte deshalb in Kombination mit den Lösungsmitteln Methanol und DMSO, untersucht wurden Küvetten der optischen Pfadlänge von 37 μm , 50 μm , 100 μm und 150 μm .

Die Analyse der Transmissions-Spektren verdeutlichte eine Abschwächung des Signals anhand der Absorptionseinheiten ($\text{AU} = \log(\text{Einstrahlung}/\text{Detektion})$) bei steigender Küvettenstärke in den Bereichen ohne oder mit nur geringem Eigensignal des Lösungsmittels (s. Abb. 4-2 für DMSO und s. Abb. 4-3 für Methanol). Diese Bereiche, von der Foss-Software als „good ranges“ geführt, können später als Messbereiche zur Kalibration verwendet werden und finden sich in der folgenden Tab. 4-8.

Tab. 4-8: Geeignete Messbereiche im MIR-Spektrum abhängig der eingesetzten Küvetten-Lösungsmittel-Kombination.

Kombination			
Küvette (μm)	Lösungsmittel	Anzahl	Messbereiche (cm^{-1})
37	DMSO	4	1100-1295 // 1330-1380 // 1460-2875 // 3050-3745
150	DMSO	5	1100-1295 // 1330-1380 // 1460-2875 // 3050-3360 // 3570-3745
37	Methanol	3	1155-1330 // 1525-2740 // 3590-3745
150	Methanol	3	1155-1330 // 1525-2740 // 3590-3745

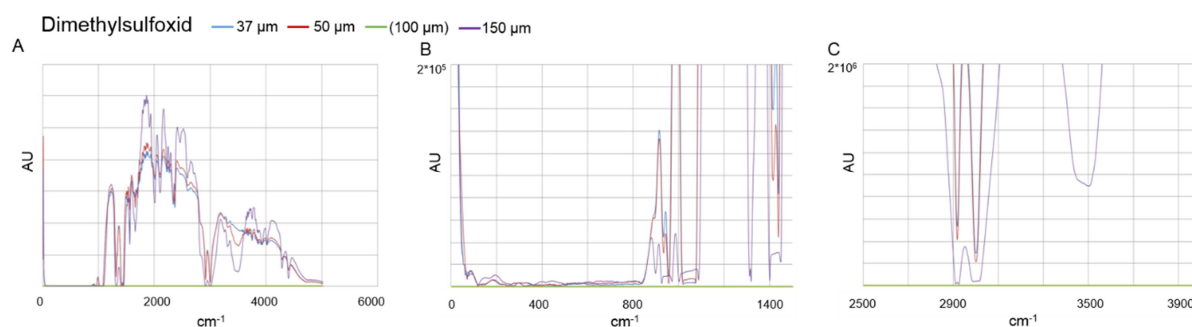


Abb. 4-2: Transmissionsspektren von Dimethylsulfoxid bei der Messung in den Küvettenstärken 37 μm , 50 μm , 100 μm und 150 μm . Darstellung des gesamten Spektrums (links) von 0-6000 cm^{-1} sowie der Ausschnitte 0-1400 cm^{-1} (mitte) und 2500-3900 cm^{-1} (rechts), AU Absorptionseinheiten.

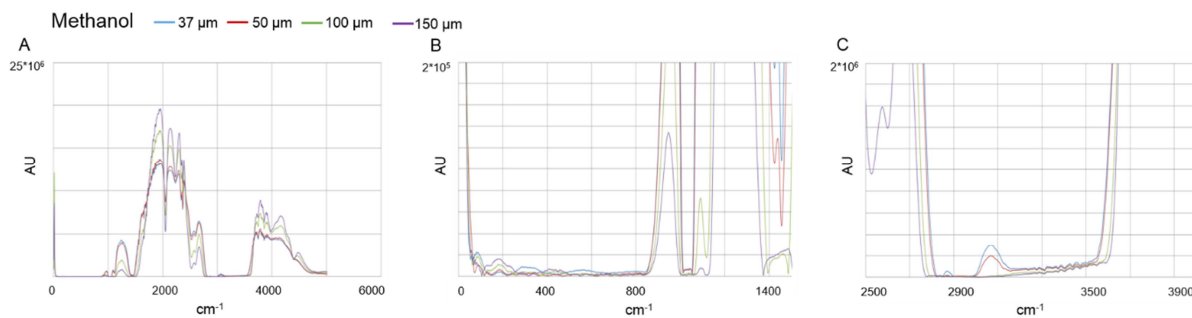


Abb. 4-3: Transmissionsspektren von Methanol bei der Messung in den Küvettenstärken 37 μm , 50 μm , 100 μm und 150 μm . Darstellung des gesamten Spektrums (links) von 0-6000 cm^{-1} sowie der Ausschnitte 0-1400 cm^{-1} (mitte) und 2500-3900 cm^{-1} (rechts), AU Absorptionseinheiten.

Die Messung der Aromavorläufer-Extrakte in den entsprechenden Lösungsmittel-Küvetten-Kombinationen ergab die in den folgenden Abbildungen gezeigten Absorptionsspektren (s. Abb. 4-4 für DMSO und s. Abb. 4-5 für Methanol), mit weißem Hintergrund hervorgehoben sind die entsprechend vorher bestimmten auswertbaren Wellenlängenbereiche. Mit Erhöhung der Schichtdicke der Küvette von 37 μm auf 150 μm konnte jeweils eine Steigerung der Signalintensität erreicht werden (vgl. jeweils A und B). Aufgrund der chemisch strukturellen Unterschiede zwischen Aromastoffvorläufern und des Lösungsmittels DMSO stand im Vergleich zu Methanol eine größere Zahl auswertbarer Wellenlänge zur Verfügung, die auch Information der Analyten beinhalteten. Deutlich erkennbar war auch die steigende Signalintensität bei Messung von aufdotierten Extrakten (s. Abb. 4-6), d.h. diese wurden in einfacher Konzentration sowie nach Zusammenführung von zwei und vier Extrakten bestimmt. Für die gering konzentrierten Aromavorläufer, welche quantitativ unter der normalen Nachweisgrenze der FT-MIR Analytik von 100 mg/L liegen, ergaben sich damit unter Verwendung der möglichst empfindlichen Kombination aus 150 μm Küvette und der Lösungsmittel DMSO und Methanol gut detektierbare Signale. Auf der Basis dieser Vorversuche wurden Basiskalibrationen unter Verwendung der Küvette 150 μm mit den Lösungsmitteln DMSO und Methanol erstellt.

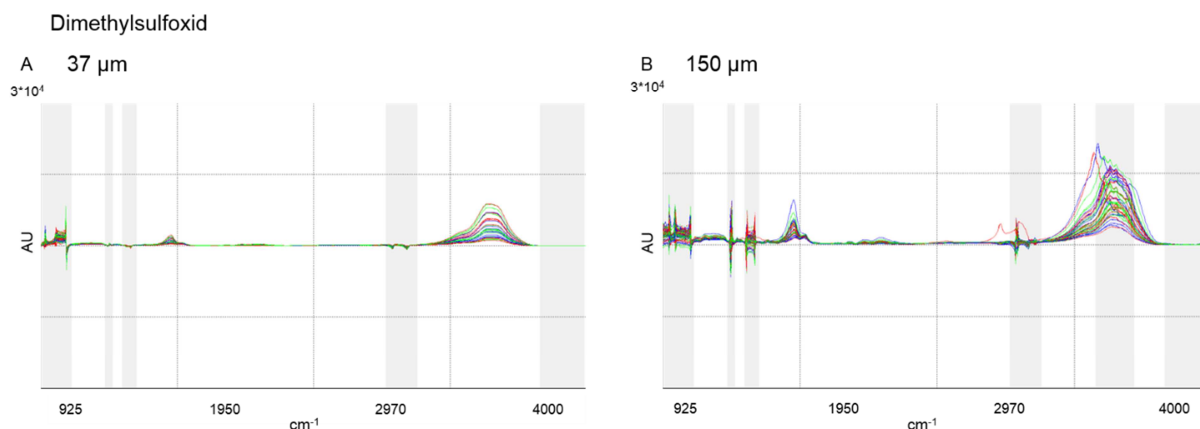


Abb. 4-4: Absorptionsspektren von Extrakten glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer in Dimethylsulfoxid bei Messung in den Küvettenstärken 37 μm (A) und 150 μm (B).

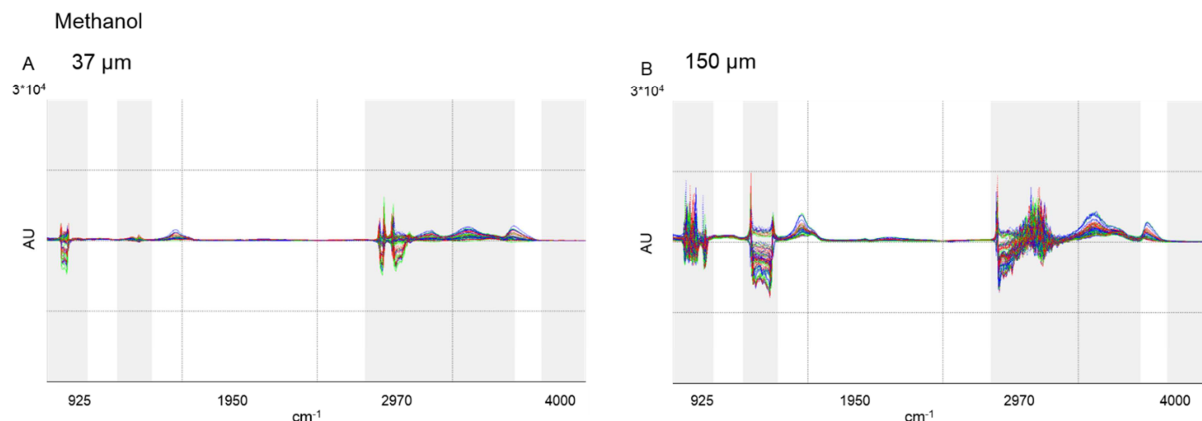


Abb. 4-5: Absorptionsspektren von Extrakten glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer in Methanol bei Messung in den Küvettenstärken 37 μm (A) und 150 μm (B).

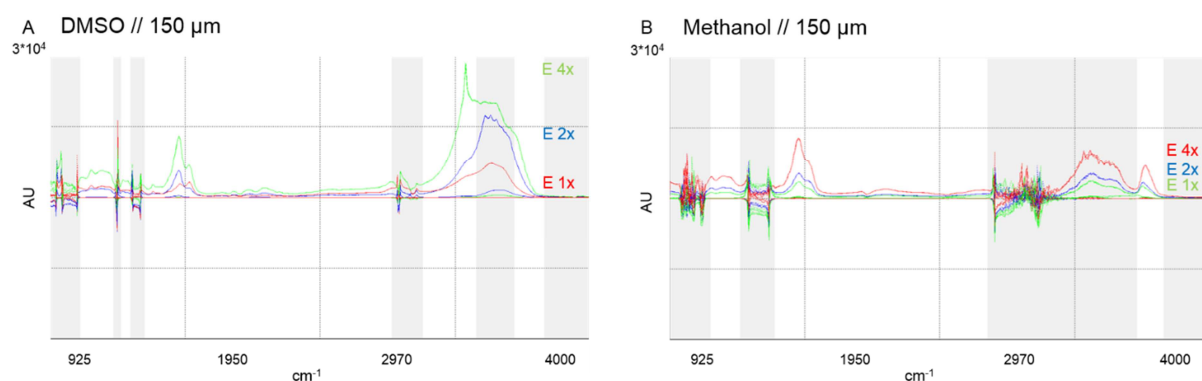


Abb. 4-6: Absorptionsspektren bei Aufdotieren von Aromavorläufer-Extrakten für Dimethylsulfoxid (A) und Methanol (B) in der 150 μm Küvette, E (Extrakt) 1x einfach, 2x zweifach, 4x vierfach.

4.1.3.3 Basiskalibration

Zur Erstellung der Basiskalibrationen, die jeweils für DMSO und Methanol unter Verwendung der 150 μm Küvette erstellt wurden, sind je 37 Einzelproben, davon zweifach als Aufarbeitungswiederholung, in dreifacher Messwiederholung verwendet worden. Von den ursprünglich 38 Proben musste jeweils eine Probe wegen Fehler bei der Applikation aus dem Datensatz entfernt werden, was in gering unterschiedlichen Werten des durchgeführten Messbereiches für die Kalibrationen mit DMSO bzw. Methanol resultierte. Aus den Datensätzen der mittels FT-MIR aufgezeichneten Spektren und den quantitativen Werten aus der Referenzanalytik GC-MS wurden unter Berücksichtigung der vorher ermittelten relevanten Wellenlängen mittels PLS über die geräteeigene Software die Kalibrierfunktionen berechnet. Zur Erstellung des PLS-Modells wurde die günstigste Kombination aus Faktoren (Hauptkomponenten) und Kanälen als Filter gewählt, jedoch wurden maximal 15 Faktoren verwendet um Überfittung der Kalibration zu vermeiden. Die Ergebnisse sind aufgrund des geringen Probenumfangs als vorläufig zu betrachten. Die Güte der Kalibration wurde anhand Bestimmtheitsmaß R^2 , dem Standardfehler der Kreuzvalidierung (RMSECV) und dem Standardfehler der Vorhersage (RMSEP) evaluiert. Die Probensätze bestanden jeweils aus in den Monaten April, Juli und August 2015 gemessenen Proben. Die Berechnung der Kalibration mit einschließlicher Kreuzvalidierung innerhalb des Gesamtprobensatzes ergab sowohl für die Verwendung von DMSO als auch Methanol als Trägerlösungsmittel akzeptable Ergebnisse. Die Validierung der Kalibration durch Betrachtung der Datensätze aus April und Juli gegen die Daten aus August war allerdings nicht erfolgreich. Die

Ergebnisse für Dimethylsulfoxid sind in Tab. 4-9, die für Methanol in Tab. 4-10 dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 lag zunächst bei den Kalibrationen der Gesamtdatensätze aller gruppierten Vorläufersubstanzen, abgesehen für die flüchtigen Phenole bei DMSO, über 0,9. Das Bestimmtheitsmaß gilt allerdings nicht als ausschließliche Kenngröße zur Beurteilung der Qualität von Kalibrationen (Foss, 2002b; Patz et al., 2004; Berger, 2013). Mittels Kreuzvalidierung, ausgedrückt durch den RMSECV, ergaben sich im Rahmen der gemessenen Konzentrationsbereiche moderate Abweichungen, wie für die C₆-Alkohole von 4,29 in DMSO bzw. 2,19 in Methanol bei einem Konzentrationsbereich zwischen 7,0 µg/L und 95,5 µg/L oder der aromatischen Alkohole von 23,78 bzw. 34,40 abhängig des Lösungsmittels bei einem Messbereich von 86,2 µg/L-1929,3 µg/L. Für die C₁₃-Norisoprenoide wurden dagegen bereits während der Kreuzvalidierung für den Konzentrationsbereich von 58,6 µg/L bis 683,6 µg/L für DMSO bzw. bis 671,7 µg/L für Methanol höhere Werte für den RMSECV von 50,3 für DMSO bzw. 46,0 für Methanol feststellbar. Die spätere Validierung mit dem unabhängigen Datensatz ergab sehr hohe Abweichungen für die Kalibrationen aller Substanzgruppen, was sich durch die Verschlechterung des Bestimmtheitsmaßes sowie des Vorhersagefehlers ausdrückte. Am Beispiel des Parameters glycosylierte aromatische Alkohole weiter ausgeführt, war die Reduktion von R^2 auf 0,7043 bei Verwendung von DMSO bzw. 0,9322 für Methanol feststellbar, bei einem deutlich gestiegenen Vorhersagefehler von 429,69 bzw. 205,66. Für die C₁₃-Norisprenoid-Vorläufer, welche bereits einen hohen RMSECV aufwiesen, war durch Validierung eine weitere Verschlechterung bei einem RMSEP von 69,07 für die Verwendung von DMSO bzw. von 63,12 für Methanol bei Bestimmtheitsmaßen von 0,2267 bzw. 0,3540 feststellbar. Die Kalibration für glycosylierte Monoterpene war zusätzlich von Cluster-Bildung der Messwerte betroffen, welche durch die starke Rebsorten-Abhängigkeit dieser Vorläufersubstanzen zustande kam. Für die Verwendung von DMSO ergab sich durch Validierung eine Reduktion im Bestimmtheitsmaß der Kalibration von 0,9837 auf 0,6730 bei einer Verschlechterung des RMSEP von 49,83 auf 68,87. Bei der Verwendung von Methanol wurde eine Reduktion von 0,9870 auf 0,8212 für R^2 bei einer Zunahme des RMSEP von 29,29 auf 50,92 ermittelt.

Tab. 4-9: Ergebnisse der Basiskalibration für DMSO (n=37).

Parameter glyk.	Bereich (µg/L)	Mittelwert (µg/L)	R^2 ^a	RMSECV ^a	R^2 ^b	RMSEP ^b (korr.) ^c	Filter-Anzahl (Faktor/Kanal)
C ₆ -Alk.	7,0-95,5	38,7	0,9482	4,29	0,8417	12,95	9/21
Monoterp.	0,1-1626,2	129,2	0,9837	49,83	0,6730	68,87	12/22
C ₁₃ -Nor.	58,6-683,6	350,8	0,9043	50,33	0,2267	69,07	14/17
ar. Alk.	86,2-1929,3	455,7	0,9873	23,78	0,7043	429,69	13/23
fl. Ph.	0,5-6,7	2,5	0,8468	0,67	0,3355	1,60	9/22

a Kalibration und Kreuzvalidierung des Gesamtdatensatzes

b Validierung mit unabhängigem Datensatz (Proben April, Juli gegen August)

c statistische Korrektur (slope/intercept) einberechnet

Tab. 4-10: Ergebnisse der Basiskalibration für Methanol (n=37).

Parameter glyk.	Bereich (µg/L)	Mittelwert (µg/L)	R ² ^a	RMSECV ^a	R ² ^b	RMSEP ^b (korr.) ^c	Filter-Anzahl (Faktor/Kanal)
C ₆ -Alk.	7,0-95,5	38,5	0,9863	2,19	0,5437	21,98	12/29
Monoterp.	0,1-1332,0	86,1	0,9870	29,29	0,8212	50,92	15/24
C ₁₃ -Nor.	58,6-671,7	341,0	0,9047	45,98	0,3540	63,12	12/29
ar. Alk.	86,2-1929,3	455,9	0,9733	34,40	0,9322	205,66	9/20
fl. Ph.	0,5-7,3	2,6	0,9408	0,47	0,6590	1,14	12/15

a Kalibration und Kreuzvalidierung des Gesamtdatensatzes

b Validierung mit unabhängigem Datensatz (Proben April, Juli gegen August)

c statistische Korrektur (slope/intercept) einberechnet

Die folgende Abb. 4-7 verdeutlicht das Ergebnis. Die Graphen in A1 (DMSO) und B1 (Methanol) bilden jeweils die Korrelation von FT-MIR-Vorhersage zu GC-MS-Referenzanalytik bei Auswertung eines Datensatzes ab. In A2 (DMSO) und B2 (Methanol) zeigt sich der Effekt der Validierung mit einem unabhängigen Datensatz, was zu einem deutlichen Verlust der Güte der Kalibration führt. Die zusätzlich gemessenen Proben weichen zum einen deutlich von den theoretischen tatsächlichen Werten ab, was insbesondere in der in A2 abgebildeten DMSO-Kalibration deutlich wird. Diese war auch durch den mit 429,69 deutlich höheren Vorhersagefehler gekennzeichnet als die Methanol-Kalibration mit 205,66. Durch die geräteeigene Software werden systematische Abweichungen zudem durch eine Korrektur Geradensteigung- bzw. Achsendurchgang (slope/ intercept) versucht anzupassen. Dieser Effekt war bei beiden Kalibrationen durch die Unterscheidung der ursprünglichen Geraden (rot) zu der korrigierten Geraden (grau) deutlich zu beobachten.

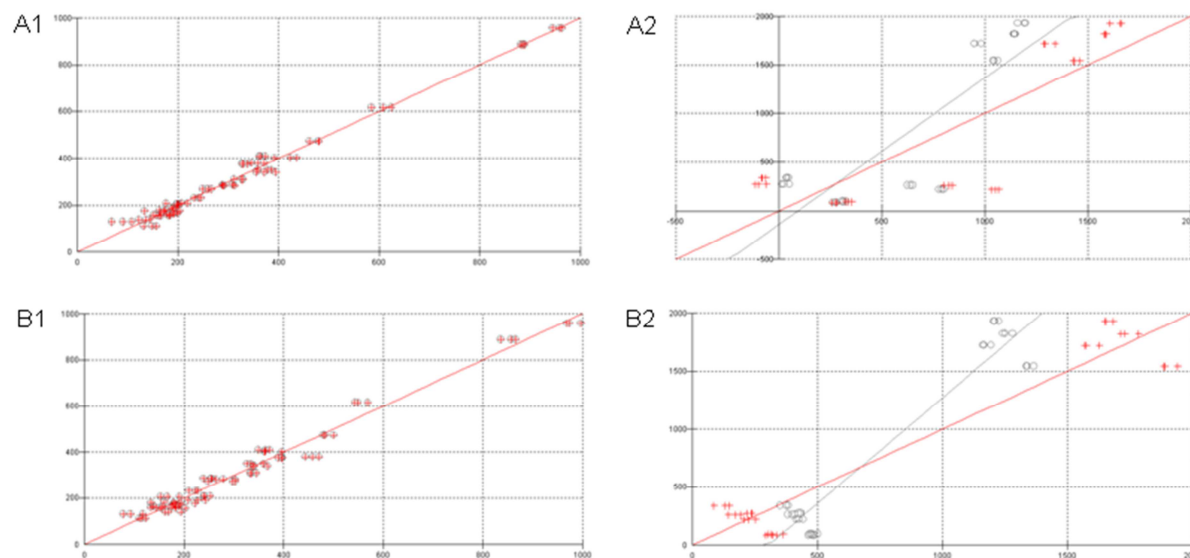


Abb. 4-7: Korrelation FT-MIR (x) zu Referenz (y) für glycosylierte aromatische Alkohole (µg/L) der Basiskalibrierung (A1) und Validierung (A2) in DMSO sowie Basiskalibrierung (B1) und Validierung (B2) in Methanol.

4.1.3.4 Fazit

In Vorversuchen konnte durch Vergrößerung der optischen Pfadlänge durch Verwendung einer 150 µm Küvette statt standardisierten 37 µm in Kombination mit dem Lösungsmittel DMSO die empfindlichste Kombination zur FT-MIR-Spektroskopie der gering konzentrierten Aromavorläufer bestimmt werden. Die Handhabung des bei Raumtemperatur viskosen

Lösungsmittels DMSO ist weniger praktikabel, weswegen zusätzlich wie bei Schneider et al. (2004) mit Methanol gearbeitet wird. Es liegen bisher zwei Basiskalibrationen im Umfang von jeweils 37 Proben in jeweiliger dreifacher technischer Replikation vor. Diese waren durch vielversprechende statistische Vorhersageparameter charakterisiert, konnten einer unabhängigen Validierung allerdings nicht standhalten. Mögliche Ursachen liegen sowohl in der FT-MIR- als auch der GC-MS-Referenzanalytik begründet. Die Modifikation des Gerätes FT 120 führte möglicherweise zu Problemen in der Temperatur- und Druckstabilität und damit zu Beeinträchtigung in der Wiederholbarkeit der Aufzeichnung der Spektren. Desweiteren liegt die angegebene Nachweisgrenze der Analytik bei 100 mg/L Berger (2013), wodurch Schwierigkeiten in der Messung von Minorkomponenten trotz Adaptionen zur Erhöhung der Signalstärke nicht auszuschließen sind. Die Validierung der GC-MS-Referenzanalytik (s. Kap. 4.1.2) ergab zudem Schwankungen in Wiederfindung und Replikation, die vermutlich durch die Probenvorbereitung bedingt sind. Die Datensätze der FT-MIR-Basiskalibrationen sind bisher allerdings durch zu geringe Probenzahlen vertreten und sollten vor einer abschließenden Aussage zur Umsetzbarkeit der Methodenentwicklung um weitere Proben heterogener Aromastoffvorläufer-Konzentrationen erweitert werden.

4.2 Einflussfaktoren auf den Ausgangsgehalt glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer in Traubenmost und Wein

Der Ausgangsgehalt der mehrheitlich glycosidisch gebundenen Aromastoffe (Noble et al., 1987), die einem Most oder Wein zueigen sind, kann man als deren Aromapotential oder als Reservoir an potentiell freisetzbaren Aromastoffvorläufern verstehen, auf dessen Basis die Freisetzung zum fertigen Wein oder Sekt erfolgen kann. Es ist von diverseren Faktoren abhängig und modulierbar.

4.2.1 Rebsorte

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene, der Literatur nach anhand ihres Aromaprofils unterschiedlich einzugruppierende Moste und Weine analysiert. Muskateller, Morio Muskat und Gewürztraminer sind dem Muskateller-Typ zuzuordnen, welcher durch sehr hohe Gehalte an Monoterpenen und deren Vorläufern charakterisiert ist. Riesling, Scheurebe und Müller-Thurgau, welche zum Riesling-Typ zählen, werden durch mittlere Gehalte dieser Substanzgruppe sowie C₆-Alkohole repräsentiert. Airen, Chardonnay, Ugni blanc gehören zum neutralen Silvaner-bzw. Weißburgunder-Typ (Gunata et al., 1985b; Mateo und Jiménez, 2000). Der Sauvignon blanc bleibt ohne Zuordnung, da diese Rebsorte vor allem durch die Thiole und deren Cystein-gebundene Vorläufer sowie Methoxypyrazine geprägt wird, zudem aber auch durch glycosidisch gebundene Vorläufer (Sefton et al., 1994). In diesem Kapitel werden sie ausschließlich anhand des Faktors Rebsorte beurteilt, während weitere beeinflussende Faktoren im folgenden Kapitel 4.2.2 einbezogen werden. Most und Wein wurden getrennt gruppiert, da sie aufgrund der während der Gärung stattfindenden Spaltung und damit Abnahme der Vorläufer grundsätzlich nicht vergleichbar sind (Sarry und Günata, 2004).

4.2.1.1 Verteilung der Aromastoffvorläufer im Most

Die insgesamt Verteilung der Vorläufer in 103 analysierten Mosten neun verschiedener Rebsorten zeigt der Boxplot in Abb. 4-8. Die Verteilung der quantitativen Gehalte zeigte insbesondere für die Monoterpen-Vorläufer eine weite Streuung von einem gemessenen Minimum von 19,5 µg/L bei einem Chardonnay bis zu 1857,1 µg/L eines Muskatellers. Der Median der in Quantilen dargestellten Werte aller Rebsorten befand sich bei 244,8 µg/L, 75 % der Werte stellten sich bis zu einem Gehalt von 449,3 µg/L dar. Das letzte Quartil der

Werte allerdings dehnte sich bis zu dem sehr hohen Maximum aus und verursachte einen Gesamtmittelwert von 378,4 µg/L. Ebenfalls verhältnismäßig hohe Maxima im Kontext des Gesamtdatensatzes waren für gebundene C₆-Alkohole und flüchtige Phenole sichtbar. Das Maximum der C₆-Alkohol-Glycoside bei 262,3 µg/L im Vergleich zum Mittelwert bei 75,5 µg/L kommt erneut durch die Rebsorte Muskateller zustande, während sich andere Rebsorten, insbesondere der Riesling, über weite Konzentrationsbereiche verteilen. Die vom Mittel bei 5,1 µg/L liegenden stark abweichenden maximalen Gehalte der glycosylierten flüchtigen Phenole bis 55,8 µg/L werden insbesondere durch die Rebsorte Gewürztraminer verursacht. Es ist zu beachten, dass an dieser Stelle keine Gewichtung weiterer Einflussfaktoren auf die Ausgangsgehalte glycosylierter Aromastoffvorläufer gelegt wurde, wodurch die Streuungen der Werte innerhalb der Rebsorten zum Teil zu erklären sind. Dazu zählen beispielsweise Einzelschritte während der Traubenverarbeitung, Ergebnisse bezüglich Einfluss von Pressung und Maischestandzeit s. Kap. 4.2.2. Die Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide und aromatischen Alkohole zeigten sich dagegen vergleichsweise rebsortenunabhängig über weite Konzentrationsbereiche verteilt. Die glycosylierten aromatischen Alkohole betreffend fanden sich beispielsweise Riesling-Moste bei 267,7 µg/L sowie bei 1631,6 µg/L und Muskateller-Moste bei 242,9 µg/L bzw. 1224,6 µg/L, den höchsten Gehalt verursachte ein Müller-Thurgau-Most bei 1874,7 µg/L. Die Gehalte glycosidisch gebundener C₁₃-Norisoprenoide erstreckten sich zwischen 16,5 µg/L und 421,8 µg/L, beides wurde in Riesling-Mosten gemessen.

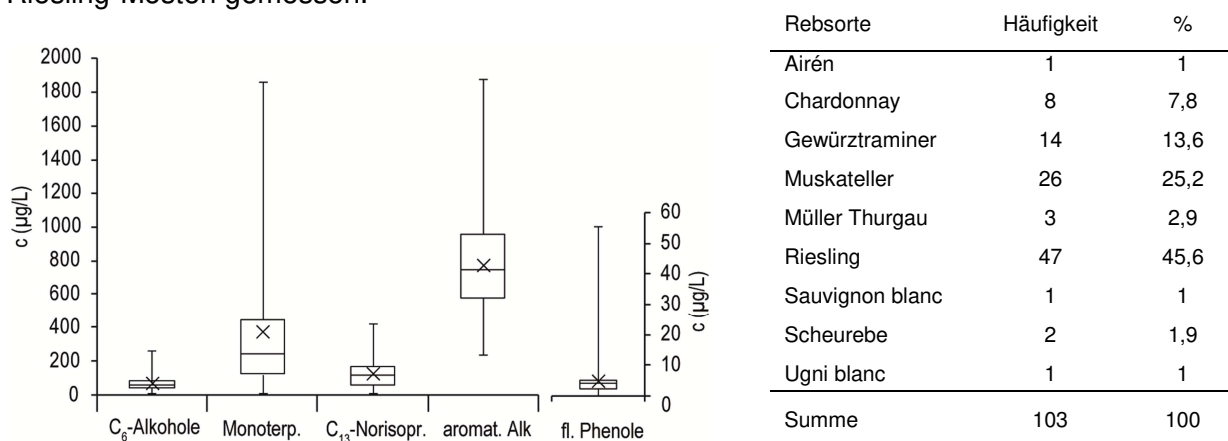


Abb. 4-8: Verteilung der Aromavorläufer in Mosten verschiedener Rebsorten. Die Darstellung der Daten im Boxplot in Quartilen, Minimum sowie Maximum und Median, außerdem Mittelwerte (Kreuz).

Die Hauptkomponentenanalyse der in den Boxplots dargestellten Mosten zeigt die Verteilung der Varianten nach Rebsorte zu den sie charakterisierenden glycosidisch gebundenen Vorläufern (s. Abb. 4-8). Auf den Hauptkomponenten 1 und 2 erklärten sich insgesamt 58,48% der Gesamtvarianz. Am deutlichsten abgesetzt finden sich die Moste der Rebsorte Muskateller, welche anhand der Hauptkomponente 1 (33,27%) von allen anderen Rebsorten differenziert wurde. Die Rebsorte ist vor allem durch gebundene Monoterpene wie Linalool, die Linalooloxide, Nerol und Geraniol, die nach Freisetzung ein blumiges Aroma hervorrufen, repräsentiert und hebt sich durch deren sehr hohe Gehalte gegenüber allen anderen Rebsorten ab. Zusätzlich deutlich vertreten sind die Vorläufer der C₆-Alkohole (*Z*)-3-Hexen-1-ol, (*E*)-2-Hexen-1-ol und *n*-Hexanol, welche für grün-grasige Aromen verantwortlich sind. Chardonnay und insbesondere Airén und Ugni blanc sind von sehr geringen Gehalten aller Vorläufersubstanzen geprägt, wobei die Chardonnay-Moste durch gebundene C₁₃-Norisoprenoide wie 3-Oxo-7,8-dihydro- α -ionol beschrieben werden. Die Rebsorte Riesling zeigte sich variabel. Es waren neutrale, durch wenige Vorläufer zu

charakterisierende Varianten vertreten, aber auch solche mit hohen Gehalten an Vorläufern. Dabei zeigte sich eine Unterteilung in zwei Richtungen, welche insbesondere an der Hauptkomponente 2 (25,21%) vorgenommen werden konnte. Ein Teil der Varianten gruppierte sich in den oberen beiden Quadranten in Richtung Monoterpen-Vorläufer wie Linalool und die Linalooloxide sowie zu dem glycosylierten 4-Vinylguaiacol, während eine weitere Gruppe an Varianten in den unteren zwei Quadranten durch Vorläufer der C₆-Alkohole wie (*E*)-2-Hexen-1-ol, der aromatischen Alkohole wie 2-Phenylethanol und Benzylalkohol sowie der C₁₃-Norisoprenoide 3-Hydroxy- β -Damascon oder 3-Oxo- α -ionol repräsentiert war.

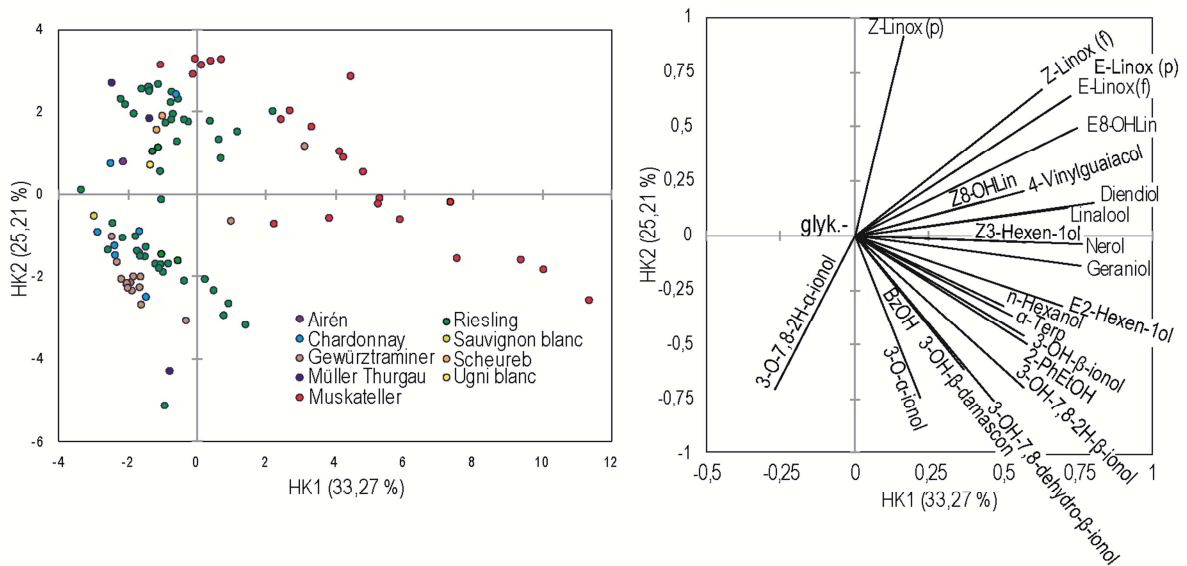


Abb. 4-9: Hauptkomponentenanalyse der glycosylierten Aromastoffvorläufer zu Mosten verschiedener Rebsorten. Projektion der Faktorwerte der Moste verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

Mittels einfaktorieller Varianzanalyse wurde der Einfluß der Rebsorte auf die Ausgangsgehalte glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer statistisch beurteilt. Es wurden die Varianten ab $n \geq 3$ in die Analyse einbezogen, d.h. die Rebsorten Chardonnay, Gewürztraminer, Muskateller, Müller-Thurgau und Riesling (s. Tab. 4-11). Zu Substanzgruppen zusammengefasst, hat die Rebsorte eines Mostes einen höchst signifikanten Einfluss auf die gebundenen Vorläufer der Monoterpene (F-Wert 29,59) und der C₆-Alkohole (F-Wert 13,78) sowie auf das flüchtige Phenol 4-Vinylguaiacol (F-Wert 2,83), hingegen bestand für die Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide und aromatischen Alkohole keine Bedeutung. Im paarweisen Vergleichstest nach Fisher's LSD Test wurden für die Monoterpen-Vorläufer zwei Übergruppen gebildet, bei denen die Rebsorte Muskateller von allen anderen Rebsorten getrennt eingeordnet wurde, ebenso für die glycosylierten C₆-Alkohole. Für die gebundenen aromatischen Alkohole wurde die Rebsorte Müller-Thurgau gegenüber Chardonnay, Muskateller und Riesling in zwei verschiedene Gruppen geteilt, während die Rebsorte Gewürztraminer keiner dieser beiden Gruppen zugeordnet werden konnte. Anhand der Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide fand keine Gruppierung statt. Bei Betrachtung der Einzelsubstanzen zeichneten sich anhand der vergleichsweise hohen F-Werte mit höchst signifikantem p-Wert vor allem zu den Monoterpen-Vorläufern gehörende Substanzen aus, welche auch als Gesamtgruppe ebenso signifikant eingestuft worden waren. Dazu gehörten vor allem die geruchsaktiven Substanzen Linalool (F-Wert 11,67), Nerol (F-Wert 27,59) und Geraniol (F-Wert 36,02), dazu desweiteren die Linalooloxide.

Ebenso bedeutsam für die Unterscheidung anhand der Rebsorte erschienen die C₆-Alkohol-Glycoside (*E*)-2-Hexen-1-ol (F-Wert 18,73) und (*Z*)-3-Hexen-1-ol (F-Wert 18,81). Weiterhin bestand ein höchst signifikanter Einfluss auf einzelne glycosylierte C₁₃-Norisoprenoide, darunter deutlich auf Substanz 3-Oxo-7,8-dihydro- α -Ionol (F-Wert 21,91) oder 3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -Ionol (F-Wert 5,80) sowie den aromatischen Alkohol-Vorläufer 2-Phenylethanol (F-Wert 12,27), deren signifikante Einstufung durch die Auswertung in Substanzgruppen als Summenparameter statistisch nicht erfasst wurde.

Tab. 4-11: Einfluss der Rebsorte auf die Aromastoffvorläufer im Most. Einfaktorielle Varianzanalyse mit F-Werten und zugehörige Signifikanzniveaus^a, Paarweiser Vergleich nach Fisher's LSD Test^b.

Analyse	ANOVA ^a		Rebsorte (4)				
	F	Signifikanz ^a	Paarweiser Vergleichstest ^b				
Substanz	F	Signifikanz ^a	Chdy	Gwtr	MThg	Musk	Rslg
glyk. C₆-Alkohole							
Z-3-Hexen-1-ol	18,81	***	B	B	B	A	B
E-2-Hexen-1-ol	18,73	***	B	B	B	A	B
n-Hexanol	1,51		A	A	A	A	A
glyk. C ₆ -Alkohole insgesamt	13,78	***	B	B	B	A	B
glyk. Monoterpene							
trans-Linalooloxid (fur)	48,72	***	C	C	BC	A	B
cis-Linalooloxid (fur)	22,95	***	C	BC	B	A	B
trans-Linalooloxid (pyr)	51,22	***	B	B	B	A	B
cis-Linalooloxid (pyr)	2,19		B	B	A	AB	AB
Z-8-Hydroxylinalool	13,08	***	C	C	C	B	A
E-8-Hydroxylinalool	58,02	***	B	B	B	A	B
Linalool	11,67	***	BC	C	BC	A	B
alpha-Terpineol	4,60	**	B	AB	B	A	A
Nerol	27,59	***	B	B	B	A	B
Geraniol	36,02	***	C	B	C	A	C
3,7-Dimethyl-1,5-Octadien-3,7-diol ²	30,62	***	C	C	BC	A	B
glyk. Monoterpene insgesamt	29,59	***	B	B	B	A	B
glyk. C₁₃-Norisoprenoide							
3-Hydroxy-beta-Damascon	1,11		A	A	A	A	A
3-Hydroxy-beta-Ionol	1,03		A	A	A	A	A
3-Oxo-alpha-Ionol	1,73		A	A	A	A	A
3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -Ionol	5,80	***	B	B	B	A	B
3-Oxo-7,8-dihydro-alpha-Ionol	21,91	***	C	A	BC	C	B
3-Hydroxy-7,8-didehydro- β -ionol	4,03	**	A	AB	B	A	B
glyk. C ₁₃ -Norisoprenoide insgesamt	0,45		A	A	A	A	A
glyk. aromat. Alkohole							
Benzylalkohol	1,76		B	AB	A	B	B
2-Phenylethanol	12,27	***	BC	AB	ABC	A	C
glyk. aromat Alkohole insgesamt	1,81		B	AB	A	B	B
glyk. flüchtige Phenole							
4-Vinylguaiacol ⁵	2,83	*	B	A	B	AB	AB

a *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Die Diskriminanzanalyse, bestehend aus den Rebsorten Chardonnay, Gewürztraminer, Muskateller, Müller Thurgau und Riesling mit einer Einzelprobenanzahl $n \geq 3$ und der analysierten glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer, erklärte anhand der ersten beiden Faktoren bereits 86,30% der Gesamtvarianz des Datensatzes aus diesen Rebsorten (s. Abb. 4-10), zusätzlich mit den Faktoren 3 (9,76%) und 4 (3,94%) waren 100% des Datensatzes erklärbar. Insbesondere die Rebsorte Muskateller war anhand des Faktors 1 (64,55%) von allen anderen Rebsorten diskriminierbar, dabei fanden sich insbesondere für Vorläufer der Monoterpene wie Linalool (0,534), Nerol (0,746), Geraniol (0,756) sowie die Linalooloxide wie beispielsweise furanoides (*E*)-Linalooloxid (0,783), pyranoides (*E*)-Linalooloxid (0,821) oder auch (*E*)-8-Hydroxylinalool (0,866) sowie für die Vorläufer der C₆-Alkohole (*Z*)-3-Hexen-1-ol (0,684) und (*E*)-2-Hexen-1-ol (0,679) hohe Korrelationen mit dem Faktor 1. Anhand des Faktors 2 (21,75%) wurden die weiteren Rebsorten diskriminiert, insbesondere die Rebsorte Riesling vom Gewürztraminer während sich Chardonnay und Müller-Thurgau nicht ohne Überlappung der Konfidenzintervalle vom Riesling trennen ließen. Leichte Korrelationen zum Faktor 2 fanden sich insbesondere für die Glycoside der Substanzen 3-Oxo-7,8-dihydro- α -ionol (0,377), 4-Vinylguaiacol (0,309) sowie (*Z*)-8-Hydroxylinalool (-0,550).

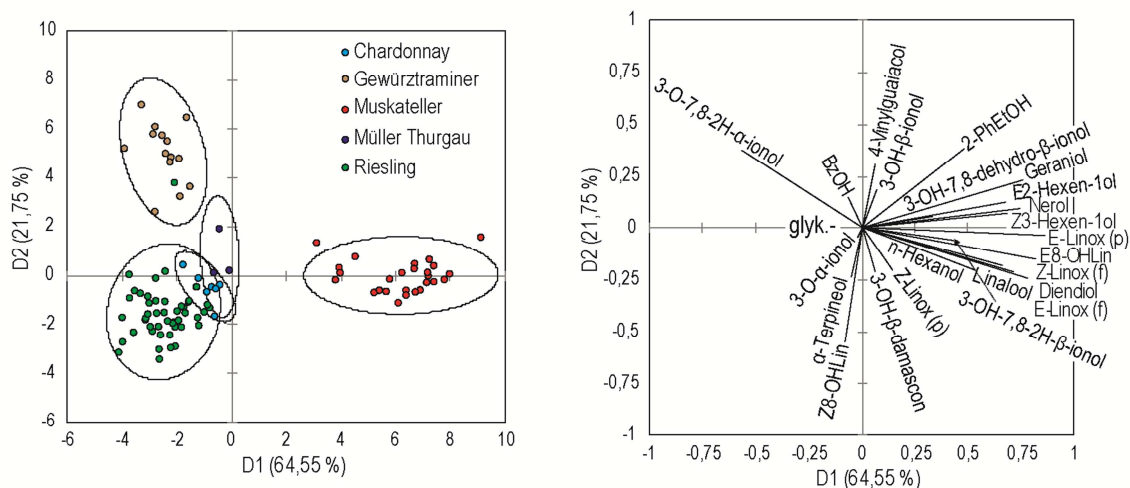


Abb. 4-10: Diskriminanzanalyse zur Diskriminierung der Moste nach Rebsorte anhand der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer. Faktorwerte der Moste verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) für die Faktoren D1 und D2.

4.2.1.2 Verteilung der Aromastoffvorläufer im Wein

Die Analyse der Weine ergab weiterhin einen noch feststellbaren Einfluss der Rebsorte auf die Aromastoffvorläufer, obwohl hypothetisch durch deren Abnahme während der Gärung unter dem Wirken diverser Einflüsse ein Angleichen der Gehalte zwischen den Rebsorten möglich gewesen wäre. Die insgesamt Verteilung der Vorläufer in 126 analysierten Weinen acht verschiedener Rebsorten zeigt der Boxplot in Abb. 4-11. Die Monoterpen-Vorläufer, obwohl bis 75% der Werte bis 131,5 $\mu\text{g/L}$ verteilt sind, fanden durch einen Wein der Rebsorte Muskateller verursachtes Maximum bei 1479,1 $\mu\text{g/L}$, ähnlich hohe Werte bis 1140,6 $\mu\text{g/L}$ waren in der Rebsorte Morio Muskat enthalten. Daraus ergab sich ein hoher Mittelwert, der im Vergleich zum Median um 61,7 $\mu\text{g/L}$ erhöht war. Viele der Weine der neutralen Sorten wie Airén, Chardonnay und Ugni blanc wiesen nach der Gärung nur noch minimale Gehalte gebundener Monoterpene auf, wie beispielsweise ein Chardonnay-Wein, durch welchen das Minimum bei 0,1 $\mu\text{g/L}$ zustande kam. Eine ebenfalls vergleichsweise

höhere Streuung der Werte aufgrund durch einen Riesling-Wein verursachtes Maximum bei 18,5 µg/L im Vergleich zum Mittelwert von 3,4 µg/L bzw. vom Median bei 2,1 µg/L trat für die glycosyliert vorliegenden flüchtigen Phenole auf. Ein Großteil dieser Vorläufer lag bei sehr geringen Gehalten, was rebsortenunspezifisch zu sein schien. Beispielsweise wurde für den Riesling mit dem niedrigsten Gehalt gebundener flüchtiger Phenole 0,7 µg/L bestimmt. Die Gehalte der glycosylierten C₆-Alkohole, C₁₃-Norisoprenoide und aromatischen Alkohole dagegen sind weniger extrem verteilt. Die Vorläufer der C₆-Alkohole betreffend, welche zwischen 5,1 µg/L eines Airén-Weines und 102,4 µg/L eines Riesling-Weines lagen, fand sich der Mittelwert bei 40,2 µg/L sowie der Median bei 40,7 µg/L, wobei 67,7% der Rieslinge oberhalb des Medians lagen und damit tendentiell zu höheren Gehalten verteilt. Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide und aromatischen Alkohole dagegen schienen weniger rebsortenabhängig, beispielsweise wurden für Chardonnay-Weine Werte zwischen 64,6 µg/L und dem Maximum von 630,0 µg/L bestimmt, das Minimum von 9,2 µg/L wurde in einem Wein der Rebsorte Airén bestimmt. Ein Wein dieser Rebsorte verursachte ebenfalls das Minimum der gebundenen aromatischen Alkohole von 44,0 µg/L, das Maximum lag bei 801,0 µg/L und wurde in einem Riesling-Wein gemessen.

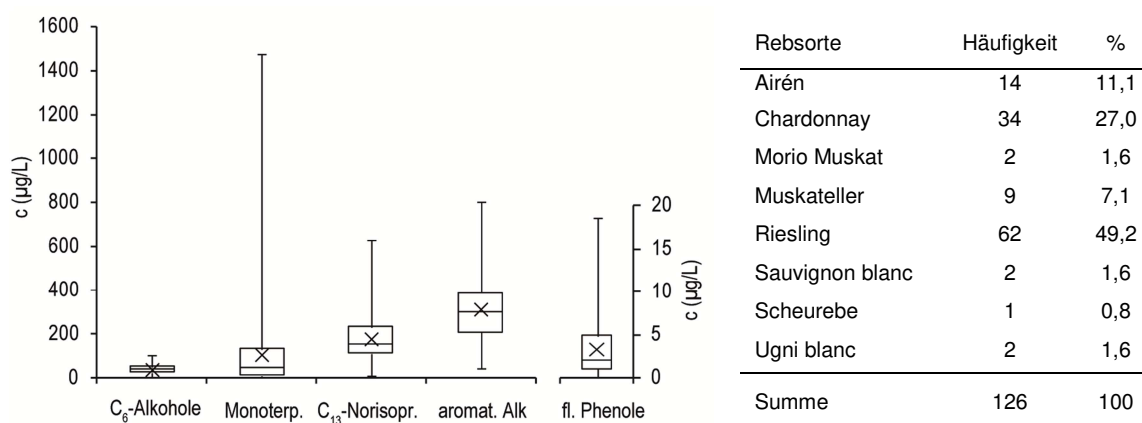


Abb. 4-11: Verteilung der Aromavorläufer in Weinen verschiedener Rebsorten. Die Darstellung der Daten im Boxplot in Quartilen, Minimum sowie Maximum und Median, außerdem Mittelwerte (Kreuz).

Die Hauptkomponentenanalyse der in den Boxplots dargestellten Weine zeigt die Verteilung der Varianten nach Rebsorte zu den sie charakterisierenden glycosidisch gebundenen Vorläufern (Abb. 4-8). Auf den Hauptkomponenten 1 und 2 konnten insgesamt 60,58% der Gesamtvarianz erklärt werden. Am auffälligsten grenzten sich anhand der Hauptkomponente 1 (41,67%) bei Projektion in den rechten oberen Quadranten die Weine der Rebsorte Morio-Muskat ab. Ebenso ein Muskateller-Wein, und auch diese Rebsorte ließ sich klar von den anderen Wein unterscheiden. Diese Rebsorten wurden durch Monoterpen-Vorläufer wie Nerol, Linalool und die Linalooloxide beschrieben. Gegensätzlich in den linken Quadranten befanden sich die Airén-, Ugni blanc- und Chardonnay-Weine, welche durch geringe Gehalte aller Aromavorläufer charakterisiert waren. Die Rebsorte Riesling war, ähnlich wie bei den Mosten, über vergleichsweise weite Bereiche, insbesondere anhand Hauptkomponente 2 (18,90%) verteilt, allerdings erfolgte keine eindeutige Gruppierung. Ein Teil der Varianten projizierte in die oberen Quadranten und war durch die nach Freisetzung blumige Aromen hervorrufende Monoterpen-Vorläufer beschrieben, während andere Riesling-Weine, abgebildet in den unteren Quadranten, durch Vorläufer der für grüne Noten verantwortlichen C₆-Alkohole wie (*E*)-2-Hexen-1-ol und (*Z*)-3-Hexen-1-ol sowie der C₁₃-Norisoprenoide wie 3-Hydroxy-β-Damascon oder der aromatischen Alkohole wie 2-Phenylethanol charakterisiert waren.

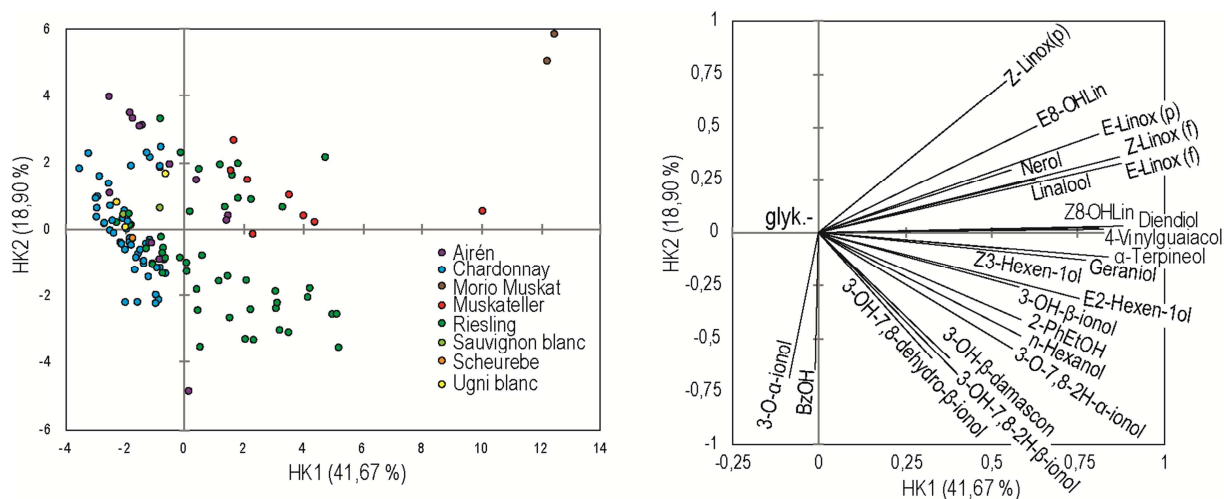


Abb. 4-12: Hauptkomponentenanalyse der glycosylierten Aromastoffvorläufer zu Weinen verschiedener Rebsorten. Projektion der Faktorwerte der Weine verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

Der Einfluss der Rebsorte auf die Ausgangsgehalte glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer in Wein wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse statistisch beurteilt, einbezogen wurden die Varianten ab $n \geq 3$ und damit die Rebsorten Airén, Chardonnay, Muskateller und Riesling (s. Tab. 4-12). Die Rebsorte zeichnete sich dabei signifikant auf die Vorläufer der C_6 -Alkohole (F-Wert 9,74), Monoterpene (F-Wert 36,95), aromatischen Alkohole (F-Wert 5,36) und flüchtigen Phenole (F-Wert 10,59), wodurch sich die Monoterpen-Vorläufer anhand der vergleichweisen Höhe des F-Wertes als größter Unterschied herausstellte. Im paarweisen Vergleichstest nach Fisher's LSD Test erfolgte eine Bildung von drei Übergruppen, welche jeweils der Rebsorte Muskateller, der Rebsorte Riesling sowie den Rebsorten Airén und Chardonnay Gruppen zuwies. Die glycosylierten C_6 -Alkohole betreffend, wurden Airén- und Chardonnay-Weine getrennt vom Riesling eingruppiert, während Muskateller keiner Gruppe eindeutig zugeordnet werden konnte. Das gleiche Schema galt für die Vorläufer der flüchtigen Phenole. Im Gehalt der gebundenen aromatischen Alkohole unterschieden sich Chardonnay und Riesling von der Rebsorte Airén, während Muskateller ohne eindeutige Zuordnung blieb. Es bestand durch den Faktor Rebsorte kein signifikanter Einfluss auf den Gehalt glycosylierter C_{13} -Norisoprenoide. Die Betrachtung der Einzelsubstanzen unterstrich, insbesondere anhand der F-Werte, die Bedeutung der Rebsorte für Vorläufer der Monoterpene, wie beispielsweise Nerol (F-Wert 23,18), Geraniol (F-Wert 39,23) oder die Linalooloxide, während keine Auswirkung auf Linalool bestand. Ebenso die glycosylierten C_6 -Alkohole (*Z*-3-Hexen-1-ol (F-Wert 24,64) oder *n*-Hexanol (F-Wert 24,62). Es bestand, im Gegensatz zur Gruppensumme, statistisch Einfluss auf einzelne Vorläufer der C_{13} -Norisoprenoide wie beispielsweise 3-Hydroxy- β -Damascon (F-Wert 3,06) oder 3-Oxo-7,8-dihydro- α -Ionol (F-Wert 15,65), dieser blieb anhand der Höhe der F-Werte vergleichsweise gering, ebenso wie die Auswirkung auf den Vorläufer des aromatischen Alkohols Benzylalkohol (F-Wert 4,94).

Tab. 4-12: Einfluss der Rebsorte auf die Aromastoffvorläufer im Wein. Einfaktorielle Varianzanalyse mit F-Werten und zugehörige Signifikanzniveaus^a, Paarweiser Vergleich nach Fisher's LSD Test^b.

Analyse	Rebsorte (3)		Paarweiser Vergleichstest ^b			
	F	Signifikanz	Airen	Chdy	Musk	Rslg
glyk. C₆-Alkohole						
Z-3-Hexen-1-ol	24,64	***	A	C	A	B
E-2-Hexen-1-ol	4,28	**	B	B	A	A
n-Hexanol	24,62	***	C	B	BC	A
glyk. C ₆ -Alkohole insgesamt	9,74	***	B	B	AB	A
glyk. Monoterpene						
trans-Linalooloxid (fur)	35,82	***	C	D	A	B
cis-Linalooloxid (fur)	17,46	***	C	D	A	B
trans-Linalooloxid (pyr)	116,61	***	B	C	A	B
cis-Linalooloxid (pyr)	4,67	**	A	B	AB	A
Z-8-Hydroxylinalool	19,10	***	B	B	A	A
E-8-Hydroxylinalool	44,45	***	B	B	A	B
Linalool	1,68		B	B	A	AB
alpha-Terpineol	21,46	***	C	C	B	A
Nerol	23,18	***	B	B	A	B
Geraniol	39,23	***	B	B	A	B
3,7-Dimethyl-1,5-Octadien-3,7-diol	58,84	***	C	C	A	B
glyk. Monoterpene insgesamt	36,95	***	C	C	A	B
glyk. C₁₃-Norisoprenoide						
3-Hydroxy-beta-Damascon	3,06	*	B	AB	A	A
3-Hydroxy-beta-Ionol	1,59		A	A	A	A
3-Oxo-alpha-Ionol	3,48	*	B	A	AB	B
3-Hydroxy-7,8-dihydro-beta-Ionol	7,84	***	B	B	A	B
3-Oxo-7,8-dihydro-alpha-Ionol	15,65	***	B	B	B	A
3-Hydroxy-7,8-didehydro-β-Ionol	4,01	**	B	A	A	A
glyk. C ₁₃ -Norisoprenoide insgesamt	2,03		B	AB	A	AB
glyk. aromat. Alkohole						
Benzylalkohol ⁴	4,94	**	B	A	AB	A
2-Phenylethanol ⁴	1,66		B	AB	AB	A
glyk. aromat. Alkohole insgesamt	5,36	**	B	A	AB	A
glyk. flüchtige Phenole						
4-Vinylguaiaicol ⁵	10,59	***	B	B	AB	A

a *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Die Diskriminanzanalyse, bestehend aus den Rebsorten Airen, Chardonnay, Muskateller und Riesling mit einer Einzelprobenanzahl $n \geq 3$ und der analysierten glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer, erklärte anhand der ersten beiden Faktoren bereits 90,92% der Gesamtvarianz des Datensatzes aus diesen Rebsorten (s. Abb. 4-13), zusätzlich mit dem Faktor 3 (9,38%) waren 100% des Datensatzes erklärbar. Insbesondere die Rebsorte Muskateller war anhand des Faktors 1 (77,74%) von allen anderen Rebsorten diskriminierbar, dabei waren zu Vorläufern aller Substanzgruppen hohe Korrelationen feststellbar, aber insbesondere zu den Monoterpenen wie beispielsweise Nerol (0,622),

Geraniol (0,723) oder pyranoidem trans-Linalooloxid (0,860), desweiteren aber auch zu beispielsweise dem glycosylierten C₆-Alkohol (Z)-3-Hexen-1-ol (0,308). Die Rebsorte war damit durch vergleichsweise hohe Gehalte an Aromastoffvorläufern insgesamt charakterisiert. Die Rebsorten Airén, Chardonnay und Riesling waren anhand des Faktors 2 (12,88%) diskriminierbar, allerdings nicht ohne Überschneidung der Konfidenzintervalle. Dabei bestand zu Riesling-Weinen insbesondere Korrelation zu den Vorläufern des C₆-Alkohols n-Hexanol (0,621), des aromatischen Alkohols Benzylalkohol (0,335) sowie des C₁₃-Norisoprenoids 3-Oxo-7,8-dihydro-alpha-Ionol (0,335). Airén- und Chardonnay-Weine waren allgemein durch Abwesenheit charakteristischer Vorläufer-Gehalte gekennzeichnet und es war, abgesehen von der vergleichsweise geringen Korrelation zum gebundenen glycosylierten pyranoiden cis-Linalooloxid (-0,139) kein Zusammenhang zu bestimmten Aromastoffvorläufern festzustellen.

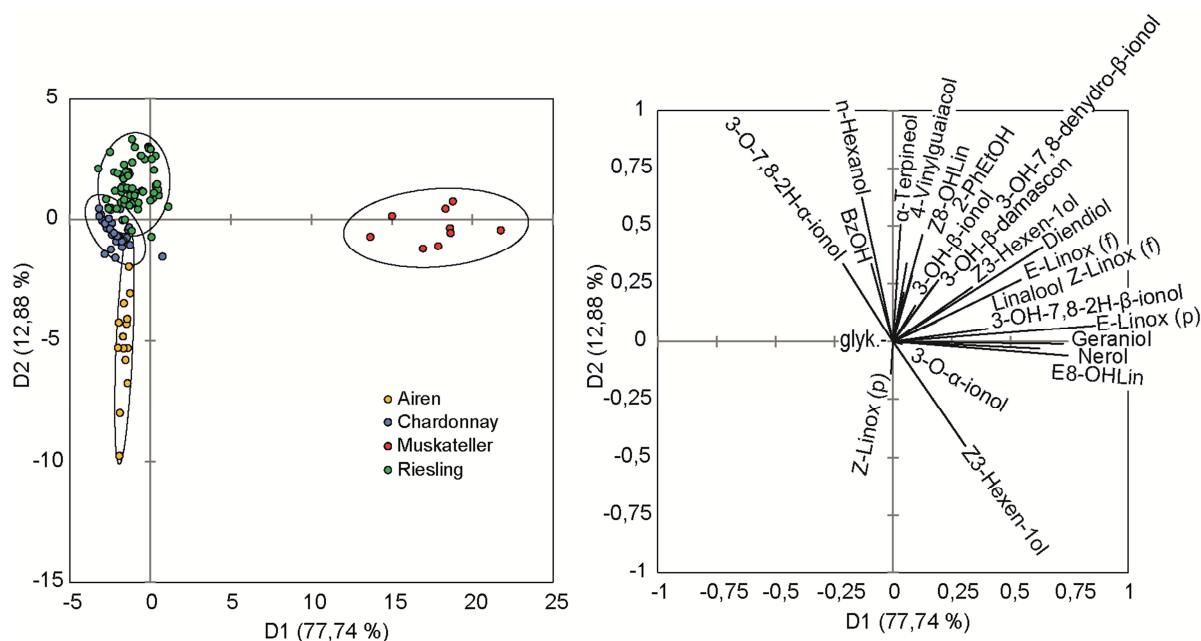


Abb. 4-13: Diskriminanzanalyse zur Diskriminierung der Weine nach Rebsorte anhand der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer. Faktorwerte der Weine verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) für die Faktoren D1 und D2.

4.2.2 Verarbeitung des Traubenmaterials

Die Traubenverarbeitung, beginnend mit der Lese bis zum fertigen Most vor der Gärung, besteht aus vielen Arbeitsschritten, welche unterschiedlich ausgeführt werden können. Die damit verbundene variierende Extraktion der Vorläufer aus den Traubenbeerenbestandteilen, insbesondere der Haut und den Kernen, dem Stielgerüst und anderer Bestandteile, kann die Ausgangsgehalte glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer im Most beeinflussen.

