Einfluss von Sauerstoff auf die Polymerisation von Rotweinpigmenten

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern

zur Erlangung des akademischen Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

genehmigte

Dissertation

(D386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Patrick Nickolaus

Angefertigt im Arbeitskreis von

Prof. Dr. Ulrich Fischer

Kaiserslautern 2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2013 bis Dezember 2017 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Fischer im Institut für Weinbau und Oenologie am Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz, Neustadt an der Weinstraße angefertigt.

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 27.10.2017

Datum der Wissenschaftlichen Aussprache: 05.03.2018

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Werner Thiel

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Fischer
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Elke Richling

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Literaturzitate kenntlich gemacht habe. Kooperationsprojekte sind ausdrücklich als solche gekennzeichnet und die Mitarbeiter genannt. Die Arbeit liegt weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vor.

Kaiserslautern, den

(Patrick Nickolaus)

Publikationen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Beiträgen, mit Genehmigung des Instituts für Weinbau und Oenologie am DLR Rheinpfalz, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, vorab veröffentlicht.

Wissenschaftliche Publikationen und Artikel in Fachzeitschriften:

Durner, D., Nickolaus, P., Grimbach, S., Schmalfuß, E., Winterhalter, P. und Fischer, U. (2018) " Longevity of microoxygenated Pinot noir " *Frontiers in Chemistry, Section Food Chemistry, Research Topic: "The Chemistry of Wine Aging"*, Artikel zur Veröffentlichung eingereicht.

Nickolaus, P. und Durner, D. (2016). "Wie viel Sauerstoff braucht der Wein?", Der Deutsche Weinbau, 25/26: 47-53.

Durner, D., P. Nickolaus und Trieu, H.-L. (2015). "Micro-oxygenation and its impact on polyphenols and sensory characteristics of Pinot Noir", *Wine & Viticulture Journal*, 30(3): 26.

Durner, D., Nickolaus, P., Weber, F., Trieu, H.-L. und Fischer, U. (2015). "Evolution of Anthocyanin-Derived Compounds during Micro-Oxygenation of Red Wines with Different Anthocyanin-Flavanol Ratios", *Advances in Wine Research*, 1203: 253-274.

Vorträge:

Nickolaus, P., Weber, F., Durner, D. (2013) "Investigation of Reactions between Malvidin-3O-glucoside and Proanthocyanins by LC-QToF-MS", 8th In Vino Analytica Scientia Symposium, 02. -05.07.2013, Reims (Frankreich).

Nickolaus, P. (2014) "Untersuchung der Polymerisationsreaktionen zwischen Anthocyanen und Proanthocyanidinen in Modellweinsystemen", Agilent LCMS Anwendertreffen, 29.01.2014, Mainz.

Nickolaus, P. (2014) "Einsatz von oenologischen Tanninen und Mikrooxygenierung zur Farbstabilisierung von Rotwein", Oenologischer Workshop Rotweinbereitung, 27.05.2014, Bernkastel-Kues.

Nickolaus, P. (2015) "Praxistaugliche Möglichkeiten zur Analytischen Prozesskontrolle von Farb- und Phenoleigenschaften während der Rotweinbereitung", Regionaltagung Bund Deutscher Oenologen Sachsen/Sachsen-Anhalt, 11.03.2015, Freyburg (Unstrut).

Nickolaus, P. (2015) "Farbintensivierung bei Rotwein durch Einsatz oenologischer Tannine und Mikrooxygenierung", Erbslöh Oeno Seminar, 02.07.2015, Neustadt (Weinstraße).

Durner, D. und Nickolaus, P. (2015) Validierung des Harbertson-Adams Assay zur Quantifizierung von Anthocyan-, Tannin- und Gesamtphenolgehalten in Most und Wein, 54. Jahrestagung des Forschungsrings Deutscher Weinbau, 28.04.2015, Oppenheim.

Durner, D. und Nickolaus, P. (2015) Multiple ethylidene-bridged anthocyanin-flavanol oligomers in red wine characterized by LC-MS/MS, 8th International Workshop on Anthocyanins vom 16.-18.09.2015, Montpellier (Frankreich).

Nickolaus, P., Ullrich, S., Durner, D., Fischer, U. (2016) "Anwendung des Harbertson-Adams Assay zur Bewertung des Polyphenolprofils von Rotwein", Anwendertreffen Weinanalytik, 01.03.2016, Freiburg.

Durner, D. und Nickolaus, P. (2017) "Mikrooxygenierung und Tannineinsatz", BWGV Tagung für Kellermeister, 09.03.2017, Karlsruhe.

Posterbeiträge:

Nickolaus, P., Weber, F. und Durner D. (2013) "Untersuchung von Polymerisationsreaktionen zwischen Anthocyanen und Proanthocyanidinen mittels LC-QToF-MS", 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 16.-18.09.2013, Braunschweig.

Nickolaus, P., Luna Zullo, M. J. und Durner, D. (2014) "Validierung einer Methode zur Bestimmung des Polyphenolprofils und der Farbstabilität von Rotweinen mittels UV/Vis-Spektroskopie", 43. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 22.-24.09.2014, Gießen.

Nickolaus, P. und Durner, D. (2015) "New polymeric pigments in red wine detected by LCMS", 9th In Vino Analytica Scientia Symposium, 14.-17.07.2015, Trento, (Italien).

Nickolaus, P. und Durner, D. (2016) "Identifizierung neuer polymerer Pigmente in Rotwein mittels LC-QToF-MS", 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 12.-14.09.2016, München.

Danksagung

Herzlich danken möchte ich Prof. Dr. Dominik Durner für die Bereitstellung des praxisnahen und komplexen Themas und dafür dass ich in seinem Team forschen durfte. Danke für die anregenden fachlichen Diskussionen und die stets motivierenden Ratschläge.

Prof. Dr. Ulrich Fischer gebührt mein Dank für seine Betreuung und die Übernahme des Erstgutachtens. Ganz besonders möchte ich mich außerdem dafür bedanken, dass ich meine Dissertation als Mitarbeiter in seinem Institut abschließen durfte.

Prof. Dr. Elke Richling möchte ich danken für die Erstellung des Zweitgutachtens, sowie Prof. Dr. Werner Thiel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Vielen Dank an alle Kooperationsbetriebe des Projektes für ihre Teilnahme an zahlreichen Projektbegleitenden Ausschüssen und die Anregungen aus der Praxis. Ganz besonders danke ich der Württembergischen Weingärtner Zentralgenossenschaft e.G., der Durbacher Winzergenossenschaft e.G. und der Alde Gott Winzer Schwarzwald e.G. für die zur Verfügung gestellten Weine und Moste, sowie bei der Ever S.r.l. für Reinzuchthefen, Tanninpräparate und das Verleihen des Sauerstoffdosagegerätes.

Danke an Prof. Dr. Peter Winterhalter und Dr. Eva Schmalfuß, TU Braunschweig, für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen des Forschungsprojektes. Dr. Fabian Weber, Universität Bonn, danke ich dafür, meine Begeisterung für Polyphenoladdukte und den Harbertson-Adams Assay geweckt zu haben und für viele Fachgespräche zu diesem Thema. Eva Schmalfuß und Fabian Weber möchte ich außerdem für die Synthese der ethyliden-verbrückten Di- und Trimere danken.

Mein Dank gilt außerdem Florian Schraut und Benedikt Grein für ihre Hilfe bei der Weinbereitung, Anette Schormann und Sandra Klink für die Organisation der Sensorik, sowie Daniel Zimmermann für seinen Beitrag bei Harbertson-Adams- und Farbmessungen. Danken möchte ich Dr. Pascal Wegmann-Herr für viele kreative Denkanstöße und seine stets ermutigenden Worte. Dankeschön an Bernhard Schandelmaier und Bernd Weik für ihre Fachkompetenz in allen oenologischen Fragen. Dank geht außerdem an Werner Dachtler für seine Unterstützung bei den LCMS- Messungen. Vielen weiteren Kollegen am DLR Rheinpfalz und dem Weincampus Neustadt danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsumfeld.

Danke an meine Diplomanden Sebastian Ullrich, Julia Willeke, Susanne Grimbach, Christine Schäfer und Johanna Körner, sowie an die Praktikanten Thierry Thran und Julieta Luna, die alle in direkter oder indirekter Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Großer Dank geht an mein Laborteam, Michaela Degünther, Jutta Keiser und Susann Krautwald, die es mir durch ihren Einsatz ermöglichten, viele Tage und Wochen des vergangenen Jahres an dieser Dissertation zu schreiben und die durch ihre freundliche, zuverlässige und menschliche Art das gemeinsame Arbeiten so angenehm machen.

Danke an alle Doktoranden am DLR Rheinpfalz, insbesondere Hai-Linh Trieu, Anna Walther, Doreen Schober, Petra Slabizki und Charlotte Legrum für die gemeinsame Zeit im Doktorandenzimmer, für die gegenseitige Motivation und für viele schöne Tage und Abende.

Sebastian und Marin danke ich für ihre bedingungslose Freundschaft und den gegenseitigen Ansporn, die Dissertation letztendlich zum Abschluss zu bringen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und Großeltern, die mich, solange ich denken kann, in allen meinen Entscheidungen unterstützen und auf die ich mich in jeder Situation verlassen kann.

Danken möchte ich schließlich von ganzem Herzen Chen, für die unzähligen motivierenden Worte und Ermunterungen sowie ihr unerschöpfliches Verständnis während der letzten Monate.

Inhalt

1	Ei	nleitung und Zielsetzung	1
1.1]	Einleitung	1
1.2	,	Zielsetzung	2
2	Li	teraturübersicht	3
2.1]	Polyphenole in Rotwein	
2.	1.1	Nicht-Flavonoide Polyphenole	3
2.	1.2	Flavonoide Polyphenole	4
2.2		Schwefeldioxid	12
2.3	5	Sauerstoff-induzierte Reaktionen in Rotwein	
2.	3.1	Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd	
2.	3.2	Reaktionen von Proanthocyanidinen und Flavanolen mit Sauerstoff	
2.	3.3	Reaktionen von Anthocyanen mit Sauerstoff	
2.4]	Reaktionen der Anthocyane während der Rotweinreifung	
2.	4.1	Allgemeine Reaktivität von Anthocyanen und Flavanolen	19
2.	4.2	Ethyliden-verbrückte Addukte	
2.	4.3	Höhermolekulare Verbindungen	
2.	4.4	Pyranoanthocyane	
2.	4.5	Portisine	
2.5]	Messung der Weinfarbe mittels Spektralphotometer	
2.6	I	Untersuchung von Polyphenolen mittels Massenspektrometer	
2.	6.1	Funktionsweise des ESI-Time-of-Flight-Massenspektrometers	
2.	.6.2	Charakteristische Fragmentierungsreaktionen von Rotweinpolyphenolen	
2.7	1	Analyse des Polyphenolprofils mittels Harbertson-Adams Assay	
2.	7.1	Eisen-reaktive Phenole und Tannine	
2.	7.2	Monomere Anthocyane und Polymere Pigmente	
2.	.7.3	Small Polymeric Pigments (SPP) und Large Polymeric Pigments (LPP)	
2.8	1	Verfahren der Rotweinbereitung	

2.8	8.1 M	aischegärung	
2.8	8.2 K	altmazeration	
2.8	8.3 N	aischeerhitzung (Kurzzeithocherhitzung)	47
2.9	Mik	rooxygenierung	
2.9	9.1 Н	istorische Entwicklung	
2.9	0.2 N	enge des zugesetzten Sauerstoffs und Dauer der Zugabe	49
2.9	9.3 Т	echnische Aspekte	51
2.9	9.4 T	emperatur und pH Wert	55
2.9	9.5 E	nfluss auf die Weinfarbe	55
2.9	9.6 E	nfluss auf den Geschmack	
2.9	9.7 E	nfluss auf das Aromaprofil	61
2.9	9.8 E	nsatzzeitpunkt während der Weinbereitung	64
2.9	9.9 N	ikrobiologische Risiken	
3	Mate	rial und Methoden	67
3.1	Che	mikalien und Reagenzien	67
3.2	Wei	ne und Sauerstoffzusatz	68
3.2 3.2	Wei 2.1 Ja	ne und Sauerstoffzusatz hrgang 2013	68 68
3.2 3.2 3.2	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja	ne und Sauerstoffzusatz hrgang 2013 hrgang 2014	
3.2 3.2 3.2 3.2	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja 2.3 Ja	ne und Sauerstoffzusatz hrgang 2013 hrgang 2014 hrgang 2015	
 3.2 3.2 3.2 3.2 3.3 	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja 2.3 Ja Stal	ne und Sauerstoffzusatz hrgang 2013 hrgang 2014 hrgang 2015 ilisierung und Füllung	
 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.3 3.4 	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja 2.3 Ja Stak Prol	ne und Sauerstoffzusatz hrgang 2013 hrgang 2014 hrgang 2015 ilisierung und Füllung pennahme und Probenvorbereitung	
 3.2 3.2 3.2 3.2 3.3 3.4 3.5 	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja 2.3 Ja Stat Prol	ne und Sauerstoffzusatz hrgang 2013 hrgang 2014 hrgang 2015 ilisierung und Füllung bennahme und Probenvorbereitung chführung des Harbertson-Adams Assay	
 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.3 3.4 3.5 3.5 	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja 2.3 Ja Stat Prol Dur 5.1 R	ne und Sauerstoffzusatz	
 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.3 3.4 3.5 3.5 3.5 3.5 	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja 2.3 Ja Stak Prol Dur 5.1 R 5.2 E	ne und Sauerstoffzusatz	
 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.3 3.4 3.5 3.5 3.5 3.5 	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja 2.3 Ja Stak Prol Dur 5.1 R 5.2 E 5.3 S	ne und Sauerstoffzusatz	
 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.3 3.4 3.5 3.5 3.5 3.5 3.5 3.5 	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja 2.3 Ja Stak Prol 5.1 R 5.2 E 5.3 Sa 5.4 T	ne und Sauerstoffzusatz	
 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.3 3.4 3.5 3.5 3.5 3.5 3.5 3.5 3.5 3.5 	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja 2.3 Ja Stat Prol Dur 5.1 R 5.2 E 5.3 S 5.4 T 5.5 A	ne und Sauerstoffzusatz hrgang 2013 hrgang 2014 hrgang 2015 ilisierung und Füllung pennahme und Probenvorbereitung pennahme und Probenvorbereitung chführung des Harbertson-Adams Assay eagenzien und Lösungen isen-reaktive Phenole mall Polymeric Pigments (SPP) und Large Polymeric Pigments (LPP) anningehalt nthocyangehalt	
 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.3 3.4 3.5 3.5 3.5 3.5 3.5 3.5 3.6 	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja 2.3 Ja Stat Prol Dur 5.1 R 5.2 E 5.3 S 5.4 T 5.5 A Spel	ne und Sauerstoffzusatz hrgang 2013 hrgang 2014 hrgang 2015 ilisierung und Füllung pennahme und Probenvorbereitung chführung des Harbertson-Adams Assay eagenzien und Lösungen sen-reaktive Phenole nall Polymeric Pigments (SPP) und Large Polymeric Pigments (LPP) anningehalt nthocyangehalt ctralphotometer	
 3.2 3.2 3.2 3.2 3.2 3.3 3.4 3.5 3.5 3.5 3.5 3.5 3.5 3.6 3.7 	Wei 2.1 Ja 2.2 Ja 2.3 Ja Stak Prol Dur 5.1 R 5.2 E 5.3 S 5.4 T 5.5 A Spel Chr	ne und Sauerstoffzusatz	

3.7.2	2 Bestimmung von Anthocyanen, Flavanolen und Hydroxyzimtsäuren mittels	
HPI	.C-DAD-FD	86
3.7.	3 Qualitative und quantitative Untersuchung des Polyphenolprofils mittels LC-QToF-	
MS	87	
3.8	Iodometrische Bestimmung des SO ₂ -Gehalts	90
3.9	Sensorische Bewertung	90
3.10	Software zur statistischen Datenauswertung	92
4 F	Crgebnisse und Diskussion	93
4.1	Teil I: Qualitative Analyse sauerstoff-induzierter polymerer Pigmente in Rotwein	93
4.1.	Entwicklung einer Methode zur Detektion oligomerer Polyphenoladdukte mittels ESI-	
QTo	oF-Massenspektrometer	94
4.1.	2 Übersicht der detektierten oligomeren Polyphenole	97
4.1.	3 Interpretation der Fragmentspektren	101
4.1.4	4 Zwischenfazit zum ersten Teil	111
4.2	Teil II: Quantifizierung polymerer Pigmente mittels LC-QToF-MS	112
4.2.	1 Entwicklung der Methode und Kalibrierung	112
4.2.2	2 Methodenvalidierung	115
4.2.	3 Quantifizierung der Reaktionsprodukte von Malvidin-3-glucosid	116
4.2.4	Bilanzierung der Stoffmengen	118
4.2.	5 Zwischenfazit zum zweiten Teil	123
4.3	Teil III: Sauerstoff-induzierte Stabilisierung der Rotweinfarbe	
(Mikr	ooxygenierung)	124
4.3.	l Acetaldehyd	125
4.3.2	2 Malvidin-3-glucosid, (Epi)Catechin, Caftar- und Kaffeesäure	127
4.3.	3 Ethyliden-verbrückte Anthocyan-Flavanol Addukte und Vitisin B	132
4.3.4	4 Untersuchung des Polyphenolprofils mittels Harbertson-Adams Assay	140
4.3.	5 Kontrolle der Weinfarbe mittels Spektralphotometer	146
4.3.	5 Zwischenfazit zum dritten Teil	153
4.4	Teil IV Chemische und sensorische Eigenschaften Sauerstoff-behandelter Weine	154
4.4.	I Farbstabilität bei SO ₂ -Gabe	154
4.4.2	2 Einfluss von Sauerstoff auf die Höhe des SO ₂ -Bedarfs	156

4.	.4.3	Sensorische Eigenschaften	
4.	.4.4	Lagerstabilität	
4.	.4.5	Zwischenfazit zum vierten Teil	174
4.5		Teil V: Analytische Kennwerte zur Eignung von Rotweinen für die	
Mik	roo	xygenierung	176
4.	.5.1	Chemisch-Analytische Charakterisierung vor und nach dem Sauerstoffzusatz	176
4.	.5.2	Statistische Auswertung	179
4.	.5.3	Zwischenfazit zum fünften Teil	
5	Z	usammenfassung und Ausblick	193
5.1		Zusammenfassung	193
5.2		Ausblick	
6	L	iteratur	197
7	L	ebenslauf	219

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Strukturen der Gallussäure (eine Hydroxybenzoesäure) und Kaffeesäure (eine Hydroxyzimtsäure) nach Ribéreau-Gayon et al. (2006b)4
Abbildung 2-2:	Struktur der Flavane (nach Andersen und Markham (2006))5
Abbildung 2-3:	Die vier häufigsten im Wein vorkommenden Flavan-3-ole nach (Ribéreau-Gayon et al. 2006b)
Abbildung 2-4:	Die acht möglichen Proanthocyanidin-Dimere des B-Typs für C4-C8 (links) und C4-C6 verknüpfte Produkte (rechts) nach Ribéreau-Gayon et al. (2006b).7
Abbildung 2-5:	Die verschiedenen Formen der Anthocyane in Abhängigkeit des pH-Wertes nach Ribéreau-Gayon et al. (2006b)9
Abbildung 2-6:	Die fünf Anthocyanidine in roten Trauben (Ribéreau-Gayon et al. 2006b) 10
Abbildung 2-7:	Reaktion der Anthocyane mit Hydrogensulfit (in Anlehnung an Jurd (1964)).
Abbildung 2-8:	Nicht-enzymatische Bildung von Acetaldehyd im Wein über Wasserstoffperoxid und unter Beteiligung von Eisen- und Kupfer-Ionen (in Anlehnung an Danilewicz (2003) und Danilewicz (2007)15
Abbildung 2-9:	Oxidation von Flavanolen und Proanthocyanidinen zu Pyranyl-Radikalen und Folgereaktionen nach Ribéreau-Gayon et al. (2006b)
Abbildung 2-10:	Oxidation von Flavanolen und Proanthocyanidinen zu Aryloxy-Radikalen und Folgereaktionen nach Ribéreau-Gayon et al. (2006b)
Abbildung 2-11:	Negative Partialladung an Flavanolen und Anthocyanen in Carbinol- bzw. Chinoidform (in Anlehnung an Salas et al. (2003))19
Abbildung 2-12:	Mesomeriestabilisierung der positiven Ladung bei Anthocyanen in der Flavyliumstruktur (in Anlehnung an Ribéreau-Gayon et al. (2006b))20
Abbildung 2-13:	Säurekatalysierte Bildung elektrophiler Carbokationen aus Proanthocyanidinen in Anlehnung an Haslam (1977)21
Abbildung 2-14:	Das rote F-A ⁺ Addukt in der Flavylium-Form (oben), das farblose F-AOH Addukt und das ebenfalls farblose F-A Addukt in der Flaven-Form (rechts) in Anlehnung an Remy et al. (2000) und Sánchez-Ilárduya et al. (2014)22
Abbildung 2-15:	Reaktion von Anthocyanen und Flavanolen zu farblosen Dimeren des Typs A- F (nach Remy et al. (2000))
Abbildung 2-16:	Direkt-verknüpfte Malvidin-Dimer des A-Typs (links) und des B-Typs (rechts). Nur das untere Anthocyan liegt in der Flavylium-Struktur vor (in Anlehnung an Vidal et al. (2004b))
Abbildung 2-17:	Bildung 8-8-ethyliden-verbrückter Addukte am Beispiel eines Anthocyan- Flavanol Dimers in Anlehnung an Timberlake und Bridle (1976b) und Fulcrand et al. (1996b)

Abbildung 2-18:	Verschiedene Formen des ethyliden-verbrückten Anthocyan-Anthocyan- Dimers nach Atanasova et al. (2002b)
Abbildung 2-19:	Xanthyliumionen aus Carboxymethin-verbrückten Flavanol-Flavanol Dimeren (links) und das hypothetische Produkt aus ethyliden-verbrückten Flavanol- Flavanol Dimeren (rechts) in Anlehnung an Es-Safi et al. (1999c)30
Abbildung 2-20:	Struktur der von (Cruz et al. 2012) hergestellten trimeren Verbindungen. Die Reaktion erfolgte zwischen einem direkt verknüpften Malvidin-Catechin Dimer des A-Typs mit Malvidin-3-glucosid (links) beziehungsweise Catechin (rechts). Die Bildung der Ethylidenbrücken erfolgte immer in der C8-Position der beteiligten Flavonoide
Abbildung 2-21:	Struktur zweier von Weber und Winterhalter (2014) synthetisierten und charakterisierten Verbindungen. Das Anthocyan befindet sich in der Mitte des Moleküls und besitzt Ethylidenbrücken in den Positionen C6 und C8
Abbildung 2-22:	Bildungsmechanismus für Pyranoanthocyane am Beispiel von Pyruvat in Anlehnung an Fulcrand et al. (1998)
Abbildung 2-23:	Bildungsmechanismus der Portisine (in Anlehnung an Mateus et al. (2003)).37
Abbildung 2-24:	Schematische Darstellung eines Quadrupol-Time-of-Flight-Massen- spektrometers mit ESI-Ionenquelle und Kollisionszelle für Fragmentierungsexperimente (eigene Darstellung, in Anlehnung an Agilent (2011))
Abbildung 2-25:	Fragmentierungsreaktionen der Flavanole nach Wolfender et al. (2000)42
Abbildung 2-26:	Technische Umsetzung der Mikrooxygenierung mit Sauerstoffquelle, Steuereinheit und Keramikfritte als Diffusor (eigene Darstellung)52
Abbildung 2-27:	Umsetzung der Mikrooxygenierung mit permeabler Membran als Diffusor (eigene Darstellung, in Anlehnung an Schmidtke et al. (2011))53
Abbildung 2-28:	Die wichtigsten, für Oxidationstöne im Wein verantwortlichen Verbindungen nach Ugliano (2013)
Abbildung 3-1:	Versuchsaufbau für maischevergorenen Spätburgunder
Abbildung 3-2:	Versuchsaufbau für maischeerhitzten Spätburgunder und Trollinger70
Abbildung 3-3:	Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung des maischeerhitzten 2013er Spätburgunder Rotwein, Versuchsdauer: 80 Tage. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung71
Abbildung 3-4:	Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung des maischeerhitzten 2013er Trollinger Rotwein, Versuchsdauer: 45 Tage. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung72
Abbildung 3-5:	Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung des maischevergorenen 2013er Spätburgunder Rotwein, Versuchsdauer: 60 Tage. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung72

- Abbildung 3-6: Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung der maischevergorenen 2014er Spätburgunder Versuchsdauer: 60 Tage. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung.......75

- Abbildung 4-3:Gemessenes Fragmentspektrum von Verbindung 7 (Mv-et-Mv-(E)C) aus dem
Precursor Ion m/z = 1301,3585.....103
- Abbildung 4-4: Vorgeschlagene Fragmentierungswege für das Fragmentspektrum von Verbindung 7 (Mv-et-Mv-(E)C) aus dem Precursor Ion m/z = 1301,3585..104
- Abbildung 4-5: Gemessenes Fragmentspektrum von Verbindung 8 ((E)C-et-Mv-et-(E)C) aus dem Precursor-Ion m/z = 1125,3216......106
- Abbildung 4-6: Gemessenes Fragmentspektrum von Verbindung 13 ((E)C-et-Mv-et-Mv-et-(E)C) aus dem Precursor Ion m/z = 1643,4736109
- Abbildung 4-7: Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Verbindung 13 ((E)C-et-Mv-et-Mv-et-(E)C) aus dem Precursor Ion m/z = 1643,4736110
- Abbildung 4-8: Aus dem TIC berechnetes Extracted Ion Chromatogramm für die Massenspur m/z = 1125,3217 (entsprechend der Masse des Trimers (E)C-et-Mv-et-(E)C). 113
- Abbildung 4-9: Konzentrationen von Vitisin B, Mv-et-(E)C und (E)C-et-Mv-et-(E)C im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder mit und ohne Zusatz oenologischer

Traubentannine (UVATANN ST, Ever Intec, Pramaggiore, Italien), nach zwölf-wöchiger Mikrooxygenierung......117

Abbildung 4-10:	Veränderung der Konzentrationen von Malvidin-3-glucosid und (Epi)Catechin, sowie von Vitisin B, Mv-et-C und C-et-Mv-et-C im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder während einer zwölf-wöchigen Reifephase mit und ohne Sauerstoffzugabe. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen
Abbildung 4-11:	Abnahme der Helligkeit im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder während einer zwölf-wöchigen Reifephase mit und ohne Mikrooxygenierung. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen
Abbildung 4-12:	Konzentration von Acetaldehyd während der Mikrooxygenierung eines 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen
Abbildung 4-13:	Konzentration von Malvidin-3-glucosid während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen
Abbildung 4-14:	Konzentration von Malvidin-3-glucosid während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Trollingers. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen
Abbildung 4-15:	Konzentration von (Epi)Catechin während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen
Abbildung 4-16:	Konzentration der Mv-et-(E)C Dimere während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen
Abbildung 4-17:	Konzentration der Mv-et-(E)C Dimere während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Trollingers. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen
Abbildung 4-18:	Konzentration von Mv-et-(E)C-(E)C während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Quantifizierung als Äquivalente des Dimers Mv-et-C. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen135
Abbildung 4-19:	Konzentration der (E)C-et-Mv-et-(E)C Trimere während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen
Abbildung 4-20:	Summe ethyliden-verbrückter Dimere und Trimere in µmol/L während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders
Abbildung 4-21:	Konzentration der (E)C-et-Mv-et-(E)C Trimere während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Trollingers. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen
Abbildung 4-22:	Konzentration von Vitisin B in mg/L Malvidin-3-glucosid-Äquivalenten während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen

- Abbildung 4-23: Konzentration von Vitisin B in mg/L Malvidin-3-glucosid-Äquivalenten während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Trollingers. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen......140
- Abbildung 4-25: Gehalte von SPP und LPP (oben) sowie Veränderung der Helligkeit L* (unten) während der Mikrooxygenierung des 2015er maischevergorenen Spätburgunder 1. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen...145

- Abbildung 4-29: Helligkeit L* während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders mit 10 bzw. 20 mg O₂/L/Monat und im gleichen Zeitraum ohne Sauerstoff. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.151

- Abbildung 4-38: Veränderung der Konzentration der direkt verknüpften Dimere Mv-(E)C im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder nach der Füllung (2014) und nach 12monatiger Flaschenlagerung (2015). Quantifizierung in äquivalenten des Dimers Mv-et-(E)C. Fehlerindikatoren aus zwei Messwiederholungen. 169

- Abbildung 4-42: Sensorisches Profil des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders mit 0, 10, bzw. 20 mg $O_2/L/M$ onat, nach 12-monatiger Flaschenlagerung (2015). Daten jeweils normiert auf Variante 0 mg $O_2/L/M$ onat. Signifikanzniveaus: *: 0,05 \ge p > 0,01; **: 0,01 \ge p > 0,001; ***: p \le 0,001......174

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Angaben zu Zeitpunkt, Höhe und Dauer der Mikrooxygenierung in der Literatur (Auswahl)
Tabelle 3-1:	Erntetermine und Reifeparameter der verarbeiteten Trauben und Moste
Tabelle 3-2:	Stammdaten der maischevergorenen 2014er Spätburgunder Weine73
Tabelle 3-3:	Stammdaten des maischeerhitzten 2014er Spätburgunders
Tabelle 3-4:	Stammdaten des maischevergorenen 2014er Trollingers74
Tabelle 3-5:	Stammdaten des maischeerhitzten 2014er Trollingers75
Tabelle 3-6:	Stammdaten des maischevergorenen 2015er Spätburgunders 1 (Durbach)77
Tabelle 3-7:	Stammdaten des maischevergorenen 2015er Spätburgunders 2 (Sasbachwalden)77
Tabelle 3-8:	Stammdaten des maischevergorenen 2015er Spätburgunders 3 (Möglingen)78
Tabelle 3-9:	Stammdaten des maischevergorenen 2015er Spätburgunders 4 (Neustadt a.d.W.) 78
Tabelle 3-10:	Stammdaten des maischeerhitzten 2015er Spätburgunders 1 (Sasbachwalden)79
Tabelle 3-11:	Stammdaten des maischeerhitzten 2015er Spätburgunders 2 (Möglingen)79
Tabelle 3-12:	Stammdaten des maischeerhitzten 2015er Lembergers (Möglingen)
Tabelle 3-13:	Reagenzien und Lösungen für den Harbertson-Adams Assay
Tabelle 3-14:	Optische Attribute und Geruchsattribute der Deskriptiven Sensorischen Analyse mit Rezeptur für Referenzmuster
Tabelle 3-15:	Geschmackksattribute der Deskriptiven Sensorischen Analyse mit Rezeptur für Referenzmuster
Tabelle 4-1:	Verwendete Testparameter zur Maximierung der Peakhöhe des zweifach ethyliden-verbrückten (Epi)Catechin-Malvidin-(Epi)Catechin Trimers. Die schließlich gewählten Parameter sind in Fettdruck dargestellt
Tabelle 4-2:	Auswahl der im mikrooxygenierten maischevergorenen 2013 Spätburgunder gefundenen Verbindungen mit Abfolge der Monomerbausteine und charakteristischen Molekülfragmenten
Tabelle 4-3:	Vergleich der für die Verbindungen 1 bis 13 gemessenen Massen mit den berechneten Werten
Tabelle 4-4:	Steigung und Achsenabschnitt der LCMS Kalibrierungen114
Tabelle 4-5:	Messwerte zur Bestimmung der Wiederholpräzision der Methode zur Quantifizierung von Mv-et-C
Tabelle 4-6:	Wiederfindung der Methode zur Quantifizierung von Mv-et-C, berechnet anhand dreier unterschiedlicher Weine. 116

Tabelle 4-7:	Zugegebene Mengen SO_2 und gemessene Konzentrationen von freier und gesamter SO_2 bei den Weinen des Jahrgangs 2015 zum Zeitpunkt der Füllung 157
Tabelle 4-8:	Analysedaten aller Versuchsweine vor der Mikrooxygenierung und Erfolg der Mikrooxygenierung bezüglich eines kleineren L*-Wertes oder einer höheren Bewertung der sensorischen Farbintensität nach der Mikrooxygenierung
Tabelle 9:	Korrelationsmatrix nach Pearson für die Hauptkomponentenanalyse der analytischen Daten des Versuchsjahrganges 2013
Tabelle 10:	Korrelationsmatrix nach Pearson für die Hauptkomponentenanalyse der analytischen Daten des Versuchsjahrganges 2014
Tabelle 11:	Korrelationsmatrix nach Pearson für die Hauptkomponentenanalyse der analytischen Daten des Versuchsjahrganges 2015

Abkürzung	Bedeutung
A^+	Anthocyan in der Flavyliumform
a*	Grün-Rot-Wert nach CIE
AO	Anthocyan in der Chinoidstruktur
АОН	Anthocyan in der Carbinolform
AP	Airpush
b*	Blau-Gelb-Wert nach CIE
BSA	Biologischer Säureabbau
BSA-Lösung	Lösung von Bovinem Serum Albumin
С	Catechin
Ch	Eichenholzchips
CID	Collision Induced Dissociation
CIE	"Commission International de l'Eclairage"
CIE	(Internationale Kommission für Licht und Beleuchtung)
Cy-3-gl bzw. Cy	Cyanidin-3-glucosid
Cy-3-ru	Cyanidin-3-rutinosid
DAD	Diodenarray-Detektor
(E)C	(Epi-)Catechin
EIC	Extracted ion Chromatogram
EM	Erweiterte Mazerationszeit
ESI	Electrospray Ionisation
-et-	-ethyliden-
F	Flavanol
FAV	Flavanol-Anthocyan-Verhältnis
FD	Fluoreszenzdetektor
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GP	Gesamtphenole
GRP	Grape-Reaction-Product
HAA	Harbertson-Adams Assay
(U)HPLC	(Ultra) High Pressure Liquid Chromatography

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
HS	Headspace
KM	Kaltmazeration
KO	Kontrolle
L*	Helligkeit nach CIE
LB	Lemberger
LC	Liquid Chromatography
LOD	"Limit of Detection", Nachweisgrenze
LOQ	"Limit of Quantification", Bestimmungsgrenze
LPP	Large Polymeric Pigments
mDP	"Mean Degree of Polymerisation", mittlerer Polymerisationsgrad
ME	Maischeerhitzung
MG	Maischegärung
MOX	Mikrooxygenierung
MS	Massenspektrometrie
Mv-3-gl bzw. Mv	Malvidin-3-glucosid
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
OW	"Organisation Internationale de la vigne et du Vin"
OIV	(Internationale Organisation für Rebe und Wein)
pre-MLF-MOX	Mikrooxygenierung vor dem biologischen Säureabbau
post-MLF-MOX	Mikrooxygenierung nach dem biologischen Säureabbau
QToF-MS	Quadrupol Time-of-Flight Massenspektrometrie
SB	Spätburgunder
Sens.	Sensorik
SPP	Small Polymeric Pigments
TAV	Tannin-Anthocyan-Verhältnis
TIC	"Total Ion Current" (Totalionenstrom)
TN	oenologische Tannine
TPP	"Total Polymeric Pigments" (Summe aus SPP und LPP)
TR	Trollinger
US	Überschwallen

XV

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Die Farbe eines Rotweines ist ein entscheidendes Merkmal bei der Qualitätsbeurteilung. Dunklen Rotweinen wird eine höhere Qualität zugesprochen als weniger farbintensiven Weinen, Weine mit violett-roten Farbnuancen werden höherwertig wahrgenommen als Weine mit bräunlichen Reflexen (Parpinello et al. 2009). Es liegt daher im Interesse eines Weinerzeugers, möglichst farbintensive und rotfarbige Weine zu produzieren.

Der Gehalt der Trauben an Farbstoffen und Tanninen ist witterungsbedingten Schwankungen unterworfen. Die Weinbereitung und der folgende Weinausbau bieten Einflussmöglichkeiten, um mit der gegebenen Traubenqualität ein möglichst gutes Ergebnis zu erzielen. Die Rotweinfarbe lässt sich etwa durch die gewählte Methode der Rotweinbereitung (Gonzalez-Neves et al. 2010), die Gärtemperatur (Gómez-Plaza et al. 2000), den Zusatz oenologischer Tannine oder eine Holzfasslagerung beeinflussen (Oberholster et al. 2015). Der in das Fass diffundierende Sauerstoff, bewirkt eine Reaktion der Polyphenole und führt dabei zu einer intensiveren Weinfarbe (Nevares und del Álamo 2008), einer Harmonisierung der Tannine und einer allgemeinen Reifung des Weines (Parish et al. 2000). Holzfässer können in ihrer Durchlässigkeit für Sauerstoff jedoch stark variieren, sodass der Sauerstoffeintrag nur schwer zu kontrollieren ist (Nevares und del Álamo 2008, del Alamo-Sanza und Nevares 2014). Wird der Wein stattdessen in modernen Edelstahltanks gelagert, fehlt der Einfluss des Sauerstoffs - der Reifeprozess läuft langsamer ab oder bleibt aus. Als technische Alternative wurde bereits vor 20 Jahren das Verfahren der Mikrooxygenierung entwickelt (Parish et al. 2000). Dabei werden dem Wein geringe Mengen reinen Sauerstoffs kontrolliert zugeführt, um den Reifeprozess auch im Edelstahltank herbeizuführen.

Es ergibt sich die Frage, wie hoch die Sauerstoffdosage gewählt werden soll. Denn neben den positiven Einflüssen kann Sauerstoff auch zu einer Überoxidation führen, die sich in einem Verlust der Farbintensität, Brauntönigkeit, Sherry-artigen Aromen, unangenehm trockener Adstringenz und insgesamt dünn wirkenden Weinen äußert (Parish et al. 2000, Du Toit et al. 2006b, Blaauw 2009). In Versuchen zeigte sich, dass unterschiedliche Weine verschieden große Mengen Sauerstoff benötigen. Unter bestimmten Voraussetzungen kann sogar jeglicher Sauerstoffzusatz negative Auswirkungen auf die Weinfarbe haben (Durner 2011). Unter welchen Bedingungen Sauerstoff der Weinfarbe zuträglich ist und wann er dem Wein schadet, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Ein zentrales Problem ist, dass die Reaktionen, die Anthocyane während der Weinlagerung eingehen, bisher nicht vollständig bekannt sind. Zwar sind zahlreiche Reaktionen in der Literatur beschrieben, doch nur einige führen zu farbintensiven, rotvioletten Pigmenten. Die bereits bekannten Pigmente sind jedoch, mit Ausnahme einiger Pyranoanthocyane, meist nur in jüngeren Rotweinen zu finden. Nach längerer Reifung hingegen sind sie nicht mehr nachweisbar (Escribano-Bailón et al. 2001, Alcalde-Eon et al. 2006) und reagieren daher offenbar zu Folgeprodukten. Bislang ist nicht bewiesen, dass sauerstoff-induzierte Reaktionen zu einer fortwährenden Polymerisation über die Bildung von Ethylidenbrücken führt oder ob stattdessen andere Reaktionen ablaufen. Auch eine oxidative Zerstörung der zunächst gebildeten Dimere ist unter weiterem Sauerstoffeinfluss denkbar. Überdies ist nicht klar, wie stark die bekannten Reaktionen zur Rotweinfarbe beitragen, da die Angaben über die im Wein auftretenden Konzentrationen in der Literatur sehr unterschiedlich sind.

1.2 Zielsetzung

Die Reaktionen der Anthocyane während der Weinreifung unter Sauerstoffeinfluss aufzuklären und die quantitative Relevanz der sekundär gebildeten Anthocyan-Derivate für die Weinfarbe nachzuweisen, sind die primären Ziele dieser Arbeit. Dies soll dem Zweck dienen, die Sauerstoff-induzierte Veränderung der Weinfarbe auf molekularer Ebene besser zu verstehen. Ferner sollen analytische Parameter gefunden werden, die eine Vorhersage über die Wirkung eines Sauerstoffzusatzes zum Wein erlauben, da ein solcher aus oenologischer Sicht nur dann sinnvoll ist, wenn er zur Bildung farbintensiver, roter Pigmente führt. Durch einfach zu ermittelnde chemische Parameter soll es ermöglicht werden über die Einsatzmenge und -dauer von Sauerstoff zum Wein zu entscheiden. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Lagerfähigkeit mikrooxygenierter Weine, die in diesem Zusammenhang bisher nur wenig erforscht wurde.

2 Literaturübersicht

2.1 <u>Polyphenole in Rotwein</u>

Polyphenole sind definiert als Stoffe, die einen Phenylring mit mindestens zwei Hydroxygruppen besitzen. Sie werden in verschiedene Klassen eingeteilt. Man unterscheidet zwischen flavonoiden und nicht-flavonoiden Polyphenolen, wobei vor allem die flavonoiden Polyphenole in eine Vielzahl von Sub-Klassen unterteilt werden. Die wichtigsten nicht-flavonoiden Polyphenole sind Stilbene und Phenolcarbonsäuren.

Rotwein enthält zwischen 1000 und 5000 mg/L Polyphenole, die damit einen erheblichen Anteil des zuckerfreien Extrakts ausmachen. Sie sind für Farbe und Adstringenz verantwortlich und machen so den wesentlichen Unterschied zwischen einem Rot- und einem Weißwein aus. Die Anthocyane sind dabei für die Farbe, die farblosen bis gelblichbraunen Proanthocyanidine ("Tannine") für die Adstringenz, aber auch die Bitterkeit verantwortlich. Anthocyane wie Proanthocyanidine gehören zur Gruppe der flavonoiden Polyphenole. Proanthocyanidine befinden sich hauptsächlich in den Traubenschalen und den Kernen roter und weißer Trauben. Anthocyane sind dagegen nur in den Schalen roter Trauben zu finden. (Ribéreau-Gayon et al. 2006b).

2.1.1 Nicht-Flavonoide Polyphenole

2.1.1.1 Phenolcarbonsäuren

Phenolcarbonsäuren gehören zu den einfachsten in Wein vorkommenden Polyphenolen. Sie besitzen einen Phenylring und teilen sich in Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren auf (Abbildung 2-1). Die Hydroxybenzoesäuren liegen in der Traube als Glykoside vor, die unter den sauren Bedingungen im Wein hydrolysiert werden. Die Hydroxyzimtsäuren (unter anderem Kaffee-, Coumar- und Ferulasäure) sind hingegen mit Weinsäure verestert. Sie werden dann als Caftar-, Coutar- und Fertarsäure bezeichnet (Ribéreau-Gayon et al. 2006b). Diese Ester sind bei Wein pH weitgehend stabil, durch Mikroorganismen oder die Zugabe ungeeigneter Pektinase-Präparate zum Most, werden sie jedoch ebenfalls gespalten. Diese freien Formen können dann durch *Brettanomyces bruxellensis* zu flüchtigen Phenolen umgesetzt werden. Diese verursachen rauchige, an Leder oder Pferdestall erinnernde Aromen, die als Weinfehler gelten (Chatonnet et al. 1992). Hydroxyzimtsäuren können überdies an die Glykosyl-Glucose der Anthocyane gebunden vorliegen, die dann als Anthocyan-coumaroylglucoside oder Anthocyan-caffeoylglucoside bezeichnet werden und zur Gruppe der acylierten Anthocyane gehören (Andersen und Markham 2006).

Kaffeesäure und Caftarsäure gehören zu den ortho-Dihydroxyphenolen, die die Umsetzung von Sauerstoff zu reaktivem Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Eisen und Kupfer fördern (Danilewicz 2003). Die Hydroxyzimtsäuren werden bei dieser Reaktion zum ortho-Chinonen oxidiert, die zu braunen Pigmenten polymerisieren. In Gegenwart ausreichender Mengen Glutathion kann stattdessen das sogenannten Grape-Reaction-Product (GRP) gebildet werden und die Bräunung wird unterdrückt (Rigaud et al. 1991). Weiterhin kann die Doppelbindung freier Hydroxyzimtsäuren mit Anthocyanen zu Pyranoanthocyanen oder Portisinen reagieren (Schwarz et al. 2003b, Oliveira et al. 2007).



Abbildung 2-1: Strukturen der Gallussäure (eine Hydroxybenzoesäure) und Kaffeesäure (eine Hydroxyzimtsäure) nach Ribéreau-Gayon et al. (2006b).

2.1.2 Flavonoide Polyphenole

Die Struktur der Flavonoide leitet sich von den Flavanen ab, die aus einem Benzopyran und einem Phenylring aufgebaut sind. Der aromatische Teil des Benzopyrans wird als A-Ring, die Pyranstruktur als C-Ring und der Phenylrest als B-Ring bezeichnet (Abbildung 2-2). Flavane können am A-Ring und am B-Ring zum Beispiel durch Hydroxy- oder Methoxygruppen substituiert sein. Bevorzugt sind diese Substituenten an den Positionen C5 und C7, sowie an C2⁺, C3⁺ und C4⁺ lokalisiert. An Position C2 befindet sich meist ein Stereozentrum. Eine wichtige Ausnahme davon stellen die Anthocyane dar, bei denen C2 sp²-hybridisiert und somit kein asymmetrisches Kohlenstoffatom ist. (Andersen und Markham 2006).



Abbildung 2-2: Struktur der Flavane (nach Andersen und Markham (2006))

2.1.2.1 Flavan-3-ole

Flavan-3-ole stellen außer den Anthocyanen die mengenmäßig wichtigste Gruppe der Rotweinpolyphenole dar. Zwar betragen die Konzentrationen der monomeren Flavan-3-ole im Rotwein etwa um 100 mg/L und machen damit nur 5 % des Gesamtphenolgehaltes aus (Würdig und Woller 1989). Flavan-3-ole sind allerdings auch die Grundbausteine der Proanthocyanidine, deren Konzentration im Rotwein meist mehr als 1000 mg/L beträgt. Flavan-3-ole tragen an Position C3 eine Hydroxygruppe. Damit entsteht an dieser Stelle, neben Position C2, ein zweites Stereozentrum. Beide Stereozentren ermöglichen zusammen die Ausbildung von vier Stereoisomeren. In der Traube kommen nur die Vertreter (+)-Catechin (absolute Konfiguration: 2R, 3S) und (-)-Epicatechin (absolute Konfiguration: 2R, 3R) vor (Abbildung 2-3). Sie tragen Hydroxygruppen an C5 und C7, sowie an C3' und C4'. Von diesen leiten sich außerdem Gallocatechin und Epigallocatechin ab, die in Position C5[•] eine weitere Hydroxygruppe tragen. Weiterhin kann Epicatechin an der C3-Hydroxygruppe mit Gallussäure verestert sein und wird dann als Epicatechin-3-O-gallat bezeichnet. Proanthocyanidine in Trauben sind nur aus diesen fünf verschiedenen monomeren Bausteinen aufgebaut (Ribéreau-Gayon et al. 2006b).



Abbildung 2-3: Die vier häufigsten im Wein vorkommenden Flavan-3-ole nach (Ribéreau-Gayon et al. 2006b).

2.1.2.2 Proanthocyanidine und kondensierte Tannine

Proanthocyanidine bestehen aus kondensierten Flavan-3-olen. Ihr Name leitet sich aus ihrer Eigenschaft ab, unter sauren Bedingungen und Hitze rote Anthocyanidine (Cyanidin und Delphinidin) freizusetzen, die durch Hydrolyse der Interflavanbindungen entstehen. Die kleinsten Proanthocyanidine sind somit Flavanol-Dimere, monomere Flavan-3-ole selbst gehören nicht zu den Proanthocyanidinen. Bei der Hydrolysereaktion entsteht nur aus dem unteren Teil des Proanthocyanidins ein Anthocyanidin, aus der oberen Einheit wird hingegen ein entsprechend kürzeres Proanthocyanidin oder ein Flavan-3-ol (Bate-Smith 1954).

Polyphenole, die mit Proteinen unlösliche Komplexe bilden, werden als Tannine bezeichnet (Hagermann und Butler 1978). Dies trifft auf Proanthocyanidine mit mehr als drei monomeren Einheiten zu. Kleine Proanthocyanidine lassen sich durch Proteine hingegen nicht fällen, da ihr Molekulargewicht zu gering ist (Harbertson et al. 2014). Sie gehören nach der Definition also nicht zu den Tanninen. Dennoch werden die beiden Begriffe "Proanthocyanidine" und (kondensierte) "Tannine" häufig synonym verwendet.

Innerhalb der Gruppe der Proanthocyanidine treten zwei verschiedene Interflavanbindungen auf. Bindungen des B-Typs sind einfache Bindungen zwischen Position C4 einer "oberen" Flavanoleinheit und C6 bzw. C8 einer "unteren" Flavanoleinheit. An der oberen Einheit befindet sich am C4 ein zusätzliches Stereozentrum, das R- oder S-Konfiguration annehmen kann. Dies führt dazu, dass bei einem C4-C8-verknüpften Proanthocyanidin Dimer, das nur aus den Grundbausteinen (+)-Catechin und (-)-Epicatechin aufgebaut ist, die Ausbildung von acht verschiedenen Stereoisomeren möglich ist (Abbildung 2-4). Da sie Diastereomere sind, lassen sie sich chromatographisch auch mit nicht-chiralen stationären Phasen trennen. Hinzu kommen acht weitere C4-C6-verknüpfte Dimere. In der Natur treten nicht alle Isomere mit der gleichen Häufigkeit auf, sodass in einem HPLC-Chromatogramm meist nicht alle Isomere sichtbar sind (Ribéreau-Gayon et al. 2006b).



Abbildung 2-4: Die acht möglichen Proanthocyanidin-Dimere des B-Typs für C4-C8 (links) und C4-C6 verknüpfte Produkte (rechts) nach Ribéreau-Gayon et al. (2006b).

Proanthocyanidine, die zusätzlich eine Etherbindung zwischen C2 und C7 besitzen, sind Proanthocyanidine des A-Typs. Sie werden durch eine Radikalreaktion aus dem B-Typ gebildet und kommen im Wein ebenfalls vor, häufig jedoch nur in geringen Konzentrationen (Ribéreau-Gayon et al. 2006b).

Die Abfolge der monomeren Bausteine folgt in Proanthocyanidinen keinem einheitlichen Muster, sondern ist mehr oder weniger zufällig. Allerdings befinden sich Catechin-Einheiten statistisch häufiger in terminaler Position, während Epicatechine eher intramolekular zu finden sind. In Proanthocyanidinen aus Traubenkernen ist der Anteil von Epicatechingallat deutlich höher als in Proanthocyanidinen aus Traubenschalen. Dafür beinhalten Traubenschalen-Proanthocyanidine Gallocatechin und Epigallocatechin, das in Traubenkern-Proanthocyanidinen nicht vorkommt. Da galloylierte Proanthocyanidine bitter schmecken (Brossaud et al. 2001), wird in der Weinbereitung stets versucht, den Eintrag von Traubenkerntanninen in den Wein gering zu halten. Proanthocyanidine aus Traubenschalen sind außerdem langkettiger als Proanthocyanidine aus Traubenkernen (Prieur et al. 1994, Souquet et al. 1996). Da die Adstringenz eines Proanthocyanidins mit der Molekülgröße zunimmt, tragen die Traubenschalentannine insgesamt stärker zur Adstringenz bei, als die Traubenkerntannine (Cheynier et al. 2006, Chira et al. 2009).

2.1.2.3 Anthocyane

Anthocyane unterscheiden sich von den anderen flavonoiden Polyphenolen durch ihre Farbigkeit. Diese tritt auf, da alle Kohlenstoffatome des C-Ringes am Anthocyan sp²hybridisiert sind. Bei niedrigem pH trägt das Sauerstoff-Atom eine positive Ladung und besitzt damit, wie die Kohlenstoffatome, ein einfach besetztes p_z -Orbital. Diese p_z -Orbitale bilden im C-Ring ein aromatisches System, das mit dem A- und dem B-Ring konjugiert ist. Um ein Elektron in diesem ausgedehnten aromatischen System anzuregen genügt Licht sichtbarer Wellenlängen, während bei Flavan-3-olen für die Anregung der Elektronen in den isolierten aromatischen Systemen des A- und des B-Ringes energiereicheres UV-Licht erforderlich ist.

Die Flavyliumform (A^+) der Anthocyane absorbiert grünes Licht im Wellenlängenbereich 512 – 528 nm. In der Folge erscheint diese Form dem menschlichen Auge in der Komplementärfarbe rot. Anthocyane liegen allerdings nur bei pH-Werten unter 1,5 ausschließlich in dieser Form vor (Asenstorfer et al. 2006). Steigt der pH, treten parallel drei weitere Formen auf (Abbildung 2-5): 1. Die blaue chinoide Form (AO), die durch die Abspaltung eines Protons entsteht. 2. Die farblose Halbacetalform (AOH, auch als Carbinolform bezeichnet), die sich durch die Aufnahme eines Hydroxid-Ions bildet. 3. Die offenkettige Chalcon-Form (C), die durch Tautomerie aus der Halbacetalform entsteht und farblos bis schwach gelb gefärbt ist (Brouillard und Delaporte 1977, Cheminat und Brouillard 1986, Asenstorfer et al. 2006).



Abbildung 2-5: Die verschiedenen Formen der Anthocyane in Abhängigkeit des pH-Wertes nach Ribéreau-Gayon et al. (2006b).

Während bei pH 3 noch etwa 30 % der Anthocyane in der Flavyliumform vorliegen, sind es bei pH 4 weniger als 5 %. Im zweitgenannten Fall treten stattdessen etwa 50 % der Anthocyane in der farblosen AOH-Form auf (Ribéreau-Gayon et al. 2006b). Oberhalb von pH 5 steigt die molare Absorption der Anthocyane wieder an, da dann die blaue Chinoid- und die gelbe Chalcon-Form überwiegen, der Farbton verschiebt sich dadurch in Richtung grün (Fossen et al. 1998).

Der pH-Wert hat somit großen Einfluss auf die Farbintensität und den Farbton eines Rotweines. Grundsätzlich gilt: Je höher der pH, desto farbschwächer und brauntöniger wirkt der Wein. Dies wird bei manchen Rotweinen durch die Entstehung polymerer Pigmente erheblich abgemildert, die auch bei höherem pH einen intensiv roten Farbton besitzen (Ribéreau-Gayon et al. 1983). Die Reaktionsmechanismen die zur Bildung dieser polymeren Pigmente führen, werden in Kapitel 2.4 eingehend erläutert.