4.2.2.1 Maischestandzeit

Die Hauptkomponentenanalyse aller Versuchsvarianten verdeutlicht den Einfluss von Rebsorte, Traubenmaterial und den Effekt durch Maischestandzeit auf alle Versuchsvarianten, welche aus Riesling und Muskateller in 2013 sowie Riesling, Muskateller und Gewürztraminer in 2014 bestand. Das Traubenmaterial von Riesling und Muskateller war in 2013 und 2014 nicht vergleichbar. Insgesamt konnten über die ersten beiden Hauptkomponenten 68,24% der Gesamtvarianz beschrieben werden (s. Abb. 4-14). Zunächst wurde anhand der Hauptkomponente 1 (47,16%) die Rebsorte Muskateller vom Riesling und Gewürztraminer unterschieden und projiziert die Varianten in die rechten beiden

Quadranten zu hohen Gehalten an Aromastoffvorläufern. Innerhalb der Rebsorte erfolgte eine Diskriminierung anhand der Hauptkomponente 2 (21,09%) bedingt durch den Faktor Jahrgang, welcher aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit des Traubenmaterials über die Jahrgänge vermutlich auf dieses zurückzuführen war. Die Varianten aus 2014 gruppierten sich in den oberen Quadranten zu Vorläufern der C₆-Alkohole, Monoterpene und C₁₃-Norisoprenoide, während die Varianten aus 2013 durch erhöhte Gehalte glycosylierter flüchtiger Phenole charakterisiert waren. Innerhalb der Varianten zeigte sich der Effekt der steigenden Maischestandzeit deutlich. Der Faktor Maischestandzeit projizierte die Varianten abhängig der Erhöhung der Zeit in Richtung höherer Korrelation zu den Aromastoffvorläufern. Die Varianten des Muskatellers aus 2014 wurden, in Richtung Hauptkomponente 2, ohne Maischestandzeit innerhalb des Quadranten nah zum Koordinatenursprung projiziert, während eine Erhöhung der Zeit um 4 Stunden, 8 Stunden bzw. 12 Stunden die Varianten proportional weiter nach außen zu den Vorläufern der Monoterpene, C₆-Alkohole und C₁₃-Norisoprenoide verschob. Die Moste aus 2013 waren anhand Hauptkomponente 1 ebenfalls ansteigend mit der Maischestandzeit von 0 Stunden bis 24 Stunden durch höhere Korrelation zu den Aromastoffvorläufern charakterisiert. Ähnliches zeigte sich auch für die anderen Rebsorten, allerdings unterschiedlich hoch ausgeprägt. Das Beispiel des Riesling- sowie des Gewürztraminer-Mostes aus 2014, gruppiert im Quadranten links oben, zeigte einen weniger stark ausgeprägten Effekt der Intensivierung, trotz einer unterzogenen Maischestandzeit von über 16 bzw. 18 Stunden. Die Varianten waren fast ausschließlich durch Vorläufer der aromatischen Alkohole, sonst durch geringe Gehalte oder Abwesenheit von Aromastoffvorläufern geprägt, die über die Verlängerung der Standzeit nur bedingt zur steigern waren. Das verdeutlicht sich anhand der leichten Verschiebung der Varianten mit steigender Standzeit in die obere Richtung des Quadranten in Richtung der Vektorenden anhand der Hauptkomponente 2. Die Riesling-Moste aus 2013, lokalisiert im unteren linken Quadranten, verzeichneten mit ansteigender Maischestandzeit ebenfalls eine Verschiebung in Richtung höherer Korrelation zu den Aromastoffvorläufern.

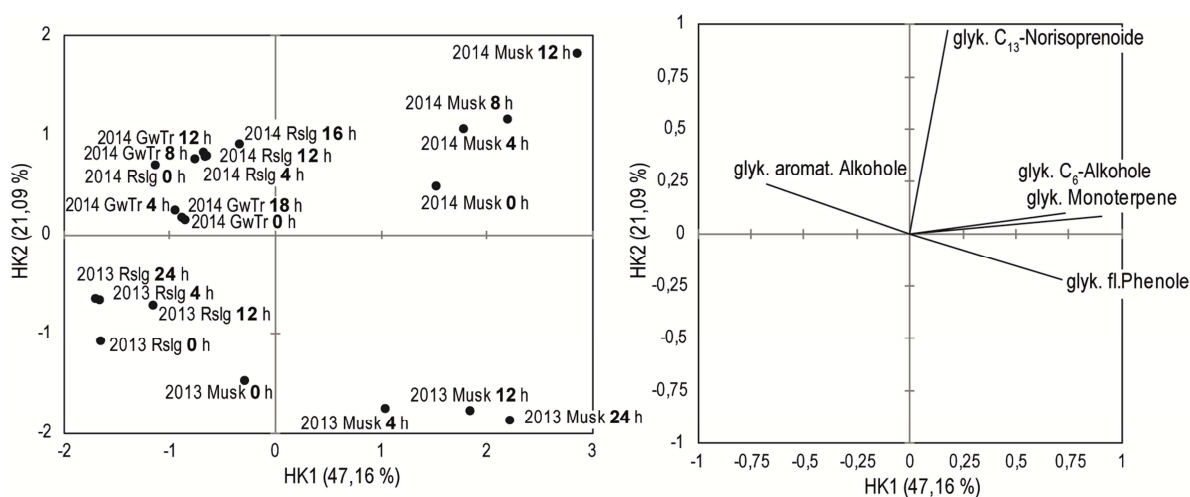


Abb. 4-14: Einfluss der Maischestandzeit auf den Gehalt der Aromastoffvorläufer verschiedener Rebsorten. Hauptkomponentenanalyse der gebundenen Aromastoffvorläufer in den Mosten der verschiedenen Rebsorten der Jahrgänge 2013 und 2014 nach unterschiedlicher Maischestandzeit des Traubenmaterials. Projektion der Faktorwerte der Moste verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

Im Folgenden sind am Beispiel von Muskateller und Riesling des Jahrgangs 2014 die Gehalte glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer abhängig der Maischestandzeit

dargestellt, der Einfluss ist statistisch mittels einfaktorieller Varianzanalyse ermittelt worden. Die Rebsorte Muskateller (s. Abb. 4-15) war typischerweise durch einen sehr hohen Gehalt glycosidisch gebundener Monoterpe charakterisiert, welche bereits in der Kontrollprobe ohne Maischestandzeit bei $798 \pm 73 \mu\text{g/L}$ lagen und sich nach 12 Stunden Maischestandzeit auf $969 \pm 37 \mu\text{g/L}$ steigerten, was statistisch allerdings als nicht signifikant eingestuft wurde. Die Analyse der Einzelsubstanzen zeigte dagegen einen statistisch signifikanten Anstieg, beispielsweise für Linalool von $68 \pm 3 \mu\text{g/L}$ der Kontrollprobe auf $101 \pm 1 \mu\text{g/L}$ nach 12 Stunden oder für Geraniol von $199 \pm 0 \mu\text{g/L}$ auf $244 \pm 10 \mu\text{g/L}$, was einem Anstieg von 149% bzw. 122% entspricht. Die Vorläufer der C_6 -Alkohole sind bereits in der Gruppensumme als signifikant beeinflusst eingestuft worden, zu verzeichnen war der Anstieg von einem Ausgangsgehalt von $70 \pm 3 \mu\text{g/L}$ auf $103 \pm 7 \mu\text{g/L}$. Das war ebenfalls anhand der Einzelsubstanzen ersichtlich, wie beispielsweise für (*Z*)-3-Hexen-1-ol um 155% von $20 \pm 1 \mu\text{g/L}$ bei 0 Stunden auf $31 \pm 2 \mu\text{g/L}$ nach 12 Stunden Maischestandzeit. Glycosylierte Vorläufer der C_{13} -Norisoprenoide verzeichneten einen Anstieg von $125 \pm 8 \mu\text{g/L}$ in der Kontrollprobe auf $188 \pm 23 \mu\text{g/L}$, was ebenso signifikant war. Weder für Einzelsubstanzen noch in der Gruppensumme statistisch signifikant war der Einfluss der Maischestandzeit auf die Vorläufer der aromatischen Alkohole mit einer Steigerung von $667 \pm 76 \mu\text{g/L}$ auf $897 \pm 63 \mu\text{g/L}$ sowie der flüchtigen Phenole von $4 \pm 1 \mu\text{g/L}$ auf $6 \pm 0 \mu\text{g/L}$.

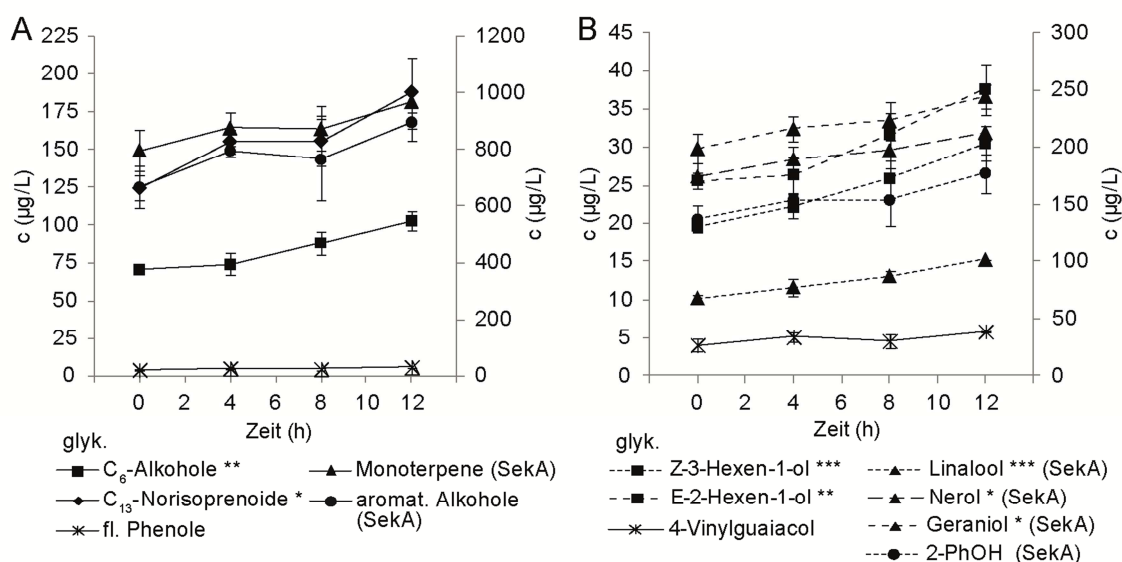


Abb. 4-15: Einfluss der Maischestandzeit auf die Gehalte der Aromavorläufer nach Substanzgruppen (A) und Einzelsubstanzen (B) in Muskateller-Most 2014. (n=3, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Die Rebsorte Riesling (s. Abb. 4-16) war im Vergleich zum Muskateller insgesamt durch geringere Gehalte glycosidisch gebundener Aromavorläufer charakterisiert. Für die Kontrollprobe ohne Standzeit wurden $219 \pm 8 \mu\text{g/L}$ glycosylierte Monoterpe bestimmt, nach 16 Stunden Maischestandzeit fanden sich im entsprechenden Most $250 \pm 11 \mu\text{g/L}$, statistisch war kein Einfluss feststellbar. Die Analyse der Einzelsubstanzen ergab dagegen einen signifikanten Einfluss der Maischestandzeit, Geraniol beispielsweise verzeichnete einen Anstieg von $14 \pm 0 \mu\text{g/L}$ auf $18 \pm 2 \mu\text{g/L}$ innerhalb von 16 Stunden. Die Vorläufer der C_6 -Alkohole verzeichneten aufgrund verlängerter Maischekontaktzeit einen signifikanten Anstieg von $33 \pm 2 \mu\text{g/L}$ in der Kontrollprobe auf $54 \pm 12 \mu\text{g/L}$ nach 16 Stunden, ebenso die Einzelsubstanzen wie zum Beispiel (*E*)-2-Hexen-1-ol um 228% durch eine Erhöhung des

Gehaltes von $9 \pm 0 \mu\text{g/L}$ auf $20 \pm 4 \mu\text{g/L}$. Ebenfalls signifikant beeinflusst waren die C_{13} -Norisoprenoid-Vorläufer, welche sich allerdings zum Endpunkt der ansteigenden Maischestandzeit verringerten. Von einem Gehalt bei $150 \pm 5 \mu\text{g/L}$ ohne Maischestandzeit erfolgte zunächst nach vier Stunden ein Anstieg auf $161 \pm 13 \mu\text{g/L}$ und lag nach 16 Stunden bei einem Gehalt von $147 \pm 33 \mu\text{g/L}$. Für die Vorläufer der aromatischen Alkohole bei Anfangs- und Endgehalten von $809 \pm 93 \mu\text{g/L}$ und $952 \pm 117 \mu\text{g/L}$ sowie der flüchtigen Phenole von $2 \pm 0 \mu\text{g/L}$ und $3 \pm 1 \mu\text{g/L}$ war weder für die Einzelsubstanzen noch in der Gruppensumme ein statistisch signifikanter Einfluss der Maischestandzeit feststellbar.

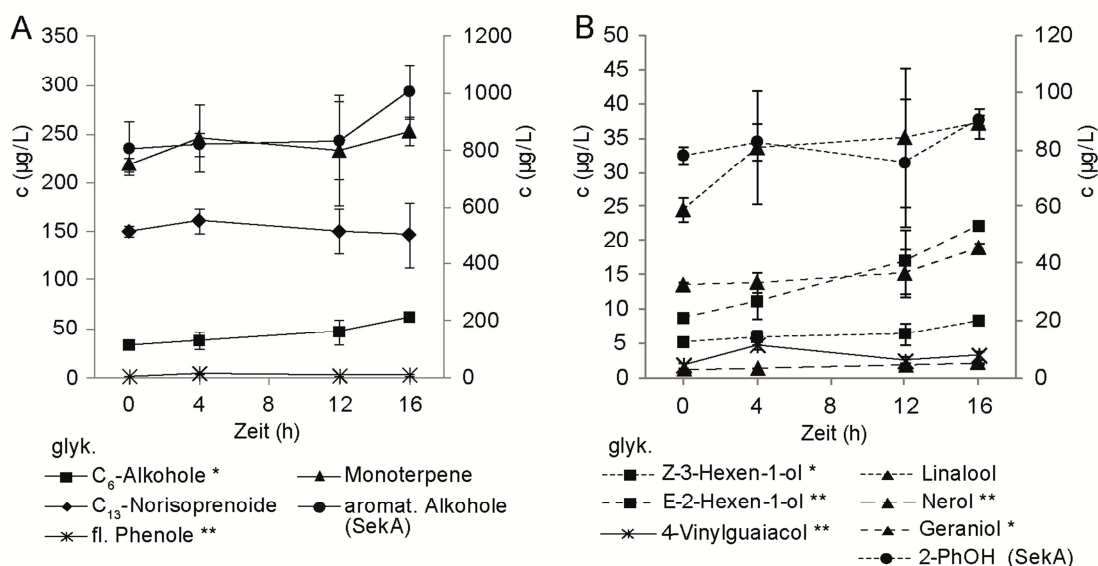


Abb. 4-16: Einfluss der Maischestandzeit auf die Gehalte der Aromastoffvorläufer nach Substanzgruppen (A) und Einzelsubstanzen (B) in Riesling-Most 2014.

($n=3$, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Der Einfluss der Faktoren Rebsorte, Traubenmaterial und Standzeit auf die Ausgangsgehalte glycosylierter Aromavorläufer wurde statistisch mittels mehrfaktorieller Varianzanalyse beurteilt. Aufgrund der unterschiedlich beprobten Maischekontaktzeiten wurden in die Analyse jeweils nur die Kontrollprobe ohne Standzeit sowie die maximal absolvierte Standzeit einberechnet, die zwischen 12 und 24 Stunden lag (s. Tab. 4-13). Einen hohen Einfluss hatte das jahrgangsabhängige Traubenmaterial, insbesondere auf die Ausgangsgehalte glycosylierter C_{13} -Norisoprenoide (F-Wert 87,73) sowie Monoterpene (F-Wert 7,53). Als weiterer signifikanter Faktor bestätigte sich die Rebsorte. Die Rebsorte war insbesondere anhand der Monoterpen-Vorläufer differenzierbar (s. Kap. 4.2.1), was sich hier bestätigte da die gebundenen Monoterpene signifikant beeinflusst waren (F-Wert 10,94). Unter Berücksichtigung aller Faktoren war die Maischestandzeit signifikant beeinflussend auf die Gehalte glycosidisch gebundener C_6 -Alkohole in den Mosten (F-Wert 6,79). Damit wurde gezeigt, dass die Extraktion der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer durch eine verlängerte Maischestandzeit insgesamt steigerbar war, allerdings abhängig von der Rebsorte und dem Traubenmaterial.

Tab. 4-13: Mehrfaktorielle Varianzanalyse über die Faktoren Jahrgang, Rebsorte und Standzeit aller Varianten. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a.

Faktor	Freiheitsgrade	glycosydisch gebunde Vorläufer					
		C ₆ -Alkohole	Monoterpene	C ₁₃ -Norisopr.	aromat. Alkohole	fl. Phenole	
Traubenm.	1	2,20	7,53 *	87,73 ***	0,67	1,53	
Rebsorte	2	5,06	10,94 *	0,90	2,97	1,06	
Standzeit	1	6,79 *	1,17	1,85	2,30	4,25	

a *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

4.2.2.2 Pressfraktionen

Die Hauptkomponentenanalyse aller Versuchsvarianten verdeutlicht den Einfluss des Pressdruckes im Kontext verschiedener Rebsorten sowie Traubenverarbeitung. Die Rebsorten Riesling, Muskateller und Gewürztraminer wurden unter ansteigenden Druckstufen gepresst und jeweils der erhaltene Most analysiert. Für Riesling wurde zusätzlich zwischen zwei Varianten unterschieden, darunter eine Kontrolle ohne vorherige Maischestandzeit sowie eine vor der Pressung absolvierte Maischestandzeit von 24 Stunden. Insgesamt konnten über die ersten beiden Hauptkomponenten 89,40% der Gesamtvarianz beschrieben werden (s. Abb. 4-17). Die Rebsorten Muskateller und Riesling wurden, unabhängig der Traubenverarbeitung im Riesling, durch Erhöhung des Pressdruckes in Richtung vorhandener glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer verschoben, insbesondere ersichtlich anhand der Hauptkomponente 1 (67,73%). Zusätzlich unterlagen alle diese Varianten einer Projektion in Richtung obere Quadranten anhand Hauptkomponente 2 (21,67%) speziell zu einer Charakterisierung durch Vorläufer der aromatischen Alkohole und C₆-Alkohole, welche damit offensichtlich insbesondere durch eine Pressdruckerhöhung verstärkt wurden. Desweiteren, den Riesling betreffend, wurden bei niedrigen Druckstufen geringe Unterschiede durch leicht unterschiedliche Projektionen der Varianten abhängig der Traubenverarbeitung deutlich, die maximale Druckstufe des Kontroll-Rieslings bei 0,8 bar sowie die vergleichswisen Druckstufe des Standzeit-Rieslings bei 0,9 bar lagen aber nah beieinander. Rebsortenabhängig war der Muskateller anhand einer Verschiebung in Richtung der rechten beiden Quadranten hin zu den Vorläufersubstanzen vom Riesling zu unterscheiden. Die Rebsorte Gewürztraminer konnte dagegen durch ansteigenden Pressdruck kaum verändert werden, einzig die maximale Variante des Mostes bei 1,5 bar war anhand Hauptkomponente 2 in Richtung zur Steigerung der glycosylierten aromatischen Alkohole sowie C₆-Alkohole abgesetzt.

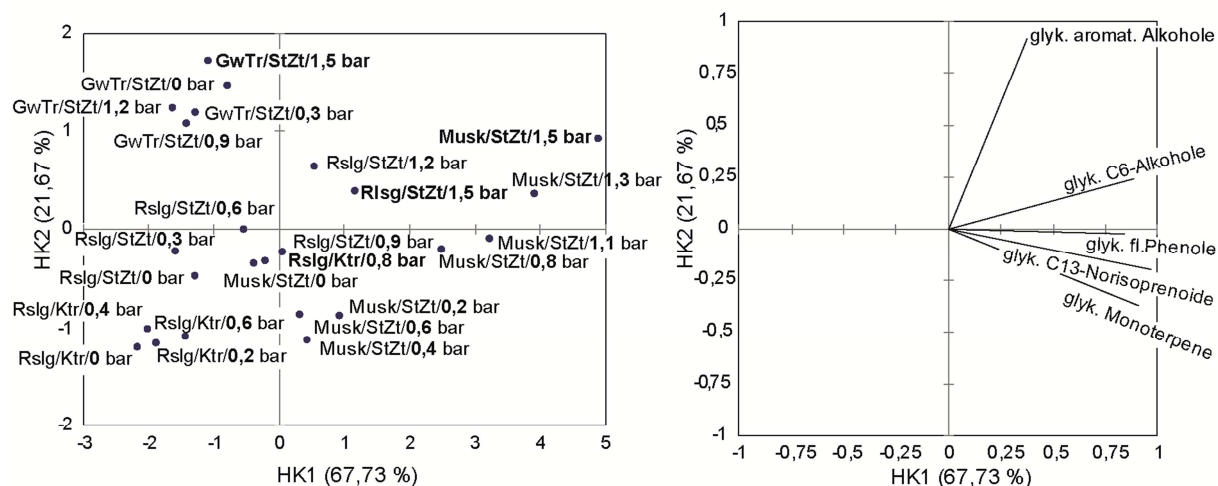


Abb. 4-17: Einfluss des Pressdruckes auf den Gehalt der Aromastoffvorläufer verschiedener Rebsorten. Hauptkomponentenanalyse der gebundenen Aromastoffvorläufer in den Mosten der verschiedenen Rebsorten, für den Riesling unterschiedlicher Traubenverarbeitung. Projektion der Faktorwerte der Moste verschiedener Rebsorten (links) und der Ladungen der Vorläufersubstanzen (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

Das folgende Beispiel der Rebsorte Riesling ist für die Pressung der Kontrolle ohne Maischestandzeit sowie die Pressung nach Absolvieren einer Maischestandzeit von 24 Stunden dargestellt, der Einfluss der Druckstufe wurde statistisch mittels einfaktorieller Varianzanalyse ermittelt. Die signifikante Steigerung der glycosylierten Aromavorläufer aller Substanzgruppen durch die Erhöhung des Pressdruckes wurde verdeutlicht (s. Abb. 4-18). Desweiteren zeigte sich der Einfluss der Traubenverarbeitung, da die Ausgangsgehalte der Aromavorläufer bereits im Vorlauf des Mostes mit Maischestandzeit gegenüber der Kontrolle erhöht waren. Die Vorläufer der C₆-Alkohole lagen in der Kontrolle bei 48±6 µg/L, in der Variante Maischestandzeit bei 57±2 µg/L. Durch Erhöhung des Pressdruckes erhöhten sich die Gehalte jeweils, bei dem maximal angesetzten Druck von 0,8 bar der Kontroll-Variante lagen im Most 81±9 µg/L und im Standzeit-Most bei 0,9 bar 64±15 µg/L vor. Durch 1,5 bar angelegten Druck konnte der Gehalt der Standzeit-Variante weiter auf 85±3 µg/L gesteigert werden. Der Gehalt glycosyliert vorliegender Monoterpene der Kontroll-Variante steigerte sich über zunehmenden Pressdruck von 186±10 µg/L auf 404±23 µg/L, durch Maischestandzeit wurde eine Erhöhung des Gehaltes von 297±35 µg/L auf maximale 497±4 µg/L erreicht. Diese Steigerungen trafen auch für die Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide, aromatischen Alkohole sowie flüchtigen Phenole zu. Damit konnte auch das Anlegen von erhöhtem Pressdruck als Mittel zur Steigerung des Aromapotentials in den Mosten gezeigt werden. Allerdings kommt es auch dabei zur Erhöhung von unerwünschten Vorläufer-Substanzen, die potentiell im späteren Wein für Fehlgerüche verantwortlich sein können. Am vorliegenden Beispiel wurde ein gesteigerter Gehalt der glycosylierten flüchtigen Phenole nachgewiesen. Ohne vorherige Maischestandzeit lagen im hergestellten Most Gehalte von 5±1 µg/L bei 0,8 bar vor, bei vorheriger Maischekontaktzeit wurde die Extraktion bis auf 6±1 µg/L bei 0,9 bar und auf 8±0 µg/L bei 1,5 bar Maximaldruck gesteigert.

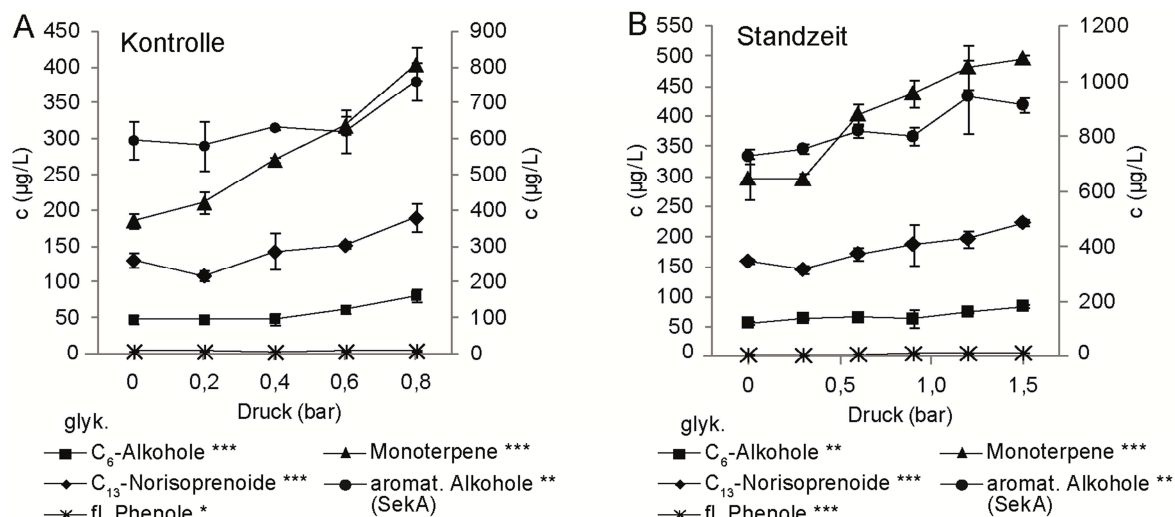


Abb. 4-18: Einfluss von ansteigenden Druckstufen auf die Gehalte gebundener Aromavorläufer ohne vorherige Maischestandzeit (A) und nach Maischestandzeit von 24 Stunden (B) im Riesling-Most. (n=3, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Am Beispiel der Rebsorte Muskateller, welche naturgemäß durch sehr hohe Gehalte glycosidisch gebundener Aromavorläufer charakterisiert ist, zeigte sich die signifikant gesteigerte zusätzliche Extraktion der Vorläufer durch Erhöhung des Pressdruckes (s. Abb. 4-19). Die Gehalte der Monoterpen-Vorläufer steigerten sich vom Vorlauf bei $847 \pm 46 \mu\text{g/L}$ bis auf $1857 \pm 17 \mu\text{g/L}$ bei 1,5 bar Pressdruck um 219 %. Beispielhaft für diese Substanzgruppe, erhöhte sich der Gehalt des Linalool-Vorläufers um 232% von $84 \pm 14 \mu\text{g/L}$ auf $195 \pm 5 \mu\text{g/L}$, von Nerol um 208% von $209 \pm 3 \mu\text{g/L}$ auf $434 \pm 10 \mu\text{g/L}$ sowie von Geraniol um 244% von $245 \pm 6 \mu\text{g/L}$ auf $597 \pm 12 \mu\text{g/L}$ durch Anlegen der maximalen Druckstufe. Die gesteigerte Extraktion war auch für die C₆-Alkohol-Vorläufer nachweisbar, z.B. für die Substanz (*Z*)-3-Hexen-1-ol um 216% und (*E*)-2-Hexen-1-ol um 244%. Der Gehalt des aromatischen Alkohol-Vorläufers 2-Phenylethanol erhöhte sich von $165 \pm 3 \mu\text{g/L}$ im Vorlauf bis auf $249 \pm 12 \mu\text{g/L}$ bei einem Pressdruck von 1,5 bar. Zusätzlich erhöhte sich auch die Extraktion des potentiell Fehlparfums hervorrufenden 4-Vinylguaiacol-Vorläufers, welche durch ansteigenden Pressdruck von $4 \pm 1 \mu\text{g/L}$ auf maximal $7 \pm 0 \mu\text{g/L}$ gesteigert wurde.

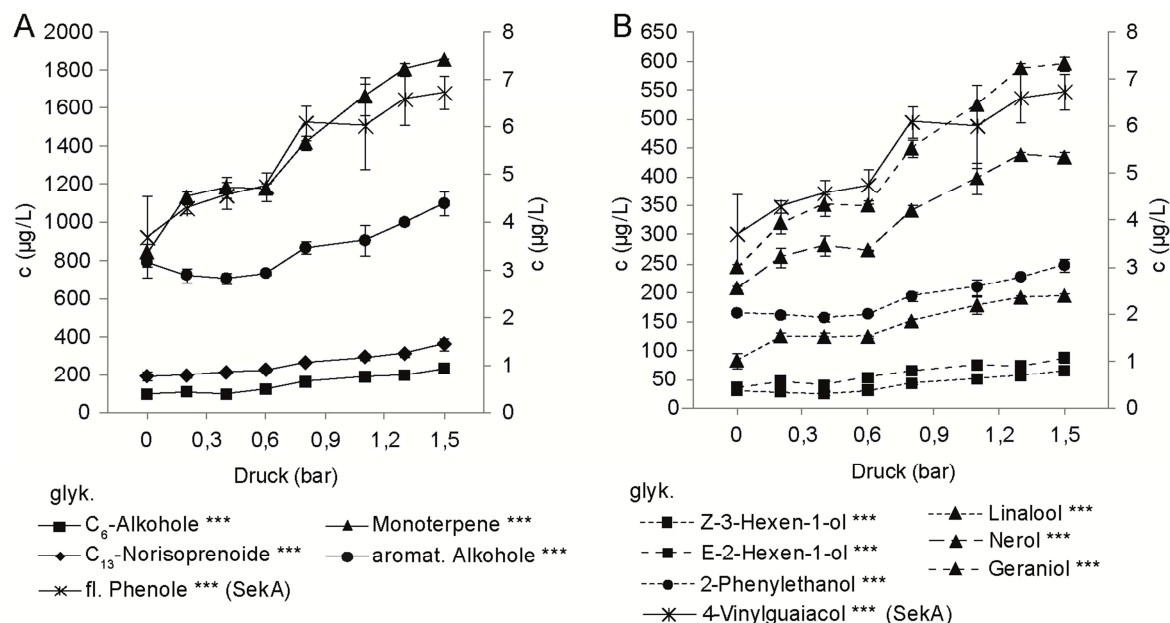


Abb. 4-19: Einfluss von ansteigenden Druckstufen auf die Gehalte gebundener Aromastoffvorläufer zusammengefasst in Substanzgruppen (A) sowie Einzelsubstanzen (B) in Muskateller-Most. (n=3, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Zusammenfassend wurde der Einfluss der Faktoren Rebsorte, Traubenverarbeitung und Pressdruck auf die Ausgangsgehalte glycosylierter Aromavorläufer statistisch mittels mehrfaktorieller Varianzanalyse beurteilt. Aufgrund der unterschiedlich beprobten Druckstufen wurden in die Analyse jeweils nur die Anfangsprobe ohne Pressdruck (Vorlauf) sowie die maximale Druckstufe einberechnet, die zwischen 0,8 und 1,5 bar lag (s. Tab. 4-14). Die Höhe des Pressdruckes hatte im Kontext der analysierten Varianten der Rebsorten Muskateller und Gewürztraminer sowie Riesling, von dem eine Partie ohne und eine nach absolvierter Maischestandzeit gepresst wurde, einen höchst signifikanten Einfluss auf die Extraktion glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer aller Substanzgruppen. Einen weiteren großen Einfluss stellte die Rebsorte an sich dar, unterstrichen von den F-Werten trat erneut anhand der Monoterpen-Vorläufer (F-Wert 55,47) die höchste Differenzierbarkeit auf, gefolgt von allen weiteren Substanzgruppen wie den Vorläufern der C₆-Alkohole (F-Wert 21,27) oder C₁₃-Norisoprenoide (F-Wert 22,33). Eine geringere Auswirkung auf die Moste hatte die Traubenverarbeitung, welche auf die Ausgangsgehalte glycosylierter aromatischer Alkohole (F-Wert 7,92) und flüchtiger Phenole (F-Wert 5,22), allerdings mit vergleichsweise geringeren F-Werten, signifikant war. Insgesamt kann über die Druckstufen die Extraktion der Aromavorläufer maßgeblich reguliert werden, allerdings muss auch die unvermeidbare zusätzliche Extraktion unerwünschter Substanzen beachtet werden.

Tab. 4-14: Mehrfaktorielle Varianzanalyse über die Faktoren Rebsorte, Traubenverarbeitung und Pressdruck aller Varianten. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a.

Faktor	Freiheitsgr.	glycosydisch gebunde Vorläufer					
		C ₆ -Alkohole	Monoterpene	C ₁₃ -Norisopr.	aromat. Alkohole	fl. Phenole	
Rebsorte	1	21,27 ***	55,47 ***	22,33 ***	8,43 **	4,13 *	
Traubenv.	2	0,13	0,70	2,19	7,92 **	5,22 *	
Pressdruck	1	20,04 ***	18,53 ***	24,89 ***	17,99 ***	22,86 ***	

^a *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

4.3 Einfluss der Hefen auf die Freisetzung der Aromastoffvorläufer während der Gärung im Labormaßstab

In Modellgärungen im Labormaßstab, d.h. Ansätze von 1 bzw. 5 L unter sterilen Laborbedingungen, wurde pasteurisierter Most der Rebsorten Riesling und Muskateller unter Verwendung verschiedener *Saccharomyces*-Hefestämme nach Einzelklon-Selektion vergoren. Zur Sicherstellung der Wiederholbarkeit wurden jeweils 3 biologische Replikate jeder Variante angefertigt. Die Quantifizierung der Aromavorläufergehalte (in diesem Kap. dargestellt) sowie der relativen Genexpression von EXG1, SPR1 und YIR007W (s. Kap. 4.7) ermöglichte Rückschlüsse auf das Freisetzungspotential der Hefestämme.

4.3.1 Modellgärung 1

Je 3 Ansätze á 5 L Riesling-Most wurden mit den Hefestämmen EC1118 und QA23 beimpft, während des Gärverlaufs wurde an den an den Tagen 1, 7, 14 und 21 (Endpunkt) beprobt.

Während des Gärverlaufes, d.h. bis zum Tag 21 der abgeschlossenen Gärung, verringerten sich die Gehalte glycosidisch gebundener C₆-Alkohole, Monoterpene und aromatischer Alkohole signifikant. Deren dadurch gezeigte Freisetzung war zwischen den eingesetzten Hefestämmen EC1118 und QA23 für die Substanzgruppen der C₆-Alkohole (F-Wert 5,05, p<0,05) und Monoterpene (F-Wert 7,58, p<0,01) statistisch signifikant, allerdings war dieser Effekt am Endpunkt der Gärung nivelliert und es bestand kein Einfluss der Hefestämme mehr (s. Tab. 4-15).

Tab. 4-15: Varianzanalyse über die Analytik der Aromastoffvorläufer der Riesling-Weine des Gärverlaufs und des Endpunktes der ersten Modellgärung. F-Werte und Signifikanzniveaus^a.

Varianzquelle	Gärverlauf insgesamt		Endpunkt Gärung
	Hefestamm	Zeitpunkt	Hefestamm
Freiheitsgrade	1	3	1
glyk. C ₆ -Alkohole	5,05 *	9,59 ***	0,06
glyk. Monoterpene	7,58 **	3,87 *	1,69
glyk. C ₁₃ -Norisoprenoide	0,28	0,22	0,09
glyk. aromat. Alkohole	0,92	55,32 ***	0,66
glyk. fl Phenole	4,70 *	2,38	2,48

a *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Während beispielsweise an Tag 14 der Gärung im mit Hefestamm EC1118 gärenden Wein noch 68±2 µg/L gebundene C₆-Alkohole vorlagen, waren es in der Variante mit Hefestamm QA23 50±9 µg/L. Am Endpunkt der Gärung an Tag 21 hatten sich diese Gehalte auf 51±7 µg/L Hefe für EC1118 bzw. 50±3 µg/L für Hefe QA23 angeglichen. Ähnliches galt für die glycosylierten Monoterpene, an Gärtag 14 waren in den Weinen bei Verwendung von Hefestamm EC1118 noch 96±5 µg/L sowie in der mit Hefe QA23 gärenden Variante noch 75±14 µg/L messbar. An Gärtag 21 dagegen wurden Endgehalte von 77±7 µg/L für Variante EC1118 bzw. 67±12 µg/L für Variante QA23 bestimmt. Der Gehalt glycosylierter aromatischer Alkohole hatte sich für beide Varianten, ohne Unterscheidung der Hefestämme, ebenfalls signifikant auf 377±46 µg/l (EC1118) bzw. 352±31 µg/L (QA23) bis zum Ende der Gärung reduziert. Für C₁₃-Norisoprenoide und flüchtige Phenole wurde während des Gärverlaufes keine Veränderung festgestellt, desweiteren bestand durch die Hefestämme EC1118 und QA23 kein Einfluss (s. Abb. 4-20, A).

Möglicherweise waren die Unterschiede in der Geschwindigkeit der Aromavorläufer-Freisetzung durch den unterschiedlich fortschreitenden Abbau der Glucose durch die Hefestämme und der daraus resultierenden nicht vollständigen Vergleichbarkeit der beiden Gärverläufe zu erklären (s. Abb. 4-20, B). Da die Glycosidase-Aktivität der Hefen durch Glucose hemmbar ist, kann dadurch Einfluss bestehen. Ebenfalls auffällig war, dass mit abnehmendem Glucose-Gehalt, insbesondere zwischen Tag 14 und Tag 21, auch die Abnahme der Aromavorläufer-Gehalte stärker war. Während an Tag 14 im mit Hefe EC1118 gärenden Wein noch 35,4 g/L bzw. für Variante mit Hefe QA23 18,3 g/L Glucose vorhanden waren, war diese an Tag 19 auf 15,5 g/L (EC1118) bzw. 4,4 g/L (QA23) und an Tag 21 auf 5,5 g/L (EC1118) bzw. 0,2 g/L (QA23) abgebaut.

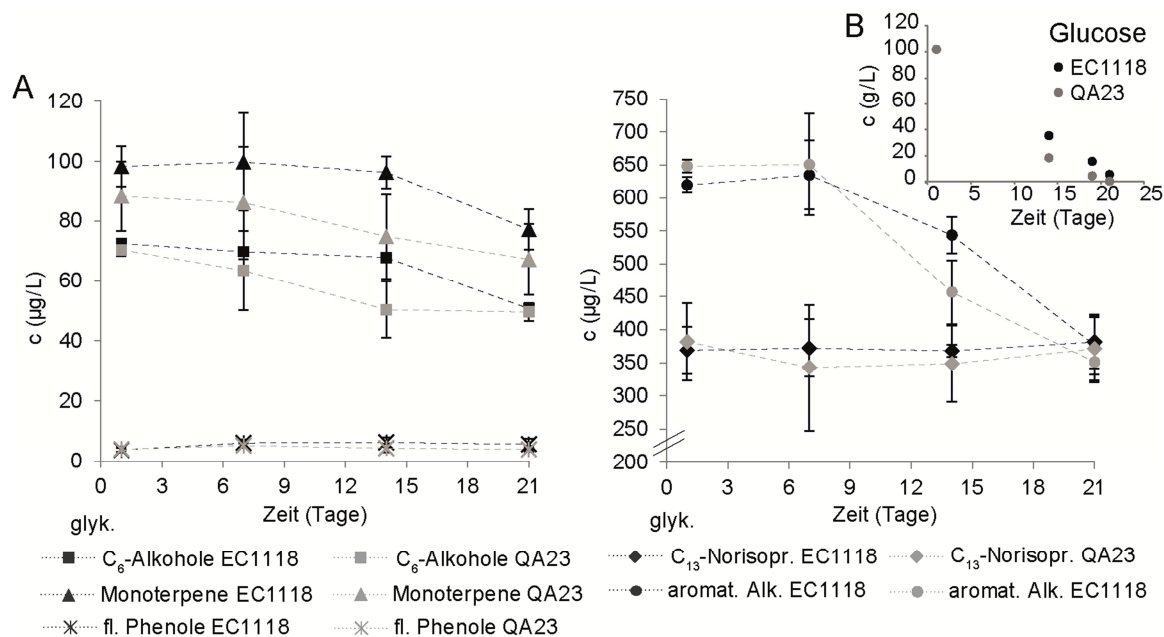


Abb. 4-20: Analyse der Aromavorläufer-Gehalte (A) unter Beachtung des Glucose-Gehaltes (B) während der Vergärung von Riesling Most mit den Hefestämmen EC1118 und QA23. (n=3).

4.3.2 Modellgärung 2

Je 3 Ansätze á 1 L pasteurisierter Riesling-Most wurden mit den Hefestämmen Siha Cryarome und Freddo vergoren. Da in der vorhergehenden Modellgärung 1 keine Unterschiede zu den verschiedenen beprobten Zeitpunkten im Gärverlauf feststellbar waren, wurde für Modellgärung 2 nur eine Endpunktbestimmung der Aromavorläufergehalte vorgenommen, welcher für diesen Versuch an Tag 56, bei vollständig abgebauter Glucose, lag. Aufgrund des vermutlich hemmenden Einfluss der freien Glucose auf die Glycosidase-Aktivität der Hefen wurde dieser Umstand beachtet. Die nach chemischer Analyse durchgeführte Varianzanalyse ergab keine durch die Hefestämme verursachten Unterschiede auf die Endgehalte der Aromastoffvorläufer.

Am Endpunkt der Gärung lagen noch 43 ± 3 µg/l glycosidisch gebundene C₆-Alkohole in den mit Hefestamm Freddo vergorenen Weinen vor, in den mit SihaCryarome hergestellten Weinen 41 ± 3 µg/L. Die Vorläufer der Monoterpene betreffend, verblieben durch Hefe Freddo 46 ± 2 µg/L in glycosylierter Form, bei Hefe SihaCryarome 44 ± 2 µg/L. Ähnliches betraf auch alle weiteren Vorläufer-Substanzen, damit waren insgesamt weder für aromatische Alkohole (239 ± 11 µg/L bzw. 258 ± 11 µg/L), C₁₃-Norisoprenoide (223 ± 14 µg/L bzw. 202 ± 13 µg/L) noch flüchtige Phenole ($2,5 \pm 0,5$ bzw. $2,2 \pm 0,3$ µg/L) Unterschiede in der Freisetzung durch die Hefen feststellbar. Da keine Mostdaten bezüglich des Ausgangsgehaltes der Aromavorläufer

verfügbar waren, kann über die absolute Freisetzung der Vorläufer vom Most zum Wein keine Aussage getroffen werden. Die quantitativen Daten des Endpunktes der Gärung sind für die Aussage bezüglich des Hefeeinflusses allerdings ausreichend und implizieren keinen Einfluss des Hefestammes auf die Freisetzung der Aromastoffvorläufer (s. Abb. 4-21). Da aus diesem Grund keine Unterschiede in der Genexpression zwischen den Hefen zu erwarten waren, ist die Analyse für diesen Versuchsteil nicht durchgeführt worden.

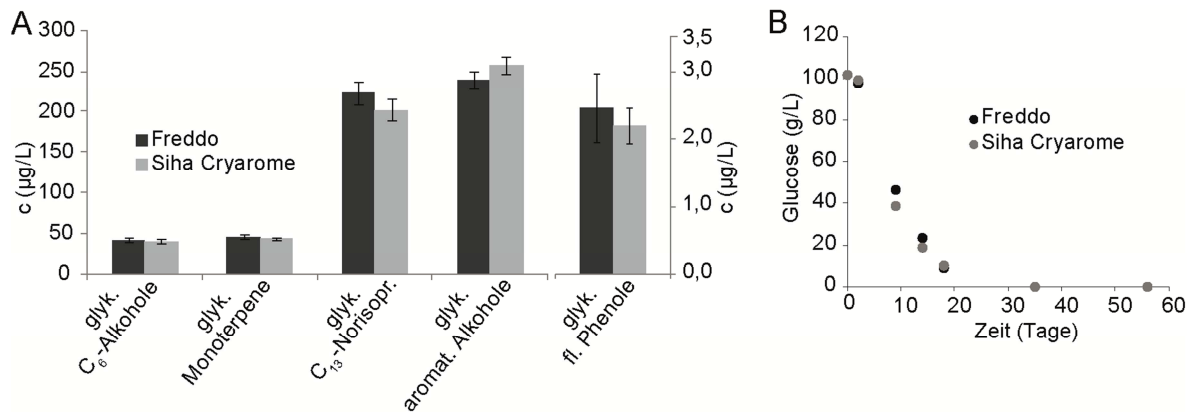


Abb. 4-21: Analyse der Aromavorläufer-Gehalte am Endpunkt der Gärung (A) und Glucose-Gehalt während der Gärung (B) von Riesling-Most bei Verwendung der Hefestämme Freddo und Siha Cryarome. (n=3).

4.3.3 Modellgärung 3

Je 3 Ansätze á 1 L pasteurisierter Muskateller-Most wurden mit den Hefestämmen Siha Cryarome und Freddo vergoren. Da aus keinem der vorhergehenden Versuche Hinweise auf Unterschiede zwischen den Hefen bezüglich der Freisetzung von Aromastoffvorläufern bestanden, wurde erneut ausschließlich am Endpunkt der Gärung nach vollständigem Abbau der freien Glucose, hier an Tag 23, analysiert. Analog zu den Versuchen mit Riesling Most, welcher durch vergleichsweise geringere Gehalte glycosidisch gebundener Aromavorläufer charakterisiert ist, ergab auch die Modellgärung mit Muskateller-Most keine Unterschiede zwischen den Hefestämmen Freddo und SihaCryarome bezüglich deren Freisetzungspotentials. Die chemische Analyse und anschließende Auswertung mittels Varianzanalyse der Endgehalte noch gebunden vorliegender Aromavorläufer der Weine ergab für keine der Substanzgruppen Unterschiede, weswegen an dieser Stelle ebenfalls auf eine Genexpressionsanalyse verzichtet wurde.

Nach beendeter Gärung waren insgesamt noch 447 ± 20 µg/L Monoterpene im mit Hefestamm Freddo bzw. 435 ± 41 µg/L im mit Stamm SihaCryarome vergorenen Wein glycosidisch gebunden, ebenso 33 ± 4 µg/L C₆-Alkohole für die mit Hefe Freddo vergorenen Weine sowie 36 ± 5 µg/L für die mit SihaCryarome hergestellten Varianten. Auf sich zwischen den Hefestamm-Varianten nicht unterscheidenden Niveaus befanden sich auch die Vorläufersubstanzen der weiteren Gruppen, die glycosylierten aromatischen Alkohole bei 431 ± 13 µg/L (Freddo) bzw. 439 ± 50 µg/L (SihaCryarome), die Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide bei 533 ± 42 µg/L (Freddo) bzw. 439 ± 37 µg/L (SihaCryarome) sowie der des flüchtigen Phenols 4-Vinylguaiaicol bei einem Endgehalt von $9,5 \pm 0,9$ µg/L der Variante Freddo sowie von $10,0 \pm 0,9$ µg/L in den mit SihaCryarome hergestellten Weinen (s. Abb. 4-22). Über die absolute Freisetzung der Aromastoffe vom Most zum Wein kann aufgrund fehlender Daten bezüglich der Aromavorläufergehalte im Ausgangsmost keine Aussage getroffen werden. Die Analyse der Weine zeigte aber eindeutig, dass kein Unterschied der ausgewählten Hefestämme auf die Freisetzung der Vorläufer bestand.

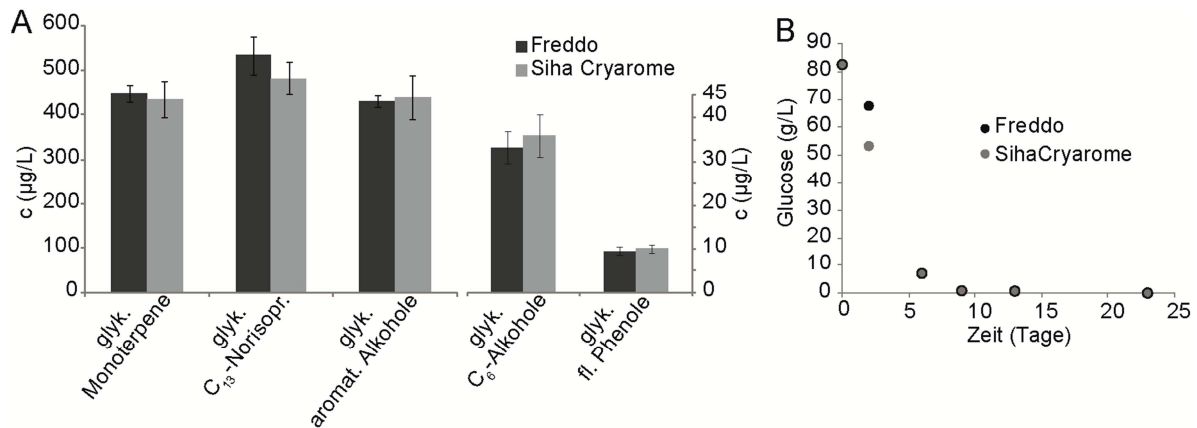


Abb. 4-22: Analyse der Aromavorläufer-Gehalte am Endpunkt der Gärung (A) und Glucose-Gehalt während der Gärung (B) von Muskateller-Most bei Verwendung der Hefestämme Freddo und Siha Cryarome. (n=3).

4.3.3.1 Zusammenfassung der Modellgärungen im Labormaßstab

Die Analyse noch gebundener Aromastoffvorläufer zeigte, dass nach abgeschlossener Gärung kein Einfluss der ausgewählten *Saccharomyces*-Hefestämme auf die Höhe der Freisetzung von Aromastoffen bestand. Während des Gärverlaufs der ersten Modellgärung traten hingegen Unterschiede zwischen den Hefestämmen EC1118 und QA23 auf. Da diese Gärungen und der damit einhergehende Glucose-Abbau unterschiedlich schnell verliefen, ist ein hemmender Einfluss der Glucose auf die Glycosidase-Aktivität der Hefestämme zu vermuten. Diese Annahme bestätigte sich, da mit beendeter Gärung keine Unterschiede zwischen den Hefestämmen mehr auftraten. Auch die Expression der Gene EXG1, SPR1 und YIR007W, welche mit der Glycosidase-Aktivität von Hefen zusammenhängen, war zwischen EC1118 und QA23 am Endpunkt der Gärung nicht unterschiedlich (s. Kap. 4.7). In den Gärungen waren aufgrund der sterilen Versuchsbedingungen andere mikrobiologische Einflüsse als die der eingesetzten Hefen auf die Freisetzung der Aromastoffvorläufer ausgeschlossen, was dem Ergebnis zusätzlich Gewicht verleiht. Durch die während der ersten Modellgärung stattfindende Abnahme der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer und der nachweisbaren Genexpression von EXG1, SPR1 und YIR007W (s. Kap. 4.7) konnte prinzipiell, wenn auch in der Höhe der Ausprägung nicht unterschiedlich, für die ausgewählten Hefestämme EC1118 und QA23 Glycosidase-Aktivität gezeigt werden.

4.4 Freisetzung der Aromastoffvorläufer in der experimentellen Weinbereitung: Einfluss von Hefe und Enzym

Der Einfluss von kommerziell erhältlichen *Saccharomyces*- und *Nicht-saccharomyces*-Hefen auf die Freisetzung von glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufern während der ersten Gärung wurde für die Rebsorten Chardonnay und Riesling des Jahrgangs 2013 untersucht. Neben den Stämmen ICVD47 und CY3079 im Chardonnay sowie HPS, Freddo, Siha7, U228, CEG und Heiligenstein im Riesling (alle *Saccharomyces*) kamen die Stämme Biodiva (*Torulspora delbrueckii*) sowie Flavia (*Metschnikowia pulcherrima*) zum Einsatz. Zusätzlich wurden jeweils Varianten unter Verwendung des Glycosidase-aktiven, aus *Aspergillus niger* stammenden Enzympräparates AR2000 hergestellt.

4.4.1 Chemische Analyse

Die Weine wurden nach der Messung mittels GC-MS auf alle Einflussfaktoren statistisch mittels mehrfaktorieller Varianzanalyse untersucht. Neben weiteren Einflussfaktoren blieb

das übergeordnete Ziel die Beurteilung der *Saccharomyces*-Hefestämme im Kontext der Freisetzung der Aromastoffvorläufer, weswegen darauf gesondert eingegangen wurde.

4.4.1.1 Chardonnay

Während der ersten Gärung zeigt sich, unabhängig vom verwendeten Hefestamm, eine deutliche Abnahme und damit Freisetzung der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer insgesamt. Die entsprechende einfaktorielle Varianzanalyse ergab eine höchst signifikante Abnahme für die Vorläufer der C₆-Alkohole (F-Wert 131,8, p<0,001), Monoterpene (F-Wert 317,5, p<0,001) und aromatischen Alkohole (F-Wert 577,2, p<0,001), aber nicht für die Vorläufer C₁₃-Norisoprenoide (F-Wert 1,3, p>0,05). Eine höchst signifikante Zunahme ist für den Vorläufer des flüchtigen Phenols 4-Vinylguaicol (F-Wert 25,9, p<0,001) bestimmt worden (s. Abb. 4-23 A). Der Einfluss des Hefestammes war dabei ausschließlich auf die Freisetzung der C₆-Alkohole und Monoterpene signifikant (s. Abb. 4-23 B), wobei die absolute Betrachtung der Aromavorläufergehalte diesen Beitrag auf ein moderates Level relativiert. Die Kombination aus *NichtSaccharomyces*-Hefe Biodiva und *Saccharomyces*-Hefe QA23 setzte beispielsweise 49 µg/L C₆-Alkohole frei, während die schwächste Hefe CY3079 mit 38 µg/L eine um nur 11 µg/L geringere Freisetzungsrates aufwies. Die Kombination Biodiva/QA23 setzte mit 34 µg/L auch den höchsten Gehalt an Monoterpenen frei, die hier schwächste Kombination aus Flavia/QA23 mit 30 µg/L allerdings nur 4 µg/L weniger. Der Hefeeinfluss auf die Freisetzung der Vorläufer der C₆-Alkohole (F-Wert 5,9, p<0,05) sowie der Monoterpene (F-Wert 3,9, p<0,05) war statistisch signifikant, aber durch vergleichsweise geringe F-Werte gekennzeichnet. Nicht signifikant dagegen war der Faktor Hefestamm auf die Freisetzung der C₁₃-Norisoprenoide, aromatischen Alkohole und flüchtigen Phenole. Die absoluten Gehalte der noch gebundenen Vorläufer waren für die aromatischen Alkohole der verschiedenen Hefestamm-Varianten ebenfalls vergleichbar (zwischen 419±33 µg/L für ICVD47 und 439±20 µg/L für Flavia/QA23). Die C₁₃-Norisoprenoide wurden während der Gärung nicht freigesetzt und bleiben auf ähnlichem Niveau wie der Most. Das sich auf quantitativ sehr geringem Level befindliche glycosidisch gebundene flüchtige Phenol 4-Vinylguaicol (zwischen 0,9±0,1 für Biodiva/QA23 sowie ICVD47 und 1,1±0,2 für CY3079) war ebenfalls nicht durch die Auswahl des Hefestammes beeinflusst.

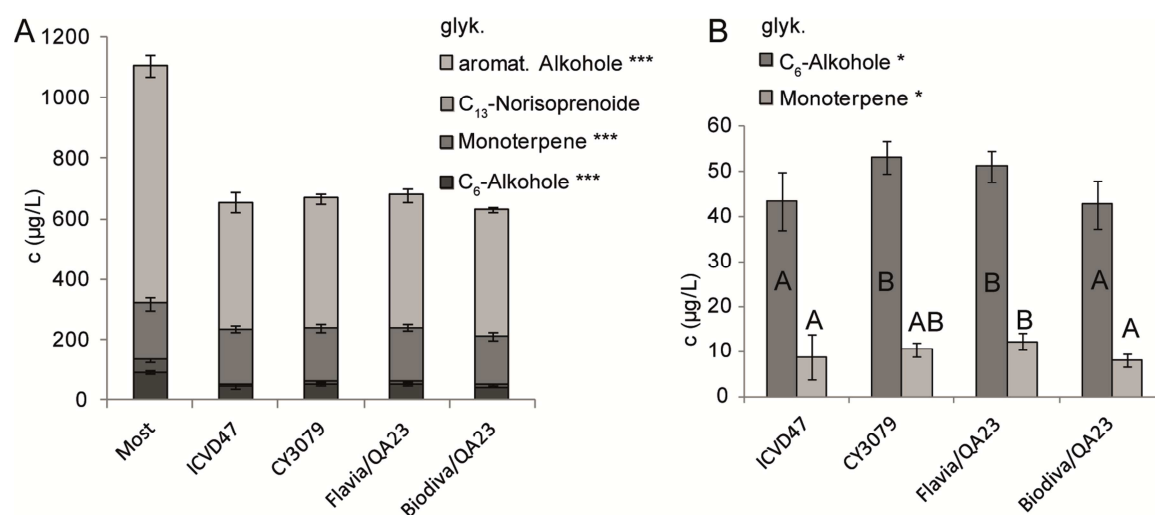


Abb. 4-23: Einfluss von Weinhefen auf die Freisetzung glycosidisch gebundener Aromastoffe in Chardonnay. Vom Most zum Wein wurden C₆-Alkohole, Monoterpene und aromatische Alkohole signifikant freigesetzt (A). Der Faktor Hefestamm beeinflusste dabei die Freisetzung der C₆-Alkohole und Monoterpene signifikant (B).

(n=3, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Der Einsatz des aus *Aspergillus niger* stammenden Enzympräparates AR2000 zusätzlich zu den zur Gärung eingesetzten Hefen wirkte sich auf die weitere Freisetzung der C₆-Alkohole (F-Wert 155,95, p<0,001), Monoterpene (F-Wert 200,91, p<0,001) und aromatischen Alkohole (F-Wert 59,02, p<0,001) höchst signifikant aus, nicht aber auf C₁₃-Norisoprenoide und flüchtige Phenole (s. Abb. 4-24). Die Monoterpene waren nach Enzymeinsatz bei allen Varianten fast vollständig freigesetzt, bei beispielsweise noch gebundenen Vorläufern von 0,4±0,1 µg/L für Biodiva in Kombination mit dem Enzym und 1,4±0,3 µg/L bei CY3079/Enzym. Von den C₆-Alkoholen wurden ebenfalls hohe Gehalte zusätzlich freigesetzt, von 42±2 µg/L auf verbliebene 19±1 µg/L für Biodiva/QA23 nach Enzymeinsatz oder für Hefestamm CY3079 von 53±3 µg/L auf noch verbliebene 28±1 µg/L durch Verwendung des Enzympräparates. Der Unterschied für die noch gebundenen aromatischen Alkohole bewegte sich zwischen 279±7 µg/L für Biodiva/Enzym und 385±6 µg/L für CY3079 in Kombination mit AR2000. Von den C₁₃-Norisoprenoiden blieben in allen Varianten im Mittel 171 µg/L±8 µg/L unveränderlich gebunden, ebenso das flüchtige Phenol 4-Vinylguaicol bei 1,0±0,1 µg/L. Insgesamt wurde durch die Kombination Biodiva/QA23/Enzym die höchsten und durch CY3079/Enzym die geringsten Gehalte freigesetzt, obwohl die Kombination aus Hefestamm und Enzym eine untergeordnete Rolle im Freisetzungsprozess spielt. Einzig für die Vorläufer der aromatischen Alkohole ergaben sich höhere Abweichungen in den finalen Gehalten der Varianten nach Enzymeinsatz, was durch die als Fehler gekennzeichnete Schwankung für den Mittelwert aller Weine nach Enzymeinsatz sowie an der statistischen Signifikanz der der Hefe-Enzym-Interaktion in der Varianzanalyse deutlich wird.

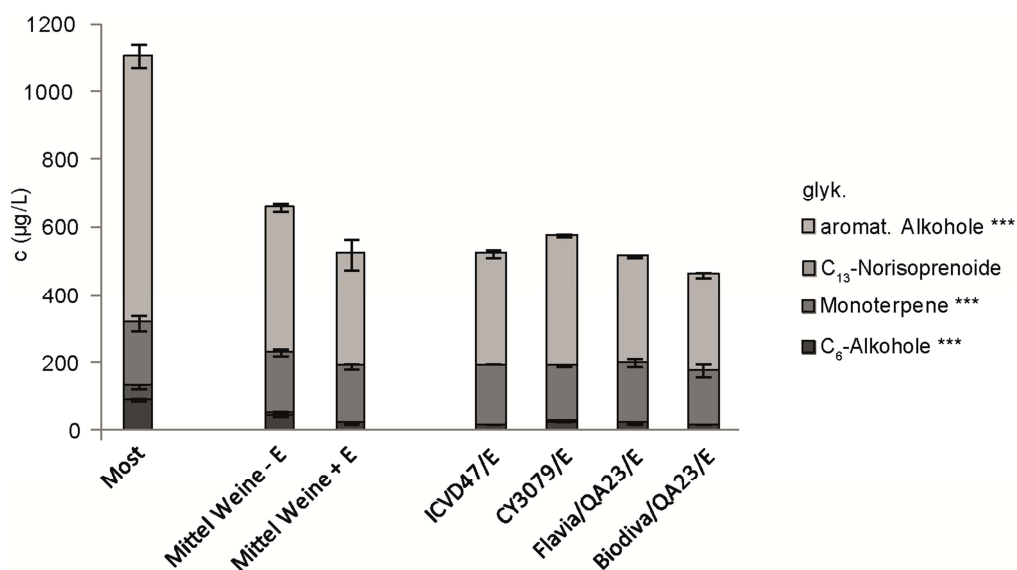


Abb. 4-24: Einfluss von Enzymeinsatz auf die Chardonnay-Weine. Der Enzymeinfluss (+E) ist höchst signifikant verantwortlich für die weitere Freisetzung von C₆-Alkoholen, Monoterpenen und aromatischen Alkoholen im Vergleich zum ausschließlichen Hefeinsatz (-E).

(n=3, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Die statistische Signifikanz der Einflussfaktoren Hefestamm, Enzymeinsatz und Interaktion von Hefe und Enzym auf die Freisetzung der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer (s. Tab. 4-16) verdeutlicht den vergleichsweise geringen Einfluss des Hefestammes, sowohl von *Saccharomyceten* als auch *Nichtsaccharomyceten-Saccharomyceten*-Kombinationen. Durch die Hefeauswahl bestand ein signifikanter Einfluss auf die Freisetzung der C₆-Alkohole (F-Wert 5,9, p<0,05) und Monoterpene (F-Wert 3,95, p<0,05), während der Enzymeinsatz sich höchst signifikant, gestützt durch sehr hohe F-Werte, auf C₆-Alkohole

(F Wert 155,95, $p < 0,001$), Monoterpene (F-Wert 200,91, $p < 0,001$) und aromatische Alkohole (F-Wert 59,02, $p < 0,001$) auswirkte. Die Interaktion von zur Gärung eingesetzter Hefe und anschließendem Enzymeinsatz spielte eine vergleichsweise untergeordnete Rolle und wirkte sich statistisch signifikant auf die Vorläufer der Monoterpene (F-Wert 3,47, $p < 0,05$) und aromatischen Alkohole (F-Wert 10,63, $p < 0,001$) aus. Die Auswertung der Einzelsubstanzen zeigte die Auswirkungen der Faktoren Hefe und Enzym im Detail, allerdings wirken die statistischen Signifikanzen zum Teil überinterpretiert. Der bereits im Most durch allgemein sehr geringe Vorläufergehalte charakterisierte Chardonnay besitzt nach Gärung nur noch sehr geringe Gehalte glycosidisch gebundener Vorläufer oder diese wurden komplett freigesetzt. Der resultierende Messwertbereich der absoluten Werte ist demzufolge sehr klein und Werte von 0 fallen statistisch sehr stark ins Gewicht. In der statistischen Auswertung der Gruppensummen hingegen tritt der Effekt entsprechend kaum auf. Das wird insbesondere für Vorläufer der Monoterpene deutlich, die zwar insgesamt durch den Hefeinsatz beeinflusst werden, die Einzelsubstanzen wie beispielsweise Nerol (F-Wert 54,80, $p < 0,001$) und Geraniol (F-Wert 136,60, $p < 0,001$) deutlich ins Gewicht fallen, deren Unterschiede in den absoluten Werten nur zwischen 0,2 $\mu\text{g/L}$ bis 1,8 $\mu\text{g/L}$ (Nerol) bzw. 0 $\mu\text{g/L}$ und 2,5 $\mu\text{g/L}$ (Geraniol) liegen. Auffällig und durch hohe F-Werte gestützt, war der dominierende Einfluss des Enzympräparates AR2000, sowohl auf die weitere Freisetzung an Vorläufern der Monoterpene, C_6 -Alkohole und aromatischen Alkohole insgesamt als auch auf nahezu alle Einzelsubstanzen wie beispielsweise (*E*)-2-Hexen-1-ol (F-Wert 205,28, $p < 0,005$) oder 2-Phenylethanol (F-Wert 262,51, $p < 0,001$).