Fünf verschiedene Anthocyanidine werden in den Trauben roter Rebsorten gebildet: Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Peonidin und Malvidin, die sich in ihren Substituenten am B-Ring, wie in Abbildung 2-6 gezeigt, unterscheiden. Malvidin ist in Trauben der meisten Rebsorten das Hauptanthocyanidin (Wenzel et al. 1987).



Abbildung 2-6: Die fünf Anthocyanidine in roten Trauben (Ribéreau-Gayon et al. 2006b).

Die Glykoside der Anthocyanidine sind die Anthocyane. Im Wein kommen nur die Glykoside vor, da nur sie stabil sind. Anthocyanidine werden hingegen durch Licht oder thermische Energie schnell zerstört (Furtado et al. 1993). Am häufigsten treten im Wein

die Anthocyanidin-3-glucoside auf. Daneben existieren acylierte Anthocyane, bei denen der Glucoserest mit Essig-, Coumar- oder Kaffeesäure verestert ist. Je nach Rebsorte stehen diese Anthocyane in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen zueinander, was unter bestimmten Bedingungen eine Authentizitätsprüfung roter Rebsorten über das Anthocyanprofil ermöglicht (Revilla et al. 2001). Die Rebsorte Cabernet Sauvignon weist etwa besonders hohe Konzentrationen des Malvidin-3-acetylglucosids auf. Rote Burgundersorten, wie der Spätburgunder, besitzen hingegen keine acylierten Anthocyane. Reben der Gattungen *Vitis rupestris* und *Vitis riparia*, sowie die daraus gezüchteten pilzwiderstandsfähigen Rebsorten, besitzen außerdem die charakteristischen Anthocyan-3,5-diglucoside (Wenzel et al. 1987, Würdig und Woller 1989, Eder et al. 1994).

Das Absorptionsspektrum der Anthocyane in der Flavyliumform weist zwei Maxima auf: $\lambda_{max,1} = 280$ nm und $\lambda_{max,2} = 512 - 528$. Die Varianz bei $\lambda_{max,2}$ wird durch das Substitionsmuster am B-Ring und, falls vorhanden, die Acylgruppe am Zucker-Rest hervorgerufen. Während die Anthocyane Cyanidin-3-glucosid und Peonidin-3-glucosid, mit je zwei Substituenten im B-Ring, in der Flavyliumform ein Absorptionsmaximum von $\lambda_{max,2} = 512$ nm aufweisen, liegt dieses bei Delphinidin-, Petunidin-, und Malvidin-3glucosid bei $\lambda_{max,2} = 520$ nm (Heredia et al. 1998). Acylgruppen führen allgemein zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums, d.h. in den längerwelligen Bereich des Spektrums (Giusti et al. 1999).

Das Anthocyanprofil von Trauben unterscheidet sich von dem der daraus hergestellten Weine, da die Konzentrationen der verschiedenen Anthocyane während der alkoholischen Gärung unterschiedlich stark abnehmen (Wenzel 1989, Revilla et al. 2001). Dafür werden zum Beispiel die Adsorption der Anthocyane an Hefezellwände (Morata et al. 2003) verantwortlich gemacht oder die Spaltung der glykosidischen Bindung durch β -Glucosidasen (Wenzel 1989). Auch die Oxidation der Anthocyane oder die Reaktion mit anderen Polyphenolen wird in diesem Zusammenhang diskutiert (Cheynier et al. 1994). Die meisten Autoren stellen übereinstimmend fest, dass Anthocyane mit Hydroxy-Substituenten (Delphinidin, Cyanidin) weniger stabil sind, als solche mit Methoxy-Substituenten (Peonidin, Malvidin) und dass jene mit zwei Substituenten (Cyanidin, Peonidin) wiederum weniger stabil sind als solche mit drei Substituenten (wie z.B. Malvidin). Daraus ergibt sich, dass Malvidin-3-glucosid mit zwei Methoxy- und einer Hydroxygruppe das stabilste der im Wein vorkommenden Anthocyane ist. Darüber
hinaus sind coumaroylierte und caffeoylierte Anthocyane weniger stabil als die acetylierten und die nicht acylierten Anthocyane (Zimman und Waterhouse 2004, Morata et al. 2005, Squadrito et al. 2010).

2.2 <u>Schwefeldioxid</u>

Schwefeldioxid wird bereits seit der Antike zur Konservierung von Wein eingesetzt. In ausreichender Konzentration wirkt SO₂ antimikrobiell und verhindert so das Wachstum von Bakterien und Hefen. Nur die freie und undissoziierte Form ist dabei mikrobiologisch wirksam. Im Wein liegt der größte Teil des SO₂ jedoch als Hydrogensulfit-Anion HSO₃⁻ vor, der deprotonierten Form der schwefeligen Säure H₂SO₃. Die Lage dieses Gleichgewichtes ist pH-abhängig. Bei pH 3,0 liegen 6,1 % der freien SO₂ undissoziiert vor, bei pH 4,0 sind es nur 0,6 % (Ribéreau-Gayon et al. 2006a). Bei der Beurteilung der mikrobiologischen Stabilität ist daher stets auch der pH zu berücksichtigen. In der Literatur werden 0,8 mg/L molekularer SO₂ als wirksamer Schutz angesehen, für die bei pH 3,2 eine Konzentration von 12,5 mg/L freier SO₂ erforderlich sind, bei pH 3,7 hingegen 68 mg/L (Hamatschek 2015).

SO₂ schützt den Wein außerdem vor Oxidation, indem es mit Wasserstoffperoxid reagiert und dieses unschädlich macht. Schwefeldioxid bzw. Sulfit wird bei dieser Reaktion zu Sulfat oxidiert. Darüber hinaus reduziert SO₂ Chinone wieder zu Polyphenolen und verhindert auf diese Weise die Bildung brauner Polymere (Danilewicz und Wallbridge 2010). Schwefeldioxid hemmt außerdem traubeneigene Polyphenoloxidasen und kann durch Zugabe zu Most oder Maische vor Bräunung schützen. Gegen die von *Botrytis* freigesetzten Laccasen ist SO₂ hingegen kaum wirksam (Hamatschek 2015).

Weiterhin bindet SO_2 an Carbonylverbindungen. Dies ist für den Wein sehr wichtig, denn insbesondere das aus der Gärung und der Oxidation von Ethanol stammende Acetaldehyd riecht nach überreifen Äpfeln, in höheren Konzentrationen auch nach faulem Obst. Es verleiht Jungweinen einen typischen, leicht oxidativen Charakter. SO_2 bildet mit Acetaldehyd α -Hydroxysulfonsäure, die nicht flüchtig ist und damit nicht mehr wahrgenommen werden kann. Weitere wichtige Reaktionspartner sind Pyruvat, α -Ketoglutarat, Glyoxal, sowie verschiedene Monosaccharide und deren Derivate. Das als Sulfonsäuren vorliegende SO₂ wird als gebundenes SO₂ bezeichnet, der ungebunden vorliegende Teil als freies SO₂ (Ribéreau-Gayon et al. 2006a).

 SO_2 bindet auch an Anthocyane. Die Reaktion des nucleophilen Hydrogensulfits erfolgt dabei, wie in Abbildung 2-7 gezeigt, an den elektrophilen Positionen C2 und C4 des Anthocyans. In Folge dieser Reaktion kann sich das aromatische System im C-Ring nicht mehr ausbilden, das Anthocyan wird farblos. Bei jungen Rotweinen kann die Schwefelung daher zu Farbverlusten führen (Jurd 1964). Bei polymeren Pigmenten hingegen findet diese Bleichungsreaktion, vermutlich aus sterischen Gründen, nicht statt, sie bleiben auch bei Anwesenheit von SO_2 weitgehend farbig (Somers 1971).



Abbildung 2-7: Reaktion der Anthocyane mit Hydrogensulfit (in Anlehnung an Jurd (1964)).

2.3 Sauerstoff-induzierte Reaktionen in Rotwein

Da die Weinbereitung nicht unter Luftabschluss stattfindet, gelangt während des gesamten Prozesses Sauerstoff in die Maische beziehungsweise den Wein. Dieser Sauerstoffeintrag führt zu einer Vielzahl von Reaktionen. Einige betreffen das Aromaprofil, indem etwa sulfidische Aromen aus dem Hefestoffwechsel oxidiert werden, andere verändern die Polyphenolzusammensetzung und beeinflussen dabei die Adstringenz oder die Farbeigenschaften des Weines. Der folgende Abschnitt behandelt die für das Polyphenolprofil wichtigsten Reaktionen.

2.3.1 Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd

Acetaldehyd spielt bei der Polyphenolpolymerisation eine Schlüsselrolle, da es molekulare Brücken zwischen Anthocyanen, Flavanolen und Proanthocyanidinen ausbildet. Acetaldehyd kann aus dem Stoffwechsel von Hefen und Milchsäurebakterien freigesetzt werden und auf diese Weise bereits während der Gärung eine Stabilisierung der Weinfarbe herbeiführen, indem es die Bildung Polymerer Pigmente aus Anthocyanen und Flavanolen fördert. Weiterhin kann es durch chemische Oxidation von Ethanol entstehen. Auf dieser mehrstufigen Reaktion beruht ein großer Teil der farbstabilisierenden Wirkung von Sauerstoff während der Rotweinreifung. Löst sich molekularer Sauerstoff im Wein, liegt er zunächst im wenig reaktiven Triplett-Zustand vor. Eine direkte Reaktion mit Polyphenolen oder Ethanol ist nicht möglich. Sind jedoch Fe²⁺-Ionen und ortho-Dihydroxyphenole (z.B. Catechin, Kaffee- oder Caftarsäure) kann Ethanol über die Reaktion anwesend. mit intermediär gebildetem Wasserstoffperoxid oxidiert werden. Dieser Prozess ist in Abbildung 2-8 dargestellt. Im ersten Reaktionsschritt wird ein Fe²⁺-Ion zum Fe³⁺ oxidiert, indem ein Elektron auf das Sauerstoffmolekül übertragen wird. Aus diesem Triplett-Sauerstoff entsteht ein Superoxid-Anion und nach Aufnahme eines zweiten Elektrons, beispielsweise von einem Polyphenol, ein Peroxid-Dianion. Zusammen mit zwei Protonen bildet sich daraus Wasserstoffperoxid (Danilewicz 2003). Danilewicz (2007) zeigte, dass die Reaktion sowohl durch Eisen- als auch durch Kupferionen allein katalysiert wird. Liegen jedoch beide zugleich vor, kommt es zu synergistischen Effekten, was auf einen Redox-Zyklus zwischen den beiden Übergangsmetallen zurückgeführt wird. Fe³⁺ wird durch Aufnahme eines Elektrons von einem Polyphenol zu Fe²⁺ regeneriert. Somit ergibt sich ein Kreislauf, in dem die Fe²⁺-Ionen nicht verbraucht werden, sondern katalytisch wirken. Die Reaktion wird dadurch gefördert, dass Fe³⁺-Ionen mit ortho-Dihydroxyphenolen koordinative Bindungen eingehen. Aus den diesen entstehen Semichinone, die zu Chinonen und ortho-Dihydroxyphenolen disproportionieren (Danilewicz und Wallbridge 2010).

Während der anschließend ablaufenden Fenton-Reaktion oxidiert Wasserstoffperoxid ein weiteres Fe²⁺-Ion zu Fe³⁺. Aus Wasserstoffperoxid entstehen dabei, unter Aufnahme eines Protons, ein Wassermolekül und ein Hydroxylradikal, das Ethanol zum Hydroxyethylradikal oxidiert. Das ungepaarte Elektron dieses Radikals kann Fe³⁺ wieder zum Fe²⁺ reduzieren. Alternativ kann durch dieses Elektron aber auch ein weiteres

Molekül Triplett-Sauerstoff zum Superoxid Anion reduziert werden. In beiden Fällen entsteht aus dem Hydroxyethylradikal schließlich Acetaldehyd (Fenton 1894, Danilewicz 2003). Durch die hohe Konzentration von Ethanol im Wein ist dieses der bevorzugte Reaktionspartner für Hydroxylradikale (Fulcrand et al. 1997). Aber auch andere Stoffe im Wein werden durch Hydroxylradikale oxidiert, wie etwa die Weinsäure. Das Produkt dieser Reaktion ist die Glyoxalsäure, die mit Flavanolen zu gelb-braunen Xanthyliumionen reagiert (Es-Safi et al. 1999c).



Abbildung 2-8: Nicht-enzymatische Bildung von Acetaldehyd im Wein über Wasserstoffperoxid und unter Beteiligung von Eisen- und Kupfer-Ionen (in Anlehnung an Danilewicz (2003) und Danilewicz (2007).

Da die Eisen- oder Kupfer-Ionen nur katalytisch wirken, reichen Spuren aus, um den Oxidationsprozess in Gang zu setzen. Durch die strikte Vermeidung von Metalleinträgen einen gegen Oxidation resistenten Wein zu erzeugen, ist daher unmöglich. Allerdings beschleunigen höhere Eisen- und Kupfergehalte die Oxidationsprozesse im Wein durchaus und machen sie schlechter kontrollierbar (Rigaud et al. 1991, Oszmianski et al. 1996), sodass Metalleinträge grundsätzlich soweit wie möglich vermieden werden sollten.

Durch Licht wird, unter Anwesenheit bestimmter Farbstoffmoleküle, Triplett-Sauerstoff außerdem direkt in Singulett-Sauerstoff umgewandelt. Dieser kann Ethanol ebenfalls zu Acetaldehyd zu oxidieren. Ob derartige Reaktionen im Wein ablaufen, ist nicht eindeutig klar. Da Wein in der Regel dunkel gelagert wird erscheint dies eher unwahrscheinlich (Singleton 1987, Danilewicz 2003).

2.3.2 Reaktionen von Proanthocyanidinen und Flavanolen mit Sauerstoff

Kommen Proanthocyanidine mit Sauerstoff in Kontakt, kann eine Reihe von, meist radikalischen, Reaktionen ablaufen, die zu niedermolekularen Abbauprodukten, aber auch zu polymeren Verbindungen führen. Zwei Reaktionswege sind dabei möglich. Ein möglicher Ausgangspunkt ist die radikalische Abstraktion des Wasserstoffatoms in Position C2, sodass ein Pyranyl-Radikal entsteht (Abbildung 2-9).



Abbildung 2-9: Oxidation von Flavanolen und Proanthocyanidinen zu Pyranyl-Radikalen und Folgereaktionen nach Ribéreau-Gayon et al. (2006b).

Das Pyranyl-Radikal kann entweder mit einem weiteren Molekül Sauerstoff zum Hydroperoxid reagieren oder, unter Abgabe eines weiteren Wasserstoffatoms, zu einem Diradikal. Dieses Diradikal kann entweder zu Polymeren reagieren oder ein Methylenchinon bilden. Sowohl Methylenchinon, als auch das Hydroperoxid können in Folgereaktionen ebenfalls Polymere bilden.

Der zweite Reaktionsweg verläuft über die Oxidation der Hydroxygruppe in Position C3⁴ des B-Ringes, sodass ein Mesomerie-stabilisiertes Aryloxy-Radikal entsteht (Abbildung 2-10).



Abbildung 2-10: Oxidation von Flavanolen und Proanthocyanidinen zu Aryloxy-Radikalen und Folgereaktionen nach Ribéreau-Gayon et al. (2006b).

Die Reaktion kann bei allen ortho-Dihydroxyphenolen ablaufen. Aufgrund der Mesomerie können sowohl das Sauerstoff-Atom als auch die Kohlenstoff-Atome C1' und C3' als Radikale reagieren. Aus den dabei gebildeten Dimeren entstehen ebenfalls braun gefärbte Polymere. Aus dem Aryloxy-Radikal können ferner, unter Abstraktion eines weiteren Wasserstoff-Atoms, ortho-Dichinone entstehen. Die radikalische Oxidation von ortho-Dihydroxyphenolen über den Aryloxy-Reaktionsweg ist ein wichtiger Schritt bei der Bildung von Acetaldehyd aus Ethanol (siehe Abschnitt 2.3.1).

2.3.3 Reaktionen von Anthocyanen mit Sauerstoff

Anthocyane sind unter Wein-Bedingungen nicht absolut stabil. Zwar sich wirkt der niedrige pH des Weines stabilisierend aus, jedoch können Oxidationsreaktionen zu einem Abbau führen. In Traubenmost und Maische wird die Oxidation durch traubeneigene Polyphenoloxidasen katalysiert. Anthocyane mit ortho-Dihydroxygruppen wie Cyanidin sind hiervon stärker betroffen als Anthocyane mit Methoxygruppen wie Malvidin. Die Reaktionsprodukte sind bräunlich oder farblos, sodass Sauerstoffeinträge in rote Moste immer zu einer Abnahme der Farbintensität führen (Cheynier et al. 1994, Sarni et al. 1995). Da die traubeneigenen Polyphenoloxidasen durch Ethanol (Valero et al. 1990) und SO₂ gehemmt werden und unter Wein pH zudem nicht stabil sind (Wissemann und Lee 1980), tragen sie nach der alkoholischen Gärung nicht mehr zur Oxidation bei. Die durch Botrytis freigesetzte Laccase ist hingegen auch im Wein aktiv. Ethanol und niedrige pH Werte hemmen das Enzym kaum. Weine aus Botrytis-belastetem Lesegut dürfen daher keinesfalls mit Sauerstoff in Kontakt kommen, da dies zu einer starken Bräunung und Verringerung der Farbintensität führt. Ausnahme hiervon sind maischeerhitzte Weine, da Laccase durch hohe Temperaturen zerstört wird (Ribéreau-Gayon et al. 2006a).

Überdies gibt es auch nicht-enzymatisch katalysierte Oxidationen. Anthocyane mit ortho-Dihydroxygruppen wie Cyanidin oder Delphinidin können mit "Reactive Oxygen Species" (ROS) reagieren, die zuvor selbst oxidiert wurden (Waterhouse und Laurie 2006). Anhand von Modell-Systemen wurde gezeigt, dass Anthocyane unter dem Einfluss von Licht oder Wärme zerstört werden, ebenso durch Wasserstoffperoxid. Ein niedriger pH erhöht dabei ebenfalls die Stabilität der Anthocyane (Hrazdina und Franzese 1974, Furtado et al. 1993). In Modelllösungen mit Malvidin-3-glucosid wurde unter Anwesenheit von Sauerstoff die Entstehung von Syringasäure, Coumarin und 2,4,6-Trihydroxyphenylessigsäure beobachtet, wofür oxidative Bildungsmechanismen verantwortlich gemacht werden (Dueñas et al. 2006a).

2.4 Reaktionen der Anthocyane während der Rotweinreifung

2.4.1 Allgemeine Reaktivität von Anthocyanen und Flavanolen

Polyphenole sind aromatische Verbindungen mit Hydroxygruppen und anderen Substituenten. Sie weisen daher ein für Aromaten typisches Reaktionsverhalten auf. Flavanole besitzen am A-Ring zwei meta-ständige Hydroxy-Gruppen. Diese üben einen +M-Effekt auf den aromatischen Ring aus, sodass sich in den Positionen C6 und C8 eine positive Partialladung befindet. Für Anthocyane in der Carbinol- bzw. Chinoidstruktur gilt dies ebenfalls (Abbildung 2-11). Diese Moleküle können somit als Nukleophile reagieren.



Abbildung 2-11: Negative Partialladung an Flavanolen und Anthocyanen in Carbinolbzw. Chinoidform (in Anlehnung an Salas et al. (2003)).

Anthocyane, die in der Flavyliumstruktur vorliegen, besitzen eine positive Ladung am C-Ring, die formal dem Sauerstoff zugeordnet wird. Durch Mesomerie kann diese Ladung auf die Positionen C2 oder C4 übertragen werden, sodass in diesen Positionen Partialladungen entstehen (Abbildung 2-12). Anthocyane in der Flavyliumstruktur reagieren aus sterischen Gründen vor allem an Position C4 als Elektrophile, wobei ihre Reaktivität im Vergleich zu nicht-aromatischen elektrophilen Kationen durch die Mesomeriestabilisierung etwas geringer ist (Ribéreau-Gayon et al. 2006b).



Abbildung 2-12: Mesomeriestabilisierung der positiven Ladung bei Anthocyanen in der Flavyliumstruktur (in Anlehnung an Ribéreau-Gayon et al. (2006b)).

Die Flavanole Catechin und Epicatechin sind normalerweise nicht elektrophil. Bei der säurekatalysierten Spaltung von Proanthocyanidinen entstehen jedoch intermediär Carbokationen, die in Position C4 des C-Ringes wie Anthocyane eine positive Ladung tragen. Da hier keine Mesomeriestabilisierung stattfinden kann, sind diese Elektrophile sehr instabil und reagieren unverzüglich mit Nucleophilen wie Anthocyanen, anderen Flavanolen oder Thiolen. Unter Anwesenheit von Sauerstoff ist außerdem die Bildung der roten Anthocyanidine Cyanidin und Delphinidin möglich. Da sie, anders als die Anthocyane, in Position C3 keinen stabilisierenden Zuckerrest besitzen, zerfallen sie sehr schnell (Haslam 1977, Iacobucci und Sweeny 1983).



Abbildung 2-13: Säurekatalysierte Bildung elektrophiler Carbokationen aus Proanthocyanidinen in Anlehnung an Haslam (1977).

2.4.1.1 Flavanol-Anthocyan Addukte

Bei der Bildung von Flavanol-Anthocyan Addukten reagiert ein Flavanol-Kation, das zuvor durch säurekatalytische Spaltung eines Proanthocyanidins entstanden ist, an Position C4 mit einem Anthocyan, das als Carbinolbase vorliegen muss. Der elektrophile Angriff des Flavanol-Kations kann an den nukleophilen Positionen C6 oder C8 des Anthocyans stattfinden. Bisher wurde jedoch nur die Existenz der C4-C8 Interflavan-Bindungen nachgewiesen (Salas et al. 2004b). Durch Abspaltung des Protons an C8 bildet sich das aromatische System im A-Ring zurück. Das resultierende Flavanol-Anthocyan Dimer ist zunächst farblos, da das Anthocyan noch als Carbinolbase vorliegt.

Durch die Eliminierung eines Wassermoleküls im C-Ring kann sich jedoch, wie bei einem Anthocyan, die rote Flavyliumstruktur ausbilden (Abbildung 2-14).



Abbildung 2-14: Das rote $F-A^+$ Addukt in der Flavylium-Form (oben), das farblose F-AOH Addukt und das ebenfalls farblose F-A Addukt in der Flaven-Form (rechts) in Anlehnung an Remy et al. (2000) und Sánchez-Ilárduya et al. (2014).

Die Carbinol- (F-AOH Addukt) und die Flavyliumform (F-A⁺ Addukt) stehen wie bei monomeren Anthocyanen in einem chemischen Gleichgewicht (Remy et al. 2000, Salas et al. 2004a). Abbildung 2-14 zeigt mit der Flaven-Struktur (F-A Addukt) eine weitere Form, die ebenfalls farblos ist (Sánchez-Ilárduya et al. 2014). Anstelle monomerer Flavanole können auch größere Proanthocyanidin-Ketten mit Anthocyanen reagieren, sodass entsprechende Tannin-Anthocyan Addukte (T-A-Addukte) entstehen (Hayasaka und Kennedy 2003).

2.4.1.2 Anthocyan-Flavanol-Addukte

Liegt das Anthocyan in der Flavyliumstruktur vor, kann es als Elektrophil an Position C4 mit einem Flavanol an den Positionen C6 bzw. C8 als Nucleophil reagieren. Wie in Abbildung 2-15 gezeigt, entsteht dabei zunächst ein direkt verknüpftes A-F Addukt des Flaven-Typs (Santos-Buelga et al. 1995) oder es bildet sich eine Etherbrücke zwischen dem C2 des Anthocyans und der Hydroxygruppe am C7 des Flavanols, ähnlich wie bei Proanthocyanidinen des A-Typs (Bishop und Nagel 1984). Das Produkt der zweiten Reaktion wird als A-O-F Addukt bezeichnet. Sowohl beim A-F als auch beim A-O-F Addukt entfällt die positive Ladung am C-Ring des Anthocyans und das resultierende Pigment ist farblos. Gelegentlich wird auch hier zwischen A-O-F (Anthocyan-Etherbrücke-Flavanol) und A-O-T (Anthocyan-Etherbrücke-Tannin) Addukten unterschieden (Fulcrand et al. 2004). A-O-F-Addukte wurden in Modell-Lösung mittels NMR und in Polyphenolextrakten aus Wein mittels Thiolyse nachgewiesen (Remy et al. 2000, Remy-Tanneau et al. 2003).

Aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Hydroxygruppen am C5 des Anthocyans und am C7 des Flavanols, können aus dem A-F oder dem A-O-F Addukt in einer Folgereaktion gelb-orange gefärbte Xanthyliumionen gebildet werden, sodass sich entsprechende Modelllösungen innerhalb kurzer Zeit gelb-braun färben (Somers 1971, Liao et al. 1992). Bei pH 3,2 können die farblosen A-T-Addukte als Zwischenprodukte detektiert werden, während die Reaktion bei pH 4,0 so schnell abläuft, dass chromatographisch nur die Xanthyliumionen nachweisbar sind. (Santos-Buelga et al. 1995)



Abbildung 2-15: Reaktion von Anthocyanen und Flavanolen zu farblosen Dimeren des Typs A-F (nach Remy et al. (2000))

Aus dem A-F Addukt in der Flaven-Struktur kann sich unter geeigneten Bedingungen auch ein A⁺-F Addukt in der Flavyliumstruktur bilden. Dafür müssen ein Proton und zwei Elektronen am C4 des Anthocyans (durch Oxidation) entfernt werden, sodass ein A⁺-F Addukt entsteht. Neben der Anwesenheit des für die Oxidation erforderlichen Sauerstoffs ist der pH Wert hier ein Einflussfaktor. Bei pH 2 entsteht bevorzugt die farblose A-O-F Form, während bei pH Werten über 3.2 eher A⁺-F Addukte gefunden werden (Dueñas et al. 2006a). Die A⁺-F Addukte sind allerdings nicht stabil und reagieren zu gelben Xanthyliumionen (Dueñas et al. 2006a). A⁺-F Addukte können somit zwar zur Weinfarbe beitragen, aufgrund ihrer Tendenz zur Bildung gelber Xanthyliumionen ist ein solcher Effekt jedoch nicht erwünscht. Werden anstelle von Flavanolen Proanthocyanidine eingesetzt, entstehen A⁺-T-Addukte, die gegenüber der Bildung von Xanthyliumionen stabiler sind. Je größer das dabei eingesetzte Proanthocyanidin, desto geringer ist die Bräunung einer entsprechenden Modelllösung (Malien-Aubert et al. 2002). Es besteht außerdem ein Gleichgewicht zwischen F-A⁺ und A⁺-F Addukten, das ebenfalls pH-abhängig ist. Dies zeigt ein Modellversuch, bei dem die F-A⁺ Addukte nur bei pH 2 in größerem Umfang gefunden wurden, da offenbar nur bei diesem pH die Spaltung der Proanthocyanidine zu Flavanol-Kationen in ausreichendem Maß abläuft. Bei pH 3,8 hingegen entstanden in der Modelllösung bevorzugt die A⁺-F bzw. A-O-F Addukte, für die eine Spaltung von Proanthocyanidinen nicht erforderlich ist (Salas et al. 2003). Im Wein werden aus diesem Grund eher die letztgenannten Formen entstehen.

Mittels MS/MS Untersuchungen wurde belegt, dass Flavanole in Wein, anders als Anthocyane, direkte Interflavan-Bindungen an C8 und am C6 ausbilden können (Salas et al. 2003). Damit besitzen diese, zusammen mit Position C4, drei Bindungsstellen, sodass im Zuge der Polyphenolpolymerisation nicht nur die Bildung linearer Ketten, sondern auch eine Verzweigung von Polymeren möglich ist.

2.4.1.3 Anthocyan-Anthocyan-Addukte

Bei Wein pH liegen Anthocyane zugleich in der Flavyliumform, als Carbinolbase und als chinoide Base vor. Da die Flavyliumform als Elektrophil, die Carbinolbase und die chinoide Base aber als Nucleophil reagieren können, ist auch die Entstehung reiner Anthocyan-Polymere möglich. Dabei können Interflavan-Bindungen des A- und des B-Typs entstehen, wie in Abbildung 2-16 gezeigt. Die in Extrakten aus Trauben gefundenen

Anthocyan-Dimere waren zumeist aus verschiedenen, teils acylierten Anthocyanen aufgebaut, die in ihrer mittleren Zusammensetzung das Anthocyanprofil der Traube widerspiegelten (Pati et al. 2009). Di- und Trimere der Anthocyane sind, genau wie die Anthocyane selbst, rot gefärbt. Innerhalb einer Polymerkette liegt allerdings nur eines der Anthocyanmoleküle in der Flavyliumstruktur vor, da sich zwei positive Ladungen in geringer räumlicher Distanz stark abstoßen würden. Es scheint daher wahrscheinlich, dass ein Anthocyan-Dimer weniger Licht absorbiert, als zwei einzelne Anthocyane. Gegenüber SO₂ weisen direkt verknüpfte Anthocyan Dimere jedoch eine niedrigere Reaktivität auf als monomere Anthocyane, sodass es bei den Dimeren zu einem geringeren Anteil gebleichter Moleküle kommt. Somit kann die Bildung von Anthocyan-Anthocyan-Dimeren zur Stabilisierung der Farbe im Rotwein beitragen (Vidal et al. 2004b, Pati et al. 2009). Es konnte überdies gezeigt werden, dass direkt verknüpfte Anthocyan-Dimere Bindungen zu Flavanolen eingehen können, sodass gemischte F-A-A⁺ Addukte entstehen (Alcalde-Eon et al. 2007). Direkt verknüpfte Anthocyan Addukte wurden in Trauben (Vidal et al. 2004b), Wein (Alcalde-Eon et al. 2007) und Portwein nachgewiesen (Oliveira et al. 2013).



Abbildung 2-16: Direkt-verknüpfte Malvidin-Dimer des A-Typs (links) und des B-Typs (rechts). Nur das untere Anthocyan liegt in der Flavylium-Struktur vor (in Anlehnung an Vidal et al. (2004b)).

2.4.2 Ethyliden-verbrückte Addukte

Carbonylverbindungen liegen bei saurem pH teilweise protoniert vor und reagieren in dieser Form leicht mit Nukleophilen. Acetaldehyd ist diesbezüglich bei Wein pH äußerst reaktiv. Flavanole, Proanthocyanidine und Anthocyane in der Carbinolform sind geeignete Reaktionspartner. Bevorzugt findet eine Reaktion am C8 des A-Ringes statt. Wie in Abbildung 2-17 dargestellt, reagiert das protonierte Acetaldehyd in einer elektrophilen aromatischen Substitution mit einem Flavanol, einem Proanthocyanidin oder einem Anthocyan. Das entstehende 8-Hydroxyethylderivat ist nicht stabil, sondern wird erneut protoniert und reagiert unter Wasserabspaltung nochmals zu einem Carbokation. Mit einem weiteren Flavonoid findet anschließend eine zweite elektrophile aromatische Substitution statt und es entsteht ein 8-8-ethyliden-verbrücktes Dimeres Addukt (Timberlake und Bridle 1976b, Fulcrand et al. 1996b).





Abbildung 2-17: Bildung 8-8-ethyliden-verbrückter Addukte am Beispiel eines Anthocyan-Flavanol Dimers in Anlehnung an Timberlake und Bridle (1976b) und Fulcrand et al. (1996b).

2.4.2.1 Ethyliden-verbrückte Anthocyan-Flavanol-Dimere

Eine wässrig-ethanolische Lösung aus Malvidin-3-glucosid und Catechin verliert während einer mehrwöchigen Lagerung unter sauren Bedingungen an Farbintensität und der Farbton der Lösung wird bräunlich. Fügt man derselben Lösung Acetaldehyd zu, wird der Farbton hingegen dunkler und der Farbton verschiebt sich in Richtung violett (Timberlake und Bridle 1976b). Für diese Beobachtung ist die Verknüpfung von Anthocyanen und Flavanolen durch das Acetaldehyd verantwortlich. Das Produkte dieser Reaktion sind die ethyliden-verbrückten Anthocyan-Flavanol Dimere (Timberlake und Bridle 1976b). Lee et al. (2004) erbrachten mittels NMR den Nachweis, dass die Verknüpfung normalerweise nur zwischen Position C8 des Flavanols und C8 des Anthocyans erfolgt. Da die Ethylidenbrücke jedoch ein Stereozentrum aufweist, entstehen aus der Reaktion von Catechin und Malvidin jeweils zwei Diastereomere, ebenso wie aus der Reaktion von Epicatechin und Malvidin.

Ethyliden-verbrückte Malvidin-Catechin Dimere weisen ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{max} = 540$ nm auf (gemessen bei pH 2,2), das gegenüber dem von Malvidin-3-glucosid ($\lambda_{max} = 520$ nm) bathochrom verschoben ist. Der molare Extinktionskoeffizient von Malvidin-3-glucosid ist bei pH Werten unter 3 größer als der der ethyliden-verbrückten Dimere, oberhalb von pH 3 absorbieren hingegen die Dimere eine größere Lichtmenge (Asenstorfer et al. 2006, Dueñas et al. 2006b). Ethyliden-verbrückte Malvidin-Catechin Dimere weisen auch eine veränderte Reaktivität gegenüber SO₂ auf. Während sich die molare Absorption von Malvidin-3-glucosid durch Zugabe von 0,123 g/L SO₂ um 40 % verringert, liegt dieser Wert beim ethyliden-verbrückten Malvidin-Catechin Dimer bei weniger als 10 %. Bei 0,123 g/L SO₂ ist Malvidin-3-glucosid fast vollständig gebleicht, während sich die Absorption beim Dimer nur 20 % verringert (Dueñas et al. 2006b).

Anthocyane sind offenbar chemisch stabiler als die Dimere, da ihre Konzentration in Modelllösungen weniger schnell abnimmt. Dafür verantwortlich ist die Spaltung der Dimere in Malvidin und Ethylcatechin-Kationen, sowie weiterer, nicht näher charakterisierter, Folgereaktionen (Escribano-Bailón et al. 2001).

2.4.2.2 Ethyliden-verbrückte Anthocyan-Anthocyan-Dimere

Ethylidenbrücken können sich auch zwischen zwei Anthocyanen ausbilden. Meist liegt in einem solchen Anthocyan-Anthocyan Dimer eines der Anthocyane in der Flavyliumform vor, während das andere entweder die Chinoid- oder die Carbinolstruktur einnimmt (siehe Abbildung 2-18). Beide Formen lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülmassen im Massenspektrometer unterscheiden. In der Literatur ist auch eine Form beschrieben, bei der beide Anthocyane in der Flavyliumstruktur vorliegen. Aufgrund der doppelten Ladung beträgt das m/z dann nur die Hälfte der Molekülmasse (Atanasova et al. 2002b). Dies sagt jedoch nichts über die tatsächlich im Wein auftretende Form aus, da die für die Analytik verwendeten Lösungsmittel wesentlich niedrigere pH Werte haben, um eine gute Ionisierung zu gewährleisten.



Abbildung 2-18: Verschiedene Formen des ethyliden-verbrückten Anthocyan-Anthocyan-Dimers nach Atanasova et al. (2002b)

2.4.2.3 Ethyliden-verbrückte Flavanole

Da Flavanole immer als Nucleophile vorliegen, können sich sehr leicht auch ethylidenverbrückte Dimere aus zwei Flavanol-Molekülen bilden (Fulcrand et al. 1996b, Saucier et al. 1997c). Während bei ethyliden-verbrückten Anthocyan-Flavanol Dimeren nur C8-C8 Verknüpfungen beobachtet werden, sind bei Flavanol-Flavanol-Dimeren zusätzlich C8-C6, C6-C8 und C6-C6-Bindungen möglich (Saucier et al. 1997b, Es-Safi et al.

1999a). Die Bildung ethyliden-verbrückter Flavanol Polymere im Wein wurde von Saucier et al. (1997a) nachgewiesen. Die Konzentration der Ethylidenbrücken bleibt allerdings während der Flaschenlagerung auf konstant niedrigem Niveau, was gegen einen kontinuierlichen Polymerisationsprozess spricht. Da die Konzentration direkter Interflavan-Bindungen während der Weinreifung jedoch gleichzeitig abnimmt, steigt mit dem Weinalter das Verhältnis von Ethyliden-Brücken zu Interflavan-Bindungen an, sodass dieser Parameter als Indikator für das Weinalter diskutiert wurde (Drinkine et al. 2007a). Man geht davon aus, dass Bildung und Abbau ethyliden-verbrückter Flavanol-Addukte während der Weinreifung parallel stattfinden, sodass die Konzentration in der Summe konstant bleibt (Drinkine et al. 2007a). Allerdings sind die Reaktionen, die zum Abbau dieser Addukte führen nicht bekannt. Fulcrand et al. (1997) zeigten, dass zwischen zwei Flavanolen auch sogenannte Carboxymethinbrücken aus Glyoxalsäure entstehen können. Diese Dimere sind strukturell vergleichbar mit ethyliden-verbrückten Dimeren, tragen jedoch zusätzlich eine Carboxylgruppe. Die für die Reaktion erforderliche Glyoxalsäure entsteht im Wein aus der Oxidation von Weinsäure (Clark und Scollary 2003). Die Ergebnisse von Drinkine et al. (2005) zeigen, dass die Reaktion mit Glyoxalsäure sogar schneller abläuft als mit Acetaldehyd. Die Carboxymethinverbrückten Flavanol-Dimere bilden jedoch nach kurzer Zeit gelbe Xanthyliumionen (Abbildung 2-19) (Es-Safi et al. 1999c). Dieser Reaktionsweg könnte auch für den Abbau Flavanol ethyliden-verbrückter Dimere verantwortlich sein, jedoch konnten Xanthyliumionen aus ethyliden-verbrückte Dimeren bisher im Wein nicht nachgewiesen werden (Es-Safi et al. 2002, Drinkine et al. 2005).



Abbildung 2-19: Xanthyliumionen aus Carboxymethin-verbrückten Flavanol-Flavanol Dimeren (links) und das hypothetische Produkt aus ethyliden-verbrückten Flavanol-Flavanol Dimeren (rechts) in Anlehnung an Es-Safi et al. (1999c).

2.4.3 Höhermolekulare Verbindungen

Die Reaktionen von Anthocyanen mit anderen monomeren Polyphenolen im Wein wurden in der Vergangenheit ausführlich untersucht, die Reaktionsmechanismen zur Bildung dimerer Verbindungen sind daher weitgehend geklärt. Allgemein wird angenommen, dass die Bildung der Polymere analog zu denen sind, die zu Bildung der Dimere führen. Allerdings fehlen die analytischen Nachweise für diese Annahmen, da in Wein bisher fast ausschließlich dimere Verbindungen massenspektrometrisch untersucht wurden. Einige wenige tri- und tetramere Pigmente sind in der Literatur jedoch beschrieben.

Hayasaka und Kennedy (2003) konnten direkt verknüpfte oligomere Pigmente aus einem Anthocyan und bis zu drei Flavanol-Einheiten massenspektrometrisch nachweisen. Allerdings gingen diese aus der Reaktion des Anthocyans mit einem Proanthocyanidin-Trimer hervor und nicht aus einer mehrstufigen Polymerisationsreaktion mit mehreren Molekülen (Epi)Catechin. Gleiches gilt für ein von Salas et al. (2003) synthetisiertes Trimer aus einem Anthocyan und einem Epicatechin-Epicatechingallat Dimer.

Es-Safi et al. (1999b) fanden in Modelllösungen ethyliden-verbrückte Tri- und Tetramere aus Malvidin-3-glucosid und Epicatechin. Da keine Fragmentspektren vorlagen, konnte keine gesicherte Angabe über die Sequenz der monomeren Bausteine und die Art der Bindungen gemacht werden. Da nicht mehr als zwei Anthocyane in einem Molekül gefunden wurden, nahm man an, dass Anthocyane sich stets in einer terminalen Molekülposition befinden müssen. Die These wurde einerseits dadurch gestützt, dass ethyliden-verbrückte Anthocyan-Flavanol Dimere ausschließlich C8-C8 verknüpft sind (Francia-Aricha et al. 1997, Lee et al. 2004), andererseits lässt der Nachweis ethylidenverbrückter Anthocyan-Tetramere an dieser Annahme zweifeln (Atanasova et al. 2002b). Sun et al. (2007) fanden in Modellwein zudem ein potentielles Reaktionsprodukt des 8-8-ethyliden-verbrückten Malvidin-Catechin Dimers, das in Position C6 des Anthocyans eine Hydroxyethylgruppe trägt. Diese resultiert aus der Reaktion des Dimers mit Acetaldehyd und könnte die Ausgangsverbindung für weitere Reaktionen darstellen. In Modelllösungen mit pH 3,2 zeigte sich die Verbindung allerdings stabiler als das ethyliden-verbrückte Dimer selbst (Sun et al. 2008). Hydroxyethyl-Dimere konnten auch im Wein nachgewiesen werden (Sun et al. 2010).

Alcalde-Eon et al. (2007) entdeckten direkt verknüpfte Addukte aus zwei Anthocyanen und einem Flavanol. Zugleich wurde mit einem direkt verknüpften Anthocyan-Dimer eine potentielle Vorstufe für das Trimer detektiert. Direkt verknüpfte Anthocyan-Anthocyan Dimere liegen bereits in Trauben vor (Vidal et al. 2004b), sie können aber auch erst im Wein gebildet werden (Fulcrand et al. 2004).

Trimere Addukte, die Interflavan-Bindungen des A-Typs und Ethyliden-Brücken enthielten, fanden Cruz et al. (2012). Dazu wurde ein C4-C8 verknüpftes, farbloses A-T-Addukt mit einem Anthocyan und einem Flavanol unter Anwesenheit von Acetaldehyd zur Reaktion gebracht. Aus der Reaktion mit dem Anthocyan entstand ein rotes Pigment, während das Produkt aus der Reaktion mit dem Flavanol farblos blieb. Die Strukturen beider Verbindungen zeigt Abbildung 2-20. An der dimeren Ausgangsverbindung bildete sich die Ethylidenbrücke nur in Position C8 des Anthocyanteils, nicht jedoch am Flavanolteil, dessen C8 bereits durch die direkte Interflavanbindung besetzt war. Auch an den als Reaktionspartner eingesetzten Anthocyanen und Flavanolen bildete sich nur an C8 eine Ethylidenbrücke aus.



Abbildung 2-20: Struktur der von (Cruz et al. 2012) hergestellten trimeren Verbindungen. Die Reaktion erfolgte zwischen einem direkt verknüpften Malvidin-Catechin Dimer des A-Typs mit Malvidin-3-glucosid (links) beziehungsweise Catechin (rechts). Die Bildung der Ethylidenbrücken erfolgte immer in der C8-Position der beteiligten Flavonoide.

Trimere und Tetramere Verbindungen mit einem Anthocyan und bis zu drei Ethyliden-Brücken wurden hingegen von Weber und Winterhalter (2014) in Modelllösungen hergestellt und isoliert (Abbildung 2-21). Mittels Massenspektrometrie und NMR- Spektroskopie wurde nachgewiesen, dass sich am Anthocyan zwei Ethylidenbrücken befinden und zwar in den Positionen C8 und C6. Damit könnten sie tatsächlich aus den von Sun et al. (2007) gefundenen Hydroxyethyl-Dimeren entstanden sein. Ihre Existenz widerspricht zudem der Annahme, dass sich ethyliden-verbrückte Anthocyane nur in terminalen Positionen befinden können.



Abbildung 2-21: Struktur zweier von Weber und Winterhalter (2014) synthetisierten und charakterisierten Verbindungen. Das Anthocyan befindet sich in der Mitte des Moleküls und besitzt Ethylidenbrücken in den Positionen C6 und C8.

Weber und Winterhalter (2014) untersuchten auch die chemischen Eigenschaften der ethyliden-verbrückten Dimere und Trimere. Die Ergebnisse zeigten, dass die Trimere durch SO₂ deutlich weniger gebleicht werden, als die dimeren Verbindungen. Auch bei einer Erhöhung des pH-Wertes zeigte sich die Farbintensität der Trimere stabiler, wenngleich der Effekt etwas weniger ausgeprägt ist.

Nave et al. (2010) erzeugten in einem semi-synthetischen Ansatz ebenfalls eine trimere Verbindung aus einem Anthocyan und zwei Flavanol Molekülen. Diese weist nur eine Ethylidenbrücke zwischen den beiden Flavanolen auf, das Anthocyan ist über eine direkte Interflavanbindung verknüpft. Überdies wurde ein Tetramer aus zwei Anthocyanen und zwei Flavanol Molekülen detektiert. Auch dieses Molekül enthielt nur eine Ethylidenbrücke, die in der Mitte, zwischen zwei Flavanol-Einheiten lokalisiert ist. Die beiden Anthocyane befinden sich damit in den terminalen Positionen. Da sie so in relativ großer Entfernung zueinander stehen, konnte das Molekül als doppelt positiv geladenes Ion detektiert werden. Sowohl die trimere als auch die tetramere Verbindung wurden in der gleichen Publikation in einem zwei und einem zehn Jahre alten Wein Rotwein qualitativ nachgewiesen. Dies zeigt ebenfalls, dass eine mehrstufige "Polymerisations"-Reaktion im Wein möglich ist. Da sich bei dem Tetramer die Anthocyane in terminalen Positionen befinden, die als potentielle Endpunkte einer Polymerkette gelten, stellt sich die Frage, ob diese weitere Reaktionen eingehen können. Da sie in einem zehn Jahre alten Rotwein nachgewiesen werden konnten, setzt dies zumindest eine gewisse Stabilität voraus und würde damit gegen weitere Reaktionen sprechen.

2.4.4 Pyranoanthocyane

Durch die positive Partialladung an Position C4 des C-Ringes können Anthocyane - im Gegensatz zu Flavanolen - in einer Cycloaddition mit polarisierten C-C-Doppelbindungen reagieren (Abbildung 2-22). Dabei entsteht, nach der Eliminierung eines Wassermoleküls, ein zweiter Pyranring zwischen C4 und der Hydroxygruppe am C5, weshalb dieser Typ von Anthocyanderivaten als Pyranoanthocyane bezeichnet wird (Bakker et al. 1997). Als erstes Pigment dieser Form wurde ein Vinylphenol-Pyranoanthocyan von Cameira dos Santos et al. (1996) und Fulcrand et al. (1996a) in Rotwein detektiert. Fulcrand et al. (1996a) zeigten im Modell, dass die Reaktion zwischen Malvidin-3-glucosid und 4-Vinylphenol den im Wein gefundenen Verbindungen führt. 4-Vinylphenol kann während der alkoholischen Gärung durch die Decarboxylase der Hefe entstehen. Die erforderlichen Enzyme werden allerdings durch die im Rotwein vorliegenden hohe Konzentrationen anderer Polyphenole gehemmt (Chatonnet et al. 1992). Später wurde gezeigt, dass die gleichen Produkte auch nichtenzymatisch, aus der direkten Reaktion zwischen Hydroxyzimtsäuren und Anthocyanen entstehen können. Die Carboxylgruppe wird dabei erst nach Ausbildung des Pyranringes als CO2 abgespalten. Das aus der Kaffeesäure gebildete Malvidin-Vinylcatechol-Pyranoanthocyan wird auch als Pinotin A bezeichnet (Schwarz et al. 2003a, Schwarz et al. 2003b). Da dieser Reaktionsweg nicht von den Enzymen der Hefen abhängt, kann die Konzentration von Pinotin A während der Alterung von Rotwein immer weiter zunehmen (Schwarz et al. 2004).

Die im Wein vorliegenden Aldehyde und Ketone können in ihrer Enolform in ähnlicher Weise reagieren wie die Vinylphenole. Das aus dem Hefestoffwechsel stammende Pyruvat reagiert mit Malvidin-3-glucosid zu Vitisin A (Fulcrand et al. 1998), die Reaktion mit Acetaldehyd ergibt hingegen Vitisin B (Heier et al. 2002). Die positive Ladung des C-Ringes kann sich in diesen Molekülen über eine größere Zahl von sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen verteilen, wodurch sie, im Vergleich zu Anthocyanen, besser stabilisiert ist. Aus diesem Grund und wegen des fehlenden Reaktionszentrums an Position C4 werden Pyranoanthocyane durch höhere pH-Werte oder den Zusatz von SO₂ kaum gebleicht (Bakker und Timberlake 1997, Oliveira et al. 2009). Sie reagieren außerdem wesentlich langsamer zu potentiellen Folgeprodukten als etwa monomere Anthocyane (Mateus und de Freitas 2001).



Abbildung 2-22: Bildungsmechanismus für Pyranoanthocyane am Beispiel von Pyruvat in Anlehnung an Fulcrand et al. (1998).

Die größere Ausdehnung des aromatischen Systems führt außerdem dazu, dass Pyranoanthocyane längerwelliges Licht absorbieren. Das Absorptionsmaximum von Vitisin A liegt in saurer wässriger Lösung bei $\lambda_{max} = 510$ nm, das von Vitisin B bei $\lambda_{max} = 478$ bis 482 nm (Bakker und Timberlake 1997, Oliveira et al. 2009). Durch diese hypsochrome Verschiebung werden Pyranoanthocyane vom menschlichen Auge als rotorange wahrgenommen. Weine mit einem hohen Anteil dieser Pigmente werden infolge dessen als brauntönig empfunden. Die mit der Weinreifung typischerweise einhergehende Bräunung wird daher auf die Bildung von Pyranoanthocyanen zurückgeführt (He et al. 2006, Rentzsch et al. 2009, Dipalmo et al. 2016).

Pyranoanthocyane können an dem zusätzlichen Pyranring anstelle von Wasserstoff (Vitisin B) oder einer Carbonsäuregruppe (Vitisin A) auch Flavanole oder Proanthocyanidine tragen. Solche Verbindungen werden als Vinylflavanol-Pyranoanthocyane bezeichnet. Ihr Absorptionsspektrum ist, wie das der Vitisine, hypsochrom verschoben und sie weisen im Vergleich zu Anthocyanen ebenfalls eine größere chemische Stabilität auf (Francia-Aricha et al. 1997). Das Vorliegen von Vinylflavanol-Pyranoanthocyane in Rotwein wiesen Asenstorfer et al. (2001) erstmals nach.

Anthocyane, Vitisin B und die meisten anderen Anthocyanderivate weisen bei pH 1 die stärkste Lichtabsorption auf. Bei steigendem pH nimmt diese in der Regel ab. Vinylflavanol-Pyranoanthocyane zeigen hingegen bei pH 3,6 die stärkste Lichtabsorption. Das Spektrum ist jedoch wie bei den Vitisinen hypsochrom verschoben. Vinylflavanol-Pyranoanthocyane sind außerdem reaktionsträge gegenüber SO₂. Selbst Konzentrationen von bis zu 250 mg/L SO₂ führten im Versuch nicht zu einer Bleichung dieser Pigmente. Im Vergleich zu monomeren Anthocyanen sind Pyranoanthocyane auch chemisch sehr stabil. Daher wird vermutet, dass sie erheblich zur Farbe älterer Rotweine beitragen und zusammen mit den Vitisinen für die mit der Alterung einhergehende Bräunung verantwortlich sind (He et al. 2010, Dipalmo et al. 2016).

Für die Bildung der Vinylflavanole wurden mehrere Reaktionswege vorgeschlagen. Asenstorfer et al. (2001) gingen davon aus, dass zunächst Flavanole mit Acetaldehyd zu Hydroxyethylflavanolen reagieren, aus denen die Vinylflavanole durch Eliminierung von Wasser entstehen. Mateus et al. (2002) zeigten, dass Vinylflavanole über die Spaltung ethyliden-verbrückter Flavanol-Flavanol-Dimere entstehen. Escribano-Bailón et al. (2001) fanden heraus, dass ethyliden-verbrückte Anthocyan-Flavanol Addukte in Modellösung gespalten werden. Obgleich bisher nicht untersucht wurde, ob bei dieser Reaktion Vinylflavanole entstehen, scheint es möglich, dass sich während der Weinreifung über diesen Weg ethyliden-verbrückte Anthocyan-Flavanol Addukte zu Vinylflavanolen umlagern.

2.4.5 Portisine

Trotz der hohen chemischen Stabilität der Pyranoanthocyane sind diese nicht völlig unreaktiv. Insbesondere Vitisin A kann aufgrund seiner Carboxylgruppe weitere Reaktionen eingehen. Eine dabei entstehende Pigmentklasse sind die Portisine. Auch diese Reaktionen laufen unter Beteiligung von polarisierbaren Doppelbindungen ab, sodass erneut Vinylflavanole und Hydroxyzimtsäuren als Reaktionspartner fungieren. Wie in Abbildung 2-23 dargestellt, wird während der Reaktion die Carboxylgruppe in Form von Ameisensäure abgespalten. Die Reaktion ist allerdings sehr langsam und erfordert hohe Konzentrationen von Pyruvat bzw. Vitisin A, sodass Portisine vor allem in gereiften Portweinen auftreten. In diesem Zusammenhang könnte bei der Entstehung der Portisine auch der für Portweine übliche hohe Alkoholgehalt von 20 % vol. eine Rolle spielen (Mateus und de Freitas 2001, Mateus et al. 2003, Oliveira et al. 2007).



Abbildung 2-23: Bildungsmechanismus der Portisine (in Anlehnung an Mateus et al. (2003))

Das Absorptionsspektrum von Portisinen ist, verglichen mit dem der Anthocyane, stark bathochrom verschoben, daher erscheinen sie dem Auge blau. Dies unterscheidet die Portisine von den anderen Pyranoanthocyanen, deren Absorptionsspektren stets hypsochrom verschoben sind. Sie könnten damit potentiell einer Brauntönung entgegenwirken. Da ihre Konzentration jedoch gering sind, ist ihr Einfluss auf die Weinfarbe unklar (Mateus et al. 2003). In weiterführenden Untersuchungen ergaben sich Hinweise, dass Pyranoanthocyane in Portwein auch Dimere bilden können (Oliveira et al. 2010). In einer Modelllösung wurden überdies ethyliden-verbrückte Pyranoanthocyan-Dimere detektiert, deren Nachweis in Wein bisher jedoch noch aussteht (Oliveira et al. 2011).