Tab. 4-16: Einfluss von Hefestamm und Enzym auf die Aromastoffvorläufer im Chardonnay-Wein. Einfaktorielle bzw. zweifaktorielle^b Varianzanalyse, F-Werte und Signifikanzniveaus^a.

Varianzquelle	Hefestamm	Enzym	Hefe*Enzym ^b
Freiheitsgrade	3	1	3
glyk. C₆-Alkohole			
Z-3-Hexen-1-ol	5,72 *	112,11 ***	2,37
E-2-Hexen-1-ol	4,73 *	205,28 ***	1,18
n-Hexanol	6,66 **	131,70 ***	0,30
Summe glyk. C ₆ -Alkohole	5,90 *	155,95 ***	0,49
glyk. Monoterpene			
Z-8-Hydroxylinalool	2,78	106,17 ***	3,20 *
E-8-Hydroxylinalool	3,23	237,94 ***	3,55 *
Linalool	13,90 **	3,17	11,51 ***
α-Terpineol	18,12 ***	1,96	2,91
Nerol	54,80 ***	18,77 ***	46,60 ***
Geraniol	136,60 ***	17,98 ***	69,87 ***
Summe glyk. Monoterpene	3,95 *	200,91 ***	3,47 *
glyk. C₁₃-Norisoprenoide			
3-Hydroxy-beta-Damascon	46,02 ***	0,81	2,49
3-Hydroxy-beta-Ionol	2,04	7,82 **	28,62 ***
3-Oxo-alpha-Ionol	0,88	0,27	0,63
3-Hydroxy-7,8-didehydro-β-ionol	1,32	19,19 ***	0,30
3-Oxo-7,8-dihydro-alpha-Ionol	8,11 **	0,27	1,06
3-Hydroxy-7,8-dihydro-β-Ionol	1,86	15,19 ***	0,075
Summe glyk. C ₁₃ -Norisoprenoide	1,68	0,32	0,64
glyk. aromatische Alkohole			
Benzylalkohol	0,97	25,68 ***	15,84 ***
2-Phenylethanol	0,46	262,51 ***	2,02
Summe glyk. aromatische Alkohole	0,54	59,02 ***	10,63 ***
glyk. flüchtige Phenole			
4-Vinylguaiacol	1,39	0,33	1,05

a *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Die Hauptkomponentenanalyse aller Hefe- und Enzymkombinationen mit den jeweils freigesetzten Aromastoffvorläufern, berechnet aus der Differenz der noch gebundenen Vorläufer des jeweiligen Weines zu den gebundenen Vorläufern des Ausgangs-Mostes, bildet insgesamt 83,43% der Gesamtvarianz auf den Hauptkomponenten 1 und 2 ab (s. Abb. 4-25). Die aussagekräftigere Hauptkomponente 1 (59,02%) differenziert zunächst die nur unter Hefeeinfluss stehenden Varianten deutlich von den mit Enzymeinsatz hergestellten Weinen. Die enzymierten Weine werden in Richtung der freigesetzten Aromastoffe projiziert, welche sich insgesamt in den rechten Quadranten befinden. Die Hefe-Varianten dagegen befinden sich im linken Quadranten in Antikorrelation zu den freigesetzten d.h. zu den noch in glycosidischer Bindung befindlichen Aromavorläufern abgebildet. Untereinander waren die Varianten aufgrund des verwendeten Hefestammes, ob mit oder ohne Enzymeinsatz, nur gering differenziert zu betrachten. Einzig die *NichtSaccharomyces*-Kombination Biodiva/QA23 lässt sich anhand der Hauptkomponente 2 (24,42%) in Richtung freigesetzter Aromastoffe differenzieren, allerdings besteht für die Variante keine QA23-Kontrolle weswegen nicht auf die Ursache der Abweichung dieser Variante geschlossen werden kann.

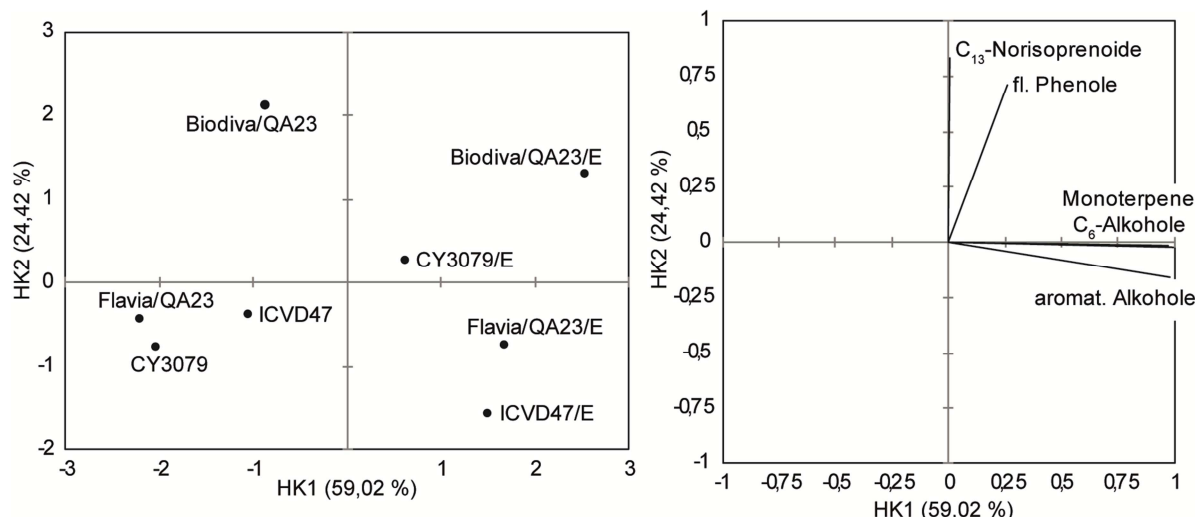


Abb. 4-25: Einfluss von Hefestamm und Enzymeinsatz auf die Freisetzung gebundener Aromastoffvorläufer im Chardonnay. Hauptkomponentenanalyse der freigesetzten Vorläufer in den Weinen der Hefestammkombinationen ohne sowie mit Enzym AR2000 (E). Projektion der Faktorwerte der Chardonnay-Weine (links) und der Ladungen der freigesetzten Aromastoffe (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

4.4.1.2 Riesling

Während der ersten Gärung von Most zu Wein in Riesling wurden, unabhängig vom eingesetzten Hefestamm, höchst signifikant C₆-Alkohole (F-Wert 122,23, $p < 0,001$), Monoterpene (F-Wert 90,89, $p < 0,001$) sowie aromatische Alkohole (F-Wert 89,25, $p < 0,001$) aus ihren Vorläufern freigesetzt. Die Gehalte für den Vorläufer des flüchtigen Phenols 4-Vinylguaicol stiegen dagegen höchst signifikant an (F-Wert 13,61, $p < 0,001$) während die der C₁₃-Norisoprenoide (F-Wert 0,36, $p > 0,05$) unbeeinflusst blieben (s. Abb. 4-26, A). Bei Ausgangswerten von 75 ± 2 µg/L gebundenen C₆-Alkoholen im Basis-Most zu im Mittel noch gebundenen Vorläufern von 43 ± 4 µg/L in den Weinen, war eine Spanne von 39 ± 1 µg/L (HPS) bis 49 ± 1 µg/L (Heiligenstein) zu beobachten, für die Monoterpen-Vorläufer von 94 ± 5 µg/L im Most zu 33 ± 2 µg/L (HPS) bis 52 ± 3 µg/L (Heiligenstein) und für die gebundenen aromatischen Alkohole von Gehalten im Most bei 679 ± 22 µg/L zu 373 ± 6 µg/L (Heiligenstein) bis 414 ± 26 µg/L (U228). Die C₁₃-Norisoprenoide wurden nicht signifikant freigesetzt, für die flüchtigen Phenole war ein signifikanter Anstieg von $0,6 \pm 0,1$ µg/L im Most auf $0,9 \pm 0,1$ µg/L (HPS) bis $2,4 \pm 0,1$ µg/L (Heiligenstein) zu verzeichnen.

Der Einfluss des Hefestammes auf die Freisetzung der Vorläufer war dabei ausschließlich für die Monoterpene (F-Wert 2,84, $p < 0,05$) signifikant (s. Abb. 4-26, B). Es wurden zwischen 33 ± 2 µg/L für die Variante HPS bis 52 ± 3 µg/L noch gebundener Vorläufer bestimmt, was bei einer Anfangskonzentration im Most von 94 ± 5 µg/L einer Freisetzung von 61 µg/L bzw. 42 µg/L entspricht. Desweiteren hoch signifikant beeinflusst waren die C₁₃-Norisoprenoide (F-Wert 5,74, $p < 0,01$), allerdings konnten hier hefestammabhängig im Vergleich zum Most Zu- sowie Abnahme der Vorläuferkonzentration ermittelt werden. Beispielsweise eine signifikante Abnahme von 123 ± 3 µg/L im Most auf 107 ± 7 µg/L (Siha7) bzw. eine hoch signifikante Zunahme auf 160 ± 6 (CEG). Das gebundene flüchtige Phenol 4-Vinylguaicol zeigte einen hefestammabhängig höchst signifikanten Konzentrationsanstieg (F-Wert 8,84, $p < 0,001$). Für diesen Versuchsteil weiterhin zu beachten ist, dass weitere Einflüsse aufgrund unter nicht-sterilen Bedingungen durchgeführter Weinbereitung nicht ausgeschlossen waren. Insbesondere die Varianten CEG und HPS waren durch biologischen Säureabbau gekennzeichnet, ersichtlich an der vollständig zu Milchsäure

umgesetzten Äpfelsäure (Daten der FTIR-Routineanalytik s. Anhang), die dafür verantwortlichen Mikroorganismen könnten unter Umständen an der enzymatischen Freisetzung der glycosidisch gebundenen Vorläufer beteiligt gewesen sein.

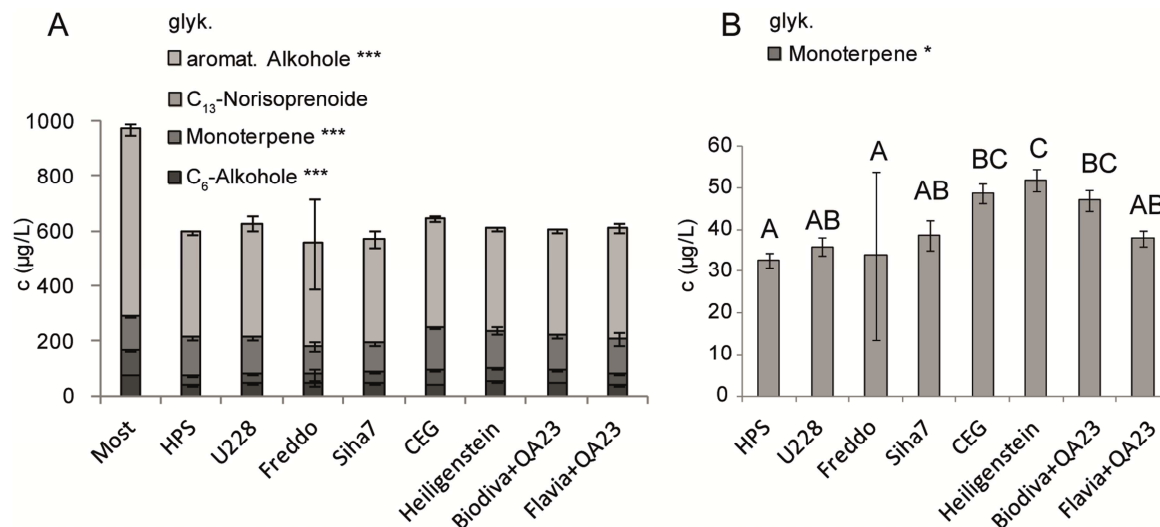


Abb. 4-26: Einfluss von Weinhefen auf die Freisetzung glycosidisch gebundener Aromastoffe in Riesling. Vom Most zum Wein wurden die C₆-Alkohole, Monoterpene und aromatischen Alkohole signifikant freigesetzt (A). Die Hefe beeinflusste die Freisetzung der Monoterpene signifikant (B). (n=3, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Durch den Einsatz des Enzympräparates AR2000, welches durch seine Herkunft aus *Aspergillus niger* durch hohe Enzymaktivität gekennzeichnet ist, wurden zusätzlich höchst signifikant C₆-Alkohole (F-Wert 117,03, p<0,001), Monoterpene (F-Wert 33,14, p<0,001) und aromatische Alkohole (F-Wert 39,09, p<0,001) aus ihren Vorläufern freigesetzt. Auf die gebundenen C₁₃-Norisoprenoide sowie flüchtigen Phenole bestand kein Einfluss des Enzyms (s. Abb. 4-27). Hauptsächlich war die Freisetzung der C₆-Alkohole und Monoterpene zu beobachten. Für die Variante U228 beispielsweise reduzierten sich die C₆-Alkohole um weitere 16 µg/L auf eine Endkonzentration von 26±3 µg/L, die Monoterpene von 36±2 µg/L auf 28±1 µg/L. Für die Hefekombination Biodiva/QA23 war eine Freisetzung von weiteren 27 µg/L an C₆-Alkoholen auf eine Endkonzentration von 20±3 µg/L sowie von weiteren 17 µg/L Monoterpenen auf final 33±3 µg/L feststellbar. Die quantitativ höher vorhandenen aromatischen Alkohole wurden ebenfalls weiter von 414±26 µg/L auf 336±13 µg/L (U228) bzw. von 380±8 auf 290±9 µg/L (Biodiva/QA23) reduziert. Die Interaktion des eingesetzten Hefestammes und der späteren Anwendung des Enzympräparates spielte trotz leichter Unterschiede im finalen Gehalt der noch gebundenen Aromastoffvorläufer in den Weinen eine untergeordnete Rolle, zeichnete sich aber für die glycosidisch gebundenen C₆-Alkohole, C₁₃-Norisoprenoide und das flüchtige Phenol statistisch signifikant (s. Tab. 4-17) und wurde aus den als Fehler gekennzeichneten Abweichungen des Mittelwertes aller Weine unter Enzymeinfluss deutlich (s. Abb. 4-27).

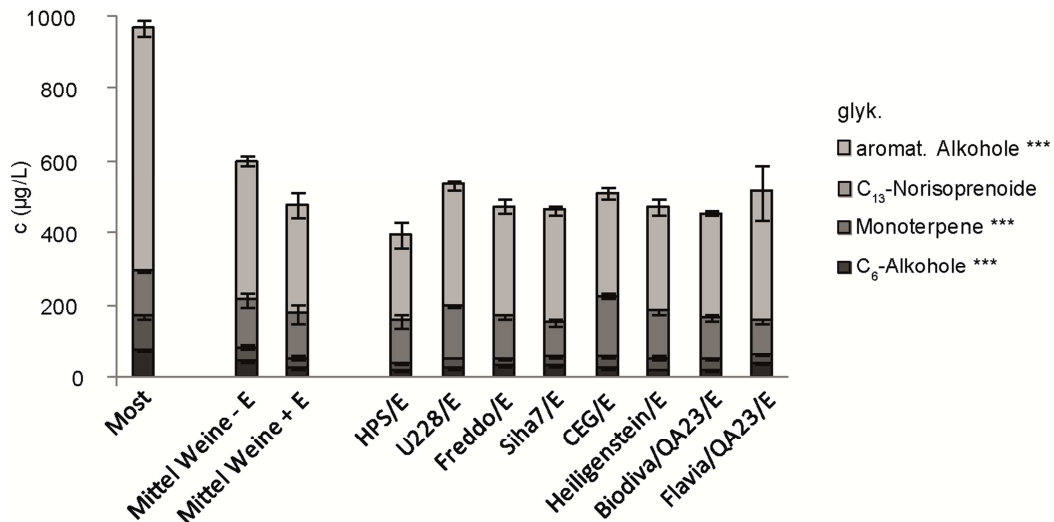


Abb. 4-27: Einfluss von Enzymeinsatz auf die Riesling-Weine. Der Enzymeinfluss (+E) ist höchst signifikant verantwortlich für die weitere Freisetzung von C₆-Alkoholen, Monoterpenen und aromatischen Alkoholen im Vergleich zum ausschließlichen Hefeinsatz (-E). (n=3, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Anhand der statistischen Signifikanz aller Einflussfaktoren wurde der dominierende Einfluss des Enzympräparates AR2000 auf die Freisetzung der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer deutlich (s. Tab. 4-17). Das Enzym wirkte sich höchst signifikant auf gebundene C₆-Alkohole (F-Wert 117,3, p<0,001), Monoterpene (F-Wert 33,14, p<0,001) und aromatischen Alkohole (F-Wert 39,09, p<0,001) aus, charakterisiert durch vergleichsweise sehr hohe F-Werte. Die Auswahl des Hefestammes wirkte sich auf die Abnahme und damit Freisetzung der glycosylierten Monoterpene signifikant aus (F-Wert 2,85, p<0,05), desweiteren auf die Gehalte der gebundenen C₁₃-Norisoprenoide und flüchtige Phenole, für die allerdings ein Anstieg zu verzeichnen war. Zudem muss auch der unbekannte Einfluss durch den mikrobiologisch verursachten biologischen Säureabbau der Varianten HPS und CEG beachtet werden. Eine vergleichsweise geringe Rolle kam der Interaktion der Kombination des spezifischen Hefestammes und des später eingesetzten Enzyms zu, statistisch signifikant auf die finalen Gehalte der glycosidisch gebundenen C₆-Alkohole (F-Wert 6,93, p<0,001), C₁₃-Norisoprenoide (F-Wert 3,09, p<0,01) und des flüchtigen Phenols (F-Wert 2,65, p<0,05) der Varianten, allerdings im vergleichsweise geringen Rahmen. Wie schon für die Rebsorte Chardonnay, können die statistischen Signifikanzen bei der aufgeschlüsselten Auswertung nach Einzelaromastoffen zum Teil überinterpretiert wirken, da die nach der Gärung nur noch sehr gering vorhandenen oder vollständig freigesetzten glycosidisch gebundenen Vorläufer aufgrund des zu kleinen Messbereiches gegenüber noch vorhandenen, wenn auch geringen Gehalten an Aromastoffvorläufern, statistisch sehr stark ins Gewicht fallen obwohl diese Substanzen nach absoluten Werte kaum bedeutsam sind. Insbesondere die Linalooloxide sowie das C₁₃-Norisoprenoid 3-Hydroxy-beta-ionol waren davon betroffen. In der statistischen Auswertung der Gruppensummen fällt dieser Umstand dagegen geringer ins Gewicht. Desweiteren in der Auswertung enthalten sind die BSA-Varianten CEG und HPS. Dessen ungeachtet, übereinstimmend mit den Gruppensummen der Substanzen, zeigte sich der vorherrschende Einfluss des Enzympräparates, beispielsweise auf die glycosidisch gebundenen C₆-Alkohole (Z)-3-Hexen-1-ol (F-Wert 112,16, p<0,001) und (E)-2-Hexen-1-ol (F-Wert 354,54, p<0,001), die Monoterpene Nerol (F-Wert 20,84, p<0,001) und Geraniol (F-Wert 249,40, p<0,001) sowie die aromatischen Alkohole Benzylalkohol und 2-Phenylethanol, insgesamt durch

vergleichsweise hohe F-Werte unterlegt. Der Faktor Hefe wirkte sich ebenfalls aus, beispielsweise auf die Monoterpen-Vorläufer α -Terpineol (F-Wert 33,45, $p < 0,001$), Nerol (F-Wert 7,80, $p < 0,001$) und Geraniol (F-Wert 4,56, $p < 0,01$) sowie die C_{13} -Norisoprenoide 3-Hydroxy-beta-Damascon und 3-Hydroxy-beta-Ionol sowie auf das flüchtige Phenol 4-Vinylguaiacol.

Tab. 4-17: Einfluss von Hefestamm und Enzym auf die Aromastoffvorläufer im Riesling-Wein. Einfaktorielle bzw. zweifaktorielle^b Varianzanalyse, F-Werte und Signifikanzniveaus^a.

Varianzquelle	Hefestamm	Enzym	Hefe*Enzym ^b
Freiheitsgrade	7	1	7
glyk. C₆-Alkohole			
Z-3-Hexen-1-ol	2,00	112,16 ***	6,53 ***
E-2-Hexen-1-ol	1,23	354,54 ***	2,88 *
n-Hexanol	2,46	76,67 ***	7,09 ***
Summe glyk. C ₆ -Alkohole	2,33	117,03 ***	6,93 ***
glyk. Monoterpene			
trans-Linalooloxid (fur)	11,45 ***	3,16	3,95 **
cis-Linalooloxid (fur)	13,46 ***	3,75	5,47 ***
trans-Linalooloxid (pyr)	3,10 *	0,19	1,41
Z-8-Hydroxylinalool	9,18 ***	53,78 ***	3,38 **
α -Terpineol	33,45 ***	2,15	7,09 ***
Nerol	7,80 ***	20,84 ***	6,02 ***
Geraniol	4,56 **	249,40 ***	8,10 ***
3,7-Dimethyl-1,5-Octadien-3,7-diol	0,61	1,20	0,69
Summe glyk. Monoterpene	2,84 *	33,14 ***	0,56
glyk. C₁₃-Norisoprenoide			
3-Hydroxy-beta-Damascon	76,45 ***	1,23	4,38 **
3-Hydroxy-beta-Ionol	237,29 ***	3,03	71,89 ***
3-Oxo-alpha-Ionol	3,15 *	0,67	3,69 **
3-Hydroxy-7,8-didehydro- β -ionol	4,64 **	0,92	3,16 **
3-Oxo-7,8-dihydro-alpha-Ionol	16,21 ***	0,32	2,49 *
3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol	24,02 ***	4,74 *	1,81
Summe glyk. C ₁₃ -Norisoprenoide	5,74 **	1,44	3,09 **
glyk. aromatische Alkohole			
Benzylalkohol	4,46 **	19,18 ***	2,66 *
2-Phenylethanol	0,65	13,65 ***	0,60
Summe glyk. aromatische Alkohole	0,20	39,09 ***	0,56
glyk. flüchtige Phenole			
4-Vinylguaiacol	7,52 ***	0,18	2,62 *

a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Die Hauptkomponentenanalyse der Weine aller Hefe- und Enzymkombinationen und der jeweils freigesetzten Aromastoffvorläufer, d.h. der Differenz des noch glycosidisch gebunden vorliegenden Aromastoffvorläufergehaltes des jeweiligen Weines zum Ausgangsgehalt des Basis-Mostes, bildet insgesamt 84,05% der Gesamtvarianz auf den Hauptkomponenten 1 und 2 ab (s. Abb. 4-28). Anhand der aussagekräftigeren Hauptkomponente 1 (53,41%) differenzierten sich zunächst die nur unter Hefeeinfluss stehenden Varianten deutlich von den mit Enzymeinsatz hergestellten Weinen. Die enzymierten Weine wurden in Richtung der freigesetzten Aromastoffe projiziert, welche sich insgesamt in den rechten Quadranten

befinden. Die Hefe-Varianten dagegen wurden im linken Quadranten in Antikorrelation zu den freigesetzten d.h. zu den noch in glycosidischer Bindung befindlichen Aromavorläufern abgebildet. Aufgrund des verwendeten Hefestammes als alleinigem Kriterium sind die Varianten untereinander kaum zu differenzieren, wenngleich eine leichte Auffächerung insbesondere anhand Hauptkomponente 2 (30,64%), welche zwischen dem Auftreten von freigesetzten C₆-Alkoholen und aromatischen aromatischen Alkoholen bzw. von Monoterpenen, C₁₃-Norisoprenoiden und flüchtigen Phenolen differenziert, erkennbar ist. Nach Enzymeinsatz verstärkte sich dieser Effekt, insbesondere die Variante CEG/E nach biologischem Säureabbau, grenzte sich deutlich von den anderen enzymierten Varianten ab und befand sich im unteren Quadranten. Dementgegen wurde die *Nichtsaccharomyceten*-Kombination Flavia/QA23/E im den oberen Quadranten projiziert. Da wiederum für diese Kombination keine QA23-Kontrolle vorlag, kann der Effekt nicht auf einen der beiden Hefestämme zurückgeführt werden.

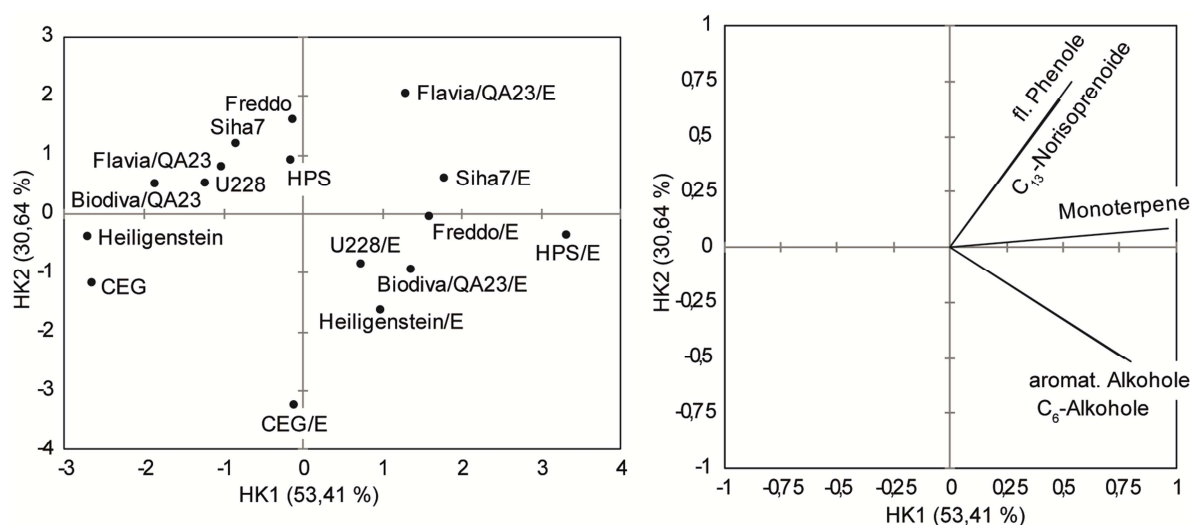


Abb. 4-28: Einfluss von Hefestamm und Enzymeinsatz auf die Freisetzung gebundener Aromastoffvorläufer im Riesling. Hauptkomponentenanalyse der freigesetzten Vorläufer in den Weinen der Hefestammkombinationen ohne sowie mit Enzym AR2000 (E). Projektion der Faktorwerte der Riesling-Weine (links) und der Ladungen der freigesetzten Aromastoffe (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

4.4.2 Sensorische Analyse der Weine

Mittels deskriptiver Analyse und anschließender statistischer Auswertung mittels *mixed model* multifaktorieller Varianzanalyse erfolgte die sensorische Beurteilung der Weine. Die weinchemischen Routine-Parameter wurden mittels FTIR Winescan bestimmt und gewährleistet, wenn nicht anders angegeben, die Vergleichbarkeit der Weine in der sensorischen Analyse (Werte s. Anhang).

4.4.2.1 Chardonnay

In der deskriptiven Analyse der Chardonnay-Weine wurden durch die 20 Prüfer keine das Aromaprofil betreffenden Unterschiede zwischen den Hefestamm-Varianten herausgestellt, die Attribute sind in ihren Intensitäten auf einem Level bewertet worden. Lediglich die Farbe der Weine wurde von den Prüfern als signifikant unterschiedlich beurteilt, außerdem das signifikant weichere Mundgefühl bei der Hefe-Kombination Flavia/QA23. Weitere Einflüsse, auch insbesondere durch die *Nichtsaccharomyceten*-Kombinationen, waren nicht feststellbar (s. Abb. 4-29, A). Der Einsatz des Enzympräparates AR2000 (E) resultierte dagegen in einer signifikanten Steigerung der Wahrnehmung von Aromaeindrücken. Im direkten Vergleich zur

jeweils ohne Enzym hergestellten Hefe-Variante waren die Attribute Pfirsich und exotische Früchte als erhöht bewertet worden, ebenso im Attribut blumig (s. Abb. 4-29, B).

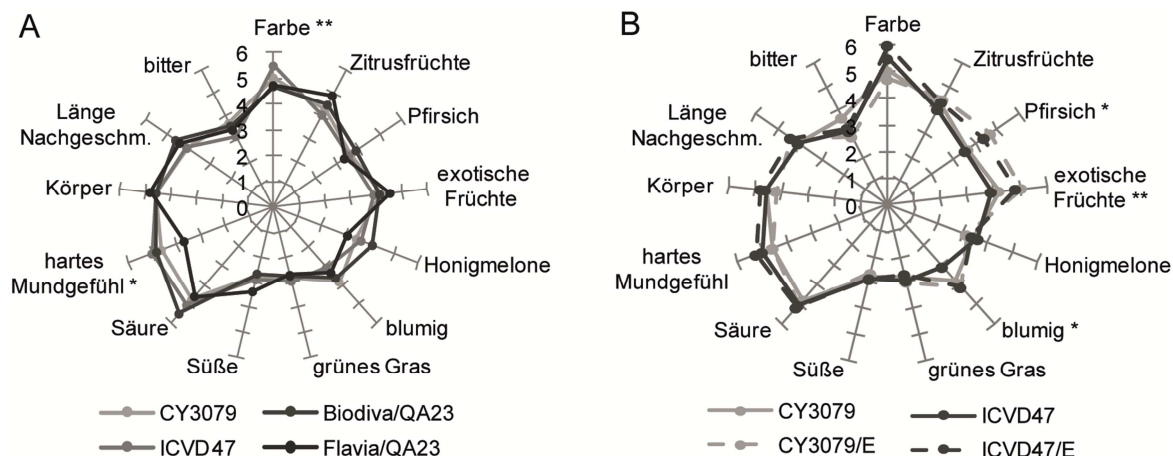


Abb. 4-29: Deskriptive sensorische Analyse der Chardonnay-Weine nach Einfluss Hefestamm (A) und Einfluss des Enzympräparates AR2000 (E) (B). (n=20 Pr. x 2 Wdhg., * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

4.4.2.2 Riesling

Die Vergärung von Riesling ergab in der geruchlichen Beurteilung für die Attribute Zitrusfrüchte und grünes Gras signifikante Unterschiede zwischen den Hefestamm-Varianten (s. Abb. 4-30, A), desweiteren für die Ausprägungen der Farbe sowie der Geschmacks- und haptischen Wahrnehmungen. Insbesondere der mit Hefestamm U228 hergestellte Wein fiel durch in allen Attributen geringere Wahrnehmung auf, während die Weine der Hefen Freddo, Heiligenstein und Siha7 auf ähnlichem Niveau bewertet wurden. Die in Kombination mit den *Nichtsaccharomyceten* Biodiva und Flavia vergorenen Weine waren von diesen, ausschließlich mit *Saccharomyces*-Reinzuchthefen hergestellten Weinen, wiederum signifikant im Geruchsattribut grünes Gras sowie im Geruchsattribut Süße und der haptischen Wahrnehmung Körper sowie der Farbe signifikant unterschiedlich. Insbesondere Stamm Flavia scheint zur Erhöhung dieser Attribute beizutragen (s. Abb. 4-30, B). Die mit den Hefestämmen CEG und HPS hergestellten Weine sind aufgrund mangelnder sensorischer Vergleichbarkeit in der Auswertung nicht berücksichtigt worden. Vermutlich bedingt durch Gärstockungen kam es bei diesen Varianten zum biologischen Säureabbau und damit zu erhöhten Milchsäurewerten, für die Variante CEG von 2,9 g/L bzw. die Variante HPS von 3,1 g/L. Der mit Stamm CEG hergestellte Wein wies zudem einen noch deutlich erhöhten Restzucker von 31,9 g/L auf (Routine-Parameter der Weine s. Anhang).

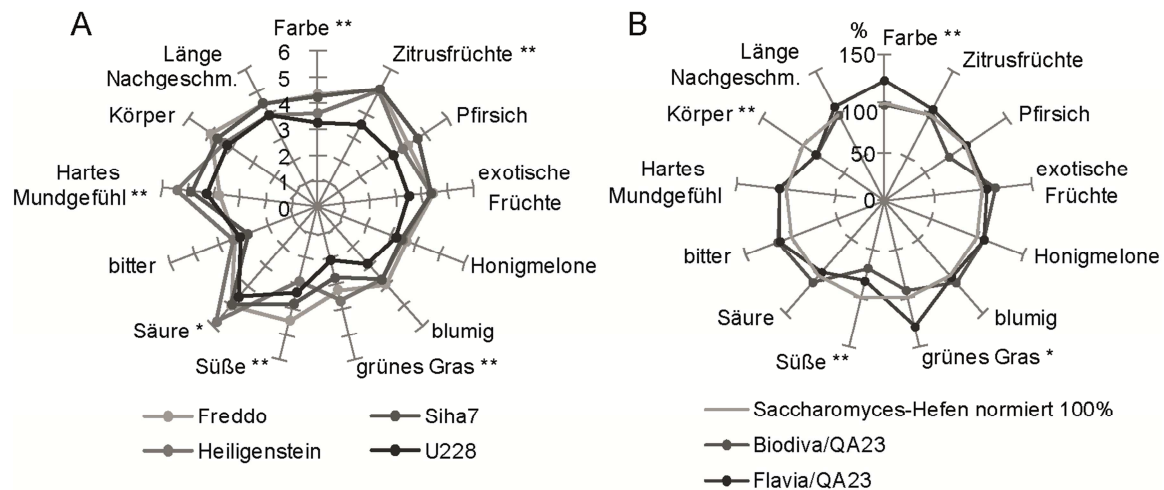


Abb. 4-30: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Weine nach Einfluss der *Saccharomyces*-Hefestämme Freddo, Heiligenstein, Siha7 und U228 (A) und Vergleich mit der Kombination aus den Nichtsaccharomyces-Stämmen Flavia und Biodiva, 100 % normiert auf die Weine aus Abb. A (B). (n=20 Pr. x 2 Wdhg., * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Der Einsatz von Enzympräparat AR2000 führte im Fall der Riesling-Weine für die Varianten Freddo, Siha7 oder die Kombination Flavia/QA23 nicht zu höheren sensorischen Intensitäten (s. Abb. 4-31, A). Nur in der Variante HPS, welche durch den spontanen BSA sensorisch deutlich hinter den Intensitäten aller Weine zurücklag, wurde durch Enzymeinsatz eine Intensivierung erzeugt, insbesondere die höchst signifikante Steigerung des Attributes blumig (s. Abb. 4-31, B).

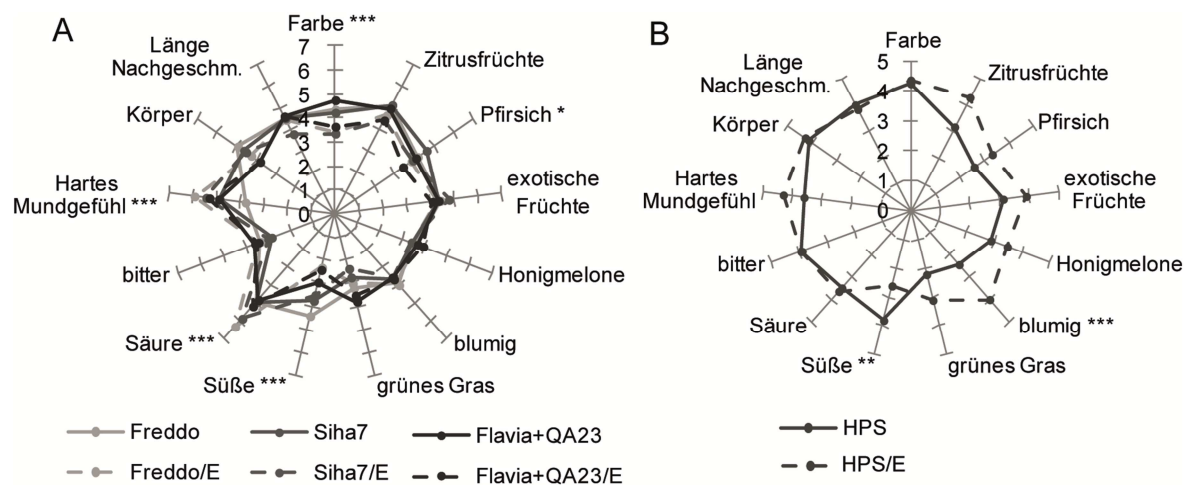


Abb. 4-31: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Weine im Kontext der Anwendung von Enzympräparat AR2000 (E). Hefestämme Freddo, Siha7 und Flavia/QA23 nach normal verlauterter Gärung (A) Hefestamm HPS nach spontanem BSA (B). (n=20 Pr. x 2 Wdhg., * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

4.4.3 Korrelation der analytischen und sensorischen Daten

Mittels Partial Least Square Regression (PLSR) wurden die Zusammenhänge zwischen den chemischen und sensorischen Daten hergestellt. Die Abnahme der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer und damit deren Freisetzung sollte theoretisch die Intensivierung bzw. Veränderung der olfaktorischen Deskriptoren in der Sensorik erklären. Die Bewertungen der Geschmacksattribute wurden aus diesem Grund nicht in die Korrelationen einbezogen. Aufgrund begrenzter Kapazitäten konnten in der sensorischen Analytik nicht alle chemisch

analysierten Weine auch sensorisch evaluiert worden. Die Vorauswahl fand aufgrund der Ergebnisse der chemischen Analytik sowie einem *bench tasting* durch eine ausgewählte Gruppe geschulter Prüfer des DLR Rheinpfalz statt.

4.4.3.1 Chardonnay

Den Gesamtzusammenhang für alle Varianten aus den *Saccharomyces*- sowie *Nichtsaccharomyces*-Hefen und Enzym-Kombinationen stellt die folgende PLS-Regression dar (s. Abb. 4-32). Die Regressionsanalyse ist mit den Gehalten an freigesetzten Aromastoffvorläufern, d.h. aus der Differenz der Vorläufergehalte des Mostes und der hergestellten Weine (Analytik) und den Bewertungen der deskriptiven Analyse (Sensorik) durchgeführt worden und erklärt über die PLS-Faktoren 1 und 2 insgesamt 82,1% der chemischen und 52,8% der sensorischen Analytik. Über den durch höheren Erklärwert gekennzeichneten PLS-Faktor 1 (62,7% Analytik, 38,5% Sensorik) wurden die Weine zunächst durch den Einfluss des Enzympräparates AR2000 differenziert. Die enzymierten Varianten ICVD47/E und CY3079/E befinden sich in die linken Quadranten projiziert und werden analytisch durch freigesetzte C₆-Alkohole, Monoterpene, C₁₃-Norisoprenoide und aromatische Alkohole erklärt, desweiteren durch die Wahrnehmung der sensorischen Deskriptoren exotische Früchte, blumig, Pfirsich und grünes Gras. Untereinander sind die Varianten kaum abgrenzbar. Die ohne Enzymeinsatz hergestellten Weine wurden, lokalisiert in den rechten Quadranten, in Antikorrelation zu den freigesetzten Aromastoffen und damit zu deren glycosidisch gebundenen Vorstufen dargestellt, ausgenommen das flüchtige Phenol 4-Vinylguaiacol welches damit in den nicht enzymierten Weinen erhöht vorlag. Die Weine konnten untereinander anhand des PLS-Faktors 2 mit geringerem Erklärwert (19,4% Analytik, 14,2% Sensorik) differenziert werden. Während die Varianten CY3079 und Flavia/QA23 im oberen Quadranten in Richtung Wahrnehmung des Attributes Zitrusfrüchte gruppiert wurden, war Variante Biodiva/QA23 im unteren Quadranten zum sensorischen Deskriptor Honigmelone und dem freigesetzten flüchtigen Phenol 4-Vinylguaiacol projiziert. Insgesamt stellt sich der Einfluss der Hefen, eingeschlossen die *Nichtsaccharomyces*, auf die Freisetzung der Aromavorläufer und die damit einhergehende intensivierete Wahrnehmung der sensorischen Deskriptoren als vergleichsweise gering dar. Das Enzym scheint zudem zusätzlich zur Aromaintensivierung das Aromaprofil der Weine von Zitrus in Richtung reife, gelbe Früchte zu verschieben.

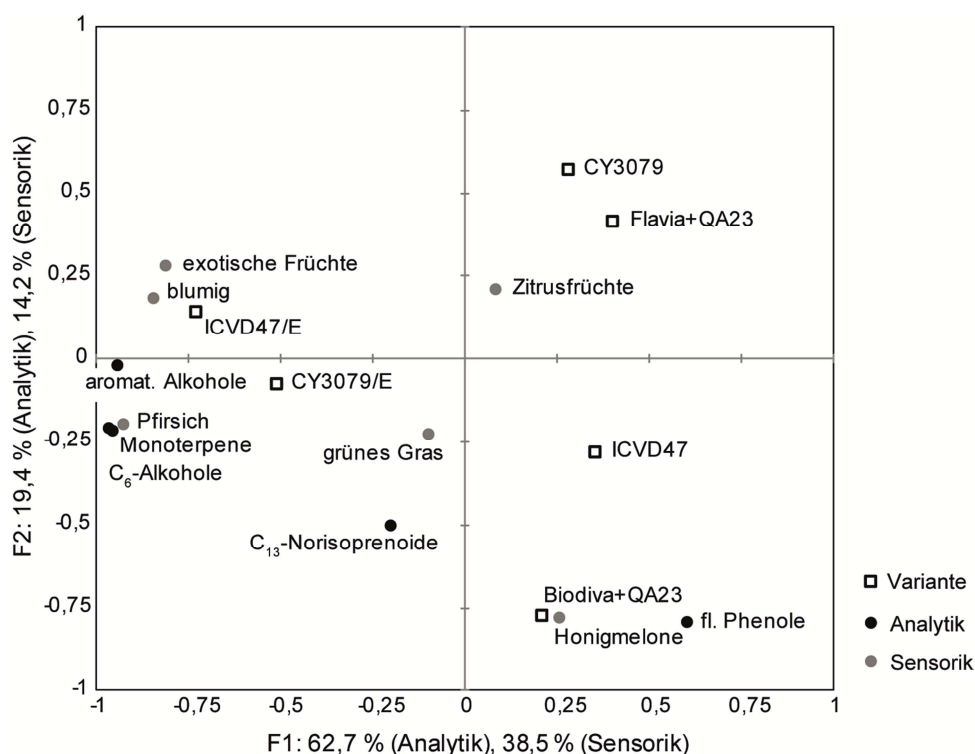


Abb. 4-32: PLS-Regression der freigesetzten Aromastoffe (X) und sensorischen Geruchsattribute (Y) mit Darstellung der verwendeten Hefestämme und Enzym AR2000 (E) bei der Vergärung von Chardonnay-Most.

4.4.3.2 Riesling

Die PLS-Regressionsanalyse der Gehalte an freigesetzten Aromastoffvorläufern, d.h. der Differenz aus den Vorläufergehalten des Basismostes und der finalen Weine (Analytik) und den Bewertungen der deskriptiven Analyse (Sensorik) erklärt über die PLS-Faktoren 1 und 2 insgesamt 83,9% der chemischen und 59,7% der sensorischen Analytik (s. Abb. 4-33). Im Fall der Gärung von Riesling konnte keine eindeutige Differenzierung von Hefestämmen oder Enzymeinsatz erfolgen, d.h. es bestand kein eindeutiger Zusammenhang der Weine mit einem der Faktoren. Die PLS-Regression ergab eine Verschiebung aller Hefestamm-Varianten in Richtung der oberen Quadranten anhand PLS-Faktor 2 (51,1% Analytik, 11,9% Sensorik), wenn Enzympräparat AR2000 eingesetzt wurde, welche jeweils unterschiedlich stark ausgeprägt war. Generell führte das Enzym, ersichtlich durch Projektion in die oberen Quadranten, zu einer Freisetzung der Aromastoffvorläufer und einer Aromaintensivierung. Beispielsweise wurden die Weine aus der Gärung mit den Hefen Freddo und Siha7 vom Attribut grünes Gras nach Enzymeinsatz in Richtung freigesetzter C₁₃-Norisoprenoide und der damit einhergehenden Wahrnehmung von Honigmelone und exotische Früchte verschoben. Am stärksten ausgeprägt war dieser Effekt für den mit Hefe HPS und unter Auftreten von biologischem Säureabbau vergorenen Wein. Diese Variante, welche über PLS-Faktor 1 (32,8% Analytik und 47,8% Sensorik) von allen anderen Weinen differenzierbar war, wurde nach Enzymierung von der Antikorrelation zu allen analytischen und sensorischen Deskriptoren in die oberen Quadranten hin zu einer Korrelation projiziert. Abgesehen von dieser eingeschränkt vergleichbaren Variante, waren die Weine aufgrund des Hefestammes weder ohne noch bei Verwendung des Enzympräparates unterscheidbar. Auch die Kombination aus dem *NichtSaccharomyces*-Stamm Flavia wurde nicht abgegrenzt und war damit nicht zu den *Saccharomyces*-Hefen unterschiedlich.

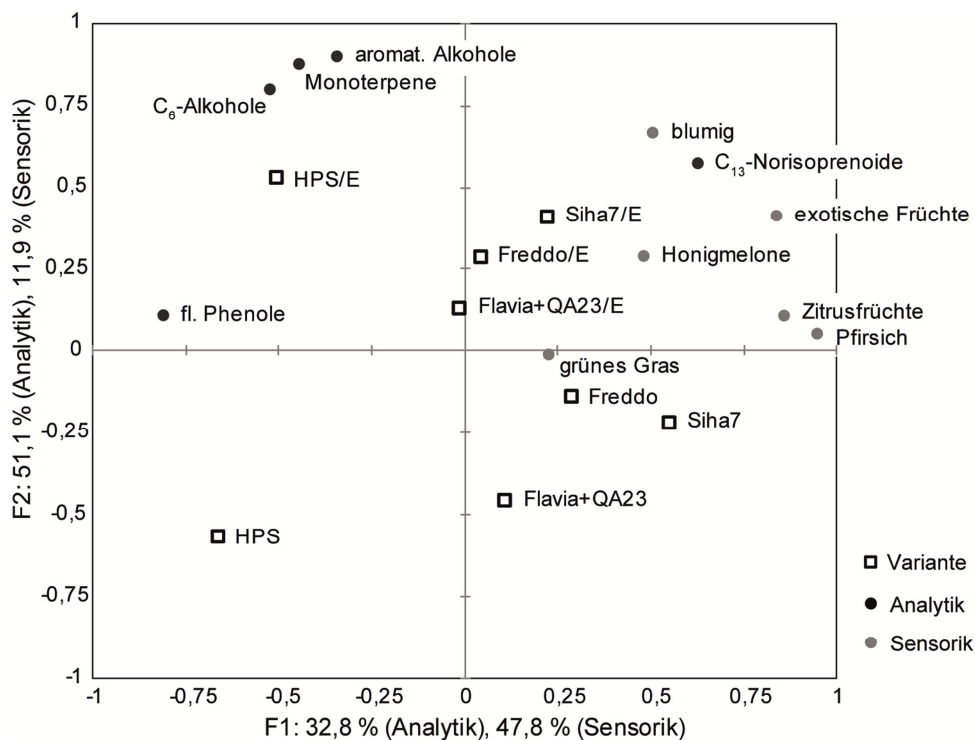


Abb. 4-33: PLS-Regression der freigesetzten Aromastoffe (X) und sensorischen Geruchsattribute (Y) mit Darstellung der verwendeten Hefestämme und Enzym AR2000 (E) bei der Vergärung von Riesling-Most.

4.4.4 Zusammenfassung der Modellgärung im Versuchsmaßstab

Die Modellgärungen im Versuchsmaßstab wurden unter vergleichbar realen kellerwirtschaftlichen Bedingungen unsteril durchgeführt, wodurch potentielle mikrobiologische Fremdeinflüsse nicht auszuschließen waren. Für den Fall der Rebsorte Riesling trat für zwei Hefestammvarianten, bei den Stämmen CEG und HPS, spontan mikrobiell verursachter biologischer Säureabbau ein und verhinderte die analytische aber vor allem sensorische Vergleichbarkeit der Weine. Ungeachtet dessen wurde für die untersuchten Rebsorten Chardonnay und Riesling eine höchst signifikante Freisetzung glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer während der Gärung vom Most zum Wein nachgewiesen. Der statistisch nachweisbare Einfluss des Hefestammes beschränkte sich auf die C₆-Alkohole und Monoterpene im Chardonnay bzw. auf die Monoterpene im Riesling. Die absoluten Gehalte betreffend, war der Hefeeinfluss insgesamt aber vergleichsweise gering und die Varianten in der Regressionsanalyse kaum nach Hefestamm zu differenzieren. Durch die Kombination mit *NichtSaccharomyces*-Hefen ergab sich keine Steigerung in der Vorläufer-Freisetzung oder Aromaintensivierung im Chardonnay, beim Riesling konnten die durch diese Kombinationen hergestellten Weine zumindest sensorisch abgegrenzt werden. Durch den Einsatz des Glycosidase-aktiven, aus *Aspergillus niger* stammenden Enzympräparates wiederum wurden signifikant höhere Gehalte an C₆-Alkoholen, Monoterpenen und aromatischen Alkoholen freigesetzt sowie die Wahrnehmung der sensorischen Deskriptoren signifikant intensiviert. Als Positiv-Kontrolle mit ausgeprägter enzymatischer Ausstattung betrachtet, relativiert das Enzym den Beitrag der Hefen zur Freisetzung glycosidisch gebundener Aromastoffe auf ein sehr geringes Niveau. Zudem konnte nicht vom Effekt der permanenten Säurehydrolyse abgegrenzt werden.

4.5 Freisetzung der Aromastoffvorläufer in der experimentellen Sektbereitung: Einfluss von Traubenmaterial, Hefe und Enzym

Moste und Grundweine wurden unter Verwendung verschiedener *Saccharomyces*-Reinzuchthefestämme vergoren, wodurch unterschiedliche Hefestammkombinationen zur Sektherstellung entstanden. Zusätzlich wurde für jede Sektvariante zusätzlich eine Variante mit dem aus *Aspergillus niger* stammenden Enzympräparat AR2000 hergestellt, das technische Aromaenzym wurde mit der Tirage zur zweiten Gärung zugegeben. Zur Abgrenzung des Hefe-Einfluss auf die Freisetzung der Aromavorläufer wurden Säurehydrolyse-Kontrollen in den Versuch einbezogen. Für die Versuche sind Rebsorten mit verschiedenen Aromavorläufer-Konzentrationen ausgewählt worden. Chardonnay besitzt allgemein geringe Vorläufer-Gehalte. Zur Variation des natürlichen Gehaltes an Aromastoffvorläufern, umfasste die Erzeugung der Grundweine sowohl die Verarbeitung eines Standardklons, als auch eines aufgrund höher Gehalte an Monoterpene als Duftklon bezeichneten Chardonnay-Klons. Dieser wurde, aufgrund des Ernteausfalls im Jahr 2013, aus dem Chardonnay-Standardklon und Gewürztraminer rekombiniert. Riesling wird durch mittlere Gehalte aller Substanzgruppen repräsentiert. Für diese Rebsorte wurden zudem über zwei Jahrgänge, in 2012 und 2013, Versuche durchgeführt. Sie unterscheiden sich in der Dauer des Hefelagers im Zuge der Flaschengärung, im Jahr 2012 wurden vier Monate und im Jahr 2013 neun Monate für die zweite Gärung in der Flasche eingehalten. Zur Variation der Ausgangsgehalte der Aromavorläufer wurde für den Jahrgang 2013 für zwei verschiedene Traubenpartien eine Ganztraubenpressung als auch eine Standardpressung nach 24 h Maischestandzeit ausgewählt. Die dritte Rebsorte im Versuch, den Muskateller, prägen hohe Vorläufer-Gehalte, insbesondere die der Monoterpene.

4.5.1 Einfluss der Hefe auf die Sektgrundweine

4.5.1.1 Chemische Analyse

Die Grundweine wurden nach der Messung mittels GC-MS auf alle Einflussfaktoren statistisch mittels mehrfaktorieller Varianzanalyse untersucht. Neben weiteren Einflussfaktoren blieb das übergeordnete Ziel allerdings die Untersuchung der Hefestämme im Kontext der Aromastoffvorläufer-Freisetzung. Der Faktor Hefestamm wurde deshalb zum Teil zusätzlich als Einflussgröße gesondert mittels einfaktorieller Varianzanalyse ausgewertet. Die Auswertung der glycosylierten Aromastoffe bleibt für die Sektgrundweine aufgrund der Aussagekraft und des Umfangs auf die Gruppensummen der Substanzklassen beschränkt.

Chardonnay

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigt zunächst den Einfluss der Faktoren Hefestamm und Klonvariante auf die Chardonnay-Grundweine (s. Tab. 4-18). Einen dominanten Einfluss hatte die Art des Klons, entweder Normal- (NK) oder rekombinierter Duftklon (DK), welcher sich höchst signifikant auf die Gehalte der glycosidisch gebundenen Monoterpene (F-Wert 128,80) bzw. signifikant auf die der C₁₃-Norisoprenoide (F-Wert 5,19) auswirkte. Die Auswahl der Grundweinehefe beeinflusste die Gehalte der Monoterpenvorläufer (F-Wert 5,62, p<0,05) und damit deren Freisetzung signifikant, allerdings wie anhand der F-Werte ersichtlich deutlich geringer. Zusätzlich war der Hefe-Einfluss auf den Vorläufer des flüchtigen Phenols 4-Vinylguaiacol höchst signifikant (F-Wert 39,08).

Tab. 4-18: Einfluss von Hefestamm und Klonvariante auf die glykosidisch gebundenen Aromavorläufer. Zweifaktorielle Varianzanalyse, F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a.

glyk. Vorläufer	FG	C ₆ -Alkohole	Monoterpene	C ₁₃ -Norisoprenoide	aromat. Alkohole	fl. Phenole
Hefestamm	1	0,53	5,62 *	0,70	1,52	39,08 ***
Klon	1	0,17	128,80 ***	5,19 *	0,15	3,66

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ***, $p < 0,001$

Während der ersten Gärung wurde, nach Klon-Variante getrennt und unabhängig vom eingesetzten Hefestamm, sowohl für den Duft- als auch den Normalklon eine höchst signifikante Abnahme der gebundenen C₆-Alkohole, Monoterpene und aromatischen Alkohole, desweiteren eine Zunahme des gebundenen flüchtigen Phenols 4-Vinylguaicol festgestellt. Die Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide wurden nur in der Duftklon-Variante beeinflusst. (s. Abb. 4-34). Die gebundenen C₆-Alkohole beispielsweise reduzierten sich in der Normalklon-Variante von 92±6 µg/L im Most auf annähernd gleiche Gehalte von 53±5 µg/L (BC) sowie 52±4 µg/L (DV10), ebenso ähnlich die finalen Gehalte für die Vorläufer der Monoterpene von 20±1 µg/L (BC) bzw. 19±1 µg/L (DV10) sowie der aromatischen Alkohole mit 467±30 µg/L (BC) bzw. 469±24 µg/L (DV10), s. Abb. 4-34, A. Vergleichbar für die Duftklon-Variante, wurden die gebundenen C₆-Alkohole von 87±3 µg/L im Most auf 53±4 µg/L (BC) bzw. 4±8 µg/L (DV10) gleichermaßen reduziert, ebenso die Vorläufer der Monoterpene von 59±7 µg/L (Most) auf 42±4 µg/L (BC) bzw. 36±3 µg/L (DV10) sowie der aromatischen Alkohole von 755±28 µg/L auf 479±3 µg/L (BC) bzw. 448±8 µg/L (DV10), s. Abb. 4-34, B. Der Gehalt der Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide unterlag dagegen in der Normalklon-Variante keiner Veränderung, während für die Duftklon-Variante ein leichter Anstieg der Gehalte zu verzeichnen war. Das gebundene flüchtige Phenol 4-Vinylguaicol, welches in nur äußerst geringen Gehalten von 0,6±0,1 µg/L (Most Normalklon) bzw. 0,7±0,2 µg/L (Most Duftklon) vorlag, stieg in beiden Varianten leicht aber signifikant an.

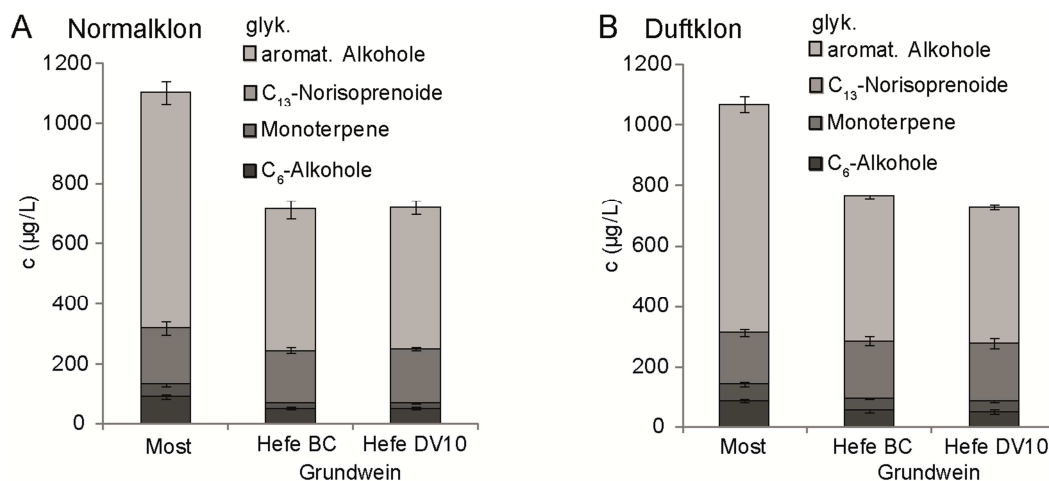


Abb. 4-34: Gehalte der Aromastoffvorläufer in den Chardonnay-Mosten und mit den Hefestämmen BC und DV10 hergestellten Grundweinen aus Normalklon (A) und Duftklon (B). (n=3).

Der Einfluss des Hefestammes auf die Freisetzung der Aromavorläufer aus ihrer glykosidischen Bindung blieb dabei allerdings begrenzt und beschränkte sich auf die gebundenen aromatischen Alkohole in den Duftklon-Grundweinen (s. Tab. 4-19), welche sich in ihren absoluten Gehalten zwischen den Hefe-Varianten signifikant unterschieden. Bei Hefestamm-Variante BC lag ein erhöhter Gehalt von 479±3 µg/L gegenüber 448±8 µg/L des mit Hefe DV10 hergestellten Grundweines vor. Desweiteren signifikant unterschiedlich waren die Grundweine beider Klon-Varianten im Gehalt des glycosylierten flüchtigen Phenols

4-Vinylguaiacol. Da diese Gehalte während der ersten Gärung angestiegen waren, kann nicht von unterschiedlicher Vorläuferfreisetzung ausgegangen werden. Für den Normklon wurden für den mit Hefestamm BC hergestellten Grundwein $2,2 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ bzw. für die mit Hefe DV10 hergestellte Variante leicht erhöhte $2,7 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ beobachtet. Für den Duftklon betragen die Endgehalte $2,2 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ (BC) bzw. $3,3 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ (DV10). Die absoluten Unterschiede fielen damit vergleichsweise gering aus.

Tab. 4-19: Einfluss des Hefestammes auf die glycosidisch gebundenen Aromavorläufer der Chardonnay-Sektgrundweine für Variante Normklon und Duftklon. ^a Einfaktorielle Varianzanalyse mit F-Werten und zugehörige Signifikanzniveaus. Eingruppierung der mit Hefestamm BC bzw. DV10 hergestellten Grundweine. ^b Paarweiser Vergleichstest (Fisher's LSD).

glyk. Vorläufer	Normklon			Duftklon		
	F-Wert ^a	Hefe BC ^b	Hefe DV10 ^b	F-Wert ^a	Hefe BC ^b	Hefe DV10 ^b
C ₆ -Alkohole	0,007	A	A	0,63	A	A
Monoterpene	1,57	A	A	5,8	A	A
C ₁₃ -Norisoprenoide	0,84	A	A	0,16	A	A
aromat. Alkohole	0,004	A	A	43,1 **	B	A
fl. Phenole	28,1 **	A	B	72,3 ***	A	B

zu ^a $p < 0,05$, ^{**} $p < 0,01$, ^{***} $p < 0,001$

Riesling 2012

Im Jahrgang 2012 wurde für den Riesling nur eine Most-Variante untersucht. Die Analyse der Aromastoffvorläufer ergab eine signifikante Abnahme der gebundenen Monoterpene, C₆-Alkohole und aromatischen Alkohole während der Vergärung des Mostes zum Wein sowie höchst signifikante Zunahmen der Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide und flüchtigen Phenole. Es bestand kein Einfluss des Hefestammes auf die Freisetzung bzw. Veränderung der Vorläufer, die mit den Hefestämmen U228 bzw. RC212 hergestellten Grundweine waren in den finalen Vorläufergehalten nicht unterschiedlich (s. Abb. 4-35 und Tab. 4-20). Die gebundenen C₆-Alkohole wurden signifikant von $65 \pm 3 \mu\text{g/L}$ im Most auf $51 \pm 2 \mu\text{g/L}$ (U228) bzw. $57 \pm 10 \mu\text{g/L}$ (RC212) reduziert, die Vorläufer der Monoterpene ausgehend von $245 \pm 13 \mu\text{g/L}$ auf $153 \pm 12 \mu\text{g/L}$ (U228) bzw. $136 \pm 14 \mu\text{g/L}$ (RC212) höchst signifikant sowie die Vorläufer der aromatischen Alkohole von im Most $275 \pm 5 \mu\text{g/L}$ auf $214 \pm 9 \mu\text{g/L}$ (U228) bzw. $189 \pm 32 \mu\text{g/L}$ (RC212) ebenfalls signifikant. Die gebundenen C₁₃-Norisoprenoide verzeichneten dagegen einen deutlichen höchst signifikanten Anstieg von $147 \pm 5 \mu\text{g/L}$ im Most auf $272 \pm 16 \mu\text{g/L}$ (U228) sowie $256 \pm 9 \mu\text{g/L}$ (RC212). Für den Vorläufer des flüchtigen Phenols 4-Vinylguaiacol war ebenfalls ein höchst signifikanter Anstieg während der ersten Gärung zu verzeichnen, der in absoluten Gehalten aber in nur geringem Rahmen stattfand. Im Most messbar waren $1,8 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ der Substanz und in den Grundweinen $9 \pm 1,6 \mu\text{g/L}$ (U228) bzw. $9 \pm 0,8 \mu\text{g/L}$ (RC212).

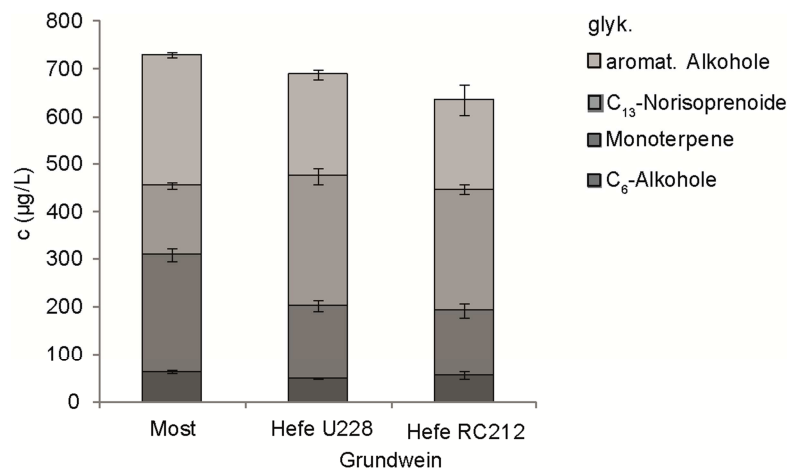


Abb. 4-35: Gehalte der Aromastoffvorläufer im Riesling-Most und in den Grundweinen der Hefestämme U228 und RC212 aus 2012. (n=3).

Der Vergleich der Grundweine ergab keinen Einfluss des Hefestammes auf die Freisetzung der glycosidisch gebundenen Aromavorläufer. Sowohl die während der ersten Gärung reduzierten Gehalte der gebundenen Monoterpene, C₆-Alkohole und aromatischen Alkohole als auch die durch Zunahme geprägten Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide und flüchtigen Phenole waren in ihren finalen Gehalten in den Grundweinen der Hefevarianten U228 und RC212 nicht unterschiedlich (s. Tab. 4-20).