2.5 Messung der Weinfarbe mittels Spektralphotometer

Zwei Verfahren zur Messung der Weinfarbe werden von der Internationalen Organisation für Rebe und Wein (OIV) anerkannt. Zum einen ist dies die weitgehend etablierte Methode nach Glories. Es wird die Absorption bei 420, 520 und 620 nm gemessen. Daraus ergibt sich nach OIV (2009a) durch Berechnung:

Farbintensität I = E420 + E520 + E620

Farbton N = E420/E520

Ein Wein ist umso dunkler, je höher die Farbintensität und umso brauntöniger, je höher der Wert für den Farbton ist (OIV 2009a).

Der Nachteil des Verfahrens ist, dass nur sehr schmale Bereiche des sichtbaren Lichtspektrums verwendet werden. Es ist daher möglich, dass zwei Weine optisch unterschiedlich sind, obwohl sie die gleichen Werte für *I* und *N* aufweisen.

Etwas präziser ist in dieser Hinsicht das Verfahren nach der Internationalen Organisation für Licht und Beleuchtung (CIE). Im L*a*b* Farbraum werden aus dem Absorptionsspektrum im gesamten Wellenlängenbereichs des sichtbaren Lichts die Werte L* (Helligkeit) a* (rot-grün-Wert) und b* (blau-gelb-Wert) berechnet. Der L*a*b* Farbraum orientiert sich dabei an der Wahrnehmung des menschlichen Auges. Eine Änderung einer dieser Parameter um den Wert 1 gilt für das menschliche Auge als gerade noch wahrnehmbar. Dieses Verfahren wird von der OIV zur Bestimmung der Weinfarbe empfohlen (OIV 2006).

2.6 <u>Untersuchung von Polyphenolen mittels Massenspektrometer</u>

Höhermolekulare Polyphenole, wie beispielsweise Proanthocyanidine oder Flavanol-Anthocyan-Addukte können aufgrund ihrer ähnlichen Struktur und der Vielzahl an Isomeren chromatographisch nur schlecht aufgelöst werden. Durch den Einsatz eines (Hochdruck-) Flüssigchromatographie gekoppelten Massenspektrometers (LC-MS) können einerseits höhere Empfindlichkeiten erreicht werden, andererseits ist bei Einsatz hochauflösender Massenspektrometer die quantitative Bestimmung von Polyphenolen möglich, die allein chromatographisch nicht aufgelöst werden können.

2.6.1 Funktionsweise des ESI-Time-of-Flight-Massenspektrometers

Das für diese Arbeit eingesetzte LC-MS-System bestand aus einer UHPLC (Ultra-High-Pressure-Liquid-Chromatograph) gekoppelt mit einem hochauflösenden Quadrupole-Time-of-Flight-Massenspektrometer (QToF-MS), welches als Ionenquelle mit einer Elektrospray-Ionisation (ESI) ausgestattet war. Zwischen UHPLC und ESI war zusätzlich ein Diodenarray-Detektor (DAD) geschaltet. Massenspektroskopische Verfahren arbeiten stets in der Gasphase, (U)HPLC-Trennungen hingegen definitionsgemäß mit flüssigen Phasen. Daher muss bei einer Kopplung der beiden Techniken der von der (U)HPLC kommende flüssige Eluent mitsamt der enthaltenen Analyten durch die Ionenquelle kontinuierlich in die Gasphase gebracht werden. In der ESI-Ionenquelle wird der Eluent durch das Nebulizer-Gas unter hohem Druck fein zerstäubt (Solvent Spray). Zwischen dem Nebulizer und der Einlasskapillare wird eine Spannung von bis zu 5000 V angelegt, wodurch eine Ladung auf die einzelnen Tröpfchen des Solvent-Sprays übertragen wird. Durch das Anlegen eines Vakuums und durch ein heißes Trocknungsgas (Stickstoff) werden die Tröpfchen des Sprays immer weiter verdampft und verkleinert, bis nur noch die ursprünglich darin gelösten Moleküle vorhanden sind. Die Ladungen werden während dieses Prozesses auf die Moleküle übertragen, die so ionisiert werden. Diese Ionen gelangen anschließend durch die Einlasskapillare in das Massenspektrometer. Auf diese Weise können wahlweise Kationen (Positiv-Modus) oder Anionen (Negativ-Modus) erzeugt werden. Welcher Ionisierungsmodus effektiver ist, hängt von der Struktur des Analyten ab (Hesse et al. 2005). Da Anthocyane und deren Derivate bereits in Lösung als Kationen vorliegen, wurden für die vorliegende Arbeit alle Messungen im positiven Modus durchgeführt.

Ein Q-ToF-Massenspektrometer besteht zwei miteinander aus gekoppelten Massenspektrometern (Abbildung 2-24). Das erste, ein Quadrupol-Massenspektrometer, dient der Selektion einzelner Ionen, wenn Fragmentierungsexperimente zur Strukturaufklärung durchgeführt werden. Nur ausgewählte Precursor-Ionen gelangen so in die Kollisionszelle und werden dort durch den Hexapol auf eine definierte kinetische Energie beschleunigt. Durch Kollision mit Stickstoffmolekülen kommt es zur Fragmentierung der Analyten. Dieser Vorgang wird als Collision Induced Dissociation (CID) bezeichnet. Die kinetische Energie muss so groß sein, dass möglichst viele aussagekräftige Fragmentionen entstehen. Ist sie zu klein, fragmentiert das Precursor-Ion nicht, ist sie hingegen zu groß, kommt es zur völligen Zerstörung des Precursor-Ions, es

können ebenfalls keine Fragmentionen detektiert werden. Allgemein gilt, dass die Kollisionsenergie umso größer sein muss, je höher das Molekulargewicht des Analyten ist (Hesse et al. 2005, Agilent 2008).



Abbildung 2-24: Schematische Darstellung eines Quadrupol-Time-of-Flight-Massen-spektrometers mit ESI-Ionenquelle und Kollisionszelle für Fragmentierungsexperimente (eigene Darstellung, in Anlehnung an Agilent (2011)).

Im Time-of-Flight-Massenspektrometer, wird das Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) der Ionen oder Fragmentionen bestimmt. Dazu werden erneut alle Ionen auf die gleiche kinetische Energie beschleunigt. Nach der Formel $E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2$ (mit E_{kin} : kinetische Energie, m: Masse und v: Geschwindigkeit) erreichen leichte Ionen bei gleicher Energie eine höhere Geschwindigkeit als schwere Ionen. Nach einer definierten Flugstrecke kommen die leichten, schnellen Ionen somit früher am Detektor an, als die schwereren, langsamen Ionen. Diese Methode der Massenbestimmung ist sehr präzise: Die Molekülmasse eines Analyten kann durch das verwendete hochauflösende Massenspektrometer auf bis zu 0,0001 Da genau bestimmt werden (Hesse et al. 2005, Agilent 2011). Der Vorteil einer hohen Auflösung besteht darin, dass Analyten mit gleicher Nominalmasse, aber unterschiedlicher Summenformel meist eine unterschiedliche exakte Masse aufweisen. So haben zum Beispiel Weinsäure ($C_4H_6O_6$) und Arabinose ($C_5H_{10}O_5$) beide eine Nominalmasse von 150 Da und wären in einem Massenspektrometer mit normaler Auflösung anhand der Molekülmasse nicht zu unterscheiden. Im hochauflösenden Massenspektrometer misst man bei entsprechend genauer Kalibrierung für Weinsäure 150,0164 g/mol und für Arabinose 150,0528 g/mol und kann daher beide Moleküle unterscheiden. Bei hochauflösenden Massenspektren ist in vielen Fällen eine Rückrechnung von der exakten Masse auf die Summenformel des Moleküls möglich.

Sollen quantitative Informationen für mehrere Analyten gleichzeitig generiert werden, leitet man alle Ionen aus der Ionenquelle ohne Fragmentierung durch den Quadrupol in das ToF-MS. Zur Auswertung werden aus den Chromatogrammen die benötigten Massenspuren durch die Hochauflösung extrahiert, integriert und so die gewünschten quantitativen Daten erzeugt.

2.6.2 Charakteristische Fragmentierungsreaktionen von Rotweinpolyphenolen

2.6.2.1 Anthocyane

Anthocyane weisen ein eher einfaches Fragmentspektrum auf, da in der Regel nur das Glykon abgespalten wird. Je nachdem, ob es sich um Glucoside, Acetylglucoside oder Coumaroylglucoside handelt, beträgt der Neutralverlust 162 Da, 204 Da oder 308 Da. Das einzige Fragmention ist stets eines der fünf im Wein auftretenden Anthocyanidine, sodass sich alle im Wein auftretenden Anthocyane massenspektrometrisch leicht unterscheiden lassen (Baldi et al. 1995, Favretto und Flamini 2000).

2.6.2.2 Flavanole

Die Fragmentspektren der Flavanole sind meist komplizierter. Mittels CID sind im ESI-Positiv-Modus drei Spaltungsreaktionen am C-Ring möglich (siehe Abbildung 2-25). Die Retro-Diels-Alder-Spaltung in α -Position zum Sauerstoffatom des Pyranringes und zwischen C3 und C4 liefert das Hauptfragmention mit 139 Da. Ein weiteres Fragment entsteht durch die α -Spaltung am Pyranring in deren Folge eine Umlagerungsreaktion zur Spaltung der Bindung zwischen C4 und C5 führt. Der A-Ring bildet dabei das Neutralteilchen in Form von Phloroglucinol und die Ladung bleibt am B-Ring. Die Masse dieses Fragmentions beträgt 165 Da. Häufig kommt es anschließend zu einer Dehydratisierung, wodurch ein Fragment mit 147 Da entsteht. Infolge der α -Spaltung kann auch die Bindung zwischen C2 und C3 aufgebrochen werden. In diesem Fall kann die Ladung an beiden Fragmenten lokalisiert sein und es sind Fragmentionen mit 151 Da und 123 Da zu beobachten (Wolfender et al. 2000).



Abbildung 2-25: Fragmentierungsreaktionen der Flavanole nach Wolfender et al. (2000).

2.6.2.3 Spaltung von Interflavan-Bindungen

Liegt statt eines Flavanols ein Proanthocyanidin vor, so können an allen Flavanol-Einheiten die im vorherigen Abschnitt genannten Spaltungsreaktionen ablaufen. Zusätzlich werden auch die Interflavan-Bindungen gespalten (Friedrich et al. 2000). Interflavan-Bindungen zwischen Anthocyanen und Flavanolen, die sich erst im Zuge der Weinreifung bilden, werden mittels CID ebenfalls gespalten. Im positiven Messmodus befindet sich die Ladung nach der Fragmentierung am Anthocyan und das Flavanol wird als Neutralteilchen abgespalten (González-Paramás et al. 2006, Alcalde-Eon et al. 2007).

2.6.2.4 Spaltung von Ethyliden-Brücken

Wird die Ethyliden-Brücke zwischen zwei Flavanolen oder zwei Anthocyanen im Massenspektrometer gespalten, verbleibt diese als Vinylrest an einem der beiden Monomerbausteine. Die Ladung kann dabei sowohl dieses Fragment, als auch jenes ohne die Vinylgruppe tragen (Saucier et al. 1997b, Cruz et al. 2012). Befindet sich eine Ethyliden-Brücke zwischen einem Anthocyan und einem Flavanol, bleibt der Vinylrest immer am Anthocyan, das stets die positive Ladung trägt (Sánchez-Ilárduya et al. 2012).

2.7 Analyse des Polyphenolprofils mittels Harbertson-Adams Assay

Mit Hilfe chromatographischer Verfahren lassen sich Einzelsubstanzen gut auftrennen und quantifizieren. Spektralphotometrische Methoden haben hingegen den Vorteil, dass Substanzklassen anhand gemeinsamer chemischer Eigenschaften, z.B. ganze funktioneller Gruppen, gemeinsam als Summenparameter bestimmt werden können. Für die Untersuchung polyphenolhaltiger Lebensmittel ist noch heute das vor über 90 Jahren publizierte Verfahren nach Folin und Ciocalteu (1927) in Gebrauch, mit dem alle im Lebensmittel enthaltenen Polyphenole und sonstigen oxidierbaren Substanzen gemeinsam erfasst werden können. Auch für Wein hat sich die Methode mit einigen Modifikationen unter der Bezeichnung "Gesamtphenolgehalt nach Folin C" als Standardverfahren durchgesetzt (Singleton et al. 1999). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Methoden, die die Quantifizierung bestimmter Untergruppen der Polyphenole ermöglichen, etwa der Anthocyane (Ribéreau-Gayon und Stonestreet 1965) oder der Tannine (Hagermann und Butler 1978, Sarneckis et al. 2006). Auch zur Bestimmung der polymeren Pigmente existiert bereits seit mehreren Jahrzehnten ein entsprechendes Verfahren (Somers und Evans 1977).

Die Kombination einiger dieser Verfahren führte zur Entwicklung des Harbertson-Adams Assay (Harbertson et al. 2003). Neben Gesamtphenolen, Tanninen und monomeren Anthocyanen steht dabei die Bestimmung der polymeren Pigmente im Zentrum. Die Innovation des Verfahrens besteht in der Unterscheidung zwischen "kleinen" ("Small Polymeric Pigments", SPP) und "großen" ("Large Polymeric Pigments", LPP) polymeren Pigmenten, anhand ihrer Fähigkeit mit Rinderserumalbumin unlösliche Komplexverbindungen zu bilden. Während sich die LPP wie Tannine verhalten und bei Zugabe des Proteins aus der Lösung ausfallen, bleiben die SPP in Lösung und können so separat quantifiziert werden (Harbertson et al. 2003).

2.7.1 Eisen-reaktive Phenole und Tannine

Eisen(III)-Ionen und Polyphenole mit vicinalen Hydroxygruppen bilden in wässriger Lösung einen intensiv-blauen Farbkomplex (Gore und Newman 1964). Diese Reaktion lässt sich nutzen, um den Gehalt dieser Polyphenole photometrisch zu bestimmen. Dazu zählen beispielsweise Flavanole, Proanthocyanidine, Hydroxyzimtsäuren und Gallussäure. Anthocyane, sowie einige Polyphenole ohne benachbarte Hydroxygruppen, wie Coumarsäure, bilden mit Eisen(III) keine Komplexverbindungen und werden daher nicht erfasst (Harbertson et al. 2004, Harbertson und Spayd 2006). Der erhaltene Messwert korreliert zwar gut mit dem Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, da das Verfahren jedoch nicht exakt das gleiche Substanzspektrum erfasst, schlagen Harbertson und Spayd (2006) vor, als Bezeichnung den Begriff "Eisen-reaktive Phenole" zu verwenden.

Tannine sind definiert als Stoffe, die mit Proteinen unlösliche Aggregate bilden. Daher ist es zweckmäßig, ihre Konzentration durch Zugabe von Protein zu bestimmen. Hagermann und Butler (1978) entwickelten ein Verfahren, bei dem als Protein Bovines Serum Albumin verwendet wird. Nach der Fällung wird das Präzipitat isoliert, gewaschen und mittels Natriumdodecylsulfat wieder in Lösung gebracht. Die Quantifizierung erfolgt analog zur Bestimmung der Eisen-reaktiven Phenole durch Zugabe von Eisen(III)-Ionen und anschließende photometrische Messung. Harbertson et al. (2002) wendeten das Verfahren zunächst zur Bestimmung von Tanninen in Trauben an. Später wurde es in den Harbertson-Adams Assay zur Bestimmung des Tanningehalts im Wein integriert (Harbertson und Spayd 2006).

Brooks et al. (2008) beurteilten das Verfahren der Tanninbestimmung zwar als unzureichend reproduzierbar, wohingegen die Ergebnisse von Mercurio und Smith (2008) belegen, dass das Verfahren mit anderen Methoden vergleichbare Ergebnisse liefert. Kennedy et al. (2006) wiesen nach, dass die Methode gut mit der sensorisch wahrgenommen Adstringenz und mit anderen Verfahren zur Tanninbestimmung korreliert. Harbertson et al. (2012) zeigte außerdem, dass ein Zusatz oenologischer Tannine mit der Methode zufriedenstellend erfasst wird.

2.7.2 Monomere Anthocyane und Polymere Pigmente

Monomere Anthocyane liegen bei pH-Werten unter 1,5 ausschließlich in der roten Flavyliumform vor, über 4,5 hingegen nur der Chinoid- oder der Chalcon-Form, die bei Wellenlängen von 520 nm keine Absorption aufweisen. Der Gehalt der Anthocyane im Wein kann daher spektralphotometrisch bestimmt werden, indem ein stark saurer (pH < 1,5) und ein schwach saurer (pH > 4,5) Puffer zugegeben werden. Die Differenz der Lichtabsorption beider Proben bei 520 nm ist proportional zum Gehalt der Anthocyane, der durch Multiplikation mit einem empirischen Faktor berechnet werden kann (Ribéreau-Gayon et al. 2006b). Die Selektivität des Verfahrens lässt sich durch die Zugabe von SO₂ zur schwach sauren Probe verbessern, da dies die Bleichung der monomeren Anthocyane effektiver macht. Zur Anwendung kommt dies in einem Assay zur Bestimmung der Anthocyane von Somers und Evans (1977). Die gebleichte Probe ist in der Regel jedoch nicht völlig farblos, da sie Polymere Pigmente enthalten, die sich durch hohe pH-Werte und SO₂ nicht bleichen lassen. So kann mit Hilfe der Methode auch ein Gehalt für Polymere Pigmente angegeben werden, aufgrund dessen bei jüngeren Weinen Rückschlüsse auf die Farbstabilität und bei gereiften Weinen auf das Weinalter möglich sind (Somers und Evans 1977).

2.7.3 Small Polymeric Pigments (SPP) und Large Polymeric Pigments (LPP)

Harbertson et al. (2003) gelang es, zwischen großen und kleinen Polymeren Pigmente zu unterscheiden indem das Verfahren der Proteinfällung nach Hagermann und Butler (1978) mit der SO₂-Bleichung zur Bestimmung der Polymeren Pigmente nach Somers und Evans (1977) kombiniert wurde. Kleine Polymere Pigmente ("Small Polymeric Pigments", SPP) sind die Polyphenole, die unter Anwesenheit von SO₂ rot gefärbt bleiben. Sie sind gut löslich und Fallen auch bei Zugabe von Proteinen nicht aus. Große Polymere Pigmente ("Large Polymeric Pigments", LPP) sind dagegen die Farbstoffe, die sich ebenfalls nicht durch SO₂ bleichen lassen und bei Zugabe von Protein ausfallen, sich also diesbezüglich wie Tannine verhalten. Ausgehend davon, dass SPP kleiner sind als LPP, lässt sich der Polymerisationsprozess während der Weinbereitung analytisch verfolgen. Aus monomeren Anthocyanen sollten demnach zunächst SPP und daraus später LPP entstehen. Da LPP mit Proteinen aus der Lösung gefällt werden, besteht bei einem Einsatz von proteinhaltigen Klärhilfsmitteln, wie Gelatine, Casein oder dem seit einigen Jahren verwendeten Erbsenprotein, die Gefahr von Farbverlusten (Harbertson et al. 2003). Polymerisieren die LPP weiter, fallen sie zudem vermutlich aufgrund ihrer Größe von selbst aus. Bei hohen LPP-Gehalten könnten daher Sauerstoffeinträge, die eine weitere Polymerisation bewirken, zu Farbverlusten führen.

2.8 Verfahren der Rotweinbereitung

Während der Weißweinbereitung sollen möglichst wenige Polyphenole in den Wein gelangen, um Bittertöne zu vermeiden. Die Trauben werden daher in der Regel zunächst zu Most verarbeitet, der anschließend vergoren wird. In der Rotweinbereitung hingegen ist die Extraktion von Anthocyanen und Tanninen aus den Traubenschalen das Ziel (Troost 1988). Dazu existieren verschiedene oenologische Verfahren. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Techniken Maischegärung, Kaltmazeration und das Maischeerhitzungsverfahren sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

2.8.1 Maischegärung

Die Maischegärung ist das klassische Verfahren der Rotweinbereitung. Die Trauben werden von den Rappen getrennt, gequetscht und mit Schalen und Kernen vergoren. Die entstehende Gärungskohlensäure treibt diese festen Maischebestandteile ständig nach oben, wo sich ein sogenannter Maischehut bildet. Dieser muss wieder mit dem gärenden Most vermischt werden muss, um das Wachstum aerober Mikroorganismen, beispielsweise Essigsäurebakterien, zu verhindern und eine kontinuierliche Extraktion von Anthocyanen und Tanninen aus den Beerenschalen zu gewährleisten. Das Unterstoßen kann per Hand erfolgen, wird jedoch in der Praxis überwiegend durch verschiedene Techniken automatisiert durchgeführt, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll. Erst gegen Ende oder nach der Gärung wird die Maische abgepresst. Die Dauer der Maischekontaktzeit entscheidet über den Tanningehalt des Weines: Wird die Maische nach 5 bis 7 Tagen abgepresst, entstehen eher leichte Weine, für kräftige, tanninreiche Rotweine sollte die Pressung erst nach mehr als 10 Tagen stattfinden. Da die Extraktion der besser löslichen Anthocyane bereits nach etwa vier Tagen abgeschlossen ist, kann über die Maischekontaktzeit das Verhältnis von Anthocyanen zu Tanninen im Wein variiert werden (Hamatschek 2015).

2.8.2 Kaltmazeration

Bei einer Kaltmazeration werden die Trauben nach der Lese ebenfalls von den Rappen getrennt und gequetscht. Anschließend werden sie jedoch auf unter 10 °C gekühlt und so

Literaturübersicht

für 5 bis 10 Tage mazeriert, ohne dass eine Gärung stattfindet. Da noch kein Ethanol vorliegt, werden während dieser Zeit vor allem die leicht löslichen Anthocyane extrahiert. Die schwerer löslichen Tannine bleiben zunächst in Traubenschalen und -kernen. Nach dieser Phase wird eine Maischegärung durchgeführt, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Auf diese Weise kann das Verhältnis zwischen Tanninen zu Anthocyanen zugunsten der Anthocyane verschoben werden, was zu farbintensiven aber weniger adstringierenden Weinen führt. Außerdem erzeugt das Verfahren insgesamt fruchtigere Weine. Angewendet wird die Kaltmazeration vor allem bei farbschwachen Burgunderrebsorten wie dem Spätburgunder (Ribéreau-Gayon et al. 2006a, Hamatschek 2015). Für die hier durchgeführten Versuche diente die Verschiebung des Tannin-Anthocyan-Verhältnisses dazu, den Einfluss eines Sauerstoffzusatzes auf Weine mit unterschiedlichen Polyphenolprofilen zu untersuchen.

2.8.3 Maischeerhitzung (Kurzzeithocherhitzung)

Da bei einer Maischegärung eine regelmäßige Durchmischung der Maische stattfinden muss, ist der technische Aufwand in der Regel deutlich höher als bei der Weiß- und Roséweinbereitung, bei der eine Vergärung des Mostes stattfindet. Durch die Kurzzeithocherhitzung roter Traubenmaische werden die Zellen der Traubenschalen thermisch aufgebrochen, sodass Anthocyane und Tannine direkt herausgelöst werden. Dazu wird die Traubenmaische für mehrere Minuten auf 80 - 87 °C erhitzt und danach wieder heruntergekühlt. Durch anschließendes Abpressen der noch unvergorenen Maische wird ein roter Most erhalten, der wie weißer Most vergoren werden kann (Hamatschek 2015). Die Kurzzeithocherhitzung wird vor allem für die Verarbeitung großer Rotweinchargen verwendet, die auf diese Weise einfach und sicher vergoren werden. Ein Vorteil des Verfahrens besteht bei fäulnisbelastetem Lesegut in der Zerstörung der Polyphenoloxidase (Laccase) aus dem Botrytis Pilz. Diese können andernfalls unter Anwesenheit von Sauerstoff durch die Oxidation der Anthocyane zu einer erheblichen Bräunung und Verlusten der Farbintensität führen. Im Gegensatz zur traubeneigenen Polyphenoloxidase (Tyrosinase) wird Laccase nicht durch SO₂ inhibiert. Mosten und Weinen die Polyphenoloxidasen enthalten, darf daher keinesfalls Sauerstoff zugesetzt werden (Ribéreau-Gayon et al. 2006a). Da bei maischeerhitzten Weinen dieses Risiko nicht besteht, eignen sie sich für die Mikrooxygenierung besonders gut.

47
2.9 Mikrooxygenierung

2.9.1 Historische Entwicklung

Während der Lagerung verändern sich Farbe und Geschmack eines Rotweines. Schon früh erkannte man, dass Luft bzw. Sauerstoff diesen Prozess beschleunigt. Louis Pasteur ging sogar davon aus, dass eine Reifung nur unter Anwesenheit von Sauerstoff stattfinden kann (Würdig und Woller 1989).

Bereits in den 1960er und 1970er Jahren wurden Ideen entwickelt, wie die Reifung von Weinen durch gezielten Luftkontakt gefördert werden kann. Zu dieser Zeit war bereits bekannt, dass Sauerstoff nicht nur einen positiven Einfluss auf die Weinreife im Allgemeinen, sondern auch auf die Weinfarbe im Speziellen haben kann (Singleton 1962, Timberlake und Bridle 1976a, Ribéreau-Gayon et al. 1983).

Durch die Modernisierung der Weinbereitung und den Austausch der traditionellen Holzfässer, gegen die meist größeren GfK-, Beton- oder Edelstahltanks, wurde der Sauerstoffeintrag in den Wein während des Herstellungsprozesses deutlich verringert. Bei Weißwein wirkte sich dies häufig positiv auf die Weinqualität aus und ermöglichte, z.B. zusammen mit einer gekühlten Vergärung, die Erzeugung besonders fruchtiger Weine und damit einen völlig neuen Weinstil. In der Rotweinbereitung hingegen führte dieser Strukturwandel durch den verringerten Sauerstoffeintrag zu einem verlangsamten Reifeprozess (Durner 2011).

Aus diesem Grund wurde in den 1990er Jahren ein Verfahren entwickelt, bei dem geringe Mengen Sauerstoff dem Wein über eine Fritte gezielt und präzise zudosiert werden können – die Mikrooxygenierung (Parish et al. 2000). Je nach Zeitpunkt und Höhe des Sauerstoffzusatzes wurden später in der Literatur unterschiedliche Begriffe eingeführt. Unter dem Ausdruck *Makrooxygenierung* wird die Zugabe großer Sauerstoffmengen von bis zu 100 mg/L, meist während oder unmittelbar nach der Gärung verstanden. Mit *Mikrooxygenierung* ist hingegen die Gabe von Mengen zwischen 1 und 10 mg Sauerstoff pro Liter und Monat gemeint, die in der Regel nach dem biologischen Säureabbau erfolgt und bis zu einem halben Jahr andauern kann. Bezüglich Höhe und Dauer ist diese Form der Sauerstoffgabe der Holzfasslagerung am nächsten. Im allgemeinen Sprachgebrauch wird der Begriff *Mikrooxygenierung* jedoch auch als Überbegriff für beide Verfahren verwendet (Durner 2011, Hamatschek 2015). Im Zusammenhang mit Wein und Sauerstoff findet man zudem den Ausdruck *Nanooxygenierung*. Damit ist in aller Regel die Förderung der Weinreifung in der Flasche durch Verwendung Sauerstoff-permeabler Verschlüsse gemeint (Caillé et al. 2010) und ist nicht Thema der vorliegenden Arbeit.

2.9.2 Menge des zugesetzten Sauerstoffs und Dauer der Zugabe

Wird Sauerstoff einem Rotwein zum Zweck der Farbintensivierung und -stabilisierung zugesetzt, stellen sich zwei Fragen: Nutzt Sauerstoff dem vorliegenden Rotwein oder kann er ihm schaden? Sollte er grundsätzlich von Nutzen sein, muss entschieden werden, wie viel Sauerstoff über welchen Zeitraum zugesetzt wird. Längst ist nicht sicher, dass eine Sauerstoffzugabe bei jedem Wein zu einer intensiveren Farbe führt. Über die Dauer und die Höhe des Sauerstoffzusatzes existieren in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben, wie die Auswahl in Tabelle 2-1 zeigt. Die Ergebnisse belegen, dass eine erfolgreiche Anwendung des Verfahrens nicht allein von der Menge des zugesetzten Sauerstoffes abhängt. Cejudo-Bastante et al. (2011b) beobachteten bei einer Gesamtdosage von 8,9 mg/L eine Erhöhung der Farbintensität, während bei del Carmen Llaudy et al. (2006) die Gabe von 9 mg/L und bei Gambuti et al. (2015) die Gabe von 15 mg/L eine Verringerung der Farbintensität bewirkten. Zwar unterschied sich die Anwendungsdauer in beiden Quellen erheblich: während sich die Sauerstoffgabe bei del Carmen Llaudy et al. (2006) über drei Monate erstreckte, führten Cejudo-Bastante et al. (2011b) die gleiche Menge innerhalb von nur 20 Tagen zu. Doch auch eine kurze und intensive Sauerstoffzugabe führt nicht zwingend zum Erfolg. Parpinello et al. (2012) fügten einem Cabernet Sauvignon in nur sechs Tagen 6,5 bzw. 13 mg/L Sauerstoff zu und damit ähnliche Mengen und in einem ähnlichen Zeitraum wie Cejudo-Bastante et al. (2011b). Obwohl sie eine Abnahme der Farbintensität beobachteten, wurde der mikrooxygenierte Wein gegenüber der reduktiv ausgebauten Kontrollvariante von Konsumenten bevorzugt. Bei weniger farbintensiven Rebsorten wie Spätburgunder oder Trollinger ist anzunehmen, dass eine verringerte Farbintensität jedoch von Verbrauchern nicht präferiert wird.

Quelle	Höhe der Sauerstoff- dosage	Zeitpunkt und Dauer	Gesamtdosage	Ergebnis
Du Toit et al. (2006a)	1,5 bzw. 3 mg/L/Monat	12 bzw. 24 Wochen post- MLF MOX	4,5 bis 18 mg/L	höhere Farbintensität
del Carmen Llaudy et al. (2006)	3 mg/L/Monat	3 Monate	9 mg/L	geringere Farbintensität
Durner et al. (2010b)	20 bzw. 100 mg/L/Monat	30 Tage pre- MLF MOX	13 bzw. 67 mg/L	2006: geringere Farbintensität 2007 höhere Farbintensität
Durner et al. (2010b)	1 bzw. 5 mg/L/Monat	3 Monate post- MLF MOX	3 bzw. 15 mg/L	2006: geringere Farbintensität 2007 höhere Farbintensität
Cejudo-Bastante et al. (2011b)	10 mL/L/Monat	20 Tage pre- MLF MOX	8,9 mg/L	höhere Farbintensität, mehr Brauntönigkeit, höhere sensorische Gesamtqualität
Parpinello et al. (2012)	25 bzw. 50 mL/L/Monat	6 Tage pre-MLF MOX	6,5 bzw. 13 mg/L	geringere Farbintensität, erhöhte Brauntönigkeit, höhere sensorische Qualität
Laurie et al. (2014)	5 mL/L/Monat	4 Monate post- MLF MOX	26 mg/L	höhere Farbintensität, mehr polymere Pigmente, höherer Tanningehalt
Oberholster et al. (2015)	1 mg/L/Monat	3 bzw. 6 Monate post- MLF MOX	3 bzw. 6 mg/L	höhere Farbintensität, rot- violetter Farbton
Gambuti et al. (2015)	15 mL/L/Monat	30 Tage post- MLF MOX	20 mg/L	geringere Farbintensität, Bräunung
Picariello et al. (2017)	Verwendung von H ₂ O ₂	30 Tage Lagerung	ensprechend 74 mg/L O ₂	höhere Farbintensität

Tabelle 2-1: Angaben zu Zeitpunkt, Höhe und Dauer der Mikrooxygenierung in der Literatur (Auswahl)

Die Ergebnisse von Durner et al. (2010b) zeigen indes, dass Weine der gleichen Rebsorte und aus der gleichen geographischen Lage sich in zwei Jahrgängen widersprüchlich verhalten. So wurde bei einem Spätburgunder des Jahrgangs 2006 durch Mikrooxygenierung eine Abnahme der Farbintensität beobachtet, egal zu welchem Zeitpunkt die Zugabe erfolgte und wie hoch die zugesetzte Sauerstoffmenge war. Im ebenfalls in dieser Publikation untersuchten Jahrgang 2007 nahm die Farbintensität der Spätburgunder hingegen in allen Varianten zu – wiederum unabhängig von der Menge des zugesetzten Sauerstoffs oder dem Zeitpunkt der Anwendung. Durner et al. (2010b) machten dafür das deutlich größere Verhältnis von Flavanolen zu Anthocyanen im Jahrgang 2006 verantwortlich, das für eine Vertiefung der Weinfarbe durch Sauerstoff offenbar eine wichtige Rolle spielt. Aus wissenschaftlicher Sicht interessant ist außerdem die Vorgehensweise von Picariello et al. (2017), die anstelle von Sauerstoff direkt Wasserstoffperoxid zusetzten. Diese Methode, die für die kommerzielle Weinbereitung nicht zugelassen ist, führte ebenfalls zu einer Erhöhung der Farbintensität.

Eine allgemeingültige Empfehlung über die optimale Sauerstoffmenge – unabhängig von Rebsorte, Jahrgang und Anbaugebiet, kann es somit offensichtlich nicht geben. Es muss vielmehr für jeden Wein individuell entschieden werden, ob – und wenn ja wie viel – Sauerstoff seiner Qualität zuträglich ist.

2.9.3 Technische Aspekte

2.9.3.1 Zugabe von Sauerstoff über Edelstahl- oder Keramikfritten

Der Sauerstoff kann auf verschiedene Arten in den Wein eingebracht werden. Die kommerziell am weitesten verbreitete Variante ist die Applikation über eine Dosageeinheit und eine (Edelstahl- / Keramik-) Fritte. Eine solche Anlage besteht aus einer Sauerstoff-Druckgasflasche mit Druckminderer, die an eine elektronische Steuereinheit angeschlossen ist (Abbildung 2-26). Diese dosiert über ein definiertes Volumen oder einen definierten Druck die gewünschte Sauerstoffmenge, die über einen Kunststoffschlauch in das Gebinde überführt wird. Damit das Gas dort nicht einfach aufsteigt und sich im Kopfraum sammelt, müssen möglichst kleine Gasblasen erzeugt werden, die sich beim Aufsteigen im Wein lösen, bevor sie die Flüssigkeitsoberfläche erreichen. Dazu wird der Sauerstoff durch Edelstahl- oder Keramikfritten geleitet, wobei die Keramikfritten wesentlich feinere Gasblasen erzeugen, was bei geringen Gebindehöhen von Vorteil ist. Allgemein wird eine Gebindehöhe von mindestens 2,20 m bis 2,50 m empfohlen (Du Toit et al. 2006b, Gómez-Plaza und Cano-López 2011).

Die meisten kommerziell erhältlichen Steuereinheiten besitzen mehrere, separat regelbare Ausgänge, sodass mit einem Gerät zugleich mehrere Gebinde mikrooxygeniert werden können. Bei allen Steuereinheiten kann die Gebindegröße und die gewünschte Sauerstoff-Dosage, meist in mg/L/Monat, eingestellt werden. Die Kunststoffschläuche können aus Polyurethan (PU), Polyamid oder HDPE sein (Durner 2011).



Abbildung 2-26: Technische Umsetzung der Mikrooxygenierung mit Sauerstoffquelle, Steuereinheit und Keramikfritte als Diffusor (eigene Darstellung).

2.9.3.2 Zugabe von Sauerstoff über Diffusionsschläuche

Anstelle von Keramikfritten können auch Schläuche aus Polydimethylsiloxan als "Diffusoren" eingesetzt werden (Abbildung 2-27). Dieses Material, das strukturell mit Silikon verwandt ist, weißt eine hohe Durchlässigkeit für Gase auf. Wird nun ein Sauerstoffüberdruck auf einen im Wein befindlichen Schlauch aus Polydimethylsiloxan gegeben, diffundiert das Gas durch den Schlauch und löst sich im Wein. Aus technischen Gründen durchströmt der Sauerstoff den Schlauch in einem Kreislauf, sodass es am Gebinde, im Gegensatz zu Systemen die mit Fritten versehen sind, einen Gaseinlass und einen Gasauslass gibt. Im Unterschied zu den Keramikfritten entstehen an der Außenseite dieser Schläuche in der Regel keine Gasblasen und der herausdiffundierende Sauerstoff löst sich direkt. Somit ist das Verfahren besonders für kleine Gebinde mit geringer Höhe geeignet, bei denen Gasblasen aus Fritten sonst an die Oberfläche aufsteigen würden (Schmidtke et al. 2011). Kleinere Gebinde haben außerdem oftmals kleine Spundöffnungen, durch die manche Keramik-Diffusoren nicht eingeführt werden können. Für sehr große Gebinde ist das System hingegen nicht geeignet, da die Sauerstoff-Diffusionsrate pro Meter Siloxan-Schlauch begrenzt ist und somit für eine große Menge Wein sehr lange Diffusionsschläuche eingesetzt werden müssten (Gambuti et al. 2015).



Abbildung 2-27: Umsetzung der Mikrooxygenierung mit permeabler Membran als Diffusor (eigene Darstellung, in Anlehnung an Schmidtke et al. (2011)).

2.9.3.3 Einsatz von Reifetanks

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Tanks aus HDPE, die beispielsweise durch die Firma Flextank (USA) angeboten werden. HDPE ist für Gase teilweise permeabel, sodass der in der Luft enthaltene Sauerstoff langsam hindurch diffundieren kann. Der Vorteil dieses Verfahrens ist sein sehr geringer technischer Aufwand. Der Nachteil ist, dass die Rate des aufgenommenen Sauerstoffs nicht variiert werden kann. Sie hängt vom Oberflächen-Volumen-Verhältnis, sowie der Beschaffenheit und Stärke des Tankmaterials ab. Insofern ist sie der Lagerung eines Weines im Holzfass sehr ähnlich, jedoch mit dem Unterschied, dass bei Holzfässern die Diffusionsrate von Fass zu Fass großen Schwankungen unterworfen ist, während die Diffusionsrate bei gut gereinigten Reifetanks immer gleich ist. Ferner sind Tanks mit unterschiedlichen Sauerstoffdiffusionsraten kommerziell erhältlich (del Alamo-Sanza et al. 2015). Die wenigen bisher publizierten Ergebnisse zu dieser Technik legen den Schluss nahe, dass durch die Verwendung von Reifetanks bezüglich der Farbstabilität ähnliche Effekte erzielt werden können, wie mittels klassischer Mikrooxygenierung (Nguyen et al. 2010), dass jedoch bezüglich der Entwicklung des Aromaprofils Unterschiede bestehen (Durner 2011). In einer weiteren Publikation zeigte sich, dass der Sauerstoff in Reifetanks, ähnlich wie bei Holzfässern, nicht homogen verteilt ist, sondern dass eine Anreicherung in der Nähe des Spundlochs und der Tankwände auftritt. Auch in diesen Versuchen waren Unterschiede in Geruch und Geschmack zwischen den in Reifetanks und mit Eichenholzchips gelagerten und den zur Kontrolle in Barriques gelagerten Weinen festzustellen (del Alamo-Sanza et al. 2015).

2.9.3.4 Elektrochemische Mikrooxygenierung (ElMOX)

Sauerstoff führt im Wein in erster Linie zur Bildung von Wasserstoffperoxid. Dieses hochreaktive Molekül oxidiert nicht nur Ethanol zu Acetaldehyd, sondern je nach Reaktivität auch alle anderen oxidierbaren Stoffe im Wein. Bei einer elektrochemischen Oxidation hingegen wird kein Wasserstoffperoxid gebildet. Stattdessen kann Ethanol direkt, durch Abgabe zweier Elektronen und zweier Protonen an einer elektrischen Anode zu Acetaldehyd oxidiert werden. An der Kathode werden die Protonen zu geringen Mengen elementaren Wasserstoffs reduziert. Die Elektrodenspannung wird so gewählt, dass Stoffe. die ein geringeres Redoxpotential besitzen als das System Ethanol/Acetaldehyd, nicht oxidiert werden. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht in der Vermeidung von Sauerstoffdepots, die nach dem Ende der Anwendung zu einer Überoxidation führen könnten. Versuche zu der als ELMOX bezeichneten Technik wurden bisher nur von Fell et al. (2007) publiziert, außerdem wurde ein ähnliches Verfahren bereits zuvor patentiert (Guglielmi und Simoncelli 2002). Fell et al. (2007) nutzen für ihre Versuche als Anode Glaskarbonelektroden, als elektrische Kathode diente der Edelstahltank selbst. Die Autoren beobachteten eine zur Mikrooxygenierung mit Sauerstoff vergleichbare Zunahme der SO₂-stabilen Pigmente, gleichzeitig jedoch eine höhere Konzentration von Acetaldehyd und in Verbindung damit auch einen höheren SO₂-Bedarf (Fell et al. 2007, Dykes 2008). Dies und die Tatsache, dass die erforderliche Ausrüstung nicht kommerziell angeboten wird, haben dazu geführt, dass das Verfahren in der Praxis bisher keine Anwendung findet.

2.9.4 Temperatur und pH Wert

Die Mikrooxygenierung sollte bei einer Weintemperatur von etwa 15 °C erfolgen. Niedrigere Temperaturen erhöhen die Löslichkeit von Sauerstoff im Wein und verhindern die Reaktion mit Weininhaltsstoffen, wodurch es zur unerwünschten Akkumulation von Sauerstoff kommt. Bei höheren Temperaturen sinkt die Löslichkeit des Sauerstoffs erheblich, was einerseits eine effektive Wirkung des Sauerstoffs verhindert und andererseits die Gefahr der Bildung von Sauerstoffdepots im Kopfraum des Gebindes erhöht (Gómez-Plaza und Cano-López 2011). Acetaldehyd kann sich bei zu hohen Temperaturen, wie andere Aromastoffen auch, verflüchtigen. Bei höheren Temperaturen steigt zudem die Gefahr mikrobiologischer Infektionen und damit das Risiko der Bildung flüchtiger Säure, *Brettanomyces*-Fehltönen und anderer Weinfehler (Hamatschek 2015).

Der pH Wert beeinflusst den Umsatz des molekular gelösten Sauerstoff in Wasserstoffperoxid und die Bildung von Acetaldehyd aus Ethanol (Danilewicz 2012). Außerdem erhöht sich der Anteil des als reaktives Carbokation vorliegenden Acetaldehyds bei niedrigem pH erheblich. Aus diesem Grund wurde beobachtet, dass der Effekt der Mikrooxygenierung auf die Bildung ethyliden-verbrückter Anthocyan-Flavanol Dimere und Vitisin B sowie auf die Farbintensität bei pH 3,1 größer ist, als bei pH 3,9 (Kontoudakis et al. 2011).

2.9.5 Einfluss auf die Weinfarbe

Viele Publikationen zeigen, dass der Zusatz von Sauerstoff zum Wein zu einer Erhöhung der Farbintensität oder zumindest zu einer Stabilisierung der Weinfarbe gegenüber der Bleichung durch SO₂ führt. Meist ist dies verbunden mit der Abnahme monomerer Anthocyane und der Zunahme der nicht durch SO₂ bleichbaren polymeren Pigmente (Gómez-Plaza und Cano-López 2011, Anli und Cavuldak 2012). Dafür ist in erster Linie die Bildung ethyliden-verbrückter Pigmente verantwortlich, die aus der Reaktion von Acetaldehyd, Anthocyanen und Flavanolen bzw. Proanthocyanidinen entstehen. Sauerstoff fördert die Reaktion, da er über Zwischenschritte Ethanol zu Acetaldehyd oxidiert (Atanasova et al. 2002a, Cano-López et al. 2006, Cano-Lopez et al. 2007). Acetaldehyd kann mit Anthocyanen jedoch auch zu Vitisinen des B-Typs oder mit Flavanolen und Anthocyanen zu Vinylflavanol-Addukten reagieren. In beiden Fällen

entstehen orange-farbene Reaktionsprodukte, die zur Bräunung der Weine beitragen können (Atanasova et al. 2002a).

Eine weitere Klasse von gelb-braunen Pigmenten im Wein sind Xanthyliumionen (Jurd und Somers 1970). Sie entstehen unter anderem aus Flavanolen und Glyoxalsäure (Es-Safi et al. 1999d). Da Glyoxalsäure durch Oxidation der Weinsäure entsteht (Clark und Scollary 2003), könnte die Mikrooxygenierung diese Reaktion ebenfalls fördern. Obwohl Xanthyliumionen bisher eher im Zusammenhang mit der Bräunung von Weißweinen untersucht wurden (Barril et al. 2012), ist ein Einfluss auf die Farbe von Rotwein unter den oxidativen Bedingungen während der Mikrooxygenierung nicht auszuschließen.

Die Mikrooxygenierung führte zwar bei der Mehrzahl der bisherigen Publikationen zu einer höheren Farbintensität und zu rot-violetten Farbtönen (Anli und Cavuldak 2012), doch einige Autoren berichten auch von negativen Auswirkungen des Sauerstoffs auf die Weinfarbe. In Untersuchungen von del Carmen Llaudy et al. (2006) nahm die Farbintensität von Cabernet Sauvignon Rotweinen nach 3-monatiger Mikrooxygenierung mit einer Sauerstoffdosage von 3 mg/L/Monat ab. Allerdings werteten die Autoren den Zusatz von Sauerstoff dennoch als Erfolg, da die sensorisch wahrgenommene trockene Adstringenz des Weines signifikant verringert werden konnte (del Carmen Llaudy et al. 2006). Parpinello et al. (2012) beobachteten, ebenfalls bei Cabernet Sauvignon, eine Zunahme der Farbintensität, aber auch eine Veränderung der Farbqualität hin zu bräunlicheren Nuancen. Zugleich wurde der mikrooxygenierte Wein von Verbrauchern gegenüber der nicht-mikrooxygenierten Variante aufgrund der größeren Komplexität bevorzugt (Parpinello et al. 2012). In einer Studie von de Beer et al. (2008) führte die Mikrooxygenierung von Weinen der Rebsorte Pinotage mit 5 mg O₂/L/Monat über einen Zeitraum von 6 Monaten zwar zu einer intensiveren Weinfarbe, allerdings wurde die Gesamtqualität des Weines durch ein geschultes Sensorikpanel gegenüber der Kontrolle als geringer beurteilt. Als Grund hierfür wurde eine zu lange und insgesamt zu hohe Sauerstoffdosage in Verbindung mit einem niedrigen Flavanolgehalt genannt (de Beer et al. 2008). Auch Durner et al. (2010b) konnten bei einigen Weinen eine Abnahme von Farbintensität messen, während bei anderen wiederum eine starke Farbzunahme gemessen wurde. Hier wurde ebenfalls eine ungünstige Zusammensetzung des Polyphenolprofils verantwortlich gemacht (Durner et al. 2010b).

Das Verhältnis von Anthocyanen zu Flavanolen bzw. Tanninen scheint dabei entscheidend zu sein. Ist die Konzentration von Tanninen und Flavanolen zu gering, reagieren die Anthocyane mangels anderer Reaktionspartner bevorzugt mit sich selbst, was zu einer geringeren Farbintensität führen sollte (Fulcrand et al. 2004). Aus reaktionskinetischen Gründen sollte bei einer überschüssigen Anthocyan-Konzentration die Tendenz zur Bildung von Vitisin B gegenüber ethyliden-verbrückten Anthocyan-Flavanol-Dimeren erhöht sein. Da es sich bei Vitisin B zwar um ein stabiles, im Farbton jedoch orange-braunes Pigment handelt, ist eine zu geringe Tannin- bzw. Flavanolkonzentration zu vermeiden.

Liegen umgekehrt zu viele Tannine und Flavanole vor, führt dies bevorzugt zur Bildung von Tannin-Tannin Addukten, was die Neigung zur Braunfärbung erhöht und negative Auswirkungen auf das Geschmacksbild haben kann. Liegt hingegen ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Anthocyanen und Tanninen vor, sollte die Ausbeute an farbstabilen Tannin-Anthocyan-Addukten und damit der Effekt auf die Farbintensität des Weine am größten sein (Fulcrand et al. 2004, Durner 2011).

Nur wenige Publikationen geben bisher Aufschluss, bei welchem Tannin-Anthocyan-Verhältnis (TAV), bzw. bei welchem Flavanol-Anthocyan-Verhältnis (FAV) durch Sauerstoffzusatz die höchsten Steigerungen der Farbintensität zu erwarten sind. Untersuchungen von Picariello et al. (2017) ergaben, dass die Zunahme der Farbintensität unter oxidativen Bedingungen umso größer ist, je größer das TAV ist. Die Berechnung des TAV erfolgte in dieser Publikation aus den Konzentrationen der Anthocyane (quantifiziert mittels HPLC) und der Tannine (bestimmt mittels Protein-Fällung), berechnet jeweils in mg/L. Das größte in dieser Studie untersuchte TAV lag bei 3:1. Durner (2011) hingegen berichtet, dass das FAV eines für die Mikrooxygenierung geeigneten Weines zwischen 0,5 und 0,6 liegt. Das FAV wurde hier aus den Konzentrationen der Anthocyane und der Summe aus Catechin und Epicatechin (Flavanole) in mg/L berechnet, wobei alle Parameter mittels HPLC bestimmt wurden. Da der Flavanol- und der Tanningehalt in Rotwein nicht unbedingt miteinander korrelieren, ist eine Umrechnung zwischen FAV und TAV nicht möglich.

Unabhängig vom Polyphenolprofil neigen Moste und Weine immer dann zur Bräunung, wenn die zu den Polyphenoloxidasen zählenden Laccasen anwesend sind. Diese Enzyme stammen aus dem Pilz *Botrytis cinerea* und können unter Anwesenheit von Sauerstoff mit hohen Umsatzraten Polyphenole zu Chinonen oxidieren (Dubernet et al. 1977). Laccasen sind, verglichen mit den Traubeneigenen Polyphenoloxidasen, weit effektiver und toleranter gegenüber niedrigen pH-Werten, Alkohol und SO₂ (Ribéreau-Gayon et al. 2006a). Rotweine aus *Botrytis*-belastetem Lesegut dürfen deshalb keinesfalls mikrooxygeniert werden, da dies innerhalb kürzester Zeit zur Bräunung und großen Farbverlusten führen würde. Die einzige Möglichkeit Laccasen effektiv zu zerstören ist eine thermische Denaturierung dieser Enzyme, die oberhalb von 60 °C stattfindet (Dubernet et al. 1977). Maischeerhitzte Weine können daher in aller Regel auch bei einem *Botrytis*-Befall der Trauben mikrooxygeniert werden.

2.9.6 Einfluss auf den Geschmack

Der Geschmack eines Weines wird von den Eindrücken süß, sauer und bitter bestimmt. Beim Rotwein kommt die Adstringenz hinzu, ein taktiler Reiz, hervorgerufen durch die im Rotwein enthaltenen Tannine, die die Proteine des Mundspeichels ausfällen (Breslin et al. 1993, Fischer und Noble 1994). Ohne die gleitende Wirkung dieser Proteine entstehen zwischen Zunge und Gaumen eine erhöhte Reibung und ein Gefühl der Trockenheit, die als Adstringenz bezeichnet werden. Je nach Struktur des Tannins, können unterschiedliche Ausprägungen der Adstringenz auftreten. Gawel et al. (2000) unterscheiden beispielsweise 33 Unterarten der Adstringenz, die in sieben Kategorien eingeteilt werden. Da einige dieser Unterarten, wie z.B. seidig, satinartig, samtig und veloursartig sehr ähnlich sind, können sie mitunter von sensorischen Prüfern nur schwer unterschieden werden (King et al. 2003). Zudem erfordert die Untergliederung in eine so große Anzahl von unter-Attributen einen hohen zeitlichen Aufwand in der Vorbereitung und der Durchführung der sensorischen Analyse. In vielen Publikationen werden daher vereinfachte Konzepte angewendet, z.B. als Unterscheidung zwischen austrocknend, zusammenziehend und aufrauend (Cliff et al. 2007), samtig, austrocknend, hart, unreif, dynamisch, persistent (Ferrer-Gallego et al. 2014) oder die Differenzierung erfolgt über die Beschreibung als grüne, weiche, harte und trockene Tannine (González-Sanjosé et al. 2008, Durner et al. 2010b). Die verschiedenen Arten von Adstringenz werden durch unterschiedliche Tannine bzw. Polyphenole hervorgerufen, die sich zusätzlich auch in ihrer Bitterkeit unterscheiden. Flavanole und kurzkettige Proanthocyanidine schmecken bitter und wenig adstringent, während die längerkettigen polymeren Proanthocyanidine

weniger bitter dafür stärker adstringent schmecken (Arnold et al. 1980, Robichaud und Noble 1990, Hufnagel und Hofmann 2008). Es konnte in mehreren Publikationen eine Korrelation zwischen der Größe des Proanthocyanidins und der Intensität der Adstringenz festgestellt werden (Peleg et al. 1999, Vidal et al. 2003, Sun et al. 2013).

Proanthocyanidine schmecken außerdem bitterer, wenn sie mit Gallussäure verestert sind. Die Verbindungen Epicatechingallat und Epigallocatechingallat schmecken bitterer als Epicatechin bzw. Epigallocatechin und werden von Verkostern im Geschmack als insgesamt unangenehmer empfunden (Narukawa et al. 2010). Für die Proanthocyanidine selbst liegen ähnliche Ergebnisse vor: So schmecken Tannine aus Traubenkernen, die einen hohen Anteil von Gallussäureestern aufweisen, deutlich bitterer als Tannine aus Traubenschalen, in denen kaum Gallussäureester vorkommen. (Prieur et al. 1994, Souquet et al. 1996, Brossaud et al. 2001). Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine hohe Anzahl von Gallussäureestern zu einer rauen, trockenen und kreidigen Adstringenz führen, während ein erhöhter Anteil des in Traubenschalentannin vorkommenden Epigallocatechin zu einem weicheren Geschmackseindruck führt (Vidal et al. 2003).

Sauerstoff wirkt sich auf die Größe und die Zusammensetzung der Proanthocyanidine und damit auf die Bitterkeit und die Adstringenz eines Weines aus. Während der Reifung und Lagerung von Wein verändern sich, ob mit oder ohne Sauerstoff, die Zusammensetzung und die Länge der Proanthocyanidine. Vidal et al. (2002) konnten zeigen, dass die Kettenlänge von Proanthocyanidinen während der Lagerung in Modellwein im Mittel abnimmt. Als Grund für diese Beobachtung wurde vor allem die säurekatalysierte Spaltung der Proanthocyanidine genannt. Gleichzeitig spielen jedoch auch oxidative Prozesse eine Rolle, wie McRae et al. (2015) darlegten. In ihren Versuchen nahm der mittlere Polymerisationsgrad (mDP) der Proanthocyanidine während der Fasslagerung unter Sauerstoffzugabe stärker ab als unter strikt reduktiven Bedingungen. Unabhängig vom vorherigen Sauerstoffzusatz konnte während der Flaschenlagerung in beiden Weinen eine weitere Abnahme des mDP gemessen werden, für die nun wiederum säurekatalysierte Prozesse verantwortlich gemacht werden (McRae et al. 2015).