Tab. 4-20: Einfluss des Hefestammes auf die glycosidisch gebundenen Aromavorläufer der Riesling-Sektgrundweine aus 2012. ^aEinfaktorielle Varianzanalyse mit F-Werten und zugehörige Signifikanzniveaus. Eingruppierung der mit Hefestamm U228 bzw. RC212 hergestellten Grundweine. ^bPaarweiser Vergleichstest (Fisher's LSD).

glyk. Vorläufer	F-Wert ^a	Hefe U228 ^b	Hefe RC212 ^b
C ₆ -Alkohole	1,11	A	A
Monoterpene	2,67	A	A
C ₁₃ -Norisoprenoide	2,05	A	A
aromat. Alkohole	1,74	A	A
fl. Phenole	0,41	A	A

zu ^a p < 0,05, ^{**} p < 0,01, ^{***} p < 0,001

Riesling 2013

Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse stellte sich der Faktor Traubenverarbeitung als höchst signifikant auf die Aromavorläufergehalte aller Substanzgruppen des Riesling-Mostes und der daraus hergestellten Grundweine heraus. Einfluss der Hefe bestand dagegen auf die Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide (F-Wert 16,85, p < 0,01) sowie des flüchtigen Phenols 4-Vinylguaiaicol (F-Wert 6,57, p < 0,05), s. Tab. 4-21.

Tab. 4-21: Einfluss von Grundweinhefe und Traubenmaterial auf die glycosidisch gebundenen Aromavorläufer. Zweifaktorielle Varianzanalyse, F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a.

glyk. Vorläufer	FG	C ₆ -Alkohole	Monoterpene	C ₁₃ -Norisoprenoide	aromat. Alkohole	fl. Phenole
Hefestamm	1	0,81	1,14	16,85 ^{**}	0,23	6,57 [*]
Traubenmaterial	1	9,89 ^{**}	242,97 ^{***}	71,32 ^{***}	117,74 ^{***}	208,34 ^{***}

zu ^a p < 0,05, ^{**} p < 0,01, ^{***} p < 0,001

Die Analyse der Aromavorläufer, unabhängig vom eingesetzten Hefestamm und getrennt nach Traubenverarbeitung, ergab für die Ganztraubenpressungen (GTP)- Variante eine signifikante Abnahme der gebundenen C₆-Alkohole, Monoterpene und aromatischen Alkohole während der ersten Gärung. Die Gehalte der Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide sowie des flüchtigen Phenols dagegen stiegen an. Für die Standzeit-Variante kann keine Aussage über die Veränderung der Vorläufer getroffen werden, da keine Daten des entsprechenden Ausgangsmostes vorliegen (s. Abb. 4-36). Die Most-Variante aus der Ganztraubenpressung brachte vor allem sehr hohe Gehalte gebundener aromatischer Alkohole von 743±23 µg/L, die in der ersten Gärung sowohl vom Hefestamm IOC 18-2007 als auch von DV10 gleichermaßen höchst signifikant freigesetzt wurden. Die gebundenen Monoterpene wurden von 127±15 µg/L (Most) auf 102±6 µg/L (DV10) bzw. 109±9 µg/L (IOC 18-2007) abgebaut, die Vorläufer der C₆-Alkohole von 105±3 µg/L (Most) auf 64±5 µg/L (DV10) bzw. 73±3 µg/L (IOC-18-2007). Für die C₁₃-Norisoprenoide und flüchtigen Phenole war ein leichter Anstieg der Vorläufer messbar. Die mit den beiden unterschiedlichen Hefen hergestellten Grundweine unterschieden sich final aber ausschließlich im Gehalt der glycosylierten C₁₃-Norisoprenoide, mit 123±7 µg/L (DV10) bzw. 152±7 µg/L (IOC 18-2007). Für den aus Trauben mit 24 Stunden Standzeit hergestellten Most sind keine quantitativen Daten bezüglich der Vorläufergehalte verfügbar, weswegen über die Freisetzung der Aromastoffvorläufer innerhalb der ersten Gärung keine Aussage getroffen werden kann. Die Analyse der Grundweine ergab im Vergleich zu den Grundweinen der GTP-Variante zunächst insgesamt höhere Gehalte an Vorläufern. Die Endgehalte an Aromavorläufern der Grundweine der Standzeit-Varianten unterschieden sich im direkten Vergleich allerdings wiederum ausschließlich die glycosylierten C₁₃-Norisoprenoide betreffend mit 211±17 µg/L (DV10) bzw. 294±33 µg/L (IOC 18-2007) sowie leicht im Vorläufer des flüchtigen Phenols 4-Vinylguaicol mit 10±1 µg/L (DV10) bzw. 8±0,3 µg/L (IOC 18-2007). Die Gehalte der Vorläufer der Monoterpene, C₆-Alkohole und aromatischen Alkohole dagegen waren nicht unterschiedlich.

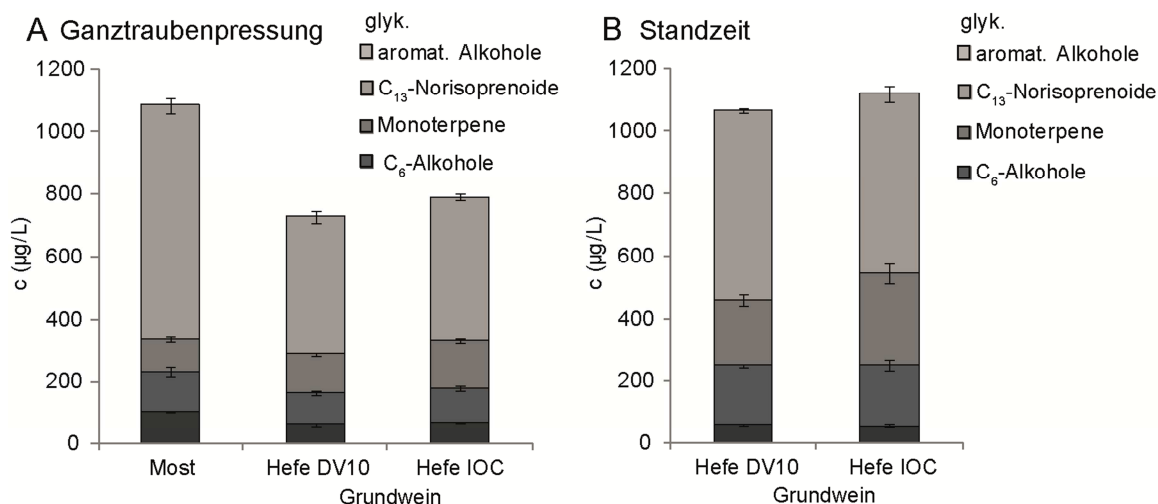


Abb. 4-36: Gehalte der Aromastoffvorläufer in den Riesling-Mosten und den Grundweinen aus den Hefestämmen DV10 und IOC 18-2007 aus Ganztraubenpressung (A) und Standzeit 24 h (B). (n=3).

Der Vergleich der Grundweine ergab insgesamt einen vergleichsweise geringen Einfluss des Hefestammes auf die Gehalte glycosidisch gebundener Aromavorläufer (s. Tab. 4-22). Vor allem im Endgehalt der gebundenen C₁₃-Norisoprenoide, welche im Vergleich zum Most angestiegen waren, wurden Unterschiede deutlich. Für die Variante Ganztraubenpressung lagen im mit Hefestamm DV10 hergestellten Grundwein 123±7 µg/L bzw. im mit Hefe

IOC 18-2007 hergestellten Grundwein 152 ± 7 $\mu\text{g/L}$ vor. In der Most-Variante Standzeit wurden Gehalte von 211 ± 17 $\mu\text{g/L}$ (DV10) bzw. 294 ± 33 $\mu\text{g/L}$ (IOC 18-2007) bestimmt. Zusätzlich unterschieden sich die Standzeit-Grundweine im finalen Gehalt des gebundenen flüchtigen Phenols, mit $10,2 \pm 0,7$ $\mu\text{g/L}$ (DV10) bzw. $7,7 \pm 0,3$ $\mu\text{g/L}$ (IOC 18-2007).

Tab. 4-22: Einfluss des Hefestammes auf die glycosidisch gebundenen Aromavorläufer der Riesling-Sektgrundweine, getrennt nach Most-Variante Ganztraubenpressung und Standzeit. ^a Einfaktorielle Varianzanalyse: F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus. Eingruppierung der mit Hefestamm IOC 18-2007 (IOC) bzw. DV10 hergestellten Grundweine. ^b Paarweiser Vergleichstest (Fisher's LSD).

glyk. Vorläufer	Ganztraubenpressung			Standzeit		
	F-Wert ^a	Hefe IOC ^b	Hefe DV10 ^b	F-Wert ^a	Hefe IOC ^b	Hefe DV10 ^b
C ₆ -Alkohole	7,05	A	A	1,04	A	A
Monoterpene	1,12	A	A	0,27	A	A
C ₁₃ -Norisoprenoide	26,42 **	B	A	14,91 *	B	A
aromat. Alkohole	2,08	A	A	3,59	A	A
fl. Phenole	0,21	A	A	37,01 **	A	B

zu ^a * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Muskateller

Von der an Monoterpen-Vorläufern reichen Rebsorte Muskateller wurde nur eine Most-Variante zu Grundweinen und Sekten vergoren. Vom Most zum Grundwein verringerten sich die Gehalte der Vorläufer der C₆-Alkohole, Monoterpene und aromatischen Alkohole höchst signifikant, während die gebundenen C₁₃-Norisoprenoide anstiegen. Der Gehalt des flüchtigen Phenols 4-Vinylguaiacol veränderte sich nicht (s. Abb. 4-37). Der Einfluss des Hefestammes war ausschließlich auf den finalen Gehalt der C₁₃-Norisoprenoide in den hergestellten Grundweinen signifikant (s. Tab. 4-23). Während der ersten Gärung wurden die Vorläufer der C₆-Alkohole von 113 ± 10 $\mu\text{g/L}$ im Most auf 56 ± 9 $\mu\text{g/L}$ (BC) und 62 ± 1 $\mu\text{g/L}$ (DV10), der Monoterpene von ausgehend 655 ± 47 $\mu\text{g/L}$ auf 480 ± 41 $\mu\text{g/L}$ (BC) und 503 ± 1 $\mu\text{g/L}$ (DV10) sowie der aromatischen Alkohole von 635 ± 75 $\mu\text{g/L}$ (Most) auf 343 ± 27 $\mu\text{g/L}$ (BC) bzw. 349 ± 3 $\mu\text{g/L}$ (DV10) reduziert. Die Gehalte der C₁₃-Norisoprenoide stiegen dagegen leicht auf 194 ± 2 $\mu\text{g/L}$ (BC) bzw. 200 ± 1 $\mu\text{g/L}$ (DV10) an. Der Gehalt des gebundenen flüchtigen Phenols 4-Vinylguaiacol veränderte sich von den $5,8 \pm 0,1$ $\mu\text{g/L}$ im Most auf $4,4 \pm 0,9$ $\mu\text{g/L}$ (BC) bzw. $4,8 \pm 0,6$ (DV10) in den Grundweinen nicht (s. Abb. 4-37).

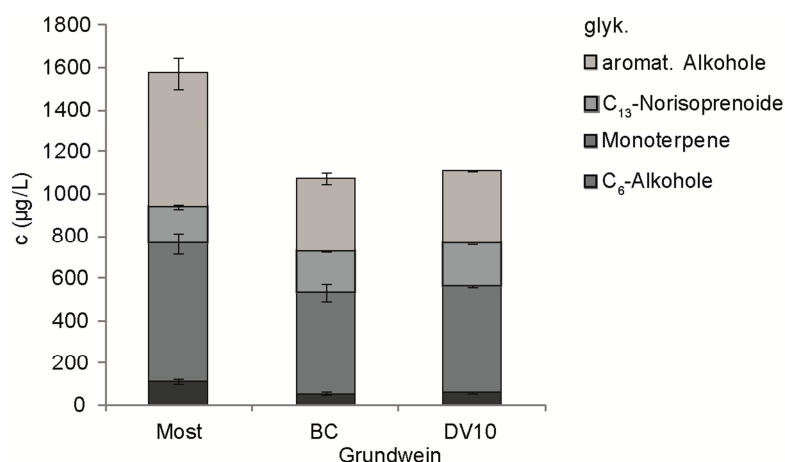


Abb. 4-37: Gehalte der Aromastoffvorläufer im Muskateller-Most und in den mit Hefestämmen BC und DV10 hergestellten Grundweinen. (n=3).

Der Einfluss des Hefestammes war auf die Freisetzung der Aromavorläufer in diesem Versuchsteil nicht von Bedeutung. Es lag lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen den Grundweinen auf den finalen Gehalt der gebundenen C₁₃-Norisoprenoide vor, welcher sich aber im Laufe der ersten Gärung nicht reduziert hatte. Der mit Hefestamm BC hergestellte Grundwein wies mit 194±2 µg/L gegenüber dem mit Hefe DV10 hergestellten Grundwein mit 200±1 µg/L einen leicht geringeren Gehalt dieser Vorläufer aus (s. Tab. 4-23).

Tab. 4-23: Einfluss des Hefestammes auf die Aromavorläufer der Muskateller-Sektgrundweine. ^aEinfaktorielle Varianzanalyse: F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus. Eingruppierung der mit Hefestamm BC bzw. DV10 hergestellten Grundweine. ^bPaarweiser Vergleichstest (Fisher's LSD).

glyk. Vorläufer	F-Wert ^a	Hefe BC ^b	Hefe DV10 ^b
C ₆ -Alkohole	1,04	A	A
Monoterpene	0,97	A	A
C ₁₃ -Norisoprenoide	15,89 *	A	B
aromat. Alkohole	0,18	A	A
fl. Phenole	0,39	A	A

zu ^a* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

4.5.1.2 Sensorische Analyse

Die Grundweine waren bezüglich ihrer weinchemischen Standardparameter vergleichbar (Parameter s. Anhang), wurden mittels deskriptiver Analyse sensorisch beurteilt und anschließend statistisch mittels zweifaktorieller *mixed model* Varianzanalyse untersucht. Die Grundweine der jeweiligen Rebsorte wurden, alle Varianten gemeinsam und voll randomisiert, in zweifacher Wiederholung probiert. Zur Herausstellung des Hefestamm-Einfluss wurden die Varianten in der Darstellung der Ergebnisse nach Traubenmaterial getrennt.

Chardonnay

Die Chardonnay-Grundweine unterschieden sich unter Einbeziehen des zusätzlichen Faktors der Klon-Variante signifikant in der Farbe (F-Wert 4,60, p<0,01) sowie in der Bewertung der Geschmackseindrücke Säure (F-Wert 2,87, p>0,05) und bitter (F-Wert 2,79, p>0,05). Um ausschließlich den Hefeeinfluss zu berücksichtigen, wurden die Grundweine getrennt voneinander nach Klon-Variante betrachtet (s. Abb. 4-38). Der Faktor Hefe zeichnete sich dann hoch signifikant für die Farbe sowie den bitteren Geschmack zwischen den Normklon-Varianten verantwortlich, die Duftklon-Varianten betreffend ausschließlich in der Wahrnehmung der Intensität der Säure.

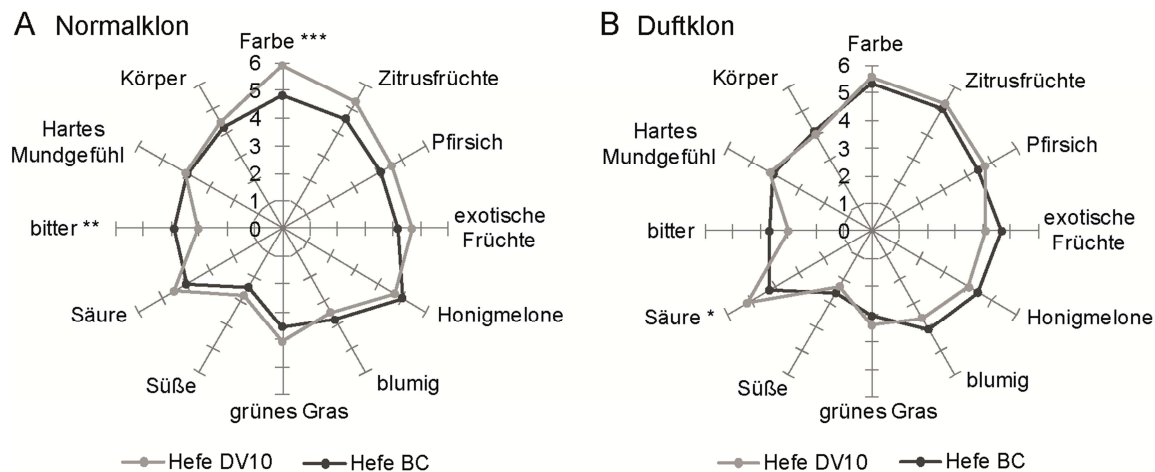


Abb. 4-38: Deskriptive sensorische Analyse der Chardonnay-Grundweine nach Normalklon (A) und Duftklon (B) unter Einfluss der Hefen DV10 und BC.

(n=18 Pr. x 2 Wdhg, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Riesling 2012

In der deskriptiven Analytik der 2012er Riesling-Grundweine ist der mit Hefe RC212 hergestellte Wein als signifikant intensiver in den Attributen Zitrone und Pfirsich eingestuft worden. Demgegenüber wurde der von mit U228 vergorene Sektgrundwein stärker als rauchig/Honig sowie hoch signifikant als fruchtiger bewertet. In der chemischen Analyse waren die Weine statistisch allerdings nicht unterschiedlich, es war lediglich eine Tendenz zu erhöht freigesetzten Vorläufern der Variante RC212 feststellbar.

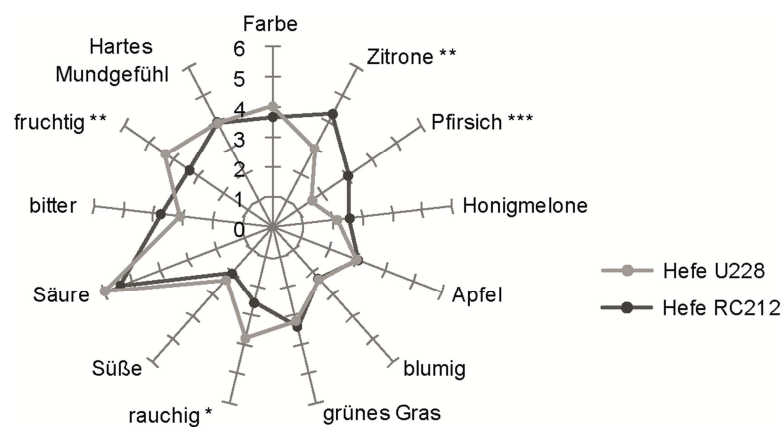


Abb. 4-39: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Grundweine aus 2012 unter Einfluss der Hefestämme U228 und RC212.

(n=17 Pr. x 2 Wdhg, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Riesling 2013

Die Riesling-Grundweine unterschieden sich zunächst aufgrund des zusätzlichen Faktors des Traubenmaterials signifikant in den Attributen Farbe (F-Wert 66,33, p < 0,001), blumig (F-Wert 7,84, p < 0,001) sowie Süße (F-Wert 3,88, p < 0,01) und Säure (F-Wert 3,22, p < 0,05). Um diesen Einfluss auszuschließen erfolgte die weitere Auswertung getrennt nach Most-Varianten (s. Abb. 4-40). Der Faktor Hefestamm war demnach zwischen den Grundweinen aus der Ganztraubenpressung höchst signifikant unterschiedlich im Attribut Farbe. Die Grundweine aus der Standzeit-Variante unterschieden sich signifikant in der

Intensitätsbewertung der Geruchseindrücke Pfirsich und Honigmelone sowie im Attribut Süße.

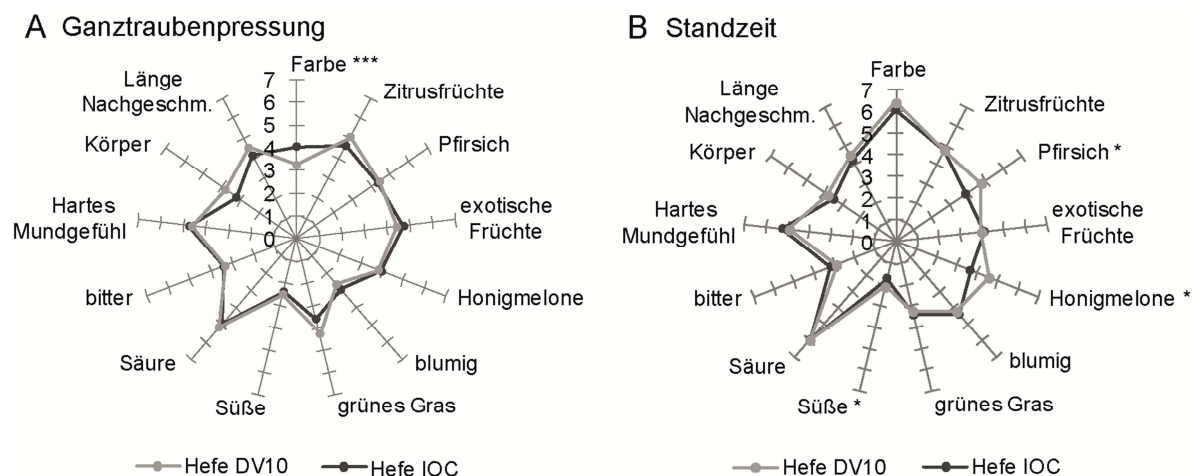


Abb. 4-40: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Grundweine nach Ganztraubenpressung (A) und Standzeit 24 h (B) unter Einfluss der Hefestämme DV10 und IOC 18-2007. (n=18 Pr. x 2 Wdhg, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Muskateller

In der deskriptiven Analyse der Muskateller-Grundweine wurde die mit Hefestamm BC hergestellte Variante signifikant intensiver in den Attributen blumig und Honigmelone bewertet (s. Abb. 4-41). Alle weiteren Deskriptoren waren zwischen den Grundweinen übereinstimmend wahrgenommen worden, was den Unterschied auf die für Muskateller typische dominierende Wahrnehmung von blumig reduziert.

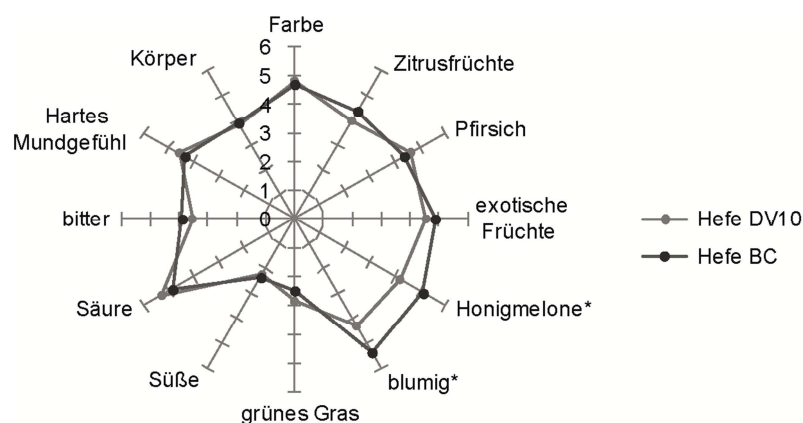


Abb. 4-41: Deskriptive sensorische Analyse der Muskateller-Grundweine unter Einfluss der Hefestämme DV10 und BC. (n=18 Pr. x 2 Wdhg, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

4.5.1.3 Korrelation chemischer und sensorischer Daten

Die Grundweine zur anschließenden Versektung wurden unter praxisnahen Bedingungen hergestellt, durch die damit verbundene nicht sterile Arbeitsweise sind Fremdeinflüsse durch beispielsweise mikrobiologische Belastung grundsätzlich nicht auszuschließen. Die Grundweine waren vollständig vergoren und wiesen weder anhand von Milchsäure noch flüchtiger Säure auf mikrobielle Belastung hin. Um verschieden hohe Ausgangsgehalte glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer einzubeziehen, wurden die Rebsorten Chardonnay, Riesling und Muskateller in den Versuch genommen.

Die Darstellung der Grundweine mittels PLS-Regression erklärt über die PLS-Faktoren 1 und 2 insgesamt 73,1% chem. Analytik und 42,3% Sensorik (s. Abb. 4-42). Die Riesling-Grundweine aus 2012 finden hier keine Beachtung, da diese in der sensorischen Analyse durch ein anderes Panel unter Verwendung von z.T. anderen Deskriptoren bewertet wurden. Die Grundweine waren folgerichtig von der Rebsorte geprägt. Die Chardonnay- und Muskateller-Grundweine differenzierten sich vor allem anhand des PLS-Faktors 1 (31,3% Analytik, 29,8% Sensorik). Bei Chardonnay waren die Grundweine, unabhängig des Traubenmaterials, vor allem durch die sensorischen Deskriptoren Zitrusfrüchte und grünes Gras erklärt, während Grundweine der Rebsorte Muskateller zu den Attributen blumig, Honigmelone, Pfirsich und exotische Früchte projiziert wurden, ebenso zu den glycosylierten Vorläufern der Monoterpene und C₆-Alkohole. Für die Riesling-Grundweine, zusätzlich zur Abgrenzung von den anderen Rebsorten, war der Einfluss des Traubenmaterials relevant und separierte die entsprechenden Varianten vor allem anhand des PLS-Faktors 2 (41,7% Analytik, 12,5% Sensorik). Die Grundweine aus dem Most nach Maischestandzeit von 24 Stunden gruppieren sich zu Vorläufern der C₁₃-Norisoprenoide, flüchtigen Phenole und aromatischen Alkohole, während die Ganztraubenpressung die Grundweine in Richtung zu glycosylierten C₆-Alkoholen verlagerte. Sensorisch waren die Varianten vor allem durch das Attribut blumig in den Standzeit-Varianten und der Wahrnehmung von gelben Früchte in den GTP-Varianten verschieden. Durch die Auswahl des Hefestammes allerdings fand für keine der Grundwein-Varianten eine Differenzierung statt.

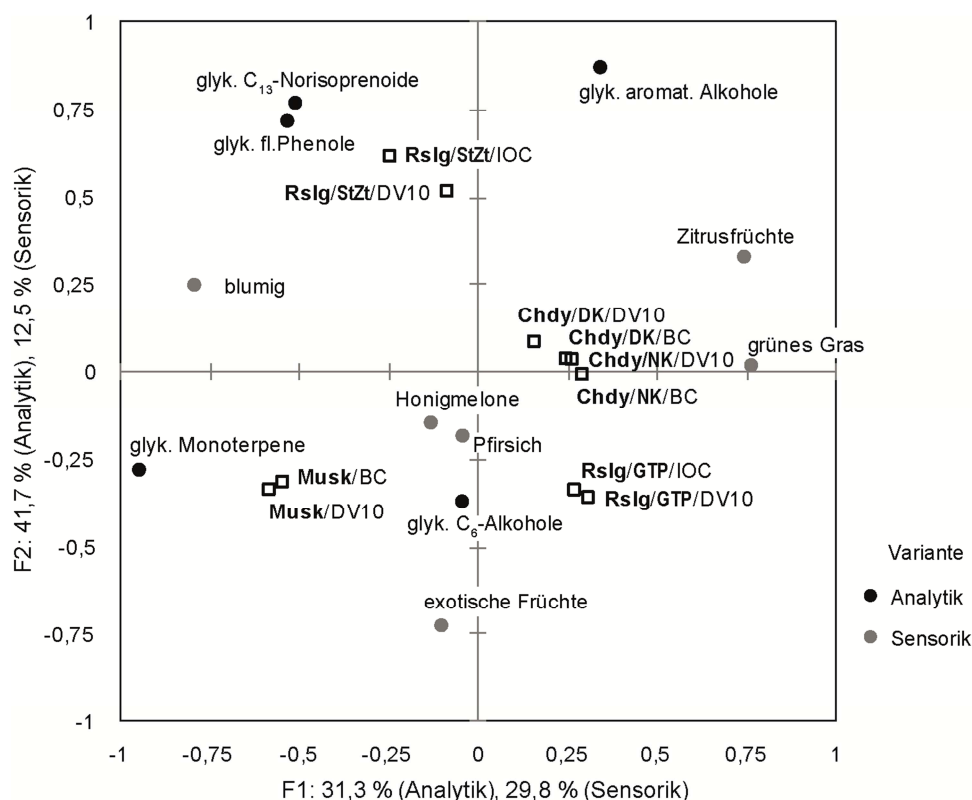


Abb. 4-42: PLS-Regression der glycosylierten Aromastoffe (X) und sensorischen Geruchsattribute (Y) mit Darstellung der Sektgrundweine der Rebsorten Chardonnay, Riesling und Muskateller unter Einfluss von Traubenmaterial und Hefestamm.

Der übergeordnete Fokus des Versuches, trotz Untersuchung weiterer Faktoren, war die Untersuchung des Hefestamm-Einfluss auf die Freisetzung der glycosylierten Aromavorläufer und die damit verbundenen sensorischen Eigenschaften der Grundweine. Durch aromachemische und sensorische Analytik oder deren statistischer Modulation

konnten kaum aussagekräftige oder reproduzierbare Unterschiede gefunden werden, welche auf einen Hefeeinfluss zurückzuführen waren. Vereinzelt sind zwischen den Hefestamm-Varianten, insbesondere in der sensorischen Bewertung der Weine, Unterschiede aufgetreten, welche sich absolut betrachtet aber in einem relativ geringen Rahmen bewegten. Beispielsweise sind die Hefe-Varianten DV10 und IOC 18-2007 des 2013er Rieslings nach Standzeit in den Attributen Pfirsich und Honigmelone signifikant unterschiedlich beurteilt worden, für die Varianten nach Ganztraubenpressung wurde dieser Unterschied durch die Prüfer aber nicht festgestellt. Die chemische Analytik bestätigte für dieses Beispiel die Unterschiede im Gehalt der C₁₃-Norisoprenoide, welche für tropisch-süße Noten verantwortlich sind und durch Hefe DV10 signifikant stärker freigesetzt worden waren. Am Beispiel der Riesling-Grundweine aus 2012 zeigte sich hingegen, dass mittels chemischer Analytik keine Unterschiede in der Freisetzung für die Hefen bestanden, in der Sensorik allerdings wurden diese signifikant unterschiedlich in den Attributen Zitrone, Pfirsich und rauchig beurteilt.

Es war auch in Betracht gezogen worden, dass der Einfluss der Hefe substratabhängig sei, weswegen die Rebsorten Chardonnay, Riesling und Muskateller zur Repräsentation ansteigender Aromavorläufer-Gehalte ausgewählt wurden. Mittels sensorischer Analyse wurde durch den Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den Hefe-Varianten des Muskateller-Grundweines in den Attributen blumig und Honigmelone, diese Vermutung zunächst bestätigt. Allerdings konnte das aromachemisch nicht durch eine signifikant unterschiedliche Freisetzung der Vorläufersubstanzen verifiziert werden. Insbesondere die Monoterpene, welche den Geruchseindruck blumig maßgeblich hervorrufen, hätten erwartungsgemäß zwischen den Hefen unterschiedlich sein müssen. Auch die Betrachtung der entsprechenden Einzelsubstanzen konnte den Unterschied nicht erklären. Beispielsweise wurde für noch glycosidisch gebunden vorliegendes Linalool $14 \pm 2 \mu\text{g/L}$ im mit Hefe BC hergestellten Grundwein bzw. $13 \pm 1 \mu\text{g/L}$ für Variante DV10 bestimmt, ebenso Nerol mit $107 \pm 13 \mu\text{g/L}$ (Hefe BC) bzw. $116 \pm 2 \mu\text{g/L}$ (Hefe DV10) oder Geraniol mit $188 \pm 22 \mu\text{g/L}$ (Hefe BC) bzw. $199 \pm 4 \mu\text{g/L}$ (Hefe DV10). Hingegen signifikant unterschiedlich waren die finalen Gehalte der C₁₃-Norisoprenoide in den Grundweinen, allerdings war in diesem Fall umgekehrt der Stamm BC die stärker freisetzende Hefe. Für die Grundweine der neutralen Rebsorte Chardonnay wiederum wurden sensorisch zwischen den Hefe-Varianten keine Unterschiede festgestellt, in der chemischen Analytik dagegen gering aber signifikant im finalen Gehalt der glycosidisch gebunden aromatischen Alkohole für die Variante Duftklon sowie im Vorläufer des flüchtigen Phenol 4-Vinylguaiacol unabhängig vom Traubenmaterial. Insgesamt konnte über die Versuche für die einzelnen Hefen kein Trend für eine vergleichsweise schwächere oder stärkere Freisetzungstätigkeit festgestellt werden.

4.5.2 Einfluss von Hefekombination und Enzymsatz auf Sekte verschiedener Rebsorten unterschiedlicher Traubenverarbeitung

4.5.2.1 Chemische Analyse

Die Sekte und Säurehydrolyse-Kontrollen wurden jeweils in dreifacher Mess- sowie zweifacher Flaschenwiederholung gemessen. Zur folgenden Auswertung wird aber jeweils nur die erste Flaschenwiederholung herangezogen. Durch die zahlreichen Versuchsvarianten und der zeitaufwändigen Probenaufarbeitung lagen zwischen der Messung der ersten und zweiten Flaschenwiederholung im Mittel sechs Monate. Der dadurch entstandene zusätzliche Einfluss der Säurehydrolyse schloss eine kombinierte Auswertung der Wiederholungen aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit aus.

Chardonnay

Die Chardonnay-Sekte sind durch mehrere Faktoren beeinflusst worden. Wie für die Grundweine, umfasst die Varianz der hergestellten Sekte zunächst die Verarbeitung eines Standard- sowie eines Duftklons. Desweiteren die Verwendung verschiedener Hefestämme sowohl für die Grundwein- als auch die Sektherstellung, wodurch sich diverse Hefekombinationen ergeben. Allerdings ist für den Chardonnay, bedingt durch die Auswahl der Hefen, keine vollfaktorielle Auswertung dieses Faktors, d.h. die Interaktion von Grundweinhafe und Sektheffe, möglich. Zusätzlich wurde für jede Hefekombination noch eine Variante unter Verwendung des durch eine signifikant erhöhte Glycosidase-Aktivität charakterisierten Enzympräparates AR2000 hergestellt, desweiteren eine Kontrolle zur Untersuchung des Beitrages der sauren Hydrolyse an der Freisetzung der Aromavorläufer über die Zeit der zweiten Gärung.

Die Hauptkomponentenanalyse fasst den Einfluss aller Faktoren auf die glycosidisch gebundenen Aromastoffe der Sekt-Varianten zusammen. Die Ergebnisse noch gebundener Aromastoffe in den Sekten sind auf die Hauptkomponenten 1 und 2 projiziert und erklären insgesamt 82,5% des Gesamtdatensatzes. Die Aromastoffvorläufer sind als Faktorladungen im rechten Bild dargestellt, die Sekte als Faktorwerte im linken Bild (s. Abb. 4-43). Für die Rebsorte Chardonnay, welche allgemein geringe Aromavorläufergehalte aufweist, dominiert der Einfluss des aus *Aspergillus niger* stammenden Enzympräparates AR2000. Die entsprechenden Varianten (E) werden vor allem durch die aussagekräftigere Hauptkomponente 1 (62,9%) von allen anderen Varianten abgetrennt und verdeutlicht damit die Abnahme der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer. Die enzymierten Varianten im Vergleich untereinander, d.h. unter Einfluss der vorher zur Gärung verwendeten Hefestammkombination sowie der Art des verarbeiteten Chardonnay-Klons, werden dagegen anhand der weniger aussagekräftigen Hauptkomponente 2 (19,5%) diskriminiert, dabei ist keine Tendenz zu einem bestimmten freisetzungsfördernden Faktor zu erkennen. Sekte die ohne Enzymeinsatz hergestellt wurden, konnten durch keine der beide Hauptkomponenten untereinander diskriminiert werden, insgesamt gruppieren sich die Varianten im unteren rechten Quadranten, dabei erklärt durch noch gebundene Monoterpene, aromatische Alkohole und C₆-Alkohole. Eine Ausnahme bildete die Variante DK/DV10/IOC, welche sich durch Hauptkomponente 2 in Richtung höherer Gehalte noch gebundener flüchtiger Phenole und C₁₃-Norisoprenoide abbildete.

Die Projektion der Säurehydrolyse-Kontrollen (Sre) erfolgte ebenfalls anhand der Diskriminierung an Hauptkomponente 1 von den enzymierten Sektvarianten aller Hefestamm-Kombinationen, allerdings auch deutlich anhand Hauptkomponente 2 von den unter Hefe-Einfluss stehenden Varianten. Bei ausschließlicher Säurewirkung wurden die Varianten in Richtung höherer Gehalte an noch gebundenen flüchtigen Phenolen, C₁₃-Norisoprenoiden und C₆-Alkoholen projiziert, während der Hefe-Einfluss die Sekte vor allem in Richtung der Monoterpen-Vorläufer abbildete. Neben der insgesamt erhöhten Freisetzungsrates durch die Hefen liegt damit ein Hinweis auf eine selektive Freisetzung von Aromastoffvorläufern vor.

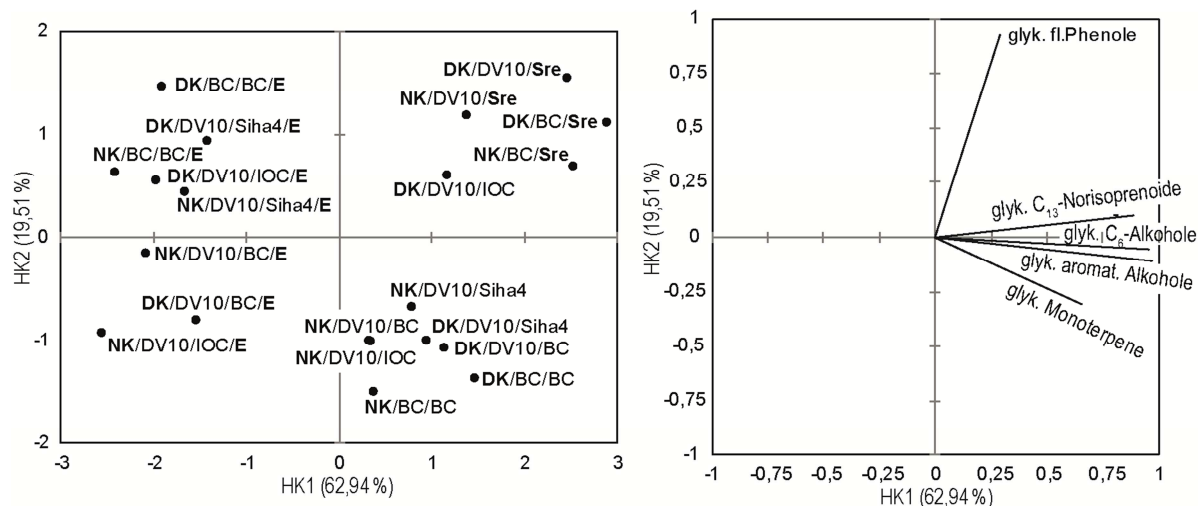


Abb. 4-43: Einfluss von Traubenmaterial (NK Normalklon, DK Duftklon), Hefestamm (Grundweinhafe/Sekthefe), Enzymeinsatz (E) und Säurehydrolyse (Sre) auf die gebundenen Aromastoffvorläufer in den Chardonnay-Sekten. Hauptkomponentenanalyse, Projektion der Faktorwerte der Chardonnay-Sekte (links) und der Faktorladungen der gebundenen Aromastoffe (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

Mittels Multifaktorieller Varianzanalyse wurden die Einflüsse der unabhängigen Variablen Sektgrundweinhafe, Sekthefe, Enzym und Art des Klons untersucht. Aufgrund des vorliegenden Datensatzes war die Berechnung der Interaktion zwischen Grundwein- und Sekthefe nicht möglich. Der Einfluss der sauren Hydrolyse wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse berechnet, da die entsprechenden Kontroll-Proben mit dem vorherigen Datensatz nicht vergleichbar waren (s. Tab. 4-24). Die Analyse zeigte den vergleichsweise geringen Einfluss der Auswahl des Hefestammes auf die Freisetzung der Aromastoffvorläufer. Die Grundweinhafe übte keinen signifikanten Einfluss auf die Gehalte der zu Gruppen aufsummierten Aromavorläufer in den fertigen Sekten aus, bei Betrachtung der Vorläufer-Einzelsubstanzen ergab sich ein signifikanter Effekt auf das Monoterpen 3,7-Dimethyl-1,5-Octadien-3,7-diol (F-Wert 4,15) sowie den aromatischen Alkohol 2-Phenylethanol (F-Wert 7,18). Für die Sekthefen bestand ein signifikanter Einfluss auf die gebundenen C₆-Alkohole (F-Wert 5,55) sowie aromatischen Alkohole (F-Wert 6,91) insgesamt, was aber anhand der vergleichsweise geringen F-Werte relativiert wurde. Die absoluten Werte über die drei eingesetzten Sekthefestämme verdeutlichten den geringen Hefestamm-Einfluss, da sich die finalen Gehalte der C₆-Alkohol-Vorläufer in den Sekten zwischen 38±1 µg/L bei Hefe-Kombination DV10/IOC 18-2007 und 42±2 µg/L bei Kombination DV10/Siha4 im Normalklon bzw. 39±4 µg/L bei Einsatz der Hefen DV10/IOC 18-2007 und 46±2 µg/L für BC/BC im Duftklon bewegten. Absolut etwas höher war der Unterschied für die Vorläufer der aromatischen Alkohole, in den Sekten blieben noch zwischen 472±7 µg/L (BC/BC) und 501±48 µg/L (DV10/Siha4) im Normalklon bzw. von 453±29 µg/L (DV10/IOC 18-2007) bis 515±10 µg/L (BC/BC) in glycosidisch gebundener Form. Der für die Gruppensumme gezeigte Sekthefeinfluss auf die glycosylierten C₆-Alkohole konnte dabei n-Hexanol (F-Wert 5,86) zugeordnet werden, der für die Vorläufer der aromatischen Alkohole Benzylalkohol (F-Wert 7,71). Zudem war ein signifikanter Einfluss auf das gebundene α-Terpineol (F-Wert 4,77) sowie auf 3,7-Dimethyl-1,5-Octadien-3,7-diol (F-Wert 3,89) feststellbar, während auf die glycosidisch gebundenen Monoterpene insgesamt kein statistischer Unterschied vorlag. Anhand der vergleichsweise geringen F-Werte für den Hefeinfluss wurde im Gegensatz dazu erneut der hohe Einfluss des Enzyms deutlich, welcher sich höchst signifikant auf die Vorläufer der C₆-Alkohole

(F-Wert 819,17), Monoterpene (F-Wert 237,52), C₁₃-Norisoprenoide (F-Wert 43,62) und aromatischen Alkohole (F-Wert 589,11), damit gestützt durch sehr hohe F-Werte, darstellte. Die absoluten Werte betrachtend, lagen für den Normalklon in nicht enzymierten Sekt-Varianten im Mittel für alle Varianten noch 40±1 µg/L C₆-Alkohole, 10±1 µg/L Monoterpene, 172±8 µg/L C₁₃-Norisoprenoide und 484±16 µg/L aromatische Alkohole nach der zweiten Gärung als Vorläufer vor. Kam das Enzympräparat zum Einsatz, verblieben dagegen nur noch 17±1 µg/L C₆-Alkohole, 1±0,2 µg/L Monoterpene, 136±7 µg/L C₁₃-Norisoprenoide bzw. 322±12 µg/L aromatische Alkohole in gebundener Form. Für die Duftklon-Varianten verhielt es sich ähnlich, in nicht enzymierten Sekt-Varianten fanden sich im Mittel für alle Varianten noch 43±2 µg/L C₆-Alkohole, 24±1 µg/L Monoterpene, 156±6 µg/L C₁₃-Norisoprenoide und 488±14 µg/L aromatische Alkohole glycosidisch gebunden, während durch Enzymeinsatz deutlich reduzierte Endgehalte der Vorläufer von 18±2 µg/L für C₆-Alkohole, 6±1 µg/L an Monoterpenen, 144±7 µg/L der C₁₃-Norisoprenoide und 313±7 µg/L der aromatischen Alkohole erreicht wurden. Das zeigt die gegenüber den *Saccharomyces*-Hefen deutlich erhöhte Freisetzungsrates dieses aus *Aspergillus niger* stammenden Enzyms. Es bestand dabei auf beinahe alle untersuchten Einzelsubstanzen ein höchst signifikanter Einfluss, der durch hohe F-Werte belegt wurde, beispielsweise für den Vorläufer des C₆-Alkohols (Z)-3-Hexen-1-ol (F-Wert 596,06), der Monoterpene Nerol (F-Wert 110,79) und Geraniol (F-Wert 123,28) oder den aromatischen Alkohol 2-Phenylethanol (F-Wert 724,85).

Durch die signifikante Abgrenzung der Säurehydrolyse-Kontrollen von den Hefe-Varianten konnte auf einen Beitrag der Hefen auf die Freisetzung der Aromastoffvorläufer geschlossen werden. Die Hefevarianten sind dabei durch geringere Gehalte an Vorläufern der C₆-Alkohole, C₁₃-Norisoprenoide, aromatischen Alkoholen und flüchtigen Phenolen charakterisiert, was auf eine enzymatische Freisetzungstätigkeit der Hefen schließen lässt. Beispielsweise charakterisierten die Säurehydrolyse-Kontrollen der Normalklon-Varianten noch 46±2 µg/L gebundene C₆-Alkohole, der Hefeinsatz hatte diese im Mittel auf 40±1 µg/L verringert. Deutlich war der Unterschied auch für die glycosylierten C₁₃-Norisoprenoide bei mittleren Endgehalten von 231±24 µg/L bei ausschließlicher Säurewirkung, welche durch Hefewirkung auf 172±8 µg/L reduziert waren, ebenso die aromatischen Alkohole, welche im Mittel für die Säurehydrolyse-Kontrollen bei 560±26 µg/L bzw. für die Hefe-Varianten bei 484±16 µg/L lagen. In vergleichweisem Rahmen bewegten sich auch die Duftklon-Varianten, beispielsweise reduzierten sich die glycosylierten C₁₃-Norisoprenoide der Säurehydrolyse-Kontrollen im Mittel von 253±15 µg/L auf 156±6 µg/L für die Hefe-Varianten. Die Monoterpen-Vorläufer hingegen wurden durch die Säurehydrolyse stärker freigesetzt, in den Normalklonvarianten lagen im Mittel über alle Hefen-Varianten noch 10±1 µg/L glycosyliert vor, in den entsprechenden Säurehydrolyse-Kontrollen 5±1 µg/L. Im rekombinierten Duftklon waren bei regulärem Hefe-Einsatz noch 24±1 µg/L gebunden, dagegen unter ausschließlichem Säurehydrolyse-Einfluss noch 17±1 µg/L.

Die statistische Auswertung der Einzelsubstanzen unterstrich allgemein die Resultate der Gruppensummen. Allerdings erneut zu beachten war die Möglichkeit der statistischen Überinterpretation bei der aufgeschlüsselten Betrachtung der Einzelsubstanzen. Das verdeutlicht hier das Beispiel der trans-Linalooloxide, welche in den regulären Sekt-Varianten unter Hefeeinfluss nicht mehr in gebundener Form vorlagen, in den Säurehydrolyse-Kontrollen allerdings noch in geringen Mengen bis maximal 1 µg/L nachzuweisen waren. Dadurch entsteht allerdings, vergleicht man Hefe- gegen Säure-Varianten mittels Varianzanalyse, ein hoher statistischer Unterschied. In der Gruppensumme bestand hingegen statistisch kein Einfluss auf die Monoterpen-Vorläufer.

Tab. 4-24: Multifaktorielle Varianzanalyse über die Chardonnay-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a. Einfaktorielle Analyse für den Einfluss der Säurehydrolyse^b.

Varianzquelle	Hefe Wein	Hefe Sekt	Enzym	Klon	Säurehydrolyse ^b
Freiheitsgrade	1	2	1	1	1
glyk. C₆-Alkohole					
Z-3-Hexen-1-ol	0,42	1,82	596,06 ***	19,05 ***	14,85 ***
E-2-Hexen-1-ol	2,46	2,94	346,50 ***	1,01	16,83 ***
n-Hexanol	0,84	5,86 **	663,50 ***	1,69	21,10 ***
Summe glyk. C ₆ -Alkohole	1,97	5,55 **	819,17 ***	3,91 *	19,49 ***
glyk. Monoterpene					
trans-Linalooloxid (fur)	-	-	-	-	51,80 ***
trans-Linalooloxid (pyr)	-	-	-	-	46,16 ***
Z-8-Hydroxylinalool	0,08	0,02	162,89 ***	65,01 ***	1,98
E-8-Hydroxylinalool	2,29	1,43	1912,20 ***	0,01	0,75
α-Terpineol	0,30	4,77 **	3,49	177,46***	2,56
Nerol	1,36	3,46 *	110,79 ***	131,14 ***	1,65
Geraniol	0,07	0,81	123,28 ***	85,32 ***	2,11
3,7-Dimethyl-1,5-Octadien-3,7-diol	4,15 *	3,89 *	0,00	33,67 ***	4,15 *
Summe glyk. Monoterpene	0,29	1,32	237,52 ***	130,49 ***	0,18
glyk. C₁₃-Norisoprenoide					
3-Hydroxy-beta-Damascon	1,85	3,90 *	91,16 ***	0,83	196,75 ***
3-Hydroxy-beta-Ionol	1,99	1,84	300,74 ***	60,54 ***	4710,11 ***
3-Oxo-alpha-Ionol	2,11	2,18	16,20 **	10,79 **	104,61 ***
3-Hydroxy-7,8-didehydro-β-ionol	1,26	0,87	164,20 ***	14,71 ***	8,23 **
3-Oxo-7,8-dihydro-alpha-Ionol	0,05	5,38 **	15,23 ***	206,87 ***	10,46 **
3-Hydroxy-7,8-dihydro-β-Ionol	1,65	3,49 *	134,54 ***	5,04 *	4,61 *
Summe glyk. C ₁₃ -Norisoprenoide	0,99	2,24	43,62 ***	1,16	177,39 ***
glyk. aromatische Alkohole					
Benzylalkohol	0,97	7,71 ***	397,46 ***	0,02	37,28 ***
2-Phenylethanol	7,18 **	1,68	724,85 ***	0,68	4,93 *
Summe glyk. aromat. Alkohole	2,41	6,91 **	589,11 ***	0,11	26,15 ***
glyk. flüchtige Phenole					
4-Vinylguaiacol	2,58	1,48	3,37	12,07 ***	25,65 ***

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Riesling 2012

Die Riesling-Sekte 2012 sind ausschließlich auf den Faktor Hefestamm untersucht worden, es wurden allerdings andere Hefen als im Versuch 2013 eingesetzt. Weiterhin wurde keine Kontrolle der Säurehydrolyse mitgeführt. Zu beachten ist, dass die zweite Gärung dieser Sekte nur für vier Monate durchgeführt wurde.

Die folgende Abb. 4-44 zeigt die vier Sektvarianten, die aus Kombinationen der Hefestämme U228 und RC212 hergestellt wurden. Die finalen Gehalte der noch glycosidisch gebundenen Aromavorläufer in den Sekten nach erster und zweiter Gärung waren in den absoluten Werten gering unterschiedlich, beispielsweise zwischen dem geringsten Gehalt von 42±2 µg/L der Hefe-Kombination U228/RC212 bis zu 48±1 µg/L bei Kombination RC212/U228 für die Vorläufer der C₆-Alkohole (p<0,01, F-Wert 9,77). Die noch glycosyliert vorliegenden Monoterpene bewegten sich zwischen 95±2 µg/L für die Hefen U228/RC212

bis 114 ± 4 $\mu\text{g/L}$ für RC212/U228 ($p < 0,01$, F-Wert 7,50), die zwischen den Sekten statistisch nicht unterschiedlichen C_{13} -Norisoprenoide zwischen 194 ± 7 $\mu\text{g/L}$ bei U228/RC212 bis maximal noch in gebundener Form vorliegende 217 ± 4 $\mu\text{g/L}$ der Kombination U228/U228 und die aromatischen Alkohole zwischen 181 ± 10 $\mu\text{g/L}$ in Variante U228/U228 und maximal 200 ± 7 $\mu\text{g/L}$ in mit Hefekombination RC212/RC212 hergestellten Sekten ($p < 0,05$, F-Wert 5,51). Der allgemein in sehr geringer Konzentration vorliegende glycosylierte Vorläufer des flüchtigen Phenols 4-Vinylguaiacol schwankte zwischen $4,4 \pm 0,3$ $\mu\text{g/L}$ in der Variante RC212/U228 sowie $5,9 \pm 0,4$ $\mu\text{g/L}$ für Hefekombination RC212/RC212 ($p < 0,05$, F-Wert 6,54).

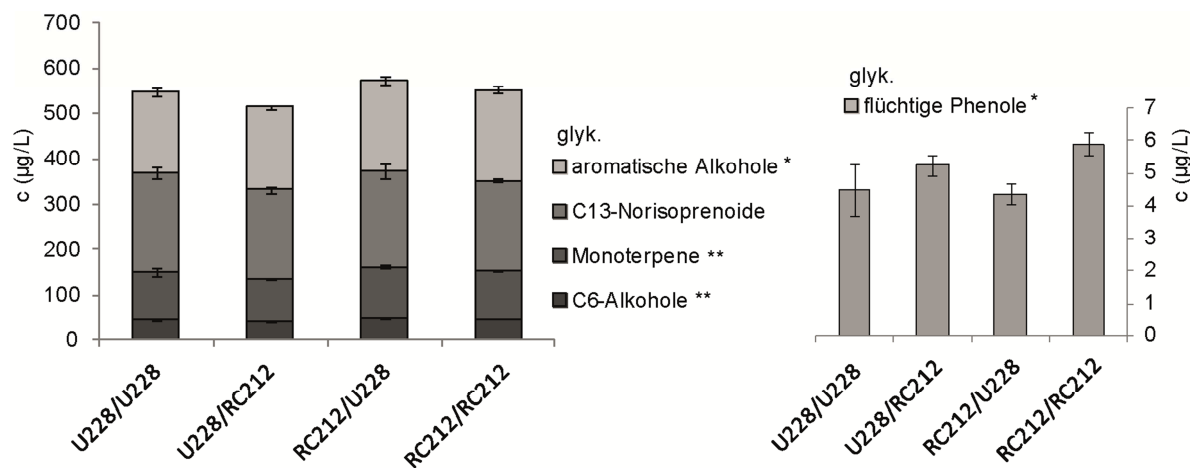


Abb. 4-44: Gehalte glycosidisch gebundener Aromastoffe in den mit verschiedenen Kombinationen der Hefestämme U228 und RC212 hergestellten Riesling-Sekten in 2012.

($n=3$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Anhand der multifaktoriellen Analyse ergab sich ein signifikanter Einfluss von sowohl Grundwein- als auch Sekthefe auf die Gehalte einiger Aromastoffvorläufer im fertigen Sekt. Die Auswahl der Grundwein-Hefe beeinflusste die Gehalte glycosidisch gebundenen C_6 -Alkohole (F-Wert 22,65), Monoterpene (F-Wert 11,45) und aromatischen Alkohole (F-Wert 14,53). Die Auswirkung auf die Einzelsubstanzen konnte dabei, beispielsweise die Vorläufer der C_6 -Alkohole betreffend, für die hoch geruchsaktiven Substanzen (*Z*)-3-Hexen-1-ol (F-Wert 33,94) und (*E*)-2-Hexen-1-ol (F-Wert 37,14) vom aufgrund seines Schwellenwertes weniger geruchsaktiven *n*-Hexanol (F-Wert 10,96) statistisch durch den F-Wert differenziert werden. Desweiteren bestand im Versuch ein signifikanter Einfluss der Sekthefe auf die Vorläufer der C_6 -Alkohole (F-Wert 5,76), Monoterpene (F-Wert 9,17), C_{13} -Norisoprenoide (F-Wert 6,87) und flüchtigen Phenole (24,80), welcher anhand der F-Werte geringer als der Beitrag der Grundweinhefe einzuschätzen war. Die Auswertung der Einzelsubstanzen stellte an dieser Stelle beispielsweise aus dem signifikanten Einfluss auf die glycosylierten Monoterpene insgesamt den Einfluss der Sekthefe auf das hoch geruchsaktive Linalool (F-Wert 23,92) heraus. Für die Interaktion von Grundwein- und Sekthefe war allerdings kein signifikanter Einfluss mehr feststellbar (s. Tab. 4-25). Der aber insgesamt im Vergleich zu den Sekten aus 2013 bestehende signifikante Einfluss der Hefen, war möglicherweise auf die mit nur 4 Monaten dauernde und damit vergleichsweise unter geringerem Einfluss der Säurehydrolyse stehende zweite Gärung zurückzuführen.

Tab. 4-25: Multifaktorielle Varianzanalyse über die 2012 Riesling-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a.

Varianzquelle	Hefe Wein	Hefe Sekt	Hefe SGW*Hefe Sekt
Freiheitsgrade	1	1	1
glyk. C₆-Alkohole			
Z-3-Hexen-1-ol	33,94 ***	1,34	0,08
E-2-Hexen-1-ol	37,14 ***	2,02	2,52
n-Hexanol	10,96 *	6,59 *	0,30
Summe glyk. C ₆ -Alkohole	22,65 **	5,76 *	0,002
glyk. Monoterpene			
trans-Linalooloxid (fur)	0,16	9,93 *	2,19
cis-Linalooloxid (fur)	0,11	6,58 *	0,07
Z-8-Hydroxylinalool	16,14 **	0,05	0,94
Linalool	18,86 **	23,92 **	2,74
α-Terpineol	0,03	23,05 **	0,32
Geraniol	0,90	14,89 **	0,05
3,7-Dimethyl-1,5-Octadien-3,7-diol	28,56 **	11,72 *	0,52
Summe glyk. Monoterpene	11,45 *	9,17 *	1,34
glyk. C₁₃-Norisoprenoide			
3-Hydroxy-beta-Damascon	0,59	7,13 *	0,06
3-Hydroxy-beta-Ionol	6,41 *	33,09 **	3,81
3-Oxo-alpha-Ionol	0,20	1,54	2,14
3-Hydroxy-7,8-didehydro-β-ionol	0,12	15,99 **	0,15
3-Oxo-7,8-dihydro-alpha-Ionol	0,46	13,40 **	0,03
3-Hydroxy-7,8-dihydro-β-Ionol	2,13	13,43 **	1,25
Summe glyk. C ₁₃ -Norisoprenoide	0,03	6,87 *	0,52
glyk. aromatische Alkohole			
Benzylalkohol	20,90 **	1,78	0,24
2-Phenylethanol	3,95	6,86 *	0,33
Summe glyk. aromat. Alkohole	14,53 **	0,13	0,008
glyk. flüchtige Phenole			
4-Vinylguaiaicol	1,56	24,60 **	3,44

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Riesling 2013

Die Riesling-Sekte sind durch mehrere Faktoren beeinflusst worden. Die Varianz der hergestellten Sekte umfasst zunächst die unterschiedliche Traubenverarbeitung mittels Ganztraubenpressung sowie einer Standzeit von 24 Stunden. Desweiteren die Verwendung verschiedener Hefestämme sowohl für die Grundwein- als auch die Sektherstellung, wodurch sich diverse Hefekombinationen ergaben. Allerdings ist für den Riesling in 2013, bedingt durch die Auswahl der Hefen, keine vollfaktorielle Auswertung dieses Faktors, d.h. die Interaktion von Grundweinhefe und Sekthefe, möglich. Zusätzlich wurde für jede Hefekombination noch eine Variante unter Verwendung des durch eine signifikant erhöhte Glycosidase-Aktivität charakterisierten Enzympräparates AR2000 hergestellt, desweiteren eine Kontrolle zur Untersuchung des Beitrages der sauren Hydrolyse an der Freisetzung der Aromavorläufer über die Zeit der zweiten Gärung.

Die folgende Hauptkomponentenanalyse fasst den Einfluss aller Faktoren auf die glycosidisch gebundenen Aromastoffe der Sekt-Varianten zusammen. Die Ergebnisse der noch gebunden vorliegenden Aromastoffe in den Sekten sind auf die Hauptkomponenten 1 und 2 projiziert und erklären insgesamt 95,04% des Gesamtdatensatzes. Die Aromastoffvorläufer sind als Faktorladungen im rechten Bild dargestellt, die Sekte als Faktorwerte im linken Bild (s. Abb. 4-45). Die Rebsorte Riesling, die insgesamt mittlere Gehalte glycosidisch gebundener Vorläufer aufweist, war bereits durch die Traubenverarbeitung deutlich beeinflusst. Die Sekt-Varianten aus der Ganztraubenpressung (GTP) bzw. der Standzeit von 24 Stunden (StZt) differenzieren sich vor allem anhand Hauptkomponente 1 (67,0%), aber auch anhand Hauptkomponente 2 (28,1%). Die StZt-Varianten werden dabei vor allem zu den Vorläufern der aromatischen Alkohole, C₁₃-Norisoprenoide, Monoterpene und flüchtigen Phenole projiziert, während die GTP-Varianten durch Vorläufer der C₆-Alkohole geprägt sind. Innerhalb dieser Gruppierungen erfolgt allerdings wiederum kaum eine Differenzierung aufgrund des Einflusses von Hefestamm bzw. Hefestammkombination. Einzig die jeweils ohne Hefeeinfluss verbliebenen Säurehydrolyse-Kontrollen (Sre) lassen sich anhand Hauptkomponente 1 von denen der Hefevarianten der jeweiligen Most-Variante abgrenzen. Unter Hefeeinsatz verschieben sich die Varianten auf Hauptkomponente 1 nach links und damit in Gegenrichtung zu den gebundenen Vorläufern, d.h. deren vermutlich durch Hefeeinsatz abnehmende Gehalte. Der Einsatz des Enzympräparates AR2000 (E) verursacht für die GTP-Varianten vor allem eine Differenzierung anhand Hauptkomponente 2 in Richtung Abnahme der C₆-Alkohole, für die StZt-Varianten erfolgt die Differenzierung anhand beider Hauptkomponenten und projiziert damit allgemein in Richtung abnehmender Gehalte der Aromastoffvorläufer.