Diese Beobachtungen stehen auf den ersten Blick im Widerspruch zu Ergebnissen, nach denen Flavanole bei Anwesenheit von Acetaldehyd mit anderen Flavanolen oder Proanthocyanidinen Ethylidenbrücken ausbilden können und somit zu einer Erhöhung der Kettenlänge führen sollten (Fulcrand et al. 1996b). Der Anteil an Ethylidenbrücken im Verhältnis zu direkten Interflavanbindungen betrug bei jungen Rotweinen jedoch weniger als 1,3 % (Drinkine et al. 2007b).

Obwohl die Geschwindigkeit der Bildung von Ethylidenbrücken offenbar langsamer ist, als die der säurekatalytischen Spaltung der Interflavanbindungen (Drinkine et al. 2007a), kann sie möglicherweise zu einer Verbesserung der sensorischen Eigenschaften beitragen. Die Ergebnisse von Vidal et al. (2004a) deuten darauf hin, dass ethylidenverbrückte polymere Flavanole ähnliche sensorische Eigenschaften haben wie Proanthocyanidine. Wenn Ethylidenbrücken Verringerung einer des Polymerisationsgrades der Proanthocyanidine entgegenwirken, sollte dies insgesamt zu einer geringeren Bitterkeit und einer stärkeren Adstringenz des Weines führen. Bei einer übermäßigen Sauerstoffzufuhr kann es zu einer starken Polymerisation der Proanthocyanidine und so zur Ausbildung einer unangenehmen und sehr trockenen Adstringenz kommen (Parish et al. 2000). Andere Autoren berichten, dass es bei einer fortschreitenden Polymerisation zu einer Verringerung der Löslichkeit und einem Ausfallen eines Teils der Proanthocyanidine kommt (Tanaka et al. 1994, Es-Safi et al. 1999b). Versuche zur Mikrooxygenierung mit stark adstringierenden Weinen zeigten, dass der Einsatz von Sauerstoff über diesen Mechanismus tatsächlich eine signifikante Verringerung der trockenen Adstringenz bewirken kann. Durch eine auf Proteinfällung basierenden Analyse wurde dabei zugleich bestätigt, dass sich der messbare Tanningehalt durch die Mikrooxygenierung reduzierte (del Carmen Llaudy et al. 2006).

Untersuchungen von Weber et al. (2013) bieten noch eine weitere Erklärung, warum der Sauerstoffeintrag zu einer Abnahme der Adstringenz führt: Die sensorische Bewertung isolierter und fraktionierter Rotweinpolyphenole zeigte, dass ethyliden-verbrückte Anthocyan-Proanthocyanidin Addukte sensorisch eine geringere Adstringenz aufweisen, als reine Proanthocyanidine vergleichbarer Polymergröße Die Verknüpfung von Anthocyanen mit Flavanolen und Proanthocyanidinen ist somit offenbar nicht nur bezüglich der Farbstabilität, sondern auch für den Geschmackseindruck des Rotweines vorteilhaft.

Weitere Mechanismen, über die der Sauerstoff auf das Geschmacksbild eines Weines wirken kann, werden in der Literatur gegenwärtig diskutiert. Schon lange ist bekannt, dass oxidative Bedingungen die Bildung des Grape-Reaction-Products (GRP), eines Adduktes aus dem Tripeptid Glutathion und Caftarsäure, in Modellwein fördern (Rigaud et al. 1991). Neuere Untersuchungen konnten nun belegen, dass eine Erhöhung der GRP-Konzentration zur Verringerung der Adstringenz und einer gleichzeitigen Intensivierung des Attributes "Oily mouthfeel", das hier am ehesten mit "Cremigkeit" übersetzt werden kann, führt (Gawel et al. 2014). Caftarsäure hingegen, das Edukt von GRP, wirkt adstringent (Hufnagel und Hofmann 2008) Auf die Bitterkeit haben offenbar weder GRP noch Caftarsäure einen Einfluss, obwohl in älteren Publikationen von einer erheblichen Bitterkeit der Caftarsäure berichtet wurde (Gawel et al. 2014). Dies würde bedeuten, dass die Bildung von GRP aus Caftarsäure zur Verringerung der Adstringenz und der Bitterkeit durch den Sauerstoffeinfluss führen könnte. Weitere Überlegungen wurden dahingehend angestellt, dass die durch Oxidation aus Polyphenolen gebildeten Phenole mit bitter schmeckenden Aminosäuren reagieren und über diesen Reaktionsweg die Bitterkeit von Weinen ebenfalls verringert werden kann (Day et al. 2015).

2.9.7 Einfluss auf das Aromaprofil

Sauerstoff führt in ungeschwefelten Weinen über die Fenton-Reaktion immer zur Zunahme von freiem Acetaldehyd. Als flüchtige Verbindung trägt es dabei auch zum Weinaroma bei. In niedrigen Konzentrationen erinnert sein Geruch an überreife Äpfel, in höheren Konzentrationen riecht es dagegen stechend und verleiht dem Wein ein typisches oxidatives Aroma. Somit ist Acetaldehyd als Aromastoff eher negativ zu bewerten. Da es sehr stark an SO₂ bindet, kann ein solcher Mangel durch Schwefelung des Weines bedingt behoben werden (Ribéreau-Gayon et al. 2006b).

oxidationsempfindlichen Die sulfidischen Aromastoffe nehmen durch einen Sauerstoffeintrag in der Regel ab. Zur Entfernung unerwünschter Gärungsnebenprodukte, die nach faulen Eiern, gekochtem Kohl, Zwiebeln, verbranntem Gummi oder ähnlichem riechen, wird Sauerstoff daher gezielt eingesetzt. Nguyen et al. (2010) zeigten, dass durch Anwendung der Mikrooxygenierung die Konzentration der unerwünschten Sulfide Methanthiol und Dimethyldisulfid gegenüber einer Kontrollvariante signifikant reduziert werden konnte. Diese Ergebnisse wurden teilweise durch Fedrizzi et al. (2011) bestätigt. Beide Publikationen zeigen, dass die Oxidation der Thiole nicht, wie häufig vermutet, zur Bildung von Disulfiden führt, da deren Konzentration in den Versuchen ebenfalls abnahm. Stattdessen entstehen vermehrt S-Oxide, wie Dimethylsulfoxid oder Methionol-S-oxid (Fedrizzi et al. 2011).

61

Neben diesen unerwünschten Aromen, gibt es aber auch eine Reihe von schwefelhaltigen Aromastoffen, wie 3-Mercaptohexan-1-ol (3MH), 3-Mercaptohexan-1-ol-acetat (3MHA) oder 4-Mercapto-4-methylpentan-3-on (4MMP), die angenehm nach exotischen Früchten oder Cassis riechen und die im Wein erhalten bleiben sollen. Während Sauerstoff bei Nguyen et al. (2010) keinen Einfluss auf die Konzentration des nach Passionsfrucht riechenden 3-Mercaptohexanol hatte, fanden Coetzee et al. (2013) bei einem Sauvignon blanc, dass der Gehalt dieses Thiols unter dem Einfluss von Sauerstoff und in Abwesenheit von SO₂ deutlich abnahm. Ähnliche Beobachtungen wurden in einer anderen Publikation auch für Rotwein beschrieben (Blanchard et al. 2004). Es ist somit davon auszugehen, dass ein Sauerstoffeintrag allgemein zur Oxidation von positiven wie negativen schwefelhaltigen Aromastoffen beitragen kann.

Im Wein vorkommende Fettsäuren, Estern und Fuselalkohole können ebenfalls oxidiert werden. Auch hier wurden teilweise widersprüchliche Ergebnisse publiziert. Ortega-Heras et al. (2008) beobachteten während der Mikrooxygenierung eine Abnahme von Estern und eine Zunahme der Konzentration der Fuselakohole, die teilweise Produkte aus der Esterspaltung waren. Die Konzentration der Fettsäuren erhöhte sich in diesen Versuchen ebenfalls. In anderen Publikationen führte der Eintrag von Sauerstoff während der Füllung zu einer signifikanten Abnahme von Estern, Fettsäuren und Fuselalkoholen (Ferreira et al. 1997, Carrascon et al. 2015). Als Ursachen dafür wurden die Oxidation, als auch die Verflüchtigung dieser Verbindungen genannt. Da die Fettsäuren aufgrund ihrer grasigen oder animalischen Noten sensorisch im Wein nur bedingt erwünscht sind, würde sich der Sauerstoff diesbezüglich positiv auswirken. Im gleichen Versuch nahmen auch die Konzentrationen von β-Damascenon und E-Whiskylacton ab, die das Aroma eines Weines positiv beeinflussen. Die Konzentrationen von Isoeugenol, Vanillin, Benzaldehyd und anderen Aromastoffen nahmen durch die Wirkung des Sauerstoffs hingegen zu und sind sehr wahrscheinlich Reaktionsprodukte aus der Oxidation von Polyphenolen (Ferreira et al. 1997, Schmarr et al. 2010, Carrascon et al. 2015).

Wird dem Wein ein erheblicher Überschuss an Sauerstoff zugesetzt, so kann dies zu Oxidationsaromen führen, die weder durch eine SO₂-Gabe noch durch andere Maßnahmen zu beheben ist. Verursacht wird dieser Weinfehler vor allem durch die in Abbildung 2-28 gezeigten Verbindungen. Methional, Phenylacetaldehyd, 2-Methylpropanal und 3-Methylbutanal entstehen dabei über den Strecker-Abbau von Aminosäuren. Dieser kann durch die Anwesenheit von ortho-Dicarbonylverbindungen

aus der Oxidation von Polyphenolen gefördert werden. Ein zweiter Bildungsmechanismus ist die Oxidation von Fuselalkoholen, wie Phenylethanol oder Methionol zu den entsprechenden Aldehyden. Tatsächlich scheinen beide Bildungswege eine Rolle zu spielen (Escudero et al. 2000b). Mehrere Studien deuten außerdem darauf hin, dass Methional und Phenylacetaldehyd zwei der wichtigsten Verbindungen für oxidative Aromen von Rot- und Weißweinen sind (Escudero et al. 2000b, Aznar et al. 2003, Silva Ferreira et al. 2003).

Sotolon entsteht aus der Reaktion von Acetaldehyd mit α-Ketobuttersäure. In geringen Konzentrationen riecht die Verbindung karamellartig, in höheren Konzentrationen jedoch nach Liebstöckel oder Sojasauce. Sotolon entsteht, wenn Wein längere Zeit oxidativen Bedingungen und damit hohen Konzentrationen von Acetaldehyd ausgesetzt ist und trägt zum charakteristischen Aroma von Sherry und Portwein bei (Escudero et al. 2000a).

Bei 3-Methyl-2,4-nonandion und anderen Verbindungen ist der Bildungsmechanismus im Wein noch wenig erforscht. Der nach Heu oder verbranntem Karamell riechende Aromastoff ist als off-flavour Komponente in anderen Lebensmitteln bekannt und wird dort unter oxidativen Bedingungen und Lichteinfluss aus Fettsäuren synthetisiert. 3-Methyl-2,4-nonandion kann wiederum zu anderen Fehlaromen abgebaut werden (Sigrist et al. 2003).



Sotolon

3-Methyl-2,4-nonandion

Abbildung 2-28: Die wichtigsten, für Oxidationstöne im Wein verantwortlichen Verbindungen nach Ugliano (2013).

2.9.8 Einsatzzeitpunkt während der Weinbereitung

Prinzipiell werden drei Einsatzzeitpunkte für die Mikrooxygenierung diskutiert: Der Sauerstoff kann entweder während oder nach der alkoholischen Gärung zugesetzt werden. Ist letzteres der Fall, kann der Sauerstoffzusatz wiederum vor oder nach dem biologischen Säureabbau erfolgen, wobei beide Vorgehensweisen Vor- und Nachteile aufweisen.

Allgemein gilt: je früher der Sauerstoffzusatz erfolgt, desto effektiver ist die farbstabilisierende Wirkung (Ribéreau-Gayon et al. 1983). Diese praktische Beobachtung ist darin begründet, dass zu einem frühen Zeitpunkt noch viele monomere Anthocyane vorliegen die zu Polymeren Pigmenten reagieren können. Anthocyane, die bereits über Interflavanbindungen mit Proanthocyanidinen verknüpft sind, haben eine geringere Reaktivität und entsprechend ist die farbvertiefende Wirkung des Sauerstoffs geringer (Cano-López et al. 2006). Aus diesem Grund sollte die Mikrooxygenierung während der Gärung besonders effektiv sein, weil dann noch alle Anthocyane als Monomere vorliegen und zu farbintensiven ethyliden-verbrückten Pigmenten reagieren können. Durch den Sauerstoff gebildete, überschüssige Mengen Acetaldehyd, können gegen Ende der Gärung durch die Hefen oder später während des biologischen Säureabbaus durch die Milchsäurebakterien abgebaut werden (Ribéreau-Gayon et al. 2006a). Die Gefahr der Bildung oxidativer Noten oder eines erhöhten SO₂-Bedarfs ist somit bei einem Sauerstoffeinsatz während der Gärung am geringsten.

Erfolgt die Mikrooxygenierung bereits während der Gärung, fördert dies auch die Hefevermehrung. Da Hefen für die Lipidsynthese Sauerstoff benötigen, begünstigt die Mikrooxygenierung den Membranaufbau und die Zellteilung und führt so zu einer zügigen und sicheren Gärung. Weiterhin verbessert eine erhöhte Sauerstoffkonzentration der Maische die Alkoholtoleranz und die Fähigkeit der Hefen zur Stickstoffaufnahme (Salmon et al. 1998, Valero et al. 2001, Salmon 2006). Letzteres kann die Gefahr der Böckserbildung erheblich verringern (Gómez-Plaza und Cano-López 2011), wobei wahrscheinlich auch die Oxidation der Sulfide hier eine entscheidende Rolle spielt (Bekker et al. 2016).

Da während der Gärung gebildetes CO₂ das in Lösung gehen des Sauerstoffs verringert, wird meist eine höhere Sauerstoffdosage eingesetzt als bei der Mikrooxygenierung nach der Gärung. Nimmt die Gärintensität ab, verringert sich der Effekt entsprechend, sodass gegen Ende der Gärung die Sauerstoffdosage zügig verringert oder vollständig gestoppt werden muss, um eine Überoxidation zu vermeiden (Durner 2011). Dies mögen einige Gründe sein, warum ein Sauerstoffzusatz während der alkoholischen Gärung trotz der genannten Vorteile in der Forschung kaum Anwendung findet, wie ein Review von Anli und Cavuldak (2012) zeigt. Ferner erscheint auch die sensorische Kontrolle während einer Mikrooxygenierung in diesem frühen Stadium der Weinbereitung schwierig.

Eine Mikrooxygenierung vor dem biologischen Säureabbau, auch als Makrooxygenierung oder im Englischen als "pre-MLF-MOX" bezeichnet (Durner 2011), wird in der Literatur von den meisten Autoren bevorzugt (Cano-López et al. 2006, Pérez-Magariño et al. 2007, Cano-López et al. 2008, Hernández-Orte et al. 2009, Durner et al. 2010b). Üblicherweise findet die Mikrooxygenierung direkt im Anschluss an die alkoholische Gärung statt, wenn noch möglichst viele Anthocyane als Monomere vorliegen. Außerdem ist der pH-Wert vor dem biologischen Säureabbau niedriger, was die Reaktivität von Acetaldehyd erhöht und sich somit positiv auf die Effektivität des Verfahrens auswirkt (Parish et al. 2000). Überschüssiges Acetaldehyd kann auch nach der pre-MLF-MOX noch durch Milchsäurebakterien der Gattungen Oenococcus und Lactobacillus verstoffwechselt werden. Ist die Acetaldehyd Konzentration jedoch zu groß, kann dies den BSA auch behindern, da dies das Wachstum der Bakterien hemmt (Osborne et al. 2006). Da Milchsäurebakterien unter Sauerstoffeinfluss bevorzugt Diacetyl und Acetoin bilden können (Nielsen und Richelieu 1999), sollte ein Sauerstoffzusatz nicht während des biologischen Säureabbaus stattfinden. Überdies sollte der Wein während einer pre-MLF-MOX regelmäßig auf entstehende Milchsäure untersucht werden. Beginnt der Äpfelsäureabbau spontan, sollte die Sauerstoffgabe unterbrochen werden um sie im Anschluss wieder fortzusetzen (Cano-López et al. 2006).

der biologische Säureabbau sehr langsam ablaufen kann, stellt er Da für Weinproduzenten ein Risiko dar, wenn er erst spät stattfindet und zugleich Termine für die Füllung und Vermarktung eingehalten werden müssen. In diesem Fall ist es sinnvoller, zuerst den BSA einzuleiten und anschließend den Sauerstoffzusatz durchzuführen ("post-MLF-MOX"). Der Wein kann dann, nach dem Ende der Sauerstoffgabe und einer kurzen Wartezeit, direkt geschwefelt, gefüllt und vermarktet werden. Nach einem post-MLF-MOX kann überschüssiges Acetaldehyd allerdings nicht mehr durch Milchsäurebakterien abgebaut werden. Daher sollten niedrigere Sauerstoffdosagen gewählt werden, um einen erhöhten SO2-Bedarf zu vermeiden. Trotz dieser Maßnahme kann die Konzentration gebundenen Acetaldehyds nach der Füllung etwas größer sein als bei Anwendung der pre-MLF-MOX (Durner et al. 2010b). Aufgrund des späteren Anwendungszeitpunkts ist außerdem ein geringerer Einfluss auf die Farbintensität und das Tanninprofil zu erwarten (Cano-López et al. 2006).

2.9.9 Mikrobiologische Risiken

Findet die Mikrooxygenierung während der Gärung statt, kann die erhöhte Sauerstoffkonzentration das Wachstum verschiedener nicht-Saccharomyces Hefen, wie z.B. Torulaspora delbrueckii oder Metschnikowia pulcherrima fördern (Day et al. 2015). Um unerwünschte Fehltöne zu vermeiden, sollte bei der Mikrooxygenierung während der Gärung unbedingt mit einer dominanten Reinzuchthefe vergoren werden. Obwohl ein trockener Wein nach dem biologischen Säureabbau als mikrobiologisch stabil gilt, können die aeroben Bedingungen während der Mikrooxygenierung grundsätzlich das Wachstum von Essigsäurebakterien und Brettanomyces-Hefen fördern (Du Toit und Pretorius 2002, Du Toit et al. 2005). Im Versuch zeigte sich tatsächlich ein geringfügiges Wachstum dieser Mikroorganismen, die jedoch durch eine anschließende SO₂-Gabe wirksam gestoppt werden konnte (Du Toit et al. 2006a). Eine prophylaktische Schwefelung vor der Mikrooxygenierung sollte nach Möglichkeit jedoch vermieden werden, da SO₂ dem Effekt des Sauerstoffs entgegenwirkt (Anli und Cavuldak 2012). Um das Risiko von Fehlaromen zu minimieren, sollte während der Mikrooxygenierung unbedingt eine regelmäßige sensorische und analytische Kontrolle auf flüchtige Säure und dem typisch nach Pferdeschweiß riechenden Brettanomyces-Ton erfolgen (Blaauw 2009).

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Reinheit / Konz.	Bezugsquelle
Acetaldehyd	99 %	Merck (Darmstadt)
Acetonitril	HPLC Gradient Grade	Bernd Kraft (Duisburg)
Acetonitril	HPLC-MS grade	Fisher Chemical (Schwerte)
Ameisensäure	98 %	Fluka (Steinheim)
Ammoniumsulfat	≥99,5 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Bovines Serum Albumin Fraction V	96 %	Merck (Darmstadt)
(+)-Catechin-Hydrat	\geq 98 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Catechin-ethyliden- Cyanidin-ethyliden-Catechin	89 % (520 nm)	zur Verfügung gestellt von Dr. Fabian Weber, TU Braunschweig
Caftarsäure	\geq 97 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Cyanidin-ethyliden-Catechin	94 % (520 nm)	zur Verfügung gestellt von Dr. Fabian Weber, TU Braunschweig
Eisen(III)Chlorid	97 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
(-)-Epicatechin	90 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Essigsäure	99,8 %	Applichem (Darmstadt)
Ethanol	99 %, 1 % MEK	Applichem (Darmstadt)
Iodid-Iodatlösung (Titrisol)	1/128 mol/L	Merck (Darmstadt)
Kaffeesäure	\geq 98 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumdihydrogenphosphat	\geq 98%	Applichem (Darmstadt)
Kaliumdisulfit	96 %	Applichem (Darmstadt)
Kaliumhydrogentartrat	98 %	Applichem (Darmstadt)
Maleinsäure	> 98 %	Fluka Analytical (Taufkirchen)
Malvidin-3-glucosid (Oenin)	91 %	Phytoplan (Heidelberg)
Malvidin-ethyliden-Catechin	97 % (520 nm)	zur Verfügung gestellt von Dr. Eva Schmalfuß, TU Braunschweig
Methanol	\geq 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	≥99,8 %	Applichem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	92-100%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumhydroxid (Plätzchen)	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Natronlauge	2 M	Applichem (Darmstadt)
Phosphorsäure	85 %	Applichem (Darmstadt)
Propionaldehyd	\geq 97 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Salzsäure	37 %	Applichem (Darmstadt)
Weinsäure	99,5 %	Applichem (Darmstadt)

3.2 Weine und Sauerstoffzusatz

3.2.1 Jahrgang 2013

Im Versuchsjahr 2013 wurden am DLR Rheinpfalz Weine der Rebsorten Trollinger und Spätburgunder hergestellt. Am Tag der Lese wurden Durchschnittsproben der Maische bzw. des Mostes entnommen und mittels Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie (WineScan, Foss, Hillerød, Dänemark) analysiert. Die Lesetermine und wichtige Reifeparameter sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

	Spätburgunder Trauben	Maischeerhitzter Spätburgunder Most	Maischeerhitzter Trollinger Most
Lesedatum	15.10.2013	12.10.2013	22.10.13
Herkunft	Pfalz	Württemberg	Württemberg
Mostgewicht [°Oe]	83	84	74
Gesamtsäure [g/l]	11,5	9,5	8,8
Red. Zucker [g/l]	190,0	195,3	163,5
Flüchtige Säure [g/l]	0,0	0,0	0,3
Gluconsäure [g/l]	0,0	0,0	0,1
pH-Wert	3,1	3,2	3,3
Anreicherung auf pot. Alkohol [g/l]	105	105	100

Tabelle 3-1: Erntetermine und Reifeparameter der verarbeiteten Trauben und Moste.

3.2.1.1 Maischegärung

Direkt nach der Lese der Spätburgunder-Trauben wurden diese entrappt und in drei 600 L Edelstahlbütten gefüllt. Zu jeder Bütte wurden 50 mg/l Kaliumdisulfit und 300 g/hl Eichenholzchips (4 mm, französisches Eichenholz, Medium Toast) zugegeben. Eine Bütte wurde für 7 Tage einer Kaltmazeration bei 4 °C unterzogen. Dafür wurde die Temperatur der Maische mittels Trockeneis (Icebitzzz Trockeneispellets, Linde, Pullach) auf 0 °C abgesenkt. Anschließend wurde die Maische im 4°C Kühlraum für 7 Tage gelagert. Die beiden anderen Chargen wurden am Tag der Lese mit 20 g/hl Reinzuchthefe (Lalvin ICV-D254, Lallemand, Montreal, Kanada) unter Zugabe von Hefenährstoff (30 g/hL GoFerm, Lallemand) beimpft. Bei einer der beiden Bütten betrug die Mazerationsdauer 7 Tage. Die Maische der anderen Bütte wurde 14 Tage mazeriert. Die kaltmazerierte Variante wurde nach 7-tägiger Kühlung auf 18 °C erwärmt, wie oben beschrieben mit 20 g/hl der gleichen Reinzuchthefe inokuliert und einer 7-tägigen Mazeration unterzogen. Alle Ansätze der Maischegärung fanden ohne aktive Gärkühlung bei 18 °C Raumtemperatur statt.

Nach dem Ende der Mazerationsdauer (7-tägige Mazeration, 14-tägige Mazeration oder 7-tägige Kaltmazeration + 7-tägige Mazeration) wurden die Maischen mittels einer Membranpresse abgepresst. Bis zum Abpressen wurde der Maischehut bei allen Varianten dreimal täglich untergestoßen. Nach dem Abpressen wurden die Jungweine in 500 L Edelstahltanks gepumpt und mit Starterkulturen (Uvaferm alpha, Lallemand, Montreal, Kanada) für den BSA inokuliert. Abbildung 3-1 gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau für den maischevergorenen Spätburgunder.



Abbildung 3-1: Versuchsaufbau für maischevergorenen Spätburgunder.

3.2.1.2 Maischeerhitzung

Die Herstellung der erhitzten Spätburgunder und Trollinger Moste wurde durch die Württembergische Weingärtner Zentralgenossenschaft e.G. durchgeführt. Dort wurden die eingemaischten Trauben in einer kontinuierlichen Maischeerhitzungsanlage kurzzeithocherhitzt (82 °C mit 2 min Heißhaltezeit). Zum Aufschluss der Maische wurden 3 ml/hl pektolytisches Enzym (Trenolin Frio DF, Erbslöh, Geisenheim) verwendet. Die Zugabe des Enzympräparats erfolgte nach Rückkühlung der Maische auf 40 °C. Nach einer Standzeit von 13 Stunden wurde die Maische mittels einer Membranpresse abgepresst. Der so erhaltene Most wurde anschließend im Versuchstechnikum des DLR Rheinpfalz in je drei 3501 Edelstahltanks gepumpt und mit 20 g/hl Reinzuchthefe (Mycoferm Cru 05, EverIntec, Pramaggiore, Italien) sowie eines Hefenährstoffs (30 g/hL GoFerm, Lallemand) gemäß den Herstellerangaben inokuliert. Anschließend wurden einem Tank 20 g/hl oenologische Tannine (UVATANN ST, EverIntec, Pramaggiore, Italien) und einem weiteren Tank 300 g/hl Eichenholzchips (evOAK, French Oak, medium toast level) hinzugefügt. Ein Tank wurde als Kontrolle ohne Zusatz von Tanninen oder Eichenholzchips vergoren. Die Gärung wurde mittels automatischer Gärsteuerungen (iFerm Solo, Liquosystems, Kirchheim/Neckar) und innenliegenden Edelstahl-Kühlschläuchen bei 19 °C durchgeführt. Am zweiten Gärtag fand die Beimpfung mit Starterkulturen (Extremo IT14, EverIntec, Pramaggiore, Italien) statt, um den Biologischen Säureabbau (BSA) simultan zur alkoholischen Gärung durchzuführen. Nach Abschluss der alkoholischen Gärung und des BSA wurden die Weine abgestochen und für die Mikrooxygenierung in 54 L Glasballons überführt. In Abbildung 3-2 ist der Versuchsaufbau für maischeerhitzten Spätburgunder und Trollinger im Überblick dargestellt.



Abbildung 3-2: Versuchsaufbau für maischeerhitzten Spätburgunder und Trollinger.

3.2.1.3 Sauerstoffgabe

Bei allen Weinen fand die Mikrooxygenierung jeweils nach Abschluss des biologischen Säureeabbaus statt. Der maischeerhitzte Spätburgunder wurde dazu in 16 Edelstahltanks mit 100 mm Innendurchmesser, 3200 mm Höhe und einem Volumen von je 100 L aufgeteilt. Die Mikrooxygenierung dieser Weine erfolgte mit reinem Sauerstoff (Linde Gase, Pullach, Deutschland), wobei als Dosiereinheit das Gerät Parsec SAEn 4000 (Thonhauser, Perchtoldsdorf, Österreich) zum Einsatz kam. Für die maischeerhitzten Weine wurden 16 Glasballons mit einem Volumen von 54 L als Gebinde eingesetzt. Die Mikrooxygenierung fand hier mit Druckluft (Linde Gase, Pullach, Deutschland) anstelle von Sauerstoff statt. Als Dosiereinheit diente hier das Gerät VinO2 (Ever s.r.l., Pramaggiore, Italien).

Um den Sauerstoff bzw. die Druckluft in möglichst kleinen, gut löslichen Gasblasen in den Wein einzubringen, wurden für alle Versuche Edelstahlfritten der Firma Thonhauser mit Keramikscheibe verwendet (Dicke 2 mm, Durchmesser 18 mm, Porengröße 0,05 μ m). Die Sauerstoffgabe erfolgte entsprechend der nachfolgend gezeigten Schemata und in doppelter Versuchswiederholung.



Abbildung 3-3: Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung des maischeerhitzten 2013er Spätburgunder Rotwein, Versuchsdauer: 80 Tage. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung.



Abbildung 3-4: Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung des maischeerhitzten 2013er Trollinger Rotwein, Versuchsdauer: 45 Tage. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung.



Abbildung 3-5: Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung des maischevergorenen 2013er Spätburgunder Rotwein, Versuchsdauer: 60 Tage. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung.

3.2.2 Jahrgang 2014

3.2.2.1 Maischevergorene Spätburgunder

Im Versuchsjahr 2014 wurden im Versuchstechnikum des DLR Rheinpfalz aus demselben Lesegut zwei verschiedene maischevergorene Spätburgunder Rotweine hergestellt. Hierfür wurden 700 kg handgelesene Trauben entrappt und gleichmäßig auf acht temperierbare Edelstahl-Fermenter aufgeteilt. Zum Zweck der Maischebewegung waren je vier mit Überschwallvorrichtung und vier mit Airpushanlage ausgestattet, die ein unterschiedliches Extraktionsverhalten bewirken sollten. Während die Maische beim Überschwallverfahren durch regelmäßiges Umpumpen von unten nach oben durchmischt wurde, erfolgte die Maischebewegung beim Airpushverfahren durch das stoßartige Einblasen gereinigter Druckluft in den unteren Teil des Fermenters. Die so bewirkte schlagartige Entbindung von CO₂ führt dabei zur Maischeumwälzung. Allen Fermentern wurden 300 g/hL Eichenholzchips (evOAK, French Oak, medium toast level) zugesetzt. Danach wurden die Maischen mit Reinzuchthefen (Lalvin ICV-D254, Lallemand) unter Zusatz eines Hefenährstoffs (30 g/hL GoFerm, Lallemand) nach Herstellerangabe beimpft und nach einer Gärdauer von insgesamt 5 Tagen bei 28 °C abgepresst. Die vier Weine aus den Fermentern mit Überschwallvorrichtung vereinigt, ebenso die vier Weine aus den Fermentern mit Airpush-Verfahren. Unmittelbar nach dem Abpressen wurde durch den Zusatz von Milchsäurebakterien (Uvaferm beta, Lallemand) der Biologische Säureabbau eingeleitet. Die Stammdaten der Weine sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Anbaugebiet	Pfalz
Lesedatum	25.09.2014
Mostgewicht	88 °Oe
Anreicherung	auf 105 g/L Alkohol
Maischebewegung	Überschwallverfahren bzw. Aipushverfahren (Druckluft)
Mazerationszeit	5 Tage bei 28 °C
Eichenholzchips	300 g/hL evOAK, French Oak, medium toast level
Hefe	Lalvin ICV-D254 (Lallemand)
Hefenährstoff	30 g/hL GoFerm (Lallemand)
BSA	Animpfen mit Uvaferm beta (Lallemand) am 29.09.2014

Tabelle 3-2: Stammdaten der maischevergorenen 2014er Spätburgunder Weine

3.2.2.2 Weitere Rotweine

Bei allen weiteren Rotweinen des Jahrganges 2014 erfolgte die Gärung nicht im Versuchstechnikum des DLR Rheinpfalz. Stattdessen wurden verschiedene Jungweine von Winzergenossenschaften aus den Anbaugebieten Baden und Württemberg zur Verfügung gestellt. Dadurch stand eine größere Vielfalt an Weinen zur Verfügung. Nach Ankunft im Versuchstechnikum wurde bei allen Weinen durch Zugabe von Reinkulturen ebenfalls der biologische Säureabbau eingeleitet. Die Stammdaten dieser Weine sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Anbaugebiet	Baden
Lesedatum	03.10.2014
Mostgewicht	92 °Oe
Anreicherung	auf 109 g/L Alkohol
Maischeerhitzung	85 °C; Rückkühlung auf 40 °C
Standzeit	6 h
Tanninzugabe	10 g/hL Fermotan (Fermol)
Hefe	20 g/hL Sihaferm Finesse red (Eaton)
Hefenährstoff	30 g/hL Ferm-Control (Heinemeyer)
Mazerationszeit	6 Tage bei 20 °C
BSA	Animpfen mit Uvaferm beta (Lallemand) am 14.10.2014

Tabelle 3-3: Stammdaten des maischeerhitzten 2014er Spätburgunders

Tabelle 3-4: Stammdaten des maischevergorenen 2014er Trollingers

Anbaugebiet	Württemberg
Lesedatum	29.09.2014
Mostgewicht	72 °Oe
Anreicherung	auf 80 g/L Alkohol
Maischebewegung	Überschwallverfahren mit 10% Saftabzug
Tannin	10g/hl VR Supra (Laffort); 20g/hl VR Color (Laffort)
Mazerationszeit	8 Tage
BSA	Animpfen mit Uvaferm beta (Lallemand) am 14.10.2014

Anbaugebiet	Württemberg
Lesedatum	06.10.2014
Mostgewicht	68 °Oe
Anreicherung	auf 105 g/L Alkohol
Maischeerhitzung	KZHE auf 82 Grad mit 2 min. Heißhaltezeit
Enzymbehandlung	2ml/hl Trenolin Thermo DF (Erbslöh)
Standzeit	11h
Mostvorklärung	Separiert und gekühlt
BSA	Animpfen mit Uvaferm beta (Lallemand) am 14.10.2014

Tabelle 3-5: Stammdaten des maischeerhitzten 2014er Trollingers

3.2.2.3 Sauerstoffgabe

Der Sauerstoffzusatz im Jahrgang 2014 erfolgte in den gleichen Gebinden und mit der gleichen technischen Ausstattung wie im Jahrgang 2013 (siehe Abschnitt 3.2.1.3). Die Sauerstoffgabe erfolgte entsprechend der nachfolgend gezeigten Schemata und in doppelter Wiederholung.



Abbildung 3-6: Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung der maischevergorenen 2014er Spätburgunder Versuchsdauer: 60 Tage. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung.



Abbildung 3-7: Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung des maischeerhitzten 2014er Spätburgunders, Versuchsdauer: 83 Tage. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung.



Abbildung 3-8: Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung der beiden 2014er Trollinger. Versuchsdauer maischevergoren: 60 Tage, Versuchsdauer maischeerhitzt: 82 Tage Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung.

3.2.3 Jahrgang 2015

Im Versuchsjahrgang 2015 wurden ausschließlich Rotweine von Genossenschaften, sowie dem Staatsweingut mit Johannitergut am Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz verwendet, um ein möglichst breites Spektrum verschiedener Weine zu erhalten. Zudem wurde die Mikrooxygenierung in diesem Versuchsjahr zusätzlich in einem 2000 L Edelstahltank und damit in einem realen Maßstab durchgeführt.

Anbaugebiet	Baden
Lesedatum	18.09.2015
Mostgewicht	95 °Oe
Anreicherung	-
Enzymbehandlung	2 g/100 kg Pektinase
Maischebewegung	Drucktank / Überschwallen
Tanninzugabe	3 g/100 kg ViniTannin SR (2b Ferm Control)
Hefe	25 g/hL Sihaferm Finesse red (Eaton)
Hefenährstoff	unbekannt
Mazerationszeit	7 Tage bei 26 °C
BSA	spontan

Tabelle 3-6: Stammdaten des maischevergorenen 2015er Spätburgunders 1 (Durbach)

Tabelle 3-7: Stammdaten des maischevergorenen 2015er Spätburgunders 2 (Sasbachwalden)

Anbaugebiet	Baden
Lesedatum	26.09.2015
Mostgewicht	102 °Oe
Anreicherung	-
Enzymbehandlung	10 g/hL Trenolin rouge DF (Erbslöh)
Maischebewegung	unbekannt
Tanninzugabe	10 g/hL VR Supra (Laffort)
Hefe	25 g/hL Siha 8 (Eaton)
Hefenährstoff	unbekannt
Mazerationszeit	5 Tage
BSA	SK 11 one Step (Erbslöh)

Anbaugebiet	Württemberg
Lesedatum	24.09.2015
Mostgewicht	93 °Oe
Anreicherung	auf 108 g/L Alkohol
Enzymbehandlung	2 g/hL Panzym Clair rapide G (Eaton)
Maischebewegung	unbekannt
Tanninzugabe	10 g/hL Oxitan
Hefe	25 g/hL Zymaflore RB2 (Laffort)
Hefenährstoff	20 g/hL SIHA Speedferm + 70 g/hL DAP (Eaton)
Mazerationszeit	9 Tage
BSA	unbekannt

 Tabelle 3-8: Stammdaten des maischevergorenen 2015er Spätburgunders 3 (Möglingen)

Tabelle3-9:Stammdatendesmaischevergorenen2015erSpätburgunders4(Neustadt a.d.W.)

Anbaugebiet	Pfalz
Lesedatum	17.09.2015
Mostgewicht	83 °Oe
Anreicherung	auf 105 g/L Alkohol
Maischebewegung	pneumatisch
Enzymbehandlung	-
Tanninzugabe	-
Hefe	25 g/hL Zymaflore X pure (Laffort)
Hefenährstoff	70 g/hL DAP
Mazerationszeit	7 Tage
BSA	spontan

(Sasbachwalaen)	
Anbaugebiet	Baden
Lesedatum	26.09.2015
Mostgewicht	102 °Oe
Anreicherung	-
Maischeerhitzung	KZHE auf 82 Grad mit 2 min. Heißhaltezeit
Enzymbehandlung	5 g/hL Trenolin Thermo DF (Erbslöh)
Standzeit	12 h
Tanninzugabe	10 g/hL VR Supra (Laffort)
Hefe	25 g/hL Oenoferm Be-Red (Erbslöh)
Hefenährstoff	unbekannt
BSA	SK 11 one Step (Erbslöh)

Tabelle 3-10: Stammdaten des maischeerhitzten 2015er Spätburgunders 1 (Sasbachwalden)

Tabelle 3-11: Stammdaten des maischeerhitzten 2015er Spätburgunders 2 (Möglingen)

Anbaugebiet	Württemberg
Lesedatum	30.09.2015
Mostgewicht	97 °Oe
Anreicherung	-
Maischeerhitzung	KZHE auf 82 Grad mit 2 min. Heißhaltezeit
Enzymbehandlung	3 g/hL Trenolin Thermo DF (Erbslöh)
Standzeit	12 h
Tanninzugabe	10 g/hL Oxitan
Hefe	20 g/hL Lalvin CLOS YSEO (Eaton)
Hefenährstoff	20 g/hL SIHA Speedferm + 70 g/hL DAP (Eaton)
BSA	unbekannt

Anbaugebiet	Wijrttemberg
Alloaugeolet	wurtteinberg
Lesedatum	30.09.2015
Mostgewicht	91 °Oe
Anreicherung	-
Maischeerhitzung	KZHE auf 82 Grad mit 2 min. Heißhaltezeit
Enzymbehandlung	3 g/hL Trenolin Thermo DF (Erbslöh)
Standzeit	12 h
Tanninzugabe	10 g/hL Oxitan
Hefe	20 g/hL Lalvin CLOS YSEO (Eaton)
Hefenährstoff	20 g/hL SIHA Speedferm + 70 g/hL DAP (Eaton)
BSA	unbekannt

Tabelle 3-12: Stammdaten des maischeerhitzten 2015er Lembergers (Möglingen)

3.2.3.1 Sauerstoffgabe

Der Sauerstoffzusatz im Jahrgang 2015 erfolgte in den gleichen Gebinden und mit der gleichen technischen Ausstattung wie im Jahrgang 2013 (siehe Abschnitt 3.2.1.3). Die Sauerstoffgabe erfolgte entsprechend der nachfolgend gezeigten Schemata und in doppelter Wiederholung.



Abbildung 3-9: Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung von Versuchsweinen Jahrganges 2015 mit Druckluft in 54 L Glasballons, Versuchsdauer: 60 Tage. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung.



Abbildung 3-10: Schematischer Versuchsaufbau bei der Mikrooxygenierung von Versuchsweinen Jahrganges 2015 mit Sauerstoff im 100 L Edelstahltanks, Versuchsdauer: 60 Tage. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils in doppelter Wiederholung.

3.3 Stabilisierung und Füllung

Nach dem Ende der Mikrooxygenierung und einer Wartezeit von 4 bis 6 Wochen wurden die Weine in jedem Versuchsjahrgang geschwefelt, sodass der Gehalt an freier SO₂ je nach pH-Wert zwischen 30 und 50 mg/L lag, jedoch stets so, dass alle Versuchsvarianten eines Weines etwa dieselben Gehalte aufwiesen. Dafür wurde im Jahrgang 2013 das Präparat Sterisol (NH₄HSO₃, Ever S.r.l., Pramaggiore, Italien) verwendet, in den Jahrgängen 2014 bzw. 2015 kam das Präparat Solution Sulfureuse P18 (KHSO₃, Erbslöh, Geisenheim, Deutschland) zum Einsatz. Anschließend wurden die Weine mittels Crossflowfilter filtriert und die bis dahin getrennt gehaltenen Versuchswiederholungen vereinigt. Anschließend wurden die Weine in Flaschen (Nennvolumen 0,75L) gefüllt und mit Anrollverschlüssen (Longcap mit Saranex-Einlage) versehen. Bis zur Durchführung der Sensorik wurden die Flaschen bei 18 °C und Dunkelheit gelagert.

3.4 Probennahme und Probenvorbereitung

Während der Phase der Mikrooxygenierung wurden in wöchentlichen Intervallen Proben entnommen. Für die Analysen wurden die Proben zunächst zentrifugiert (1400 U/min, 10 min) und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Vor jeder Analyse wurden die Proben über Spritzenvorsatzfilter (DIAFIL, Celluloseactetat, Porenweite 0,45 µm, DIA-Nielsen, Düren) filtriert, um vorhandene Trübungen (Hefe, Weinstein) zu entfernen.

3.5 Durchführung des Harbertson-Adams Assay

3.5.1 Reagenzien und Lösungen

Die für den Assay verwendeten Lösungen und Reagenzien sind in Tabelle 3-13 aufgeführt.

Reagenzien	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer	50 g/L Natriumdodecylsulfat (92-100 %) und 50 mL/L
	Triethanolamin (98 %) in Wasser, pH 9,4
Eisenchloridlösung	2,7 g/L Eisen(III)chlorid (97 %), 800 µL/L konz. HCl
	(37 %) in Wasser
Waschpuffer	9,86 g/L NaCl (99,5 %) und 12 mL/L Essigsäure (99,8%)
	in Wasser, pH 4,9
BSA-Lösung	1 g/L BSA (Bovines Serum Albumin Fraction V) in
	Waschpuffer
Bleich-Lösung	40 g/L Kaliumdisulfit (96 %) in Wasser
Modellwein	5 g/L Weinsäure (99,5 %) in 12 Vol.% wässrigem Ethanol
	(99 %), pH 3,3
Anthocyanpuffer	23 g/L Maleinsäure (>98 %), 9,93 g/L NaCl in Wasser,
	pH 1,8

Tabelle 3-13: Reagenzien und Lösungen für den Harbertson-Adams Assay

3.5.2 Eisen-reaktive Phenole

In einer Mikro-Küvette wurden 75 μ L Wein mit 800 μ L Resuspensionspuffer versetzt, gemischt, und die Absorption bei $\lambda = 510$ nm nach 10 min Inkubationszeit gemessen. Nach der Zugabe von 125 μ L Eisenchloridlösung und weiteren 10 min Inkubationszeit wurde die Absorption erneut gemessen. Aus der Differenz beider Messungen ergibt sich der Gesamtphenolgehalt über eine externe Kalibrierreihe mit (+)Catechin.

3.5.3 Small Polymeric Pigments (SPP) und Large Polymeric Pigments (LPP)

Zur Bestimmung wurden 500 μ L einer Probe in eine Halbmikroküvette gegeben und mit 1 mL Waschpuffer versetzt. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die Absorption bei $\lambda = 520$ nm gemessen (Messwert A). Anschließend wurden 120 μ L Bleichlösung zugefügt und nach weiteren 10 min erneut die Absorption bei $\lambda = 520$ nm gemessen (Messwert B).

In das Eppendorf Reaktionsgefäß wurden 500 μ L der Probe mit 1 mL BSA-Lösung versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das entstehende Präzipitat abzentrifugiert (13000 U/min, 5 min). 1 mL der überstehenden Lösung wurde in eine Halbmikroküvette überführt und mit 80 μ L Bleichlösung versetzt. Nach 10 min Inkubation wurde bei $\lambda = 520$ nm die Absorption gemessen (Messwert C).

Der (Licht-)Absorptionsanteil der SPP ist der Messwert C. Die Differenz zwischen Messwert B und Messwert C ergibt den Absorptionsanteil der LPP. Messwert A wird für die Bestimmung des Anthocyangehalts (s.u.) benötigt.

3.5.4 Tanningehalt

Zur Bestimmung des Tanningehaltes wurde das im Eppendorf-Reaktionsgefäß verbliebene Präzipitat aus dem vorherigen Versuchsteil verwendet. Zunächst wurde dazu die verbleibende überstehende Lösung im Eppendorf Reaktionsgefäß vorsichtig entfernt. Dann wurden 500 μ L Waschpuffer zugegeben und das Gefäß vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde nochmals zentrifugiert (13000 U/min, 5 min) und der Überstand erneut vom Präzipitat entfernt. Nach Zugabe von 875 μ L Resuspensionspuffer und einer
Inkubationszeit von 20 min wurde das Gefäß bis zum Auflösen des Niederschlages geschüttelt. Die Lösung wurde in eine Mikroküvette überführt und nach einer Inkubationszeit von 10 min die Absorption bei $\lambda = 510$ nm gemessen. Anschließend wurden 125 µL Eisenchloridlösung zugegeben und die Absorption nochmals bei $\lambda = 510$ nm gemessen. Aus der Differenz beider Messungen ergibt sich der Tanningehalt über eine externe Kalibrierreihe mit (+)Catechin.

3.5.5 Anthocyangehalt

Da monomere Anthocyane nur im stark sauren Medium vollständig in der roten Flavyliumstruktur vorliegen, bei pH 5 jedoch in einer farblosen Form vorliegen, lässt sich der Gehalt monomerer Anthocyane im Wein durch Variation des pH Wertes anhand der Absorptionsdifferenz näherungsweise bestimmen (Ribéreau-Gayon et al. 2006b).

Dafür wurden 100 μ L Wein in einer Halbmikroküvette mit 500 μ L Modellwein und 1000 μ L Anthocyanpuffer versetzt, gemischt und nach 5 min Inkubationszeit die Absorption bei $\lambda = 520$ nm gemessen (Messung D). Als Referenzmessung dient Messung A aus dem Versuchsteil zur Bestimmung der SPP und LPP, die bei pH 4,9 durchgeführt wurde. Die Differenz der beiden Messungen ergibt den Anthocyangehalt durch den Vergleich mit einer empirisch erstellten Kalibrierfunktion.

3.6 Spektralphotometer

Spektralphotometer Varian Cary 100 Scan UV-Visible Spectrophotometer

- Zentrifuge Thermo Scientific Heraeus Pico 17 Centrifuge
- Software Cary Advanced Reads 4.1; Cary Win UV Color 3.2

3.7 <u>Chromatographische Verfahren</u>

3.7.1 Gaschromatographische Bestimmung der Acetaldehydkonzentration

Bei der Bestimmung des Acetaldehyds mittels Headspace-Gaschromatographie (HS-GC) und Flammenionisationsdetektion (FID) wurde nur die freie und nicht die an SO₂ gebundene Form erfasst. Dazu wurden 10 ml Probe in ein mit Argon vorgespanntes 22 mL Vial gegeben, und sofort mit einem Septum verschlossen, um Verluste durch Verdampfung zu vermeiden. Vor der Headspace-Injektion wurde die Probe im Autosampler für 50 min bei 45 °C inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierreihe in einem ungeschwefelten Rotwein mit möglichst geringem nativem Acetaldehydgehalt.

3.7.1.1 Geräte, Säule und Software HS-GC-FID-Analytik

Headspace Autosampler	Perkin-Elmer TurboMatrix HS 40 Trap
Säule	10 m CP-Sil-19 CB (0,53 mm ID; 2,10 µm FT)
	+ 30 m DB1 (0,53 mm ID, 3 μm FT)
GC	Carlo Erba Fisons GC8000 Top
Software	Chromcard data system Software, Version 2.4.1

3.7.1.2 Parameter am Headspace-Autosampler

Inkubationszeit und -temperatur	50 min bei 45 °C
Nadel- und Transferlinetemperatur	115 °C
Druckaufbau-, Injektions und Verweilzeit	1 min / 0,02 min / 0,2 min
Säulen- und Injektionsdruck	25 kPa

Trägergas	Stickstoff
Injektortemperatur	150 °C
Ofenprogramm	statisch für 6 min bei 32 °C; aufheizen mit 40 °C/min auf 200 °C; statisch für 5 min bei 200 °C
Brenngas FID	30 ml/min Wasserstoff, 300 mL/min Luft
Temperatur FID	245 °C

3.7.1.3 Methodische Parameter der Chromatographie und Detektion

3.7.2 Bestimmung von Anthocyanen, Flavanolen und Hydroxyzimtsäuren mittels HPLC-DAD-FD

Im Rotwein enthaltene Polyphenole wurden mittels monomere Hochleistungschromatographie (HPLC) mit Diodenarraydetektion (DAD) und Fluoreszenzdetektion (FD) bestimmt. Sämtliche monomeren Anthocyane wurden als Gesamtanthocyangehalt bei 520 nm mittels DAD quantifiziert. Die Detektion der Hydroxyzimtsäuren Kaffeesäure und Caftarsäure erfolgte bei 320 nm. Die Flavanole Catechin und Epicatechin wurden anhand ihrer Fluoreszenz (Anregung bei 310 nm, Emission bei 325 nm) bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte anhand externer Standards, die in Modellwein (5 g/l Weinsäure, 12 % Ethanol) angesetzt wurden. Für Malvidin-3glucosid wurde der pH mit HCl auf 1,5 eingestellt, für Flavanole und Hydroxyzimtsäuren mit NaOH auf 3,6.

3.7.2.1 Geräte, Säule und Software HPLC-DAD-Analytik

Autosampler:	Jasco AS 2057 Plus				
Pumpe:	Jasco PU 2080 Plus, Niederdruck Pumpe mit tertiärem Gradientenformer Jasco LG 2080-02 und 3-Wege Degaser Jasco DG 2080-53				
Säulenofen	Jasco Column Thermostat Jetstream				
Vorsäule	Phenomenex Security Guard Cartridge System C18				
Säule:	Phenomenex, Gemini NX-C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, 110 Å				
Detektoren:	Jasco MD 2010 Plus, Multiwavelength Detector;				
	Jasco FP-2020 Plus, Fluorescence Detector				
Software:	Jasco ChromPass, Version 1.8.6.1				

Injektionsvolumen:	20 µL					
Temperatur:	40 °C					
Fluss:	1,2 mL/min					
Phosphatpuffer:	10 mmol/L KH pH 1,5 stellen	10 mmol/L KH ₂ PO ₄ in Reinstwasser, mit 85% iger H ₃ PO ₄ auf pH 1,5 stellen				
Fließmittel:	A: Phosphatpuff	fer/Acetonitril, 95/5	j v/v			
	B: Phosphatpuffer/Acetonitril, 50/50, v/v					
Gradient:	Zeit / min	Eluent A / %	Eluent B / %			
	0	100	0			
	12	88	12			
	18	88	12			
	37,5	49	51			
	38	25	75			
	41	25	75			
	42	100	0			
Gesamtdauer:	43 min					

3.7.2.2 Methodische Parameter der Chromatographie

3.7.3 Qualitative und quantitative Untersuchung des Polyphenolprofils mittels LC-QToF-MS

Reaktionsprodukte der Anthocyane wurden mittels LC-QToF-MS qualitativ nachgewiesen. Anhand der Fragmentspektren wurden Strukturvorschläge erarbeitet. Am Massenspektrometer wurden zwei Methoden entwickelt, von denen eine dem Nachweis kleinerer und eine dem Nachweis größerer Polyphenole dienen sollte.

Für die Quantifizierung ausgewählter Polyphenoladdukte wurde nur MS Methode 1 verwendet. Dabei wurde 1 mL der filtrierten Probe in ein HPLC Vial gegeben und mit 10 μL einer Cyanidin-3-rutinosid Lösung der Konzentration 100 mg/L (gelöst in Ethanol/Wasser 12/88 (v/v), 0,5 % (w/v) Weinsäure, pH 1,5 (eingestellt mit NaOH)) versetzt. Falls erforderlich wurden die Proben zuvor mit Modellwein (Ethanol/Wasser 12/88 (v/v), 0,5 % (w/v) Weinsäure, pH 3,6 (eingestellt mit HCl)) verdünnt. Für die Massenkalibrierung des ToF Massenspektrometers wurde eine gebrauchsfertige Referenzmassenlösung des Herstellers (G1969-85000 Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Für die qualitative Analytik wurde dem Massenspektrometer zur Erhöhung der Massengenauigkeit kontinuierlich eine Referenzmassenlösung (G1969-85003, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) zugeführt, die Purin und Hexakis(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)phosphazen enthielt.