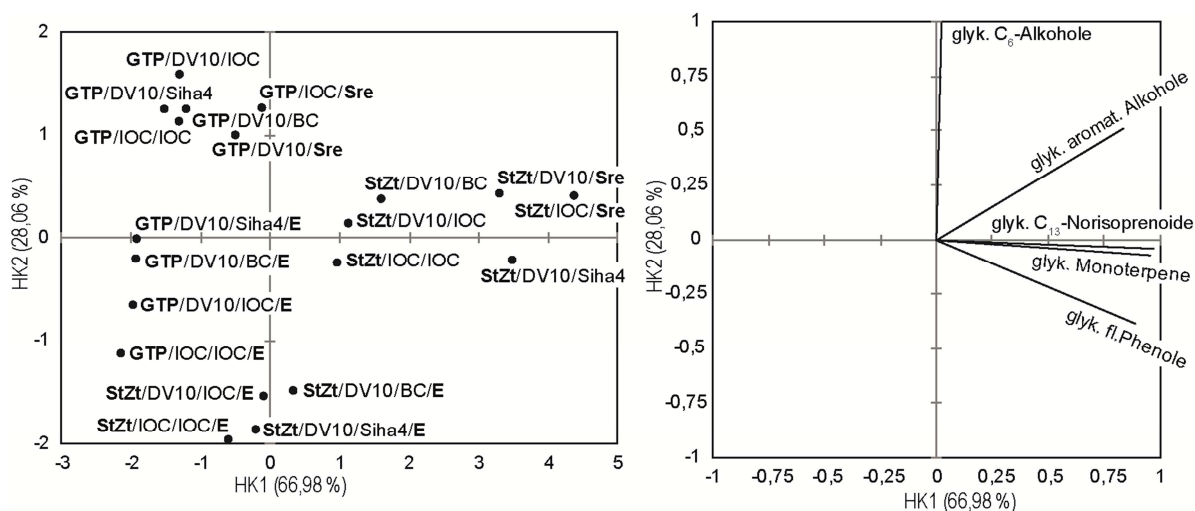


Abb. 4-45: Einfluss von Traubenmaterial (GTP Ganztraubenpressung, StZt Standzeit), Hefestamm, Enzymeinsatz (E) und Säurehydrolyse (Sre) auf die gebundenen Aromastoffvorläufer in den Riesling-Sekten aus 2013. Hauptkomponentenanalyse, Projektion der Faktorwerte der Riesling-Sekte (links) und der Ladungen der gebundenen Aromastoffe (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

Mittels Multifaktorieller Varianzanalyse wurden die Einflüsse der unabhängigen Variablen Grundweinhafe, Sektheffe, Enzym und Traubenverarbeitung untersucht. Aufgrund des vorliegenden Datensatzes war die Berechnung der Interaktion zwischen der Grundweinh- und der Sektheffe nicht möglich. Der Einfluss der sauren Hydrolyse wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse berechnet, da die entsprechenden Kontroll-Proben mit dem vorherigen Datensatz nicht vergleichbar waren (s. Tab. 4-26). Die Analyse zeigte auch für die Rebsorte

Riesling einen vergleichsweise geringen Einfluss der Hefen auf die Gehalte glycosidisch gebundener Aromavorläufer im fertigen Sekt. Die Auswahl der Grundwein-Hefen erwies sich auf die gebundenen C₆-Alkohole (F-Wert 25,8) sowie aromatischen Alkohole (F-Wert 11,9) als signifikant. Anhand der vergleichsweise niedrigen F-Werte sowie der absoluten Gehalte noch gebundener Aromastoffe ist dieser Effekt allerdings relativiert zu betrachten. Die Gehalte noch glycosyliert vorliegender C₆-Alkohole für die Varianten nach Ganztraubenpressung bewegten sich zwischen 61±5 µg/L für die Hefe-Kombination IOC 18-2007/IOC 18-2007 und 66±2 µg/L für DV10/IOC 18-2007. Die Varianz der noch gebundenen aromatischen Alkohole lag zwischen 426±32 µg/L bei Verwendung der Hefen IOC 18-2007/IOC 18-2007 und 484±12 µg/L für die Kombination DV10/IOC 18-2007. Ähnlich verhielt es sich für die Varianten nach Maischestandzeit, die Restgehalte glycosylierter C₆-Alkohole fanden sich zwischen 42±1 µg/L für Variante IOC 18-2007/IOC 18-2007 und 51±1 µg/L bei Hefe-Kombination DV10/Siha4. Die Varianz der Vorläufer aromatischer Alkohole zeigte sich höher, es wurden Endgehalte zwischen 464±3 µg/L für Variante IOC 18-2007/IOC 18-2007 und 556±10 µg/L für die Kombination DV10/BC festgestellt. Die Analyse der Einzelsubstanzen ordnete den Beitrag des signifikanten Einflusses der Grundwein-Hefe auf die Vorläufer der C₆-Alkohole insgesamt absteigend den Substanzen (*Z*)-3-Hexen-1-ol (F-Wert 23,27), *n*-Hexanol (F-Wert 20,07) und (*E*)-2-Hexen-1-ol (F-Wert 5,49) zu. Der Einfluss auf die Freisetzung der aromatischen Alkohole wurde Benzylalkohol (F-Wert 11,81) zugewiesen. Die Auswahl der Sekthefe verursachte bei zu Gruppen summierten Vorläufern, ausgenommen die flüchtigen Phenole, keinen nachweisbaren signifikanten Einfluss. Bei Betrachtung der Einzelsubstanzen stellten sich allerdings Effekte heraus, wie beispielsweise auf den Monoterpen-Vorläufer α -Terpineol (F-Wert 3,5) oder den Vorläufer des aromatischen Alkohols 2-Phenylethanol (F-Wert 10,9).

Die durch deutliche Signifikanzen erwiesene Abgrenzung der Säurehydrolyse-Kontrollen von den regulären Hefe-Varianten unterstrich auch für die Riesling-Sekte eine Beteiligung der Hefen an der Freisetzung der Aromavorläufer, hier insbesondere auf Monoterpene (F-Wert 5,55), C₁₃-Norisoprenoide (F-Wert 16,47) und aromatische Alkohole (F-Wert 59,05). Die absoluten Gehalte noch gebundener Vorläufer lagen unter Hefeeinwirkung geringer, beispielsweise fanden sich in den Varianten nach Ganztraubenpressung unter ausschließlicher Säurewirkung im Mittel noch 171±5 µg/L gebundene C₁₃-Norisoprenoide, bei Hefeeinsatz war dieser Gehalt auf 136±8 µg/L reduziert. Von den aromatischen Alkoholen lagen in den Säurehydrolyse-Kontrollen noch 533±10 µg/L bzw. in den Hefe-Varianten im Mittel noch 445±16 µg/L glycosyliert vor. Ähnlich für die Standzeit-Varianten, beispielsweise die C₁₃-Norisoprenoide betreffend reduzierten sich die Gehalte von 292±13 µg/L unter Säureeinfluss auf 231±8 µg/L in den Hefe-Varianten. Die statistische Auswertung der glycosylierten Einzelsubstanzen zeigte ebenfalls deutlich die Abgrenzung von Säurehydrolyse und Hefewirkung, beispielsweise anhand Vorläufern des C₆-Alkohols (*E*)-2-Hexen-1-ol (F-Wert 8,16), des aromatischen Alkohols Benzylalkohol (F-Wert 87,87) oder des Monoterpens α -Terpineol (F-Wert 5,90). Insbesondere die Beispiele der Monoterpen-Vorläufer Linalool (F-Wert 336,59) sowie der Linalooloxide zeigen allerdings erneut das Problem der möglichen statistischen Überinterpretation durch Betrachtung der Einzelsubstanzen geringer Konzentration auf. Diese waren in den Hefe-Varianten gänzlich freigesetzt worden, in den Säurehydrolyse-Kontrollen aber noch in geringen Konzentrationen vorhanden, was in der Auswertung zu sehr hohen F-Werten und damit vergleichsweise zu hoher Wichtigung führt. Ein anderes Beispiel ist das C₁₃-Norisoprenoid 3-Hydroxy-beta-Ionol (F-Wert 1836,36), welches in allen Säurehydrolyse-Kontrollen deutlich geringer vorlag als in den Hefe-Varianten und dadurch begründet statistisch als hoch beeinflusst eingestuft wurde.

Insgesamt schienen die Hefen einen signifikanten Beitrag zur Hydrolyse der Aromastoffvorläufer zu leisten, dabei allerdings in vergleichsweise geringem Maß und innerhalb der Gattung *Saccharomyces* kaum unterschiedlich.

Der Einsatz des Enzympräparates AR2000 wirkte sich auf die Aromastoffvorläufer aller Substanzgruppen höchst signifikant aus, unterstützt durch die vergleichsweise sehr hohen F-Werte wie beispielsweise für C₆-Alkohole mit einem Wert von 1572,94, für Monoterpene mit 34,68 oder aromatische Alkohole mit 180,12. Der höchst signifikante Einfluss bestand auf nahezu alle Einzelsubstanzen, ebenfalls gestützt durch sehr hohe F-Werte. Insbesondere auf die glycosylierten C₆-Alkohole wie beispielsweise (*Z*)-3-Hexen-1-ol (F-Wert 554,81) aber auch auf Monoterpene wie z.B. Nerol (F-Wert 23,34) und Geraniol (F-Wert 85,11), C₁₃-Norisoprenoide wie 3-Hydroxy-beta-Damascon (F-Wert 62,89) oder 3-Hydroxy-beta-Ionol (F-Wert 135,2) sowie die aromatischen Alkohole Benzylalkohol (F-Wert 90,87) und 2-Phenylethanol (F-Wert 381,72). Die erhöhte Freisetzung der Vorläufer durch das Glycosidase-aktive Enzympräparat verdeutlichten auch deren absolute finale Gehalte in den Sekten. Für die Varianten aus Ganztraubenpressung reduzierte das Enzym beispielsweise die glycosylierten C₆-Alkohole im Mittel von 64±3 µg/L auf 36±1 µg/L, die Vorläufer der Monoterpene von 50±4 µg/L auf 42±3 µg/L und von den aromatischen Alkoholen lagen nach Enzymeinsatz noch 360±14 µg/L zu im Vergleich bei ausschließlicher Hefewirkung von 445±16 µg/L gebunden vor. Ähnlich für die Varianten aus der Standzeit, hier wurden im Mittel die Vorläufer der C₆-Alkohole von 46±2 µg/L auf 16±1 µg/L, die der Monoterpene von 101±8 µg/L auf 76±7 µg/L und die der aromatischen Alkohole von 522±11 µg/L auf 413±7 µg/L durch Enzymanwendung verringert. Desweiteren sehr bedeutsam auf die Aromavorläufer-Gehalte aller Substanzgruppen zeigte sich die Traubenverarbeitung mittels Ganztraubenpressung oder einer Standzeit von 24 Stunden. Beispielsweise wirkte sich diese höchst signifikant auf die Monoterpen-Vorläufer aus, insbesondere auch auf geruchsaktive Substanzen wie Nerol (F-Wert 330,50) oder Geraniol (F-Wert 318,76). Weiterhin bestand ein großer Einfluss auf die C₆-Alkohole wie (*Z*)-3-Hexen-1-ol (F-Wert 84,57) und n-Hexanol (F-Wert 882,26) oder den aromatischen Alkohol-Vorläufer 2-Phenylethanol (F Wert 142,92).

Tab. 4-26: Multifaktorielle Varianzanalyse über die Riesling-Sekte aus 2013. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a. Einfaktorielle Analyse für den Einfluss der Säurehydrolyse^b.

Varianzquelle	Hefe Wein	Hefe Sekt	Enzym	Traubenmat.	Säurehydrolyse ^b
Freiheitsgrade	1	2	1	1	1
glyk. C₆-Alkohole					
Z-3-Hexen-1-ol	23,27 ***	1,40	554,87 ***	84,57 ***	4,46 *
E-2-Hexen-1-ol	5,49 *	0,94	673,40 ***	0,82	8,16 **
n-Hexanol	20,07 ***	3,13	1218,94 ***	882,26 ***	2,63
Summe glyk. C ₆ -Alkohole	25,78 ***	1,31	1572,94 ***	523,05 ***	4,20 *
glyk. Monoterpene					
trans-Linalooloxid (fur)	0,12	4,78 *	1,50	10,60 **	263,90 ***
cis-Linalooloxid (fur)	0,38	2,52	1,52	72,14 ***	117,52 ***
trans-Linalooloxid (pyr)	0,80	4,83 *	0,14	180,35 ***	42,29 ***
cis-Linalooloxid (pyr)	-	-	-	-	9,55 **
Z-8-Hydroxylinalool	2,82	0,15	207,06 ***	35,20 ***	14,38 ***
E-8-Hydroxylinalool	1,53	0,80	9,07 **	9,07 **	0,20
Linalool	-	-	-	-	336,59 ***
α-Terpineol	0,04	3,50 *	3,17	526,78 ***	5,90 *
Nerol	1,09	1,84	23,34 ***	330,50 ***	0,65
Geraniol	0,15	0,31	85,11 ***	318,76 ***	0,25
3,7-Dimethyl-1,5-Octadien-3,7-diol	1,48	0,71	2,78	0,55	1,25
Summe glyk. Monoterpene	0,7	2,11	34,68 ***	210,76 ***	5,55 *
glyk. C₁₃-Norisoprenoide					
3-Hydroxy-beta-Damascon	0,05	3,91 *	62,89 ***	8,88 **	28,16 ***
3-Hydroxy-beta-Ionol	0,43	0,01	135,20 ***	82,27 ***	1836,36 ***
3-Oxo-alpha-Ionol	0,18	1,37	16,61 ***	439,03 ***	5,33 *
3-Hydroxy-7,8-didehydro-β-ionol	0,19	0,54	72,24 ***	177,56 ***	7,30 **
3-Oxo-7,8-dihydro-alpha-Ionol	0,22	0,54	21,53 ***	281,16 ***	0,001
3-Hydroxy-7,8-dihydro-β-Ionol	0,24	1,06	78,29 ***	1,85	0,12
Summe glyk. C ₁₃ -Norisoprenoide	0,12	1,68	40,92 ***	146,63 ***	16,47 ***
glyk. aromatische Alkohole					
Benzylalkohol	11,81 ***	3,79 *	90,87 ***	45,32 ***	87,87 ***
2-Phenylethanol	0,30	10,9 ***	381,72 ***	142,92 ***	1,61
Summe glyk. aromat. Alkohole	11,95 ***	1,96	180,12 ***	82,54 ***	59,05 ***
glyk. flüchtige Phenole					
4-Vinylguaicol	0,00	5,95 **	3,26	92,77 ***	4,75 *

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Muskateller

Für den Muskateller beschränken sich die Einflussfaktoren auf den Einfluss der Hefen bzw. Hefestammkombination und den Einsatz des durch signifikant erhöhte Glycosidase-Aktivität charakterisierten Enzympräparates AR2000. Der Einfluss der Hefen kann an dieser Stelle vollfaktoriell analysiert werden. Der Beitrag der Säurehydrolyse zur Freisetzung der Aromavorläufer über die Zeit der zweiten Gärung wurde mittels Kontroll-Varianten ohne Hefezugabe untersucht.

Die folgende Hauptkomponentenanalyse fasst den Einfluss aller Faktoren auf die glycosidisch gebundenen Aromastoffe der Sekt-Varianten zusammen. Die Ergebnisse der

noch gebunden vorliegenden Aromastoffe in den Sekten sind auf die Hauptkomponenten 1 und 2 projiziert und erklären insgesamt 94,22% des Gesamtdatensatzes. Die Aromastoffvorläufer sind als Faktorladungen im rechten Bild dargestellt, die Sekte als Faktorwerte im linken Bild (s. Abb. 4-46). Die Rebsorte Muskateller ist insgesamt durch sehr hohe Gehalte glycosidisch gebundener Vorläufer, insbesondere der Monoterpene, charakterisiert. In diesem Versuchsteil wurde von nur einer Trauben- bzw. Mostvariante ausgegangen. Es wird ersichtlich, dass zunächst alle Sekte der unter dem ausschließlichen Einfluss der verschiedenen Hefestamm-Kombinationen stehenden Varianten zu den Vorläufern der Monoterpene, aromatischen Alkohole und C₆-Alkohole gruppiert projiziert werden und sich dabei kaum anhand der Hauptkomponenten differenzieren lassen. Eine Differenzierung der Sekte erfolgt aufgrund des Enzymeinsatzes an der aussagekräftigeren Hauptkomponente 1 (84,8%) in Gegenrichtung zu noch gebundenen Aromastoffvorläufern. Diese Darstellung unterstreicht damit den hohen Beitrag des Enzyms an der Freisetzung der Aromastoffe während der zweiten Gärung.

Anhand der mit geringerem Erklärungswert ausgezeichneten Hauptkomponente 2 (9,4%) erfolgt die Differenzierung der regulären Hefevarianten ohne Enzymeinsatz und der Säurehydrolyse-Kontrollen (Sre). Diese finden sich von den unter Hefe-Einfluss stehenden Varianten abgegrenzt durch die Projektion zu gebundenen C₁₃-Norisoprenoiden und flüchtigen Phenolen.

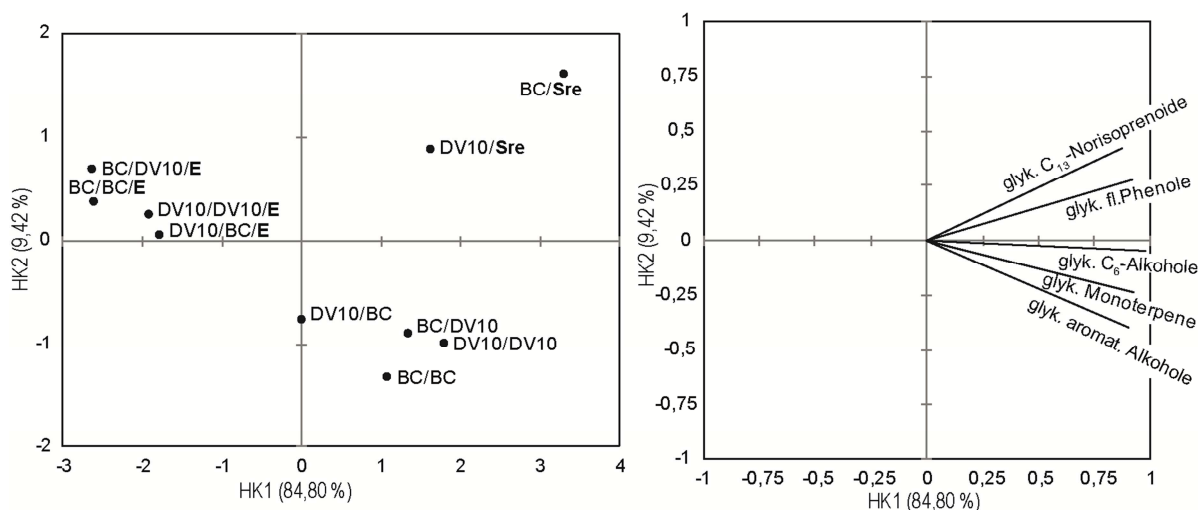


Abb. 4-46: Einfluss von Hefestamm, Enzymeinsatz (E) und Säurehydrolyse (Sre) auf die gebundenen Aromastoffvorläufer in den Muskateller-Sekten. Hauptkomponentenanalyse, Projektion der Faktorwerte der Riesling-Sekte (links) und der Ladungen der gebundenen Aromastoffe (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

Mittels Multifaktorieller Varianzanalyse wurden die Einflüsse der unabhängigen Variablen Grundweinhafe, Sekthefe, Enzymeinsatz sowie die Interaktion von Sektgrundweinhafe und Sekthefe untersucht. Der Einfluss der sauren Hydrolyse wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse berechnet, da die entsprechenden Kontroll-Proben mit dem vorherigen Datensatz nicht vergleichbar waren (s. Tab. 4-27). Die statistische Analyse ergab bei zu Gruppensummen zusammengefasster Auswertung keinen von Grundweins- oder Sekthefe beziehungsweise durch deren Interaktion bedingten Einfluss auf die Freisetzung glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer. Bei Auswertung der Einzelsubstanzen wurden Auswirkungen deutlich, beispielsweise auf den Monoterpen-Vorläufer cis-Linalooloxid (pyranoid) oder die gebundenen C₁₃-Norisoprenoide 3-Oxo-alpha-Ionol (F-Wert 5,06) und 3-Hydroxy-7,8-didehydro-β-ionol (F-Wert 4,52), welche aber durch die geringen F-Werte

vergleichsweise wenig Bedeutung aufwiesen. Die Interaktion zwischen Grundwein- und Sekthefer zeigte sich auf die Freisetzung der Monoterpenvorläufer Nerol (F-Wert 5,38) sowie Geraniol (F-Wert 6,84) signifikant. Am Beispiel des Monoterpen-Vorläufers Linalool (F-Wert 53,32) verdeutlichte sich erneut die Problematik der statistischen Überinterpretation. Die Substanz war, in absoluten Gehalten, im geringen Konzentrationsbereich zwischen $0,9 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ der Hefekombination DV10/BC bis $2,7 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ der Kombination BC/BC nachweisbar, trotzdem erhielt sie eine deutliche statistisch hohe Wichtung.

Trotz des geringen Hefe-Einfluss und marginalen Unterschieden zwischen den einzelnen Stämmen schienen die Hefen an der Freisetzung der Aromastoffe beteiligt zu sein, da sie sich signifikant von den Säurehydrolyse-Kontrollen abgrenzen liessen, für den Muskateller die Vorläufer der C_6 -Alkohole (F-Wert 6,09), C_{13} -Norisoprenoide (F-Wert 74,39) und flüchtigen Phenole (F-Wert 24,36) betreffend, zudem durch die zahlreich signifikant beeinflussten Einzelsubstanzen unterstrichen. Die Hefe-Varianten waren in den absoluten Gehalten gegenüber den Säurehydrolyse-Kontrollen in den betreffenden Substanzgruppen durch geringere Vorläuferkonzentrationen charakterisiert, wodurch auf deren zusätzliche Freisetzung geschlossen werden konnte. Die Auswirkung auf die Vorläufer der C_6 -Alkohole blieb vergleichsweise gering, in den Säurehydrolyse-Kontrollen fanden sich im Mittel $51 \mu\text{g} \pm 5 \mu\text{g/L}$ in noch gebundener Form, während der Gehalt für die Hefe-Varianten bei $49 \pm 6 \mu\text{g/L}$ lag. Für gebundene C_{13} -Norisoprenoide war der Unterschied deutlich, es fanden sich im Mittel in den Säurehydrolyse-Kontrollen noch $310 \pm 50 \mu\text{g/L}$, während der Gehalt durch Hefewirkung bei verringerten $175 \pm 18 \mu\text{g/L}$ lag. Für die Gesamtsumme der Monoterpen-Vorläufer war statistisch kein Unterschied zwischen den Säure- und Hefe-Varianten erkennbar, allerdings spezifisch auf die Einzelsubstanzen Linalool, Geraniol und Nerol. Die primären Terpenalkohole Nerol und Geraniol waren durch die Hefe stärker freigesetzt worden, bei im Mittel über alle Hefen von $59 \pm 21 \mu\text{g/L}$ für Nerol bzw. $71 \pm 48 \mu\text{g/L}$ für Geraniol während die Kontrollvarianten mit ausschließlichem Säure-Einfluss noch bei $87 \pm 15 \mu\text{g/L}$ bzw. $120 \pm 21 \mu\text{g/L}$ lagen. Der tertiäre Terpenalkohol Linalool, obwohl nur in geringer Konzentration vorhanden, wurde demgegenüber durch Säure stärker freigesetzt, da in den Hefevarianten im Mittel noch $1,3 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ gegenüber den Säure-Kontrollen bei $0,8 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ feststellbar war. Das ist möglicherweise ein weiterer Hinweis auf den selektiven Einfluss der Enzymaktivität der Hefe.

Eindeutig jedoch war der Einfluss des Enzympräparates AR2000. Es wirkte sich höchst signifikant auf die Aromavorläufer aller Substanzgruppen aus, beispielsweise auf die Vorläufer der C_6 -Alkohole (F-Wert 257,51), Monoterpene (F-Wert 71,44) und aromatischen Alkohole (F-Wert 94,54), damit zusätzlich unterstrichen durch sehr hohe F-Werte. Die Auswirkungen des Enzyms schlossen dabei nahezu alle Einzelsubstanzen ein, insbesondere auch geruchsaktiven Stoffe wie den C_6 -Alkohol-Vorläufer (*Z*)-3-Hexen-1-ol (F-Wert 330,93), die gebundenen Monoterpene Linalool (F-Wert 54,67) Nerol (F-Wert 69,38) und Geraniol (F-Wert 234,82) sowie den aromatischen Alkohol-Vorläufer 2-Phenylethanol (F-Wert 53,04). Das hoch Glycosidase-aktive Enzym aus *Aspergillus niger* hatte zu einer deutlichen weiteren Freisetzung der Aromastoffvorläufer geführt. Die gebundenen C_6 -Alkohole wurden durch Enzymeinsatz im Mittel von $49 \pm 6 \mu\text{g/L}$ bei ausschließlicher Aktivität der Hefen auf $9 \pm 1 \mu\text{g/L}$ verringert, die Vorläufer der Monoterpene von $372 \pm 37 \mu\text{g/L}$ bei Hefewirkung auf $211 \pm 8 \mu\text{g/L}$ durch Enzym sowie die C_{13} -Norisoprenoide von $175 \pm 18 \mu\text{g/L}$ der Hefe-Varianten auf $148 \pm 8 \mu\text{g/L}$ durch Verwendung des Enzyms und die aromatischen Alkohole reduzierten sich durch das Enzym von $367 \pm 26 \mu\text{g/L}$ der Hefe-Varianten auf $226 \pm 12 \mu\text{g/L}$. Eine geringfügige Abnahme von $4,3 \pm 0,5 \mu\text{g/L}$ bei Hefewirkung auf $3,4 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ durch Enzymeinsatz war für

den Vorläufer des flüchtigen Phenols 4-Vinylguaiacol feststellbar. Damit konnte die gegenüber den *Saccharomyces*-Hefen deutlich erhöhte Freisetzungstätigkeit des Enzyms demonstriert werden.

Tab. 4-27: Multifaktorielle Varianzanalyse über die Muskateller-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a. Einfaktorielle Analyse für den Einfluss der Säurehydrolyse^b.

Varianzquelle	Hefe Wein	Hefe Sekt	Hefe W.*Hefe S.	Enzym	Säurehydrolyse ^b
Freiheitsgrade	1	1	1	1	
glyk. C₆-Alkohole					
Z-3-Hexen-1-ol	2,94	1,24	0,69	330,93 ***	5,28 *
E-2-Hexen-1-ol	0,04	3,35	0,86	267,83 ***	4,45 *
n-Hexanol	2,00	3,43	3,90	154,55 ***	9,19 **
Summe glyk. C ₆ -Alkohole	1,21	2,95	1,79	257,51 ***	6,09 *
glyk. Monoterpene					
trans-Linalooloxid (fur)	0,14	1,58	0,63	1,68	10,20 **
cis-Linalooloxid (fur)	0,34	2,51	0,19	0,80	7,35 **
trans-Linalooloxid (pyr)	1,02	0,37	0,13	6,07 *	0,54
cis-Linalooloxid (pyr)	4,28 *	4,37 *	2,22	2,61	0,80
Z-8-Hydroxylinalool	0,25	0,13	0,009	137,37 ***	0,13
E-8-Hydroxylinalool	0,06	0,17	0,003	147,07 ***	0,00
Linalool	53,32 ***	0,00	2,40	54,67 ***	7,73 **
α-Terpineol	5,1 *	2,85	1,81	0,006	3,79
Nerol	0,11	0,58	5,38 *	69,38 ***	9,63 **
Geraniol	1,39	0,66	6,84 *	234,82 ***	6,13 *
3,7-Dimethyl-1,5-Octadien-3,7-diol	0,02	1,24	0,32	0,86	32,24 ***
Summe glyk. Monoterpene	0,51	0,55	1,99	71,44 ***	3,87
glyk. C₁₃-Norisoprenoide					
3-Hydroxy-beta-Damascon	0,19	1,81	0,04	30,70 ***	106,66 ***
3-Hydroxy-beta-Ionol	0,06	3,04	0,15	139,95 ***	174,03 ***
3-Oxo-alpha-Ionol	1,30	5,06 *	0,00	0,25	99,54 ***
3-Hydroxy-7,8-didehydro-β-ionol	0,59	4,52 *	0,19	11,62 **	2,15
3-Oxo-7,8-dihydro-alpha-Ionol	0,61	4,17	0,33	5,52 *	31,27 ***
3-Hydroxy-7,8-dihydro-β-Ionol	1,57	2,91	0,21	5,93 *	26,08 ***
Summe glyk. C ₁₃ -Norisoprenoide	0,73	3,68	0,002	8,54 **	74,39 ***
glyk. aromatische Alkohole					
Benzylalkohol	2,73	0,03	0,26	99,43 ***	0,70
2-Phenylethanol	0,58	0,87	3,24	53,04 ***	2,14
Summe glyk. aromat. Alkohole	2,18	0,18	0,87	94,54 ***	1,02
glyk. flüchtige Phenole					
4-Vinylguaiacol	1,85	1,90	0,28	14,95 ***	24,36 ***

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

4.5.2.2 Sensorische Analyse

Mittels deskriptiver Analyse und anschließender statistischer Auswertung mittels *mixed model* multifaktorieller Varianzanalyse erfolgte die sensorische Beurteilung der Weine. Die weinchemischen Routine-Parameter wurden mittels FT-MIR bestimmt (Werte s. Anhang) und gewährleisteten, wenn nicht anders angegeben, die Vergleichbarkeit der Weine.

Chardonnay

Die Chardonnay-Sekte waren durch die unabhängigen Faktoren der Grundwein- und Sektheefe sowie Enzymeinsatz und Klon-Variante beeinflusst. Die multifaktorielle *mixed model* Varianzanalyse (s. Tab. 4-28) ergab einen geringen Einfluss der Hefen auf die olfaktorischen Deskriptoren der sensorischen Analytik, allein die Auswahl der Grundweinhefe wirkte sich signifikant auf die Attribute Zitrusfrüchte, blumig und Honig aus. Die Wahrnehmung des fruchtigen, süßen und bitteren Geschmacks sowie des Gesamteindrucks Frische konnten durch die Auswahl der Grundweinhefe dagegen signifikant modifiziert werden, was auch durch vergleichsweise hohe F-Werte unterstrichen wurde. Allerdings ist die Wirkung auf geschmackliche und haptische Deskriptoren nicht durch flüchtige Aromastoffe nach deren Freisetzung aus der glycosidischen Bindung verursacht. Der Einsatz der Glycosidase AR2000 dagegen wirkte sich höchst signifikant auf die erhöhte Wahrnehmung der Attribute frischer Apfel, gelbe Früchte, Honigmelone, blumig, grünes Gras und Honig aus, was wiederum das erhöhte Freisetzungsvermögen des Enzyms gegenüber den *Saccharomyces*-Hefen zeigt. Diese Signifikanzen werden auch durch die Höhe der F-Werte unterstützt. Der Einfluss der Klon-Variante beschränkte sich ausschließlich auf die Farbe, welche im Duftklon signifikant hochfarbiger beurteilt wurde.

Tab. 4-28: Multifaktorielle *mixed model* Varianzanalyse der Ergebnisse der deskriptiven Analyse der Chardonnay-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a.

Varianzquelle	Hefe Wein	Hefe Sekt	Enzym	Klon-Variante
FG	1	1	1	1
Optische Deskriptoren				
Farbintensität	0,005	0,76	0,25	87,78 ***
Olfaktorische Deskriptoren				
Zitrusfrüchte	9,80 **	1,18	0,83	0,01
frischer Apfel	2,10	1,89	9,70 **	2,92
gelbe Früchte	0,93	0,41	34,89 ***	5,08 *
Honigmelone	0,04	1,58	15,05 ***	2,18
blumig	3,89 *	0,62	20,31 ***	0,35
grün, grasig, Heu	0,01	0,70	4,56 *	0,01
Honig	5,94 *	1,49	12,34 ***	0,03
hefig	0,81	0,41	0,40	5,4 *
Geschmackliche und haptische Deskriptoren				
fruchtig	22,91 ***	0,63	0,11	0,08
Säure	0,13	0,89	0,008	1,34
Süße	7,1 **	1,26	0,006	3,36
bitter	9,02 **	0,27	0,50	1,08
weiches Mungefühl	2,66	0,51	0,41	0,13
Gesamteindruck Frische	20,01 ***	0,38	10,32 ***	2,17

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die Hauptkomponentenanalyse der Chardonnay-Sekte und der sensorischen Deskriptoren bildet auf den Hauptkomponenten 1 und 2 62,6% der Gesamtvarianz ab (s. Abb. 4-47). Es wurde zunächst deutlich, dass die Klon-Varianten nicht voneinander diskriminiert werden. Die Betrachtung der Sekte aus der Herstellung mit den verschiedenen Kombinationen aus Grundwein- und Sekthefen zeigte, dass unabhängig der Klon-Variante die Hefekombination BC/BC von allen anderen Kombinationen sowohl durch Hauptkomponente 1 (37,8%) als

auch Hauptkomponente 2 (24,8%) abgegrenzt wurde. Während diese Kombination dominierend durch hefig, sonst verhalten beschrieben wurde, wurden die Sekte der Kombinationen DV10/IOC sowie DV10/BC als frisch, fruchtig und Geruch nach Zitrus sowie ein weiches Mundgefühl beschrieben. Die unter Enzymeinsatz vergorenen Sekte wurden, im Vergleich zu den Sekten ohne Enzym, ebenfalls diskriminiert und anhand beider Hauptkomponenten vor allem in Richtung blumig, gelbe Früchte und Honigmelone verschoben. Damit erfolgt durch den Einsatz des Aromaenzym nicht nur eine Intensivierung der olfaktorischen Deskriptoren, sondern auch eine Veränderung des Aromaprofils insgesamt von frischen, durch Zitrus geprägten Sekten zu eher reifen, vollen und dabei gelben und blumigen Varianten.

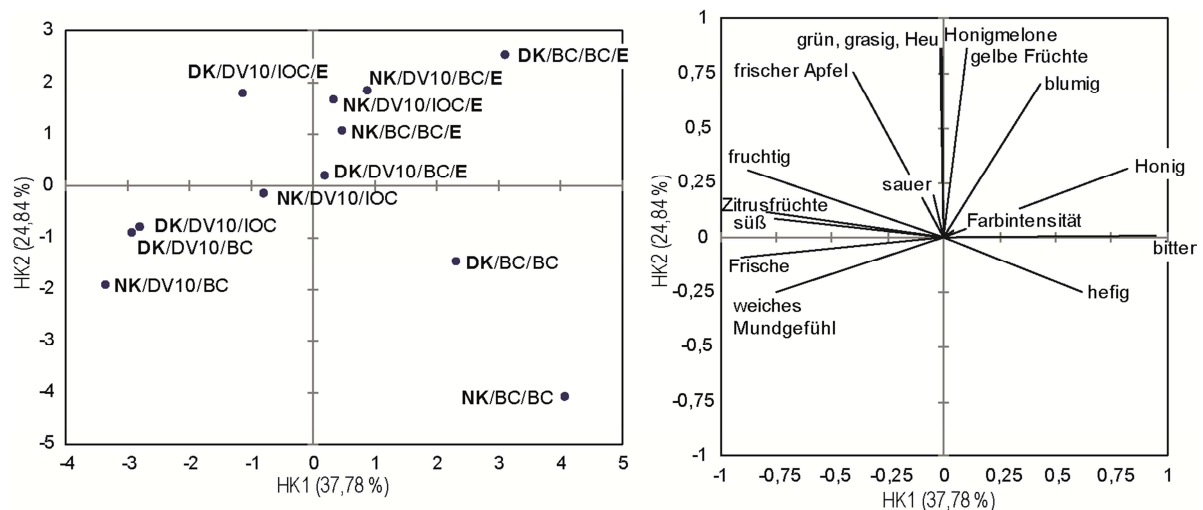


Abb. 4-47 Einfluss von Hefestamm, Enzymeinsatz (E) und Klon-Variante (NK Normalklon, DK Duftklon) auf die Sensorik der Chardonnay-Sekte. Hauptkomponentenanalyse der sensorischen Merkmale und der Sektvarianten, Projektion der Faktorwerte der Chardonnay-Sekte (links) und der Ladungen der sensorischen Merkmale (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

Der Einfluss des Faktors Hefe, einfaktoriell betrachtet, zeigt den Unterschied der Sekt-Variante BC/BC gegenüber den beiden Kombinationen DV10/BC und DV10/IOC 18-2007 (s. Abb. 4-48). Der Sekt dieser Kombination wurde unabhängig der Klon-Variante und ausgenommen der Wahrnehmung von Honig, als signifikant weniger intensiv in den olfaktorischen Attributen sowie der Fruchtigkeit und Frische bewertet. Die Sekte der Kombinationen DV10/BC und DV10/IOC 18-2007 unterschieden sich hingegen nur marginal.

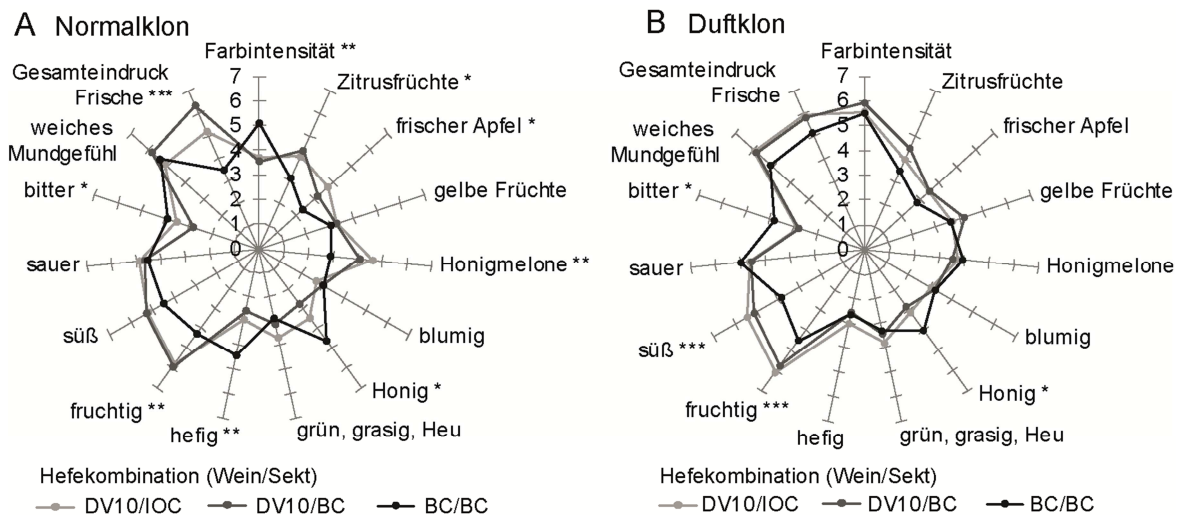


Abb. 4-48: Deskriptive sensorische Analyse der Chardonnay-Sekte, unterschieden nach den Klon-Varianten Normalklon (A) und Duftklon (B) unter Einfluss der Hefen DV10, BC und IOC 18-2007. (n=16 Pr. x 2 Wdhg, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Riesling 2012

Die Riesling-Sekte aus 2012 waren ausschließlich durch die unabhängigen Faktoren der Grundwein- und Sektheefe beeinflusst, die Kombination der Hefeauswahl erlaubte an dieser Stelle die Analyse der Interaktion von Grundwein- und Sektheefe. Im Vergleich zu den Sekten aus 2013 unterscheiden sich die Sekte aus 2012 durch eine verkürzte zweite Gärung von vier Monaten, was in einer geringer andauernden Kontaktzeit mit der Hefe und dem verringerten Einfluss der Säurehydrolyse resultiert. Für diesen Versuchsteil liegen allerdings keine Säurehydrolyse- oder Enzym-Varianten vor. Desweiteren sind in 2012 zum Teil andere sensorische Deskriptoren abgefragt worden, wodurch die Vergleichbarkeit mit den Sekten aus 2013 nur eingeschränkt gegeben ist.

Die multifaktorielle *mixed model* Varianzanalyse (s. Tab. 4-29) ergab für die in viermonatiger zweiter Gärung hergestellte Riesling-Sekte ebenfalls einen nur geringen Einfluss der Hefestammstämme bzw. deren Kombination in der ersten und zweiten Gärung auf die olfaktorischen Deskriptoren der fertigen Sekte. Ein signifikanter Einfluss der Grundwein-Hefe bestand auf die Attribute Apfel und Pfirsich, die Wahl der Sektheefe zeichnete sich für die Intensität der Wahrnehmung des Attributes Zitrusfrüchte und blumig verantwortlich. Auf die geschmackliche Beurteilung der Sekte dagegen bestanden sowohl durch die Grundwein- als auch durch die Sekthefen signifikante Unterschiede zwischen den Sekten, deutlich auch anhand der vergleichsweise höheren F-Werte, welche die gesteigerte Bedeutung dieser Unterschiede unterstreichen, wie beispielsweise für die Bewertung der Fruchtigkeit (F-Wert Grundweinhefe 21,3 bzw. Sekt 13,9). Durch die Interaktion von Grundwein- und Sektheefe wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sekten festgestellt.

Tab. 4-29: Multifaktorielle *mixed model* Varianzanalyse der Ergebnisse der deskriptiven Analyse der Riesling-Sekte aus 2012. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a.

Varianzquelle	Hefe Wein	Hefe Sekt	Hefe Wein*Hefe Sekt
FG	1	1	1
Optische Deskriptoren			
Farbintensität	0,07	0,06	0,06
Olfaktorische Deskriptoren			
Zitrusfrüchte	0,77	14,06 ***	0,39
Apfel	4,90 *	0,70	0,15
Pfirsich	3,99 *	2,66	1,76
Honigmelone	0,02	1,03	0,01
blumig	0,38	5,74 *	1,18
rauchig	3,35	1,21	0,38
grünes Gras	0,07	3,41	1,36
Geschmackliche und haptische Deskriptoren			
fruchtig	21,28 ***	13,93 ***	0,13
Säure	8,71 **	4,76 *	0,11
Süße	22,54 **	5,57 *	0,001
bitter	4,59 *	0,001	0,02
hartes Mundegefühl	6,52 *	4,62 *	0,47

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Der Einfluss des Faktors Hefekombination insgesamt, einfaktoriell betrachtet, wirkte sich signifikant auf die olfaktorischen Deskriptoren Zitrusfrüchte und Pfirsich in den fertigen Sekten aus, wodurch diese sich unterscheiden (s. Abb. 4-49). Deutliche Unterschiede wurden in der geschmacklichen Beurteilung, insbesondere des Attributes fruchtig, sowie in der Wahrnehmung des Mundgefühls festgestellt. Speziell der mit Hefekombination U228/U228 hergestellte Sekt wurde in der geruchlichen Beurteilung sowie in der Fruchtigkeit als gering intensiv, dafür durch ein vergleichsweise hartes Mundgefühl beschrieben. Im Gegensatz dazu stand der Sekt aus der Kombination RC212/RC212, dieser wurde als fruchtigster und aromaintensivster Sekt eingestuft.

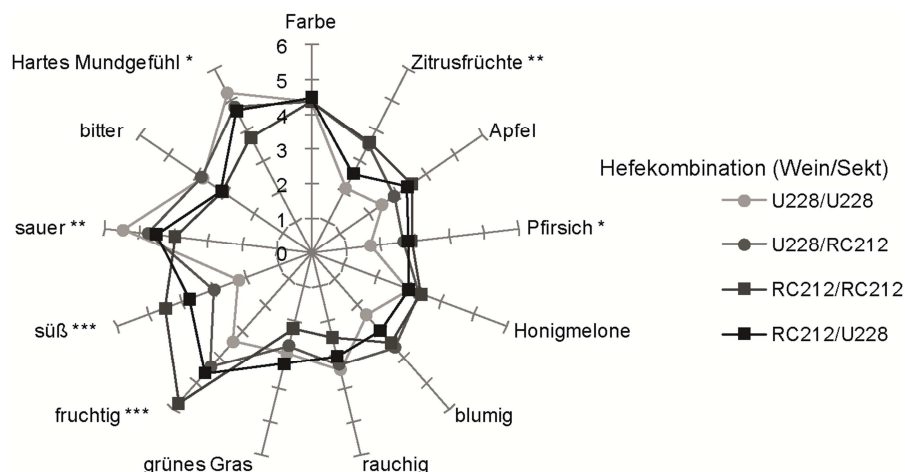


Abb. 4-49: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Sekte der verschiedenen Kombinationen der Hefestämme U228 und RC212.

($n=18$ Pr. x 2 Wdhg, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Riesling 2013

Die Riesling-Sekte waren den unabhängigen Faktoren Grundwein- und Sekthefer sowie Enzymeinsatz und Traubenverarbeitung ausgesetzt. Die multifaktorielle *mixed model* Varianzanalyse (s. Tab. 4-30) ergab einen sehr geringen Einfluss der Hefen auf das Sektaroma. Die olfaktorischen Deskriptoren betreffend, war ausschließlich ein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Grundweinhefen (F-Wert 4,31, $p < 0,05$) sowie der Sekthefen (F-Wert 9,14, $p < 0,01$) auf das Attribut blumig feststellbar. Da sich flüchtige Aromastoffe vor allem auf die geruchliche Wahrnehmung auswirken, deutet auch dieses Ergebnis auf relativ geringe Unterschiede im Aroma-Freisetzungspotential der Hefestämme hin. Dagegen wirkte sich die Wahl des Hefestammes in der ersten Gärung auf die geschmackliche Beurteilung der Süße, sowie die Wahl der Sekthefer auf die Wahrnehmung der Säureintensität und des Mundgefühls aus. Durch den Einsatz des Enzympräparates AR2000 wurden die Sekte bezüglich der olfaktorischen Deskriptoren signifikant unterschiedlich zu den nicht enzymierten Sekten bewertet, statistisch durch vergleichsweise hohe F-Werte gestützt. Die Attribute frischer Apfel, gelbe Früchte, Honigmelone, blumig und Honig wurden in diesen Sekten als signifikant intensiver eingestuft, dagegen verursachte das Enzym keine Veränderung in der geschmacklichen oder haptischen Wahrnehmung. Weiterhin bestand auch auf die Sekte ein Einfluss der Traubenverarbeitung. Insbesondere die Farbe (F-Wert 68,3, $p < 0,001$), aber auch die geschmackliche Wahrnehmung der Fruchtigkeit, Säure, Süße und des Mundgefühls wurde signifikant beeinflusst.

Tab. 4-30: Multifaktorielle *mixed model* Varianzanalyse der Ergebnisse der deskriptiven Analyse der Riesling-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a.

Varianzquelle	Hefe Wein	Hefe Sekt	Enzym	Traubenverarbeitung
FG	1	1	1	1
Optische Deskriptoren				
Farbintensität	0,04	0,10	7,05 **	68,28 ***
Olfaktorische Deskriptoren				
Zitrusfrüchte	0,23	1,71	0,57	0,21
Frischer Apfel	2,03	1,38	7,22 **	1,03
Gelbe Früchte	3,47	0,001	9,08 **	1,95
Honigmelone	0,90	0,01	9,49 **	0,18
blumig	4,31 *	9,14 **	27,06 ***	0,00
Grün, grasig, Heu	0,00	0,007	0,21	1,56
Honig	0,70	0,19	18,39 ***	4,96 *
hefig	0,35	2,57	0,51	15,11 ***
Geschmackliche und haptische Deskriptoren				
fruchtig	2,98	0,20	0,65	18,03 ***
Säure	3,36	8,20 **	0,00	4,54 *
Süße	8,10 **	0,33	1,36	63,39 ***
bitter	0,45	0,40	0,18	1,57
Weiches Mungefühl	2,43	3,65 *	1,65	12,87 ***
Gesamteindruck Frische	0,29	0,47	2,47	0,92

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die Hauptkomponentenanalyse der Riesling-Sekte und der sensorischen Deskriptoren bildet auf den Hauptkomponenten 1 und 2 59,4% der Gesamtvarianz ab (s. Abb. 4-50). Für die nicht enzymierten Sekte zeigte sich zunächst eine Diskriminierung aufgrund der Art der Traubenverarbeitung, d.h. zwischen den Ganztraubenpressungen (GTP)- und

Standzeit (StZt)-Varianten, anhand der Hauptkomponente 1 (35,2%). Die Sekte aus dem GTP-Most werden dabei insbesondere durch die Attribute fruchtig, Zitrusfrüchte und Frische beschrieben, während die StZt in den Sekten zu einer verstärkten Wahrnehmung der Säure, Bitterkeit aber auch der Farbe führt. Die verschiedenen verwendeten Hefe-Kombinationen aus den Stämmen DV10, IOC 18-2007 und Siha4 dagegen wurden innerhalb der Traubenverarbeitung kaum getrennt, was wiederum den vergleichsweise geringen Einfluss der *Saccharomyces*-Hefen auf die Freisetzung der Aromavorläufer aus ihrer glycosidischen Bindung verdeutlichte. Die in der zweiten Gärung mit Enzym AR2000 behandelten Sekte konnten im Vergleich zu den nicht enzymierten Sekten anhand Hauptkomponente 2 (24,2%) diskriminiert werden. Die Sekte wurden nicht mehr anhand der Traubenverarbeitung unterschieden und insgesamt vor allem zu den olfaktorischen Deskriptoren wie Honigmelone, Apfel, Honig, blumig und gelbe Früchte projiziert. Als Nebeneffekt war allerdings ein Verlust an Frische, begleitet durch eine verringerte Wahrnehmung des Attributes Zitrusfrüchte, zu verzeichnen. Insgesamt verdeutlichte sich damit die Aromaintensivierung durch das Enzym, einhergehend mit einer ebenfalls praxisrelevanten Stilveränderung der Sekte.

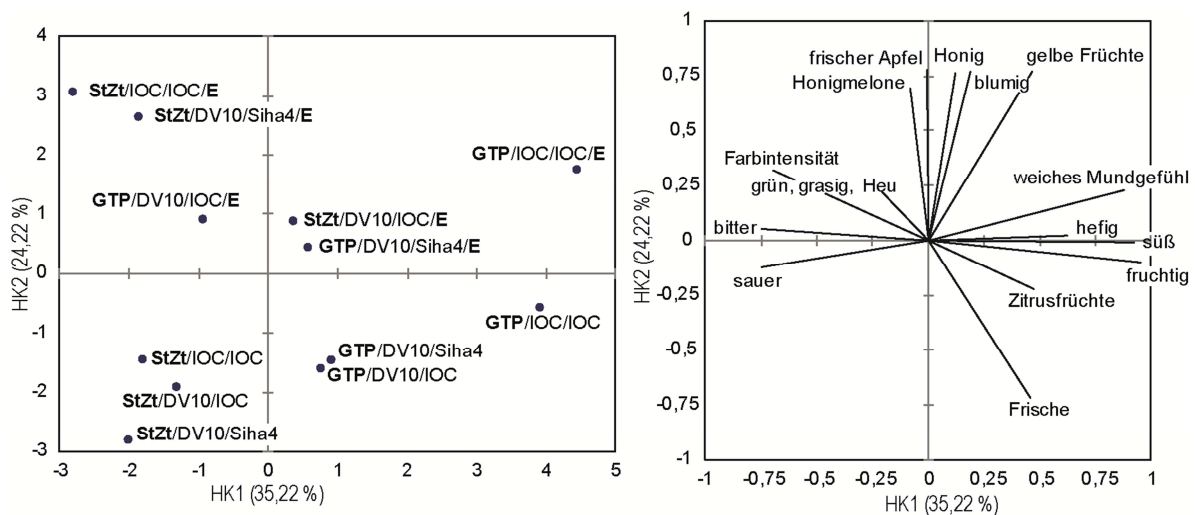
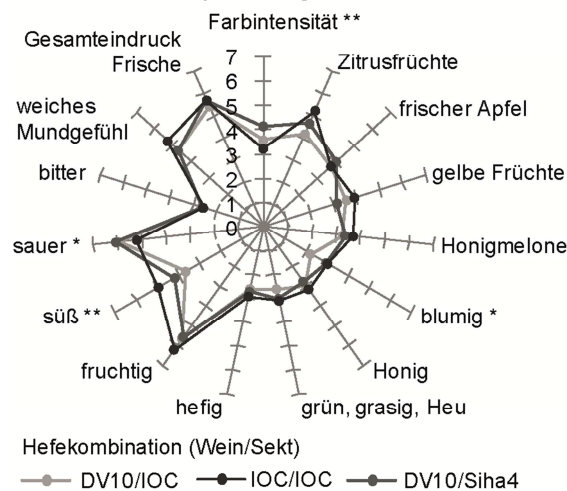


Abb. 4-50: Einfluss von Hefestamm, Enzymeinsatz (E) und Traubenverarbeitung (GTP Ganztraubenpressung, StZt Standzeit 24 h) auf die Sensorik der Riesling-Sekte. Hauptkomponentenanalyse der sensorischen Merkmale und der Sektvarianten, Projektion der Faktorwerte der Chardonnay-Sekte (links) und der Ladungen der sensorischen Merkmale (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

Den marginalen Einfluss des Faktors Hefe verdeutlicht die einfaktorielle Betrachtung der deskriptiven Sensorik der Sekte (s. Abb. 4-51). Die olfaktorische Wahrnehmung betreffend, bestand für die GTP-Varianten ein signifikanter Einfluss der Hefestammkombination auf das Attribut blumig, vor allem durch die geringere Intensität im Sekt der Hefekombination DV10/IOC 18-2007. Desweiteren bestand Einfluss auf die Süße, Säure sowie die Farbintensität. Für die StZt-Varianten waren ausschließlich leichte Unterschiede in der geschmacklichen Wahrnehmung der Süße, Säure sowie der haptischen Wahrnehmung des Mundgefühls feststellbar. Die vorhandenen Unterschiede zwischen den Sekten fielen zudem absolut betrachtet vergleichsweise gering aus.

A Ganztraubenpressung



B Standzeit

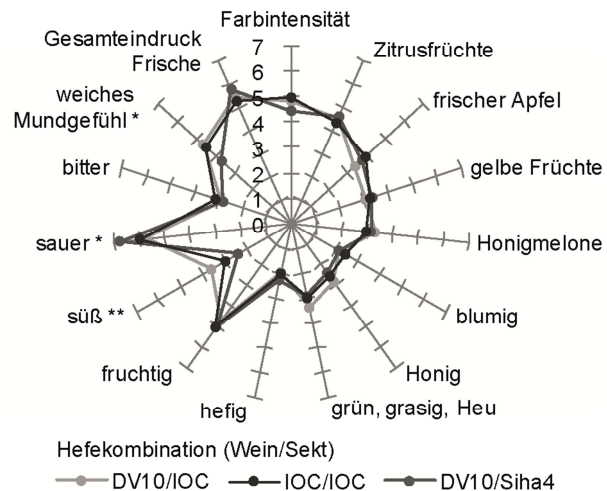


Abb. 4-51: Deskriptive sensorische Analyse der Riesling-Sekte, unterschieden nach Varianten Traubenverarbeitung Ganztraubenpressung (A) und Standzeit 24 h (B) unter Einfluss der Hefestämme DV10, IOC 18-2007 (IOC) und Siha4.

(n=17 Pr. x 2 Wdhg, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Muskateller

Die Muskateller-Sekte waren durch die unabhängigen Faktoren der Grundwein- und Sektheefe sowie den Enzymeinsatz beeinflusst. Durch die Kombination der Hefeauswahl war an dieser Stelle die Analyse der Interaktion von Grundwein- und Sektheefe möglich. Die multifaktorielle *mixed model* Varianzanalyse (s. Tab. 4-31) verdeutlichte auch an dieser Stelle den geringen Einfluss der Auswahl des Hefestammes auf das Sektaroma. Während die Sekte aufgrund von Hefe-Einfluss in der olfaktorische Beurteilung ausschließlich für das Attribut grünes Gras signifikant unterschiedlich waren (F-Wert 4,0, p<0,05), verursachte der Einsatz des Aromaenzym AR2000 eine weitreichende signifikante Intensivierung der Geruchswahrnehmung, zusätzlich verdeutlicht durch vergleichsweise sehr hohe F-Werte. Beeinflusst war insbesondere das Attribut blumig (F-Wert 229,9, p<0,001), zudem die Attribute gelbe Früchte, Honigmelone, Honig und hefig. Die geschmackliche Beurteilung der Sekte war insgesamt gering beeinflusst, allerdings beispielsweise das Mundgefühl durch die Interaktion von Grundwein- und Sektheefe sowie die gesteigerte Wahrnehmung der Fruchtigkeit durch das Enzym.

Tab. 4-31: Multifaktorielle *mixed model* Varianzanalyse der Ergebnisse der deskriptiven Analyse der Muskateller-Sekte. F-Werte und zugehörige Signifikanzniveaus^a.

Varianzquelle	Hefe Wein	Hefe Sekt	Hefe Wein*Hefe Sekt	Enzym
FG	1	1	1	1
Optische Deskriptoren				
Farbintensität	19,09 ***	0,31	0,001	15,86 ***
Olfaktorische Deskriptoren				
Zitrusfrüchte	0,34	0,24	0,09	1,56
Frischer Apfel	0,68	0,97	0,77	0,28
Gelbe Früchte	0,003	0,56	0,09	13,91 ***
Honigmelone	0,04	0,05	0,74	5,30 *
blumig	0,07	1,82	0,02	229,92 ***
Grün, grasig, Heu	4,03 *	0,17	0,13	0,00
Honig	0,007	0,81	0,12	30,08 ***
hefig	0,30	0,48	0,77	12,17 ***
Geschmackliche und haptische Deskriptoren				
fruchtig	0,24	2,76	0,32	10,88 ***
Säure	1,36	0,83	3,84 *	0,22
Süße	0,63	3,56	0,19	1,04
bitter	3,74 *	0,78	1,12	0,04
Weiches Mungegefühl	0,01	1,13	6,42 **	0,11
Gesamteindruck Frische	2,40	0,02	0,24	0,62

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die Hauptkomponentenanalyse der Muskateller-Sekte und der sensorischen Deskriptoren bildet auf den Hauptkomponenten 1 und 2 61,81% der Gesamtvarianz ab (s. Abb. 4-52). Erneut bestätigte sich der dominierend Einfluss des aus *Aspergillus niger* stammenden Enzyms AR2000, welches die Sekte anhand Hauptkomponente 1 (41,5%) in enzymierte und nicht enzymierte Varianten diskriminierte. Die ausschließlich unter Einfluss der *Saccharomyces*-Hefen stehenden Varianten wurden korrelierend zu den Attributen frischer Apfel, Zitrusfrüchte und Frische sowie zu hefig und bitter projiziert. Untereinander war eine geringfügige Unterscheidbarkeit der Varianten anhand der weniger aussagekräftigen Hauptkomponente 2 (20,3%), insbesondere des Sektes aus der Kombination DV10/BC zu den weiteren Varianten, feststellbar. Der Enzymeinsatz führte wiederum zu einer Beschreibung der Sekte durch insbesondere gelbe Früchte, Honigmelone, blumig, Honig sowie fruchtig. Damit wurde deutlich, dass Enzymierung nicht nur die Intensivierung der geruchlichen Wahrnehmung, sondern auch eine Stilveränderung der Sekte von frischen Zitrusaromen zu satteren, gelben Sekten verursacht.

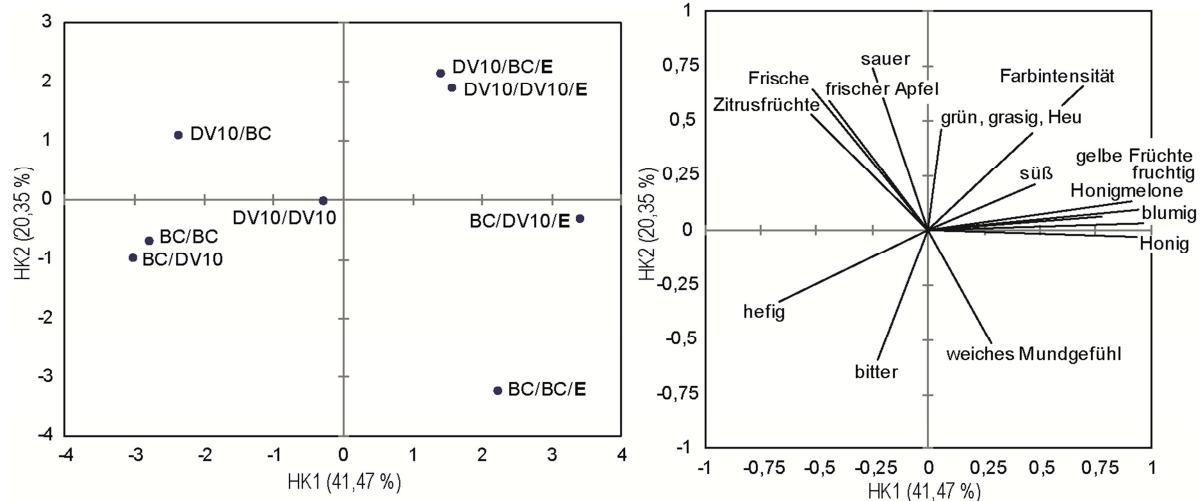


Abb. 4-52: Einfluss von Hefestamm-Kombination und Enzymeinsatz (E) auf die Sensorik der Muskateller-Sekte. Hauptkomponentenanalyse der sensorischen Merkmale und der Sektvarianten, Projektion der Faktorwerte der Muskateller-Sekte (links) und der Ladungen der sensorischen Merkmale (rechts) auf die Hauptkomponenten HK1 und HK2.

Den vergleichsweise geringen Einfluss des Faktors Hefestamm hob die einfaktorische Betrachtung der deskriptiven Sensorik der Sekte hervor (s. Abb. 4-53, A), desweiteren die signifikante Intensivierung bzw. Veränderung des Sektaromas durch Enzymeinsatz (s. Abb. 4-53, B). Die Auswahl des Hefestammes bzw. der Hefestammkombination verursachte keine signifikante Unterscheidbarkeit der Sekte in der olfaktorischen Beschreibung, während die Anwendung des Enzyms AR2000 zu einer signifikanten Intensivierung der Bewertung insbesondere des Attributes blumig sowie für gelbe Früchte, Honigmelone, Honig und hefig sowie die geschmackliche Beurteilung der Fruchtigkeit führte.

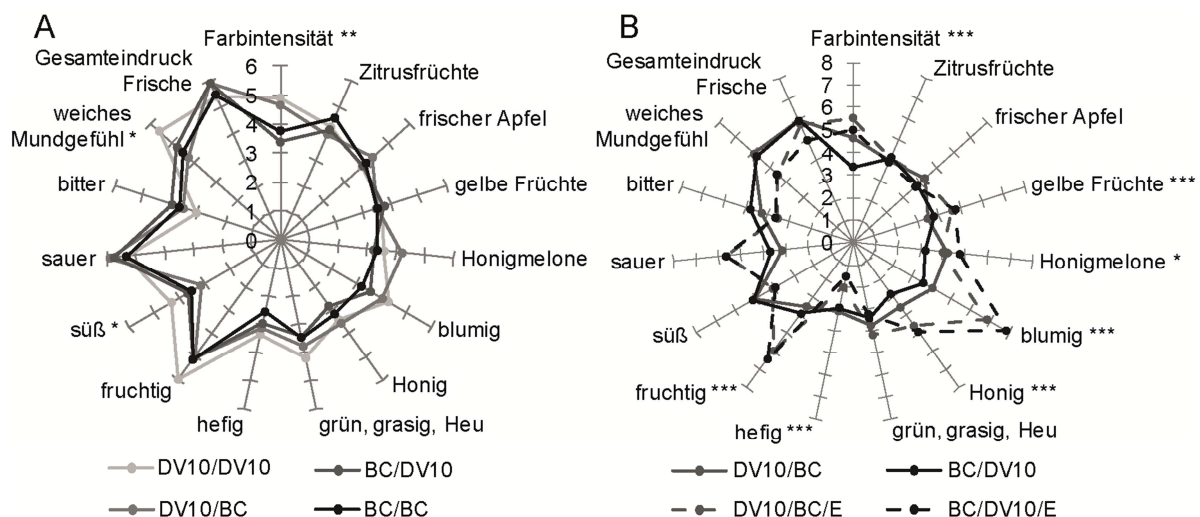


Abb. 4-53: Deskriptive sensorische Analyse der Muskateller-Sekte der verschiedenen Hefestamm-Kombinationen aus den Stämmen DV10 und BC (A) und Auswirkungen des Einsatzes von Enzympräparat AR2000 (E) in der zweiten Gärung (B).

(n=16 Pr. x 2 Wdhg, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.5.3 Korrelation chemischer und sensorischer Daten

Mittels Partial Least Square Regression (PLSR) wurden die Zusammenhänge zwischen den chemischen und sensorischen Daten hergestellt. Die chemische Analytik wird durch zu Substanzgruppen aufsummierte Aromastoffvorläufer repräsentiert, da keine der

Einzelsubstanzen besonders aufgefallen war. Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Eingruppierung teilt die analysierten Substanzen aufgrund ihrer chemischen Strukturverwandtschaft und durch sie hervorgerufene Aromaeindrücke ein. Die Abnahme der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer und damit deren Freisetzung sollte theoretisch die Intensivierung bzw. Veränderung der olfaktorischen Deskriptoren in der Sensorik erklären. Die Bewertungen der Geschmacksattribute wurden aus diesem Grund nicht in die Korrelationen einbezogen. Dabei konnten die Säurehydrolyse-Kontrollen mangels sensorischer Daten nicht berücksichtigt werden, desweiteren sind nicht alle aromachemisch analysierten Sekt-Varianten aufgrund begrenzter Kapazitäten auch sensorisch evaluiert worden. Die Vorauswahl fand aufgrund der Ergebnisse der aromachemischen Analytik sowie einem *bench tasting* durch eine ausgewählte Gruppe geschulter Prüfer des DLR Rheinpfalz statt. Die Sekte waren innerhalb der Rebsorten anhand ihrer weinchemischen Parameter vergleichbar. Die Muskateller-Sekte waren vollständig vergoren und wiesen keine Anzeichen eines biologischen Säureabbaus auf, während die Chardonnay und Riesling-Sekte nicht komplett durchgegoren waren und z.T. Milchsäure nachgewiesen wurde. Allerdings wurde keine Zusammenhang einer Auswirkung mittels chemischer und sensorischer Analytik der entsprechenden Proben festgestellt, obwohl andere mikrobiologische Einflüsse nicht auszuschließen waren (FTIR-Daten s. Anhang).