3.7.3.1 Geräte, Säule und Software LC-QToF-MS-Analytik

Pumpe:	Agilent 1260 Infinity Binary Pump
Degaser:	Agilent 1260 Infinity HiP Degasser
Autosampler:	Agilent 1260 Infinity HiP ALS
Säulenofen:	Agilent 1260 Infinity TCC
DAD:	Agilent 1260 Infinity DAD
Säule:	Phenomenex Kinetex C18, 150x2,10, 2,6µm, 100 Å
Massenspektrometer:	6530 Accurate-Mass QToF LC/MS
Software:	Agilent Mass Hunter Workstation Software, Version B.05.00

3.7.3.2 Methodische Parameter der Chromatographie

Injektionsvolumen: 5 μL Temperatur: 40 °C Fluss: 0,4 ml/min Fließmittel: A: 93 % Reinstwasser / 5 % Acetonitril / 2 % Ameisensäure B: 5 % Reinstwasser / 93 % Acetonitril / 2 % Ameisensäure

Gradient:	Zeit / min	Eluent A / %	Eluent B / %
	0	100	0
	2	100	0
	18	30	70
	22	0	100
	23	0	100
	24	100	0
Dauer:	31 min		

Ionisierungsmodus:	ESI-Positiv
Massenbereich:	100 - 1700 Da
Kapillarspannung:	3000
Fragmentorspannung:	170 V
Skimmer:	65 V
Nebulizer:	35 psig
Gas Temp.:	300°C
Gas Flow:	8 L/min
Sheath Gas:	380°C
Sheath Gas Flow:	11 L/min
Kollisionsenergie Auto-MS (CID):	$\left(\frac{3*m/z}{100}+5\right)eV$
Scanrate	4 Spektren/s

3.7.3.3 Parameter am Massenspektrometer MS-Methode 1

3.7.3.4 Parameter am Massenspektrometer MS-Methode 2

Ionisierungsmodus:	ESI-Positiv
Massenbereich:	100 - 3200 Da
Kapillarspannung:	4000
Fragmentorspannung:	350 V
Skimmer:	65 V
Nebulizer:	25 psig
Gas Temp.:	320°C
Gas Flow:	10 L/min
Sheath Gas:	380°C
Sheath Gas Flow:	12 L/min
Kollisionsenergie Auto-MS (CID):	$\left(\frac{3*m/z}{100}+5\right)eV$
Scanrate	4 Spektren/s

3.8 Iodometrische Bestimmung des SO₂-Gehalts

Die Bestimmung von freier und gesamter SO₂, sowie der Reduktone erfolgte nach den Vorgaben der OIV (2009b).

Freies SO₂:

25 mL Wein wurden mit 1-2 Tropfen Stärkelösung und 5 mL 5 N H₂SO₄ versetzt. Mit Iodid-Iodat-Lösung wurde bis zum Farbumschlag nach dunkellila titriert.

Gesamtes SO₂:

25 mL Wein wurden mit 12,5 mL 2 N NaOH und 1-2 Tropfen Stärkelösung versetzt. Nach 10 min Reaktionszeit wurden 10 mL 5 N H_2SO_4 zugesetzt und mit Iodid-Iodat-Lösung bis zum Farbumschlag nach dunkellila titriert.

Andere reduzierende Stoffe im Wein, wie Ascorbinsäure oder reduzierende Zucker werden zusammenfassend als Reduktone bezeichnet. Reduktone täuschen bei der iodometrischen Bestimmung SO₂ vor. Sie werden deswegen separat bestimmt und von den zuvor ermittelten Gehalten freier und gesamter SO₂ subtrahiert.

Reduktone:

25 mL Wein wurden mit 5 mL Propionaldehyd und 1-2 Tropfen Stärkelösung versetzt. Nach 5 min Reaktionszeit wurden 5 mL 5N H₂SO₄ zugesetzt und mit Iodid-Iodat-Lösung bis zum Farbumschlag nach dunkellila titriert.

3.9 <u>Sensorische Bewertung</u>

Ein trainiertes Prüferpanel bewertete die optischen, olfaktorischen und gustatorischen Merkmale der Versuchsweine im Rahmen einer deskriptiven Analyse, wobei alle Weine blind, in doppelter Wiederholung und voll randomisiert verkostet wurden.

Zunächst wurde von den Prüfern eine Bewertung der Farbintensität und des Farbtons gefordert, wobei die Weine untereinander verglichen werden sollten. Die Bewertungsskala reichte bei der Farbintensität von hell (linker Endpunkt) bis dunkel (rechter Endpunkt) und beim Farbton von orange (linker Endpunkt) über rot (Skalenmittelpunkt) bis violett (rechter Endpunkt).

Die Bewertung der Geruchs- und Geschmacksattribute fand jeweils auf einer Skala von 0 (schwach/nicht wahrnehmbar) bis 10 (stark wahrnehmbar) und stets im Vergleich zu einer Referenzprobe statt. Die Referenzproben hatten dabei per Definition die Stärke 10. Die Rezepturen für die Referenzproben sind in Tabelle 3-14 aufgeführt.

Ausnahmen bildeten die beiden Geschmacksattribute Mundgefühl und Körper bei denen die Unterschiede zwischen den Weinen ohne Referenz bewertet werden sollte. Die Bewertungsskala reichte im Falle des Mundgefühls von weich (linker Endpunkt) bis hart (rechter Endpunkt), sowie im Falle des Körpers von dünn (linker Endpunkt) nach dicht (rechter Endpunkt).

Sensorische Attribute	Rezeptur für Referenz ¹		
Aussehen			
Farbintensität	Bewertung von "hell" nach "dunkel", keine Referenz		
Farbton	Bewertung von "braun" nach "violett", keine Referenz		
Geruch			
Erdbeere	5 mL Konservenflüssigkeit (Natreen)		
Sauerkirsche	25 mL Sauerkirschsaft (Lindavia)		
17 11	1/3 Karamellbonbon (Werthers Echte) 2 min in Wein		
Karamen	extrahieren		
Heu	10 g Heu 10 min extrahieren		
Nelke	2 Nelken (Ostmann) 3 min extrahieren		
Schokolade	3 ml Schokoladensirup (Monin)		
	1 mL Sojasoße (Kikkoman),		
oxidativer Geruch	+ 100 µL Acetaldehydlösung (10 %)		

Tabelle 3-14: Optische Attribute und Geruchsattribute der Deskriptiven Sensorischen Analyse mit Rezeptur für Referenzmuster

¹ Mengenangaben beziehen sich auf 50 mL des Grundweines

Sensorische Attribute	Rezeptur für Referenz ¹		
Geschmack			
Süß	3 g/L Fructose		
Sauer	1,5 g/L Weinsäure		
Körper	Bewertung von "dünn" nach "dicht", keine Referenz		
Mundgefühl	Bewertung von "weich" nach "hart", keine Referenz		
grüne Tannine	0,8 g/L Catechin		
trockene Tannine	0,6 g/L Gallotannine		
Bitter	1,5 g/L Coffein		

Tabelle 3-15: Geschmackksattribute der Deskriptiven Sensorischen Analyse mit Rezeptur für Referenzmuster

¹ Mengenangaben beziehen sich auf 50 mL des Grundweines

3.10 Software zur statistischen Datenauswertung

Die Erfassung und Auswertung der Daten der Sensorik erfolgte mit der Software FIZZ (Version 2.50 b 37, Biosystèms, Couternon, Frankreich).

Hauptkomponentenanalysen, Varianzanalysen und sonstige statistische Berechnungen wurden in Microsoft Excel 2007 (Version 12.0) mit Hilfe des Statistik Add-Ins XL Stat (Version 2011.4.04, Addinsoft SARL., Paris, Frankreich) durchgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Viele Publikationen haben sich bereits mit den Reaktionen zwischen Polyphenolen während der Weinreifung befasst. Allerdings wurden im Wein bisher vor allem dimere Strukturen beschrieben. Die vorliegende Arbeit befasst sich zunächst damit, die durch den Zusatz von Sauerstoff entstehenden polymeren Pigmente im Wein qualitativ nachzuweisen, die Struktur derselben zu untersuchen und so zu erklären, welche Reaktionen die Dimere weiter eingehen können. Der zweite Teil befasst sich mit der Quantifizierung einiger dieser Pigmente, um zu erfassen welcher Anteil der nach der Gärung vorliegenden monomeren Anthocyane zu Polymeren Pigmenten reagiert. Im dritten Teil erfolgt eine umfassende Analyse mehrerer Probenserien die während der Mikrooxygenierung verschiedener Weine entnommen wurden. Erneut werden dazu ausgewählte Pigmente mittels LCMS quantifiziert. Zusätzlich erfolgt eine photometrische Bestimmung von SPP, LPP und weiterer Parameter mit dem Harbertson-Adams Assay. Um deren Einfluss auf die Weinfarbe zu untersuchen, wurde außerdem die Farbcharakteristik im CIE-L*a*b* Farbraum gemessen. Die chemischen und sensorischen Eigenschaften mikrooxygenierter Weine werden im vierten Teil diskutiert. Schließlich werden anhand einer retrospektiven Betrachtung aller durchgeführten Versuche die Zusammenhänge zwischen dem Polyphenolprofil eines Weines und der Auswirkung von Sauerstoff auf die Farbstabilität untersucht. Dies ist Thema des fünften Teils, der erörtern soll, welche Weine sich grundsätzlich für eine Farbstabilisierung durch den gezielten Zusatz von Sauerstoff eignen und welche Weine eher unter Sauerstoffausschluss ausgebaut werden sollten.

4.1 <u>Teil I: Qualitative Analyse sauerstoff-induzierter polymerer</u> <u>Pigmente in Rotwein</u>

Der Begriff "Polymere Pigmente" suggeriert, dass es sich dabei um Molekülketten aus vielen Einzelbausteinen handelt. Die bisher mittels Massenspektrometer oder NMR nachgewiesenen Verbindungen gehen jedoch kaum über trimere Polyphenoladdukte hinaus, sodass auf Grundlage dieser Daten allein nicht von einer Polymerisation im eigentlichen Sinn gesprochen werden kann. Allerdings gibt es andere Hinweise, dass eine Polymerisation tatsächlich abläuft. Somers (1966) berichtet als einer der ersten davon,

dass Weinpigmente teilweise als Polymere vorliegen und konnte dies mittels Gel-Permeationschromatographie nachweisen. Nur wenig später gelang ihm der Nachweis, dass die Menge dieser Polymere mit dem Weinalter zunimmt (Somers 1971). Timberlake und Bridle (1976b) schlugen als einen ersten Schritt dieser Polymerisation die Bildung von Dimeren aus Anthocyanen, Flavanolen und Acetaldehyd vor. Erst nach zwei Jahrzehnten gelang der massenspektrometrische Nachweis dieser Dimere durch Es-Safi et al. (1999b).

Kurze Zeit später wurde festgestellt, dass die primär gebildeten ethyliden-verbrückten Anthocyan-(Epi)Catechin-Dimere unter Wein-Bedingungen nicht stabil sind (Escribano-Bailón et al. 2001). Vermutlich reagieren sie mit anderen Polyphenolen zu Verbindungen höheren Molekulargewichts. Mehrere Reaktionswege sind dabei denkbar. So könnte es ohne Beteiligung von Acetaldehyd zur direkten Kondensation kommen. Solche Reaktionsprodukte wären möglicherweise farblos (Remy-Tanneau et al. 2003). Bei Anwesenheit von Sauerstoff beziehungsweise Acetaldehyd ist auch die Bildung von weiteren Ethyliden-Brücken oder Pyranoanthocyan-Strukturen möglich. Als dritte Möglichkeit kommen noch völlig andere, bisher unbekannte Reaktionswege in Frage.

Da eine Stabilisierung und Intensivierung der Rotweinfarbe in der Praxis durch Sauerstoff erfolgt, wurde der Fokus dieser Arbeit auf Sauerstoff-induzierte Reaktionen gelegt. Im Jahrgang 2013 wurden daher ein maischeerhitzter Spätburgunder, ein maischeerhitzter Trollinger und ein maischevergorener Spätburgunder mit Sauerstoff behandelt. Die höchste Farbintensität und die größten Konzentrationen von SPP und LPP wies danach der maischevergorene Spätburgunder auf. Dieser Wein wurde für die Identifizierung neuer Polyphenoladdukte mittels LCMS ausgewählt.

4.1.1 Entwicklung einer Methode zur Detektion oligomerer Polyphenoladdukte mittels ESI-QToF-Massenspektrometer

Die erforderliche Energie für die Ionisierung von Molekülen wächst mit der Molekülgröße. Ist die Energie zu klein, reicht sie für die Ionisierung nicht aus. Ist sie hingegen zu groß, werden die Moleküle in der Ionenquelle zerstört. Für die Detektion verschieden großer Polyphenoladdukte wurden daher zwei Methoden am Massenspektrometer entwickelt. Für MS Methode 1 wurden die Geräteparameter so gewählt, dass die Peakflächen der Malvidin-ethyliden-(Epi)Catechin Dimere die maximale Größe aufwiesen. Für MS Methode 2 waren hingegen die Peakflächen des zweifach ethyliden-verbrückten (Epi)Catechin-Malvidin-(Epi)Catechin Trimers maßgeblich. Alle zur Entwicklung getesteten Geräteparameter sind in Tabelle 4-1 aufgeführt. Die in hellgrau hinterlegten Parameter wurden anhand der beschriebenen Kriterien für MS Methode 1 ausgewählt, die dunkelgrau hinterlegten Ziffern stellen hingegen die Werte für MS Methode 2 dar. Die in MS Methode 2 für Drying Gas und Sheath Gas gewählten Temperaturen und Durchflussgeschwindigkeiten sind die vom Gerätehersteller vorgegeben Maximalwerte und konnten daher nicht weiter erhöht werden.

Tabelle 4-1: Verwendete Testparameter zur Maximierung der Peakhöhe des zweifach ethyliden-verbrückten (Epi)Catechin-Malvidin-(Epi)Catechin Trimers. Die schließlich gewählten Parameter sind in Fettdruck dargestellt.

Kapillar-	Fragmentor-	Temperatur	Durchfluss	Temperatur	Durchfluss	Druck
spannung	spannung	Drying Gas	Drying Gas	Sheath Gas	Sheath Gas	Nebulizer
(V)	(V)	(°C)	(L/min)	(°C)	(L/min)	(psig)
2500	150	280	8	350	10	20
3000	200	300	9	380	11	25
3500	250	320	10	400	12	30
4000	300	-	-	-	-	35
4500	350	-	-	-	-	40
-	400	-	-	-	-	-

Abbildung 4-1 zeigt die mit beiden Methoden aufgenommenen Chromatogramme des verwendeten Rotweines als Total Ion Current (Totalionenstrom, TIC). Es ist zu erkennen, dass die zwischen 1 und 12,5 Minuten eluierenden Polyphenole geringeren Molekulargewichtes (beispielsweise monomere Flavanole und Anthocyane) mit MS Methode 1 (oben) sehr gut ionisiert werden. Aufgrund der hohen Kapillar- und Fragmentorspannungen von MS Methode 2 (unten) werden diese hingegen nahezu vollständig fragmentiert und erscheinen daher im TIC kaum noch. Im Bereich zwischen 12,5 und 15 Minuten sind die Peakhöhen in beiden Chromatogrammen etwa vergleichbar. Die Intensitäten der Peaks die erst nach 15 Minuten oder später eluieren, konnte hingegen durch MS Methode 2 erheblich gesteigert werden.



Abbildung 4-1: Total Ion Current (TIC) des mikrooxygenierten maischevergorenen 2013er Spätburgunders, aufgenommen mit MS Methode 1 (oben) und MS Methode 2 (unten).

4.1.2 Übersicht der detektierten oligomeren Polyphenole

In dem genannten maischevergorenen 2013er Spätburgunder wurden mit Hilfe beider Methoden verschiedene polymere Verbindungen detektiert. Eine Auswahl der Signale mit den höchsten *m/z*-Verhältnissen ist in Tabelle 4-2 aufgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde Malvidin-3-glucosid dort und im folgenden Text nur mit "Mv" abgekürzt, eine Ethyliden-Brücke mit "et" und (Epi)Catechin mit (E)C. Von allen Verbindungen wurden mittels Collision Induced Dissociation (CID) Fragmentspektren mit unterschiedlichen Kollisionsenergien aufgenommen. Fragmentionen und die jeweils verwendeten Kollisionsenergien (CID (eV)) sind ebenfalls in Tabelle 4-2 aufgeführt. Für die Verbindungen 1 bis 3, sowie 6 und 7 wurde dabei MS Methode 1 verwendet, für alle anderen Verbindungen MS Methode 2.

Charakteristische Fragmentionen, wie das Aglykon von Malvidin-3-glucosid (m/z = 331,0812), Vinylmalvidin-3-glucosid (m/z = 519,1497) oder dessen Aglykon (m/z = 357,0969) weisen bei allen in Tabelle 4-2 aufgelisteten Verbindungen darauf hin, dass Malvidin-3-glucosid als Baustein enthalten ist. Darüber hinaus konnten aufgrund der erhaltenen Informationen auch die weiteren monomeren Bausteine in diesen Verbindungen identifiziert werden. Anhand der Fragmentspektren wurden Vorschläge für die Abfolge der Monomerbausteine in der Molekülkette erarbeitet. Eine zusätzliche Absicherung dieser Vorschläge erfolgte über den Vergleich der mittels hochauflösender Massenspektrometrie gemessenen Massen mit den theoretisch erwarteten Werten. Tabelle 4-3 zeigt, dass die Abweichung zwischen gemessenem und theoretisch berechneten Werten maximal 4,7 ppm betrug und insgesamt kaum höher lag als die gerätespezifische Massengenauigkeit von 2 ppm (Agilent 2012).

Da es sich bei Catechin und Epicatechin um Diastereomere handelt und die Ethylidenbrücken zwischen den Monomerbausteinen ebenfalls ein Stereozentrum enthalten, existieren bereits vom ethyliden-verbrückten Malvidin-(Epi)Catechin Dimer vier Diastereomere. Mit der Zahl der monomeren Bausteine nimmt die Zahl der chromatographisch zu trennenden Stereoisomere immer weiter zu. Daher wurden für jede Verbindung mehrere Peaks mit identischem m/z und identischen Fragmentspektren gefunden. Bei einigen Verbindungen war die Isomerenzahl so groß, dass Peaks nicht mehr eindeutig getrennt und mit Retentionszeiten identifiziert werden konnten. In diesen Fällen wurden in Tabelle 4-2 lediglich Retentionszeitbereiche angegeben.

Nr.	Abfolge der Monomerbausteine	[M+H] ⁺	Fragmentionen	CID (eV)	RT (min)
1	Mv-et-(E)C	809,2324	647,1741; 519,1487; 357,0966	15	12,9; 13,2; 13,6; 13,9
2	Mv-et-(E)C-(E)C	1097,2965	935,2295; 807,2148; 645,1520; 519,1487; 357,0959	20	12,4; 12,9; 13,1; 13,5; 13,7; 13,8; 14,0; 15,0; 15,4
3	Mv-et-(E)C-(E)C-(E)C	1385,3552	1223,3062; 1095,2776; 807,2109; 519,1501; 357,0960	20	11,5; 12,6; 13,0; 13,3; 13,6; 13,8; 14,0
4	Mv-et-(E)C-(E)C-(E)C-E(C)	1673,4132	1383,3531; 1095,2808; 807,2187; 519,1500; 357,0956	25	12,5 - 15,0
5	Mv-et-(E)C-(E)C-(E)C- (E)C	1961,4821	1673,3530; 807,1819; 519,1491; 357,1012	25	12,5 - 15,0
6a	Mv-et-Mv	1011,2780	-	-	12,5 - 13,5
6b	Mv-et-Mv	1029,2878	1011,2774; 849,2248; 687,1685; 519,1491; 493,1273; 357,0940; 331,0772	25	12,5 - 13,5
7	Mv-et-Mv-(E)C	1301,3585	1139,3078; 1011,2744; 849,2240; 519,1507; 357,0962	25	14,5 - 16,5
8	(E)C-et-Mv-et-(E)C	1125,3216	835,2429; 673,1896; 545,1638; 519,1384; 383,1108; 357,0959	30	16,2; 16,4; 16,6; 16,9; 17,2; 17,5; 17,6; 17,9; 18,2; 18,7; 19,1; 19,3; 19,5
9	(E)C-et-Mv-et-(E)C-(E)C	1413,3824	1123,3216; 835,2465; 545,1648; 519,1500; 493,1171; 383,1139; 357,0933	30	14,1; 14,4; 14,5 - 16,3; 16,4; 16,8; 17,0; 17,4; 17,6
10	(E)C-(E)C-et-Mv-et-(E)C-(E)C/ (E)C-et-Mv-et-(E)C-(E)C-(E)C	1701,4531	1411,3373; 1123,2868; 835,2461; 833,2288; 545,1620; 519,1388; 383,1074; 357,1056	30	15,5 - 17,0
11	Mv-et-Mv-et-(E)C	1327,3761	1165,3083; 1037,2928; 875,2343; 835,2579; 809,2305; 545,1475; 519,1425; 493,1381; 383,1169; 357,1009; 331,0739	30	16,5 - 19,5
12	(E)C-et-Mv-et-(E)C-et-(E)C	1441,4202	1151,3402; 861,2457; 835,2370; 545,1643; 519,1338; 383,1029; 357,0896	30	19,5 - 22,0
13	(E)C-et-Mv-et-Mv-et-(E)C	1643,4736	1353,3826; 1063,3040; 901,2509; 835,2378; 809,2387; 545,1575; 519,1468; 383,1054; 357,9672	40	20,0 - 22,0

Tabelle 4-2: Auswahl der im mikrooxygenierten maischevergorenen 2013 Spätburgunder gefundenen Verbindungen mit Abfolge der Monomerbausteine und charakteristischen Molekülfragmenten

CID: "Collision Induced Dissociation", für das Fragmentspektrum verwendete Kollisionsenergie; RT: Retentionszeit ; Mv: Malvidin-3-glucosid; -et-: -ethyliden-; (E)C: (Epi)Catechin

Nr.	Abfolge der Monomerbausteine	Summen- formel	[M+H] [⁺] (gemessen)	Exakte Masse (berechnet)	Abweichung (ppm)
1	Mv-et-(E)C	C ₄₀ H ₄₁ O ₁₈	809,2324	809,2287	4,6
2	Mv-et-(E)C-(E)C	C ₅₅ H ₅₃ O ₂₄	1097,2965	1097,2921	4,0
3	Mv-et-(E)C-(E)C-(E)C	C ₇₀ H ₆₅ O ₃₀	1385,3552	1385,3555	0,2
4	Mv-et-(E)C-(E)C-(E)C-E(C)	C ₈₅ H ₇₇ O ₃₆	1673,4132	1673,4189	3,4
5	Mv-et-(E)C-(E)C-(E)C-(E)C- (E)C	$C_{100}H_{89}O_{42}$	1961,4821	1961,4823	0,1
6a	Mv-et-Mv	$C_{48}H_{51}O_{24}$	1011,2780	1011,2765	1,5
6b	Mv-et-Mv	$C_{48}H_{53}O_{25}$	1029,2878	1029,2870	0,8
7	Mv-Mv-et-(E)C	C ₆₃ H ₆₅ O ₃₀	1301,3585	1301,3555	2,3
8	(E)C-et-Mv-et-(E)C	C ₅₇ H ₅₇ O ₂₄	1125,3216	1125,3234	1,6
9	(E)C-et-Mv-et-(E)C-(E)C	C ₇₂ H ₆₉ O ₃₀	1413,3824	1413,3868	3,1
10	(E)C-(E)C-et-Mv-et-(E)C-(E)C/ (E)C-et-Mv-et-(E)C-(E)C-(E)C	C ₈₇ H ₈₁ O ₃₆	1701,4531	1701,4502	1,7
12	Mv-et-Mv-et-(E)C	$C_{65}H_{67}O_{30}$	1327,3761	1327,3712	3,7
11	(E)C-et-Mv-et-(E)C-et-(E)C	C ₇₄ H ₇₃ O ₃₀	1441,4202	1441,4182	1,4
13	(E)C-et-Mv-et-Mv-et-(E)C	C ₈₂ H ₈₃ O ₃₆	1643,4736	1643,4658	4,7

Tabelle 4-3: Vergleich der für die Verbindungen 1 bis 13 gemessenen Massen mit den berechneten Werten.

Tabelle 4-2 zeigt, dass die Retentionszeit der ethyliden-verbrückten Verbindungen unter den gegebenen Bedingungen in erster Linie von der Zahl der Ethyliden-Brücken und weniger von der Molekülmasse abhängig war. So eluierten unter den gegebenen Bedingungen die Verbindungen 1 bis 7 (mit je einer Ethyliden-Brücke) zwischen 11,5 und 16,5 Minuten während die Verbindungen 8 bis 11 (je zwei Ethyliden-Brücken) Retentionszeiten zwischen 14,1 und 19,5 Minuten aufwiesen. Die Verbindungen 12 und 13 (je drei Ethyliden-Brücken) wurden schließlich nach 19,5 bis 22 Minuten detektiert. Vermutlich ergeben direkte Interflavan-Bindungen eine eher lineare Molekülstruktur und bewirken damit einen (für die entsprechenden Molekulargewichte) vergleichsweise schnellen Durchgang durch die Trennsäule. Ethylidenbrücken erzwingen hingegen deutlich stärker gewinkelte Molekülketten und erschweren somit den Weg durch die Trennsäule. Dies wird durch Abbildung 4-2 deutlich, die dreidimensionale Darstellungen eines vollständig über Interflavanbindungen verknüpftes (E)C-(E)C-(E)C-Mv-Adduktes (hypothetisch, nicht nachgewiesen), sowie die vorgeschlagenen Strukturen für Verbindung 3 mit einer Ethylidenbrücke und Verbindung 12 mit drei Ethylidenbrücken zeigt.



Abbildung 4-2: Dreidimensionale Darstellung der vollständig direkt verknüpften Verbindung (E)C-(E)C-(E)C-Mv (oben), von Verbindung 3 (Mv-et-(E)C-(E)C-(E)C) mit einer Ethylidenbrücke (mitte), sowie von Verbindung 12 ((E)C-et-Mv-et-(E)C-et-(E)C) mit drei Ethylidenbrücken (unten). Die gezeigten Strukturen sind nur eine von mehreren möglichen Konformationen und stellen nicht unbedingt die thermodynamisch stabilste dar.

Es ist zu erwarten, dass Polyphenoladdukte mit einer noch größeren Anzahl an Ethylidenbrücken noch später oder überhaupt nicht eluieren. Dies stünde einer Detektion mittels LCMS, neben der schlechten Ionisierbarkeit, zusätzlich im Wege.

4.1.3 Interpretation der Fragmentspektren

Die Verbindungen 1 bis 5 sind der Literatur bekannt. Es handelt sich jeweils um ethyliden-verbrückte "Dimere" aus einer Malvidin-Einheit und einem Flavanol bzw. einer Proanthocyanidinkette (Timberlake und Bridle 1976b, Rivas-Gonzalo et al. 1995, Es-Safi et al. 1996). Während bei reinen Flavanol-Flavanol-Dimeren die Ethylidenbrücke auch am C6 des A-Ringes auftreten kann (Fulcrand et al. 1996b), befindet sich diese bei gemischten Dimeren stark bevorzugt zwischen den beiden C8-Atomen am jeweiligen A-Ring der beteiligten Flavonoide (Timberlake und Bridle 1976b, Lee et al. 2004). Aus Gründen der Übersichtlichkeit und weil allein anhand massenspektrometrischer Daten meist nicht eindeutig zu bestimmen ist, an welcher Position sich eine Ethylidenbrücke befindet, wird im Folgenden soweit möglich stets von einer C8-C8-Verknüpfung ausgegangen.

Theoretisch kann aus Verbindung 1 (Mv-et-(E)C) durch eine Kondensationsreaktion mit (Epi)Catechin Verbindung 2 (Mv-et-(E)C-(E)C) entstehen. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da bei Wein pH der mittlere Polymerisationsgrad von Proanthocyanidinketten eher ab- als zunimmt (Vidal et al. 2002). Zudem zeigte sich in den durchgeführten Versuchen, dass während der Mikrooxygenierung alle diese Verbindungen zur gleichen Zeit in den Weinen auftraten und ihre Konzentration danach zeitgleich wieder abnahm (siehe auch Kapitel 4.3.3). Auch dies spricht dagegen, dass es zu einer Reaktionsfolge von Mv-et-(E)C zu Mv-et-(E)C-(E)C und von da zu Mv-et-(E)C-(E)C-(E)C kommt.

Verbindung 2 (Mv-et-(E)C-(E)C) mit m/z = 1097,2965 unterscheidet sich von der durch Nave et al. (2010) publizierten Verbindung darin, dass sich die Ethylidenbrücke hier zwischen dem Anthocyan und dem Proanthocyanidin-Rest befindet. Daher weist das Fragmentspektrum ein Signal mit m/z = 519,1497 auf. Dieses fehlt in den von Nave et al. (2010) publizierten Spektren, da sich die Ethylidenbrücke bei deren Addukt zwischen den beiden Flavanol Molekülen befindet.

Die Verbindungen 6a und 6b (Mv-et-Mv) sind ethyliden-verbrückte Dimere aus zwei Molekülen Malvidin-3-glucosid und wurden in dieser Form von Atanasova et al. (2002b) beschrieben. Da Anthocyane in der roten Flavyliumstruktur eine positive Ladung tragen und zwei positive Ladungen in unmittelbarer räumlicher Nähe energetisch ungünstig sind, liegt eines der beiden Anthocyane bevorzugt in einer neutralen Form vor, d.h. als

chinoide Base oder als Carbinolbase (siehe Abschnitt 2.4.2.2). Die beiden Formen weisen m/z = 1011,2780(chinoide Base) und m/z = 1029,2878(Carbinolbase) mit unterschiedliche Molekulargewichte auf und lassen sich daher massenspektrometrisch unterscheiden. Verbindung 6a ist im Fragmentspektrum von Verbindung 6b als Molekülfragment enthalten und entsteht durch Abspaltung eines Wassermoleküls. Da beide Formen auch bei niedrigen pH-Werten in einem chemischen Gleichgewicht stehen, findet während der chromatographischen Trennung in der HPLC-Säule ständig eine Transformation zwischen den beiden Formen statt. Aus diesem Grund können nicht etwa zwei getrennte Peaks beobachtet werden, sondern nur ein breiter Peak, über dessen gesamte Breite beide Formen zu stets gleichen Verhältnissen auftreten. Überdies kann auch die positive Ladung einmal an der einen und einmal an der anderen Anthocyan-Einheit auftreten. Da das Molekül symmetrisch aufgebaut ist, führt letzteres nicht zu einer weiteren Verbreiterung des Peaks.

Verbindung 7 (Mv-et-Mv-(E)C) weist das gleiche m/z auf, wie eine von Cruz et al. (2012) beschriebene Verbindung, die aus zwei Malvidin-Einheiten, einer Flavanol-Einheiten aufgebaut ist. Dort befindet sich zwischen den beiden Malvidin-Molekülen eine Ethyliden-Brücke, während das Flavanol über eine Interflavan-Bindung des A-Typs an eines der beiden Anthocyane gebunden ist. Die hier gemessenen Fragmentspektren unterscheiden sich allerdings zum Teil von den durch Cruz et al. (2012) publizierten Daten, was auf Differenzen in der Molekülstruktur hindeuten kann. Da Cruz et al. (2012) ein Ion-Trap Massenspektrometer verwendeten, während in unseren Untersuchungen ein QToF zum Einsatz kam und beide Geräte sich in Aufbau und Funktionsweise erheblich unterscheiden, auch technische Unterschiede Differenzen könnten zu im Fragmentspektrum geführt haben. Abbildung 4-3 zeigt das für Verbindung 7 erhaltene Fragmentspektrum. Das erste dort auftretende Fragmention mit m/z = 1139,3078[M+H -62]⁺ wird durch Abspaltung der Glykosyl-Glucose eines der beiden Anthocyane hervorgerufen, wie in Abbildung 4-4 gezeigt. Dieses Fragmention wurde ebenso von Cruz et al. (2012) beobachtet. Das zweite Fragmention mit $m/z = 1011,2744 [M+H - 290]^+$ geht aus der Abspaltung einer Flavanoleinheit hervor, die durch eine Interflavan-Bindung des B-Typs an das Molekül gebunden sein muss. Das Fragmention weist die gleiche Molekülmasse auf, wie das ethyliden-verbrückte Malvidin-Dimer, das als Verbindung 6a detektiert wurde. Es wurde in dieser Form von Cruz et al. (2012) nicht beobachtet. Stattdessen wurde dort ein Fragment mit m/z = 1149 detektiert, das durch eine RetroDiels-Alder-Spaltung des C-Ringes am Flavanol entsteht. Die Autoren begründen dies mit dem Vorliegen einer Interflavan-Bindung des A-Typs zwischen dem Flavanol und einem der beiden Anthocyane. Dieser Bindungstyp ist stabiler als eine Bindung des B-Typs und kann unter den gegebenen Bedingungen nicht gespalten werden. Umgekehrt führt die eher labile B-Typ Bindung dazu, dass im Massenspektrometer stets das vollständige Flavanol abgespalten wird, bevor die Retro-Diels-Alder Spaltung des Flavanolgerüstes stattfinden kann. Dies erklärt das fehlende Signal mit m/z = 1149 in dem in Abbildung 4-3 gezeigten Spektrum. In Abbildung 4-4 ist die Interflavanbindung als C4-C8-Bindung zwischen Anthocyan und Flavanol dargestellt. Auch eine C4-C6-Bindung wäre stattdessen denkbar. Anhand der vorliegenden Daten ist eine Unterscheidung der beiden Formen jedoch nicht möglich.



Abbildung 4-3: Gemessenes Fragmentspektrum von Verbindung 7 (Mv-et-Mv-(E)C) aus dem Precursor Ion m/z = 1301,3585.

Das Fragmention $m/z = 849,2240 [M+H - 290 - 162]^+$ entsteht aus m/z = 1011,2744 durch Abspaltung von Glucose aus einer der beiden Anthocyan-Einheiten. Die weiteren Signale m/z = 519,1507 und m/z = 357,0962 werden durch 8-Vinylmalvidin-3-glucosid und sein Aglykon hervorgerufen. Beide Fragmente sind auch in den Fragmentspektren von Cruz et al. (2012) enthalten. In den hier aufgenommenen Spektren fehlt das Signal m/z = 493, das von Cruz et al. (2012) beobachtet wurde und die auch im Fragmentspektrum von Verbindung 6a enthalten war. Im Unterschied zu Verbindung 6a, bei der die positive Ladung an jedem der beiden Anthocyan-Einheiten gleichermaßen auftreten kann, ist die Ladung in Verbindung 7 eindeutig am terminalen Anthocyan lokalisiert: Da der C-Ring des mittleren Anthocyans an die Flavanol-Einheit gebunden ist, kann sich dort die Flavyliumstruktur nicht mehr ausbilden. Stattdessen liegt diese Einheit permanent in einer neutralen Form vor. Es ist daher zu vermuten, dass in den hier durchgeführten Experimenten stets die gesamte Einheit Catechin-Malvidin als Neutralfragment von der bereits im Molekül positiv geladenen terminalen Malvidin-Einheit gespalten wurde. Analog zu den anderen ethyliden-verbrückten Verbindungen, verbleibt die Ethyliden-Brücke dabei in Form eines Vinylrestes stets am entstehenden Fragmention, hier also an der Malvidin-3-glucosid Einheit.



Abbildung 4-4: Vorgeschlagene Fragmentierungswege für das Fragmentspektrum von Verbindung 7 (Mv-et-Mv-(E)C) aus dem Precursor Ion m/z = 1301,3585.

Das Auftreten von Verbindung 7 ist ein Beleg dafür, dass eine mehrstufige Verknüpfung zwischen Anthocyanen und Flavanolen im Wein stattfinden kann. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob dieses trimere Addukt aus der Reaktion zwischen einem Ethylidenverbrückten Malvidin-Dimer und einem Flavanol oder durch Bildung einer Ethyliden-Brücke zwischen einem direkt verknüpften Flavanol-Malvidin-Dimer und einer weiteren Malvidin-Einheit entsteht. Beide Reaktionswege erscheinen möglich. Obwohl die Verbindungen 1 bis 5 bereits Ethyliden-Brücken und Interflavan-Bindungen zugleich enthielten, zeigt das Auftreten dieses Trimers, dass beide Bindungstypen an einem Molekül im Wein entstehen können. Während die in den Verbindungen 1 bis 5 auftretenden Interflavanbindungen bereits in der Traube entstanden sein dürften, gibt es dort nach bisherigem Kenntnisstand keine direkt verknüpften Anthocyan-Flavanol-Dimere. Die Bildung von Ethyliden-Brücken kann zudem nur im Wein ablaufen, da das erforderliche Acetaldehyd für diese Reaktion in der gesunden Traube nicht zur Verfügung steht. Ähnliches gilt auch für die von Nave et al. (2010) detektierten Verbindungen C-et-C-Mv.

Folgereaktionen erscheinen an der terminalen Malvidin-Einheit und an der terminalen (Epi)Catechin-Einheit möglich. Durch die direkte C4-C8-Interflavanbindung (oder die ebenfalls denkbare C4-C6-Interflavanbindung) zwischen dem terminalen (Epi)Catechin und dem intramolekularen Malvidin, ist die Position C6 an letztgenanntem noch nicht durch eine Ethylidenbrücke besetzt. Somit wäre diese Position ein denkbarer Ausgangspunkt für die Bildung eines verzweigten Pigments. Die Existenz solcher Verbindungen wird zwar allgemein angenommen, konnte jedoch bisher noch nicht belegt werden. Auch im Rahmen dieser Arbeit war der Nachweis eines solchen Pigments, das eine Masse von 1617,4502 Da aufweisen würde, nicht möglich.

Verbindung 8 ((E)C-et-Mv-et-(E)C) wurde in ähnlicher Form von Weber und Winterhalter (2014) in einer wässrig-ethanolischen Lösung synthetisiert und isoliert. Es handelt sich um ein trimeres Addukt aus zwei terminalen (Epi)Catechin-Molekülen und einer Anthocyan-Einheit. Anstelle des hier enthaltenen Malvidin-3-glucosid verwendeten Weber et al. jedoch Cyanidin-3-glucosid, dass ein 44 Da geringeres Molekulargewicht aufweist. Daher sind alle Signale in den von Weber et al. gemessenen Fragmentspektren jeweils um 44 Einheiten kleiner als die in unseren Spektren. Die Neutralfragmente sind hingegen identisch und erlauben so den Vergleich der beiden Verbindungen. Weber und Winterhalter konnten durch NMR-Daten belegen, dass das Anthocyan in den Positionen

C6 und C8 jeweils eine Ethylidenbrücke trägt, an die je ein Catechin-Molekül gebunden ist. Somit befindet sich das Anthocyan in einer intramolekularen Position und die Abfolge der Monomerbausteine lautet C-et-Mv-et-C (C: Catechin). Das in Abbildung 4-5 gezeigte Fragmentspektrum weist ein Signal m/z = 545,1643 [M+H -290 -290]⁺ auf, das durch das Molekülfragment 6,8-Divinylmalvidin-3-glucosid hervorgerufen wird, wobei die beiden Vinylreste aus zwei Ethylidenbrücken entstehen. Analog zu Fragment m/z = 519,1497, das stets bei einfach ethyliden-verbrückten Malvidin-Molekülen auftritt, ist dieses Fragment charakteristisch für doppelt ethyliden-verbrückte Malvidin-Moleküle.

Obwohl Es-Safi et al. (1999b) und Weber und Winterhalter (2014) in Modell-Lösungen Pigmente mit mehreren Ethyliden-Brücken fanden, konnte deren Existenz in dieser Arbeit erstmals in Rotwein nachgewiesen werden. Die Ergebnisse belegen außerdem im Widerspruch zu Es-Safi et al. (1999b), dass Malvidin zwei Ethyliden-Brücken ausbilden kann. Die Reaktion einer "Polyphenol-Kette" mit einem Malvidin-Molekül stellt somit nicht wie von Es-Safi et al. (1999b) zwangsläufig das Ende des Polymerisationsprozesses dar.



Abbildung 4-5: Gemessenes Fragmentspektrum von Verbindung 8 ((E)C-et-Mv-et-(E)C) aus dem Precursor-Ion m/z = 1125,3216.

Ethyliden-verbrückte Malvidin-Flavanol Dimere werden durch SO₂ und hohe pH-Werte weniger gebleicht als monomere Anthocyane (Escribano-Bailón et al. 2001).Weber und Winterhalter zeigten, dass die trimere Verbindung C-et-Cy-et-C bei Zugabe von SO₂ noch stabiler gegen Bleichung ist, als das Dimer Cy-et-C und dieses wiederum stabiler als das monomere Cyanidin. Überdies liegt bei einem für Wein üblichen pH von 3,5 ein wesentlich größerer Anteil der Trimere in einer rot-violett farbigen Struktur vor als bei monomeren Cyanidin. Damit kann eine weitere Polymerisation von Ethylidenverbrückten Anthocyan-Flavanol Dimeren eine zusätzliche Stabilisierung der Weinfarbe bewirken. Die hier vorliegenden Ergebnisse belegen nun, dass die Polymerisation zu trimeren Verbindungen nicht nur im Modell sondern auch im Wein stattfindet.

Bei den bisher diskutierten Verbindungen befanden sich die Flavanole (bzw. Proanthocyanidine) stets in terminaler Position. In Verbindung 12 ((E)C-et-Mv-et-(E)C-et-(E)C) treten diese nun innerhalb des Moleküls auf. Molekülmasse und Fragmentspektren lassen auf Malvidin und drei Flavanol-Einheiten sowie drei Ethyliden-Brücken schließen. Das Fragmention m/z = 861,2457 [M+H -290 -290]⁺ entsteht durch den Verlust zweier terminaler (Epi)Catechin-Einheiten, während m/z = 835,2370 [M+H - 290 -290 -26]⁺ vermutlich durch die Abspaltung von (E)C-et-(E)C als Neutralfragment hervorgerufen wird. Bei Fragment m/z = 545,1643 [M+H -290 -290 -26]⁺ handelt es sich, wie bei Verbindung 8, um 6,8-Divinyl-Malvidin. Dieses Fragment belegt so, dass sich Malvidin in intramolekularer Position befinden muss. Die Abfolge der monomeren Einheiten in der Molekülkette kann somit nur (E)C-et-(E)C-et-(E)C oder (E)C-et-(E)C lauten. Verbindung 12 kann damit entweder aus Verbindung 8 entstanden sein, indem eine weiteres Molekül (Epi)Catechin über eine Ethyliden-Brücke gebunden wurde, alternativ ist auch die Reaktion von (E)C-et-(E)C mit Verbindung 1 denkbar. Zwar wurde (E)C-et-(E)C hier nicht direkt nachgewiesen, die

Existenz der Verbindung in Wein ist jedoch aufgrund mehrerer Publikationen gesichert (Fulcrand et al. 1996b, Saucier et al. 1997a, Saucier et al. 1997c). Zugleich gilt (E)C-et-(E)C als hochreaktiv, sodass auch dieser Reaktionsweg denkbar erscheint (Drinkine et al. 2007b). Auch Verbindung 12 fanden Weber und Winterhalter (2014) als Derivat von Cyanidin in wässrig-ethanolischer Modelllösung. Die in den Fragmentspektren auftretenden Neutralfragmente entsprechen ebenfalls den dort publizierten Daten. Nachdem die Existenz von Verbindungen mit zwei Ethylidenbrücken in Rotwein nachgewiesen wurde, belegt dieses Pigment, dass auch drei Ethyliden-Brücken in einem Molekül möglich sind.

Verbindung 11 (Mv-et-Mv-et-(E)C) weist, wie Verbindung 7, zwei Anthocyane und eine Flavanoleinheit auf, enthält jedoch zwei Ethyliden-Brücken. Ein trimeres Pigment mit den gleichen monomeren Bausteinen wurde von Es-Safi et al. (1999b) in einer Modelllösung detektiert, jedoch als doppelt geladenes Kation. Die Zuordnung der Struktur erfolgte dort lediglich auf Basis der Molekülmasse, da Fragmentspektren nicht zur Verfügung standen. Die Autoren schlugen die Sequenz Mv-et-(E)C-et-Mv als Abfolge der Monomerbausteine vor. Die Fragmentspektren der hier gefundenen Verbindung belegen hingegen die Abfolge Mv-et-Mv-et-(E)C, da das Fragment $m/z = 1037,2928 [M+H -290]^+$ durch Abspaltung einer (Epi)Catechin-Einheit direkt aus dem Molekülion entsteht. Damit muss die (Epi)Catechin-Einheit in terminaler Position vorliegen. Dies zeigt, dass in mehrfach Ethyliden-verbrückten Polyphenol-Addukten in Rotwein auch mehrere Anthocyane enthalten sein können.

Für die Bildung dieses trimeren Adduktes sind zwei Wege denkbar: Es kann entweder durch die Reaktion eines Mv-et-Mv Dimers mit (Epi)Catechin, oder durch die Verknüpfung des Dimers Mv-et-(E)C mit einem weiteren Malvidin entstehen. In beiden Fällen muss die Bildung einer zusätzlichen Ethyliden-Brücke aus Acetaldehyd stattfinden. Da sowohl Mv-et-(E)C, als auch Mv-et-Mv als Ausgangsstoffe zur Verfügung stehen, laufen auch hier vermutlich beide Bildungswege parallel ab.

Bei Verbindung 13 ((E)C-et-Mv-et-Mv-et-(E)C) lassen Molekülmasse und Fragmentspektren auf einen Aufbau aus zwei Malvidin- und zwei Flavanol-Molekülen schließen, die untereinander über insgesamt drei Ethyliden-brücken gebunden sind. Direkte Interflavan-Bindungen treten nicht auf. Auf Basis des Fragmentspektrums (Abbildung 4-6) wird für die Abfolge der Monomerbausteine die Sequenz (E)C-et-Mv-et-

Mv-et-(E)C vorgeschlagen. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass die beiden ersten im Spektrum auftretenden Fragmente $m/z = 1353,3826 \text{ [M+H -}290]^+$ und m/z = 1063,3040[M+H -290 -290]⁺ jeweils durch die Abspaltung von (Epi)Catechin hervorgerufen werden (Abbildung 4-7). Somit können diese beiden Flavanole nicht intramolekular vorliegen. Bei einer Abfolge Mv-et-Mv-et-(E)C-et-(E)C würde anstelle von m/z = 1063,3040 ein Fragment mit m/z = 1037,2921 (Mv-et-Mv-vinyl) auftreten, da ein Vinylrest aus der Ethyliden-Brücke zwischen den beiden (E)C-Einheiten im Neutralfragment enthalten sein müsste. Bemerkenswert ist außerdem die Spaltung des Moleküls zwischen den beiden Malvidin-Einheiten. Dabei verbleibt die Ethylidenbrücke teilweise als Vinylrest am Fragmention und führt zum Signal m/z = 835,2378, teilweise wird sie zusammen mit dem Neutralfragment abgespalten, wodurch das Signal m/z = 809,2387 entsteht. Letzteres entspricht dem Molekülion des Dimers Mv-et-(E)C (Verbindung 1) und wird analog zum Fragmention 8-Vinylmalvidin (m/z = 519,1468) gespalten, das eigentlich für einfach ethyliden-verbrückte Malvidin-Moleküle charakteristisch ist. Zugleich entsteht aus dem Fragmention m/z = 835,2378 aber auch das für doppelt ethyliden-verbrückte Malvidin-Moleküle typische Fragmention m/z = 545,1575. Nach derzeitigem Kenntnisstand wurde ein derartiges Pigment bisher weder in Modellsystemen noch in Wein nachgewiesen. Es stellt damit einen weiteren Beleg für die Vielfalt der Rotweinpigmente dar.



Abbildung 4-6: Gemessenes Fragmentspektrum von Verbindung 13 ((E)C-et-Mv-et-Mv-et-(E)C) aus dem Precursor Ion m/z = 1643,4736



Abbildung 4-7: Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Verbindung 13 ((E)C-et-Mv-et-Mv-et-(E)C) aus dem Precursor Ion m/z = 1643,4736

4.1.4 Zwischenfazit zum ersten Teil

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse belegen, dass die Acetaldehydinduzierte Polymerisation von Rotweinpigmenten durch Bildung von Ethyliden-Brücken ein kontinuierlicher Prozess ist, der zu immer größeren Addukten führt. Anthocyane können dabei sowohl in Position C8, als auch in Position C6 des A-Ringes Ethyliden-Brücken ausbilden. Damit wird die Polymerisation, anders als in der Literatur postuliert (Es-Safi et al. 1999b), nicht durch den Einbau von Anthocyanen in die Polyphenolkette beendet.

Es wurden mehrere Moleküle detektiert, die Ethyliden-Brücken und zugleich direkte Interflavan-Bindungen aufweisen. Es ist also zu erwarten, dass bei größeren Polyphenol-Polymeren beide Bindungstypen parallel auftreten. Ethyliden-Brücken sind innerhalb der Molekülkette zwischen zwei Anthocyanen, zwischen zwei Flavanolen oder zwischen Anthocyanen und Flavanolen möglich. Die Polymerisation der Polyphenole kann somit potentiell so lange ablaufen, bis alle monomeren Bausteine (Anthocyane, Flavanole, Proanthocyanidine) aufgebraucht sind. Pigmente mit mehreren Ethyliden-Brücken, die bisher nur aus Modell-Systemen bekannt waren, wurden zudem erstmals in Rotwein nachgewiesen.

Die Ergebnisse zeigen ferner, dass das Anthocyan-Flavanol-Verhältnis innerhalb der mehrfach ethyliden-verbrückten Addukte sehr unterschiedlich sein kann. Es wurden Verhältnisse von 2:1 (Verbindung 11), 1:3 (Verbindung 12) und 1:1 (Verbindung 13) beobachtet. Hier stellt sich die Frage, wie sich das Anthocyan-Flavanol-Verhältnis innerhalb eines Polymers auf dessen Farbeigenschaften auswirkt und inwiefern das Verhältnis in Polymeren Pigmenten durch das Verhältnis der frei im Wein vorliegenden Anthocyane und Flavanole beeinflusst wird.

4.2 Teil II: Quantifizierung polymerer Pigmente mittels LC-QToF-MS

4.2.1 Entwicklung der Methode und Kalibrierung

In Teil I dieser Arbeit wurden zahlreiche neue oder bisher nur in Modell-Systemen synthetisierte ethyliden-verbrückte Pigmente nachgewiesen. Das folgende Kapitel befasst sich mit der Frage, welcher Anteil der Anthocyane durch den Einfluss von Sauerstoff zu solchen Pigmenten reagiert.

Eine Quantifizierung ethyliden-verbrückter Pigmente erfolgt in der Literatur meist in Malvidin-3-glucosid Äquivalenten (Cano-López et al. 2006, Wirth et al. 2010), da die Pigmente selbst als Reinsubstanzen für die Quantifizierung kommerziell nicht zur Verfügung stehen. Ihre Synthese ist zwar möglich, aber mit hohem apparativem und zeitlichem Aufwand verbunden (Bakker und Timberlake 1997, Weber und Winterhalter 2014). Häufig erfolgt die Bestimmung zudem über den Diodenarray-Detektor (Kontoudakis et al. 2011, Gambuti et al. 2015). Diese Vorgehensweise kann jedoch zu Fehlern führen, da sich die Extinktionskoeffizienten von Malvidin-3-glucosid und seinen Derivaten je nach vorherrschendem pH Wert unterscheiden. Bei pH 1 weist Malvidin-3-glucosid (bei 520 nm) eine höhere Absorption auf, als eine äquimolare Lösung des Dimers Mv-et-Cat. Oberhalb von pH 3 kehrt sich dies um, sodass die Dimere eine höhere Absorption besitzen (Dueñas et al. 2006b). Üblicherweise werden diese Unterschiede bei der Quantifizierung vernachlässigt.

Steht zusätzlich ein Massenspektrometer zur Verfügung, dient dies in der Regel nur zu Identifizierung (Cejudo-Bastante et al. 2011a, Marquez et al. 2014). Der Grund hierfür ist, dass die Effektivität der Ionisierung in ESI-, APCI- oder vergleichbaren Ionenquellen starken Schwankungen unterworfen ist, die eine Quantifizierung erschweren. Einfacher ist es daher, quantitative Daten mittels vorgeschaltetem UV/Vis- oder Diodenarray-Detektor zu erheben. Bei ausreichender chromatographischer Trennung und Bestimmung von Majorkomponenten, wie Mv-et-(E)C ist eine solche Vorgehensweise möglich und sinnvoll. Für das trimere (E)C-et-Mv-et-(E)C ist dies jedoch schwierig, da insgesamt 16 Diastereomere vorliegen können, die mit anderen Verbindungen, wie (E)C-et-Mv-et-(E)C (E)C oder Mv-et-(E)C teilweise co-eluieren (siehe hierzu auch Tabelle 4-2). Aus diesem Grund erfolgte die Quantifizierung von (E)C-et-Mv-et-(E)C für die vorliegende Arbeit mittels Massenspektrometer. Aus dem Totalionenstrom (TIC) können

Extracted Ion Chromatogramme (EIC) für ein spezifisches m/zdabei (z.B. m/z = 1125,3217) erstellt werden, die eine quantitative Auswertung co-eluierender Stoffe ermöglichen, solange diese sich in ihrer Molekülmasse ausreichend unterscheiden (siehe Abbildung 4-8). Allerdings darf die Konzentration der co-eluierenden Stoffe dennoch nicht zu groß sein, da dies zu Ionensuppression und somit zu verfälschten Messergebnissen führen würde (Unterbestimmung). In der Literatur ist hier teilweise eine semiquantitative Bestimmung üblich, indem die Peakflächen miteinander verglichen werden (Dipalmo et al. 2016). Aufgrund der unterschiedlichen Ionisierbarkeit der Analyten kann dies jedoch, genau wie bei einer Quantifizierung als Malvidin-3-glucosid-Äquivalente, zu einem in seiner Höhe nicht einschätzbaren Messfehler führen. Eine der wenigen Literaturstellen, in denen eine Quantifizierung verschiedener Reaktionsprodukte von Anthocyanen im Massenspektrometer beschrieben ist, sind die Arbeiten von Arapitsas et al. (2012), obgleich die Bestimmung ebenfalls in Äquivalenten der entsprechenden monomeren Anthocyane erfolgte.



Abbildung 4-8: Aus dem TIC berechnetes Extracted Ion Chromatogramm für die Massenspur m/z = 1125,3217 (entsprechend der Masse des Trimers (E)C-et-Mv-et-(E)C).

Die Effektivität der Ionenquelle kann, je nach Zustand des Nebulizers und der Einlasskapillare, erheblich schwanken. Daher ist die Quantifizierung mittels Massenspektrometer nur unter Verwendung interner Standards möglich. Hier wurde Cyanidin-3-rutinosid (Cy-3-ru) ausgewählt, ein Anthocyan, das in Trauben beziehungsweise Wein nicht vorkommt, das den Analyten aber strukturell ähnlich ist und eine gute Wasserlöslichkeit aufweist. Laut Literatur liegt die Halbwertszeit in saurer Lösung (pH 2,8) bei 65 Tagen. Es ist somit in der Matrix weitgehend stabil (Iacobucci und Sweeny 1983). Da alle Anthocyane unter der den Bedingungen der MS Methode 2 bereits in der Ionenquelle vollständig fragmentieren und sich dabei aus Cy-3-ru kein analytisch nutzbares Fragment bildete, wurde für die Quantifizierung lediglich MS Methode 1 verwendet.

Da die Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Ionisierbarkeit der Analyten nicht in Cyanidin-3-rutinosid Äquivalenten ausgedrückt werden sollten, fanden als externe Standards das Dimer Mv-et-C und das Trimer C-et-Cy-et-C Verwendung. Jedem externen Standard und jeder Probe wurden 1 mg/L des Internen Standards Cy-3-ru zugefügt und die Kalibrierfunktionen über den Quotienten der Peakflächen von Standard/Interner Standard erstellt. Die beiden Reinstoffe Mv-et-C und C-et-Cy-et-C wurden dazu von Dr. Eva Schmalfuß und Dr. Fabian Weber in der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Winterhalter (Institut für Lebensmittelchemie, TU Braunschweig) hergestellt und zur Verfügung gestellt. Um das Pyranoanthocyan Vitisin B zu quantifizieren, für das kein Standard zur Verfügung stand, wurde eine Kalibrierung mittels Malvidin-3-glucosid erstellt. Da sich Vitisin B strukturell nur wenig von Malvidin-3-glucosid unterscheidet, kann der dadurch auftretende Fehler vernachlässigt werden. Steigung und Achsenabschnitt aller Kalibrierfunktionen sind in Tabelle 4-4 aufgeführt.

	Steigung	Achsenabschnitt	R^2	LOD ^a	LOQ ^b
Mv-3-gl	2,087	-0,002	1,000	0,017	0,066
Mv-et-C	0,142	+0,001	1,000	0,11	0,42
C-et-Cy-et-C	0,00163	-0,00063	0,995	0,53	1,85

Tabelle 4-4: Steigung und Achsenabschnitt der LCMS Kalibrierungen.

a: Nachweisgrenze, ermittelt aus der linearen Regression der Kalibrierung nach DIN 32645

b: Bestimmungsgrenze, ermittelt aus der linearen Regression der Kalibrierung nach DIN 32645

An den Steigungen der Kalibriergeraden lässt sich erkennen, dass sich das Dimer Mv-et-C um den Faktor 14,7 schlechter ionisieren lässt, als Mv-3-gl. Bei einer Quantifizierung in Mv-3-gl-Äquivalenten käme es so zu einer starken Unterbestimmung. Noch deutlicher wird dies bei C-et-Cy-et-C das um den Faktor 1280 schlechter ionisiert wird als Mv-3-gl. Die schlechte Ionisierung resultiert aus der Notwendigkeit, für die Quantifizierung MS Methode 1 zu nutzen, die für diese Verbindung nur bedingt geeignet ist. Gleichwohl zeigt sich hier, dass eine Angabe in Mv-3-gl Äquivalenten in diesem Fall zu völlig unbrauchbaren Ergebnissen führen würde.

4.2.2 Methodenvalidierung

Im Rahmen einer Methodenvalidierung wurden Wiederholbarkeit und Wiederfindung für die Substanz Mv-et-C bestimmt. Es wurde dazu jeweils nur einer der vier Isomerenpeaks im Chromatogramm ausgewertet, weil nur für dieses Isomer der Referenzstandard zur Verfügung stand. Darüber hinaus war nur eine Charge des Standards verfügbar, deren Reinheit mittels HPLC anhand des DAD-Chromatogramms bei 280 nm bestimmt wurde. Die Messunsicherheit des Verfahrens dürfte daher größer sein, als die vorliegenden Daten erwarten lassen. Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit wurde eine Probe des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders in 10 Wiederholungen gemessen (Tabelle 4-5).

Wiederholung Nr.	Messergebnis (mg/L)
1	2,55
2	2,55
3	2,57
4	2,51
5	2,54
6	2,58
7	2,55
8	2,77
9	2,59
10	2,59

Tabelle 4-5: Messwerte zur Bestimmung der Wiederholpräzision der Methode zur Quantifizierung von Mv-et-C.

Für ein Konfidenzniveau von 95 % errechnet sich aus diesen Daten eine Wiederholpräzision von 0,19 mg/L.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden drei unterschiedliche Rotweine mit jeweils 1 mg/L und 2 mg/L des Mv-et-C Dimers aufdotiert. Die für das Verfahren ermittelte Wiederfindung lag demnach zwischen 95,2 und 101,0 % (Tabelle 4-6) und ist damit sehr zufriedenstellend. Für die vorgesehenen Zwecke scheint das Verfahren daher ausreichend valide zu sein.

Probe	Aufdotiert (mg/L)	Messwert (mg/L)	Wiederfindung (%)
Teslinger	0	0,32	
i rollinger,	1	1,31	99,2
maischevergoren	2	2,22	95,2
0 "(1 1	0	4,12	
Spatburgunder,	1	5,09	97,4
Kommerzielle Probe	2	6,06	96,9
0 "41 1	0	2,50	
Spatburgunder,	1	3,49	99,4
maischeerhitzt	2	4,52	101,0

Tabelle 4-6: Wiederfindung der Methode zur Quantifizierung von Mv-et-C, berechnet anhand dreier unterschiedlicher Weine.

Für das trimere C-et-Mv-et-C konnte aufgrund der nur sehr begrenzt zur Verfügung stehenden Substanzmenge keine entsprechende Validierung durchgeführt werden. Da der Aufbau des Stoffes (Anthocyane, Flavanole, ethyliden-Brücken) jedoch dem des Dimers sehr ähnlich ist, wird davon ausgegangen, dass die Methode auch für diesen Analyten anwendbar ist.

4.2.3 Quantifizierung der Reaktionsprodukte von Malvidin-3-glucosid

Während der Reifung von Rotwein wird, insbesondere unter Anwesenheit von Sauerstoff, stets eine Abnahme von Anthocyanen und Flavanolen beobachtet. Im folgenden Abschnitt erfolgt eine Einschätzung, welcher Anteil dieser Flavanole zu ethylidenverbrückten Addukten und zu Vitisin B reagiert. Dazu erfolgte zunächst die Quantifizierung von Vitisin B, dem Mv-et-(E)C Dimer und dem (E)C-et-Mv-et-(E)C Trimer nach 12 wöchiger Mikrooxygenierung des maischeerhitzen 2013er Spätburgunder mit und ohne Tanninzusatz (Abbildung 4-9).



Abbildung 4-9: Konzentrationen von Vitisin B, Mv-et-(E)C und (E)C-et-Mv-et-(E)C im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder mit und ohne Zusatz oenologischer Traubentannine (UVATANN ST, Ever Intec, Pramaggiore, Italien), nach zwölf-wöchiger Mikrooxygenierung.

Die hier gefundenen Konzentrationen lagen teils wesentlich höher als die publizierten Werte. Cano-López et al. (2006) fanden in mikrooxygenierten Monastrell Weinen Konzentrationen der Malvidin-ethyliden-(Epi)Catechin Dimere von umgerechnet 3,5 bis 4,6 mg/L, während die hier mikrooxygenierten Weine Konzentrationen von bis zu 16 mg/L gefunden wurden. In einem weiteren Versuch wurden etwa 6 bis 7 mg/L der Addukte nachgewiesen (Cano-Lopez et al. 2007). Die von Wirth et al. (2010) in Grenache gemessenen Konzentrationen lagen zwischen 0,2 und 0,4 mg/L, Kontoudakis et al. (2011) fanden in mikrooxygenierten Weinen der Rebsorte Cabernet Sauvignon Konzentrationen zwischen 0,42 und 0,76 mg/L. Somit liegen auch innerhalb der publizierten Daten bereits größere Unterschiede vor. Diese sind möglicherweise darin begründet, dass es sich um Weine unterschiedlicher Rebsorten, mit unterschiedlichen Anthocyankonzentrationen und unterschiedlichen Herstellungsweisen und Lagerbedingungen handelt. In allen Fällen wurde den Weinen jedoch Sauerstoff zugesetzt, sodass ausreichende Mengen Acetaldehyd mit 14 mg/L (Cano-López et al.

2006) und bis zu 45 mg/L (Cano-Lopez et al. 2007) zur Verfügung standen. Die Konzentration der monomeren Anthocyane lag mit 200 bis 500 mg/L in allen Publikationen deutlich über den hier vorhandenen 135 mg/L. Die Flavanolkonzentration wurde nur bei Wirth et al. (2010) und war dort mit 40 bis 90 mg/L vergleichbar mit den hier gemessenen 77 mg/L. Die Ausgangsstoffe zur Bildung ethyliden-verbrückter Pigmente lagen somit (soweit nachvollziehbar) trotz der unterschiedlichen Weine in allen Fällen vor. Möglicherweise wurden die Pigmente in den genannten Publikationen aus anderen Gründen nicht gebildet. Möglicherweise sind die Differenzen aber auch auf das verwendete Analyseverfahren zurückzuführen.

Dipalmo et al. (2016) verglichen die Peakflächen in den Extracted Ion Chromatogrammen von Malvidin-3-glucosid und den ethyliden-verbrückten Anthocyan-Flavanol Dimeren und geben auf Basis dieser Daten an, dass in dem von ihnen untersuchten jungen Rotwein der Rebsorte Primitivo das ethyliden-verbrückte Anthocyan-Flavanol-Addukte etwa 2,8 % des Gehalts monomerer Anthocyane betrug. Im hier untersuchten Spätburgunder lag dieses Verhältnis in der Kontrolle in Woche 12 bei etwa 8 % und in dem mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Wein bei 22 % und damit ebenfalls höher.

Arapitsas et al. (2012) quantifizierten direkt mittels Massenspektrometer und nicht mit dem DAD. In jüngeren Sangiovese Weinen fanden sie so Konzentrationen zwischen 5 und 14 mg/L, die somit mit den hier bestimmten Werten vergleichbar sind. In diesen Untersuchungen wurde allerdings kein interner Standard verwendet und die Bestimmung erfolgte in Äquivalenten von Malvidin-3-glucosid.

4.2.4 Bilanzierung der Stoffmengen

Um zu ermitteln, wie groß die Ausbeute ethyliden-verbrückter Anthocyan-Flavanol Addukte bei der Mikrooxygenierung ist, wurden die Konzentrationen von Malvidin-3glucosid und (Epi)Catechin, sowie von Vitisin B, Mv-et-(E)C und (E)C-et-Mv-et-(E)C, vor und nach der Sauerstoffzugabe bestimmt. Daraus wurde jeweils die Differenz berechnet und in μ mol/L angegeben. Die Differenz der vor und nach der Sauerstoffzugabe gemessenen Helligkeit L* soll außerdem die Zusammenhänge mit der Farbintensität aufzeigen. Die Konzentrationen von Malvidin-3-glucosid und (Epi)Catechin (Abbildung 4-10) nahmen demnach bei 0 mg O₂/L/Monat und ohne Tanninzusatz um 24 µmol/L bzw. 42 µmol/L ab. Zugleich wurden in diesem Wein keine Zunahmen von Vitisin B, Mv-et-(E)C oder (E)C-et-Mv-et-(E)C gemessen. Da ohne Sauerstoff kein Acetaldehyd für deren Bildung zur Verfügung stand, erscheint dies plausibel. Es zeigt aber, dass während der Reifephase andere, Acetaldehyd-unabhängige Reaktionen abliefen. Abbildung 4-11 zeigt, dass die Helligkeit dieses Weines um zugleich 2 Einheiten abnahm. Die Reaktionen wirkten sich somit positiv auf die Farbintensität aus.

In dem mit 10 mg $O_2/L/Monat$ mikrooxygenierten Wein nahmen während des gleichen Zeitraumes Malvidin-3-glucosid um 52 µmol/L und (Epi)Catechin um 68 µmol/L ab, was 217 % bzw. 162 % der in der Kontrolle gemessenen Abnahme entspricht. Die Helligkeit nahm um 7 Einheiten ab. Setzt man die Abnahme der Helligkeit ins Verhältnis mit der Abnahme der Anthocyankonzentration, verringerte sich L* in der Variante 0 mg O_2 um 0,94 AU pro 10 µmol/L Mv-3-gl, in der Variante 10 mg O_2 hingegen um 1,62 AU pro 10 µmol/L Mv-3-gl. Damit konnte die Farbintensität hier durch den Sauerstoffzusatz effektiver gesteigert werden. In der Variante mit 20 mg O_2 jedoch betrug die Abnahme von L* 1,07 AU pro 10 µmol/L Mv-3-gl und war damit ähnlich wie in der Variante ohne Sauerstoffzugabe. Es ist daher unklar, ob ein Zusatz von Sauerstoff die Weinfarbe stets effektiver steigert oder ob der Zusatz von 20 mg $O_2/L/Monat$ zu einer Überoxidation führte, die eine potentiell größere Effektivität ausglich.

Es ist anzunehmen, dass die Mikrooxygenierung die in der Variante mit 0 mg $O_2/L/M$ onat beobachteten, Sauerstoff-unabhängigen Reaktionen nicht unterbindet, sondern dass die Bildung von Vitisin B und ethyliden-verbrückten Pigmenten zusätzlich stattfindet. Betrachtet man also nur die Differenz zur Kontrolle, reagierten in dem mit 10 mg $O_2/L/M$ onat mikrooxygenierten Wein zusätzlich 28 µmol/L Mv-3-gl und 26 µmol/L (Epi)Catechin. Die zur Quantifizierung ausgewählten Produkte enthielten hingegen 10 µmol/L (Epi)Catechin und 14 µmol Mv-3-gl. Damit können 50 % der durch die Mikrooxygenierung zusätzlich bewirkten Anthocyanabnahme mit der Bildung von Vitisin B und der ethyliden-verbrückten Di- und Trimere erklärt werden. Bei den von Cano-López et al. (2006) publizierten Daten nahm die Konzentration von Mv-3-gl unter dem Einfluss von Sauerstoff um 31,4 µmol/L stärker ab, als in der ohne Sauerstoff ausgebauten Kontrollvariante, die gemessene Zunahme von Vitisin B und ethyliden-verbrückten Dimeren betrug zusammen 1,35 µmol/L und erklärt damit nur 4 % der


Anthocyanabnahme. Aus den Ergebnissen von Kontoudakis et al. (2011) errechnet sich für Wein A (pH 3,5) so ein Wert von 5,9 % und für Wein B (pH 3,5) ein Wert von 6,3 %.

Abbildung 4-10: Veränderung der Konzentrationen von Malvidin-3-glucosid und (Epi)Catechin, sowie von Vitisin B, Mv-et-C und C-et-Mv-et-C im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder während einer zwölf-wöchigen Reifephase mit und ohne Sauerstoffzugabe. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Die 50% der Anthocyane, deren Abnahme sich nicht durch die quantifizierten Produkte erklären ließ, reagierte vermutlich zu Addukten aus Malvidin und Proanthocyanidinen oder zu völlig anderen Produkten, etwa Vinylcatechin-Pyranoanthocyanen. Sehr wahrscheinlich werden außerdem auch die C-et-Mv-et-C Trimere zu tetrameren Addukten weiterreagieren, wie sie in Teil I dieser Arbeit detektiert wurden.

Die Konzentration von (Epi)Catechin nahm bei 10 mg O₂/L/Monat stärker ab, als die von Malvidin-3-glucosid. Die Veränderung von Mv-et-(E)C und (E)C-et-Mv-et-(E)C erklärt nur 38 % dieser Abnahme. Teilweise erklärt sich dies daraus, dass diese beiden Flavanole nicht nur mit Malvidin-3-glucosid, sondern gleichermaßen auch mit den anderen Anthocyanen reagierten. Der Anteil von Malvidin-3-glucosid am Gesamtanthocyangehalt lag in allen Versuchsvarianten zu beiden Messzeitpunkten bei 75,4 \pm 0,8 %. Man kann daher davon ausgehen, dass sich die übrigen Anthocyane während des Versuchs vergleichbar mit Malvidin-3-glucosid verhielten und dass vergleichbare Verbindungen zu Mv-et-(E)C und (E)C-et-Mv-et-(E)C auch aus Delphinidin-, Cyanidin-, Petunidin- und Peonidin-3-glucosid gebildet wurden. Berücksichtigt man dies, lässt sich die Abnahme von (Epi)Catechin ebenfalls zu 50 % erklären.



Abbildung 4-11: Abnahme der Helligkeit im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder während einer zwölf-wöchigen Reifephase mit und ohne Mikrooxygenierung. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

In dem mit 20 mg $O_2/L/M$ onat mikrooxygenierten Wein nahmen die Konzentrationen von Malvidin-3-glucosid um 70 µmol und die von (Epi)Catechin um 52 µmol ab. Die Reaktionsprodukte enthielten insgesamt 24 µmol Malvidin-3-glucosid und 21 µmol (Epi)Catechin. Diese erklären somit nur 34 % (Malvidin) bzw. 40 % ((Epi)Catechin) der Abnahme der Edukte. Bei (Epi)Catechin bleibt der Anteil damit gleich, während er bei Malvidin wesentlich geringer ist, als bei der Variante mit 10 mg $O_2/L/M$ onat. Diese zusätzliche Abnahme von Malvidin kann nicht allein durch die Bildung von Vitisin B erklärt werden, da die gebildete Menge bei 20 mg $O_2/L/M$ onat nur geringfügig höher war, als bei 10 mg O_2 . Auch hier müssen also weitere, bisher unbekannte Pigmente gebildet worden sein. Auch eine oxidative Zerstörung der Pigmente kommt als Ursache in Frage.

In einem weiteren Versuchsteil wurden dem 2013er maischeerhitzten Spätburgunder bereits vor der Gärung oenologische Tannine zugesetzt, um das Verhältnis von Anthocyanen zu Tanninen zu variieren. Bei 0 mg O₂/L/Monat führte dies im Vergleich mit der Variante ohne Tanninzusatz zu einer verstärkten Abnahme von Anthocyanen und Flavanolen. Trotz der erhöhten Konzentration der Flavanole war das Verhältnis zwischen Anthocyan- und Flavanolabnahme mit 0,53 identisch mit jenem das ohne Tanninzugabe beobachtet wurde. Die Konzentration von ethyliden-verbrückten Pigmenten und Vitisin B nahm geringfügig zu, was ohne Tanninzusatz nicht zu beobachten war.

Der Zusatz von 10 mg O₂/L/Monat führte auch in diesem Versuchsteil zu einer stärkeren Abnahme von Anthocyanen und Flavanolen, während sich der Anteil der Sauerstoffabhängigen Reaktionsprodukte kaum unterschied. Sauerstoff führte gegenüber der Lagerung unter Sauerstoffausschluss auch hier zu einem veränderten Verhältnis der Abnahme von Anthocyanen und Flavanolen. Vergleichbar mit jener Versuchsvariante ohne Tanninzusatz lag dieses Verhältnis bei 0,79. Der Tanninzusatz führte insgesamt nicht zu einer verstärkten Bildung ethyliden-verbrückter Dimere. Allerdings war der Anteil der trimeren Pigmente etwas höher als ohne Tanninzusatz. Die Helligkeit in der mikrooxygenierten und der nicht-mikrooxygenierten Variante nahm jeweils stärker ab, als in der Variante ohne Tanninzusatz. Dies muss auf eine verstärkte Bildung Sauerstoff-unabhängiger Reaktionsprodukte zurückzuführen sein, was sich in den Varianten mit 0 mg O₂/L/Monat zeigt.

4.2.5 Zwischenfazit zum zweiten Teil

Die Konzentration der ethyliden-verbrückten Malvidin-(Epi)Catechin Di- und Trimere, sowie von Vitisin B wurden unter Verwendung von Referenzsubstanzen sowie eines internen Standards mittels Massenspektrometer quantifiziert. Es zeigte sich dabei, dass die ethyliden-verbrückten Dimere um den Faktor 14,7 und die Trimere um den Faktor 1280 schlechter ionisiert werden als die das monomere Malvidin-3-glucosid. Da in der Literatur häufig eine Quantifizierung der Dimere in Äquivalenten von Malvidin-3-glucosid erfolgt (Kontoudakis et al. 2011, Gambuti et al. 2015), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass diese Verbindungen allgemein unterbestimmt werden und dass deren Einfluss auf die Farbe von Rotwein somit unterschätzt wird.

Die Bilanzierung der Stoffmengen zeigte, dass bis zu 50 % der durch die Zugabe von Sauerstoff bewirkten Abnahme von Malvidin-3-glucosid und (Epi)Catechin durch die Entstehung von Vitisin B, sowie ethyliden-verbrückten Di- und Trimeren erklärt werden konnte. Dieser Wert war, wie aus den vorhergehenden Überlegungen zu erwarten, höher als die in der Literatur gefundenen Werte (Cano-Lopez et al. 2007, Wirth et al. 2010, Kontoudakis et al. 2011). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass auch ohne eine gezielte die Anthocyankonzentration Ohne Sauerstoffzugabe abnimmt. Sauerstoff beziehungsweise Acetaldehyd entstehen die oben genannten Pigmente jedoch kaum. Stattdessen reagierten die Anthocyane offenbar zu anderen Pigmenten. Auch diese Reaktionen führten zu einer intensiveren Farbe des Rotweines. Da bei einem Sauerstoffzusatz jedoch zusätzlich die ethyliden-verbrückten Pigmente gebildet wurden, nahm die Farbe der Weine hier erheblich stärker zu.

4.3 <u>Teil III: Sauerstoff-induzierte Stabilisierung der Rotweinfarbe</u> (Mikrooxygenierung)

Unterschiedliche Weine benötigen unterschiedliche Mengen Sauerstoff. Versuche, den individuellen Sauerstoff-"Bedarf" exakt vorherzusagen, gestalten sich aufgrund der großen Zahl oxidierbarer Stoffe im Wein jedoch schwierig: Der mengenmäßig wichtigste oxidierbare Stoff im Wein ist der Alkohol, der zu Acetaldehyd oxidiert werden kann und dessen Konzentration sich leicht messen lässt. Schwieriger ist es, die verschiedenen Polyphenole, wie Anthocyane, Flavanole, Tannine, Hydroxyzimtsäuren sowie weitere Flavonoiden und nicht-Flavonoiden einzeln zu erfassen. Dabei wäre gerade dies unverzichtbar, da sie auf unterschiedliche Weise involviert sind: Sie können zu Chinonen oxidiert werden, sind an der Umsetzung von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid beteiligt und können außerdem mit Acetaldehyd als Oxidationsprodukt von Ethanol auf verschiedene Weise reagieren. Da die Reaktivität der Polyphenole so unterschiedlich sein kann, ist die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes allein nicht ausreichend. Stattdessen muss zumindest zwischen Anthocyanen, Tanninen und sonstigen Polyphenolen unterschieden werden. Darüber hinaus spielen auch SO2 und der Reduktongehalt sowie schwefelhaltige Proteine, Aminosäuren und Peptide wie GSH für Oxidationsprozesse im Wein eine Rolle. Kupfer- und Eisenionen sind katalytisch direkt an der Bildung von Wasserstoffperoxid, Acetaldehyd und weiteren Stoffen beteiligt, sodass auch deren Konzentrationen bestimmt werden müssten. Weiterhin ist die Löslichkeit des Sauerstoffs zu beachten, die nicht nur von der Temperatur sondern auch vom Alkohol- und Trubgehalt des Weines abhängt. Zuletzt ist der pH-Wert ein wichtiger Faktor, da manche Reaktionen durch eine hohe Protonenkonzentration gefördert, andere inhibiert werden. Der Aufwand alle Parameter zu messen und so den Sauerstoffbedarf zu bestimmen, wäre für die Anwendung in der Weinbereitung zu groß. Praktikabler ist es hingegen, während Anwendung anhand einiger aussagekräftiger Messwerte die Höhe der der Sauerstoffdosage anzupassen und schließlich zu beenden. Ziel des folgenden Kapitels ist es, analytische Verfahren zu prüfen, ob diese für eine solche Prozesskontrolle geeignet sind.

Während der Mikrooxygenierung des maischeerhitzten 2013er Spätburgunders und des maischeerhitzten 2013er Trollingers wurden mehrfach die Gehalte von Acetaldehyd, Anthocyanen, Flavanolen, Vitisin B, ethyliden-verbrückten Malvidin-(Epi)Catechin-

Addukten, sowie kleinen und großen polymeren Pigmenten bestimmt. Weiterhin wurden die Farbqualität und die Helligkeit als Indikator für den Erfolg des Verfahrens gemessen. Die in diesen Versuch applizierten Sauerstoffdosagen betrugen 0 (Kontrollvariante), 10 und 20 mg O₂/L/Monat. Die Sauerstoffdosage erfolgte beim Spätburgunder mit konstanter Rate über zwölf Wochen. Da die Konzentration der Anthocyane beim Trollinger schneller abnahm, wurde der Versuch bereits nach neun Wochen beendet.

4.3.1 Acetaldehyd

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Bildung von Addukten zwischen Anthocyanen und Proanthocyanidinen über Acetaldehyd die Farbintensität von Rotwein effektiv steigern kann. Zugleich ist Acetaldehyd die Leitsubstanz für den oxidativen Geruch und zudem Ausgangsstoff für die Bildung weiterer oxidativer Aromen wie Sotolon (Escudero et al. 2000a). Es gilt, während der Mikrooxygenierung die Acetaldehydkonzentration einerseits in dem Maße zu erhöhen, dass eine Polyphenolpolymerisation ermöglicht wird und andererseits so niedrig zu halten, dass sich keine oxidativen Aromen manifestieren.

Zum Verständnis der chemischen Prozesse wurde die Acetaldehydkonzentration während der Mikrooxygenierung des 2013er Spätburgunders im Rahmen eines gemeinsamen Projektes von Frau Dipl.-Lebensmittelchemikerin Hai-Linh Trieu gemessen (Abbildung 4-12). Nach Beginn des Sauerstoffzusatzes zeigten sich in diesem Versuch erstmals nach vier Wochen Unterschiede zwischen den mikrooxygenierten Weinen und der Kontrollvariante. Danach erfolgte eine Akkumulation sowohl bei 10 als auch bei 20 mg O₂/L/Monat bis zum Ende der Sauerstoffzugabe in Woche zwölf. Zu diesem erreichte der Variante mit 20 mg $O_2/L/Monat$ Zeitpunkt sie in eine Acetaldehydkonzentration von 75 mg/L. Nach dem Ende des Sauerstoffzusatzes, begann die Acetaldehydkonzentration langsam zu sinken. Nach zwei Wochen lag sie bei etwa 85% der Maximalkonzentration. Diese Beobachtung lässt erwarten, dass auch nach zwei Wochen noch mit weiteren Reaktionen der polymeren Pigmente zu rechnen ist. Außerdem muss dies bei der SO₂-Gabe berücksichtigt werden. Da sich Acetaldehyd und SO2 miteinander verbinden und gegenseitig unwirksam machen, müssten erheblich größere Mengen SO₂ zugegeben werden, um eine ausreichende Konzentration freier und mikrobiologisch wirksamer SO₂ zu erzielen. Dies ist für die Praxis von Bedeutung, da der Gesamt-SO₂ Gehalt, je nach Weinart, Prädikat und Restzuckergehalt gesetzlich limitiert ist. Für biologisch erzeugte Weine gelten nochmals um 30 bis 50 mg/L geringere Grenzwerte (EU 2009). Diese können nur eingehalten werden, wenn die Konzentrationen von Acetaldehyd und ähnlichen Carbonylverbindungen zum Zeitpunkt der SO₂-Gabe möglichst gering sind. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen daher, dass nach der Mikrooxygenierung deutlich länger als zwei Wochen mit der SO₂-Gabe gewartet werden sollte. Bei einer linearen Abnahme der Acetaldehydkonzentration wären in diesen Weinen nach acht Wochen etwa 60% der maximalen Acetaldehydmenge abgebaut. Dies würde in der Variante mit 10 mg O2/L/Monat eine Konzentration von 18 mg/L Acetaldehyd und in der Variante mit 20 mg O2/L/Monat eine Konzentration von 30 mg/L Acetaldehyd bedeuten. Ein Milligramm Acetaldehyd bindet bei stöchiometrisch vollständiger Reaktion 1,45 mg SO₂ und würde damit in den beiden mikrooxygenierten Weinen 26 bzw. 44 mg gebundenes SO₂ erzeugen. Dies steht 16 mg durch Acetaldehyd gebundenem SO_2 in der Kontrollvariante gegenüber. Damit würde die Mikrooxygenierung hier zu einer um 10 bzw. 28 mg erhöhten Gesamt-SO₂ führen. Der Zusammenhang zwischen Sauerstoffzusatz und der Höhe der gesamten SO2 wird in Abschnitt 4.4.2 umfassend diskutiert.



Abbildung 4-12: Konzentration von Acetaldehyd während der Mikrooxygenierung eines 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Auffallend sind in Abbildung 4-12 die großen Fehlerindikatoren bei den Varianten 10 mg O₂ und 20 mg O₂. Sie zeigen an, dass größere Differenzen zwischen den in den Versuchswiederholungen gemessenen Acetaldehydkonzentrationen auftraten. Diese sind nicht auf die Messunsicherheit des Analyseverfahrens zurückzuführen, wie die erheblich kleineren Fehlerindikatoren in der Kontrollvariante zeigen. Die Differenzen zwischen den Versuchswiederholungen sind daher entweder auf unterschiedliche Konzentrationen gelösten Sauerstoffs oder auf eine unterschiedliche Geschwindigkeit in der Umsetzung zurückzuführen. Unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen könnten durch Abweichungen in der Dosiergenauigkeit der verwendeten Mikrooxygenierungsanlagen verursacht werden. Dies wurde jedoch überprüft und scheidet als Ursache aus. Die Konzentration gelöster Gase in flüssigen Medien ist allgemein jedoch abhängig vom Gehalt an Trubstoffen: Je mehr Trub, desto schlechter die Löslichkeit. Da Weintrub in aller Regel nicht gleichmäßig in einer Charge verteilt ist, kann es bei der Aufteilung auf mehrere Partien zu Differenzen kommen. Auch das Absetzverhalten des Trubes ist nicht immer gleich, da sich grober Trub schneller absetzt als Feintrub. Weiterhin bilden sich an den Sauerstoffdiffusoren während der Mikrooxygenierung Weinsteinkristalle, die einen Einfluss auf die Größe der Sauerstoffblasen hat und damit auch auf deren Löslichkeit im Wein. Umgekehrt können auch unvermeidbare Mengen von Sauerstoff durch (verschlossene) Spundlöcher und andere Tanköffnungen diffundieren oder während der Probennahme in den Wein gelangen (Durner et al. 2010a). Alle genannten Faktoren tragen zusammen zu einer Unsicherheit bei der Sauerstoffdosage und der entstehenden Konzentration von Acetaldehyd bei.

4.3.2 Malvidin-3-glucosid, (Epi)Catechin, Caftar- und Kaffeesäure

Wie bereits dargelegt, kann Acetaldehyd auf unterschiedliche Weise mit Polyphenolen im Wein reagieren. Die Konzentrationen einiger Polyphenole wurden daher während der Sauerstoffzugabe immer wieder mittels HPLC-DAD-FP bestimmt. Ausgewählt wurden dazu Malvidin-3-glucosid, die Flavanole Catechin und Epicatechin, deren Konzentrationen aufaddiert wurden (im Folgenden als (Epi)Catechin bezeichnet), sowie Caftar- und Kaffeesäure, als wichtigsten Repräsentanten der Hydroxyzimtsäuren.

In Abbildung 4-13 ist die Veränderung der Konzentrationen von Malvidin-3-glucosid während der Mikrooxygenierung des maischeerhitzten 2013er Spätburgunders dargestellt.

Während des 14-wöchigen Versuchszeitraumes nahm diese in allen Varianten ab. Während der Weinreifung ist dies stets zu beobachten, da Anthocyane und Flavanole miteinander reagieren. Die Geschwindigkeit dieser Reaktionen kann jedoch sehr unterschiedlich sein. In der Kontrollvariante ist die Abnahme vermutlich auf Sauerstoffund Acetaldehyd-unabhängige Reaktionen zurückzuführen. Die entstehenden Produkte sind jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand teilweise farblos (Remy-Tanneau et al. 2003). Solche Reaktionen tragen daher wahrscheinlich zu den gelegentlich beobachteten Farbverlusten während der Weinreifung unter reduktiven Bedingungen bei. Der Zusatz von Sauerstoff führte zu einer erheblich schnelleren Abnahme von Malvidin-3-glucosid als in der Kontrollvariante, insbesondere bei Gabe von 20 mg O₂/L/Monat. Entgegen der Erwartung nahm die Konzentration von Malvidin-3-glucosid während der ersten beiden Versuchswochen in der Variante 10 mg O₂/L/Monat etwas zu. Ähnliches wurde auch von del Carmen Llaudy et al. (2006) beobachtet, die dies auf eine (oxidative) Spaltung der ethyliden-verbrückten Anthocyan-Flavanol Dimere zurückführten. Dies kann hier jedoch nicht die Ursache sein, da die Konzentration dieser Stoffe durch die Mikrooxygenierung zu- statt abnahm (siehe Abschnitt 4.3.3) und im Widerspruch zu der genannten Publikation die Farbintensität zunahm (siehe Abschnitt 4.3.4). Ein Erklärungsansatz wäre stattdessen die erhöhte Strömungsaktivität im Gebinde. Diese entsteht während der Mikrooxygenierung durch Sauerstoffblasen und dadurch ausgetriebenes CO₂ und führt zu einer Verwirbelung des sonst am Tankboden sitzenden Weintrubes. Dieser Trub besteht aus Hefen und feinen Traubenbestandteilen, die Anthocyane und andere Polyphenole adsorbieren (Vasserot et al. 1997). Durch die Bewegung des Trubes können adsorbierte Anthocyane wieder in Lösung gehen und so die Anthocyankonzentration im Wein erhöhen. Durch einen schnelleren chemischen Umsatz nahm die Konzentration von Malvidin-3-glucosid im weiteren Versuchsverlauf erwartungsgemäß schnell ab, sodass am Ende des Versuchs in den beiden mikrooxygenierten Weinen deutlich weniger Anthocyane vorlagen als in der Kontrolle.



Abbildung 4-13: Konzentration von Malvidin-3-glucosid während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Beim maischeerhitzten Trollinger nahm die Konzentration von Malvidin-3-glucosid in den mikrooxygenierten Varianten deutlich schneller ab, als beim Spätburgunder (Abbildung 4-14). Innerhalb der neun Versuchswochen betrug die Abnahme bei 20 mg O₂/L/Monat 55 %. Beim Spätburgunder waren es zu diesem Zeitpunkt nur 34 %. Der Unterschied zwischen der mit 10 und der mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Variante war beim Trollinger außerdem geringer. Hier war möglicherweise bei 10 mg O₂/L/Monat bereits der maximale Umsatz erreicht. Zu Beginn des Versuchs kam es zudem nicht zu einem Anstieg der Konzentration.



Abbildung 4-14: Konzentration von Malvidin-3-glucosid während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Trollingers. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Abbildung 4-15 zeigt, dass beim Spätburgunder auch die Konzentration von (Epi)Catechin abnahm. In der Kontrollvariante nahm die Konzentration etwa so stark ab wie die von Malvidin-3-glucosid, in den beiden mikrooxygenierten Varianten war die Abnahme der von Malvidin-3-glucosid hingegen stärker. Dies deutet auf die Bildung von ethyliden-verbrückten Malvidin-Malvidin-Dimeren oder Vitisin B hin, die ohne Beteiligung von (Epi)Catechin abläuft. Da die Abnahme von Malvidin-3-glucosid und (Epi)Catechin in der Kontrollvariante gleich stark ausgeprägt war, bildeten sich hier offenbar eher direkt verknüpfte Malvidin-(Epi)Catechin-Dimere und kaum Malvidin-Malvidin-Dimere. Gleiches wurde beim maischeerhitzten Trollinger beobachtet und ist daher nicht dargestellt.



Abbildung 4-15: Konzentration von (Epi)Catechin während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Hydroxyzimtsäuren können mit Anthocyanen zu Vinylphenoladdukten reagieren (Schwarz et al. 2003b). Die Konzentrationen der Caftarsäure und die daraus durch Hydrolyse entstehende Kaffeesäure veränderten sich beim Spätburgunder und beim Trollinger weder in der Kontrolle noch in einer der mikrooxygenierten Varianten. Auf eine Darstellung wurde daher verzichtet. Obwohl der in der Literatur vorgeschlagene Reaktionsweg die Abgabe von 4 Elektronen erforderlich macht und oxidative Bedingungen die Bildung der Vinylphenoladdukte fördern sollte, wurde konnte auch in der Literatur anhand Modellversuchen kein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Sauerstoff und der Bildung dieser Pigmente festgestellt werden (Schwarz et al. 2003b). Zudem scheinen diese Reaktionen sehr langsam (über Jahre) abzulaufen und waren daher in dem hier beobachteten Versuchszeitraum vermutlich nicht messbar. Die Umsetzung mit Sauerstoff zu Chinonen über die Fenton-Reaktion lief offenbar ebenfalls nicht in einem Umfang ab, der sich auf die Konzentration der Hydroxyzimtsäuren messbar auswirkte.

4.3.3 Ethyliden-verbrückte Anthocyan-Flavanol Addukte und Vitisin B

Die Konzentration der Malvidin-ethyliden-(Epi)Catechin Dimere (Mv-et-(E)C) wurden in den während der Mikrooxygenierung des Spätburgunders und des Trollingers entnommenen Proben ebenfalls mit der in Teil II entwickelten Methode bestimmt. Diese Anthocyan-Derivate werden aufgrund ihrer intensiven rot-violetten Färbung und ihrer relativ hohen Beständigkeit gegenüber Bleichung durch SO₂ als wichtiger Bestandteil der Rotweinfarbe angesehen. Abbildung 4-16 zeigt, wie die Konzentration dieser Pigmente durch die Zugabe von Sauerstoff gefördert wird. Zu Beginn des Versuchs in Woche 0 lagen die Mv-et-(E)C Dimere in einer Konzentration von ca. 7,5 mg/L vor. In der Kontrollvariante nahm die Konzentration danach zunächst etwas zu, veränderte sich nach der vierten Versuchswoche jedoch kaum noch. Nach zwölf Wochen lag die Konzentration bei 9 mg/L.



Abbildung 4-16: Konzentration der Mv-et-(E)C Dimere während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Wurden dem Wein 20 mg O₂/L/Monat zugefügt, führte dies innerhalb der ersten vier Wochen zu einer Verdoppelung der Konzentration von 7,5 auf 15 mg/L. Bei 10 mg O₂/L/Monat erreichte die Konzentration der Dimere nach vier Wochen eine Konzentration von 12 mg/L. In beiden Varianten wurde nach diesem Zeitpunkt keine weitere Zunahme der Konzentration gemessen, obwohl noch genügend Acetaldehyd, Malvidin-3-glucosid und (Epi)Catechin für die Reaktion zur Verfügung standen. Tatsächlich nahmen die Konzentrationen von Malvidin-3-glucosid und (Epi)Catechin auch nach der vierten Woche mit unverminderter Geschwindigkeit ab (siehe Abschnitt 4.3.2). Letzteres deutet darauf hin, dass auch nach der vierten Woche Mv-et-(E)C gebildet wurde. Die stagnierende Konzentration dieser Dimere lässt sich dadurch erklären, dass es sich dabei um Zwischenprodukte handelt, die in weiteren, sekundären Reaktionen zu Folgeprodukten reagieren.

Zur Steuerung eines Sauerstoffzusatzes könnte eine stagnierende Konzentration ethyliden-verbrückter Mv-et-(E)C Dimere als Zeichen einer übermäßigen Polymerisation infolge einer zu hohen Sauerstoffdosage sein. Dagegen spricht, dass potentielle Reaktionsprodukte ebenfalls positive Farbeigenschaften aufweisen können. Die in Abschnitt 4.3.5 gemessenen Farbeigenschaften zeigen, dass die Helligkeit der Weine auch nach der vierten Versuchsweine abnahm und legen diese Vermutung nahe.

Beim maischeerhitzten Trollinger wichen die Konzentrationen der Mv-et-(E)C Dimere von dem Muster im Spätburgunder ab (Abbildung 4-17). Auch bei diesem Wein wurde bei Zusatz von Sauerstoff eine Zunahme beobachtet. Obwohl die Konzentrationen von Malvidin-3-glucosid deutlicher abnahmen als beim Spätburgunder, nahmen die Konzentrationen der ethyliden-verbrückten Dimere langsamer zu und waren insgesamt erheblich geringer. Es bildete sich, möglicherweise aus diesem Grund, auch keine Phase stagnierender Konzentrationen. Eine Ursache für die verminderte Bildung ist vermutlich der pH, der beim Trollinger bei 3,8, beim Spätburgunder hingegen bei 3,5 lag (jeweils gemessen nach dem biologischen Säureabbau). Allerdings erklärt dies nicht, aus welchem Grund die Konzentration der Anthocyane schneller abnahm als beim Spätburgunder.



Abbildung 4-17: Konzentration der Mv-et-(E)C Dimere während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Trollingers. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Mögliche Folgeprodukte, die sich auch ohne den Einfluss von Acetaldehyd aus ethylidenverbrückten Mv-et-(E)C Dimeren bilden könnten, wären Mv-et-(E)C-(E)C Trimere. Interflavanbindungen in Proanthocyanidinen werden jedoch unter Wein-Bedingungen eher gespalten als gebildet (Vidal et al. 2002), sodass letzteres unwahrscheinlich ist. Das Verhalten der Konzentrationen der Mv-et-(E)C-(E)C Trimere, die in Äquivalenten des Mv-et-C Dimers angegeben wurden (Abbildung 4-18), belegt dies. Während des Versuchs blieb die Konzentration in der Kontrollvariante nahezu unverändert. Ohne Sauerstoff beziehungsweise Acetaldehyd war eine Bildung somit nicht möglich, obwohl für die Reaktion etwa 8 mg/L des potentiellen Eduktes Mv-et-(E)C vorhanden waren. In den beiden mikrooxygenierten Weinen, in denen Acetaldehyd als Reaktionspartner verfügbar war, nahmen die Konzentrationen hingegen deutlich zu. Der Anstieg erfolgte gleichzeitig mit der Zunahme der Mv-et-(E)C Dimere. Bei einer Bildung aus diesen Dimeren wäre eher etwas verzögerte Bildung zu erwarten gewesen. Die Bildung eines konstanten Konzentrationsniveaus blieb bei den Mv-et-(E)C-(E)C Trimere aus. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Polymerisation der Weinpigmente nicht, oder nur sehr langsam, über die direkte Reaktion von Flavanolen mit endständigen Flavanolen erfolgen kann.



Abbildung 4-18: Konzentration von Mv-et-(E)C-(E)C während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Quantifizierung als Äquivalente des Dimers Mv-et-C. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Das doppelt ethyliden-verbrückte (E)C-et-Mv-et-(E)C Trimer muss ein Folgeprodukt von Mv-et-(E)C sein, da sich Malvidin zwischen den beiden (Epi)Catechin-Einheiten befindet. Somit können diese trimeren Pigmente nur aus der Reaktion zwischen den ethyliden-verbrückten Malvidin-(Epi)Catechin Dimeren und (Epi)Catechin hervorgegangen sein. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung dieser Trimere sind in Abbildung 4-19 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Konzentration der trimeren Pigmente in der Kontrollvariante ohne Sauerstoffzugabe während des gesamten Versuchszeitraums unterhalb der Nachweisgrenze (0,53 mg/L) blieb. Bei Zugabe von 10 mg O₂/L/Monat, konnte ab der achten Versuchswoche eine kontinuierliche Zunahme der Konzentration um durchschnittlich 0,5 mg/L pro Woche festgestellt werden. In der Variante mit 20 mg O₂/L/Monat waren trimere Pigmente bereits ab der vierten Versuchswoche nachweisbar. Die Konzentrationszunahme betrug hier pro Woche im

Durchschnitt 0,75 mg/L und lief damit auch etwas schneller ab als in der Variante mit 10 mg O₂/L/Monat, in der die Trimere erst ab der achten Woche nachgewiesen werden konnten. In beiden mikrooxygenierten Chargen trat die Bildung der Trimere gegenüber den Dimeren etwas verzögert auf.



Abbildung 4-19: Konzentration der (E)C-et-Mv-et-(E)C Trimere während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Wenn die Mengen der gebildeten Trimere die nach Woche 4 stagnierende Konzentration der Dimere erklären kann, müsste die Summe aus Dimeren und Trimeren linear ansteigen. Um dies zu überprüfen, wurden die Konzentrationen der Dimere und Trimere in µmol/L umgerechnet und aufsummiert (Abbildung 4-20). Es ist zu erkennen, dass die Trimere das beobachtete Phänomen nicht vollständig erklären können. Bei der mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Versuchsvariante steigen die aufsummierten Konzentrationen zwar auch nach der vierten Versuchswoche noch etwas an. Dennoch flacht die Kurve auch in dieser Darstellung deutlich ab. Dies deutet darauf hin, dass die (E)C-et-Mv-et-(E)C Trimere ebenfalls nicht stabil sind und daraus noch größere Polymere gebildet werden. So konnten in Teil I dieser Arbeit in weiteren Versuchen qualitativ Addukte aus vier und fünf Flavanol-Einheiten nachgewiesen werden, deren Bildungsweg über diese Trimere verlaufen könnte. Weitere Reaktionen der Dimere, wie etwa die Spaltung in Vinylflavanole (Escribano-Bailón et al. 2001) und anschließende Bildung von Vinylflavanol-Pyranoanthocyane (Mateus et al. 2002), sind ebenfalls nicht auszuschließen.



Abbildung 4-20: Summe ethyliden-verbrückter Dimere und Trimere in µmol/L während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders.

Trotz des etwas unterschiedlichen Verhaltens der Dimere im maischeerhitzten Trollinger verhielt sich die Konzentration der (E)C-et-Mv-et-(E)C Trimere sehr ähnlich wie im Spätburgunder (Abbildung 4-21). Auch bei diesem Wein konnten die Trimere bei Zusatz von 20 mg O₂/L/Monat erst nach vierwöchigem Sauerstoffzusatz erstmals detektiert werden. Die Konzentration war in dieser Variante nach acht Wochen ebenfalls doppelt so hoch, wie in der Variante mit 10 mg O₂/L/Monat. Die Zunahme der Konzentration wies danach ebenfalls einen linearen Verlauf auf. Da beim Trollinger bereits die Konzentration der Dimere geringer war, betrug nach der Mikrooxygenierung auch die Konzentration der Trimere nur 30 % beziehungsweise 50 % der Werte, die im Spätburgunder vorgefunden wurden.



Abbildung 4-21: Konzentration der (E)C-et-Mv-et-(E)C Trimere während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Trollingers. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Das aus Malvidin-3-glucosid und Acetaldehyd gebildete Vitisin B ist gegenüber der Bleichung durch SO₂ ebenfalls sehr stabil (Bakker und Timberlake 1997). Da es wegen seines orangenen Farbtons den Wein bräunlich erscheinen lassen kann, ist es in Rotwein nur bedingt erwünscht. Abbildung 4-22 zeigt, dass die Konzentration von Vitisin B im Spätburgunder ohne Zusatz von Sauerstoff während der gesamten Zeitraums bei etwa 2 mg/L verblieb. Wurde der gleiche Wein mit 10 mg O₂/L/Monat mikrooxygeniert, konnte eine kontinuierliche Zunahme zwischen der zweiten und der zwölften Versuchswoche beobachtet werden. Dies wurde aufgrund der unterschiedlichen Abnahme der Konzentrationen von Malvidin-3-glucosid und (Epi)Catechin in diesen Varianten bereits vermutet (siehe Abschnitt 4.3.2). Bei Gabe von 20 mg O₂/L/Monat stieg die Konzentration von Vitisin B während der ersten vier Versuchswochen schnell auf etwas mehr als 6 mg/L an und blieb danach unverändert. Wie schon bei den Mv-et-(E)C Dimeren, erscheint es auch hier unwahrscheinlich, dass ab diesem Zeitpunkt kein Vitisin B mehr gebildet wurde. Obwohl die Pyranoanthocyane chemisch sehr stabil sind (Francia-Aricha et al. 1997), kann Ihre Konzentration unter Anwesenheit größerer Mengen Acetaldehyd abnehmen (Morata et al. 2007). Sehr wahrscheinlich reagierte daher auch Vitisin B zu Sekundärprodukten und es stellte sich ebenfalls ein Gleichgewicht zwischen der Bildungs- und einer potentiellen Folgereaktion ein. Dieses Gleichgewicht scheint sich möglicherweise erst später oder bei höheren Acetaldehydkonzentrationen zu bilden als bei den Mv-et-(E)C Dimeren, da es hier nur bei der Variante mit 20 mg O₂/L/Monat zu beobachten war.



Abbildung 4-22: Konzentration von Vitisin B in mg/L Malvidin-3-glucosid-Äquivalenten während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Abbildung 4-23 zeigt die Konzentration von Vitisin B im maischeerhitzten Trollinger. Während in diesem Wein die Mv-et-(E)C Dimere linear zunahmen, ist bei Vitisin B in der mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Variante nach 4 Wochen ein Abflachen der Kurve zu sehen, ähnlich wie dies auch beim Spätburgunder zu beobachten war. Im Unterschied dazu waren allerdings die Konzentrationen im Trollinger zu Beginn des Versuchs unterhalb der Bestimmungsgrenze (0,066 mg/L). In der Variante ohne Sauerstoffzusatz wurde diese während des gesamten Versuchszeitraums nicht erreicht.



Abbildung 4-23: Konzentration von Vitisin B in mg/L Malvidin-3-glucosid-Äquivalenten während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Trollingers. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

4.3.4 Untersuchung des Polyphenolprofils mittels Harbertson-Adams Assay

Acetaldehyd-vermittelte Reaktion der Anthocyane mit Die Flavanolen und Proanthocyanidinen führt zur Bildung einer großen Zahl farbstabiler Pigmente, die aufgrund ihrer Molekülgröße und der Vielzahl von Isomeren mittels Chromatographie und Massenspektrometrie nicht zu erfassen sind. Mit spektralphotometrischen Methoden können Stoffe jedoch anhand ihrer Eigenschaften bestimmt werden, ohne die chemische Struktur genau zu kennen. Außerdem können Stoffe mit ähnlichen strukturellen Eigenschaften zu Summenparametern wie dem Gesamtphenolgehalt nach Folin C zusammengefasst werden. Mit dem Harbertson-Adams-Assay können so die Eisenreaktiven Phenole, die monomeren Anthocyane und die Tannine photometrisch quantifiziert werden. Darüber hinaus ermöglicht das Verfahren die Bestimmung der polymeren Pigmente als Summenparameter. Die Methode unterscheidet dabei zwischen kleinen farbstabilen Pigmenten (SPP) und großen farbstabilen Pigmenten (LPP). Beiden ist gemein, dass sie sich aufgrund ihrer Molekülgröße und der damit verbundenen sterischen Hinderung am C-Ring der Anthocyane nicht durch SO₂ bleichen lassen. Die

größeren LPP lassen sich außerdem, im Gegensatz zu den SPP, wie Tannine durch Proteine aus dem Wein ausfällen. Da mit dem Harbertson-Adams Assay also gleich mehrere Parameter parallel bestimmt werden können, und zudem durch keine andere photometrische Methode zwischen kleinen und großen polymeren Pigmenten unterschieden werden kann, wurde dieses Verfahren gewählt, um die Veränderungen des Polyphenolprofil der Weine während der Mikrooxygenierung zu erfassen.

Zunächst wurde der Gehalt der Eisen-reaktiven Phenole im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder bestimmt. Es zeigte sich bei diesem, wie auch bei den anderen untersuchten Weinen, kein eindeutiger Trend. In den meisten Fällen blieb die Konzentration der Eisen-reaktiven Phenole während des Versuchs unverändert. In manchen Weinen lag der Gehalt nach der Mikrooxygenierung etwas niedriger als in der entsprechenden Kontrolle. Häufig waren auch diese Unterschiede jedoch statistisch nicht signifikant. Ein durch die Mikrooxygenierung verursachtes Ausfallen größerer Mengen Polyphenolen aufgrund fortschreitender Polymerisation von oder anderer Oxidationsprozesse fand somit nicht statt. Auch in der Literatur wird nur selten eine Abnahme des Gesamtphenolgehaltes beschrieben (del Carmen Llaudy et al. 2006, Pérez-Magariño et al. 2009, Parpinello et al. 2012).

Abbildung 4-24 zeigt die Veränderung der Gehalte von SPP und LPP im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder während der Mikrooxygenierung. In Woche 0 lag der Gehalt der SPP bei 0,45, LPP waren kaum vorhanden. Während der folgenden Woche nahm der Gehalt der SPP in allen Weinen zu. Am stärksten war dies in der Variante mit 20 mg O₂/L/Monat, aber auch bei 10 mg O₂ und in der Kontrolle nahmen die Gehalte zu. Die Zunahme der SPP erfolgte stetig und es stellte sich, anders als bei den ethylidenverbrückten Dimeren, keine Phase der Stagnation ein. Auch nach dem Ende der Mikrooxygenierung nahmen die SPP weiter zu. Dies passt zur Beobachtung, dass nach dem Ende des Sauerstoffzusatzes die Acetaldehyd-Konzentration abnahm: Zwar war zu diesem Zeitpunkt für die Polymerisation der Pigmente noch genügen Acetaldehyd vorhanden, gleichzeitig wurde der Stoff durch die Reaktion verbraucht.



Abbildung 4-24: SPP- und LPP-Gehalte während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Die Gehalte der LPP nahmen nach Versuchsbeginn zunächst etwas zu, blieben danach jedoch bis Woche 6 bzw. 8 weitgehend unverändert. Danach konnte nochmals eine Zunahme beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls das Fortschreiten einer Polymerisation im Sinne größer werdender Moleküle an: Während zunächst bevorzugt SPP gebildet wurden, nahmen die LPP in ihrer Konzentration erst mit einiger Verzögerung zu.