Chardonnay

Das PLSR-Modell erklärte für die Chardonnay-Sektvarianten insgesamt 96,9% der chemischen und 46,2% der sensorischen Analytik über die PLS-Faktoren F1 und F2 (s. Abb. 4-54). Insgesamt lässt sich vor allem durch die Einflussfaktoren Klon-Variante und Enzymeinsatz eine Unterteilung der Sektvarianten in vier Gruppen feststellen. Der Einfluss des verwendeten Chardonnay-Klons, d.h. der Normal- bzw. der monoterpenreichere Duftklon, wirkte sich insbesondere auf die Sekte, welche ohne Enzymeinsatz vergoren worden waren, aus. Diese ließen sich anhand des PLS-Faktors F2, allerdings mit vergleichsweise geringem Erklärwert (10,0% Analytik, 5,9 %Sensorik), separieren. Die Duftklon-Varianten wurden dabei weiterhin zu hohen Monoterpen-Vorläufergehalten projiziert, während die Normalklonvarianten durch Vorläufer der C₆-Alkohole, C₁₃-Norisoprenoide sowie aromatische Alkohole charakterisiert waren. Ein sehr hoher Einfluss bestand durch das Enzympräparat AR2000, welches durch eine offensichtlich ausgeprägte Glycosidase-Aktivität die Freisetzung der Aromastoffe aus ihren glycosidischen Bindungen bewirkte. Alle enzymierten Sekte lassen sich anhand des hoch erklärenden PLS-Faktors F1 (86,9% Analytik, 40,3 %Sensorik) von den nicht enzymierten Varianten differenzieren. Die entsprechenden Sekte werden dabei insgesamt zu den Ladungen der olfaktorischen Attribute projiziert, während die nur unter Hefeeinfluss hergestellten Sekte durch deren Abwesenheit geprägt sind. Anhand des geringer erklärwertigen PLS-Faktors F2 konnte zudem die Trennung der Klon-Varianten innerhalb der enzymierten Sekte erfolgen, wobei die Duftklon-Varianten eher durch die Attribute blumig, gelbe Früchte, frischer Apfel und grünes Gras gruppiert werden, vermutlich verursacht durch das höhere Potential an freisetzbaren Aromavorläufern im Most des Duftklons. Die Normalklon-Varianten sind durch Honig, Honigmelone und Zitrus beschrieben. Anhand der verwendeten Hefestammkombination wurden die Sektvarianten innerhalb dieser Gruppen kaum separiert, was auf einen vergleichsweise geringen Einfluss der Auswahl der *Saccharomyces*-Hefe auf die Freisetzung der Aromavorläufer schließen lässt.

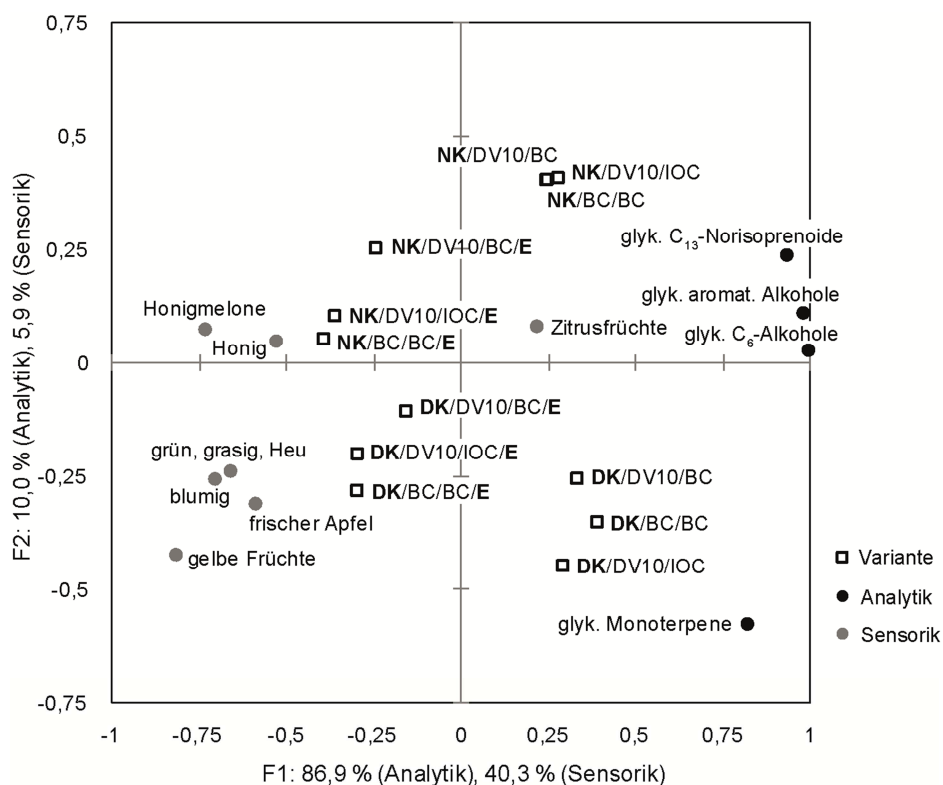


Abb. 4-54: PLS-Regression der glycosidisch gebundenen Aromastoffe (X) und der olfaktorischen sensorischen Deskriptoren (Y) mit Darstellung der Chardonnay-Sektvarianten unter Einfluss der Faktoren Grundweinhaefe, Sektheefe, Enzymeinsatz (E) und Klon-Variante (NK Normaklon, DK Duftklon).

Riesling 2012

Zwischen den verschiedenen Riesling-Sekten aus 2012, die mit den Kombinationen der Saccharomyces-Hefestämme U228 und RC212 in verkürzter zweiter Gärung von vier Monaten hergestellt worden waren, fanden sich chemisch und sensorisch geringfügige Unterschiede, insbesondere die Gehalte der Aromavorläufer waren durch den signifikanten Einfluss der Grundwein- sowie Sektheefe unterschiedlich. Allerdings blieben diese Unterschiede absolut gesehen in geringem Rahmen und wirkten sich in der sensorischen Beurteilung kaum auf die fertigen Sekte aus. Der Gesamtdatensatz aus chemischer und sensorischer Analytik enthielt aufgrund dieser geringen Unterschiede zwischen den Sekt-Varianten wenig Information und war mittels Regressions- oder Korrelationsanalysen nicht auswertbar.

Riesling 2013

Das PLSR-Modell erklärte für die Riesling-Sektvarianten insgesamt 95,1% der chemischen und 44,9% der sensorischen Analytik über die PLS-Faktoren F1 und F2 (s. Abb. 4-54). Insgesamt war auch für die Rebsorte Riesling eine Trennung der Sektvarianten in vier Gruppen zu beobachten. Durch die Traubenverarbeitung der Traubenpartien, durch Ganztraubenpressung (GTP) bzw. einer Maischestandzeit von 24 Stunden (StZt), erfolgte eine Differenzierung der fertigen Sekte anhand beider Hauptkomponenten. Die nicht enzymierten d.h. ausschließlich unter Hefeinfluss stehenden Sekte wurden desweiteren von den unter Enzymeinsatz hergestellten Sekten (E) unterschieden. Diese Varianten wurden von ihren jeweiligen nicht enzymierten Vergleichsvarianten über die beiden PLS-Faktoren F1 (62,9% Analytik, 31,3% Sensorik) sowie F2 (33,2% Analytik, 13,5% Sensorik) zur Projektion

der Wahrnehmung der olfaktorischen Attribute verschoben. Die GTP-E-Varianten waren dabei stärker mit Honig, gelbe Früchte, Honigmelone und blumig korreliert, während die enzymierten StZt-Sekte insbesondere durch frischer Apfel und grünes Gras charakterisiert waren. Die nicht enzymierten Sekte waren, ausgenommen das Attribut Zitrusfrüchte, durch die Abwesenheit der Wahrnehmung der Attribute beschrieben. Zudem bestand eine Korrelation zu den noch in glycosylierter Form vorliegenden Aromavorläufern, während der Enzymeinsatz die Sekt-Varianten in negative Korrelation zu diesen projizierte und damit deren Abnahme bzw. Freisetzung verursachte.

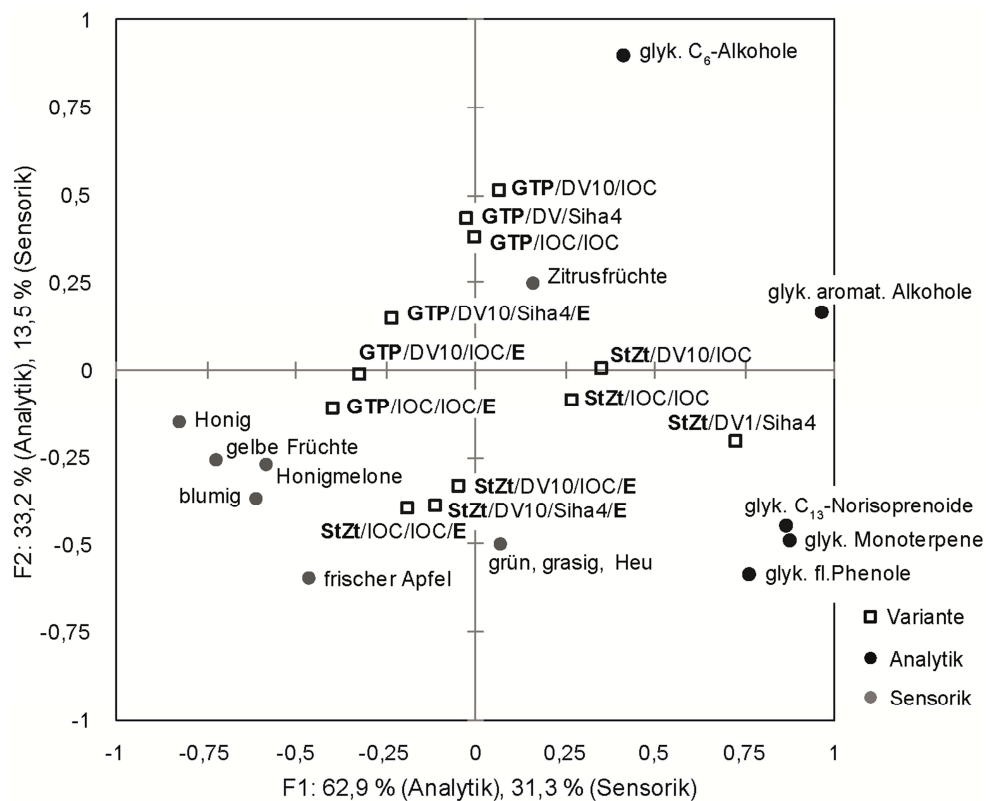


Abb. 4-55: PLS-Regression der glycosidisch gebundenen Aromastoffe (X) und der olfaktorischen sensorischen Deskriptoren (Y) mit Darstellung der Riesling-Sektvarianten unter Einfluss der Faktoren Grundweinsteife, Sektheife, Enzymeinsatz (E) und Traubenverarbeitung (GTP Ganztraubenpressung, StZt Standzeit).

Muskateller

Das PLSR-Modell erklärte für die Muskateller-Sektvarianten insgesamt 96,7% der chemischen und 59,2% der sensorischen Analytik über die PLS-Faktoren F1 und F2 (s. Abb. 4-54). Die ausschließlich durch die Auswahl des Hefestammes bzw. der Hefestamm-Kombination sowie Verwendung des Enzympräparates AR2000 (E) variierten Muskateller-Sekte wurden auch für diese Rebsorte vor allem durch das Enzym diskriminiert. Anhand des aussagekräftigen PLS-Faktors F1 (88,8% Analytik, 52,0% Sensorik) wurden die enzymierten Sekte im Vergleich zu den nicht enzymierten Sekten in negative Korrelation zu den glycosyliert vorliegenden Aromavorläufern hin zu der Wahrnehmung der olfaktorischen Deskriptoren gelbe Früchte, blumig, Honig und Honigmelone projiziert. Die ausschließlich unter dem Einfluss der Hefekombination stehenden Sekte wurden dagegen durch positive Korrelation zu den noch gebundenen Aromavorläufern sowie zu den sensorischen Attributen Zitrusfrüchte, grünes Gras und frischer Apfel charakterisiert. Untereinander wurden diese nicht enzymierten Sekte anhand des durch geringen Erklärwert gekennzeichneten PLS-

Faktors (7,9% Analytik, 7,3% Sensorik) unterschieden. Insbesondere die Variante BC/DV10, projiziert zur Wahrnehmung von Zitrusfrüchten und erhöhtem Gehalt gebundener C₁₃-Norisoprenoide sowie Variante DV10/BC, beschrieben durch die Attribute frischer Apfel und grünes Gras, waren voneinander diskriminiert, während die Kombination der Hefen BC/BC bzw. DV10/DV10 zu wenig unterschiedlichen Sekten führte.

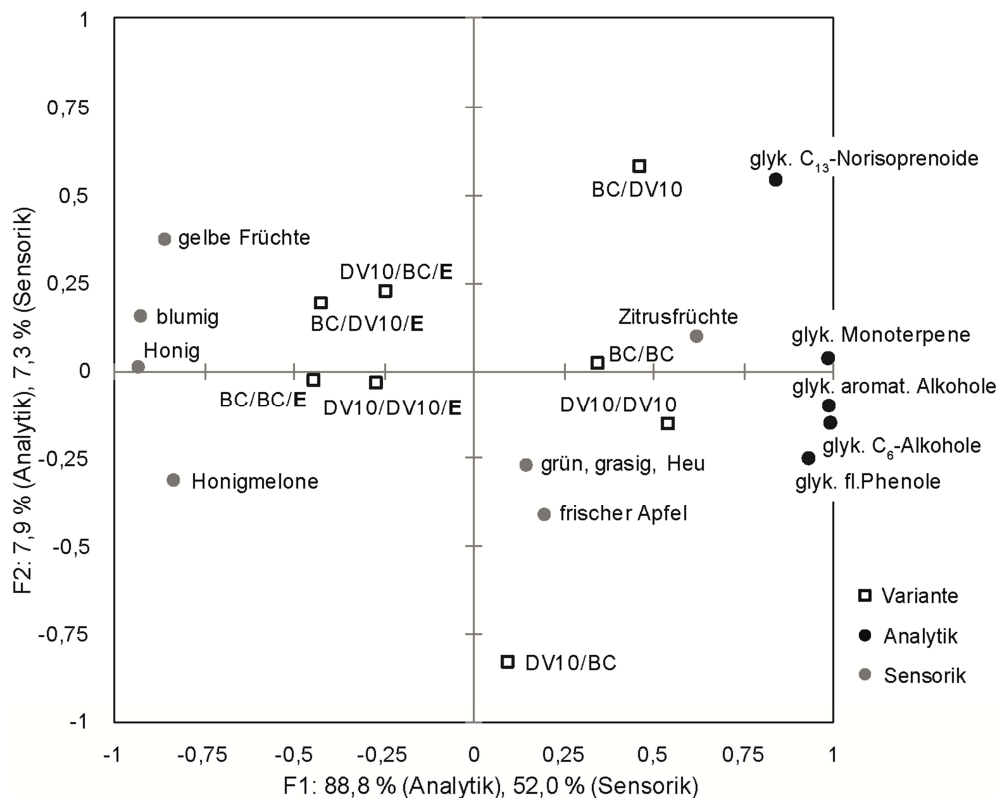


Abb. 4-56: Partial Least Square Regression der glycosidisch gebundenen Aromastoffe (X) und der olfaktorischen sensorischen Deskriptoren (Y) mit Darstellung der Muskateller-Sektvarianten unter Einfluss der Faktoren Grundweinhaefe, Sektheefe und Enzymeinsatz (E).

4.5.4 Zusammenfassung der experimentellen Sektbereitung

Die in Flaschengärung hergestellten Sekte waren den Einflüssen Traubenmaterial, Hefe, Enzymeinsatz und Säurehydrolyse ausgesetzt. Das übergeordnete Ziel des Versuches blieb dabei die Untersuchung des Einflusses von *Saccharomyces*-Hefestämmen auf die Freisetzung glycosidisch gebundener Aromastoffe sowie das damit verbundene Aromaprofil der Sekte. Für die in 2013 in neunmonatiger zweiter Gärung hergestellten und durch verschieden hohe Gehalte an Aromastoffvorläufern charakterisierten Sekte konnte dabei weder durch die Grundwein- noch Sektheefe oder die Hefekombination verursachte reproduzierbare nennenswerte Unterschiede bezüglich Freisetzung der Aromavorläufer oder des Sektaromas gefunden werden. Die sporadisch nachweisbaren Unterschiede konnten nicht wiederholbar bestimmten Hefestämmen, Aromastoffvorläufern oder olfaktorischen Attributen zugeordnet werden. Auf geschmackliche und haptische Deskriptoren konnte dagegen Hefe-Einfluss nachgewiesen werden. Desweiteren bestand für Einzelsubstanzen teilweise das Problem der möglichen statistischen Überinterpretation aufgrund sehr geringer Vorläufer-Konzentrationen. Die Sekte aus 2012, die bereits nach viermonatiger zweiter Gärung untersucht wurden, waren geringfügig unterschiedlich, was möglicherweise auf den dadurch geringeren Einfluss der Säurehydrolyse zustande kam. Dafür spricht auch die über alle Rebsorten nachgewiesene Abgrenzung der Sekte von den Säurehydrolyse-Kontrollen,

welche durch signifikant geringere Freisetzung der Vorläufer geprägt waren. Dementsprechend schien die enzymatische Aktivität der Hefen durchaus an der Hydrolyse der Aromastoffvorläufer beteiligt gewesen zu sein, allerdings war diese zwischen den untersuchten Hefestämmen nicht unterschiedlich. Der Einsatz des aus *Aspergillus niger* stammenden Enzympräparates AR2000, welches durch eine hohe Glycosidase-Aktivität gekennzeichnet ist, führte dagegen in allen Versuchsteilen zu einer signifikant erhöhten Freisetzung der Aromastoffvorläufer sowie einer Aromaintensivierung der Sekte. Dabei waren fast ausschließlich olfaktorische Deskriptoren betroffen, während die geschmackliche Wahrnehmung nicht beeinflusst wurde. Weiterhin von Praxisrelevanz war die mit der Intensivierung einhergehende Stilveränderung der enzymierten Sekte, welche sich vom eher fruchtig-frischen Typ in Richtung gelber, breiter und reifer Sekte verschob.

4.6 Bestimmung der β -D-Glucosidase- und Glycosidase-Aktivität als Freisetzungspotential der Hefen in Modellversuchen

Eine vorhandene Glycosidase-Aktivität ist Voraussetzung zur Fähigkeit von Mikroorganismen zur hydrolytischen Spaltung und damit Freisetzung von glycosidisch gebundenen Aromastoffen. Die Schwierigkeit besteht in der Diversität der Zuckerreste, die potentiell an die Aromastoffe binden. Zu großen Teilen handelt es sich dabei um Disaccharide, in denen das den Aromastoff 1,4- β -D-glycosidisch bindende Glucose-Molekül zusätzlich Apiose, Arabinose oder Rhamnose bindet, für deren sequentielle Hydrolyse die entsprechende Enzymaktivität nötig ist. In den folgenden Modellversuchen wurde sich zunächst auf die Bestimmung der β -D-Glucosidase-Aktivität beschränkt. Im Kontext der Auswahl von Hefen zur gesteuerten Freisetzung von Aromavorläufern während der Wein- und Sektgärung wurden 18 Stämme der Gattung *Saccharomyces* getestet, desweiteren Stämme von Nichtsaccharomyces-Hefen der Gattungen *Torulaspora*, *Metschnikowia*, *Debaromyces* und *Pichia*, welche als Positivkontrolle für spätere Tests beibehalten wurden.

4.6.1 Test auf Agar-Platten

Mittels Plattentests konnte zügig und mit geringem Aufwand die β -D-Glucosidase-Aktivität der Hefen beurteilt werden, indem YNB-Agar mit einer 1,4- β -D-glycosidisch gebundenen Kohlenstoff-Quelle angereichert wurde. Es wurden mit Arbutin und Cellobiose zwei unterschiedliche Substrate eingesetzt, um die Möglichkeit von aufgrund Aglycon-selektiver Spaltung entstehenden falsch-negativen Ergebnissen zu reduzieren. Desweiteren wurde Positiv- und Negativkontrollen angefertigt. Über Plattentests ist anhand des Wachstums der Hefe auf der Platte auf die Hydrolysefähigkeit rückschließbar, allerdings ohne die Möglichkeit der Quantifizierung.

4.6.1.1 Kontrollen

Als Positivkontrolle wurde von jedem Hefestamm ein Ausstrich auf Vollmedium (YPD) durchgeführt, was die Wachstumsfähigkeit der Stämme unter den für die Tests gewählten Konditionen abgesicherte (s. Abb. 4-57). Das Ergebnis war für alle Stämme positiv, sichtbar an einem deutlichen Wachstum der Hefen auf der Platte.

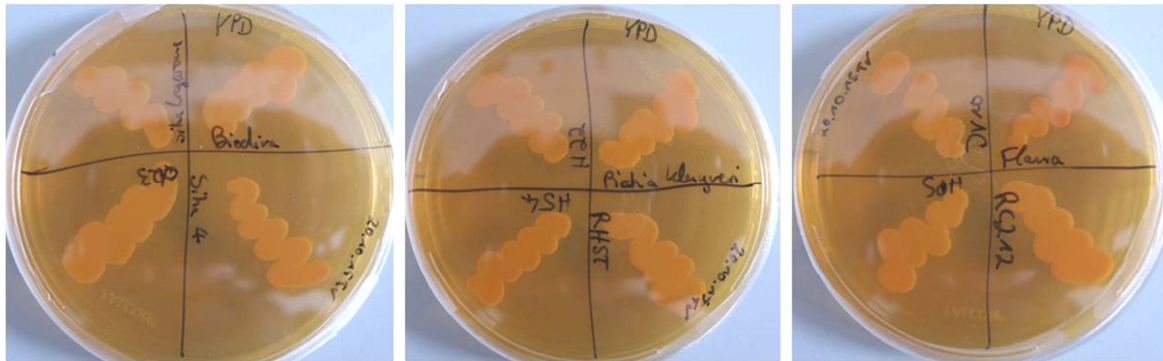


Abb. 4-57: Postivkontrolle der Platten-Tests, Ausstrich auf Vollmedium (YPD).

Als Negativkontrolle diente YNB-Agar ohne Zusatz einer Kohlenstoff-Quelle. Es blieben teilweise sichtbare Spuren vom Ausstrich bei allen Hefen (s. Abb. 4-58 A, auf verschieden farbiger Unterlage), der mechanisch bedingt durch den Ösenausstrich sowie durch rudimentäres Wachstum in Spuren des zur Anzucht verwendeten Medium oder Most, zustande kam. Zur korrekten Interpretation der Plattentests vom positiven Wachstum auf der Platte sollte sicher unterschieden werden können. Das war eindeutig der Fall, positives Wachstum auf YNB-Medium mit Kohlenstoffquelle wie beispielsweise Arbutin, wie z.B. der Stämme Flavia, H54 und H22 konnte eindeutig von Spuren abgegrenzt werden (s. Abb. 4-58, B1). Im Zweifelsfall konnte zur Absicherung die Unterseite der Platte ausgewertet werden (s. Abb. 4-58 B2). In seltenen Fällen wurden Grenzfälle wie bei Stamm H64 beobachtet, in dem Spuren nicht sicher von sehr schwachem Wachstum abgegrenzt werden konnten.

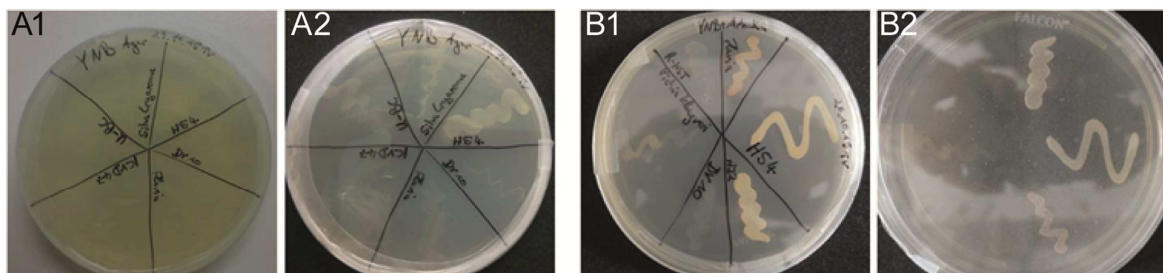


Abb. 4-58: Negativkontrolle auf YNB-Medium ohne Zusatz einer Kohlenstoff-Quelle (A). Positives Wachstum der Stämme Flavia, H54 und H22 auf YNB+Arbutin zum Vergleich (B).

4.6.1.2 YNB-Medium mit Arbutin (mit und ohne Ammoniumeisen(III)-citrat)

Die Kohlenhydratquelle Arbutin stellt β -D-glycosidisch gebundenes Hydrochinon dar und ist spezifisch für das Enzym 1,4- β -D-Glucosidase beschrieben (Rodríguez et al., 2004). Auf den Agar-Platten konnten nur diejenigen Stämme wachsen und eine Braunfärbung auf dem Agar verursachen, wenn sie durch eine vorhandene β -D-Glucosidase-Aktivität zur Spaltung von Arbutin fähig waren (nach Rosi et al., 1994). Nach acht Tagen Inkubation bei 30 °C zeigten die Stämme Flavia (*Metschnikowia pulcherrima*), H22 (*Debaromyces hansenii*) und H54 (*Pichia anomala*) positive Testergebnisse. Insbesondere Stamm Flavia zeigte eine ausgeprägte Färbung der Kolonien und auf dem Agar, die Stämme H22 und H54 waren zum Wachstum auf der Platte fähig und die Kolonien braun gefärbt. Dagegen wurde kein Stamm der Gattung *Saccharomyces* positiv getestet (s. Abb. 4-59).



Abb. 4-59: Plattentest auf YNB-Medium mit Arbutin und Ammoniumeisen(III)-citrat.

Aufgrund in der Literatur diskutierter hemmender Wirkung des Ammoniumeisen(III)-citrat und daraus resultierender falsch-negativer Ergebnisse für die β -D-Glucosidase-Aktivität insbesondere der *Saccharomyces*-Hefen (Daenen et al., 2008) wurde der Versuch ohne Zusatz der Substanz, d.h. nur YNB-Medium und Arbutin wiederholt. Es wurden keine fehlnegativen Ergebnisse durch Einsatz von Ammoniumeisen(III)-citrat für die getesteten Stämme ermittelt, da ebenfalls kein Wachstum von vorher negativ getesteten Stämmen auf Platten mit ausschließlichem Arbutin-Zusatz beobachtet wurde. Der Test zeigte sich allenfalls durch eine geringere Braunfärbung der Kolonien bzw. einem Fehlen des braunen Ringes um die Kolonien als Zeiger einer Positivreaktion unterschiedlich (s. Abb. 4-60).



Abb. 4-60: Plattentest auf YNB-Medium mit Arbutin ohne Zusatz von Ammoniumeisen(III)-citrat.

4.6.1.3 Substrat Cellobiose

Die Hefen wurden auf Platten mit der Kohlenhydratquelle Cellobiose als Substrat zum alternativen Test zur Verringerung Risikos falsch-negativer Ergebnisse aufgrund spezifischer oder Aglycon-abhängiger Hydrolyse erneut getestet. Es kam zum selben Ergebnis, für keinen Stamm der *Saccharomyces*-Hefen konnte Wachstum und damit β -D-Glucosidase-Aktivität nachgewiesen werden, die Stämme Flavia, H54 und H22 dagegen waren auch auf YNB-Agar mit Cellulose zum Wachstum fähig (s. Abb. 4-61).

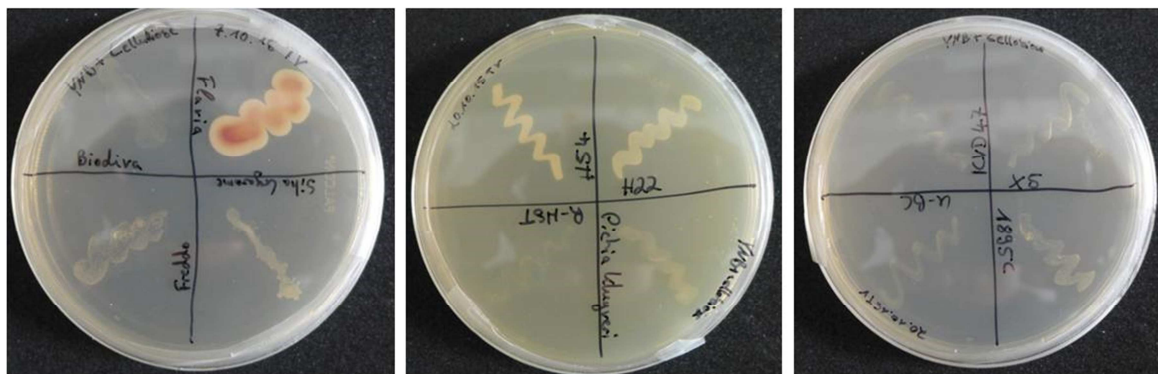


Abb. 4-61: Plattentest auf YNB-Medium mit Cellobiose.

4.6.2 pNPG-assay

Der pNPG-assay ermöglicht die quantitative Bestimmung der β -D-Glucosidase-Aktivität der Hefen über die photometrische Bestimmung des p-Nitrophenolanions nach Spaltung des Substrates p-Nitrophenol- β -D-glucopyranosid (pNPG) in p-Nitrophenol (pNP) und Glucose. Es wurden *Saccharomyces*- und *Nicht-saccharomyces*-Hefen sowie das aus *Aspergillus niger* stammende Enzym AR2000 bestimmt. Ist eine Standardabweichung angegeben, wurde für den entsprechenden Stamm in Form biologischer Replikate wiederholt gemessen, ist zusätzlich mit einer laufenden Nummerierung p angegeben, handelt es sich um verschiedene Chargen der Präparate. Es konnten nur Daten für die extrazelluläre Enzymaktivität der Hefen erhalten werden, die Messungen nach Permeabilisierung mit CTAB ergaben keine auswertbaren Ergebnisse.

Enzympräparat

Zunächst wurde die Enzymaktivität des aus *Aspergillus niger* stammenden Enzympräparates AR2000 bestimmt. Dieses kam zur enzymatischen Hydrolyse der Aromastoffvorläufer vor der gaschromatographischen Messung zum Einsatz und wurde desweiteren in der experimentellen Weinbereitung eingesetzt. Für das Präparat sind bereits Daten bezüglich dessen Aktivität publiziert. Baek und Cadwallader (1999) ermittelten 380 mU/mg, Barbagallo et al. (2002) 158 mU/mg und Spagna et al. (1998) 36 mU/mg. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen ergaben 103 ± 29 mU/mg und damit mit der Literatur übereinstimmende Werte (s. Tab. 4-32). Damit konnte die Vergleichbarkeit des Assays sowie die Wirksamkeit des Enzympräparates über die Dauer der Versuche überprüft werden, obwohl über die Vollständigkeit der Hydrolyse der Aromastoffvorläufer in der Probenvorbereitung keine Aussage getroffen werden kann.

Tab. 4-32: β -D-Glucosidase-Aktivität des Enzympräparates AR2000, eigene Messungen und Literaturwerte.

Quelle	β -D-Glucosidase-Aktivität (mU/mg)
Eigene Messung (2015) ¹	103 ± 29
Baek und Cadwallader (1999)	380
Barbagallo et al. (2002)	158
Spagna et al. (1998)	36

¹ Messzeitraum 10.07.2015-13.08.2015, Sechsfachbestimmung

Hefen

Die in der Weinbereitung normalerweise eingesetzten und kommerziell erhältlichen Reinzuchthefestämmen der Gattung *Saccharomyces* mit den Arten *S. cerevisiae* und *S. bayanus* wurden durch vergleichsweise sehr geringe β -D-Glucosidase-Aktivitäten von im Mittel 52 ± 15 μ U/mg charakterisiert, die geringste Aktivität zeigte mit 26 μ U/mg Hefestamm CEG, die höchste Aktivität Stamm EC1118 der ersten überprüften Charge (p1) mit 79 μ U/mg. Mittels Varianzanalyse konnte zwischen den Stämmen statistisch kein Unterschied festgestellt werden, zudem befanden sich die Werte insgesamt auf einem vergleichsweise geringen Niveau, so dass von einer insgesamt geringen Aktivität der *Saccharomyces*-Hefen ausgegangen werden kann. Ebenso unterschieden sich diese Hefen nicht zwischen den Arten *S. cerevisiae* mit im Mittel 50 ± 13 μ U/mg und *S. bayanus* mit im Mittel 53 ± 18 μ U/mg, auch mittels t-Test nach Student konnte statistisch kein Unterschied festgestellt werden ($p=0,69$, n.s.). Dementgegen ergaben die Messungen der *NichtSaccharomyces*-Hefen zum Teil höhere Messungen. Die Untersuchung der kommerziell erhältlichen Reinzuchthefepreparate Biodiva (*Torulaspora delbrueckii*) und Flavia (*Metschnikowia pulcherrima*) ergab für Stamm Biodiva mit 190 ± 92 μ U/mg eine erhöhte Aktivität, für Stamm Flavia dagegen mit 32 ± 18 μ U/mg nicht. Desweiteren zeigte der Stamm H22 der Art *Debaromyces hansenii* mit 129 ± 23 μ U/mg eine leicht erhöhte Aktivität. Für Stamm H54 der Art *Pichia anomala* wurde die höchste Aktivität gemessen, welche mit 796 ± 267 μ U/mg auch signifikant unterschiedlich zu allen anderen Hefestämmen war.

Die im Assay ermittelten Messwerte für alle Hefestämme und das Enzym können der folgenden Abbildung Abb. 4-62 entnommen werden. Alle *Saccharomyces*-Stämme zeichneten sich durch vergleichsweise geringe Aktivität aus. Der signifikante Unterschied des *Pichia anomala* Stammes H54 wird ebenso deutlich wie die leicht erhöhte Aktivität des *Torulaspora delbrueckii* Stammes Biodiva und des *Debaromyces hansenii* Stammes H22. Als Vergleich zusätzlich dargestellt ist das um ca. 1000fach erhöhte Enzym AR2000 aus *Aspergillus niger*.

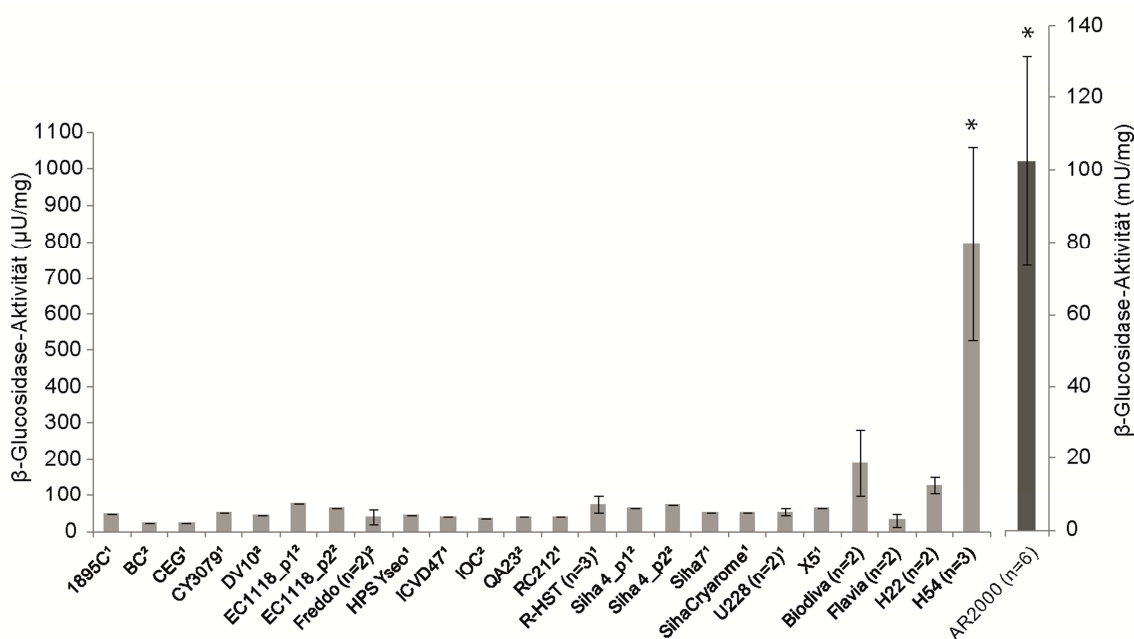


Abb. 4-62: β -D-Glucosidase-Aktivität von Hefen und Enzym. Zuordnung der Stämme: Saccharomyceten: ¹ *S. cerevisiae*, ² *S. bayanus*, Nichtsaccharomyceten: Biodiva *Torulaspora delbrueckii*, Flavia *Metschnikowia pulcherrima*, H22 *Debaromyces hansenii*, H54 *Pichia anomala*.

4.6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur β -D-Glucosidase-Aktivität der Hefen

Mittels Plattentests und pNPG-Assay sollte unter kontrollierten Bedingungen grundsätzlich die Fähigkeit von *Saccharomyces*-Hefen zur enzymatischen Hydrolyse von β -D-glycosidisch gebundenen Substraten untersucht werden. Dabei wurde sich aufgrund der Messkapazität auf die Messung der β -Glucosidase-Aktivität beschränkt, obwohl es sich bei den Zuckerresten in der Mehrzahl nicht um einfache β -D-Glucoside, sondern um Disaccharide handelt, bei denen die β -D-Glucose mit α -L-Arabinofuranosyl-, α -L-Rhamno-pyranosyl- und β -Apiofuranosyl-Resten verknüpft sein kann. Zur deren Hydrolyse sind entsprechende Glycosidasen notwendig, zu deren Aktivität hier keine Aussage getroffen werden kann.

In den Plattentests mit den Kohlenstoff-Quellen Arbutin und Cellobiose wurden alle *Saccharomyces*-Hefen negativ getestet, damit konnte keine β -Glucosidase-Aktivität nachgewiesen werden. Die Messungen des pNPG-Assay zeigten für alle dieser Reinzuchthefestämme eine vergleichsweise geringe Aktivität, sowohl für *S. cerevisiae* als auch für *S. bayanus*. Die Stämme waren zudem innerhalb der Gattung nicht unterschiedlich. Einige der *Nichtsaccharomyceten* wurden dagegen mittels Plattentests positiv und mittels Aktivitäts-Assay durch signifikant höhere β -Glucosidase-Aktivität beurteilt (s. Tab. 4-33). Desweiteren war die mittels pNPG-Assay bestimmte β -Glucosidase-Aktivität des aus *Aspergillus niger* stammenden Enzympräparates ungefähr 1000fach gegenüber *Saccharomyces*-Hefen erhöht.

Tab. 4-33: β -D-Glucosidase-Aktivität ausgewählter Saccharomyces- (¹ *S. cerevisiae* ² *S. bayanus*) und Nichtsaccharomyces-Stämme³.

Hefestamm	spez. Aktivität pNPG (μ U/mg)	Plattentest YNB+Arbutin	Plattentest YNB+Cellobiose
1895C ¹	49	-	-
BC ²	27	-	-
CEG ¹	26	-	-
CY3079 ¹	52	-	-
DV10 ²	46	-	-
EC1118_p1 ²	79	-	-
EC1118_p2 ²	66	-	-
Freddo (n=2) ²	42 \pm 22	-	-
HPS Yseo ¹	46	-	-
ICVD47 ¹	41	-	-
IOC ²	39	-	-
QA23 ²	40	-	-
RC212 ¹	41	-	-
R-HST (n=3) ¹	74 \pm 22	-	-
Siha 4_p1 ²	67	-	-
Siha 4_p2 ²	73	-	-
Siha7 ¹	52	-	-
SihaCryarome ¹	52	-	-
U228 (n=2) ¹	55 \pm 11	-	-
X5 ¹	66	-	-
Biodiva (<i>Torulasporea delbrueckii</i>) ³	190 \pm 92	-	-
Flavia (<i>Metschnikowia pulcherrima</i>) ³	32 \pm 18	++	++
H22 (<i>Debaromyces hansenii</i>) ³	130 \pm 23	+	+
H54 (<i>Pichia anomala</i>) ³	796 \pm 267	+	+

4.7 Genexpressionsanalysen

Während der durchgeführten Modellgärung 1 im Labormaßstab (s. Kap. 4.3.1), der Vergärung von 3 Ansätzen á 5 L Riesling-Sterilmost mit den Hefestämmen EC1118 und QA23, wurden parallel zur Untersuchung der Aromastoffvorläufer zusätzlich mittels qPCR Analysen zur Genexpression der putativ für Glycosidase-aktive Proteine verantwortlichen Gene EXG1, SPR1 und YIR007W durchgeführt. Es wurde während des Gärverlaufs zu den Zeitpunkten 17, 168, 336 und 504 Stunden (analog zu Tag 1, 7, 14 und 21 der Aromavorläufer-Messung) nach Gärbeginn analysiert.

Die auf das Haushaltsgen UBC6 und den Δ ct-Wert der untersuchten Hefestämme normalisierte relative Quantifizierung der Expression der Kandidatengene ergab während des Gärverlaufs zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den Hefestämmen (s. Abb. 4-63). In der Darstellung der resultierenden exponentierten $\Delta\Delta$ ct-Werte lag bei invertierter Darstellung der Werte die Expression des Hefestammes QA23 über der des Stammes EC1118, im umgekehrten Fall zeigte die positive Ausrichtung eine gesteigerte Expression des Stammes EC1118 an (s. Abb. 4-63, A). Zu den Zeitpunkten von 17, 168 und 336 Stunden nach Gärbeginn war für keines der Gene eine auffällig erhöhte Expression eines Hefestammes gegenüber dem anderen zu ermitteln. Am Ende der Gärung

war die Expression von EXG1 1,91 fach bei Stamm EC1118 gegenüber QA23 erhöht, allerdings innerhalb der Standardabweichungen der biologischen Replikate. Das verdeutlicht auch die Darstellung der logarithmierten Daten (s. Abb. 4-63, B). Die Gene SPR1 und YIR007W unterschieden sich nicht vom Nullwert der Normierung über die Hefen, insbesondere *SPR1* bei relativer Expression zwischen Faktor -0,06 bis 0,18 sowie YIR007W zwischen Faktor 0,05 bis 0,55. Wohingegen für EXG1, zu Beginn anhand Wert -0,31 fach bei QA23 höher exprimiert, am Ende der Gärung dagegen bei Wert 0,93 fach in Richtung EC1118 verschoben war.

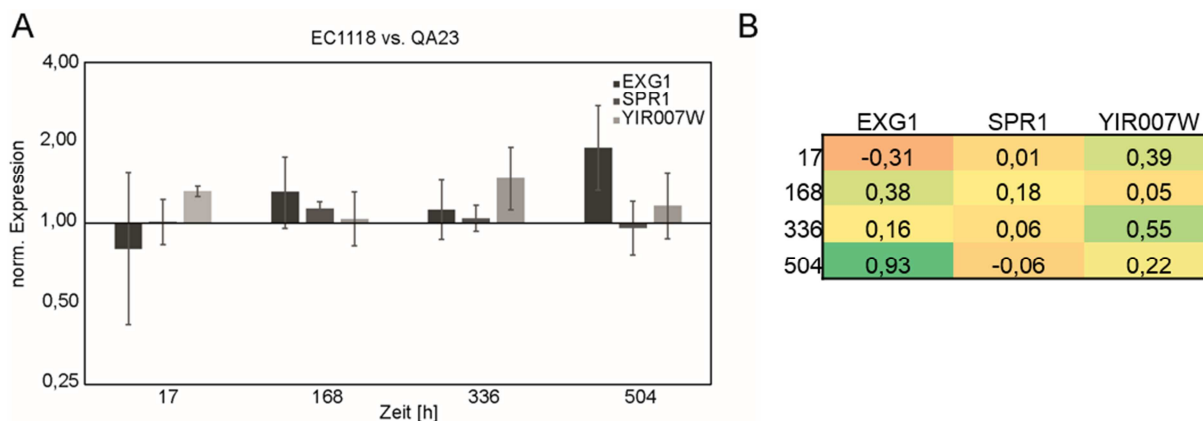


Abb. 4-63: Relative Expression von EXG1, SPR1 und YIR007W anhand $\Delta\Delta\text{ct}$ nach Normalisierung auf *UBC6* und Δct der untersuchten Hefestämme EC1118 und QA23 (n=3). A exponentierte Daten, B logarithmierte Daten.

Die auf Haushaltsgen *UBC6* und den Zeitpunkt 17 Stunden normierte relative Expression verdeutlichte die ansteigende Expression des Gens EXG1 über die fortschreitende Gärung, während das für SPR1 und YIR007W nicht feststellbar war. Für Hefestamm EC1118 war das Maximum für das Gärende des Zeitpunktes von 504 Stunden messbar (s. Abb. 4-64, A1 und B1), die Vervielfachung der relativen Expression um Faktor 4,41 war signifikant (F-Wert 5,16 bei $p < 0,05$). Für Hefestamm QA23 lag das Maximum der Expression bereits bei 336 Stunden um das 3,17 fache signifikant erhöht (F-Wert 7,58 bei $p < 0,01$) und verringerte sich bis 504 Stunden wieder, was vermutlich darauf zurückzuführen war, dass die Gärung dieses Hefestammes zu diesem Zeitpunkt bereits beendet war. Der Mangel an freier Glucose führte damit vermutlich zu einer gesteigerten Expression des Gens zur Synthese eines glycosidase-aktiven Proteins. Scheinbar ist EXG1p daran beteiligt. Desweiteren hatte dieser Hefestamm eventuell zu dem späteren Zeitpunkt von 504 Stunden bereits an Vitalität verloren, was zu einer Abnahme der Expression von EXG1 führte, wobei die Expression des Haushaltsgens allerdings für beide Hefestämme bis zu diesem Zeitpunkt unverändert stabil blieb. Die logarithmierten Daten der Expressionshöhe verdeutlichten den Verlauf, während für Hefe EC1118 ein Anstieg der Expression bis auf Faktor 2,05 nach 504 Stunden bestimmt wurde, war das Maximum des Stammes QA23 nach 336 Stunden mit Faktor 1,66 erreicht. SPR1 blieb konstant, für YIR007W war ein Rückgang der Expression messbar (s. Abb. 4-64, A2 und B2).

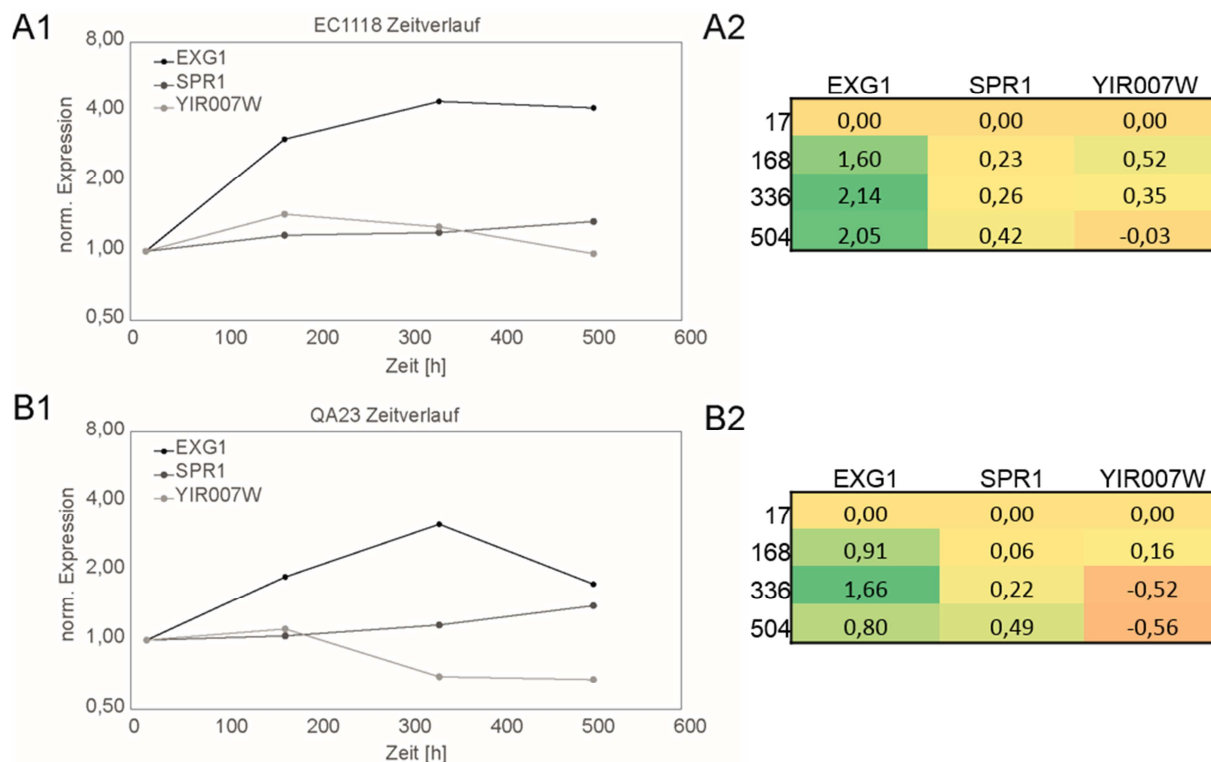


Abb. 4-64: Relative Expression von EXG1, SPR1 und YIR007W anhand $\Delta\Delta\text{ct}$ nach Normalisierung auf *UBC6* und den Zeitpunkt 17 Stunden im Gärverlauf ($n=3$). A exponentierte Daten, B logarithmierte Daten.

Zusammenhang von Glucose-Gehalt, Genexpression und Aromastoffanalytik

Für die untersuchten Hefestämme EC1118 und QA23 bestand kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der Genexpression der für die putativ Glycosidase-aktiven Proteine codierenden Gene EXG1, SPR1 und YIR007W an den untersuchten Zeitpunkten der Gärung. Es wurde allerdings eine signifikante Steigerung der Expression des Gens EXG1 im Verlauf der Gärungen beider Hefestämme bestimmt, für Stamm EC1118 mit F-Wert 5,16 bei $p < 0,05$ und für Stamm QA23 mit F-Wert 7,58 bei $p < 0,01$, nicht aber für die Gene SPR1 und YIR007W. Aufgrund der unterschiedlichen Gärkinetik der Hefen, insbesondere zum Endpunkt der Gärung, blieb zusätzlich deren direkter Vergleich problematisch. Die Darstellung der Größen Glucose, Expression des Gens EXG1 und des Aromastoffvorläufer-Gehaltes über den Gärverlauf zeigt getrennt für die Hefenstämme EC1118 und QA23 einen ähnlichen Zusammenhang (s. Abb. 4-65, A und B). Durch die alkoholische Gärung erfolgte die Abnahme der Glucose-Konzentration über die Zeit, bei Stamm EC1118 bis zum Gärende bei 504 Stunden mit verbleibendem Restgehalt von 5,4 g/L, bei Stamm QA23 war die Glucose bei 336 Stunden bereits auf 4,4 g/L und bei 504 Stunden vollständig abgebaut. Damit einhergehend war ein Anstieg der Genexpression von EXG1 zu verzeichnen, welcher bei Hefe EC1118 zu den Zeitpunkten 336 und 504 Stunden maximal ausgeprägt bei 2,9 bzw. 2,7 facher Expression lag. Bei Hefe QA23, der bereits bei Zeitpunkt 336 Stunden nur noch geringe Gehalte freier Glucose zur Verfügung standen, war die Expression zu diesem Zeitpunkt maximal und um 2,6 fach erhöht, bei Gärende war dagegen bereits wieder eine Abnahme auf 1,4 fache Erhöhung feststellbar. Die Gehalte der glycosidisch gebundenen Vorläufer, zum Gesamtgehalt aller Einzelsubstanzen aufsummiert, reduzierten sich bei beiden Varianten, dabei zwischen den Hefen nicht unterschiedlich, von $1163 \pm 37 \mu\text{g/L}$ auf $935 \pm 65 \mu\text{g/L}$ bei EC1118 bzw. von $1183 \pm 54 \mu\text{g/L}$ auf $843 \pm 71 \mu\text{g/L}$ bei QA23.

Zusammengefasst, war eine Korrelation von Abnahme des Glucose-Gehaltes bei ansteigender Expression von EXG1 und damit verbundener Abnahme der Aroma-Glycoside erkennbar. Die Abhängigkeit der Faktoren liegt vermutlich in dieser Rangfolge vor.

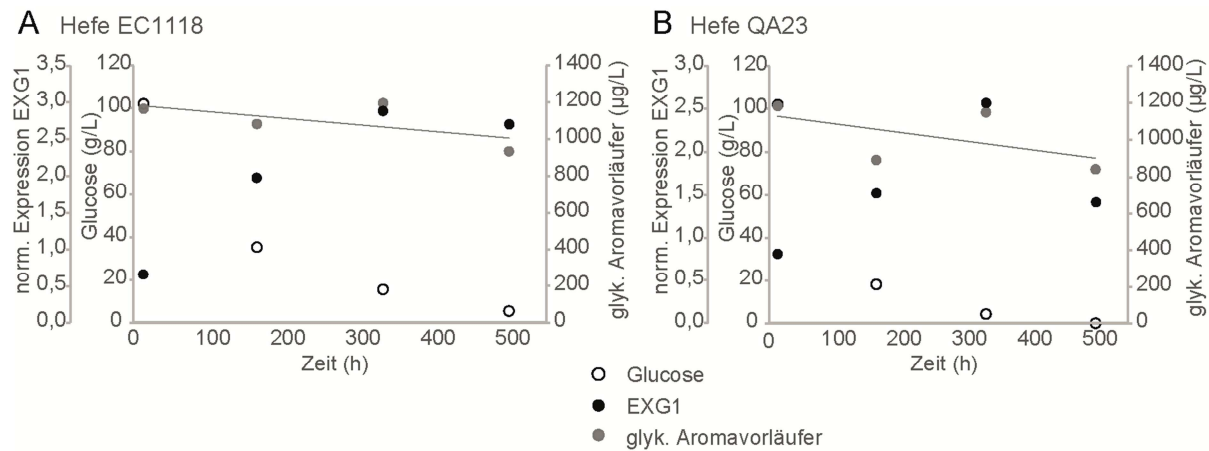


Abb. 4-65: Zusammenhang von Glucose, Genexpression von EXG1 und Aromastoffvorläufer-Gehalt während der Gärungen mit den Hefestämmen EC1118 (A) und QA23 (B) über die Zeit.

5 Diskussion

Den zentralen Punkt der vorliegenden Arbeit bilden glycosidisch gebundene Aromastoffe weißer Rebsorten. Insbesondere die Frage nach der enzymatischen Spaltung der Aromastoffvorläufer und der damit verbundenen Freisetzung geruchsaktiver Aromastoffe in der Wein- und Sektbereitung durch Mikroorganismen ist allerdings bisher unzureichend beantwortet worden und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Diese Arbeit soll einen ganzheitlichen Überblick über den aktuellen Stand der mikrobiologischen und oenologischen Literatur geben. Mit den interdisziplinär orientierten Versuchen wurde eine umfassende Charakterisierung der im Fokus stehenden, umgangssprachlich als Weinhefen bezeichneten *Saccharomyces*-Hefen und zusätzlich zum Vergleich einiger *NichtSaccharomyces*-Hefen und eines Enzympräparates vorgenommen. Die Charakterisierung beinhaltete die Bestimmung der Glycosidase-Aktivität zur Beurteilung des Freisetzungspotentials glycosidisch gebundener Aromastoffe und damit einhergehend die Möglichkeiten zur Beeinflussung des Wein- und Sektaromas. In verschiedenen Modellgärungen wurden die Hefen und das Enzym eingesetzt und die hergestellten Weine, Grundweine und Sekte chemisch bezüglich der Aromastoffvorläufer und sensorisch das gebildete Aromaprofil untersucht.

Die Umsetzbarkeit von optimierten Messmethoden zur Quali- und Quantifizierung der Aroma-Glycoside im Rahmen der derzeitigen Möglichkeiten wird diskutiert.

5.1 Angewandte Methoden zur Analytik der Aromastoffvorläufer

Für die vorliegende Arbeit sollte eine Analytik etabliert werden, mit der zuverlässig für eine große Anzahl Proben die Quantifizierung von glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufern durchführbar war. Im Vordergrund standen Einflussfaktoren auf die hydrolytische Spaltung der Aromastoffvorläufer, was indirekt über die Abnahme der Vorläufersubstanzen untersucht wurde. Die Analyse von intakten Aromastoff-Glycosiden war im Umfang dieser Arbeit nicht umsetzbar, da keine Möglichkeit zur Synthese von Standardsubstanzen bestand. In der Literatur ist die Analyse von Aroma-Glycosiden ebenso bisher nur vereinzelt beschrieben, in diesen Fällen wurden nur Analysen von ausgewählten Einzelsubstanzen unter Verwendung von aufwändig synthetisierten Standardsubstanzen mittels HPLC-MS-MS durchgeführt (Hayasaka et al., 2010b; Stanitzek, 2014). Möglich war deshalb die Quantifizierung über Glycon oder Aglycon nach Spaltung der Glycoside.

Als unkomplizierte Methode zur Ermittlung des Gesamtgehaltes der Aromastoffvorläufer im Summenparameter war der Glycosyl-Glucose-Assay nach Williams et al. (1995) vorgesehen. Mit dieser Methode erfolgt die Bestimmung aller glycosidisch gebundenen vorliegenden Stoffe als Summenparameter über die Glycone. Es stellte sich allerdings während den Messungen heraus, dass die enzymatische Spaltung der Aromastoffvorläufer in der Probenvorbereitung zu falschpositiven Ergebnissen führte, was durch daraufhin durchgeführte Zuckanalytik mittels Molisch-Test und Dünnschichtchromatographie auf das Trägermaterial des Enzympräparates AR2000 zurückzuführen war. Dieses setzte D-Glucose frei und enthielt vermutlich Maltodextrin. Eine Alternative zur Spaltung der Glycoside stellt die Säurehydrolyse dar, was aufgrund der dadurch auftretenden Umlagerungsreaktionen der Aromastoffe in der parallel durchgeführten GC-MS-Analytik nicht durchgeführt wurde (Williams et al., 1982). Die Anwendung des GG-Assay ist daraufhin als Schnellmethode nicht weiter eingesetzt worden.

Realisiert wurde die Quantifizierung von 24 glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufern mittels SPE/GC-MS speziell für die Injektion großvolumiger Proben. Die Analyse erfolgte über die mit Enzympräparat AR2000 enzymatisch freigesetzten Aglycone, diese waren den Stoffgruppen Monoterpene, C₆-Alkohole, C₁₃-Norisoprenoide, aromatischen Alkohole und flüchtige Phenole zugeordnet. Die enzymatische Spaltung der Aromastoffvorläufer vor der Messung ermöglichte die Analyse der primären Vorläufersubstanzen, d.h. ohne weitere Umlagerungsreaktionen vorliegende Aglycone. Freie Aromastoffe wurden nicht quantifiziert, da eine Korrelation zwischen der Abnahme von glycosylierten Vorläufern und dem Auftreten der entsprechenden freien Aromastoffe durch weitere Einflussfaktoren wie Umlagerungsreaktionen und Austritt durch CO₂ als nicht gegeben beschrieben wurde (Günata et al., 1986; Zoecklein et al., 1997). Diese differenzierte Analyse der Aglycone ermöglichte, im Gegensatz zum GG-Assay als Summenparameter, die Zuordnung des in einer Probe gemessenen Aromapotentials zu einem auftretenden Aromaeindruck, zudem werden andere glycosyliert vorliegenden Stoffe nicht mit einbezogen. Die gesamte SPE/GC-MS-Methode wurde in Anlehnung an Schneider et al. (2004) und Ibarz et al. (2006) etabliert, die Modifikationen am GC zur großvolumigen Injektion nach Magni und Porzano (2003). Durch die Injektion großer Probenvolumina konnten weitere Schritte der Probenvorbereitung zur Aufkonzentrierung der Analyten eingespart werden, welche neben einer Verringerung des Arbeitsaufwands auch das Risiko weiterer Verluste oder Verschleppungen herabsetzte. Die Automatisierung der SPE erhöhte ebenfalls den Probendurchsatz und minimierte die Schwankungen in der technischen Replikation der Proben, da jede Probe in dreifacher Wiederholung den gesamten Extraktionsprozess durchlief. Die Anwendung des SIVA ermöglichte eine verlässliche Quantifizierung der Aromastoffe (Milo und Blank, 1998). Die Methode ist im Rahmen der Arbeit validiert worden. Für die GC-MS-Analytik wurde eine gute Wiederfindung und Reproduzierbarkeit der Messungen erwiesen. Die mittlere Abweichung von Ist- zu Soll-Werten bei aufdotierten Proben über den gesamten Kalibrierbereich lag bei $\pm 16\%$, die Stabilität des Systems wurde über wiederholte Messungen gleicher Proben an verschiedenen Tagen durch sehr geringe Schwankungen zwischen $-4,9\%$ bis $+3,7\%$ verdeutlicht. Die Quantifizierung aller Messreihen wurde kontinuierlich über eine als externen Standard eingesetzte Kalibrierprobe kontrolliert und die korrekte Injektion der Proben über die Retentionszeit des Standards *n*-Dekan überprüft. Über die Gesamtmethode aus SPE, enzymatischer Hydrolyse und GC-MS wurde eine mittlere Wiederfindungsrate der Analyten aller analysierten Proben von 93% bei einer Abweichung von 30% ermittelt. Diese Abweichung fand sich ebenso zwischen den technischen Replikaten einer Probe wieder und wies auf eine Abhängigkeit zu den Substanzgruppen hin, da die Schwankungen unterschiedlich hoch ausgeprägt waren. Eine mögliche Ursache stellt die SPE dar, da Säulendurchbruch nachweisbar war. Dieser Effekt schien sowohl abhängig von der Substanzgruppe als auch von der Probenmatrix sowie der Kombination beider Faktoren. In Wein-Proben, vermutlich durch die Ethanol-Wasser-Matrix, wurden insbesondere Vorläufer der C₆-Alkohole und aromatischen Alkoholen ausgewaschen und bei Most-Proben, vermutlich durch die Polarität bedingt, insbesondere C₁₃-Norisoprenoide. Der Vergleich von Riesling und Muskateller wies für Proben mit hohen Konzentrationen an Aromastoffvorläufern höhere Verluste während der SPE nach, was vermutlich durch die Sättigung des Säulenmaterials zustande kommt. Für den Extraktionsschritt existierte in der durchgeführten Methode allerdings keine Alternative, das verwendete polymerbasierte Säulenmaterial war zudem als am besten geeignet getestet worden (Ibarz et al., 2006; Stanitzek, 2014). Aufgrund der Verluste in der SPE sollte ein systematischer Fehler in der absoluten Aromastoffvorläufer-Konzentration in Betracht gezogen werden. Die Abhängigkeit

des Effektes von Probenmatrix und Substanzgruppe sollte ebenfalls in die Diskussion von vergleichender Betrachtung von Proben, insbesondere bei Most gegen Wein, einbezogen werden. Der Vergleich von Most- bzw. Weinproben untereinander hingegen ist unproblematisch, insbesondere bei Versuchen innerhalb einer Rebsorte. Einen weiteren möglichen kritischen Schritt stellte die Spaltung der Aromavorläufer mittels enzymatischer Hydrolyse vor der Messung mittels GC-MS dar. Die Aktivität des verwendeten Enzympräparates wurde regelmäßig mittels pNPG-Assay kontrolliert, weswegen von einer vergleichbaren Freistzungsrate bei allen Proben ausgegangen wird. Über den tatsächlich vorhandenen absoluten Gehalt der Aromastoffvorläufer bei hundertprozentiger Spaltung kann keine sichere Aussage getroffen werden. Das verwendete Enzympräparat AR2000 wurde in Vorarbeiten durch seine Zusammensetzung aus den nötigen Glycosidasen als das effektivste Präparat zur Hydrolyse von Aroma-Glycosiden ermittelt und durch einen hohen Wirkungsgrad beschrieben (Stanitzek, 2014; Dziadas und Jeleń, 2016). Die enzymatische Spaltung ist jedoch grundsätzlich sowohl von der Struktur des Aglycons als auch von der Art des Glycons abhängig. Für Enzyme aus *Aspergillus niger*, wie dem verwendeten Präparat AR2000 ist beispielsweise beschrieben, dass bevorzugt tertiäre Terpenalkohole im Vergleich zu primären Terpenalkoholen aus der glycosidischen Bindung freigesetzt werden. (Gunata et al., 1990a). Für dieses Problem existieren bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Alternativen, die Säurehydrolyse ist durch das Verursachen von Umlagerungsreaktionen und Artefaktbildung für die Anwendung ungeeignet (Williams et al., 1982). Schlußendlich bleibt zu berücksichtigen, dass die Bestimmung der Wiederfindungsrate der Analyten über die Gesamtmethode nur semiquantitativ über den Standard Octyl- β -D-Glucopyranosid durchgeführt werden konnte. Dadurch bleiben eventuelle substanzabhängige Unterschiede unbeachtet. Deuterierte interne Standards in Form von Aroma-Glycosiden standen nicht zur Verfügung, diese wurden bei der Anwendung des SIVA deshalb erst nach der hydrolytischen Spaltung als deuterierte freie Aromastoffe zugegeben.