Laurie et al. (2014) beobachteten ebenfalls dass ein Sauerstoffzusatz zuerst die Bildung von SPP und, nach etwas längerer Zeit, auch die Entstehung von LPP fördert. Bei einem weniger kontrollierten Sauerstoffzusatz durch Umpumpen kam es dabei zu einer überproportionalen Bildung von LPP. In den Versuchen von Gambuti et al. (2015) führte der Zusatz von Sauerstoff hingegen zu einer Abnahme der SPP. Obwohl die Autoren selbst die Vermutung äußern, dass daraus größere Polymere gebildet worden sein könnten, wurden keine Daten zu den LPP Gehalten veröffentlicht. Andere Autoren, die nicht zwischen SPP und LPP unterschieden, stellten durch den Sauerstoffeinfluss stets eine Zunahme der Polymeren Pigmente fest (Cano-López et al. 2008, Oberholster et al. 2015, Picariello et al. 2017).

Aus dem Versuchsprotokoll des Harbertson-Adams Assay ergibt sich, dass es sich bei den SPP um Pigmente handelt, die sich weder durch SO₂ bleichen, noch durch Proteine ausfällen lassen. Somit ist bei diesen Pigmenten ein versehentliches Ausfällen, sei es bei der Durchführung von Schönungen oder spontan, nicht zu erwarten. Bei den LPP hingegen handelt es sich per Definition um Pigmente, die zwar stabil gegen SO2-Bleichung sind, jedoch aufgrund ihrer Größe mit Proteinen unlösliche Komplexe bilden. LPP sind aufgrund ihrer Molekülgröße generell schlechter löslich als SPP und können bei weiter zunehmendem Molekulargewicht auch spontan ausfallen. Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass durch oenologische Maßnahmen, wie eine Gelatine-, Bentonitoder Caseinschönung LPP ausgefällt werden, SPP hingegen nicht (Harbertson et al. 2003). Vor diesem Hintergrund kann die Bildung von SPP nahezu uneingeschränkt als positiv bewertet werden, während die Entstehung von LPP eher kritisch gesehen werden muss. Da sich bei niedriger Sauerstoffdosage und kurzen Einsatzzeiten bevorzugt SPP bilden und erst bei höheren Dosagen und längeren Einsatzzeiten größere Mengen der LPP, stellen diese beiden Parameter möglicherweise gute Indikatoren zur Steuerung der Mikrooxygenierung dar.

Dies verdeutlichen auch die von Frau Christine Schäfer im Rahmen einer Diplomarbeit erhaltenen Ergebnisse (Schäfer 2016). Abbildung 4-25 (oben) zeigt, dass die LPP im 2015er maischevergorenen Spätburgunder 1 schneller zunahmen als die SPP. Dies führte dazu, dass nach vier bis sechs Wochen mehr LPP als SPP vorlagen. In der Kontrollvariante blieben die SPP während der 10 Versuchswochen weitgehend unverändert, die LPP nahmen hingegen zu. Obwohl die polymeren Pigmente damit in der Summe zunahmen, führte dies nicht zu einer Abnahme der Helligkeit L* (Abbildung 4-25, unten). In der mit 10 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Variante hingegen stiegen die Gehalte von SPP und LPP gemeinsam an, wobei die Zunahme bei den LPP stärker war als bei den SPP. Zunächst führte dies zu einer Abnahme von L*. Ab Versuchswoche sechs, nachdem der Gehalt der LPP über dem der SPP lag, konnte nun jedoch auch hier keine signifikante Abnahme des L*-Wertes mehr gemessen werden.

Obwohl die Mikrooxygenierung hier gegenüber der Kontrolle ebenfalls zu einer größeren Farbintensität des Weines führte, ist die überproportionale Zunahme der LPP aufgrund der Gefahr des Ausfallens der Pigmente und einer frühzeitigen Alterung kritisch zu sehen. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die alleinige Messung der Weinfarbe für die Steuerung und Kontrolle der Mikrooxygenierung nicht ausreichend ist, da die überproportionale Bildung von LPP allein anhand einer Farbmessung nicht zu erkennen gewesen wäre.

Unter allen für diese Arbeit untersuchten Weinen gab es nur wenige, bei denen der LPP-Gehalt den SPP-Gehalt während der Mikrooxygenierung überstieg. Aus diesem Grund kann keine Aussage getroffen werden, wie groß in diesem speziellen Fall die Gefahr negativer Auswirkungen der Mikrooxygenierung ist. Allerdings zeigte sich bei Betrachtung aller durchgeführten Versuche, dass bei hohen LPP-Gehalten eines Weines durch die Mikrooxygenierung ein positives Ergebnis bezüglich der Farbstabintensität unwahrscheinlicher wird (siehe Kapitel 4.5).

Welche Substanzen die Stoffgruppen SPP und LPP beinhalten, ist nicht exakt definiert. Die Bleichung von Anthocyanen und niedermolekularen Anthocyanderivaten läuft häufig nur unvollständig ab. Der Zusatz von SO₂ führt beispielsweise zur Bleichung von bis zu 95 % der monomeren Anthocyane und bis zu 50 % der ethyliden-verbrückten Anthocyan-Dimere (Escribano-Bailón et al. 2001, Cheynier et al. 2006), Vitisin B wird ebenfalls um bis zu 50 % gebleicht, während bei Vitisin A überhaupt keine Bleichung erfolgt (Bakker und Timberlake 1997). Es gibt jedoch Hinweise, dass die Tendenz zur SO₂-Bleichung mit der Anzahl der in einem Pigment enthaltenen Flavonoideinheiten abnimmt (Weber und Winterhalter 2014). Entgegen der Definition findet somit keine Unterscheidung zwischen "bleichbaren" und "nicht-bleichbaren" Pigmenten statt. Die Methode zeigt viel mehr den "nicht-bleichbaren Anteil" der Pigmente an. Trotz dieser "Unschärfe" der Methode ist also davon auszugehen, dass bei Zunahme der SPP tatsächlich eine höhere Resistenz des Weines gegenüber SO₂-Bleichung vorliegt.

Ähnliches wurde für die Fällung von Polyphenolen mittels Proteinen beobachtet. Polyphenoladdukte mittleren Molekulargewichtes werden auch hier nur zu einem gewissen Anteil ausgefällt. Je höher jedoch das Molekulargewicht, desto höher ist die Ausbeute der Fällungsreaktion (Harbertson et al. 2014). Daher kann angenommen werden, dass sich die durchschnittliche Molekülgröße der Pigmente bei Zunahme des Messwertes für LPP ebenfalls erhöht.



Abbildung 4-25: Gehalte von SPP und LPP (oben) sowie Veränderung der Helligkeit L* (unten) während der Mikrooxygenierung des 2015er maischevergorenen Spätburgunder 1. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Insgesamt wird durch die Methode also der Anteil von Pigmenten erfasst, der auch bei der Schwefelung des Weines farbstabil bleibt (Summe von SPP und LPP). Die LPP allein geben hingegen den Anteil der Pigmente an, die aufgrund ihrer schlechteren Wasserlöslichkeit gefährdet sind, auszufallen.

Durch die wiederholte Messung der SPP und LPP während der Mikrooxygenierung kann also die farbstabilisierende Wirkung des Sauerstoffs direkt überprüft und gegebenenfalls die zudosierte Menge angepasst werden. Dies gilt auch im Hinblick auf eine spätere Bleichung durch SO₂. Dabei zeigt ein steigender SPP-Gehalt die Wirksamkeit des Sauerstoffs an, während ein zu stark ansteigender LPP-Gehalt auf eine potentielle Überoxidation hindeutet.

4.3.5 Kontrolle der Weinfarbe mittels Spektralphotometer

Wie zuvor dargelegt, reicht eine einfache Messung der Helligkeit zur Steuerung der Mikrooxygenierung nicht aus. Dennoch stellt sie einen wichtigen Baustein der analytischen Prozesskontrolle dar, da die Weinfarbe eines der unmittelbar durch den Sauerstoff veränderten Qualitätskriterien für Rotweine ist. Dabei kommt es auf die Farbintensität und den Farbton an. Letzterer darf bei einem jungen Wein keine braunen Nuancen aufweisen, da dies ein Zeichen für frühzeitige Alterung bzw. Überoxidation darstellt und von Konsumenten abgelehnt wird (Parpinello et al. 2009). Auch ein zu violetter Farbton wird von Seiten der Praxis bei Spätburgunder oder Trollinger, die sonst eher ziegelrote Farbtöne aufweisen, als untypisch empfunden.

Zur chemischen Charakterisierung der Farbe wurden Absorptionsspektren der Weine im VIS-Bereich gemessen und daraus die Farbintensität (als Helligkeit H*) und Farbton (als Grün-Rot-Wert a* bzw. Blau-Gelb-Wert b*) nach dem CIE-L*a*b* System berechnet. In Abbildung 4-26 ist zu erkennen, dass der Blau-Gelb-Wert des maischeerhitzten 2013er Spätburgunder während der Mikrooxygenierung mit 10 mg O₂/L/Monat b* kontinuierlich zunahm. Bei Zusatz von 20 mg O₂/L/Monat wurde während der ersten drei Wochen eine noch stärkere Zunahme beobachtet, während der folgenden fünf Wochen änderte sich der Wert hingegen nicht mehr. Der gezeigte Kurvenverlauf von b* ist qualitativ vergleichbar mit der Veränderung der Konzentration des braunen Pigments Vitisin B (vergleiche Abschnitt 4.3.3) und lässt daher zunächst einen Zusammenhang vermuten. Die im Wein

gemessenen Konzentrationen von Vitisin B lagen bei maximal 6,6 mg/L. Der optische Schwellenwert des Pigments liegt in Rotweinen der Rebsorte Spätburgunder zwischen 43,2 mg/L und 57,1 mg/L (Schmalfuß 2017) und damit erheblich über der gefundenen Konzentration. Schmalfuß (2017) stellte außerdem fest, dass sich b* bei Zusatz von Vitisin B zu einem Wein verringert und nicht, wie hier, erhöht. Dies steht allerdings im Widerspruch zur hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums von Vitisin B gegenüber seinem Edukt Malvidin-3-glucosid, die eine Erhöhung der Werte für b* erwarten lässt. Eventuell spielt hier die Copigmentierung eine Rolle, doch dies wurde bisher nicht untersucht. Da Schmalfuß (2017) eine Verringerung von b* erst bei Zugaben von mehr als 25 mg/L Vitisin B beobachtete, kann dieses den Wert von b* im vorliegenden Wein nicht messbar beeinflusst haben. Der beobachtete Anstieg von b* um mehr als 6 Einheiten im CIE-Lab-System muss daher von anderen orangefarbigen Pigmenten verursacht worden sein.



Abbildung 4-26: Veränderung des Blau-Gelb-Wertes b* während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders mit 10 bzw. 20 mg $O_2/L/Monat$ und im gleichen Zeitraum ohne Sauerstoff. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Nach Versuchswoche sechs nahm b* in der 20 mg O2 Variante wieder ab. Ursache deren könnten hier die ethyliden-verbrückten Pigmente sein, optische Wahrnehmungsschwelle nur bei etwa 10 mg/L liegt (Schmalfuß 2017). Diese Konzentrationen wurden in den mikrooxygenierten Weinen allein durch die ethylidenverbrückten Anthocyan-Flavanol Dimere erreicht. Hinzu kommen die im Abschnitt 4.3.3 ebenfalls quantifizierten Trimere, sowie potentiell ebenfalls gebildete Tetra- und Pentamere in unbekannter Konzentration. Da das Absorptionsmaximum von ethylidenverbrückten Di- und Trimeren im Vergleich zu Malvidin-3-glucosid bathochrom verschoben ist, sollten sie im Wein eine Abnahme von b* und eine Zunahme von a* bewirken können. Dies wurde in der Arbeit von Schmalfuß (2017) bestätigt.

Die Kontrollvariante ohne Sauerstoffzugabe zeigt, dass auch die ohne Sauerstoff ablaufenden Reaktionen einen Einfluss auf den Farbton haben. Obwohl die Konzentration von Vitisin B in dieser Variante während des Versuchs unverändert blieb, stieg der b* kontinuierlich an, der Farbton verschob sich somit in Richtung bräunlicher Nuancen. Dadurch wiesen alle drei Versuchsvarianten nach 14 Versuchswochen einen vergleichbaren b*-Wert auf. Die Mikrooxygenierung führte damit aus analytischer Sicht letztlich nicht zu einer höheren Brauntönigkeit des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders.

Beim maischeerhitzten 2013er Trollinger veränderte sich b* während des gesamten Versuchs weder in der Kontrolle noch in den mikrooxygenierten Varianten in signifikantem Ausmaß. Auf eine Darstellung wurde daher verzichtet.

Der Grün-Rot-Wert a* nahm beim maischeerhitzten Spätburgunder während des Versuchs in allen Weinen ab. In der Kontrolle war die Abnahme dabei am geringsten, in der mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Variante am größten. Dies lässt sich einerseits darauf zurückzuführen, dass rote Anthocyane zu violetten ethylidenverbrückten Pigmenten reagieren, die weniger rot- und stärker blautönig sind. Andererseits führt die Bildung von Vitisin B aus Anthocyanen zu einer Abnahme des Grün-Rot-Wertes, wie Schmalfuß (2017) ebenfalls nachwies.



Abbildung 4-27: Veränderung des Grün-Rot-Wertes a* während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders mit 10 bzw. 20 mg O₂/L/Monat und im gleichen Zeitraum ohne Sauerstoff. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Völlig anders verhielt sich hingegen der maischeerhitzte 2013er Trollinger (Abbildung 4-28). Zwar veränderte sich a* in der Kontrollvariante ebenfalls nur geringfügig, allerdings nahmen die Werte bei Zugabe von 10 bzw. 20 mg O₂/L/Monat erheblich zu, wobei zwischen diesen beiden Varianten kein signifikanter Unterschied bestand. Aus analytischer Sicht konnte beim maischeerhitzten Trollinger durch den Sauerstoffzusatz eine erhöhte Rottönigkeit erreicht werden. Es konnte auch in diesem Fall nicht geklärt werden, aus welchem Grund sich der Trollinger anders verhielt, als der Spätburgunder. Da die vergleichbar starke Abnahme der Anthocyane nur zu moderaten Konzentrationen von ethyliden-verbrückten Pigmenten und Vitisin B führte, wurden vermutlich weitere unbekannte Pigmente gebildet, die den Farbton beeinflussen.



Abbildung 4-28: Veränderung des Grün-Rot-Wertes a* während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Trollingers mit 10 bzw. 20 mg O₂/L/Monat und im gleichen Zeitraum ohne Sauerstoff. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Ziel der Mikrooxygenierung ist das Erreichen einer möglichst hohen Farbintensität. Im CIE-L*a*b* System wird diese durch die Helligkeit L* repräsentiert. Je farbintensiver der Wein, desto kleiner wird dieser Parameter. In Abbildung 4-29 ist zu erkennen, dass die Helligkeit aller Weine während des Versuchszeitraums kontinuierlich abnahm – sowohl in den beiden mikrooxygenierten Weinen, als auch die der Kontrollvariante. Für alle Varianten ist der Verlauf annähernd linear. Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt für die Kontrollvariante -0,22, bei der Variante 10 mg O₂/L/Monat -0,49 und liegt damit um den Betrag 0,27 niedriger. Bei 20 mg O₂/L/Monat ergibt sich eine Steigung von -0,75, die um den Betrag 0,52 kleiner ist als bei der Kontrolle. Damit besteht auch ein linearer Zusammenhang zwischen der Sauerstoffdosage und der erzielten Abnahme der Helligkeit.

Für die Abnahme der Helligkeit des Weines werden die ethyliden-verbrückten Anthocyan-(Epi)Catechin Dimere verantwortlich gemacht, die bei Wein pH eher in der Flavyliumstruktur vorliegen und damit farbintensiver sind, als ihre Ausgangsstoffe, die monomeren Anthocyane (Dueñas et al. 2006b). Bei pH 4 ist ihr molarer

Extiktionskoeffizient von Mv-et-(E)C 16,7-fach höher, als der des Edukts Malvidin-3glucosid. Der Extinktionskoeffizient von Vitisin B beträgt dagegen nur das 0,25-fache dessen von Malvidin-3-glucosid (Schmalfuß 2017). Die Bildung von Vitisin B bewirkt somit keine Steigerung, sondern eine Verringerung der Farbintensität.

Obwohl nach der vierten Versuchswoche keine weitere Erhöhung der Konzentrationen der ethyliden-verbrückten Malvidin-(Epi)Catechin Dimere gemessen wurde, nahm die Helligkeit der Weine weiter ab. Verantwortlich dafür muss unter anderem die Bildung der ethyliden-verbrückten Trimere sein, die in Konzentrationen von bis zu 6 mg/L auftraten und die bei pH 3,5 gegenüber den ethyliden-verbrückten Dimeren eine nochmals gesteigerte Absorption aufweisen (Weber und Winterhalter 2014). Sehr wahrscheinlich spielt auch hier die Entstehung der in Teil I dieser Arbeit nachgewiesenen Pigmente höheren Molekulargewichts eine Rolle.



Abbildung 4-29: Helligkeit L* während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders mit 10 bzw. 20 mg $O_2/L/Monat$ und im gleichen Zeitraum ohne Sauerstoff. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

Obwohl sich a* beim maischeerhitzten Trollinger unter dem Einfluss von Sauerstoff gegensätzlich zum Spätburgunder verhielt, waren die Entwicklungen bei L* vergleichbar (Abbildung 4-30). Auch hier war in der Kontrollvariante nur eine geringe, in den beiden mikrooxygenierten Weinen hingegen eine starke Abnahme zu beobachten. Der Unterschied zur Kontrollvariante war dabei erheblich größer als beim Spätburgunder, während die Unterschiede zwischen den beiden Varianten mit 10 und 20 mg O₂/L/Monat geringer waren. Erneut fällt auf, dass die Konzentrationen der ethyliden-verbrückten Pigmente und von Vitisin B wesentlich geringer waren als beim Spätburgunder. Somit wird an dieser Stelle nochmals deutlich, dass es noch weitere, ebenfalls Sauerstoff-induzierte Pigmente geben muss, die jedoch noch unbekannt sind.



Abbildung 4-30: Helligkeit L* während der Mikrooxygenierung des 2013er maischeerhitzten Trollingers mit 10 bzw. 20 mg $O_2/L/M$ onat und im gleichen Zeitraum ohne Sauerstoff. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.

4.3.6 Zwischenfazit zum dritten Teil

Der Zusatz von Sauerstoff zum Wein führte erst mit einer Verzögerung von mindestens zwei Wochen zu einer messbaren Zunahme der Acetaldehyd Konzentration. Dem entsprechend bildeten sich ethyliden-verbrückte Dimere und Vitisin B ebenfalls erst nach zwei bis vier Wochen. Da sich die doppelt ethyliden-verbrückten Trimere aus den Dimeren bilden, war eine Zunahme dieser Pigmente noch später messbar. Während die Konzentrationen von Vitisin B und ethyliden-verbrückter Pigmente im maischeerhitzten Trollinger meist kontinuierlich zunahmen, erreichten sie im Spätburgunder nach mehreren Wochen ein stabiles Niveau. Dieses lag bei Zugabe von 20 mg O₂/L/Monat deutlich höher, als bei Zusatz von 10 mg O₂/L/Monat. Kurz nach dem Ende des Sauerstoffzusatzes war jedoch eine Abnahme dieser Stoffe messbar. Dies deutet darauf hin, dass diese Pigmenten kontinuierlich zu Folgeprodukten weiterreagierten, sodass sich ein Fließgleichgewicht einstellte. Beim Trollinger war dies nicht zu beobachten. Da die Konzentrationen der Pigmente in diesem Wein insgesamt geringer waren, waren die Reaktionen dazu möglicherweise noch nicht weit genug fortgeschritten.

Die Gehalte der SPP und LPP, die potentiell alle gelösten Pigmente erfassen, nahmen im Spätburgunder kontinuierlich zu. Auch dies deutet auf einen fortschreitenden Polymerisationsprozess hin. Anhand zweier weiterer Weine wurde gezeigt, dass der Vergleich von SPP und LPP eine einfache Aussage über den "Polymerisationsgrad" der Pigmente zulässt: In einem jungen Rotwein sind zunächst mehr SPP als LPP enthalten. Während eines Sauerstoffzusatzes kommt es zur Polymerisation, die zunächst zu einer Zunahme der SPP und, etwas verzögert, der LPP führt. Bei einem Fortschreiten des Polymerisationsprozesses übersteigt die Konzentration der LPP jene der SPP. Da LPP eine schlechtere Löslichkeit aufweisen und beim Zusatz von Kellerhilfsstoffen, wie Bentonit und Gelatine, ausfallen können (Harbertson et al. 2003), sollte eine übermäßige Bildung dieser Pigmente vermieden werden. Es wird daher vorgeschlagen, einen Sauerstoffzusatz spätestens dann zu beenden, wenn mehr LPP als SPP im Wein vorliegen.

Die Helligkeit L* der in diesem Teil untersuchten Weine nahm durch den zugesetzten Sauerstoff stets ab. Obwohl sich der Farbton im Spätburgunder und im Trollinger zunächst unterschiedlich entwickelte, war nach der SO₂-Gabe gegenüber der Kontrollvariante keine erhöhte Brauntönigkeit bei einem der Weine festzustellen.

4.4 <u>Teil IV Chemische und sensorische Eigenschaften Sauerstoff-</u> <u>behandelter Weine</u>

4.4.1 Farbstabilität bei SO₂-Gabe

Schwefeldioxid, SO₂, wird dem Wein zur Haltbarmachung zugesetzt. Ein unerwünschter Nebeneffekt ist der mit der "Schwefelung" einhergehende Verlust von Farbintensität bei Rotwein. Der Grund hierfür ist, dass monomere Anthocyane durch SO₂ gebleicht werden. Polymere Pigmente hingegen erweisen sich gegenüber SO₂ als farbstabil (Somers 1971). Di- und Trimere aus Anthocyanen und Flavanolen lassen sich weder der einen, noch der anderen Gruppe eindeutig zuordnen. Sie sind gegenüber eine Bleichung zwar robuster, als die monomeren Anthocyane, werden aber zu einem geringen Prozentsatz noch immer gebleicht (Weber und Winterhalter 2014). Da der Gehalt der polymeren Pigmente zudem nicht exakt in mg/L angegeben werden kann, ist es nicht möglich, ihn mit der Konzentration der monomeren Anthocyane ins Verhältnis zu setzen und so den Grad der Bleichung bei der SO₂-Gabe vorherzusagen.

Anhand des Versuchsjahrgangs 2014 wurde überprüft, inwiefern sich mikrooxygenierte und nicht-mikrooxygenierte Weine während der Schwefelung unterscheiden. Besonders beachtet wurde dabei, ob die während der Mikrooxygenierung erzielte Farbvertiefung auch über die SO₂-Gabe hinaus Bestand hat. Dazu wurde nach dem Ende der Sauerstoffdosage zunächst eine 3-wöchige Ruhephase zum Abbau potentieller Sauerstoffund Acetaldehyd Depots eingehalten, bevor während der folgenden sechs Wochen wurde die SO₂-Gabe durchgeführt wurde.

SO₂ bindet in nicht exakt vorhersehbarer Weise an unterschiedliche Carbonyle im Wein, insbesondere an Acetaldehyd (Ribéreau-Gayon et al. 2006a). Mikrobiologisch wirksam ist jedoch nur das ungebundene, freie SO₂. Da die sich die chemischen Gleichgewichte zwischen gebundenem und freiem SO₂ nur langsam einstellen, erfolgt die SO₂ Gabe über Tage oder Wochen in mehreren Schritten, so lange, bis in allen Weinen eine ausreichend hohe und stabile Konzentration von freiem SO₂ erreicht ist. Im vorliegenden Fall wurde die Konzentration bei allen Weinen auf eine praxisübliche Konzentration von 35 bis 40 mg/L freiem SO₂ eingestellt (Ribéreau-Gayon et al. 2006a).

Vom Beginn der Mikrooxygenierung bis zum Ende der Schwefelung wurde in regelmäßigen Abständen die CIE-Lab Farbmetrik gemessen. Abbildung 4-31 zeigt, dass

die Helligkeit beim 2014er maischevergorenen Spätburgunder (Airpush) auch nach dem Ende der Mikrooxygenierung weiter abnahm. Mit dem Beginn der Schwefelung erfolgte eine Zunahme der Helligkeit in beiden Weinen, die am Ende deutlich höher war als zu Beginn des Versuchs in Woche 0. Durch den Zusatz von Sauerstoff konnte dieser Effekt eindeutig abgeschwächt werden. Während L* nach der Schwefelung in der Kontrolle um 12,1 Einheiten höher lag, als in Woche 0, waren es im mikrooxygenierten Wein nur 3,2 Einheiten.

Die in Woche 12 bestehenden Farbunterschiede zwischen den beiden Weinen, wurden durch die SO₂-Gabe noch verstärkt: Während der mikrooxygenierte Wein in der zwölften Woche um 5,8 Einheiten dunkler war als die Kontrollvariante, betrug diese Differenz nach Abschluss der Schwefelung 8,9 Einheiten. Mit Ausnahme des maischevergorenen Trollingers, bei dem keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle festgestellt wurden, konnten vergleichbare Beobachtungen in allen Versuchsweinen des Jahrgangs 2014 gemacht werden.



Abbildung 4-31: Helligkeit L* des 2014er maischevergorenen Spätburgunders (Airpush) während der Mikrooxygenierung und SO₂-Gabe. Fehlerdindikatoren aus zwei Versuchswiederholungen.
4.4.2 Einfluss von Sauerstoff auf die Höhe des SO₂-Bedarfs

Die Höchstmengen für gesamte SO₂ in Wein sind gesetzlich reglementiert. Für trockene Rotweine der Qualitätsstufe QbA mit einem Restzuckergehalt unter 5 g/L gilt beispielsweise die Höchstgrenze von 150 mg/L (EU 2009). Gleichzeitig ist eine gewisse Höhe an freier SO₂ erforderlich, um den Wein wirksam vor mikrobiellem und oxidativem Verderb zu schützen und ihn lagerfähig zu machen. Je nach pH-Wert sind unterschiedliche Konzentrationen von freier SO2 erforderlich, in der Regel werden etwa 40-50 mg/L angestrebt (Hamatschek 2015). Wie viel gesamtes SO₂ erforderlich sind, um diese Konzentration an freiem SO2 zu erreichen, hängt u.a. vom Restzuckergehalt, der Menge der Polyphenole und den Konzentrationen von Carbonylverbindungen, wie Pyruvat und Acetaldehyd, ab. Da durch die Mikrooxygenierung Acetaldehyd generiert wird, könnte das Verfahren zu einer Erhöhung der gesamten SO₂ führen. Dies wurde anhand der Weine des Jahrgangs 2015 überprüft. Jeweils 6 Wochen nach dem Ende der Mikrooxygenierung wurde bei diesen Weinen mit der SO₂-Gabe begonnen. Die insgesamt zugesetzten Mengen SO2 wurden dazu dokumentiert. Weiterhin wurden die analytisch nachweisbaren Konzentrationen von freiem und gesamtem SO2 iodometrisch bestimmt.

Tabelle 4-7 zeigt, dass den mikrooxygenierten Weinen des Jahrgangs 2015 maximal 10 mg/L mehr SO₂ zugesetzt werden mussten, als den entsprechenden nichtmikrooxygenierten Kontroll-Weinen. Bei der analytischen Messung der gesamten SO₂ zeigten sich nach der Füllung jedoch kaum Unterschiede. Teilweise lag die gesamte SO₂ der mikrooxygenierten Weine sogar etwas unter den Gehalten, die in den Kontrollvarianten gemessen wurden. Bei keinem der Weine lag der Gehalt der gesamten SO₂ in der Nähe der gesetzlichen Grenze. Auch der strengere Grenzwert von 100 mg/L für biologisch erzeugte Weine unter 2 g/L Restzucker (EU 2009) wurde hier eingehalten.

In allen Weinen war eine Abweichung von 50 - 75 mg/L zwischen tatsächlich zugesetzter und analytisch nachweisbarer gesamter SO₂ zu beobachten. Diese wird dadurch verursacht, dass ein Teil der zugesetzten SO₂ durch den gelösten Sauerstoff zu Sulfat oxidiert wird und somit nicht mehr als SO₂ nachweisbar ist (Ribéreau-Gayon et al. 2006a). Da in den mikrooxygenierten Weinen trotz der eingehaltenen Wartezeiten offenbar noch etwas mehr gelöster Sauerstoff vorhanden war, als bei den nichtmikrooxygenierten Varianten, wurde dort eine etwas höhere Schwefelgabe erforderlich. Die Acetaldehydkonzentration war zum Zeitpunkt der SO₂-Gabe hingegen nicht mehr erhöht, da dies zwangsläufig zu einem höheren Gehalt an gesamter SO₂ geführt hätte.

Wein	O2-Dosage (mg/L/Monat)	SO ₂ -Gabe (mg/L)	freie SO ₂ (mg/L)	ges. SO ₂ (mg/L)
ME Spätburgunder 1	0	133	46	81
ME Spätburgunder 1	10	140	41	85
ME Spätburgunder 2	0	110	49	93
ME Spätburgunder 2	10	118	46	71
ME Lemberger	0	128	48	83
ME Lemberger	10	135	46	83
MG Spätburgunder 1	0	138	44	86
MG Spätburgunder 1	10	140	47	74
MG Spätburgunder 2	0	130	45	88
MG Spätburgunder 2	10	140	42	87
MG Spätburgunder 3	0	120	50	84
MG Spätburgunder 3	10	125	45	84
MG Spätburgunder 4	0	115	49	72
MG Spätburgunder 4	10	115	45	69
MG Spätburgunder 4	dynamisch	120	45	69

Tabelle 4-7: Zugegebene Mengen SO₂ und gemessene Konzentrationen von freier und gesamter SO₂ bei den Weinen des Jahrgangs 2015 zum Zeitpunkt der Füllung

Um den SO₂-Bedarf trotz Sauerstoffgabe möglichst gering zu halten, wurde eine "dynamische" Mikrooxygenierung durchgeführt. Dabei wurde zunächst mit einer Sauerstoffdosage von 20 mg/L/Monat begonnen und diese während der folgenden zwölf Wochen in mehreren Schritten auf 5 mg/L/Monat gesenkt. Die Idee einer solchen Prozessführung ist, dass zu Beginn der Sauerstoffgabe viele oxidierbare Substanzen (Reduktone) im Wein vorliegen, die zunächst reagieren, bis es zur Bildung von

Acetaldehyd kommt. Durch die hohe Sauerstoffgabe sollte ein zügiger Beginn der Farbstabilisierung gewährleistet sein. Auf ähnliche Weise führten Cano-López et al. (2006) ihre Versuche durch. Gegen Ende der Sauerstoffgabe sollte durch die verringerte Sauerstoffgabe die Bildung von Sauerstoff- und Acetaldehyd Depots vermieden werden. Bezüglich des SO₂-Bedarfs brachte diese Vorgehensweise jedoch hier keinen Vorteil. Es mussten sogar 5 mg/L mehr SO₂ zugeführt werden, um die gleiche Konzentration von freiem SO₂ zu erreichen. Sowohl der mit 10 mg O₂/L/Monat, als auch der dynamisch mikrooxygenierte Wein wiesen mit 69 mg/L exakt gleich hohe Gehalte an gesamter SO₂ auf.

4.4.3 Sensorische Eigenschaften

Die analytischen Daten konnten belegen, dass sich der Zusatz von Sauerstoff positiv auf das Polyphenolprofil des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders auswirkte. Die Daten sagen jedoch wenig über die sensorische Qualität des Weines aus. Ein Wein, der nach der Mikrooxygenierung hervorragende Farbeigenschaften hat, kann sensorisch trotzdem überoxidiert und flach wirken. Die sensorische Bewertung der Weine durch ein trainiertes Prüferpanel erfolgte im Jahr 2014, etwa zwei Wochen nach der Flaschenfüllung. Die Ergebnisse der Verkostung sind in Abbildung 4-32 dargestellt, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit die numerischen Werte in % der Variante ohne Sauerstoffzusatz angegeben wurden.

Im Rahmen der Verkostung ergaben sich signifikante Unterschiede in den optischen Attributen Farbintensität und Farbton. Während die Farbintensität auf einer Skala von "hell" nach "dunkel" bewertet wurde, erfolgte die Bewertung des Farbtones über eine Skala, die von "braun" über "rot" nach "violett" definiert war. Je kleiner die hier dargestellten Werte, desto brauntöniger wurde der Farbton des Weines durch die Prüfer bewertet. Der mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierte Wein erhielt bei der Farbintensität eine 1,7-fach höhere Bewertung als der Wein ohne Sauerstoffzusatz, während sich der Wein mit 10 mg O₂/L/Monat nur wenig von der Kontrolle unterschied. Der Farbton der mikrooxygenierten Weine wurde von den Prüfern im Verhältnis zur Kontrolle als violetter und weniger brauntönig bewertet, was als positiv anzusehen ist.

Keiner der mikrooxygenierten Weine wies eine höhere Intensität im Attribut "oxidativ" auf, was auf eine potentielle Überoxidation hindeuten würde. Beide mikrooxygenierten Weine wurden jedoch signifikant höher im Geruchsattribut "Schokolade" bewertet. Dieses positiv besetzte Attribut wird häufig Barriquefass-gelagerten Weinen zugeschrieben und gilt daher als Zeichen einer höheren Wertigkeit (Pizarro et al. 2014). Obwohl das Auftreten von an Eichenholz, Vanille oder Schokolade erinnernden Aromen eher der Extraktion von Aromastoffen aus dem Holz zugeschrieben wird, wurde es durch die Prüfer auch in den mit Sauerstoff behandelten Weinen intensiver wahrgenommen. Offenbar kann somit auch der Sauerstoff selbst durch die Oxidation bestimmter Stoffe im Wein einen solchen Eindruck erzeugen.



Abbildung 4-32: Sensorisches Profil des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders mit 0, 10, bzw. 20 mg $O_2/L/Monat$, nach der Füllung (2014). Daten jeweils normiert auf Variante 0 mg $O_2/L/Monat$. Signifikanzniveaus: *: 0,05 $\ge p > 0,01$; **: 0,01 $\ge p > 0,001$; ***: $p \le 0,001$.

Das sensorische Profil des maischeerhitzten Trollingers in Abbildung 4-33 wird geprägt durch die sehr großen Unterschiede in Farbintensität und Farbton. Bezüglich der Farbintensität steht dies im Einklang mit der gemessenen Helligkeit L*, die sich beim Trollinger ebenfalls stärker unterschied als beim Spätburgunder. Beim Farbton hingegen führte der Sauerstoffeinsatz beim Trollinger zu einer Zunahme von a*, während er beim Spätburgunder eine Abnahme bewirkte. Sensorisch wurden die mikrooxygenierten Weine hingegen bei beiden Rebsorten als stärker violett und weniger brauntönig bewertet. Die Unterschiede waren auch hier beim Trollinger größer als beim Spätburgunder. Da der Farbton mittels CIE-L*a*b* auf einer zweidimensionalen Ebene dargestellt wird, die sensorische Skala jedoch eindimensional ist, sind die Ergebnisse nur schwer vergleichbar. Interpretation und Aussagekraft der CIE-Lab Parameter a* und b* bezüglich des Farbtones von Rotwein müssen daher kritisch bewertet werden, da letztlich die sensorische Wirkung des Weines entscheidend ist. Die Helligkeit L* scheint hingegen geeignet, zumindest eine Aussage über die Farbintensität zu treffen.

Bei beiden mikrooxygenierten Weinen wurde die Intensität des Geschmacksattributes "grüne Adstringenz" etwas schwächer wahrgenommen als in der Kontrolle, jedoch war diese Modifikation nicht signifikant (Trollinger: p = 0,128). Dieses Attribut wird durch unreife Tannine hervorgerufen, erinnert an den Eindruck der beim Zerkauen von Traubenkernen oder Rappen entsteht und, im Gegensatz zur "trockenen Adstringenz", im Wein unerwünscht ist. Neben der Steigerung der Farbintensität kann dies ein weiterer positiver Effekt des Sauerstoffeinsatzes sein, der auf die Veränderung des Tanninprofils und damit der Rotweinpolyphenole zurückzuführen ist (Gawel et al. 2000, Durner et al. 2010b). Die zunächst nicht erklärbare Verstärkung des Attributes "süß" in der Variante "20 mg O₂" könnte indirekt beeinflusst worden sein: Ein Wein, der weniger grün adstringierend schmeckt, kann für die Verkoster möglicherweise süßer wirken, obwohl der Restzuckergehalt analytisch gleich bleibt.



Abbildung 4-33: Sensorisches Profil des 2013er maischeerhitzten Trollingers mit 0, 10, bzw. 20 mg $O_2/L/M$ onat, nach der Füllung (2014). Daten jeweils normiert auf Variante 0 mg $O_2/L/M$ onat. Signifikanzniveaus: *: 0,05 $\ge p > 0,01$; **: 0,01 $\ge p > 0,001$; ***: $p \le 0,001$.

4.4.4 Lagerstabilität

Der Zusatz von Sauerstoff führt zu einer Intensivierung und Stabilisierung der Rotweinfarbe, da die Bildung ethyliden-verbrückter Polymerer Pigmente gefördert wird. Dieser Abschnitt befasst sich nun mit der Lagerstabilität der in Flaschen gefüllten Weine. Da Sauerstoff den Reifeprozess von Rotweinen allgemein beschleunigt, besteht seitens der Praxis die Sorge, dass die Weine eine verringerte Lagerfähigkeit aufweisen und die Weinfarbe aufgrund übermäßiger Polymerisation der Polyphenole während der Flaschenlagerung an Intensität verliert. Um dies auszuschließen wurde der im April 2014 abgefüllte und mit Drehverschlüssen dicht verschlossene 2013er maischeerhitzte Spätburgunder im Juli 2014 und im Juli 2015 analytisch untersucht und die Ergebnisse verglichen. Über die Lagerfähigkeit mikrooxygenierter Weine wurde bisher nur wenig publiziert. Cejudo-Bastante et al. (2011b) konnten zeigen, dass die Qualität mikrooxygenierter Weine nach einer Lagerdauer von 5 Monaten von Verkostern höher bewertet wird als bei einem nicht-mikrooxygenierten Wein nach gleicher Lagerdauer. Die Farbintensität des mikrooxygenierten Weines nahm in diesem Zeitraum zu. In den Versuchen von Kontoudakis et al. (2011) und González-del Pozo et al. (2010) verringerten sich hingegen die Unterschiede zwischen mikrooxygenierten und nichtmikrooxygenierten Weinen während der Lagerung. Eine sensorische Bewertung erfolgte jedoch nicht.

Die Untersuchung der Lagerstabilität erfolgte im Rahmen einer Diplomarbeit. Alle gezeigten analytischen und sensorischen Daten des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders aus dem Jahr 2015 wurden dazu von Frau Susanne Grimbach gemessen (Grimbach 2015).

4.4.4.1 Stabilität des SO₂-Gehaltes

Wie Abbildung 4-34 zeigt, nahmen die SO₂-Gehalte durch die Lagerung des 2013er Spätburgunders in allen Versuchsvarianten ab. Dies war zu erwarten, da geringste Mengen Sauerstoff durch die Kontaktfläche zwischen Glas und Verschluss diffundieren (Lopes et al. 2009) und im Wein SO₂ zu SO₃, beziehungsweise Sulfit (SO₃⁻) zu Sulfat (SO₄²⁻) oxidieren. Wie groß die Abnahme während der Lagerung ist, hängt von vielen Faktoren ab, sodass es keine allgemein gültigen Werte gibt, um wie viel mg/L der Gehalt der freien oder gesamten SO₂ pro Jahr abnimmt (Ribéreau-Gayon et al. 2006a).

Die Konzentrationen des gesamten SO₂ lagen in den beiden mikrooxygenierten Weinen kurz nach der Füllung im Jahr 2014 etwas höher als im nicht-mikrooxygenierten Kontrollwein. Während der 12-monatigen Lagerdauer nahmen diese in allen Weinen um etwa 25 mg/L ab, sodass die Unterschiede zwischen den Versuchsvarianten weitestgehend erhalten blieben. Ähnlich verhielt sich die Konzentration des freien SO₂. Da sich dessen Konzentration aufgrund der vorliegenden chemischen Gleichgewichte nicht präzise einstellen lässt, variierten die Gehalte im Jahr 2014 kurz nach der Füllung zwischen 40 mg/L und 50 mg/L. In der Kontrollvariante nahm die Konzentration während der Lagerung um 25 mg/L ab und verringerte sich damit um den gleichen Betrag wie in der Variante mit 20 mg O₂/L/Monat. Eine beschleunigte Alterung durch eine schnelleren Abnahme der SO₂ Konzentration konnte somit nicht festgestellt werden.



Abbildung 4-34: Veränderung von freiem und gesamten SO_2 im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder nach der Füllung (2014) und nach 12-monatiger Flaschenlagerung (2015). Fehlerindikatoren aus zwei Messwiederholungen.

4.4.4.2 Anthocyan- und Flavanolgehalt

Der Anthocyan- und der Flavanolgehalt verhielten sich während der Lagerung unterschiedlich. Abbildung 4-35 zeigt, dass die Konzentration der Anthocyane nach zwölf Monaten um durchschnittlich 38 % abgenommen hatte, während bei den Flavanolen die Veränderungen im Bereich der Messunsicherheit lagen.



Abbildung 4-35: Veränderung von Anthocyan- und Flavanolkonzentrationen im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder nach der Füllung (2014) und nach 12-monatiger Flaschenlagerung (2015). Fehlerindikatoren aus zwei Messwiederholungen.

Nagel und Wulf (1979) beschrieben ebenfalls, dass die Konzentration der Anthocyane während der Weinlagerung deutlich abnimmt. Die Autoren beobachteten jedoch auch eine Abnahme der Flavanolkonzentration, obgleich diese geringer war als die Abnahme der Anthocyane. Die Abnahme des Anthocyangehaltes wird durch die Bildung von direkt verknüpften Polymeren Pigmenten verursacht (siehe Abschnitt und 4.4.4.4.). Dies wurde auch von Nagel und Wulf (1979) berichtet. Dazu müsste sich jedoch auch die Konzentration der Flavanole in ähnlichem Umfang verringern. Zugleich könnten jedoch durch saure Hydrolyse von Proanthocyanidinen monomere Flavanole freigesetzt werden, was unter Wein-Bedingungen möglich ist, jedoch sehr langsam abläuft. Durch einen

forcierten Alterungsprozess bei 30°C über einen Zeitraum von mehreren Monaten konnte eine signifikante Abnahme des mittleren Polymerisationsgrades von Proanthocyanidinen beobachtet werden (Vidal et al. 2002). Während der drei Monate andauernden Mikrooxygenierung wurde eine Proanthocyanidinspaltung hier nicht beobachtet, da sie bei 15 °C durchgeführt wurde und die Reaktion bei dieser Temperatur mit wesentlich geringerem Umsatz ablaufen dürfte.

4.4.4.3 Ethyliden-verbrückte Anthocyan-Flavanol Di- und Trimere, Vitisin B

Die Aufnahmeraten für Sauerstoff liegt bei den verwendeten BVS-Verschlüssen mit Saranex-Einlage zwischen 1 und 2 mg/L pro Jahr (Lopes et al. 2009). Da so kaum Acetaldehyd entstehen kann, ist die Bildung von ethyliden-verbrückten Addukten oder Vitisin B in den so verschlossenen Flaschen vermutlich gering. Geringe Mengen Sauerstoff können außerdem während des Füllprozesses in die Flasche gelangen. Daher wurden die Konzentrationen von Vitisin B, der Dimere Mv-et-(E)C (Abbildung 4-36) und der Trimere (E)C-et-Mv-(E)C ein Jahr nach der Flaschenfüllung bestimmt.

In Abbildung 4-36 wird deutlich, dass sich die Konzentrationen der ethyliden-verbrückten Dimere und von Vitisin B während der Lagerung erheblich verringerten. Dies war zu erwarten, da sich auch in der Literatur Hinweise auf eine geringe chemische Stabilität der Dimere finden (Escribano-Bailón et al. 2001). Auch Cejudo-Bastante et al. (2011b) und Kontoudakis et al. (2011) beobachteten bei ihren Lagerversuchen eine Abnahme dieser Verbindungen. Für Vitisin B wird von einer höheren chemischen Stabilität berichtet (Francia-Aricha et al. 1997), was sich auch hier bestätigt: Während sich die Konzentration der Dimere innerhalb von 12 Monaten um 97 bis 98 % verringerte, nahm die Konzentration von Vitisin B zwischen 79 und 92 % ab. In den mikrooxygenierten Weinen war die Abnahme dabei geringer, als in der Kontrolle. Trotz der insgesamt geringen Stabilität dieser Pigmente, wirkte sich der Zusatz von Sauerstoff in diesem Zusammenhang positiv auf das Pigmentprofil aus.



Abbildung 4-36: Veränderung der Konzentrationen von Vitisin B und der ethylidenverbrückten Dimere Mv-et-(E)C im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder nach der Füllung (2014) und nach 12-monatiger Flaschenlagerung (2015). Fehlerindikatoren aus zwei Messwiederholungen.

Da sich die Konzentrationen von Vitisin B und der Dimere stark verringerten, müssen entsprechende Reaktionsprodukte entstanden sein. Da, wie zuvor dargelegt, eine Bildung von Acetaldehyd in der Flasche kaum stattfinden kann, ist die Bildung zusätzlicher Ethyliden-Brücken nicht zu erwarten. Abbildung 4-37 zeigt jedoch, dass die Konzentration der (E)C-et-Mv-et-(E)C Trimere während der Lagerung teilweise zunahm. Verantwortlich dafür könnten Umlagerungsreaktionen sein. Die Spaltung ethylidenverbrückter Flavanol-Flavanol-Dimere führt, wie von Mateus et al. (2002) beschrieben, zu Vinylflavanolen. Es ist vorstellbar, dass diese mit den ethyliden-verbrückten Dimeren zu den entsprechenden trimeren Addukten reagierten. Außerdem könnten die Anthocyan-Flavanol-Dimere selbst gespalten werden und sich zu trimeren Verbindungen umlagern, auch wenn es dazu in der Literatur bisher keine Hinweise gibt.

Während bei den ethyliden-verbrückten Dimeren und bei Vitisin B die Konzentrationen in den beiden mikrooxygenierten Varianten stets am größten waren, kehren sich die Verhältnis bei den ethyliden-verbrückten Trimeren um. Zu Beginn des Lagerversuchs 2014 wardie Konzentration in der mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Variante ebenfalls am größten. Hier nahm die Konzentration während der Lagerung ab. In der Kontrollvariante war hingegen eine deutlich Zunahme zu beobachten, sodass nach der Lagerung die Konzentration dort am höchsten war. In der mit 10 mg O₂/L/Monat veränderte sich der Gehalt hingegen kaum und lag jeweils in der Mitte der beiden anderen Varianten.



Abbildung 4-37: Veränderung der Konzentrationen der ethyliden-verbrückten Trimere (E)C-et-Mv-et-(E)C im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder nach der Füllung (2014) und nach 12-monatiger Flaschenlagerung (2015). Fehlerindikatoren aus zwei Messwiederholungen.

Diese Beobachtung stützt die These, dass es tatsächlich zu einer Polymerisation vom Dimer Mv-et-(E)C zum Trimer (E)C-et-Mv-et-(E)C und von dort zu höhermolekularen Addukten kommt. In der Kontrolle lief die Bildung des Trimers schneller ab, als die Entstehung eines potentiellen Tetramers, infolge dessen erhöhte sich die Trimerkonzentration. In der mit 20 mg O₂ mikrooxygenierten Variante lief die Folgereaktion hingegen schneller ab als die Bildung des Trimers, sodass dessen Konzentration während der Lagerung abnahm. In dieser Hinsicht sind die mikrooxygenierten Weine in ihrer Reife weiter entwickelt, als die nicht-mikrooxygenierte Variante. Sollte eine fortschreitende Polymerisation nach mehreren Jahren der Lagerung zu einem Ausfallen von Pigmenten führen, wären die mikrooxygenierten Weine daher vermutlich früher betroffen, als die Kontrolle.

Potentielle Reaktionsprodukte von Vitisin B wurden nicht gefunden. Es sind in der Literatur bisher keine Polyphenoladdukte bekannt, die als Reaktionsprodukte aus Vitisin B hervorgehen könnten. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass solche Produkte existieren müssen.

4.4.4.4 Direkt verknüpfte Anthocyan-Flavanol Dimere

Da die Anthocyan-Konzentration während der Lagerung erheblich abnahm, ethylidenverbrückte Anthocyan-Derivate und Vitisin B aber nicht gebildet wurden, müssen andere Reaktionsprodukte, beispielsweise direkt verknüpfte Anthocyan-Flavanol Addukte, entstanden sein. Das LCMS-Chromatogramm zeigte zwei entsprechende Peaks mit m/z = 781,1911. Die exakte Masse und die Fragmentspektren lassen darauf schließen, dass es sich um farbige F-A⁺ (oder A⁺-F) Addukte handelt (Salas et al. 2004a). Abbildung 4-38 zeigt, dass die Konzentration dieser Pigmente kurz nach der Füllung im Jahr 2014 in der mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Variante geringer war, als in der Kontrollvariante ohne Sauerstoffzusatz. Ursache hierfür könnte sein, dass Sauerstoff die Bildung ethyliden-verbrückter Anthocyane förderte und so weniger monomere Anthocyane für direkte Interflavan-Bindungen zur Verfügung standen.

Auch nach der 12-monatigen Lagerung waren die Konzentrationen der direkt verknüpften Addukte in den mikrooxygenierten Varianten geringer als in der Kontrolle. Allerdings hatten sie sich in allen Varianten jeweils verzehnfacht. Die Konzentrationen waren damit deutlich größer als die der ethyliden-verbrückten Dimere, während sie ein Jahr zuvor noch geringer gewesen waren. Daraus lässt sich schließen, dass die Bildung der direkt verknüpften Addukte deutlich langsamer oder zeitlich verzögert abläuft. Dies lässt sich bei der Mikrooxygenierung nutzen. Durch einen frühen Zusatz von Sauerstoff kann die Bildung von ethyliden-verbrückten Pigmenten forciert und die Konzentration der direkt verknüpften Dimere langfristig verringert werden. Eine geringere Konzentration direktverknüpfter Anthocyan-Flavanol-Addukte ist wünschenswert, da sie teilwiese farblos sind und daraus gelbe Xanthylium-Ionen entstehen können, die zu braunen Farbnuancen im Wein führen (Remy-Tanneau et al. 2003, Salas et al. 2004b).



Abbildung 4-38: Veränderung der Konzentration der direkt verknüpften Dimere Mv-(E)C im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder nach der Füllung (2014) und nach 12monatiger Flaschenlagerung (2015). Quantifizierung in äquivalenten des Dimers Mv-et-(E)C. Fehlerindikatoren aus zwei Messwiederholungen.

4.4.4.5 Stabilität der Weinfarbe

Die bisher gezeigten Ergebnisse belegen, dass sich das Pigmentprofil des Weines während der 12-monatigen Lagerung in der Kontrollvariante und in den mikrooxygenierten Varianten stark veränderte. Es ist zu erwarten, dass sich dies auch auf die Weinfarbe auswirkte. Häufig ist während der Rotweinlagerung eine Abnahme der Farbintensität zu beobachten (Sartini et al. 2007). Dies war auch hier der Fall: Abbildung 4-39 zeigt, dass die Helligkeit L* während der Lagerung in allen Versuchsvarianten zunahm. Die mikrooxygenierten Weine zeichneten sich auch nach der Lagerung durch eine geringere Helligkeit aus als die Kontrollvariante. Im Jahr 2014 war L* in dem mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Wein um 8,3 Einheiten geringer als in der Kontrolle. Im Jahr darauf betrug die Differenz sogar 11,4 Einheiten.

Atanasova et al. (2002b), González-del Pozo et al. (2010) und Oberholster et al. (2015) beobachteten während der Flaschenlagerung ebenfalls eine Zunahme von L*

beziehungsweise Abnahme der Farbintensität. Vor und nach der Lagerung war jedoch der mikrooxygenierte Wein dunkler als die Kontrolle, obgleich sich die Unterschiede während der Lagerung verringerten.



Abbildung 4-39: Veränderung der Helligkeit L* im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder nach der Füllung (2014) und nach 12-monatiger Flaschenlagerung (2015). Fehlerindikatoren aus zwei Messwiederholungen.

Einer Wiederholung des Lagerversuchs der beiden 2015er maischeerhitzten Spätburgunder zeigte ähnliche Ergebnisse. Die Helligkeit wurde bei diesen Weinen im Jahr 2016 kurz nach der Füllung und im Jahr 2017, nach insgesamt 18-monatiger Lagerdauer, gemessen (Abbildung 4-40). Im Spätburgunder 1 war die gemessene Helligkeit durch Zusatz von Sauerstoff (10 mg O₂) um 4 Einheiten geringer als in der Kontrolle (0 mg O₂). Nach der Lagerung nahm die Helligkeit in beiden Varianten um den gleichen Betrag von 6 Einheiten zu, sodass der mit Sauerstoff behandelte Wein noch immer eine geringere Helligkeit aufwies. Im Spätburgunder 2 war die Helligkeit in der mikrooxygenierten Variante um 8,5 Einheiten geringer als in der Kontrolle. Auch hier bewirkte die Lagerung in beiden Varianten eine Zunahme der Helligkeit um etwa 6 Einheiten.



Abbildung 4-40: Veränderung der Helligkeit L* im 2015er maischeerhitzten Spätburgunder 1(ME SB 1) und im 2015er maischeerhitzten Spätburgunder 2 (ME SB 2) nach der Füllung (2016) und nach 18-monatiger Flaschenlagerung (2017). Sauerstoffzusatz (10 mg O2) führte gegenüber der Kontrolle (0 mg O2) jeweils zu einer geringeren Helligkeit. Fehlerindikatoren aus zwei Messwiederholungen.

Damit führte der Zusatz von Sauerstoff nicht nur zum Zeitpunkt der Füllung zu einer intensiveren Weinfarbe, sondern auch der während der Lagerung eintretende Verlust von Farbintensität konnte bei Weinen des Jahrgangs 2013 begrenzt werden. Bei zwei Weinen des Jahrgangs 2015 blieb die durch den Sauerstoff hervorgerufene Farbintensivierung gegenüber der jeweiligen Kontrolle erhalten. Ein Ausfallen von Pigmenten aufgrund einer übermäßigen Polyphenolpolymerisation fand somit nicht statt.