Bei der Entwicklung einer Schnellmethode zur Quantifizierung der Aromastoffvorläufer mittels FT-MIR-Spektroskopie wurde die etablierte GC-MS-Methode als Referenzanalytik eingesetzt. Es muss daher grundsätzlich berücksichtigt werden, dass systematische Fehler aufgrund Verlusten durch die SPE oder selektiver bzw. unvollständiger Spaltung der Vorläufer in der enzymatischen Hydrolyse in die neue, indirekte Messmethode mit einkalibriert werden. Dennoch wäre die Entwicklung einer solchen Methode aufgrund ihrer unkomplizierten Anwendung lohnenswert. In dieser Arbeit sind bisher analog zwei Basiskalibrationen aus jeweils 37 heterogenen Most- und Wein-Proben erstellt worden. Dazu wurden die in Vorversuchen als geeignet zur Optimierung des Analyten-zu-Hintergrund-Signals ermittelten Kombinationen aus DMSO bzw. Methanol in 150 μ m Küvetten verwendet. Nach zunächst vielversprechenden Korrelationen für die einzelnen Substanzgruppen der Aromastoffvorläufer konnten die Kalibrierungen der Validierung mit einem unabhängigen Datensatz jedoch nicht standhalten. Es kann durch die erst begonnene Kalibrierarbeit bisher keine sichere Aussage über die Umsetzbarkeit der Methode getroffen werden. Problematisch ist die geringe Konzentration der Aromastoffvorläufer, die trotz der Aufkonzentrierung durch Extraktion unter der normalen Nachweisgrenze für die FT-MIR-Spektroskopie von 100 mg/L liegen (Berger, 2013). Der bislang erstellte Datensatz umfasst zudem einen zu geringen Probenumfang und muss um weitere heterogene Proben erweitert werden. Auch aus der Literatur ist nicht bekannt, ob die von Schneider et al. (2004) veröffentlichte aussichtsreiche Basiskalibration erfolgreich angewendet werden kann. Die von den Autoren publizierte Minorkomponenten-Kalibration wurde für die geringe Probenanzahl von 39 Proben von ausschließlich Mosten der Rebsorte Melon de Bourgogne erstellt. Die Methode wurde

anhand des Bestimmungsmaß R^2 sowie des Vorhersagefehlers RMSECV bewertet, eine Validierung mit entsprechenden RMSEP-Werten stellten die Autoren nicht vor bzw. ist bis heute nicht veröffentlicht worden. In dieser Arbeit kommen neben dem grundsätzlichen Konzentrationsproblem der Aromastoffvorläufer und der bisher zu geringen Probenanzahl einige mögliche Fehlerquellen in Betracht. Problematisch blieb die Probenapplikation nach Umbau des Gerätes FT 120, wodurch die Voraussetzung der Temperatur- und Druckstabilität zur Messung vermutlich nicht ausreichend gewährleistet war. Daraus resultierte möglicherweise die bisher ungeklärte mangelhafte Wiederholbarkeit bei der Messung der Proben mittels FT-MIR-Spektroskopie. Als weiteres Vorgehen sollte daher die manuelle Probenaufgabe optimiert werden, beispielsweise durch Automatisierung mittels eines HPLC-Probengebers zur Sicherstellung eines geschlossenen temperatur- und druckstabilen Systems zum Erreichen bestmöglicher Wiederholbarkeit. Weitere Ursachen könnten möglicherweise in Messschwankungen der Referenzanalytik SPE/GC-MS begründet liegen. Zusätzlich unterscheidet sich die Referenzanalytik zur FT-MIR-Spektroskopie dahingehend, dass mittels GC-MS die zuvor freigesetzten Aromastoffe analysiert werden, während in die FT-MIR-Analytik die intakten Aroma-Glycoside gemessen werden. Die Abweichungen zwischen beiden Analysen sollten dementsprechend die Probenvorbereitung betreffend möglichst weiter minimiert werden. Die Referenzanalytik betreffend, könnten eventuell generell Alternativen bedacht werden, wie beispielsweise Analytik mittels HPLC-MS-MS bei Synthese entsprechender Standards.

5.2 Einflussfaktoren auf den Ausgangsgehalt der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer

Es sind diverse Einflussfaktoren auf den Ausgangsgehalt der Aromastoffvorläufer bekannt, von denen wohl am längsten die Rebsorte als biologisch determinierender Faktor bekannt ist (Gunata et al., 1985b; Mateo und Jiménez, 2000). Während der Traubenverarbeitung kann dieses sogenannte Ausgangsaromapotential, von diesem ausgehend später geruchsaktive freie Aromastoffe freigesetzt und durch weitere Umlagerungsreaktionen gebildet werden können, weitreichend moduliert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sich auf die Teilschritte der Maischestandzeit und der Pressung beschränkt, welche bisher ausschließlich anhand GG-Assay auf die Gesamtsumme aller vorhandenen glycosylierten Substanzen untersucht worden sind (Fischer et al., 2001; Papargyriou, 2003).

Rebsorte

Mittels Varianzanalyse, Hauptkomponentenanalyse und Diskriminanzanalyse erfolgte die statistische Auswertung der in verschiedenen Versuchsteilen dieser Arbeit untersuchten Proben. Es handelte sich um 103 Moste aus neun verschiedenen Rebsorten und 126 Weine aus acht Rebsorten. Es bestätigte sich die in der Literatur für freie Aromastoffe etablierte Klassifizierung der Rebsorten anhand der Aromastoffprofile (Rapp et al., 1993), welche auch auf glycosidisch gebundene Vorläufer übertragbar ist (Mateo und Jiménez, 2000). Insbesondere anhand der Monoterpenvorläufer-Gehalte wurden die dem Muskat-Typ zugehörigen Sorten Muskateller und Morio Muskat von allen anderen Mosten bzw. Weinen differenziert. Diese waren zusätzlich auch durch hohe Gehalte an C_6 -Alkohol-Vorläufern charakterisiert. Die neutralen Rebsorten Chardonnay, Airén, Ugni blanc waren hingegen durch geringe Gehalte an Aromastoffvorläufern aller Substanzgruppen vertreten. Die Rebsorte Riesling, nach der als Riesling-Typ benannt allgemein Rebsorten mit mittleren Aromastoff- bzw. vorläufer-Gehalte eingruppiert werden, war über alle Proben hinweg mit stark variierenden Ausgangsgehalten insbesondere der Monoterpen- und C_6 -Alkohol-

Vorläufer vorhanden. Die Auswirkungen von weiteren Einflussfaktoren außer der Rebsorte wurden hier nicht berücksichtigt, eine diesbezügliche Analyse findet sich im nächsten Kapitel zur Traubenverarbeitung. Allerdings weist das Beispiel des Rieslings bereits durch die weite Verteilung der Aromastoffvorläufer-Gehalte auf die Modulierbarkeit des Ausgangspotentials an theoretisch freisetzbaren Aromastoffen hin. Weitere Rebsorten wie Sauvignon blanc und Scheurebe, die neben glycosidisch gebundenen Vorläufern verstärkt durch in dieser Arbeit nicht analysierte Aromastoffe wie Methoxypyrazine und cysteingebundene Vorläufer charakterisiert sind (Sefton et al., 1994), waren ebenfalls in Richtung mittlerer Gehalte einzugruppiert. Die Auswertung der Einzelsubstanzen zugehörig den Substanzgruppen ergab keine Schlüsselsubstanz als Alleinstellungsmerkmal, die sich aus der jeweiligen Substanzgruppe hervorhob. Moste waren generell durch höhere Vorläufergehalte repräsentiert als Weine, da deren Abnahme aufgrund säurehydrolytischer und enzymatischer Freisetzung während der Gärung in jedem Fall stattfindet (Sarry und Günata, 2004).

Traubenverarbeitung: Maischestandzeit und Pressung

Um den Most aus den Traubenbeeren zu gewinnen, muss im Laufe der Traubenverarbeitung eine Trennung der festen und flüssigen Bestandteile, d.h. von Trester und Saft, erfolgen. Zuvor werden die Trauben angedrückt, damit entsteht die Maische, ein Gemisch aus allen Traubenbestandteilen (Christmann, 2001). Der Kontakt der Bestandteile führt zur Extraktion von entsprechend lokalisierten Stoffen in den Most, wodurch das Variieren des Verarbeitungsablaufs hypothetisch eine wichtige Stellschraube zur Modulierung des Gehaltes von Aromastoffvorläufern darstellt. Diese sind zu großen Teilen insbesondere in der Beerenhaut lokalisiert (Gunata et al., 1985b; Gomez et al., 1994; Fischer et al., 2001).

Maischestandzeit

Die Rebsorten Riesling, Gewürztraminer und Muskateller wurden in den Jahrgängen 2013 und 2014 ausgehend von Kontrollproben ohne Standzeit vierstündlich beprobt und der extrahierte Gehalt an Aromastoffvorläufern in den Mosten quantifiziert. Zunächst blieb der signifikante Einfluss der Rebsorte erhalten, der den Einfluss des Jahrgangs als dominanter Faktor überstieg. Für die durch hohe Gehalte an Aromastoffvorläufern charakterisierte Rebsorte Muskateller war die signifikante Steigerung der Extraktion sehr deutlich, für den durch mittlere Vorläufergehalte repräsentierten Riesling war der Effekt ebenfalls messbar aber weniger stark ausgeprägt, ebenso für den Gewürztraminer. Die Kompartimentierung der glycosidisch gebundenen Vorläufersubstanzen in der Traubenbeere ist als rebsortenabhängig beschrieben (Fischer et al., 2001). Daraufhin ist vermutlich auch die Auswirkung der Maischestandzeit zur Extraktion der Aromastoffvorläufer von der Rebsorte abhängig. Insgesamt bestand durch Verlängerung der Maischestandzeit statistisch der größte Einfluss auf die Extraktion der C₆-Alkohole in den Most, welche als Abbauprodukte von Membranlipiden bereits in der Literatur desöfteren als beeinflussbar durch Maischestandzeit oder Enzymeinsatz bei der Traubenmazeration beschrieben wurden (Cabaroglu et al., 1997; Oliveira et al., 2006). Im Fall des Muskatellers ebenfalls gesteigert wurde die Ausbeute der C₁₃-Norisoprenoid-Vorläufer, welche aufgrund der photoprotektiven Wirkung der Carotinoide als deren Vorläufersubstanzen ebenfalls in der Beerenhaut akkumulieren (Guedes de Pinho et al., 2001). Desweiteren für alle Rebsorten ersichtlich war die signifikant gesteigerte Extraktion an Vorläufern der geruchsaktiven Monoterpene Linalool, Geraniol und Nerol. Es ist bereits ein Zusammenhang von erhöhter Glycosyl-Glucose und der Zunahme von blumigen und fruchtigen Aromen festgestellt (Fischer et al., 2001; Papargyriou, 2003), ebenfalls von Frische, Fruchtigkeit und Körper bei einer erhöhten

Extraktion von Glycosiden der Monoterpene, aromatischen Alkohole und C₁₃-Norisoprenoide (Palomo et al., 2006). Zusätzlich muss bei verlängerter Maischestandzeit beachtet werden, dass auch Verursacher negativ assoziierter Aromaeindrücke stärker extrahiert werden können. Am Beispiel des Rieslings wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die signifikant gesteigerte Extraktion des glycosylierten flüchtigen Phenols 4-Vinylguaiacol nachgewiesen, die auch bereits von Marais und Rapp (1988) beschrieben wurde. Es kann aufgrund fehlender sensorischer Daten für diesen Versuchsteil nicht beurteilt werden ob sich durch Freisetzung dieses erhöhten Gehaltes die Wahrnehmung des negativen Aromas von rauchig, medizinisch erhöhte. Im ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführten Versuch zur experimentellen Sektbereitung für die Rebsorte Riesling führte der Einsatz von Maischestandzeit allerdings weder in den Grundweinen noch in den Sekten zu erhöhter Wahrnehmung von Fehlparomen aus dem Bereich der Phenole. Allerdings war es möglich, die Varianten aufgrund der Traubenverarbeitung durch Ganztraubenpressung oder Standzeit zweier Traubenpartien bis hin zu den finalen Sekten analytisch und sensorisch zu differenzieren. Polyphenole können zu Bitterkeit und Adstringenz führen und sind vor allem in den Kernen und der Haut von weißen Traubenbeeren enthalten (Singleton und Esau, 1969), weshalb diese Stoffe theoretisch ebenfalls durch erhöhte Maischestandzeit verstärkt extrahiert werden. Allerdings sind die Gesamtgehalte vergleichsweise gering (Ritter, 1997; Nikfardjam, 2011). Diverse sensorische Studien konnten dazu ergänzend keine verstärkte Wirkung der Bitterkeit aufgrund Maischestandzeit erkennen (Test et al., 1986; Fischer et al., 2001; Papargyriou, 2003; Sokolowsky, 2014; Sokolowsky et al., 2015). Weitere Einflüsse verlängerter Maischestandzeit können auftreten. Im Kontext der Untersuchung der Aromaveränderung ist insbesondere die Erhöhung des Most-pH durch erhöhten Kaliumeintrag zu nennen, was nachfolgend zu sensorischer Veränderung führen kann und ein verstärktes Risiko mikrobiellen Befalls birgt (Test et al., 1986; Cheynier et al., 1989; Schneider, 2008).

Pressung

Die Argumentation zur Erhöhung Saftausbeute und Steigerung der Extraktion von Aromakomponenten aus der Maische ist ähnlich der zur Maischestandzeit zu führen. Zu diesem Thema finden sich allerdings kaum Daten aus der Literatur. Die Arbeit von Papargyriou (2003) zeigte einen Anstieg aller glycosidisch gebundenen Substanzen erst ab dem bereits vergleichsweise hohen Pressdruck von 1,5 bar. Eine weitere Studie wies rebsortenabhängig Auswirkungen der Pressung auf Monoterpen-Glycoside nach, die nur teilweise in sensorischen Veränderungen der hergestellten Weine resultierte (Reynolds et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden eingemaischte Trauben der Rebsorten Riesling, Gewürztraminer und Muskateller aus 2014 nach Standzeit in ansteigenden Druckstufen gepresst. Für die Rebsorte Riesling ist zusätzlich eine Variante ohne Absolvieren von Standzeit direkt gepresst worden. Der Anstieg des Pressdruckes führte mit der maximalen angelegten Druckstufe von 1,5 bar für die untersuchten Aroma-Glycoside der C₆-Alkohole, Monoterpene, C₁₃-Norisoprenoide, aromatischen Alkohole sowie flüchtigen Phenole zu signifikant erhöhter Extraktion. Dieser Effekt wurde, wie in der Arbeit von Papargyriou beschrieben, erst beim Anlegen von hohem Druck erreicht, bis ca. 0,6 bar korrelierten die Ergebnisse aus Druckstufe und Extraktion nicht. Eine zusätzliche Verstärkung der Aromastoffvorläufer-Ausbeute wurde, ebenfalls wie in der Arbeit von Papargyriou (2003) gezeigt, für das untersuchte Beispiel des Rieslings durch vor der Pressung absolvierte Maischestandzeit im Vergleich zur Kontrolle erreicht. An dieser Stelle kann bezüglich der Auswirkungen des Pressdruckes auf die Sensorik von Wein und Sekt keine Aussage

getroffen werden, vermutlich können die im Kontext der Maischestandzeit diskutierten Ergebnisse, zumindest eingeschränkt, auf die Pressung übertragen werden.

5.3 Einfluss auf die Hydrolyse der glycosylierten Aromastoffe

Die gezielte Freisetzung der glycosidisch gebunden vorliegenden Aromastoffe ist unumstritten von Bedeutung, da ein großer Teil der sehr heterogenen Aromastoffe, darunter viele mit wesentlichem Einfluss auf das Weinaroma („Impact“-Aromen), diverse positive wie die blumigen Monoterpene oder die süßlichen C₁₃-Norisoprenoide als auch negative Eindrücke verursachende wie die flüchtigen Phenole, in dieser geruchlosen Form vorliegt (Noble et al., 1987). Bestenfalls wäre daraufhin die angestrebte gesteuerte Freisetzung dieser Aromavorläufer durchführbar, um zum einen quantitativ aber auch qualitativ das Aroma des fertigen Weines oder Sektes bestimmen zu können. Während der Gärung stehen dazu als Werkzeuge Mikroorganismen, d.h. Hefen, Bakterien und Enzympräparate, zur Verfügung. Genaue Kenntnisse von deren enzymatischer Aktivität, darunter die individuelle enzymatische Ausstattung, Wirkungsgrad und –optimum sowie Substrat-Spezifität sind zu deren Auswahl zur Wein- und Sektbereitung wesentlich. Weitere Eigenschaften wie insbesondere die Bildung von Fehlparomen oder Nebenaktivitäten müssen bekannt sein. Nicht zu steuern ist die fortwährend durch den pH des Weines ablaufende Säurehydrolyse der Vorläufer (Sarry und Günata, 2004).

Die vorliegende Arbeit diene vor allem der Untersuchung der umgangssprachlich als „Weinhefen“ zur Gärung eingesetzten Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus*. Für kommerziell erhältliche Reinzuchthefestämme sollte eine umfassende Charakterisierung erstellt werden, um sie je nach Ausgangssituation im Most oder Sektgrundwein zur gezielten Freisetzung der Aromastoffvorläufer während der Gärung auswählen zu können. Die Kombination von Hefestämmen mit entsprechenden Freisetzungsvermögen in der ersten und zweiten Gärung sollte eine produktorientierte Sektherstellung ermöglichen. In der Literatur lagen allerdings unterschiedliche, zum Teil gegensätzliche Ergebnisse vor und wurden kontrovers diskutiert, desweiteren ließen selbst durchgeführte experimentelle Gärungen das grundsätzliche Freisetzungsvermögen der *Saccharomyces*-Hefen in Frage stellen. Zur Klärung der Grundlagen schloss sich eine umfassende Literatur- und Datenbank-Recherche mit anschließender Analyse der Genexpression und Glycosidase-Aktivität der Hefestämmen an. Desweiteren wurden zum Vergleich einige *Nicht-saccharomyceten* und das aus *Aspergillus niger* stammende Enzympräparat AR2000 in die Versuche einbezogen.

Charakterisierung der Glycosidase-Aktivität von *Saccharomyces*-Hefen

Die in den experimentellen Gärungen verwendeten, kommerziell erhältlichen *Saccharomyces*-Reinzuchthefen sind mittels Plattentest auf Arbutin und Cellobiose negativ auf β -Glucosidase-Aktivität getestet worden. Positives Wachstum konnte hingegen für die Laborstämme der Arten *Pichia anomala* und *Debaromyces hansenii* gezeigt werden. Dieses Ergebnis war stimmig mit einer Vielzahl von Studien, in denen Hefen mittels Kohlenstoff-Mangelmedium unter Zugabe eines glycosylierten Substrates charakterisiert wurden. Rosi et al. (1994) detektierten bei Verwendung von Arbutin beispielsweise unter 153 untersuchten Stämmen ausschließlich einen zum Wachstum fähigen Stamm, in den Untersuchungen von Fia et al. (2005) oder Daenen et al. (2008) waren alle Stämme negativ getestet worden. Arbutin ist spezifisch nur durch das Enzym β -Glucosidase spaltbar, weswegen es als Nachweis für die Existenz des Enzyms angesehen werden kann (Rodríguez et al., 2004). Für die untersuchten Hefen konnte entsprechend das Enzym β -Glucosidase nicht festgestellt

werden. Auf Vollmedium hingegen waren alle Hefen zum Wachstum fähig, weswegen grundsätzlich die Fähigkeit der Hefen zum Wachstum gegeben war. Im durchgeführten pNPG-Assay wurde für alle Reinzuchthefestämme eine basale Aktivität zwischen 27 und 79 $\mu\text{U}/\text{mg}$ gemessen. Diese Werte waren im Vergleich mit der Positivkontrolle *Pichia anomala* bei 796 $\mu\text{U}/\text{mg}$ sowie mit dem Enzympräparat AR2000 bei 103 mU/mg signifikant geringer und unterschieden sich nicht untereinander. In der Publikation von Daenen et al. (2008) wurden ebenfalls vergleichsweise geringe Aktivitäts-Werte für *Saccharomyces* bis unter 2 mU/mg beschrieben. Mittels rekombinanter Expression in *E. coli* wurde die Substratspezifität des Enzyms überprüft und für pNPG eine relative Hydrolyse-Rate von 22% sowie für Cellobiose von 3% zu dem zu 100% hydrolysierten Substrat Laminaran gefunden (Suzuki et al., 2001). Daraus erklärt sich vermutlich die zwar geringe aber dennoch nachweisbare Enzymaktivität der *Saccharomyces*-Hefen im Assay mit Substrat pNPG, aber das nicht mögliche Wachstum auf Arbutin oder Cellobiose. Mittels dem Substrat Cellobiose charakterisierten Daenen et al. (2008) ebenfalls sämtliche Hefen als negativ. Letztlich kann aufgrund der durchgeführten Charakterisierungen mittels Plattentests und Aktivitäts-Assay für die untersuchten Hefestämme, welche auch zu experimentellen Gärungen eingesetzt wurden, von einer geringen und zwischen den Hefestämmen marginal unterschiedlichen glycosidischen Aktivität ausgegangen werden.

Desweiteren ungeklärt bleibt die Existenz und Aktivität der zusätzlich zur Freisetzung der zu großen Teilen an Disaccharide gebundenen Aromastoffe nötigen Disaccharidasen β -D-Apiofuranosidase, α -L-Arabinofuranosidase und α -L-Rhamnopyranosidase. Delcroix et al. (1994) wiesen β -Glucosidase-, α -Arabinosidase- und α -Rhamnosidase-Aktivität bei drei *Saccharomyces*-Hefen nach, da entsprechend mono- und diglycosyliertes pNP als Substrat gespalten wurde. Die verantwortlichen Enzyme identifizierten die Autoren allerdings nicht. Diesbezüglich ist zudem nichts über die Nebenaktivitäten anderer Enzyme bekannt, die eventuell an der Spaltung der Disaccharide beteiligt sein könnten.

Im Kontext der Diskussion ist zu beachten, dass die Begrifflichkeiten der enzymatischen Aktivität und des verantwortlichen Enzyms verschiedene Aussagen beinhalten. Es ist bekannt, dass in *Saccharomyces*-Hefen, bis auf die Ausnahme des Stammes AL41, kein Gen für Enzym 1,4- β -Glucosidase existiert (Quatrini et al., 2008), wohl aber die Expression der Gene EXG1, SPR1 und YIR007W mit dem Auftreten von Glycosidase-Aktivität in Zusammenhang steht (Schmidt et al., 2011). Mittels *knockout*- (Schmidt et al., 2011) und Überexpressionsstudien (Gil et al., 2005) wurde gezeigt, dass ausschließlich die Expression von Gen EXG1 Einfluss auf die Spaltung glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer aufweist. Das Gen codiert für eine zellwandständige, extrazellulär sekretierte β -1,3-Glucanase, die damit Substrat-unspezifisch auch Glycosidase-aktiv ist.

Die Analyse von EXG1, SPR1 und YIR007W in dieser Arbeit demonstrierte die aktive Expression der drei Gene in den untersuchten Hefestämmen EC1118 und QA23 und damit prinzipiell deren genetische Ausstattung zur Enzymtätigkeit. Zwischen den untersuchten Hefestämmen EC1118 und QA23 bestand für die Genexpression zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied in der Höhe der relativen Expression.

Die auf den Anfangspunkt der Gärung normierte relative Expression zeigte bei beiden Hefen einen kontinuierlichen und signifikanten Anstieg für Gen EXG1 von Beginn bis zum Ende der Gärung. In der Literatur wurde nur dem Gen EXG1 eine signifikante Ursache der Freisetzung von Glycosiden zugeschrieben, für die beiden weiteren Gene dagegen war kein Effekt feststellbar (Gil et al., 2005; Schmidt et al., 2011). Für beide Hefen war die Expression zum

Gärende maximal ausgeprägt; für Hefe EC1118 4,41fach und für Hefe QA23 3,17fach gegenüber Gärbeginn. Die Glucose war bei Hefe EC1118 nach 504 Stunden sowie bei Hefe QA23 nach 336 Stunden vollständig abgebaut. Es ist möglicherweise ein Mechanismus der glucophilen Hefen, bei Mangel an Glucose zur Erschließung neuer Glucose-Quellen auch glycosidisch gebundene Aromastoffvorläufer zu hydrolysieren. Demnach ist die maximale Expression von EXG1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten vermutlich auf den unterschiedlich schnellen Abbau der Glucose zurückzuführen. Umgekehrt scheint bei vorhandener freier Glucose eine Hemmung zu bestehen. In der Literatur ist eine Hemmung der Glycosidase-Aktivität bei Hefen durch die Anwesenheit von Glucose um 20-30% von der Maximalaktivität beschrieben (Delcroix et al., 1994).

Über den Gärverlauf wurde die signifikante Abnahme der glycosylierten Aromastoffvorläufer der C₆-Alkohole, Monoterpene und aromatischen Alkohole nachgewiesen. Damit wird ein kausaler Zusammenhang zwischen der Aromavorläufer-Spaltung und dem Anstieg der Expression von Gen EXG1, welches für die β -1,3-exo-Glucanase EXG1p codiert, aufgrund des abnehmenden Glucose-Gehaltes während der Gärung angenommen.

Einfluss der *Saccharomyces*-Hefen während der Gärung

Erste Gärung: Wein und Sektgrundwein

In den bei Verwendung von pasteurisiertem Riesling-Most durchgeführten experimentellen Gärungen wurde eine signifikante Abnahme der glycosidisch gebundenen C₆-Alkohole, Monoterpene und aromatischen Alkohole über den Verlauf der Gärung dokumentiert. Diese ging, wie bereits im Abschnitt zur Charakterisierung der Glycosidase-Aktivität von *Saccharomyces*-Hefen dargelegt, mit der ansteigenden Expression von Gen EXG1 einher. Demnach scheint die Höhe der Expression vom Abbau der Glucose abhängig zu sein. Auffällig war eine erhöhte Freisetzungsrates der Aromastoffvorläufer zum Ende der Gärung hin, was vermutlich mit der zu diesem Zeitpunkt gesteigerten Genexpression zusammenhing. Dagegen war für die Vorläufer der C₁₃-Norisoprenoide und flüchtigen Phenole keine Freisetzung während der Gärung feststellbar. Das ist möglicherweise durch die Aglycon-spezifische Spaltung durch das Enzym bedingt, wie sie unter anderem von Gunata et al. (1990a) für verschiedene Monoterpenalkohole aufgrund ihrer Strukturisomerie dokumentiert wurde. Zwischen den untersuchten Hefestämmen EC1118 und QA23 bestand im Verlauf der Gärung von Riesling-Sterilmost ein signifikanter Unterschied für die Vorläufer der C₆-Alkohole, Monoterpene und aromatischen Alkohole. Zum Endpunkt der Gärung waren diese Unterschiede allerdings nicht mehr nachweisbar. Auch nach der Gärung von Muskateller-Sterilmost mit den Stämmen Freddo und Siha Cryarome wurden keine Unterschiede in der Aromastoffvorläufer-Freisetzung festgestellt. Möglicherweise waren die während der laufenden Gärung detektierten Unterschiede zwischen den Hefen durch die unterschiedliche Geschwindigkeit des Glucose-Abbaus bedingt, wodurch die Höhe der Genexpression von EXG1 und damit möglicherweise die Freisetzungsrates der Aromastoffvorläufer beeinflusst war. Aufgrund der Verwendung von pasteurisierten Mosten und der Versuchsdurchführung unter sterilen Bedingungen im Labor waren mikrobiologische Fremdeinflüsse auszuschließen.

Die Gärungen von Chardonnay mit zwei sowie von Riesling mit sechs unterschiedlichen *Saccharomyces*-Hefestämmen resultierten, ebenso wie die Gärungen mit Sterilmost, in einer signifikanten Abnahme von Vorläufern der C₆-Alkohole, Monoterpene und aromatischen Alkohole. Die Abnahme der Aromastoffvorläufer im Verlauf der Gärung wurde in der bisher veröffentlichten Literatur beschrieben. Fischer et al. (2001) beobachteten eine Verringerung

der Glycosyl-Glucose, die proportional zum Abbau des Gesamtzuckers während der Gärung war. Günata et al. (1986) zeigten eine Abnahme der Gesamt-Terpenglycoside, die vom gebundenen Aromastoff abhängig war. An der Spaltung der Aromastoffvorläufer ist nachweislich das Enzym Exg1p, eine β -1,3-exo-Glucanase, der Hefen beteiligt (Gil et al., 2005; Schmidt et al., 2011). Als weitere Ursache zur Verringerung der Vorläufer-Gehalte wurde die Adsorption an Hefezellwände diskutiert. Diese ist allerdings von Chassagne et al. (2005a) als gering beschrieben worden, die Autoren wiesen nur 5% der Aroma-Glycoside als adsorbiert vorliegend nach. Zusätzlich muss eine bei Most- und Wein-pH ständig ablaufende Säurehydrolyse in Betracht gezogen werden, die ebenfalls zur Spaltung der Aromastoffvorläufer führt (Sarry und Günata, 2004).

Der Einfluss des Hefestammes in den Gärungen bestand aromachemisch für die hergestellten Chardonnay-Weine auf glycosidisch gebundene C₆-Alkohole und Monoterpene sowie für die Riesling-Weine auf die Monoterpen-Vorläufer. Darunter waren auch Vorläufer von Schlüsselaromastoffen wie Linalool, Geraniol und Nerol zu finden. Die sensorischen Analysen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Die Chardonnay-Weine unterschieden sich in keinem der Geruchsattribute, bei den Riesling-Weinen wurden Unterschiede in den Attributen Zitrusfrüchte und grünes Gras festgestellt. Erwartet hätte man eine unterschiedliche Wahrnehmung im Attribut blumig, da dieser Geruchseindruck durch Monoterpene verursacht wird. Die Korrelation aus chemischer und sensorischer Analytik mittels PLS-Regression verdeutlichte den geringen Einfluss der Hefen auf die Aromausprägung der Chardonnay-Weine durch die Freisetzung von Aromastoffen. Die Weine waren anhand des Hefestammes mittels der multivariaten Statistik kaum differenzierbar und weniger durch freigesetzte Aromastoffe, als vielmehr durch Aromastoffvorläufer repräsentiert. Ein etwas diffuseres Bild ergab die PLS-Regression der Riesling-Weine, die aber insgesamt einen geringen Erklärwert besaß. Ein großer Unterschied wurde insbesondere bei dem mit Hefestamm HPS hergestellten Wein beobachtet, bei welchem spontan ein mikrobiell verursachter biologischer Säureabbau (BSA) auftrat. Damit verdeutlichte sich die Möglichkeit der Beeinflussung durch andere Mikroorganismen und die Vergleichbarkeit der sensorischen Ergebnisse war nicht mehr gegeben. Milchsäurebakterien, insbesondere *Oenococcus oeni*, sind nachweislich zur Freisetzung von Aromastoffvorläufern fähig (Boido et al., 2002; Mansfield et al., 2002; Ugliano et al., 2003). Die Untersuchungen zum Hefeeinfluss mit Chardonnay und Riesling ergaben unabhängig vom BSA inkonsistente Ergebnisse, wodurch kein prognostizierbarer Effekt aufgrund der Auswahl des Hefestammes vorlag. Der Einsatz des Enzympräparates AR2000 aus *Aspergillus niger*, welches im Vergleich zum alleinigen Hefe-Einsatz zu einer signifikanten Steigerung der Aromastoffvorläufer-Freisetzung und Intensivierung des Aromas in den Weinen führte (s. Abschnitt Technisches Enzympräparat: Charakterisierung und Gärung), relativierte die inkonsistenten Ergebnisse zusätzlich und legen nahe, dass der Einfluss von *Saccharomyces*-Hefen auf die Freisetzung des Aromapotentials während der Gärung marginal ist.

Das Ausgangstraubenmaterial für die Herstellung von Sektgrundweinen unterscheidet sich durch den früheren Erntezeitpunkt von dem für die Weinherstellung und ist daraufhin durch geringere Ausgangsgehalte an Aromastoffvorläufern charakterisiert. (Robinson et al., 2014a). Es bestand dadurch kein Einfluss auf die Abnahme der Aromastoffvorläufer während der Gärung, da diese von den Mosten zu den Grundweinen analog den zuvor beschriebenen Gärungen stattfand. Auch die zusätzliche Variation der Ausgangskonzentration durch Rebsorte und Traubenmaterial wirkte sich nicht auf die Höhe der Vorläufer-Freisetzung aus.

Der Einsatz verschiedener Hefestämme zur Gärung beeinflusste die Gehalte der Aromastoffvorläufer im Grundwein nur marginal. Etwaige Unterschiede waren nicht reproduzierbar. Chardonnay- und Muskateller-Grundweine wurden mit den Hefestämmen DV10 und BC hergestellt. Während sich die Chardonnay-Grundweine aufgrund dieser eingesetzten Hefen in den Vorläufergehalten flüchtiger Phenole unterschieden, führten die Hefen beim Muskateller zu Unterschieden in den Vorläufergehalten der C₁₃-Norisoprenoide. Dabei konnte für keinen der beiden Hefestämme eine Tendenz zu einer charakteristischen Freisetzungsrates festgestellt werden. Die 2012er Riesling-Grundweine wiesen nach der Gärung mit den Hefen U228 und RC212 keine aromenchemischen Unterschiede auf. Der Einsatz von Hefestamm U228 zur Gärung im vorangegangenen Versuch verursachte hingegen Unterschiede zwischen den Riesling-Weinen. Die mit den Hefen DV10 und IOC 18-2007 vergorenen 2013er Riesling-Grundweine unterschieden sich unabhängig von der Traubenverarbeitung in den C₁₃-Norisoprenoid-Vorläufergehalten, Stamm DV10 verursachte dabei geringere Endgehalte der noch gebunden vorliegenden Vorläufer. Ausschließlich die Grundweine aus dem Riesling-Most nach Standzeit unterschieden sich zusätzlich im Gehalt glycosylierter flüchtiger Phenole, die von Hefestamm IOC 18-2007 stärker freigesetzt worden waren. Es war demnach anhand dieses Versuches für die Hefestämme ebenfalls keine prognostizierbare Freisetzungsrates bestimmbar, weder bezüglich der Quantität noch der Substratspezifität der Freisetzung der Aromastoffvorläufer.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen damit im Einklang mit Daten anderer Studien. Die vorhandene Literatur liefert zum Teil widersprüchliche Ergebnisse, eine Konsistenz der Daten ist nicht feststellbar. Chassagne et al. (2005a) postulierten eine hefestammabhängige Abnahme der Aromastoffvorläufer zwischen 17 und 57% während der Gärung von Chardonnay. Zoecklein et al. (1997) zeigten bei der Gärung von Riesling nur marginale Unterschiede bezüglich der Vorläufer-Freisetzung zwischen vier verschiedenen Reinzuchtstämmen, die sich sensorisch nicht auswirkten. In einer Studie von Delcroix et al. (1994) wurden für drei verschiedene Hefen weder chemische noch sensorische Unterschiede festgestellt. Allen Studien war gemein, dass unabhängig der Hefe während der Gärung abnehmende Gehalte von Aromastoffvorläufern nachgewiesen wurden.

An der Spaltung der Aromastoffvorläufer ist nachweislich die Nebenaktivität einer β -1,3-exo-Glucanase der Hefen beteiligt (Gil et al., 2005; Schmidt et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels pNPG-Assay eine basale Aktivität der zu den Gärungen eingesetzten Hefestämme bestimmt, die zwischen den Stämmen nicht unterschiedlich war (s. Abschnitt Charakterisierung der Glycosidase-Aktivität von *Saccharomyces*-Hefen). Im Kontext der durchgeführten Gärungen, die keine reproduzierbaren Unterschiede aufgrund der Verwendung von *Saccharomyces*-Hefen ergaben, wird ein ausschließlich marginaler Hefe-Einfluss auf die Freisetzung von Aromastoffvorläufern angenommen. Insbesondere die Säurehydrolyse trägt vermutlich zusätzlich Maskierung der Enzymaktivität der Hefen bei, da diese Art der Spaltung bei Wein-pH stattfindet (Sarry und Günata, 2004).

Sporadisch auftretende Unterschiede sind möglicherweise durch die individuelle Vitalität der Hefen, verursacht durch spezifische Optima wie des pH-Wertes, der Temperatur oder der Nährstoffversorgung bedingt. Möglicherweise gilt ähnliches für Glycosidase-aktive Enzyme der Hefen, wodurch Auswirkungen in eine erhöhte oder verringerte Aromastoffvorläufer-Freisetzungstätigkeit resultieren. Ein weiterer Grund sind vermutlich andere Mikroorganismen. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Gärung trotz Beimpfung mit Reinzuchthefestämmen in den ersten Tagen von indigenen, von der Traubenoberfläche im Weinberg oder aus Transport- und Verarbeitungs- und Gärgeräten stammenden

Nichtsaccharomyces-Hefen wie *Kloeckera* und *Candida* dominiert wird, die nicht unbedingt durch die SO₂ elimiert werden (Fleet, 1990; Querol et al., 1992). Eben diese Stämme zeichnen sich wiederum verbreitet durch eine erhebliche Glycosidase-Aktivität aus (Jolly et al., 2014). Desweiteren kann diese Aktivität bei Milchsäurebakterien wie *Oenococcus*, *Pedicoccus*, *Lactobacillus* und *Leuconostoc* auftreten (Maicas und Mateo, 2016).

Die deskriptive sensorische Analytik der Grundweine ergab ebenfalls inkonsistente, durch die aromenchemische Analyse nicht konsequent erklärbare Ergebnisse. Die Chardonnay-Grundweine unterschieden sich in keinem der Geruchsattribute. Für den 2012er Riesling wurden Unterschiede in der Wahrnehmung von Zitrone, Pfirsich und rauchig festgestellt. Die Analyse der 2013er Rieslinge hingegen ergab für die Weine aus den Mosten der Ganztraubenpressung keine Unterschiede sowie aus den Mosten nach Standzeit für Pfirsich und Honigmelone. Die Muskateller-Grundweine waren in den Attributen blumig und Honigmelone unterschiedlich. Der mit erhöhten Ausgangsgehalten an Aromastoffvorläufern ansteigende Einfluss der Hefen auf der Sensorik der Sektgrundweine legte die Annahme eines bestehenden Einfluss der Aromastoffvorläufer-Konzentration auf die Freisetzungsrates nahe. Allerdings waren die Auswirkungen vergleichsweise gering ausgeprägt, für den Riesling über die zwei Jahrgänge nicht reproduzierbar und konnten nicht durch eine Korrelation der Ergebnisse aus den chemischen und sensorischen Analysen bestätigt werden. Insbesondere wurde das am Beispiel der Riesling-Grundweine aus 2012 verdeutlicht. Während die Endgehalte glycosidisch gebundener Aromastoffvorläufer nicht durch den Hefestamm beeinflusst waren, ergab die sensorische Beurteilung der Weine unterschiedliche Intensitätsbewertungen in Zitrone, Pfirsich und rauchig. Es liegt in diesem Fall nahe, dass obwohl die sensorischen Deskriptoren mit den zu untersuchenden Aromastoffen abgestimmt ist, hier weitere nicht analysierte Stoffe an der Aromabildung beteiligt sind. Am Beispiel des 2013er Standzeit-Rieslings konnte wiederum gezeigt werden, dass die unterschiedliche Wahrnehmung von Honigmelone und Pfirsich mit den signifikant verschiedenen Vorläufergehalten an C₁₃-Norisoprenoiden einhergehen. Es ist bekannt, dass nach der Spaltung der Vorläufer eine säurekatalytische Umlagerung von nicht geruchsaktiven primären Vorläufern wie 3-Hydroxy- β -Damascon zu hoch geruchsaktiven Stoffen wie β -Damasconen stattfindet (Mendes-Pinto, 2009).

Erste und Zweite Gärung in Kombination: Sekt

Gemäß der Studie von Ganß et al. (2011), die durch Anreicherung von Sektgrundweinen mit Aromavorläufer-Extrakten eine signifikante Intensivierung des Sektaromas gezeigt hat, leisten die während der Gärung freigesetzten Aromastoffvorläufer einen signifikanten Beitrag zum Sektaroma. Die Einflussfaktoren auf diese Freisetzung untersuchten die Autoren nicht.

Während der zweiten Gärung vom Grundwein zum Sekt wurde in dieser Arbeit ein vorhandener Einfluss der *Saccharomyces*-Hefen auf die Freisetzung von Aromastoffen aus ihrer glycosidischen Bindung demonstriert. Über die Dauer der Sektgärung wurden Säurehydrolyse-Varianten mitgeführt, die keinem Hefe-Einfluss ausgesetzt waren. Diese waren durch eine signifikant geringere Freisetzung an Vorläufern der C₆-Alkohole, C₁₃-Norisoprenoide, aromatischen Alkohole und flüchtigen Phenole gekennzeichnet. Die Monoterpen-Vorläufer hingegen waren durch die Säurehydrolyse zum Teil stärker freigesetzt worden. Möglicherweise ist die Substratspezifität der enzymatischen Aktivität der Hefen dafür verantwortlich, wodurch bestimmte Substanzen bevorzugt hydrolysiert werden. Bekannt ist beispielsweise, dass Hefen selektiv primäre und sekundäre Monoterpenalkohole bevorzugt spalten (Gunata et al., 1990a). Die Analyse der Muskateller-Sekte diesbezüglich

ergab eine unterschiedlich ausgeprägte Freisetzung der Glycoside von Linalool, Geraniol und Nerol. Die primären Terpenalkohole Nerol und Geraniol waren durch die Hefe stärker freigesetzt worden, dementsprechend wurde der tertiäre Terpenalkohol Linalool durch Säure stärker freigesetzt. Diese Beobachtung lässt den in der Literatur beschriebenen selektiven Einfluss der Enzymaktivität der Hefe vermuten. Unklar bleibt, wie der Effekt durch Hefe-Einfluss bei zusätzlich bestehendem Einfluss der Säurehydrolyse zustande kam. Ungeachtet dessen wurde für die eingesetzten Hefen durch eine gesteigerte Freisetzung der Aromastoffvorläufer im Vergleich zur Säurehydrolyse das Vorhandensein von Glycosidase-Aktivität ersichtlich. Mittels pNPG-Assay war für diese Hefestämme eine basale Enzymaktivität bestimmt worden, die im Bereich von Literaturwerten lag (Daenen et al., 2008) und vermutlich auf die Nebenaktivität der Glucanase Exg1p zurückzuführen ist (Gil et al., 2005; Schmidt et al., 2011). Die selektive Freisetzung von Nerol und Geraniol gegenüber Linalool im Beispiel der Muskateller-Sekte stellt einen weiteren Hinweis zur Bestätigung einer von Hefen verursachten enzymatischen Aktivität dar, da die bevorzugte Hydrolyse von primären Terpenalkoholen den Hefen zugesprochen wird (Gunata et al., 1990a).

Die Analyse der Sekte bestätigte die Beobachtungen, dass zwischen den *Saccharomyces*-Hefestämmen nur marginale und inkonsistente Unterschiede auf die Freisetzungsraten der Aromastoffvorläufer und damit einhergehend auf das Sektaroma bestehen. Das wurde unabhängig von der Hefestamm-Kombination aus der ersten und zweiten Gärung festgestellt. Auftretende Unterschiede zwischen den Aromastoffvorläufern lagen zudem in absoluten Gehalten betrachtet unter den Geruchsschwellenwerten der Einzelsubstanzen, so dass eine Auswirkung auf die Sensorik der Sekte angezweifelt werden kann. Die Chardonnay-Sekte waren nicht durch die Grundweinhafe beeinflusst, dafür durch die Sektheife im Gehalt gebundener C₆-Alkohole. Auf die Muskateller-Sekte bestand weder Einfluss durch Grundwein- oder Sektheife noch durch die Hefestammkombination. Für die 2013er Riesling-Sekte wurde ein Einfluss der Sektgrundweinhafe auf die Gehalte glycosylierter C₆-Alkohole und aromatischer Alkohole sowie des Sekthefestammes auf die Vorläufer der flüchtigen Phenole ermittelt. Für den 2012er Riesling, entgegen den Sekten aus 2013, war ein signifikanter Einfluss von Grundwein- sowie Sekthefestamm auf die Aromastoffvorläufer in den fertigen Sekten feststellbar, der für die Kombination der Hefestämmen nicht mehr nachweisbar war. Der auftretende Einfluss lag vermutlich in der unterschiedlichen Lagerzeit auf der Hefe begründet. Die zweite Gärung der Sekte aus 2012 wurde über vier Monate durchgeführt, in 2013 hingegen über neun Monate. Die säurekatalysierte Hydrolyse der Aromastoffvorläufer, welche nachweislich einen signifikanten Einfluss darstellt, hatte durch die längere Einwirkdauer vermutlich zu einem Angleichen der finalen Vorläufer-Gehalte in den Sekten geführt.

Die Sensorik der Sekte spiegelte die chemischen Analysen wider, die keine auf die Auswahl des Hefestammes zurückzuführenden bemerkenswerten Unterschiede in den Sekten verursachte. Erneut traten sporadisch Unterschiede auf. Die Chardonnay-Sekte der Normalklon-Varianten unterschieden sich in den Attributen Zitrusfrüchte, Apfel, Honigmelone und Honig, hingegen waren die Duftklon-Varianten ausschließlich im Attribut Honig unterschiedlich. Auch diese Sekte waren nicht von mikrobiellen Fremdeinflüssen abzugrenzen, da sie teilweise spontanen BSA vollzogen hatten. Möglicherweise liegen darin die beobachteten inkonsistenten Unterschiede begründet. Für die Muskateller-Sekte war dementsprechend kein Hinweis auf BSA gegeben und diese Sekte wiesen auch keinerlei sensorische Unterschiede untereinander auf, obwohl insbesondere für Muskateller aufgrund

der hohen Ausgangsgehalte an Aromavorläufern ein größerer Hefe-Einfluss vermutet worden war. Die Riesling-Sekte waren in den Geruchsattributen nicht unterschiedlich.

Der Vergleich mit dem Einsatz von Aromaenzym AR2000 aus *Aspergillus niger* relativierte den Einfluss der Glycosidase-Aktivität der *Saccharomyces*-Hefen zusätzlich. Für alle Sekte wurde eine signifikante Steigerung der Aromastoffvorläufer-Freisetzung und Intensivierung des Aromas gezeigt. Die multivariate Statistik unterstrich diese Ergebnisse konsequent mit sehr hohen F-Werten und grenzte sie von den sporadisch auftretenden, durch geringe F-Werte charakterisierte Effekte der Hefen ab. Der signifikante Einfluss der Sektheefe auf die Chardonnay-Sekte wurde beispielsweise mit einem F-Wert von 5,6 ausgewiesen, während der Einfluss von AR2000 von einem F-Wert von 819,2 begleitet wurde. Der Gesamtzusammenhang aller Faktoren unter Einbezug chemischer und sensorischer Analysen führte zu einer Differenzierung der Sekt-Varianten nach Enzymeinsatz und Ausgangstraubenmaterial, nicht aber aufgrund der Hefestämme.

Die Beobachtungen reihen sich in die Ergebnisse aller in dieser Arbeit durchgeführten Gärungen ein. Der Vergleich mit dem Enzympräparat AR2000 aus *Aspergillus niger* verdeutlichte, dass die *Saccharomyces*-Hefen gegenüber dem Enzym kaum zur Nutzung des Aromapotentials aus den Sektgrundweinen beitrugen. Erst der Enzymeinsatz setzte signifikant erhöht Aromastoffe frei und intensivierte das Sektaroma. Vor dem Hintergrund der vergleichsweise geringen Enzymaktivität und des aufgrund der langen Gärzeit beachtlichen Einfluss der Säurehydrolyse erübrigt sich die Frage nach Unterschieden zwischen einzelnen Hefestämmen. Es wurden in den Sekten aufgrund der Auswahl des Hefestammes ausschließlich marginale und inkonsistente Unterschiede auf die Aromastoffvorläufer-Gehalte und die Sensorik gezeigt. Es liegt deshalb für die *Saccharomyces*-Hefen auch in der Sektherstellung kein prognostizierbarer Effekt vor. Damit ist zumindest bei einer traditionellen Flaschengärung von neun Monaten die Überlegung, bestimmte *Saccharomyces*-Hefen als Werkzeuge zur gezielten Modulation des Sektaromas einzusetzen, überbewertet.

Nichtsaccharomyces-Hefen: Charakterisierung und Gärung

Die Bedeutung von *Nichtsaccharomyces*-Hefen in der Weinbereitung steigt momentan, da sie je nach Gattung zu deutlich anderen Aromaprofilen führen können. Im Gegensatz zu *Saccharomyces*-Hefen sind in einer Vielzahl von Untersuchungen sowohl das Enzym β -Glucosidase als auch eine hohe Glycosidase-Aktivität nachgewiesen worden (Rosi et al., 1994; Fia et al., 2005; Daenen et al., 2008). Im Kontext dieser Arbeit waren die Ergebnisse der *Nichtsaccharomyces*-Hefen eine wichtige Vergleichsmöglichkeit zu Aussagen bezüglich der Glycosidase-Aktivität von *Saccharomyces*-Hefen. Für die Laborstämme H54 der Art *Pichia anomala* und H22 der Art *Debaromyces hansenii* ist eine positive Wachstumsfähigkeit auf Arbutin und Cellobiose nachgewiesen worden. Insbesondere das Wachstum auf dem für β -Glucosidase spezifischen Substrat Arbutin (Rodríguez et al., 2004) weist auf die Anwesenheit des Enzyms hin. Desweiteren wurde für den kommerziell erhältlichen Stamm Flavia der Art *Metschnikowia pulcherrima* positives Wachstum festgestellt, negativ getestet wurde der ebenfalls als Reinzuchtheefe verfügbare Stamm Biodiva der Art *Torulasporea delbruckii*. Im Aktivitäts-Assay mit pNPG war ausschließlich der *Pichia anomala*-Laborstamm H54 durch signifikant erhöhte Aktivität von den *Saccharomyces*-Hefen unterschiedlich, Laborstamm H22 sowie die Präparate Flavia und Biodiva dagegen nicht. Welche enzymatische Ausstattung der Hefen auf diese beobachtete substratspezifische Präferenz zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden und ist auch mit Hilfe der Literatur bisher nicht zu klären.

Die Präparate Flavia und Biodiva wurden ebenfalls zur Gärung von Chardonnay und Riesling eingesetzt. Allerdings zeigte weder die aromachemische noch die sensorische Analyse, dass die mit Flavia oder Biodiva hergestellten Weine anders waren. Der mit der Kombination aus Biodiva und *Saccharomyces*-Hefe QA23 hergestellte Chardonnay-Wein zeichnete sich durch im Vergleich zu dem mit *Saccharomyces*-Hefe hergestellten Wein durch geringere noch glycosylierte Vorläufer-Gehalte aus. Im Riesling-Wein, der ebenso mit der Kombination aus den Hefen Biodiva und QA23 hergestellt worden war, konnte der Effekt aber nicht beobachtet werden. Die sensorische Analyse der Chardonnay-Weine ergab keinen signifikanten Unterschied zu den mit *Saccharomyces*-Hefen hergestellten Weinen, die signifikant erhöhte Intensität des Attributes grünes Gras im Riesling-Wein lässt wiederum auf eine erhöhte Freisetzung von C₆-Alkoholen schließen. Es ist möglich, dass die zuvor gezeigte erhöhte Glycosidase-Aktivität der Präparate Flavia und Biodiva nicht ausreichte, um sich merklich auf die Freisetzung der Aromastoffvorläufer auszuwirken und die Sensorik der Weine zu beeinflussen. Zudem war im pNPG-Assay ausschließlich Laborstamm Pichia H54 durch signifikant erhöhte Aktivität gegenüber allen Hefen charakterisiert. Die Glycosidase-Aktivität der Hefen und deren Einfluss auf das Weinaroma ist stark gattungsabhängig (Jolly et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit ist aufgrund der ausschließlichen Untersuchung von zwei Hefestämmen aus zwei Gattungen in der Weinbereitung keine weitreichende Aussage zum Einsatz von *Nicht-saccharomyces*-Hefen zur Intensivierung des Weinaromas möglich.

Technisches Enzympräparat: Charakterisierung und Gärung

Das Enzympräparat AR2000 wurde im Vergleich mit anderen Präparaten mit der höchsten Glycosidase-Aktivität charakterisiert (Gunata et al., 1990b; Stanitzek, 2014). Im pNPG-Assay in dieser Arbeit wurde für das Enzym gegenüber den *Saccharomyces*-Hefen eine ca. 1000fach erhöhte Aktivität von 103±29 mU/mg bestimmt. Dieser Wert lag im Bereich von publizierten Werten (Spagna et al., 1998; Baek und Cadwallader, 1999; Barbagallo et al., 2002). Die sehr hohe Glycosidase-Aktivität des Enzyms fand sich in allen in dieser Arbeit durchgeführten Gärungen wieder. Im Kontext der Arbeit diente das Präparat zusätzlich als Vergleich, das Aromapotential von Mosten und Sektgrundweinen maximal zu nutzen.

Die Anwendung von Enzym AR2000 in der beendeten Gärung von Chardonnay und Riesling mit *Saccharomyces*-Hefen führte zu einer weiteren höchst signifikanten Steigerung der Freisetzung von C₆-Alkoholen, Monoterpenen und aromatischen Alkoholen aus ihrer glycosidischen Bindung. Damit zeigte sich, dass das Aromapotential zuvor durch die Hefen nur unzureichend ausgeschöpft worden war. Die spezifische Spaltung von bestimmten Aromastoffvorläufern ist für den filamentösen Pilz *Aspergillus niger* ebenfalls beschrieben. Allerdings wurde für diesen Pilz im Vergleich zu *Saccharomyces*-Hefen, welche ebenfalls bevorzugt C₆-Alkohole, Monoterpene und aromatische Alkohole freigesetzt hatten, durch Spaltung tertiärer Monoterpenalkohole eine gegensätzliche Spezifität gezeigt (Gunata et al., 1990a). Scheinbar wirkte sich die Spezifität nicht auf die Aromastoffvorläufer-Freisetzung aus, denn in keinem Fall wurden C₁₃-Norisoprenoide oder flüchtige Phenole abgespalten. Ein verschachtelter Effekt aus Hefe- und Enzymkombination war desweiteren nicht feststellbar. In der sensorischen Analyse wurde durch die Prüfer für alle unter Enzymeinsatz hergestellten Chardonnay-Weine im Vergleich zum ausschließlichen Hefe-Einfluss eine Intensivierung der Geruchsattribute Pfirsich, exotische Früchte und blumig festgestellt, in den Riesling-Weinen für war die Wahrnehmung von Pfirsich und blumig erhöht.

Im Rahmen der Untersuchung zur Sektgärung wurde das Enzym zur zweiten Gärung mit der Tirage zugesetzt. Die multivariate Statistik verdeutlichte, dass der Einfluss des

Enzympräparates auf die Aromastoffvorläufer und das Aroma der Sekte über die anderen Faktoren (Hefe, Traubenverarbeitung) dominierte. Das wurde anhand der Differenzierbarkeit der Sekte anhand des Enzyms verdeutlicht. Die Differenzierbarkeit war für Chardonnay und Riesling zusätzlich durch das Traubenmaterial gegeben. Die Hefen führten nicht zu einer Unterscheidbarkeit der Sekte. Der signifikante Einfluss des Enzyms auf nahezu alle Aromastoffvorläufer wurde weiterhin durch sehr hohe F-Werte gestützt. Im Chardonnay war der Enzymeinfluss uneingeschränkt größer als der Einfluss des Ausgangstraubenmaterials. Im Riesling hingegen wirkte sich das Traubenmaterial stärker auf die Vorläufer der Monoterpene und C₁₃-Norisoprenoide aus. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass der dominierende Einfluss des Enzympräparates durch andere Produktionsfaktoren beeinflussbar ist. Da die Interaktion von Rebsorte und Enzym gegeben war, können unterschiedliche Enzymeffekte bei verschiedenen Rebsorten angenommen werden.

Vor allem für die Praxis ist interessant, dass durch das Enzym nur die Geruchs-, nicht aber die Geschmacksdeskriptoren intensiviert wurden. Zusätzlich sollte beachtet werden, dass die Steigerung des Weinaromas durch Enzymeinsatz nicht als eine rein quantitative Intensivierung, sondern auch als eine Stilveränderung von eher frisch, zitrus- und apfelartig zu blumig, Honig, Honigmelone und gelbe Früchte auftritt. Die Begründung hierfür liegt möglicherweise in der selektiven Spaltung des Enzyms, könnte aber auch durch Substanzen verursacht werden, die ihre Geruchsschwelle erst durch die hohe Freisetzung erreichen. Weiterhin treten eventuell synergistische Effekte auf, die durch erreichte Konzentrationen bestimmter Substanzen zustande kommen (Dunkel et al., 2014). Im Kontext der gravierenden Veränderungen des Aromas und der damit einhergehenden Stilveränderung von Weinen und Sekten durch den Einsatz des Enzympräparates AR2000 sollte die Anwendung stets sorgfältig abgewogen werden.

In der Literatur sind sowohl Glycosidase-Aktivität als auch die aromasteigernden Effekte von Enzymen aus *Aspergillus niger* in der Weinbereitung eindeutig belegt (Binder, 1998; Fischer et al., 2001; Cabaroglu et al., 2003). Zusätzlich zur β -Glucosidase-Aktivität wurden auch die Disaccharidasen α -Arabinosidase, α -Rhamnosidase und β -Apiosidase nachgewiesen (Günata et al., 1997). Die Voraussetzung zur enzymatischen Spaltung der mehrheitlich an Disaccharide gebundenen Aromastoffvorläufer ist dadurch gegeben. Vermutlich führt neben einer allgemein erhöhten Aktivität der Enzyme aus *Aspergillus niger* auch die Verfügbarkeit der vollständigen Enzymausstattung zur gesteigerten Glycosidase-Aktivität der Enzympräparate. Im Umkehrschluss erklärt sich so die geringe Glycosidase-Aktivität der *Saccharomyces*-Hefen.

Beachtet werden sollten weitere in gering aufgereinigten Enzympräparaten enthaltene Enzyme, die zu unerwünschter Aromabildung führen können. Das bedeutenste ist die Cinnamyl-Esterase, die durch die Freisetzung der Hydroxyzimtsäuren die Bildung von Ethyl- und Vinylphenolen durch Hefen ermöglicht und zu Fehlparomen wie schweißig, medizinisch und rauchig führen kann (Dugelay et al., 1993). Dementgegen wirkt die ausschließliche Anwendung der Präparate am Ende der Gärung. Daraus ergibt sich das Problem der Inaktivierung von Enzymen, was bis heute nicht zufriedenstellend gelöst ist. Die Schönung mit Bentonit verursachte keinen Aktivitätsverlust, sondern führte zur Entfernung von Aromastoffen aus dem Wein. Mit eisenhaltigen Partikeln konnten Enzyme zwar erfolgreich immobilisiert werden, das Vorgehen führte durch den Eiseneintrag allerdings zu Nebenwirkungen im Wein wie Oxidationsanfälligkeit und Verfärbung (Ferner, 2016). Es wurde allerdings von Fischer et al. (2001) keine nachteilig wahrgenommene Veränderung der Weine während der Reifung über einen Zeitraum von bis zu vier Jahren in Riesling-,

Muskateller- und Morio Muskat-Weinen registriert. Ob bei weniger aromareichen Varianten mit geringerem Aromapotentiale Nachteile entstehen oder sich ein noch längerer Lagerzeitraum als kritisch darstellt, bleibt offen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 18 *Saccharomyces*-Hefestämme sowie zwei Stämme der *Nichtsaccharomyces*-Hefen *Torulaspota delbruckii* und *Metschnikowia pulcherrima* und ein Enzympräparat aus *Aspergillus niger* in Gärungen im Labor- und Praxismaßstab sowie in betriebsüblichen Wein- und Sektgärungen bezüglich ihres Potentials zur Freisetzung von glycosidisch gebundenen Aromastoffen charakterisiert. Die Untersuchungen wurden in den Jahrgängen 2012, 2013 und 2015 für die Rebsorten Chardonnay, Riesling und Muskateller durchgeführt. Hierbei wurden die Verfahren der Traubenverarbeitung zur Intensivierung der unterschiedlichen Ausgangsgehalte an Aromastoffvorläufern variiert. Zusätzlich wurden in 2013er und 2014er Mosten der Rebsorten Riesling, Muskateller und Gewürztraminer die Einflussfaktoren Maischestandzeit und Pressung auf den Ausgangsgehalt an Aromastoffvorläufern untersucht. Alle Moste, hergestellten Weine, Grundweine und Sekte sind aromachemisch mittels SPE/GC-MS sowie die Weine und Sekte sensorisch durch die deskriptive Analyse untersucht worden. Anhand multivariater Statistik wurden die Datensätze modelliert. Die 18 eingesetzten *Saccharomyces*-Hefestämme sowie zusätzlich zwei Laborstämme der Art *Debaromyces hansenii* und *Pichia anomala* wurden mittels Plattentests unter Verwendung von YNB-Mangelmedium bei Zugabe der Substrate Arbutin und Cellobiose als Kohlenstoff-Quelle sowie mittels pNPG-Assay quantitativ auf Glycosidase-Aktivität getestet. Das Enzympräparat wurde ebenfalls mit dem Assay untersucht. Mittels qPCR erfolgte die Analyse der relativen Genexpression der mit der Glycosidase-Aktivität von *Saccharomyces*-Hefen in Verbindung stehenden Gene EXG1, SPR1 und YIR007W über den Verlauf einer Gärung. Die Analyse der Aromastoffvorläufer wurde mittels einer im Zuge der Arbeit etablierten SPE/GC-MS-Methode für die Injektion großer Probenvolumina durchgeführt. Anhand dieser Analytik als Referenzmethode, sollte eine praxistaugliche Schnellanalytik mittels FT-MIR in Anlehnung an Schneider et al. (2004) entwickelt werden.

Die Untersuchungen zur Variation der Traubenverarbeitung bestätigten den in der Literatur beschriebenen signifikanten Einfluss auf die Aromastoffvorläufer-Gehalte im Most (Fischer et al., 2001; Papargyriou, 2003). Erstmals konnte in dieser Arbeit verdeutlicht werden, dass eine verlängerte Maischestandzeit sowie gesteigerter Pressdruck bis hin zum fertigen Wein und Sekt als signifikanter Einflussfaktor sowohl auf die Gehalte der Aromastoffvorläufer als auch auf die Sensorik bestehen bleibt. Die Auswahl des *Saccharomyces*-Hefestammes hingegen konnte nicht als signifikanter, maximal als marginaler Einflussfaktor auf die Freisetzung der Aromastoffvorläufer oder die Sensorik der finalen Weine, Grundweine und Sekte identifiziert werden. Es wurden selbst bei weitestgehendem Ausschluss anderer mikrobiologischer Einflussfaktoren keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen den untersuchten Hefestämmen nachgewiesen, wodurch kein prognostizierbarer Effekt ermittelt werden konnte. Dieses Ergebnis konnte durch die Charakterisierung der Enzymausstattung und -aktivität der Hefen erklärt werden. Die Hefen konnten in den Plattentests die glycosidische Bindung der Substrate Arbutin und Cellobiose nicht spalten, wie auch in der Literatur beschrieben (Rosi et al., 1994; Daenen et al., 2008). Da Arbutin als spezifisch zum Nachweis des Enzyms 1,4- β -Glucosidase gilt (Rodríguez et al., 2004), kann davon ausgegangen werden, dass das Enzym in den *Saccharomyces*-Hefen nicht exprimiert wurde. Detektierbar mittels pNPG-Assay war hingegen eine basale Glycosidase-Aktivität, welche vermutlich auf eine Nebenaktivität der in der Literatur beschriebenen exo-1,3- β -Glucanase Exg1p zurückzuführen ist (Gil et al., 2005; Schmidt et al., 2011). Für

das korrespondierende Gen EXG1 wurde mittels qPCR über den Verlauf einer Gärung proportional zum Abbau der Glucose eine ansteigende relative Expression bestimmt. Glucose scheint als Hemmstoff für die Genexpression von EXG1 zu wirken. Mit dem Anstieg der Genexpression ging die Abnahme der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer einher. Zwischen den untersuchten *Saccharomyces*-Hefestämmen bestanden dabei keine Unterschiede. Die Analyse der Sekte ergab nach neunmonatiger zweiter Gärung signifikante Unterschiede zwischen den regulär mit Hefe hergestellten Sekten und den ausschließlich unter Säureeinfluss stehenden Varianten ohne Hefezugabe. Damit konnte verdeutlicht werden, dass *Saccharomyces*-Hefen eine Glycosidase-Aktivität ausbilden, da sie im Vergleich zur ausschließlichen säurehydrolytischen Wirkung signifikant erhöht Aromastoffvorläufer freigesetzt hatten. Die Verwendung verschiedener Hefestämme führte hingegen nicht zu konsistenten Unterschieden in der Freisetzung der Aromastoffvorläufer und blieb ohne bemerkenswerte Auswirkungen auf die Sensorik der Grundweine und Sekte. Die im Praxismaßstab hergestellten Weine bestätigten diese Beobachtungen. Das aus *Aspergillus niger* stammende Enzympräparat AR2000 zeichnete sich hingegen in der Quantifizierung der Glycosidase-Aktivität mit ca. 1000fach erhöhter Aktivität gegenüber den Hefen aus. Dementsprechend setzte das Enzym in den Gärungen signifikant erhöht Aromastoffvorläufer frei und führte zu veränderten sensorischen Profilen der Weine und Sekte. Die weiterhin in die Versuche einbezogenen *NichtSaccharomyces*-Hefen wurden teilweise positiv auf das Enzym β -Glucosidase getestet und waren, insbesondere im Fall des *Pichia anomala*-Stammes, auch durch eine signifikant erhöhte quantitative Enzymaktivität charakterisiert. Durch die umfassende Charakterisierung der *Saccharomyces*-Hefen im Vergleich mit *NichtSaccharomyces*-Hefen und Enzympräparat wurde deutlich, dass die Glycosidase-Aktivität der *Saccharomyces*-Hefen nicht ausreicht, um das Aromapotential während der Wein- und Sektbereitung bedeutend ausschöpfen zu können.

Die in dieser Arbeit etablierte large volume GC-MS-Methode wurde validiert und gilt als eine stabile Methode mit hohen Wiederfindungsraten und guter Reproduzierbarkeit. Aufgrund von probenabhängigen Verlusten durch die SPE und die möglicherweise unvollständige enzymatische Spaltung der Aromastoffvorläufer bleibt der Gesamtmethode vermutlich ein systematischer Fehler der absoluten Aromastoffvorläufer-Gehalte zueigen, vergleichende Analysen sind jedoch problemlos möglich. Zum jetzigen Kenntnisstand existiert keine alternative Analyseverfahren. Die Unschärfe der SPE/GC-MS-Analytik pflanzte sich entsprechend bei der Entwicklung der Schnellmethode zur Quantifizierung der Aromastoffvorläufer mittels FT-MIR fort, welche mit der GC-MS-Methode als Referenzmethode etabliert werden sollte. Im Zuge der Methodenentwicklung am Gerät FT 120 Winescan (Foss) wurde zunächst die Signalintensität der Analyten in den Spektren verbessert, da Aromastoffvorläufer in Most und Wein unterhalb der üblichen Nachweisgrenze der MIR-Spektroskopie liegen. Diese Erhöhung der Signalintensität wurde durch eine Vergrößerung der Küvettenstärke auf 150 μm und durch Verwendung der Lösungsmittel Dimethylsulfoxid oder Methanol erreicht. Für beide Küvetten-Lösungsmittel-Kombinationen wurde jeweils eine Basiskalibration mit einem Probensatz aus 37 heterogenen Most- und Weinproben verschiedener Rebsorten und Herkunft erstellt. Die Kalibrationen waren durch vielversprechende statistische Vorhersageparameter charakterisiert. Der Validierung mit unabhängigen Datensätzen konnten beide Kalibrationen aber bisher nicht standhalten.

6.2 Ausblick

Aufbauend auf die vorliegende Arbeit, die verdeutlichte dass ein Großteil der Aromastoffvorläufer während der Gärung mit *Saccharomyces*-Hefen nur unzureichend freigesetzt wird, ist die fortführende Charakterisierung der Glycosidase-Aktivität anderer Mikroorganismen anzuraten, um das Aromapotential von Mosten und Sektgrundweinen besser zu nutzen. Da erste Ergebnisse auf eine erhöhte Glycosidase-Aktivität von einigen *Nichtsaccharomyces*-Hefen hinwiesen, sollten diese in den Fokus zukünftiger Untersuchungen rücken. Um eine Vielzahl von Hefen untersuchen zu können, kann in weiterführenden Arbeiten auf die etablierten Plattentests und den pNPG-Assay zurückgegriffen werden. Diese Tests sind einfacher durchführbar als aufwändige und zeitintensive Gärungen, die nachfolgend auch eine umfangreiche Analytik erfordern. Durch die Einsatzmöglichkeit verschiedener glycosidisch gebundener Substrate könnten Hefen zusätzlich bezüglich der spezifischen Affinität ihrer enzymatischen Aktivität charakterisiert werden. Interessante Kandidaten sollten anschließend in Gärungen auf ihre Eignung in der Wein- und Sektbereitung untersucht werden. Da *Nichtsaccharomyces*-Hefen verstärkt zur Bildung von Fehleraromen neigen, ist eine entsprechende sensorische Evaluierung unabdingbar.

Als weitere aussichtsreiche Werkzeuge zur erhöhten Freisetzung der Aromastoffvorläufer steht eine Vielzahl an Enzympräparaten aus *Aspergillus niger* zur Verfügung. Diese sind allgemein für sehr hohe Glycosidase-Aktivität bekannt, können aber zusätzlich eine Stilveränderung der Weine und Sekte verursachen. Um diese Auswirkungen bei der Anwendung von Enzymen einschätzen zu können, sollten diese ebenfalls in Gärungen eingesetzt und entsprechende aromachemische und sensorische Untersuchungen durchgeführt werden. Zusätzlich sollten Untersuchungsmöglichkeiten zur Disaccharidase-Aktivität der Hefen etabliert werden. Ein Großteil der Aromastoffe liegt an Disaccharide gebunden vor und das Vorliegen entsprechender Enzymaktivitäten gilt als Voraussetzung zur Spaltung der Glycoside. Das Substrat β -D-Apiofuranosyl- β -D-Glucosid ist allerdings kommerziell nicht verfügbar und müsste zuvor synthetisiert werden. Dieser Teil ist insbesondere bei Vorliegen hoher Glycosidase-Aktivität relevant, also insbesondere für *Nichtsaccharomyces*-Hefen und Enzympräparate aus *Aspergillus niger*.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für *Saccharomyces*-Hefen kein prognostizierbarer Effekt auf die Freisetzungsrates von Aromastoffen durch Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt. Eine weitergehende Charakterisierung dahingehend scheint deshalb nicht zielführend zu sein. Der Einfluss der Hefestammkombination in der Sektbereitung war bei kurzer zweiter Gärung hingegen nicht auszuschließen. Es könnte daraufhin der mögliche Nutzen gezielter Hefestamm-Kombination zur Modulation des Aromaprofils beispielsweise bei Tankgärungen von Schaumweinen mit der gesetzlich geringer festgelegten Hefelagerzeit von 30 bzw. 60 Tagen untersucht werden. Bei längeren Lagerzeiten scheinen Untersuchungen aufgrund der starken säurekatalysierten Hydrolyse der glycosidisch gebundenen Aromastoffvorläufer nicht sinnvoll zu sein.

Es ist auch weiterhin lohnenswert, die Entwicklung einer Schnellmethode zur Quantifizierung der Aromastoffvorläufer mittels FT-MIR-Spektroskopie voranzutreiben. Die bei aktuellem Kenntnisstand durchführbare Analytik ist bisher mit einem Kompromiss verbunden. Die vereinfachte Quantifizierung über die Glycosy-Glucose ermittelt nur den Gesamtgehalt aller glycosidisch gebundenen Stoffe. Die differenzierte Analytik der verschiedenen Aglycone mittels GC-MS(-MS) ist dafür sehr aufwändig. In Anlehnung an Schneider et al. (2004) wurde

daher eine Basiskalibration zur Quantifizierung glycosidisch gebundener Aromastoffe erstellt, die allerdings einer Validierung nicht standhielt. Für künftige Weiterarbeiten muss zunächst die bestehende Basiskalibration um zusätzliche heterogene Most- und Weinproben erweitert werden, um robust und aussagekräftig die Messung der probenabhängig stark variierenden Aromastoffvorläufergehalte zu ermöglichen. Erst eine solche Datengrundlage wird auch eine finale Aussage zur Umsetzbarkeit der Methode für die Quantifizierung der Minor Komponenten erlauben. Für die Weiterentwicklung der Methode sollten desweiteren sowohl die indirekte Messung mittels FT-MIR als auch die Referenzmethode GC-MS optimiert werden. Die FT-MIR-Spektroskopie betreffend, muss der Geräteumbau standardisiert werden. Die manuelle Probenapplikation hatte zu mangelnder Druck- und Temperaturstabilität der Messzelle geführt, wodurch Schwankungen in der Reproduzierbarkeit auftraten. Dieses Problem könnte beispielsweise mit einer automatisierten Applikation zur Sicherstellung eines geschlossenen Systems gelöst werden, vergleichbar mit der Anwendung eines HPLC-Probengebers. Der systematische Fehler der GC-MS-Referenzanalytik, verursacht durch SPE sowie die enzymatische Spaltung der Aromastoffvorläufer vor der Messung, wird auf die zu etablierende indirekte FT-MIR-Methode übertragen. Bisher liegen allerdings keine befriedigenden Alternativen zur Eliminierung dieser Effekte vor. Im Idealfall würde eine Quantifizierung der ungespaltenen Aromastoffvorläufer mittels HPLC-MS(-MS) erfolgen. Diese Analytik setzte allerdings verfügbare Standardsubstanzen voraus, die zuvor aufwändig zu synthetisieren wären. Es ergäbe sich aus der Vielzahl an Aromastoffen und den mindestens vier möglichen Zuckerresten eine große Zahl an zu trennenden und zu identifizierenden Substanzen.

7 Anhang

Tab. 7-1: Weinchemische Parameter 2013er Chardonnay- und Riesling-Wein

Parameter	vorh.Alk g/L	RZ ^a g/L	zf.Extr g/L	Dichte	Gluc g/L	Fruc ^a g/L	titr.Sr g/L	pH	Weinsr g/L	Äpfelsr g/L	Milchsr g/L	fl.Sr g/L
Chardonnay												
CY3079	102,1	5,7	26,3	0,9955	0,0	5,5	7,7	3,3	1,9	4,3	0,1	0,47
CY3079/E	101,8	6,1	26,1	0,9956	0,1	5,4	7,7	3,3	2,0	4,3	0,1	0,45
ICVD47	98,1	4,9	26,4	0,9958	0,0	4,8	7,5	3,4	1,9	4,3	0,0	0,41
ICVD47/E	97,7	4,8	26,6	0,9959	0,0	4,8	7,6	3,4	1,9	4,4	0,1	0,42
Biodiva	99,5	4,1	27,8	0,9958	0,0	4,5	7,6	3,3	1,8	3,8	0,1	0,37
Biodiva/E	99,4	4,1	27,5	0,9957	0,0	4,4	7,6	3,3	1,9	4,0	0,1	0,37
Flavia	99,8	4,8	27,2	0,9958	0,0	4,6	7,7	3,4	1,9	4,1	0,1	0,53
Flavia/E	99,7	4,7	27,2	0,9958	0,0	4,7	7,7	3,4	1,9	4,2	0,1	0,53
Riesling												
CEG	87,2	31,9	19,4	1,0051	6,1	22,9	5,8	3,5	2,4	0,4	2,9	0,69
CEG/E	87,4	31,5	19,3	1,0049	6,2	22,4	5,8	3,5	2,4	0,4	2,9	0,68
Freddo	101,6	4,6	26,7	0,9953	0,0	4,7	9,3	3,1	2,4	5,3	0,0	0,64
Freddo/E	101,3	4,8	26,7	0,9954	0,0	4,7	9,3	3,1	2,3	5,4	0,0	0,67
HPS	98,1	4,4	22,3	0,9940	0,0	5,1	5,9	3,3	2,4	0,0	3,1	0,64
HPS/E	98,2	4,1	22,6	0,9940	0,0	5,2	5,9	3,3	2,4	0,0	3,1	0,65
HST	100,3	5,5	25,6	0,9954	0,0	5,1	9,1	3,1	2,2	5,6	0,0	0,51
HST/E	100,6	5,6	25,9	0,9955	0,0	5,1	9,2	3,1	2,2	5,6	0,0	0,49
Siha7	101,1	4,7	26,5	0,9953	0,0	4,7	9,2	3,0	2,3	5,3	0,0	0,41
Siha7/E	101,5	5,0	26,3	0,9953	0,0	4,7	9,2	3,0	2,3	5,3	0,0	0,41
U228	97,3	5,1	26,4	0,9960	0,0	5,0	8,9	3,1	2,3	5,0	0,0	0,34
U228/E	97,2	5,4	26,6	0,9962	0,0	4,9	8,9	3,0	2,3	5,0	0,0	0,36
Biodiva	100,7	4,1	27,2	0,9954	0,0	4,6	8,8	3,1	2,2	4,9	0,0	0,36
Biodiva/E	100,4	4,7	27,0	0,9956	0,0	4,6	8,8	3,0	2,2	4,8	0,0	0,38
Flavia	99,5	4,5	25,8	0,9952	0,0	4,7	8,5	3,1	2,1	5,1	0,0	0,42
Flavia/E	99,4	4,7	25,8	0,9953	0,0	4,6	8,5	3,1	2,1	5,1	0,0	0,41

a angereichert mit 5 g/L Fructose

Tab. 7-2: Weinchemische Parameter 2013er Chardonnay Grundwein und Sekt

Parameter	vorh. Alk	RZ ^a	zf.Extr	Dichte	Gluc	Fruc	titr.Sr	pH	Weinsr	Äpfelsr	Milchs	fl.Sr
	g/L	g/L	g/L		g/L	g/L	g/L		g/L	g/L	g/L	g/L
Grundwein												
DK/BC	98,5	0,0	26,0	0,9937	0,0	0,0	7,4	3,3	2,3	3,9	0,0	0,31
DK/DV10	98,8	0,0	28,0	0,9944	0,0	0,0	8,1	3,2	2,5	4,4	0,0	0,39
NK/BC	99,4	0,0	26,1	0,9936	0,0	0,0	7,6	3,3	2,3	3,9	0,0	0,4
NK/DV10	92,8	1,9	28,7	0,9963	0,0	0,0	8,4	3,3	2,6	4,7	0,1	0,51
Sekt												
DK/BC/BC/E	103,7	13,3	21,38	0,9963	3,5	7,9	5,15	3,4	1,63	0,08	2,38	0,53
DK/BC/BC	102,9	13,3	21,37	0,9964	3,7	8,1	5,07	3,4	1,60	0,17	2,40	0,52
NK/BC/BC/E	105,3	12,2	21,55	0,9957	2,7	7,7	5,30	3,4	1,65	0,08	2,38	0,58
NK/BC/BC	104,3	12,8	21,20	0,9960	3,0	7,9	5,20	3,4	1,63	0,10	2,45	0,59
DK/DV10/BC/E	101,6	15,1	21,83	0,9975	4,0	9,29	5,47	3,5	1,60	0,17	2,73	0,66
DK/DV10/BC	100,8	16,2	21,80	0,9980	5,1	9,3	5,43	3,5	1,63	0,15	2,85	0,64
NK/DV10/BC/E	102,2	17,2	21,50	0,9981	4,4	10,4	5,68	3,5	1,58	0,15	2,73	0,75
NK/DV10/BC	101,2	16,7	21,78	0,9981	4,5	10,2	5,68	3,5	1,63	0,15	2,85	0,78
DK/DV10/IOC/E	100,7	17,0	22,00	0,9984	5,1	10,1	5,57	3,5	1,60	0,23	2,90	0,69
DK/DV10/IOC	100,0	18,3	21,73	0,9989	6,4	10,1	5,57	3,5	1,70	0,17	2,93	0,66
NK/DV10/IOC/E	100,6	18,7	21,37	0,9989	5,6	11,3	5,70	3,5	1,57	0,23	2,90	0,77
NK/DV10/IOC	99,8	18,9	21,90	0,9992	5,9	11,4	5,70	3,5	1,67	0,33	3,03	0,78

a z.T. angereichert über Dosage

Tab. 7-3: Weinchemische Parameter 2012er Riesling Grundwein und Sekt

Variante	vorh. Alk g/L	RZ ^a g/L	zf.Extr g/L	Dichte	Gluc g/L	Fruc g/L	titr.Sr g/L	pH	Weinsr g/L	Äpfelsr g/L	Milchs g/L	fl.Sr g/L
Grundwein												
RC212	93,6	2,0	20,66	0,9938	0,0	3,4	6,98	3,0	2,77	2,91	0,0	0,38
U228	92,3	3,7	21,91	0,9952	0,0	4,6	7,65	2,9	2,95	3,39	0,0	0,32
Sekt												
U228/ U228	96,3	15,9	21,02	0,9994	6,1	11,6	6,87	3,0	2,54	3,11	0,07	0,34
U228/ RC212	102,4	2,0	22,04	0,9932	0,0	3,0	7,44	2,9	2,71	3,23	0,01	0,28
RC212/ U228	98,9	10,1	22,36	0,9969	2,7	8,4	7,6	2,9	2,79	3,34	0,00	0,36
RC212/ RC212	92,6	23,2	20,74	1,0025	10,5	14,6	6,83	3,0	2,70	2,98	0,01	0,37

a z.T. angereichert über Dosage

Tab. 7-4: Weinchemische Parameter 2013er Riesling Grundwein und Sekt

Parameter	vorh. Alk g/L	RZ ^a g/L	zf.Extr g/L	Dichte	Gluc g/L	Fruc g/L	titr.Sr g/L	pH	Weinsr g/L	Äpfelsr g/L	Milchsr g/L	fl.Sr g/L
Grundwein												
StZt/IOC	84,2	0,0	27,8	0,9965	0,0	0,0	9,7	3,1	3,5	5,5	0,0	0,52
GTP/IOC	94,8	1,9	29,7	0,9964	0,0	0,0	9,2	2,9	3,1	4,7	0,0	0,44
StZt/DV10	85,0	0,2	28,7	0,9968	0,0	0,0	10	3,0	3,6	5,4	0,0	0,52
GTP/DV10	95,7	0,0	30,9	0,9966	0,0	0,0	9,6	2,9	3,3	4,7	0,0	0,45
Sekt												
GTP/ DV10/IOC/E	103,7	9,1	26,70	0,9967	1,6	5,2	8,95	2,9	2,00	4,53	0,00	0,42
GTP/ DV10/IOC	102,9	13,1	26,60	0,9984	3,6	7,1	8,90	2,9	1,98	4,45	0,00	0,42
StZt /DV10/IOC/E	91,1	11,3	21,93	0,9976	1,9	7,1	6,98	3,2	2,18	0,73	2,38	0,64
StZt/ DV10/IOC	88,8	13,3	21,35	0,9985	3,2	8,4	6,55	3,3	2,25	0,13	3,20	0,69
GTP/ DV10/Siha4/E	104,1	12,8	26,77	0,9981	3,9	6,8	8,90	2,9	1,97	4,47	0,00	0,45
GTP/ DV10/Siha4	103,4	17,5	26,73	1,0000	6,2	8,7	8,83	2,9	1,93	4,33	0,00	0,45
StZt/ DV10/Siha4/E	93,5	10,8	25,23	0,9983	3,1	5,5	9,35	3,0	2,18	5,15	0,05	0,58
StZt/ DV10/Siha4	93,8	11,3	25,40	0,9985	3,5	5,7	9,43	3,1	2,20	5,13	0,03	0,61
GTP/ IOC/IOC/E	97,4	18,7	24,17	1,0004	5,3	12,2	6,80	3,1	2,07	0,93	2,17	0,58
GTP/ IOC/IOC	97,6	19,2	23,93	1,0004	5,4	12,1	6,75	3,1	1,98	0,58	2,18	0,60
StZt/ IOC/IOC/E	90,2	9,4	21,83	0,9969	1,5	6,2	6,80	3,3	2,13	0,73	2,68	0,64
StZt/ IOC/IOC	89,7	10,0	21,28	0,9970	2,0	6,8	6,53	3,3	2,10	0,38	3,20	0,67

a z.T. angereichert über Dosage

Tab. 7-5: Weinchemische Parameter 2013er Muskateller Grundwein und Sekt

Variante	vorh. Alk g/L	RZ ^a g/L	zf.Extr g/L	Dichte	Gluc g/L	Fruc g/L	titr.Sr g/L	pH	Weinsr g/L	Äpfelsr g/L	Milchs g/L	fl.Sr g/L
Grundwein												
DV10	90,3	0,3	23,7	0,9941	0,0	0,0	7,7	3,1	2,9	3,5	0,0	0,37
BC	90,2	0,0	22,6	0,9936	0,0	0,0	6,4	3,2	2,6	2,9	0,1	0,19
Sekt												
BC/BC/E	101,1	10,5	20,25	1,00	3,25	5,60	6,10	3,1	1,65	2,65	0,00	0,25
BC/BC	100,8	10,4	20,17	1,00	3,50	5,53	6,07	3,1	1,70	2,67	0,00	0,22
BC/DV10/E	100,5	10,0	20,35	1,00	3,05	5,60	6,30	3,1	1,80	2,90	0,00	0,30
BC/DV10	100,5	9,5	20,53	0,99	2,87	5,30	6,30	3,1	1,87	2,80	0,00	0,26
DV10/BC/E	96,1	10,5	21,17	1,00	2,70	6,47	7,13	3,1	1,93	3,50	0,00	0,37
DV10/BC	96,3	10,2	21,00	1,00	2,23	6,37	7,00	3,1	1,97	3,17	0,20	0,35
DV10/DV10/E	96,8	9,6	21,23	1,00	1,77	5,97	7,37	3,1	1,93	3,60	0,00	0,43
DV10/DV10	96,7	11,0	21,57	1,00	2,57	6,77	7,43	3,1	2,07	3,67	0,07	0,41

a z.T. angereichert über Dosage

8 Literatur

Acker, L. (1967a) Nachweis und Bestimmung der Mono- und Oligosaccharide. In *Analytik der Lebensmittel, Nachweis und Bestimmung von Lebensmittel-Inhaltsstoffen*, (Diemair, W., ed.) pp. 338. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Acker, L. (1967b) Nachweis und Bestimmung der Mono- und Oligosaccharide. In *Analytik der Lebensmittel, Nachweis und Bestimmung von Lebensmittel-Inhaltsstoffen*, (Diemair, W., ed.) pp. 391. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Arnold, R.A. und Noble, A.C. (1979) Effect of Pomace Contact on the Flavor of Chardonnay Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 30: 179-181.

Aryan, A.P., Wilson, B., Strauss, C.R. und 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: 182-188.

Bach, H.-P., Troost, G. und Rhein, O.H. (2010) *Handbuch der Lebensmitteltechnologie : Sekt, Schaumwein, Perlwein*. 3. Auflage. Eugen Ulmer KG, Stuttgart.

Baderschneider, B. und Winterhalter, P. (2001) Isolation and Characterization of Novel Benzoates, Cinnamates, Flavonoids, and Lignans from Riesling Wine and Screening for Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2788-2798.

Baek, H.H. und Cadwallader, K.R. (1999) Contribution of Free and Glycosidically Bound Volatile Compounds to the Aroma of Muscadine Grape Juice. *Journal of Food Science* 64: 441-444.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. und Loureiro, V. (2012) The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153: 243-259.

Barbagallo, R., Spagna, G., Abbate, C., Azzaro, G. und Palmeri, R. (2002) Inexpensive isolation of β -d-glucopyranosidase from α -l-arabinofuranosidase, α -l-rhamnopyranosidase, and o-acetyltransferase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 101: 1-13.

Barbe, J.-C., Pineau, B. und Ferreira, A.C.S. (2008) Instrumental and Sensory Approaches for the Characterization of Compounds Responsible for Wine Aroma. *Chemistry & Biodiversity* 5: 1170-1183.

Barnett, J.A. (1998) A history of research on yeasts 1: Work by chemists and biologists 1789–1850. *Yeast* 14: 1439-1451.

Bartowsky, E.J. und Borneman, A.R. (2011) Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92: 441-447.

Bauer, F.F. und Pretorius, I.S. (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency : How to survive the making of wine - A Review. *South African Journal for Enology and Viticulture* 21 27-51.

Baumes, R., Wirth, J., Bureau, S., Gunata, Y. und Razungles, A. (2002) Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Analytica Chimica Acta* 458: 3-14.

- Berger, T. (2013) Erstellung und Validierung einer Kalibration von Traubenminor- und Majorbestandteilen als Grundlage einer qualitätsorientierten Traubengeldauszahlung auf Basis der FT-MIR Analytik. Thesis, Technische Universität Kaiserslautern.
- Binder, G. (1998) Steigerung der Weinqualität durch Aromaenzyme SLFA Neustadt Aktuell 64-79.
- Boatright, J., Negre, F., Chen, X., Kish, C.M., Wood, B., Peel, G., Orlova, I., Gang, D., Rhodes, D. und Dudareva, N. (2004) Understanding in Vivo Benzenoid Metabolism in Petunia Petal Tissue. *Plant Physiology* 135: 1993-2011.
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Carrau, F. und Dellacassa, E. (2002) Effect of β -Glycosidase Activity of *Oenococcus oeni* on the Glycosylated Flavor Precursors of Tannat Wine during Malolactic Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2344-2349.
- Bönisch, F., Frotscher, J., Stanitzek, S., Rühl, E., Wüst, M., Bitz, O. und Schwab, W. (2014) A UDP-Glucose:Monoterpenol Glucosyltransferase Adds to the Chemical Diversity of the Grapevine Metabolome. *Plant Physiology* 165: 561-581.
- Boqué, R. und Heyden, Y.V. (2009) The Limit of Detection. *LCGC Europe* 22.
- Borneman, A.R., Chambers, P.J. und Pretorius, I.S. (2009) Systems Biology as a Platform for Wine Yeast Strain Development. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, (König, H., Unden, G. und Fröhlich, J., eds.), pp. 395-414. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. und Kunkee, R.E. (1996) Yeast and Biochemistry of Ethanol Fermentation. In *Principles and Practices of Winemaking*, pp. 102-181. Chapman & Hall, New York.
- Bureau, S.M., Baumes, R.L. und Razungles, A.J. (2000) Effects of vine or bunch shading on the glycosylated flavor precursors in grapes of *Vitis vinifera* L. Cv. Syrah. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1290-1297.
- Cabaroglu, T., Selli, S., Canbas, A., Lepoutre, J.-P. und Günata, Z. (2003) Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 581-587.
- Cabaroglu, T., Canbas, A., Baumes, R., Bayonove, C., Lepoutre, J.P. und Günata, Z. (1997) Aroma Composition of a White Wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir as Affected by Skin Contact. *Journal of Food Science* 62: 680-683.
- Carrau, F.M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G. und Henschke, P.A. (2005) De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 243: 107-115.
- Gen, H. und He, Y. (2007) Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science & Technology* 18: 72-83.
- Chassagne, D., Vernizeau, S., Nedjma, M. und Alexandre, H. (2005a) Hydrolysis and sorption by *Saccharomyces cerevisiae* strains of Chardonnay grape must glycosides during fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 212-217.
- Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H. und Voilley, A. (2005b) Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chemistry* 91: 39-44.

- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J.-n. und Pons, M. (1992) The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60: 165-178.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J.-n. und Lavigne, V. (1993) Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62: 191-202.
- Cheyrier, V., Rigaud, J., Souquet, J.M., BarillÈRE, J.M. und Moutounet, M. (1989) Effect of Pomace Contact and Hyperoxidation on the Phenolic Composition and Quality of Grenache and Chardonnay Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 40: 36-42.
- Christmann, M. (2001) *Schonende Traubenverarbeitung: Theoretische Grundlagen, Konsequenzen und Auswirkungen*. Meininger Verlag GmbH, Neustadt an der Weinstraße.
- Ciani, M. und Maccarelli, F. (1997) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14: 199-203.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I. und Domizio, P. (2010) Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10: 123-133.
- Cordonnier, R. und Bayonove, C. (1974) Mise en evidence dans la baie de raisin, variete Muscat d'Alexandrie, de monoterpenes lies revelables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *CR Acad Sci* 278: 3387-3390.
- Daenen, L., Saison, D., Sterckx, F., Delvaux, F.R., Verachtert, H. und Derdelinckx, G. (2008) Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 104: 478-488.
- Degre, R. (1993) Selection and Commercial Cultivation of Wine Yeasts and Bacteria. In *Wine Microbiology and Technology*, (Fleet, G. H., ed.) pp. 421-443. Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, Schweiz.
- Delcroix, A., Günata, Z., Sapis, J.-C., Salmon, J.-M. und Bayonove, C. (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: 291-296.
- Demmig-Adams, B. und Adams, W.W. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1: 21-26.
- Dietz, K.J., Sauter, A., Wichert, K., Messdaghi, D. und Hartung, W. (2000) Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *Journal of Experimental Botany* 51: 937-944.
- Dimitriadis, E. und Williams, P.J. (1984) The Development and Use of a Rapid Analytical Technique for Estimation of Free and Potentially Volatile Monoterpene Flavorants of Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 35: 66-71.
- Dugelay, I., Gunata, Z., Sapis, J.C., Baumes, R. und Bayonove, C. (1993) Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 2092-2096.
- Dunkel, A., Steinhaus, M., Kotthoff, M., Nowak, B., Krautwurst, D., Schieberle, P. und Hofmann, T. (2014) Genuine Geruchssignaturen der Natur – Perspektiven aus der Lebensmittelchemie für die Biotechnologie. *Angewandte Chemie* 126: 7250-7271.

- Dziadas, M. und Jeleń, H.H. (2016) Comparison of enzymatic and acid hydrolysis of bound flavor compounds in model system and grapes. *Food Chemistry* 190: 412-418.
- Eglinton, J.M., McWilliam, S.J., Fogarty, M.W., Francis, I.L., Kwiatkowski, M.J., HØJ, P.B. und Henschke, P.A. (2000) The effect of *Saccharomyces bayanus*-mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 190-196.
- Fernández-González, M., Di Stefano, R. und Briones, A. (2003) Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiology* 20: 35-41.
- Ferner, M.J. (2016) Immobilisierung von Glycosidasen an magnetische Partikel mit dem Ziel einer Weinaromaverbesserung. Thesis, Technischen Universität Kaiserslautern
- Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R. und Cacho, J. (2002) Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4048-4054.
- Fia, G., Giovani, G. und 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: 509-517.
- Fischer, U. und Berger, T. (2006) Objektive Bestimmung der Traubengesundheit. *Der Deutsche Weinbau, Neustadt* 13: 16-19.
- Fischer, U., Ganss, S. und Schmarr, H.G. (2009) Flavour change with the second fermentation. *Der Deutsche Weinbau, Neustadt, Germany* 8: 14-18.
- Fischer, U., Trautmann, S., Binder, G., Wilke, A. und Göritz, S. (2001) Intensivierung des Weinaromas. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), Darmstadt.
- Fleet, G.H. (1990) Growth of yeasts during wine fermentations. *Journal of Wine Research* 1: 211.
- Fleet, G.H. und Heard, G.M. (1993) Yeasts-Growth During Fermentation. In *Wine Microbiology And Biotechnology*, (Fleet, G. H., ed.) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, Schweiz.
- Ford, C.M. und HØJ, P.B. (1998) Multiple glucosyltransferase activities in the grapevine *Vitis vinifera* L. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 48-58.
- Foss (2002a) Operator's Manual WineScan FT 120 Type 77110 and 77310. Foss Electric A/S, Hillerød, Dänemark.
- Foss (2002b) Reference Manual WineScan FT 120 Type 77110 and 77310. Foss Electric A/S, Hillerød, Dänemark.
- Francis, I.L. und Newton, J.L. (2005) Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*.
- Gachon, C.M.M., Langlois-Meurinne, M. und Saindrenan, P. (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* 10: 542-549.

- Ganß, S., Kirsch, F., Winterhalter, P., Fischer, U. und Schmarr, H.-G. (2011) Aroma Changes due to Second Fermentation and Glycosylated Precursors in Chardonnay and Riesling Sparkling Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 2524-2533.
- Gerdes, S.M., Winterhalter, P. und Ebeler, S.E. (2001) Effect of Sunlight Exposure on Norisoprenoid Formation in White Riesling Grapes. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, Vol. 802 pp. 262-272. American Chemical Society.
- Gholami, M., Coombe, B.G., Robinson, S.P. und Williams, P.J. (1996) Amounts of glycosides in grapevine organs during berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2: 59-63.
- Gholami, M., Hayasaka, Y., Coombe, B.G., Jackson, J.F., Robinson, S.P. und Williams, P.J. (1995) Biosynthesis of flavour compounds in Muscat Gordo Blanco grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 19-24.
- Gil, J.V., Manzanares, P., Genovés, S., Vallés, S. und González-Candelas, L. (2005) Overproduction of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *International Journal of Food Microbiology* 103: 57-68.
- Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H. und Spraul, M. (2013) Targeted and Nontargeted Wine Analysis by 1H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 5610-5619.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. und Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 Genes. *Science* 274: 546-567.
- Goldberg, D.M., Karumanchiri, A., Soleas, G.J. und Tsang, E. (1999) Concentrations of Selected Polyphenols in White Commercial Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 50: 185-193.
- Gomez, E., Martinez, A. und Laencina, J. (1994) Localization of free and bound aromatic compounds among skin, juice and pulp fractions of some grape varieties. *Vitis*.
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J. und Zamora, F. (2015) Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulasporea delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology* 240: 999-1012.
- Gottfried, J.A. (2010) Central mechanisms of odour object perception. *Nat Rev Neurosci* 11: 628-641.
- Gottwald, W. und Wachter, G. (1997) IR-Spektroskopie für Anwender. Verlag VCH, Weinheim.
- Gowda, L.R., Bachhawat, N. und Bhat, S.G. (1991) Permeabilization of Bakers' yeast by cetyltrimethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis. *Enzyme and Microbial Technology* 13: 154-157.
- Grob, K., Grob, G. und Grob Jr, K. (1981) Testing capillary gas chromatographic columns. *Journal of Chromatography A* 219: 13-20.

Grosch, W. (2001) Evaluation of the Key Odorants of Foods by Dilution Experiments, Aroma Models and Omission. *Chemical Senses* 26: 533-545.

Guedes de Pinho, P., Silva Ferreira, A.C., Mendes Pinto, M., Benitez, J.G. und Hogg, T.A. (2001) Determination of Carotenoid Profiles in Grapes, Musts, and Fortified Wines from Douro Varieties of *Vitis vinifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5484-5488.

Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L. und Cordonnier, R.E. (1985a) 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 857-862.

Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L. und Cordonnier, R.E. (1985b) The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of Chromatography A* 331: 83-90.

Gunata, Y.Z., Biron, C., Sapis, J.C. und Bayonove, C. (1989) Glycosidase activities in sound and Botrytis infected grapes in relation to hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides. *Vitis*.

Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Tapiero, C. und Cordonnier, R.E. (1990a) Hydrolysis of grape monoterpenyl .beta.-D-glucosides by various .beta.-glucosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1232-1236.

Günata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L. und 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: 112-114.

Gunata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J.-M., Bayonove, C. und Cordonnier, R. (1988) Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydrate Research* 184: 139-149.

Gunata, Z., Brillouet, J.M., Voirin, S., Baumes, R. und Cordonnier, R. (1990b) Purification and some properties of an .alpha.-L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 772-776.

Günata, Z., Dugelay, I., Vallier, M.J., Sapis, J.C. und Bayonove, C. (1997) Multiple forms of glycosidases in an enzyme preparation from *Aspergillus niger*: Partial characterization of a β -apiosidase. *Enzyme and Microbial Technology* 21: 39-44.

Günata, Z., Blondeel, C., Vallier, M.J., Lepoutre, J.P., Sapis, J.C. und Watanabe, N. (1998) An Endoglycosidase from Grape Berry Skin of Cv. M. Alexandria Hydrolyzing Potentially Aromatic Disaccharide Glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 2748-2753.

Guth, H. (1997a) Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3027-3032.

Guth, H. (1997b) Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3022-3026.

Hayasaka, Y., Baldock, G.A., Pardon, K.H., Jeffery, D.W. und Herderich, M.J. (2010a) Investigation into the Formation of Guaiacol Conjugates in Berries and Leaves of Grapevine *Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Sauvignon Using Stable Isotope Tracers Combined with HPLC-MS and MS/MS Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 2076-2081.

- Hayasaka, Y., Dungey, K.A., Baldock, G.A., Kennison, K.R. und Wilkinson, K.L. (2010b) Identification of a β -d-glucopyranoside precursor to guaiacol in grape juice following grapevine exposure to smoke. *Analytica Chimica Acta* 660: 143-148.
- Hayasaka, Y., Baldock, G.A., Parker, M., Pardon, K.H., Black, C.A., Herderich, M.J. und Jeffery, D.W. (2010c) Glycosylation of Smoke-Derived Volatile Phenols in Grapes as a Consequence of Grapevine Exposure to Bushfire Smoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 10989-10998.
- Heard, G.M. und Fleet, G.H. (1985) Growth of Natural Yeast Flora during the Fermentation of Inoculated Wines. *Applied and Environmental Microbiology* 50: 727-728.
- Hernandez-Orte, P., Concejero, B., Astrain, J., Lacau, B., Cacho, J. und Ferreira, V. (2015) Influence of viticulture practices on grape aroma precursors and their relation with wine aroma. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95: 688-701.
- Hernández-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E. und Ferreira, V. (2008) The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry* 107: 1064-1077.
- Hernández, L.F., Espinosa, J.C., Fernández-González, M. und Briones, A. (2003) β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology* 80: 171-176.
- Hjelmeland, A.K. und Ebeler, S.E. (2015) Glycosidically Bound Volatile Aroma Compounds in Grapes and Wine: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 66: 1-11.
- Hufnagel, J.C. und Hofmann, T. (2008) Quantitative Reconstruction of the Nonvolatile Sensometabolome of a Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9190-9199.
- Ibarz, M., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Loscos, N. und Cacho, J. (2006) Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *Journal of Chromatography A* 1116: 217-229.
- Iland, P.G., Cynkar, W., Francis, I.L., Williams, P.J. und 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: 171-178.
- Ilc, T., Parage, C., Boachon, B., Navrot, N. und WERCK, D. (2016) Monoterpenol oxidative metabolism: role in plant adaption and potential applications. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Janusz, A., Capone, D.L., Puglisi, C.J., Perkins, M.V., Eelsey, G.M. und Sefton, M.A. (2003) (E)-1-(2,3,6-Trimethylphenyl)buta-1,3-diene: A Potent Grape-Derived Odorant in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7759-7763.
- Jolly, N.P., Varela, C. und Pretorius, I.S. (2014) Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14: 215-237.
- Jones, P. und Vogt, T. (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213: 164-174.
- Joslin, W.S. und Ough, C.S. (1978) Cause and Fate of Certain C6 Compounds Formed Enzymatically in Macerated Grape Leaves During Harvest and Wine Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 29: 11-17.

- Kemp, B., Alexandre, H., Robillard, B. und Marchal, R. (2015) Effect of Production Phase on Bottle-Fermented Sparkling Wine Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 19-38.
- King, A. und Richard Dickinson, J. (2000) Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16: 499-506.
- Klein, E., Farnow, H. und Rojahn, W. (1964) Die Chemie der Linalool-oxide. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 675: 73-82.
- Knudsen, J.T., Tollsten, L. und Bergström, L.G. (1993) The International Journal of Plant Biochemistry Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* 33: 253-280.
- Köhler, H.J., Geßner, M. und Maier, C. (2000) Enzymes, glucose and bentonite: The use of flavour enhancing enzymes. *Der Deutsche Weinbau, Neustadt* 16-17 34-37.
- Kotseridis, Y., Baumes, R. und Skouroumounis, G.K. (1998) Synthesis of labelled [2H4]β-damascenone, [2H2]2-methoxy-3- isobutylpyrazine, [2H3]α-ionone, and [2H3]β-ionone, for quantification in grapes, juices and wines¹. *Journal of Chromatography A* 824: 71-78.
- Kurtzmann, C.P., Fell, W.F. und Boekhout, T. (2011) *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 5th edition. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Lecas, M., Gunata, Z.Y., Sapis, J.-C. und Bayonove, C.L. (1991) Purification and partial characterization of β-glucosidase from grape. *Phytochemistry* 30: 451-454.
- Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCT Method. *Methods* 25: 402-408.
- López, R., Aznar, M., Cacho, J. und 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: 167-177.
- Maarse, H. und Visscher, C.A. (1994) *Volatile Compounds in Food: Qualitative and Quantitative Data*. 6. Edition. Central Institute for Nutrition and Food Research, TNO, Zeist, The Netherland.
- Magni, P. und Porzano, T. (2003) Concurrent solvent recondensation large sample volume splitless injection. *Journal of Separation Science* 26: 1491-1498.
- Maicas, S. und Mateo, J.J. (2005) Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 322-335.
- Maicas, S. und Mateo, J. (2016) Microbial Glycosidases for Wine Production. *Beverages* 2: 20.
- Mansfield, A.K., Zoecklein, B.W. und Whiton, R.S. (2002) Quantification of Glycosidase Activity in Selected Strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 303-307.
- Marais, J. und Rapp, A. (1988) Effect of Skin-contact Time and Temperature on Juice and Wine Composition and Wine Quality *South African Journal of Viticulture and Enology* 9: 22-30.

- Marais, J., Hunter, J.J. und Haasbroek, P.D. (1999) Effect of canopy microclimate season and region on Sauvignon blanc grape composition and wine quality. *South African Journal of Viticulture and Enology* 20: 19-30.
- Marais, J.V., G.; van Wyk, C. J.; Rapp, A. (1992) Effect of region on free and bound monoterpene and C₁₃-norisoprenoid concentrations in weisser riesling wines. *South African Journal for Enology and Viticulture* 12: 71-77.
- Martin, D.M., Aubourg, S., Schouwey, M.B., Daviet, L., Schalk, M., Toub, O., Lund, S.T. und Bohlmann, J. (2010) Functional Annotation, Genome Organization and Phylogeny of the Grapevine (*Vitis vinifera*) Terpene Synthase Gene Family Based on Genome Assembly, FLcDNA Cloning, and Enzyme Assays. *BMC Plant Biology* 10: 1-22.
- Martini, A. (1993) Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces*. *Journal of Wine Research* 4: 165.
- Martini, A., Ciani, M. und Scorzetti, G. (1996) Direct Enumeration and Isolation of Wine Yeasts from Grape Surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture* 47: 435-440.
- Masanetz, C., Guth, H. und Grosch, W. (1998) Fishy and hay-like off-flavours of dry spinach. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 206: 108-113.
- Mateo, J.J. und Di Stefano, R. (1997) Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiology* 14: 583-591.
- Mateo, J.J. und Jiménez, M. (2000) Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A* 881: 557-567.
- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F. und Günata, Z. (2005) A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C₁₃-norisoprenoid accumulation. *Journal of Experimental Botany* 56: 2721-2731.
- Mathieu, S., Wirth, J., Sauvage, F.-X., Lepoutre, J.-P., Baumes, R. und Gunata, Z. (2009) Biotransformation of C₁₃-norisoprenoids and monoterpenes by a cell suspension culture of cv. Gamay (*Vitis vinifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 97: 203-213.
- Mayr, C.M., Parker, M., Baldock, G.A., Black, C.A., Pardon, K.H., Williamson, P.O., Herderich, M.J. und Francis, I.L. (2014) Determination of the Importance of In-Mouth Release of Volatile Phenol Glycoconjugates to the Flavor of Smoke-Tainted Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 2327-2336.
- McLaughlin, D.J., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., Spatafora, J.W. und Vilgalys, R. (2009) The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology* 17: 488-497.
- Mendes-Pinto, M.M. (2009) Carotenoid breakdown products the—norisoprenoids—in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483: 236-245.
- Milo, C. und Blank, I. (1998) Quantification of Impact Odorants in Food by Isotope Dilution Assay: Strength and Limitations. In *Flavor Analysis*, Vol. 705 pp. 250-259. American Chemical Society.
- Mortimer, R. und Polsinelli, M. (1999) On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150: 199-204.

- Naumov, G. (1996) Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Industrial Microbiology* 17: 295-302.
- Nieuwoudt, H.H., Prior, B.A., Pretorius, I.S., Manley, M. und Bauer, F.F. (2004) Principal Component Analysis Applied to Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Design of Calibration Sets for Glycerol Prediction Models in Wine and for the Detection and Classification of Outlier Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3726-3735.
- Nieuwoudt, H.H., Pretorius, I.S., Bauer, F.F., Nel, D.G. und Prior, B.A. (2006) Rapid screening of the fermentation profiles of wine yeasts by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* 67: 248-256.
- Nikfardjam, M.S.P. (2011) Polyphenole in Weißweinen und Traubensäften und ihre Veränderung im Verlauf der Herstellung. Thesis, Justus von Liebig-Universität Giessen.
- Noble, A.C. und Ebeler, S.E. (2002) Use of multivariate statistics in understanding wine flavor. *Food Reviews International* 18: 1-20.
- Noble, A.C., Strauss, C.R., Williams, P.J. und Wilson, B. (1987) Sensory evaluation of non-volatile flavour precursors in wine. In *Flavour Science and Technology: Proceedings of the 5th Weurman Flavour Research Symposium*, (Martens, M., ed.) pp. 383-391. Wiley & Sons, New York.
- Oliveira, J.M., Faria, M., Sá, F., Barros, F. und Araújo, I.M. (2006) C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Analytica Chimica Acta* 563: 300-309.
- Ono, E., Homma, Y., Horikawa, M., Kunikane-Doi, S., Imai, H., Takahashi, S., Kawai, Y., Ishiguro, M., Fukui, Y. und Nakayama, T. (2010) Functional Differentiation of the Glycosyltransferases That Contribute to the Chemical Diversity of Bioactive Flavonol Glycosides in Grapevines (*Vitis vinifera*). *The Plant Cell* 22: 2856-2871.
- Orlova, I., Marshall-Colón, A., Schnepf, J., Wood, B., Varbanova, M., Fridman, E., Blakeslee, J.J., Peer, W.A., Murphy, A.S., Rhodes, D., Pichersky, E. und Dudareva, N. (2006) Reduction of Benzenoid Synthesis in Petunia Flowers Reveals Multiple Pathways to Benzoic Acid and Enhancement in Auxin Transport. *The Plant Cell* 18: 3458-3475.
- Palmeri, R. und Spagna, G. (2007) β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 382-389.
- Palomo, E.S., Perez-Coello, M.S., Diaz-Maroto, M.C., Vinas, M.A.G. und Cabezudo, M.D. (2006) Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat "a petit grains" wines and effect of skin contact. *Food Chemistry* 95: 279-289.
- Papargyriou, E. (2003) Veränderung von glykosidisch gebundenen Sekundärmetaboliten bei *Vitis vinifera* L. (cvs. Gewürztraminer und Riesling) in Zusammenhang mit Traubenreife, Weinbereitung und Weinlagerung. Thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Park, S.K. und Noble, A.C. (1993) Monoterpenes and Monoterpene Glycosides in Wine Aromas. In *Beer and Wine Production*, Vol. 536 pp. 98-109. American Chemical Society.
- Park, S.K., Morrison, J.C., Adams, D.O. und Noble, A.C. (1991) Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 514-518.
- Parker, M., Osidacz, P., Baldock, G.A., Hayasaka, Y., Black, C.A., Pardon, K.H., Jeffery, D.W., Geue, J.P., Herderich, M.J. und Francis, I.L. (2012) Contribution of Several Volatile

Phenols and Their Glycoconjugates to Smoke-Related Sensory Properties of Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 2629-2637.

Patz, C.-D. und Dietrich, H. (2005) Automatische Bestimmung der Traubenqualität. *Der Deutsche Weinbau* 14: 16-22.

Patz, C.D., Blieke, A., Ristow, R. und Dietrich, H. (2004) Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica Chimica Acta* 513: 81-89.

Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H. und Heard, G.M. (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4: 865-877.

Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.

Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T. und Augustyn, O. (1999) Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *South African Journal of Viticulture and Enology* 20: 61-74.

Quatrini, P., Marineo, S., Puglia, A., Restuccia, C., Caggia, C., Randazzo, C., Spagna, G., Barbagallo, R., Palmeri, R. und Giudici, P. (2008) Partial sequencing of the β -glucosidase-encoding gene of yeast strains isolated from musts and wines. *Annals of Microbiology* 58: 503-508.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. und Ramón, D. (1992) Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2948-2953.

Rapp, A. und Hastrich, H. (1976) Gas chromatography investigations on the aroma substances of grape berries. II. Possibilities of cv. characterisation. *Vitis*.

Rapp, A. und Mandery, H. (1986) Wine aroma. *Experientia* 42: 873-884.

Rapp, A. und Versini, G. (1996) Volatile phenolic compounds in wine. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*.

Rapp, A., Volkmann, C. und Niebergall, H. (1993) Analysis of volatile aroma compounds of grapevine: Characterization of Riesling and Riesling derived cultivars. *Vitis* 32: 171-178.

Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J.M., Mayen, M., Merida, J. und Medina, M. (2002) Adsorption of Phenolic Compounds and Browning Products in White Wines by Yeasts and Their Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7432-7437.

Razungles, A., Gunata, Z., Pinatel, S., Baumes, R. und Bayonove, C. (1993) Quantitative studies on terpenes, norisoprenoids and their precursors in several varieties of grapes. *Sciences Des Aliments* 13: 59-72.

Renouf, V., Claisse, O. und Lonvaud-Funel, A. (2007) Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 149-164.

Reynolds, A.G., Wardle, D.A. und Dever, M. (1993) Terpene response to pressing, harvest date, and skin contact in *Vitis vinifera*. *HortScience*.

Riccio, P., Rossano, R., Vinella, M., Domizio, P., Zito, F., Sansevrino, F., D'Elia, A. und Rosi, I. (1999) Extraction and immobilization in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 123-129.

Ritter, G. (1997) Die Bedeutung der phenolischen Saft- und Weinhaltstoffe während der Verarbeitung von Äpfeln, Speierling und weißen Trauben. Der Einfluß moderner Verfahrenstechnologie auf das Endprodukt. Thesis, Forschungsanstalt Geisenheim.

Ritter, H. und Schulz, G.E. (2004) Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *The Plant Cell* 16: 3426-3436.

Robinson, A.L., Boss, P.K., Solomon, P.S., Trengove, R.D., Heymann, H. und Ebeler, S.E. (2014a) Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *American Journal of Enology and Viticulture* 65: 1-24.

Robinson, A.L., Boss, P.K., Solomon, P.S., Trengove, R.D., Heymann, H. und Ebeler, S.E. (2014b) Origins of Grape and Wine Aroma. Part 2. Chemical and Sensory Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* 65: 25-42.

Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., van Broock, M., Valles, S., Ramón, D. und Caballero, A.C. (2004) Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *Journal of Applied Microbiology* 96: 84-95.

Rosi, I., Vinella, M. und Domizio, P. (1994) Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 519-527.

Rosini, G. (1984) Assessment of Dominance of added Yeast in Wine Fermentation and Origin of *Saccharomyces cerevisiae* in Winemaking. *The Journal of General and Applied Microbiology* 30: 249-256.

Rossouw, D., Næs, T. und Bauer, F.F. (2008) Linking gene regulation and the exometabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics* 9: 1-10.

Sacks, G.L., Gates, M.J., Ferry, F.X., Lavin, E.H., Kurtz, A.J. und Acree, T.E. (2012) Sensory Threshold of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and Concentrations in Young Riesling and Non-Riesling Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 2998-3004.

Sánchez, J. und Harwood, J.L. (2002) Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104: 564-573.

Sarry, J.-E. und Günata, Z. (2004) Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry* 87: 509-521.

Schaller, K. (2000) [150th birthday of Hermann Müller-Thurgau - an outstanding personality of grapevine breeding and founder of scientifically based viticulture]. *Wein-Wissenschaft, Wiesbaden*.

Schmid, J. und Amrhein, N. (1995) Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* 39: 737-749.

Schmidt, S., Rainieri, S., Witte, S., Matern, U. und Martens, S. (2011) Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Glucosidase That Hydrolyzes Flavonoid Glucosides. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 1751-1757.

- Schneider, R., Charrier, F., Moutounet, M. und Baumes, R. (2004) Rapid analysis of grape aroma glycoconjugates using Fourier-transform infrared spectrometry and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta* 513: 91-96.
- Schneider, V. (2008) Optimization of malo-lactic fermentation. *Die Winzer-Zeitschrift, Germany* 23 38-40.
- Schreier, F., Drawert, F. und Junker, A. (1976a) Differentiation of the aroma components of different grape varieties (*Vitis vinifera*) by gaschromatography-mass spectrometry (m. engl. u. franz. Zus.). *Chem Mikrobiol Technol Lebensm* (Nuernberg).
- Schreier, P., Drawert, F., Junker, A. und Reiner, L. (1976b) Application of the multiple discriminant analysis for the differentiation of grape varieties using the quantitative distribution of volatile wine constituents (m. engl. u. franz. Zus.). *Mitt Klosterneuburg*.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. und van Dijck, P. (2002) On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 426-435.
- Seckler, J., Jung, R. und Freund, M. (2001) Untersuchung zur Optimierung des Transports von Trauben und Maische. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), Darmstadt.
- Sefton, M.A. und Williams, P.J. (1991) Generation of oxidation artifacts during the hydrolysis of norisoprenoid glycosides by fungal enzyme preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 1994-1997.
- Sefton, M.A., Francis, I.L. und Williams, P.J. (1994) Free and Bound Volatile Secondary Metabolites of *Vitis Vhifera* Grape cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Food Science* 59: 142-147.
- Sefton, M.A., Skouroumounis, G.K., Elsey, G.M. und Taylor, D.K. (2011) Occurrence, Sensory Impact, Formation, and Fate of Damascenone in Grapes, Wines, and Other Foods and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 9717-9746.
- Sigler, J., Krebs, H., Wohlfarth, P. und Amann, R. (2000) Enological experiments in autumn 1999 at the institute for viticulture in Freiburg, Germany. *Der Badische Winzer* 6: 32-37
- Singleton, V.L. und Esau, P. (1969) Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. *Adv Food Res Suppl* 1: 1-261.
- Singleton, V.L., Timberlake, C.F. und Lea, A.G.H. (1978) The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29: 403-410.
- Sinnott, M.L. (1990) Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews* 90: 1171-1202.
- Sokolowsky, M. (2014) Modulation des bitteren Geschmacks und seines zeitlichen Verlaufs durch oenologische Verfahren und sensorisch relevante Weininhaltsstoffe bei Weißwein. Thesis, Technische Universität, Kaiserslautern.
- Sokolowsky, M., Rosenberger, A. und Fischer, U. (2015) Sensory impact of skin contact on white wines characterized by descriptive analysis, time–intensity analysis and temporal dominance of sensations analysis. *Food Quality and Preference* 39: 285-297.

- Somers, T.C., Vérette, E. und Pocock, K.F. (1987) Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 40: 67-78.
- Sommer, S. (2012) Oenologische Einflussfaktoren auf die Bildung bakteriell induzierter Weinfehler. Thesis, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Cuvillier Verlag, Göttingen.
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Martino, A. und Pifferi, P.G. (2000) A simple method for purifying glycosidases: α -l-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 522-530.
- Spagna, G., Romagnoli, D., Angela, M., Bianchi, G. und 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. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 298-304.
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Restuccia, C. und Giudici, P. (2002) Properties of endogenous β -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 1030-1035.
- Stahl-Biskup, E., Intert, F., Holthuijzen, J., Stengele, M. und Schulz, G. (1993) Glycosidically bound volatiles—a review 1986–1991. *Flavour and Fragrance Journal* 8: 61-80.
- Stanitzek, S. (2014) Monoterpenylglucosyltransferasen aus *Vitis vinifera*: Funktionelle Charakterisierung und Analytik der Produkte mittels LC-MS/MS. Thesis, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Strauss, C.R., Wilson, B., Gooley, P.R. und Williams, P.J. (1986) Role of Monoterpenes in Grape and Wine Flavor. In *Biogenesis of Aromas*, Vol. 317 pp. 222-242. American Chemical Society.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A. und Calderón, F. (2007) The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry* 102: 10-21.
- Sun, Q., Gates, M.J., Lavin, E.H., Acree, T.E. und Sacks, G.L. (2011) Comparison of Odor-Active Compounds in Grapes and Wines from *Vitis vinifera* and Non-Foxy American Grape Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 10657-10664.
- Suzuki, K., Yabe, T., Maruyama, Y., Abe, K. und Nakajima, T. (2001) Characterization of Recombinant Yeast Exo- β -1,3-Glucanase (Exg 1p) Expressed in *Escherichia coli* Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65: 1310-1314.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. und Pretorius, I.S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 139-173.
- Test, S.L., Noble, A.C. und Schmidt, J.O. (1986) Effect of Pomace Contact on Chardonnay Musts and Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 133-136.
- Torrens, J., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., Lopez-Tamames, E. und Buxaderas, S. (2010) Assessment of volatile and sensory profiles between base and sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 2455-2461.

- Torrens, J., Urpí, P., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E. und Buxaderas, S. (2008) Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *International Journal of Food Microbiology* 124: 48-57.
- Torresi, S., Frangipane, M.T. und Anelli, G. (2011) Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chemistry* 129: 1232-1241.
- Ubeda Iranzo, J.F., Briones Pérez, A.I. und Izquierdo Cañas, P.M. (1998) Study of the oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. *Food Microbiology* 15: 399-406.
- Ugliano, M., Genovese, A. und Moio, L. (2003) Hydrolysis of Wine Aroma Precursors during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5073-5078.
- Ugliano, M., Bartowsky, E.J., McCarthy, J., Moio, L. und Henschke, P.A. (2006) Hydrolysis and Transformation of Grape Glycosidically Bound Volatile Compounds during Fermentation with Three *Saccharomyces* Yeast Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6322-6331.
- van Den Dool, H. und Kratz, P.D. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A* 11: 463-471.
- Varela, C., Siebert, T., Cozzolino, D., Rose, L., McLean, H. und Henschke, P.A. (2009) Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with 'wild' indigenous and inoculated yeasts: role of yeast volatile compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15: 238-248.
- Vasserot, Y., Caillet, S. und Maujean, A. (1997) Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of Some Physicochemical Parameters. *American Journal of Enology and Viticulture* 48: 433-437.
- Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* 3: 2-20.
- Volk, T. (2015) Regulation of β -D-Glucosidase activity of different yeast strains in correlation with chemical analysis of aglycone release in winemaking. Thesis, Hochschule Mannheim
- Vollhardt, K.P.C. und Schore, N.E. (2005) Organische Chemie. In *Organische Chemie*, pp. 524-531. Wiley-VCH GmbH&Co KGaA, Weinheim.
- Walker, G.M. (1998) *Yeast Physiology and Biotechnology*. 1st edition. John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, England.
- Watanabe, T., Tani, M., Ishibashi, Y., Endo, I., Okino, N. und Ito, M. (2015) Ergosteryl- β -glucosidase (Egh1) involved in sterylglucoside catabolism and vacuole formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* 25: 1079-1089.
- Waterhouse, A.L. (2002) Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957: 21-36.
- Welke, J.E., Zanusi, M., Lazzarotto, M., Pulgati, F.H. und Zini, C.A. (2014) Main differences between volatiles of sparkling and base wines accessed through comprehensive two dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection and chemometric tools. *Food Chemistry* 164: 427-437.

- Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B. und 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* 30: 1219-1223.
- Williams, P.J., Cynkar, W., Francis, I.L., Gray, J.D., Iland, P.G. und Coombe, B.G. (1995) Quantification of Glycosides in Grapes, Juices, and Wines through a Determination of Glycosyl Glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 121-128.
- Wilson, B., Strauss, C.R. und Williams, P.J. (1986) The Distribution of Free and Glycosidically-Bound Monoterpenes Among Skin, Juice, and Pulp Fractions of Some White Grape Varieties. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 107-111.
- Winterhalter, P. und Skouroumounis, G. (1997) Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation. In *Biotechnology of Aroma Compounds*, Vol. 55 (Berger, R., Babel, W., Blanch, H., Cooney, C., Enfors, S., Eriksson, K., Fiechter, A., Klibanov, A., Mattiasson, B., Primrose, S., Rehm, H., Rogers, P., Sahm, H., Schügerl, K., Tsao, G., Venkat, K., Villadsen, J., von Stockar, U. und Wandrey, C., eds.), pp. 73-105. Springer Berlin / Heidelberg.
- Winterhalter, P. und Gök, R. (2013) TDN and β -Damascenone: Two Important Carotenoid Metabolites in Wine. In *Carotenoid Cleavage Products*, Vol. Vol. 1134 (Winterhalter, P. und Ebeler, S. E., eds.), pp. 125-137. ACS Symposium Series, American Chemical Society.
- Winterhalter, P., Sefton, M.A. und Williams, P.J. (1990) Two-dimensional GC-DCCC analysis of the glycoconjugates of monoterpenes, norisoprenoids, and shikimate-derived metabolites from Riesling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1041-1048.
- Würdig, G. und Woller, R. (1989) *Chemie des Weines*. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Wüst, M. (2003) Wein — Qualität entscheidet sich in Nanogramm: Zur Biochemie des sortentypischen Weinaromas. *Chemie in unserer Zeit* 37: 8-17.
- Yanai, T. und Sato, M. (1999) Isolation and Properties of β -Glucosidase Produced by *Debaryomyces hansenii* and Its Application in Winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture* 50: 231-235.
- Zoecklein, B.W., Douglas, L.S. und Jasinski, Y.W. (2000) Evaluation of the Phenol-Free Glycosyl-Glucose Determination. *American Journal of Enology and Viticulture* 51: 420-423.
- Zoecklein, B.W., Marcy, J.E., Williams, J.M. und Jasinski, Y. (1997) Effect of Native Yeasts and Selected Strains of *Saccharomyces cerevisiae* on Glycosyl Glucose, Potential Volatile Terpenes, and Selected Aglycones of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) Wines. *Journal of Food Composition and Analysis* 10: 55-65.

Lebenslauf

Doreen Schober

geboren in Bautzen

- 12/2011 – jetzt Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie
Doktorandin (AG Prof. U. Fischer, Inst. Wb. & Oe., DLR RLP)
Titel der Dissertation: Freisetzung glycosidisch gebundener Aromastoffe während der Wein- und Sektbereitung: chemische, sensorische und molekularbiologische Untersuchungen
- 01/2016 – jetzt OIV-Stipendium, Hochschule Ludwigshafen am Rhein
wiss. Mitarbeiterin (Kooperation mit DLR Rheinpfalz)
Titel des Projektes: Charakterisierung des Aroma-Freisetzungspotentials von Nichtsaccharomyces-Hefen verschiedener Gattungen (bis 12/2016)
- 05/2015 – 11/2015 DLR Rheinpfalz, Institut für Weinbau und Oenologie
wiss. Mitarbeiterin (AiF 18670 TDN-Reduzierung in Riesling)
Sensorische Analysen (Schwellenwerte), Entwicklung einer FT-MIR Methode für glykosylierte Aromastoffvorläufer
- 12/2011 – 05/2015 DLR Rheinpfalz, Institut für Weinbau und Oenologie
wiss. Mitarbeiterin (AiF 16627 Aromavorläufer in Most & Wein)
Experimentelle Weinbereitung (Weißwein, Sekt), SPE-GC/MS Analytik, FT-MIR, deskriptive sensorische Analysen
- 09/2011 – 11/2011 Karlsruher Institut für Technologie, Botanischer Garten
wiss. Hilfskraft
Aufbau einer Gendatenbank von Wildpflanzen mit Nutzungspotential (Projekt "Crop Wild Relatives")
- 06/2011 – 08/2011 Paracelsus Heilpraktiker-Schule, Mannheim
Abschluss: Ganzheitliche Ernährungsberaterin
- 09/2010 – 11/2010 Technische Universität Kaiserslautern, Abt. Tierphysiologie
wiss. Hilfskraft
Morphologische Analysen hippocampaler Pyramidenzellen von ADF- und Cofilin-*knockout*-Mäusen verschiedener Alterstufen
- 04/2005 – 09/2010 Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Biologie
Abschluss: Diplom-Biologin
Studienschwerpunkte: Neurophysiologie, Pflanzenphysiologie, Phytopathologie, Lebensmittelchemie
Titel der Diplomarbeit: Lernversuche und morphologische Analysen dendritischer Dornen Profilin 1-defizienter Mäuse
- 09/1996 – 07/2004 Schiller-Gymnasium Bautzen
Abschluss: Abitur
Leistungsfächer: Englisch, Deutsch