Auch die Farbqualität entwickelte sich durch den Zusatz von Sauerstoff positiv, wie Abbildung 4-41 zeigt. Der Rotanteil a* des Farbtones nahm in allen Weinen ab, wobei die Kontrollvariante mit einer Abnahme um 15 Einheiten am stärksten betroffen war und die Variante 20 mg O₂/L/Monat mit einer Abnahme um 3,2 Einheiten die geringste Veränderung zeigte. Während die mikrooxygenierten Weine kurz nach der Füllung im Vergleich zur Kontrolle einen geringeren Rotanteil aufwiesen, war es im Jahr darauf genau umgekehrt. Ursache für die Abnahme des Rotanteils in der Kontrolle ist vermutlich die beobachtete Bildung von direkt-verknüpften A⁺-F Addukten aus monomeren Anthocyanen, die anschließend zu Xanthyliumionen umgesetzt wurden und somit nicht mehr zum Rotanteil beitragen. In den mikrooxygenierten Weinen wurden umgekehrt weniger direkt-verknüpfte Addukte detektiert – entsprechend war hier die Abnahme von a* geringer. Die optische Farbqualität der mikrooxygenierten Weine sollte sich damit durch einen brillanteren Rot-Ton und eine geringere Brauntönigkeit auszeichnen.

Der Gelbanteil b* veränderte sich kaum. Die Differenzen lagen meist im Bereich +/- 1 Einheiten und wirken sich somit optisch nicht aus. Es ist eine leichte Tendenz zu erkennen, dass b* in der Kontrollvariante etwas zunahm, während in den beiden mikrooxygenierten Weinen eher eine Abnahme gemessen werden konnte. Bei intensiverer Ausprägung dieses Effekts würde eine Abnahme von b* ebenfalls eine geringere Brauntönigkeit bewirken.



Abbildung 4-41: Veränderung des Rotanteils a* und des Gelbanteils b* im 2013er maischeerhitzten Spätburgunder nach der Füllung (2014) und nach 12-monatiger Flaschenlagerung (2015). Fehlerindikatoren aus zwei Messwiederholungen.

Durch den Sauerstoffzusatz konnte eine nachhaltige Farbvertiefung erreicht werden, die auch ein Jahr nach der Füllung noch messbar war. Die Tendenz zur Bildung von braunen Farbnuancen war in den mikrooxygenierten Weinen geringer als in der entsprechenden Kontrolle. Die Konzentration der ethyliden-verbrückten Malvidin-Catechin Dimere und Vitisin B nahm während der Lagerzeit in allen Versuchsvarianten ab. Dies war in dem mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Wein auch für die ethyliden-verbrückten Trimere zu beobachten. Gerade in dieser Variante blieben Farbintensität und Farbton besonders stabil. Daraus folgt, dass die aus den Di- und Trimeren gebildeten Reaktionsprodukte ähnliche Farbeigenschaften aufweisen müssen, wie diese selbst.

4.4.4.6 Veränderung der sensorischen Eigenschaften

Der 2013er maischeerhitzte Spätburgunder wurde nach der 12-monatigen Lagerung, ein zweites Mal sensorisch beurteilt, nachdem die erste Verkostung bereits im Jahr 2014 stattgefunden hatte (siehe Abschnitt 4.4.3). Dabei wurden mit 10 bzw. 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Weine erneut farbintensiver bewertet als die Kontrolle. Die Unterschiede waren sogar ausgeprägter als im Jahr 2014. Der mit 10 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierte Wein hatte, verglichen mit der Kontrolle, nun eine 1,5-fache, der Wein mit 20 mg O₂/L/Monat sogar eine 2-fach höhere Farbintensität. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der spektralphotometrischen Farbmessung. Der Farbton der mikrooxygenierten Weine erschien im Vergleich zur Kontrolle auch nach der Lagerung stärker violett und weniger brauntönig.

Im Geruch traten die im Jahr 2014 festgestellten Unterschiede im Attribut "Schokolade" nun nicht mehr auf. Negative Einflüsse des Sauerstoffzusatzes, etwa eine höhere Bewertung der Attribute "oxidativ", oder "bitter" waren nicht feststellbar. Der mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierte Wein wurde allerdings im Attribut "Körper" etwas niedriger bewertet, der Unterschied zur Kontrolle war dabei zwar signifikant, aber sehr gering. Dennoch kann dies als Anzeichen einer potentiellen Überoxidation angesehen werden.



Abbildung 4-42: Sensorisches Profil des 2013er maischeerhitzten Spätburgunders mit 0, 10, bzw. 20 mg $O_2/L/M$ onat, nach 12-monatiger Flaschenlagerung (2015). Daten jeweils normiert auf Variante 0 mg $O_2/L/M$ onat. Signifikanzniveaus: *: 0,05 $\geq p > 0,01$; **: 0,01 $\geq p > 0,001$; ***: $p \leq 0,001$.

4.4.5 Zwischenfazit zum vierten Teil

Die SO₂-Gabe führt bei Rotwein meist zu einer Abnahme der Farbintensität beziehungsweise einer Zunahme der Helligkeit. Dies konnte im Versuch mit einem 2014er Spätburgunder auch durch die vorherige Mikrooxygenierung nicht vollständig verhindert werden. Im Vergleich zur Kontrolle nahm die Helligkeit L* des mikrooxygenierten Weines jedoch deutlich weniger zu. Damit wirkte sich der Sauerstoff auf die Farbintensität und die Farbstabilität gleichermaßen positiv aus.

Acetaldehyd, das einerseits als Edukt für die Bildung der ethyliden-verbrückten Pigmente unbedingt erforderlich ist, kann andererseits zu einer erhöhten Konzentration der Gesamt-SO₂ führen. Da die Konzentrationen für Gesamt-SO₂ gesetzlich limitiert sind, würde dies ein Problem darstellen. Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche war die Gesamt-SO₂ jedoch in keinem der mikrooxygenierten Weine höher als in der Kontrolle.

Bei der sensorischen Bewertung der Weine zeigte sich, dass durch den Sauerstoff im Wesentlichen die Farbeigenschaften beeinflusst wurden. Das Aromaprofil blieb hingegen weitgehend unverändert. Insbesondere bildeten sich keine Oxidationsaromen, die als Fehlnoten gelten und die Verkehrsfähigkeit der Weine in Frage stellen würden. Anders als in der Literatur häufiger beschrieben (González-Sanjosé et al. 2008, Durner et al. 2010b, Parpinello et al. 2012), wurden die Geschmackseigenschaften durch den Sauerstoffzusatz ebenfalls kaum beeinflusst, was an den insgesamt geringen Gesamtphenolgehalten der hier verwendeten Spätburgunder und Trollinger liegen könnte.

Der Sauerstoffzusatz wirkte sich nicht nachteilig auf die Lagerfähigkeit aus. Wie auch von Atanasova et al. (2002a) und Oberholster et al. (2015) beobachtet, war die Abnahme der Farbintensität der mikrooxygenierten Weine geringer als in der Kontrolle. Ein negativer Einfluss auf das Geruchs- oder Geschmacksprofil konnte nicht festgestellt werden.

Die Konzentrationen von ethyliden-verbrückten Malvidin-(Epi)Catechin Dimeren und Vitisin B nahmen während der Lagerung in der Flasche in Übereinstimmung mit der Literatur (Cejudo-Bastante et al. 2011b, Kontoudakis et al. 2011) erheblich ab. Stattdessen bildeten sich, aufgrund der sauerstoffarmen Atmosphäre und des Mangels an Acetaldehyd, bevorzugt direkt verknüpfte Malvidin-(Epi)Catechin Addukte. Die Konzentration der ethyliden-verbrückten Trimere nahm in dem mit 20 mg O₂/L/Monat mikrooxygenierten Weinen während der Lagerung ab, in der Kontrollvariante hingegen zu. Da in der Flasche kaum freies Acetaldehyd vorliegt, deutet letzteres auf eine Umlagerungsreaktion hin.

4.5 <u>Teil V: Analytische Kennwerte zur Eignung von Rotweinen für die</u> <u>Mikrooxygenierung</u>

Sauerstoff kann nach derzeitigem Kenntnisstand nicht nur zu einer Farbvertiefung sondern auch zu einer Verringerung der Farbintensität führen (Durner et al. 2010b, Parpinello et al. 2012). Eines der Ziele dieser Arbeit ist es daher, die Chancen und Risiken eines Zusatzes von Sauerstoff zum Wein anhand chemisch-analytischer Messgrößen bewerten zu können. In der Literatur wurden dazu das Flavanol-Anthocyan Verhältnis (FAV) (Fulcrand et al. 2004, Durner 2011) und das Tannin-Anthocyan Verhältnis (TAV) diskutiert (Picariello et al. 2017). Bisher liegen dazu jedoch nur sehr wenige Daten vor. Um die Eignung des FAV und des TAV für eine solche Bewertung zu prüfen und weitere zu diesem Zweck geeignete Parameter zu identifizieren, wurden insgesamt 21 Weine aus drei aufeinanderfolgenden Jahrgängen einem Sauerstoffzusatz unterzogen. Um eine möglichst breite Basis unterschiedlicher Weine zu gewährleisten, wurde das Polyphenolprofil durch verschiedene Verfahren der Weinerzeugung wie Maischeerhitzung, Maischegärung, Kaltmazeration oder durch eine verlängerte Mazerationszeit variiert. Einige Weine wurden außerdem in mehrere Chargen aufgeteilt und mit oenologischen Tanninen oder Eichenholzchips versetzt, um das Verhältnis von Anthocyanen zu Tanninen gezielt zu variieren. Bei jedem dieser Weine wurde jeweils vor Beginn der Mikrooxygenierung eine ausführliche analytische Untersuchung des Polyphenolprofils durchgeführt. Nach erfolgter Sauerstoffgabe, Stabilisierung und Füllung wurden das Polyphenolprofil und die Farbeigenschaften der Weine nochmals analytisch untersucht und sensorisch bewertet. Beides diente dem Zweck, den durch die Mikrooxygenierung erzielten Erfolg anhand von Kennwerten zu charakterisieren und mittels statistischer Verfahren mit den vor der Sauerstoffgabe gemessenen Werten zu korrelieren. Für den Jahrgang 2015 wurden dazu teilweise Daten verwendet, die von Frau Christine Schäfer im Rahmen einer Diplomarbeit gemessen wurden (Schäfer 2016).

4.5.1 Chemisch-Analytische Charakterisierung vor und nach dem Sauerstoffzusatz

Vor der Mikrooxygenierung wurden Gesamtphenole, SPP, LPP und Tanningehalt mit dem Harbertson-Adams Assay bestimmt und daraus zusätzlich der Gesamtgehalt polymerer Pigmente (SPP + LPP), sowie das Verhältnis von SPP zu LPP (SPP/LPP) und das TAV berechnet. Mit der HPLC erfolgte die Bestimmung des Anthocyan- und des Flavanol-Gehaltes zur Berechnung des FAV. Die Ergebnisse dieser analytischen Untersuchungen sind in Tabelle 4-8 aufgeführt.

Nach Abschluss der Mikrooxygenierung erfolgte eine Bewertung, ob sich die Farbintensität durch den Zusatz von Sauerstoff gegenüber der jeweiligen Kontrolle signifikant veränderte (Signifikanzniveau 95%). Dazu wurde die Helligkeit L* im CIE-L*a*b* System zwischen den mikrooxygenierten Weinen und der jeweils mitgeführten Kontrolle verglichen. Eine Zunahme der Farbintensität (kleinerer L*-Wert im mikrooxygenierten Wein) wurde in Tabelle 4-8 mit einem "+", eine Abnahme mit einem "-" gekennzeichnet. Ferner wurde der Einfluss auf die Weinfarbe im Rahmen einer sensorischen Beurteilung bewertet, indem die Farbintensität der mikrooxygenierten Weine mit der jeweiligen Kontrollvariante verglichen wurde. In Tabelle 4-8 ist die Zunahme der sensorischen Farbintensität ebenfalls durch ein "+", die Abnahme durch ein "-" dargestellt. Bei insignifikanten Unterschieden, wurde dies sowohl bei der photometrischen Messung als auch bei der sensorischen Bewertung in der Tabelle mit "0" gekennzeichnet.

Insgesamt konnte durch die Mikrooxygenierung bei 16 Weinen gegenüber der Kontrolle ein geringerer Wert für L* und damit eine Zunahme der Farbintensität erzielt werden. Bei vier Weinen kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen Kontrolle und behandelter Variante. Die sensorische Beurteilung der Farbintensität zeigte hingegen, dass die Farbintensität durch die Mikrooxygenierung nur bei 14 Weinen gesteigert werden konnte, sich bei zwei Weinen nicht signifikant veränderte, bei fünf Weinen jedoch gegenüber der Kontrolle abnahm. Bei letzteren handelte es sich in zwei Fällen um die Weine, bei denen photometrisch keine signifikanten Unterschiede gemessen wurden. Bei drei Weinen wurde photometrisch eine Zunahme, sensorisch jedoch eine Abnahme der Farbintensität festgestellt. Dieser Gegensatz zeigt, dass sich die Wahrnehmung durch das menschliche Auge nicht mit einer photometrischen Messung gleichsetzen lässt.

L*-Wertes oder einer	höheren Be	ewertung	der senso	rischen F	arbintensitä	t nach dei	r Mikroo	xygenierur	ıg.	(
Versuchsvariante	GP. HAA	SPP	LPP	Tannin	SPP/LPP	SPP+ LPP	TAV	Flav. HPLC	Anth. HPLC	FAV	Erfolg L*	Erfolg Sens.
	(mg/L)	(AU)	(AU)	(mg/L)	•	I	I	(mg/L)	(mg/L)	•	ı	,
2013_ME_SB_KO	872	0,34	0,05	131	7,2	0,4	1,1	78	135	0,6	+	+
2013_ME_SB_TN	1163	0,37	0,07	174	5,1	0,4	1,6	93	130	0,7	+	+
2013_ME_SB_Ch	938	0,36	0,06	151	6,3	0,4	1,3	76	129	0,6	+	+
2013_ME_TR_KO	740	0,24	0,04	150	5,7	0,3	1,3	87	113	0,8	+	+
2013_ME_TR_TN	875	0,23	0,08	208	2,9	0,3	1,8	106	111	1	+	+
2013_ME_TR_Ch	795	0,25	0,07	180	3,5	0,3	1,6	87	111	0,8	+	+
2013_MG_SB_KO	1201	1	1,07	412	0,9	2,1	8,8	118	30	4	0	ı
2013 _MG_SB_KM	1438	1	1,12	439	0,9	2,1	7,9	133	18	7,4	0	+
2013 _MG_SB_EM	1118	0,79	0,87	375	0,9	1,7	13,2	175	39	4,5	0	ı
2014 _ME_SB	1975	$0,\!61$	0,21	439	2,9	0,8	2,7	326	126	2,6	+	+
2014 MG SB AP	1068	0,63	$0,\!41$	320	1,5	1	2	70	120	$0,\!6$	+	+
2014 MG SB US	1417	$0,\!62$	0,44	425	1,4	1,1	2,1	106	169	$0,\!6$	+	+
2014 _ME_TR	594	$0,\!4$	0,03	62	12,6	0,4	0,5	67	114	$0,\!6$	+	ı
2014 MGTR	2395	1,09	1,2	894	0,9	2,3	7,9	200	83	2,4	+	·
2015_ME_SB_WZG	773	0,36	0,07	81	S	0,4	0,5	138	149	0,9	+	+
2015 MG SB WZG	1744	0,5	0,33	541	1,5	0,8	ω	221	194	1,1	+	+
2015_ME_LB_WZG	1638	0,35	0,08	452	4,1	0,4	2,3	87	224	0,4	0	0
$2015 ME_SB_AG$	1322	0,42	0,13	361	3,3	0,5	2,7	110	117	0,9	+	+
2015 MG SB AG	1990	0,88	0,53	525	1,7	1,4	2,8	168	156	1,1	+	0
2015 MG SB DB	1245	0,31	0,17	423	1,8	0,5	2,7	164	173	0,9	+	ı
2015_MG_SB_SWG	797	$0,\!28$	0,03	115	9,6	0,3	1	112	120	0,9	+	+
HAA: Harbertson-Ada TAV: Tannin- Anthocy	ıms Assay; (van-Verhält	3P: Gesam nis nach D	ıtphenolge aten aus d	halt; Anth. em HAA;]	: Anthocyang Flav.: Flavano	;ehalt; TPI olgehalt; F	2: "Total I AV: Flav	⁹ olymeric F anol-Antho	igments", S cvan-Verhä	Summe au altnis aus	ıs SPP und HPLC-Dat	i LPP; ten;
Sens.: Sensorik												

Ergebnisse und Diskussion

178

Die Weine, bei denen der Sauerstoffzusatz keinen oder einen negativen Einfluss auf die gemessene oder sensorische Farbintensität hatte, wiesen meist Besonderheiten im Polyphenolprofil auf. So war das TAV bei den Varianten 2013 MG SB KO, 2013 MG SB KM und 2013 MG SB EM, sowie 2014 MG TR besonders hoch. Hier fehlten den Flavanolen und Tanninen offenbar die Anthocyane als Reaktionspartner. Das größte TAV, bei dem noch eine Zunahme der Farbintensität beobachtet wurde, betrug 2,9. Dies ist gegenteilig zu den Ergebnissen von Picariello et al. (2017), die zeigten, dass der zu erwartende Erfolg eines Sauerstoffzusatzes in Weinen der Rebsorte Pinotage mit zunehmendem TAV kontinuierlich ansteigt. Bei der Variante 2014 ME TR allerdings war aufgrund einer besonders geringen Tanninkonzentration das TAV mit einem Wert von 0,5 sehr klein. Auch bei diesem Wein wurde die Farbintensität des mikrooxygenierten Weines niedriger bewertet als die Kontrolle. In diesem Fall fehlten den Anthocyanen möglicherweise die Tannine als Reaktionspartner. Da bei Variante 2015 ME SB WZG das TAV ebenfalls 0,5 betrug, die Mikrooxygenierung hier jedoch zu einer intensiveren Weinfarbe führte, sind die Ergebnisse diesbezüglich nicht eindeutig. Insgesamt sollte das TAV, wie von Fulcrand et al. (2004) und (Durner et al. 2010b) vorgeschlagen, weder zu groß noch zu klein sein, um durch Zusatz von Sauerstoff eine größere Farbintensität zu erzielen.

4.5.2 Statistische Auswertung

Zur Verdeutlichung der Zusammenhänge zwischen den analytischen Daten und einer farbintensivierenden Wirkung der Mikrooxygenierung sowie ihrer visuellen Darstellung wurde eine statistische Auswertung vorgenommen. Als analytische Parameter flossen Flavanole, Tannine, SPP, LPP und Anthocyane ein. Die Anthocyane wurden chromatographisch mittels HPLC und zugleich spektralphotometrisch mittels Harbertson-Adams Assay bestimmt. Dies sollte einer Einschätzung dienen, ob die Anwendung des kostengünstigeren photometrischen Verfahrens in der Praxis der Weinbereitung ausreichend ist. Die berechneten Parameter TAV und FAV flossen ebenfalls in die statistische Auswertung ein.

Da die Differenzen bezüglich Polyphenolgehalten und Farbintensitäten zwischen den Weinen meist größer waren, als die durch den Sauerstoff erzeugten Unterschiede, würde eine Betrachtung von Absolutwerten nicht zu sinnvollen Ergebnissen führen. Um nur den Einfluss von Sauerstoff auf die Gehalte von SPP, LPP, Tanninen und L* darzustellen, wurden daher bei diesen Parametern die Differenz zwischen den mikrooxygenierten Weinen und der jeweiligen Kontrolle gebildet.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei der Helligkeit die Differenz umgekehrt zwischen L* (Kontrolle) und L* (Mikrooxygenierung) gebildet, sodass ein hoher positiver Wert eine "Zunahme der Farbintensität" darstellt. Entsprechend wurde dieser Parameter in der graphischen Darstellung auch so bezeichnet.

Abbildung 4-43 zeigt, dass sich die Weine anhand der gewonnen Daten in einer Diskriminanzanalyse sehr gut nach Jahrgängen klassifizieren lassen. Einer der größten Faktoren war dabei die Farbzunahme. Bei den Weinen des Jahrgangs 2013 war diese am größten, bei denen des Jahrgangs 2014 hingegen am geringsten. Letztere wiesen die höchsten Flavanol- bzw. Tanninkonzentrationen auf. Die Parameter "SPP vor MOX", "LPP vor MOX", "FAV" und "TAV" trugen hingegen kaum zur Diskriminierung der Jahrgänge bei, variierten also in allen Jahrgängen im Mittel gleich. Dies zeigt, dass es über die Jahrgänge hinweg Faktoren gibt, die die Zunahme der Farbintensität beeinflussen, die jedoch hier nicht erfasst wurden. Um zu vermeiden, dass diese jahrgangsspezifischen Unterschiede die den Einfluss des Polyphenolprofils überdecken, wurden im Folgenden Hauptkomponentenanalysen für jeden Jahrgang separat durchgeführt. Die zugehörigen Korrelationsmatrices finden sich am Ende dieses Kapitels.



Abbildung 4-43: Diskriminanzanalyse nach Jahrgängen mit allen Versuchsweinen. Ellipsen repräsentieren ein 95% iges Konfidenzintervall.

4.5.2.1 Ergebnisse des Versuchsjahrganges 2013

Das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse für den Jahrgang 2013 ist in Abbildung 4-44 dargestellt. In der Projektion der Faktorladungen (Abbildung 4-44, unten) zeigt sich eine gute Korrelation ($R^2 = 0,729$) zwischen den mittels HPLC ("Anthocyane HPLC") und mittels Harbertson-Adams Assay ("Anthocyane HAA") bestimmten Anthocyangehalten. Dies zeigt, dass das kostengünstigere photometrische Verfahren für die hier vorgesehene Anwendung geeignet ist und in der Praxis ausreicht. Weiterhin besteht eine positive Korrelation zwischen "SPP vor MOX" und "LPP vor MOX" ($R^2 = 0,885$), also den Gehalten der Polymeren Pigmente vor dem Sauerstoffzusatz. Kleine und große Polymere Pigmente traten in den untersuchten Weinen somit zumeist gleichzeitig in hohen Konzentrationen auf. Die beiden Parameter waren außerdem jeweils negativ mit den Anthocyangehalten korreliert ($R^2 = 0,796$). Das heißt, je weniger Anthocyane vor der Mikrooxygenierung in einem Wein enthalten waren, desto höher war umgekehrt der Anteil von SPP und LPP. Dies erscheint plausibel, denn bei einem hohen Gehalt Polymerer Pigmente, müssen bereits größere Teile der monomeren Anthocyane zu diesen Produkten reagiert sein.

Die Parameter "SPP vor MOX", "LPP vor MOX", sowie "TAV vor MOX" und "FAV vor MOX", zeigten ebenfalls negative Korrelationen mit der Zunahme der Farbintensität mit Bestimmtheitsmaßen zwischen $R^2 = 0.404$ ("FAV HPLC") und $R^2 = 0.687$ ("SPP vor MOX"). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Picariello et al. (2017), die zeigten, dass ein Sauerstoffzusatz die Farbintensität umso stärker erhöht, je größer das TAV ist. Allerdings wurde dort die Tanninkonzentration nur durch den Zusatz oenologischer Tanninpräparate (Traubenschalentannin) erhöht. Die Konzentration der Anthocyane blieb umgekehrt unverändert, sodass die Weine mit dem höchsten TAV stets auch den größten Polyphenolgehalt und damit das größte Potential zur Bildung Polymerer Pigmente aufwiesen. Wie aus Tabelle 4-8 ersichtlich und im vorherigen Abschnitt erläutert, konnte in der vorliegenden Arbeit die Farbintensität durch die Mikrooxygenierung nie erhöht werden, wenn das TAV deutlich größer als 3 war. Das höchste TAV in den von Picariello et al. (2017) untersuchten Weinen lag jedoch gerade bei 3, sodass deren Ergebnisse für Weine mit einem TAV größer 3 nur eine begrenzte Aussagekraft haben.



Abbildung 4-44: Hauptkomponentenanalyse mit Versuchsweinen des Jahrgangs 2013. Projektion der Faktorladungen (oben) und der Faktorwerte (unten).

Die Zunahme der SPP korrelierte in den Weinen des Jahrgangs 2013 nur sehr schwach mit einer Zunahme der Farbintensität ($R^2 = 0,202$), während zwischen der Zunahme der LPP und der Zunahme der Farbintensität kein Zusammenhang festgestellt wurde ($R^2 = 0,0012$). Dies widerspricht der Theorie, dass die intensivere Weinfarbe gerade durch die Bildung der Polymeren Pigmente verursacht wird (Somers 1971, Sims und Morris 1985, Harbertson und Spayd 2006) und lässt sich nur dadurch erklären, dass es offenbar Pigmente gibt, die gegenüber großen Mengen SO₂, wie sie bei der analytischen Bestimmung der SPP und LPP zum Einsatz kommen, stabil sind, jedoch unter den üblichen Wein-bedingungen eine geringer Farbintensität aufweisen, als andere aus Anthocyanen gebildete Weinpigmente.

Der Parameter "Zunahme Tannine" korrelierte indes mit keinem der anderen Parameter und lässt sich so anhand des Polyphenolprofils vor der Mikrooxygenierung nicht vorhersagen.

Die Faktorwerte ordneten sich in drei Gruppen an (Abbildung 4-44, unten). Auf der rechten Seite befinden sich die maischevergorenen Weine, deren Farbintensität sich durch den Sauerstoffzusatz kaum veränderte. Diese wiesen jedoch schon vor der Mikrooxygenierung eine hohe Konzentration von SPP und LPP auf, sowie ein hohes FAV beziehungsweise TAV. Ein hoher Gehalt von SPP und LPP vor der Mikrooxygenierung scheint also ein negatives Kriterium für den Sauerstoffzusatz darzustellen: Wo bereits eine große Menge polymerer Pigmente und nur noch wenige Anthocyane vorhanden sind, können kaum weitere SPP und LPP zu Farbintensivierung gebildet werden.

Im linken unteren Quadranten findet sich die Gruppe der Weine, bei denen SPP und LPP während des Sauerstoffzusatzes am stärksten zugenommen hatte. Dies waren die maischeerhitzten Weine der Rebsorte Spätburgunder. Auch die Zunahme der Farbintensität war bei diesen Weinen sehr zufriedenstellend. Der Zusatz von oenologischen Tanninen (ME_SB_TN_10) und Eichenholzchips (ME_SB_Ch_10) führte im Vergleich zur Kontrolle (ME_SB_KO_10) zu einer größeren Zunahme der LPP, was sich jedoch kaum auf die Farbintensität auswirkte.

Die Weine im oberen linken Quadranten der Beobachtungen zeigten die größte Zunahme der Farbintensität. Bei diesen Weinen handelte es sich um die maischeerhitzten Weine der Sorte Trollinger. Es waren die Weine mit dem höchsten Anthocyangehalt und dem niedrigsten FAV bzw. TAV. Eine Differenzierung der innerhalb dieser Gruppe fand kaum statt, obwohl auch hier oenologische Tannine und Eichenholzchips zugesetzt worden waren. Der Zusatz von Sauerstoff hatte bei den maischeerhitzten Weinen des Jahrgangs 2013 einen erheblich größeren Einfluss auf die Farbintensität als bei den maischevergorenen Weinen.

Es fällt insgesamt auf, dass sich die Weine nach den Traubenchargen gruppierten aus denen sie produziert worden waren. Es wurde zwar versucht, Anthocyan-, Flavanol- und Tanningehalte durch verschiedene Maischegärverfahren und den Zusatz oenologischer Tannine zu variieren, dies gelang jedoch nur bedingt. Wesentlich größer waren hingegen die Einflüsse von Rebsorte und Reifegrad der Trauben. Aus diesem Grund wurden in den Jahrgängen 2014 und 2015 die Versuche zum Sauerstoffzusatz mit einer größeren Anzahl verschiedener Weine aus unterschiedlichen Betrieben durchgeführt.

4.5.2.2 Ergebnisse des Versuchsjahrganges 2014

Die Hauptkomponentenanalyse der Ergebnisse aus dem Jahrgang 2014 (Abbildung 4-45) lieferte ein ähnliches Bild wie im Jahrgang 2013. Auch hier ergab sich eine negative Korrelation zwischen der Farbzunahme und dem TAV ($R^2 = 0,450$), eine Korrelation der Farbzunahme mit dem FAV war mit $R^2 = 0,077$ hingegen nicht festzustellen. Das TAV war in diesem Jahrgang somit zur Vorhersage der Farbzunahme deutlich besser geeignet. Hohe Messwerte für SPP und LPP vor der Mikrooxygenierung wirkten sich, wie bereits im Jahrgang 2013, negativ auf die Farbzunahme aus ($R^2 = 0,360$ bzw. 0,348). Anders als 2013 ergab sich allerdings eine deutliche Korrelation zwischen der LPP während des Sauerstoffzusatzes und der Farbzunahme ($R^2 = 0,516$), sowie eine schwache Korrelation zwischen der Zunahme der SPP und der Farbzunahme ($R^2 = 0,209$).

Die Projektion der Faktorwerte zeigt, dass in diesem Jahrgang bei den maischevergorenen Spätburgundern eine deutlichere Steigerung der Farbintensität erzielt wurde, als bei den maischeerhitzten Weinen. Der mittels Überschwallverfahren erzeugte Wein (MG_SB_US), profitierte dabei mehr von der Sauerstoffzugabe, als der mittels Airpush-Verfahren hergestellte Wein (MG_SB_AP) aus demselben Lesegut, da er mehr Anthocyane und Tannine enthielt (siehe auch Tabelle 4-8) und damit offenbar ein größeres Potential zur Bildung Polymerer Pigmente.



Abbildung 4-45: Hauptkomponentenanalyse mit Versuchsweinen des Jahrgangs 2014. Projektion der Faktorladungen (oben) und der Faktorwerte (unten).

4.5.2.3 Ergebnisse des Versuchsjahrganges 2015

Die Hauptkomponentenanalyse der Analysedaten des Jahrgangs 2015 zeigte ebenfalls eine mäßige negative Korrelation zwischen der Farbzunahme und dem TAV ($R^2 = 0,389$), in zwischen der Farbzunahme und dem FAV bestand in diesem Jahrgang sogar eine schwach positive Korrelation, die aber mit $R^2 = 0,129$ nur knapp 13 % der Farbzunahme erklärte. Dies zeigt, dass das TAV auch in diesem Jahrgang der bessere Parameter zur Vorhersage der Sauerstoffwirkung zu sein scheint. Hohe Gehalte von SPP und LPP vor der Mikrooxygenierung zeigten keine Korrelation mit der Farbzunahme ($R^2 = 0,040$ bzw. $R^2 = 0,084$). Eine Zunahme der Farbintensität war, anders als im Jahrgang 2014, nicht mit einer Zunahme der SPP oder LPP korreliert.

Während 2013 und 2014 stets eine positive Korrelation zwischen dem Anthocyangehalt und der Farbzunahme bestand, waren korrelierten diese beiden Faktoren im Jahrgang 2015 kaum ($R^2 = 0,166$ für Anthocyane HAA). Da die Anthocyane die Ausgangsstoffe für die Bildung farbintensiver Polymerer Pigmente darstellen, wäre eine Korrelation jedoch zu erwarten. Hier müssen noch andere Einflussfaktoren existieren. Denkbar wäre beispielsweise die Bildung von farbstabilen Pigmenten aus farblosen Anthocyan-Dimeren.

Widersprüchlich erscheint die Korrelation zwischen "Anthocyane HAA" und dem TAV $(R^2 = 0,446)$, da hohe Anthocyan Konzentrationen diesen Quotienten eigentlich kleiner werden lassen müsste. Dies kann nur dadurch erklärt werden, dass in diesem Jahrgang anthocyanreiche Weine stets eine vielfach höhere Tanninkonzentration aufwiesen, sodass das TAV scheinbar widersprüchlich mit der Anthocyankonzentration zunahm.

Während sich die meisten Weine in der Projektion der Faktorwerte in der oberen Hälfte befinden, liegt der maischeerhitzte Lemberger (ME_LB_WZG) als einziger weit entfernt in der unteren Hälfte, da er sich als einziger Vertreter dieser Rebsorte offenbar zu sehr von den anderen Weinen unterschied. Die Darstellung verdeutlicht außerdem, dass auch in diesem Jahrgang bei maischeerhitzten und einigen maischevergorenen Weine die Farbintensität durch die Sauerstoffgabe gesteigert werden konnte, während erneut einige maischevergorene Weine (MG_SB_AG, MG_SB_DB) weniger profitierten.



Abbildung 4-46: Hauptkomponentenanalyse mit Versuchsweinen des Jahrgangs 2015. Projektion der Faktorladungen (oben) und der Faktorwerte (unten).

ahme SPP LPP Tannine	,674 -0,738 -0,358 0,342	454 0,545 0,128 0,117 0,454	, 754 0,502 0,120 -0,048 0	,569 0,252 0,014 0,002 uat	,829 -0,596 -0,223 -0,030 sep	687 0,355 0,050 0,001	,690 -0,717 -0,354 0,265 27	476 0,514 0,125 0,070 476	, 583 0,740 0,372 -0,458 ob	,340 0,548 0,138 0,210	530 -0,529 -0,179 0,458 ²	281 0,280 0,032 0,210 0,0	,636 -0,537 -0,093 0,417	404 0,288 0,009 0,174) ,682 -0,592 -0,145 0,348	465 0,350 0,021 0,121	000 0,449 0,035 0,260	000 0,202 0,001 0,068	, 449 1,000 0,797 -0,414	202 1,000 0,635 0,171	.035 0,797 1,000 -0,296	, 001 0,635 1,000 0,088	, 260 -0,414 -0,296 1,000	068 0,171 0,088 1,000
OX zur	912 -(332 0	915 0	337 0	845 -(714 0	916 - (339 0	953 0	908 0	774 -(299 0)- -(974 0)- 000	0 000	682 1	465 1	592 0	350 0	145 0	0 0	348 0	121 0
Σ	0,9	0,8	Ó,	0,8	0,8	0,7	0,9	0,8	, Ģ	0,0	0,7	0,5	0,9	0,0	1,0	1,0	, Ŷ	0,4	, Ó	0,0	,	0,0	0,0	0
MOX	0,886	0,785	-0,874	0,764	0,797	0,635	0,876	0,767	-0,934	0,872	0,816	0,666	1,000	1,000	0,987	0,974	-0,636	0,404	-0,537	0,288	-0,093	0,009	0,417	0,174
HPLC	0,886	0,785	-0,659	0,434	0,759	0,576	0,832	0,692	-0,832	0,692	1,000	1,000	0,816	0,666	0,774	0,599	-0,530	0,281	-0,529	0,280	-0, 179	0,032	0,458	0,210
Antho. HPLC	-0,970	0,941	0,854	0,729	-0,848	0,719	-0,967	0,935	1,000	1,000	-0,832	0,692	-0,934	0,872	-0,953	0,908	0,583	0,340	0,740	0,548	0,372	0,138	-0,458	0,210
LPP vor MOX	0,987	0,974	-0,892	0,796	0,941	0,885	1,000	1,000	-0,967	0,935	0,832	0,692	0,876	0,767	0,916	0,839	-0,690	0,476	-0,717	0,514	-0,354	0,125	0,265	0,070
SPP vor MOX	0,911	0,830	-0,916	0,839	1,000	1,000	0,941	0,885	-0,848	0,719	0,759	0,576	0,797	0,635	0,845	0,714	-0,829	0,687	-0,596	0,355	-0,223	0,050	-0,030	0,001
Antho. HAA	-0,839	0,704	1,000	1,000	-0,916	0,839	-0,892	0,796	0,854	0,729	-0,659	0,434	-0,874	0,764	-0,915	0,837	0, 754	0,569	0,502	0,252	0,120	0,014	-0,048	0,002
lannine	1,000	1,000	-0,839	0,704	0,911	0,830	0,987	0,974	-0,970	0,941	0,886	0,785	0,886	0,785	0,912	0,832	-0,674	0,454	-0,738	0,545	-0,358	0,128	0,342	0,117
	r	ک	r	ک ر	r	ک ر	r	7 2	r	ک ر	r	Z 2	r	Z	r	7 2	r	Z	r	ک ر	r	Z 2	r	Z 2
Variablen	Toppino		Anthocyane	HAA	SPP	vor MOX	LPP	vor MOX	Anthocyane	HPLC	Flavanole	HPLC	FAV vor	MOX	TAV vor	MOX	Farb-	zunahme	Zunahme	SPP	Zunahme	LPP	Zunahme	Tannine

4.5.2.4 Korrelationsmatrices zu den Hauptkomponentenanalysen

Tabelle 9: Korrelationsmatrix nach Pearson für die Hauptkomponentenanalyse der

Ergebnisse und Diskussion

Tannine	Zunahme	Lbb	Zunahme	Sbb	Zunahme	zunahme	Farb-	MOX	TAV vor	MOX	FAV vor	HPLC	Flavanole	HPLC	Anthocyane	MOX	LPP vor	SEE VUI IVIUA		HAA	Anthocyane		Tappipo	Variablen
R ²	r	R^2	r	R^2	r	R^2	r	R^2	r	R ²	r	R^2	r	R^2	r	R^2	r	R^2	r	R^2	r	R^2	r	
0,172	0,030	-0,300	0,090	0,062	0,004	-0,520	0,270	0,962	0,925	0,556	0,309	0,349	0,122	-0,400	0,160	0,868	0,753	0,961	0,924	-0,260	0,068	1,000	1,000	Tannine
-0,227	0,052	0,827	0,684	0,610	0,372	0,743	0,552	-0,502	0,252	-0,214	0,046	0,040	0,002	0,965	0,931	-0,397	0,158	-0,407	0,166	1,000	1,000	-0,261	0,068	Antho. HAA
0,083	0,007	-0,320	0,102	0,034	0,001	-0,600	0,360	0,982	0,964	0,368	0,135	0,115	0,013	-0,530	0,281	0,963	0,927	1,000	1,000	-0,410	0,168	0,961	0,924	SPP vor MOX
0,005	0,000	-0,210	0,044	0,098	0,010	-0,590	0,348	0,918	0,843	0,111	0,012	-0,150	0,023	-0,490	0,240	1,000	1,000	0,963	0,927	-0,400	0,160	0,868	0,753	LPP vor MOX
-0,158	0,025	0,801	0,642	0,551	0,304	0,719	0,517	-0,611	0,373	-0,330	0,109	-0,069	0,005	1,000	1,000	-0,485	0,235	-0,533	0,284	0,965	0,931	-0,402	0,162	Antho. HPLC
0,377	0,142	-0,370	0,137	-0,210	0,044	-0,030	0,001	0,228	0,052	0,952	0,906	1,000	1,000	-0,070	0,005	-0,150	0,023	0,115	0,013	0,040	0,002	0,349	0,122	Flavanole HPLC
0,418	0,175	-0,560	0,314	-0,290	0,084	-0,280	0,078	0,488	0,238	1,000	1,000	0,952	0,906	-0,330	0,109	0,111	0,012	0,368	0,135	-0,210	0,044	0,556	0,309	FAV vor MOX
0,194	0,038	-0,460	0,212	-0,080	0,006	-0,670	0,449	1,000	1,000	0,488	0,238	0,228	0,052	-0,610	0,372	0,918	0,843	0,982	0,964	-0,500	0,250	0,962	0,925	TAV vor MOX
-0,150	0,023	0,718	0,516	0,457	0,209	1,000	1,000	-0,670	0,449	-0,280	0,078	-0,030	0,001	0,719	0,517	-0,590	0,348	-0,600	0,360	0,743	0,552	-0,520	0,270	Farb- zunahme
0,183	0,033	0,845	0,714	1,000	1,000	0,457	0,209	-0,080	0,006	-0,290	0,084	-0,210	0,044	0,551	0,304	0,098	0,010	0,034	0,001	0,610	0,372	0,062	0,004	Zunahme SPP
-0,230	0,053	1,000	1,000	0,845	0,714	0,718	0,516	-0,460	0,212	-0,560	0,314	-0,370	0,137	0,801	0,642	-0,210	0,044	-0,320	0,102	0,827	0,684	-0,300	0,090	Zunahme LPP
1,000	1,000	-0,234	0,055	0,183	0,033	-0,146	0,021	0,194	0,038	0,418	0,175	0,377	0,142	-0,158	0,025	0,005	0,000	0,083	0,007	-0,227	0,052	0,172	0,030	Zunahme Tannine

Tabelle 10: Korrelationsmatrix nach Pearson für die Hauptkomponentenanalyse der analytischen Daten des Versuchsjahrganges 2014

Tabelle 11: Korrelationsmatrix nach Pearson für die Hauptkomponentenanalyse der analytischen Daten des Versuchsjahrganges 2015
4.5.3 Zwischenfazit zum fünften Teil

Die Analyse der Daten zeigte, dass nicht ein Faktor allein die Wirkung von Sauerstoff auf die Weinfarbe beeinflusst, sondern dass mehrere Parameter berücksichtigt werden müssen.

Das vor dem Sauerstoffzusatz gemessenen TAV, das von Fulcrand et al. (2004) und Picariello et al. (2017) zur Bestimmung des Sauerstoffbedarfs vorgeschlagen wurde, war in allen Jahrgängen negativ mit der Zunahme der Farbintensität korreliert. Somit wirkte sich ein niedriges TAV stets positiv auf die Wirkung des Sauerstoffs aus. Lag das TAV hingegen oberhalb eines Wertes von 3, führte ein Sauerstoffzusatz abnehmenden oder gleichbleibenden Farbintensitäten. Das von Durner (2011) verwendete FAV wies zwar im Jahrgang 2013 ebenfalls eine gute Korrelation mit der Farbzunahme auf, in den Jahrgängen 2014 und 2015 war die Korrelation jedoch nur schwach. Damit scheint das TAV besser geeignet als das FAV, um vor der Mikrooxygenierung das Potential eines Sauerstoffzusatzes zur Farbintensivierung einzuschätzen. In den Jahrgängen 2013 und 2014 war eine hohe Anthocyankonzentration außerdem positiv mit der Zunahme der Farbintensität korreliert. Neben einem ausgewogenen Verhältnis von Tanninen zu Anthocyanen sollten somit auch ausreichende Konzentrationen dieser Stoffe im Wein vorliegen.

Obwohl man allgemein davon ausgeht, dass die Bildung Polymerer Pigmente zur Farbvertiefung führt (Somers 1971, Sims und Morris 1985, Harbertson und Spayd 2006), bestand meist nur eine mäßige Korrelation zwischen der Zunahme der Farbintensität und der Zunahme von SPP und LPP. Dies deutet darauf hin, dass nur ein Teil der Polymerisationsreaktionen zu unter Wein-bedingungen farbintensiven Pigmenten führt. Andere Polymere Pigmente sind hingegen offenbar stabiler gegenüber einer Bleichung durch SO₂ (und werden aus diesem Grund überhaupt erst als SPP oder LPP erfasst), weisen jedoch offenbar nicht zwangsläufig auch eine intensivere Farbe auf.

Eine gute negative Korrelation bestand stattdessen zwischen den vor der Mikrooxygenierung gemessenen Gehalten von SPP und LPP und der Farbzunahme. Lag die Summe der SPP und LPP vor dem Sauerstoffzusatz über 1,4, führte dieser zu einer Abnahme oder einer gleichbleibenden Farbintensität. Offenbar war in diesen Fällen die Pigmentpolymerisation schon so weit fortgeschritten, dass ein Sauerstoffzusatz hier keinen (positiven) Einfluss auf die Farbintensität hatte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Sauerstoff führt zu einer Polymerisation der Rotweinpolyphenole, indem Anthocyane und Flavanole über Ethyliden-Brücken untereinander verknüpft werden. Die zunächst gebildeten Dimere reagieren, meist über weitere Ethylidenbrücken, zu Tri- und Tetrameren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden solche ethyliden-verbrückten trimeren und tetrameren Verbindungen, die bisher nur aus Modelllösungen bekannt waren (Weber und Winterhalter 2014), erstmals im Wein nachgewiesen. Es gelang zudem der massenspektrometrische Nachweis eines gänzlich neuen ethyliden-verbrückten tetrameren Pigments, das aus zwei Einheiten Malvidin-3-glucosid und zwei Flavanol-Molekülen aufgebaut war. Anhand der Fragmentspektren ließ sich eindeutig belegen, dass sich die beiden Flavanole in den terminalen Positionen befinden, die Anthocyane hingegen in der Mitte des Moleküls. Dies zeigt, dass Anthocyane in Rotwein nicht nur in Position C8, sondern auch in Position C6 Ethylidenbrücken ausbilden können. Anders als etwa von Es-Safi et al. (1999b) angenommen, bilden Anthocyane daher nicht unbedingt das Ende einer Kette von Polyphenolen.

Einige der im Wein nachgewiesenen Pigmente waren aus bis zu drei Flavanolen-Einheiten und nur einem Anthocyan aufgebaut. Umgekehrt konnten im gleichen Wein auch ein Trimere mit nur einer Flavanol-Einheit und zwei Anthocyanen detektiert werden. Dies deutet auf eine große Variabilität bei der Bildung solcher Oligomere hin. Überdies traten auch Addukte auf, die zugleich Ethylidenbrücken, und direkte Interflavan-Bindungen des B-Typs aufwiesen, was die Vielfalt der möglichen Reaktionsprodukte weiter erhöht.

Es zeigte sich, dass die in der Literatur übliche Quantifizierung ethyliden-verbrückter Anthocyan-Flavanol Dimere mittels DAD in Malvidin-3-glucosid Äquivalenten (zum Beispiel bei Wirth et al. (2010), Kontoudakis et al. (2011) oder Gambuti et al. (2015)) zu einer Unterbestimmung führt. Mit der hier entwickelten massenspektrometrischen Methode, wurden unter Verwendung eines internen Standards deutlich größere Konzentrationen ethyliden-verbrückter Pigmente im Wein gefunden, als in den genannten Literaturstellen. Aufgrund der Verwendung von Referenzsubstanzen und der Validierung des Verfahrens erscheinen diese höheren Konzentrationen realistischer, als die bisher publizierten Werte.

Die Sauerstoff-induzierte Bildung von ethyliden-verbrückten Dimere und Trimere, sowie von Vitisin B, führt zur Abnahme der Ausgangsstoffe Malvidin-3-glucosid und (Epi)Catechin (Cano-López et al. 2006, Durner et al. 2010b). Durch die Quantifizierung ethyliden-verbrückter Pigmente mit dem Massenspektrometer wurde gezeigt, dass bis zu 50 % der durch einen Sauerstoffeintrag bewirkten Abnahme von Malvidin-3-glucosid und (Epi)Catechin durch die Bildung solcher Produkte erklärt werden und damit ebenfalls wesentlich mehr, als bei Wirth et al. (2010) oder Gambuti et al. (2015) beschrieben. Durch den Vergleich mit der ohne Sauerstoffzusatz ausgebauten Kontrollvariante zeigte sich, dass ethyliden-verbrückte Pigmente die Farbintensität von Rotwein wesentlich effektiver steigern, als die ohne Sauerstoff gebildeten Reaktionsprodukte.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Malvidin-ethyliden-(Epi)Catechin Dimere nicht stabil sind (Escribano-Bailón et al. 2001). Als ein mögliches Folgeprodukt wurde in dieser Arbeit die trimere Verbindung (Epi)Catechin-ethyliden-Malvidin-ethyliden-(Epi)Catechin im Wein nachgewiesen und quantifiziert. Dies zeigt, dass die Polymerisation von Polyphenolen in Rotwein, über die wiederholte Ausbildung von Ethylidenbrücken im Wein stattfindet.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich der Zusatz von Sauerstoff während der Weinbereitung auf die Lagerfähigkeit von Rotwein auswirkt. In der Literatur ist beschrieben, dass die Farbintensität von Rotweinen während der Lagerung allgemein abnimmt und der Farbton zugleich rot-braune Nuancen annimmt (Somers 1971, Sims und Morris 1985, Gómez-Plaza et al. 1999). Dies wurde auch in den hier untersuchten Weinen beobachtet. Allerdings wirkte der Zusatz von Sauerstoff diesem Effekt entgegen. Abweichend von Kontoudakis et al. (2011) und González-del Pozo et al. (2010) bei Cabernet Sauvignon beobachtet, blieb die durch den Sauerstoff im Vergleich zur Kontrolle erzielte Zunahme der Farbintensität während der Lagerung erhalten oder wurde vergrößert.

Der Sauerstoffzusatz wirkte sich in dieser Arbeit kaum auf das Aroma- und Geschmacksprofil der Weine aus. Es waren dabei auch keine negativen Veränderungen, wie oxidative Geruchsnoten oder ein wässrig-dünn wirkender Körper, festzustellen. Die erforderliche Menge Gesamt-SO₂ zum Erreichen der mikrobiologischen Stabilität wurde

in den Weinen durch Sauerstoffbehandlung nicht erhöht, Während der Lagerung wurde außerdem keine beschleunigte Abnahme der freien SO₂ gemessen. Es lässt sich somit zusammenfassen, dass eine durch den Sauerstoffzusatz erzielte Intensivierung der Weinfarbe nachhaltig war und dass zugleich keine negativen Effekte, wie etwa eine verringerte Lagerfähigkeit auftragen.

Der Zusammenhang zwischen dem Tannin-Anthocyanen Verhältnis (TAV), SPP, LPP und dem Verhalten der Weinfarbe während der Mikrooxygenierung wurde anhand 21 verschiedener Weine der Rebsorten Spätburgunder, Trollinger und Lemberger untersucht. Die Daten zeigten, dass ein Zusatz von 10 mg O₂/L/Monat immer dann zu einer intensiveren Weinfarbe führte, wenn das TAV einen Wert von 3 nicht überschritt. Das TAV war dabei als Indikator wesentlich besser geeignet als das Flavanol-Anthocyan Verhältnis (FAV). Eine höhere Farbintensität wurde insbesondere dann erzielt, wenn vor der Mikrooxygenierung ein geringer Polymerisationsgrad der Pigmente, messbar als SPP und LPP, vorlag. Überstieg der Messwert für LPP vor oder während der Mikrooxygenierung den Messwert für SPP, war die Wirkung des Sauerstoffs auf die Weinfarbe gering. Eine überproportionale Bildung der LPP ist auch aufgrund ihrer geringen Löslichkeit und der Gefahr des Ausfallens zu vermeiden (Harbertson et al. 2003). Eine ausreichende Konzentration monomerer Anthocyane und Flavanole zur Bildung Polymerer Pigmente war für eine Farbintensivierung stets erforderlich. Auf Basis dieser Parameter, die sich spektralphotometrisch mittels Harbertson-Adams Assay bestimmen lassen, ist es somit möglich zu beurteilen, ob der Zusatz von Sauerstoff die Farbintensität eines Weines steigern kann. Diese Parameter könnten somit geeignet sein, während der Mikrooxygenierung anzuzeigen, ab welchem Zeitpunkt weiterer Sauerstoff der Farbintensität und -stabilität nicht mehr zuträglich ist und die Zugabe beendet werden sollte.

5.2 <u>Ausblick</u>

Die in dieser Arbeit qualitativ nachgewiesenen Moleküle stellen nur einen kleinen Ausschnitt aus dem Spektrum der Polymeren Pigmente dar. Viele Strukturelemente, wie Pyranringe oder Portisin-verwandte Teilstrukturen wurden hier nicht untersucht. Es bleibt daher zu erforschen, in welchem Umfang solche Elemente in größeren Pigmenten enthalten sind. Da hier nur 50 % der Anthocyane und Flavanole zu ethyliden-verbrückten Dimeren, Trimeren und zu Vitisin B reagierten, muss es einen erheblichen Anteil anderer Reaktionsprodukte geben. Dies zeigte sich insbesondere beim maischeerhitzten Trollinger des Jahrgangs 2013, dessen Farbintensität durch den Zusatz von Sauerstoff deutlich stärker zunahm, als der Spätburgunder, bei dem die Konzentrationen der ethylidenverbrückten Pigmente und von Vitisin B zugleich jedoch nur etwa halb so groß waren. Bei den Kontroll-Varianten wurde beobachtet, dass die Farbintensität eines Weines auch ohne den Zusatz von Sauerstoff zunehmen kann, wenngleich in einem geringeren Umfang. Die Strukturen der dabei entstehenden Verbindungen sollten ebenfalls weiter erforscht werden, da sie nach bisherigem Kenntnisstand teilweise farblos oder besonders instabil sein können.

6 Literatur

Agilent (2008). Agilent 6500 Series Q-TOF LC/MS System Maintainance Guide. Santa Clara, CA, USA, Agilent Technologies, Inc.

Agilent (2011). Agilent 6500 Series Q-TOF LC/MS System Concepts Guide. Santa Clara, CA, USA, Agilent Technologies Inc.

Agilent (2012). Agilent 6530B Accurate Mass Q-TOF LC/MS System Data Sheet. Santa Clara, CA, USA, Agilent Technologies Inc.

Alcalde-Eon, C., M. T. Escribano-Bailón, C. Santos-Buelga und J. C. Rivas-Gonzalo (2006). "Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing" *Analytica Chimica Acta*, 563 (1-2): 238-254.

Alcalde-Eon, C., M. T. Escribano-Bailon, C. Santos-Buelga und J. C. Rivas-Gonzalo (2007). "Identification of dimeric anthocyanins and new oligomeric pigments in red wine by means of HPLC-DAD-ESI/MSn" *Journal of Mass Spectrometry*, 42 (6): 735-748.

Andersen, O. M. und K. R. Markham (2006). *Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, Florida (USA), CRC Taylor & Francis Group.

Anli, R. E. und Ö. A. Cavuldak (2012). "A review of microoxygenation application in wine" *Journal of the Institute of Brewing*, 118 (4): 368-385.

Arapitsas, P., D. Perenzoni, G. Nicolini und F. Mattivi (2012). "Study of Sangiovese Wines Pigment Profile by UHPLC-MS/MS" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 10461-10471.

Arnold, R. A., A. C. Noble und V. L. Singleton (1980). "Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28 (3): 675-678.

Asenstorfer, R. E., Y. Hayasaka und G. P. Jones (2001). "Isolation and Structures of Oligomeric Wine Pigments by Bisulfite-Mediated Ion-Exchange Chromatography" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5957-5963.

Asenstorfer, R. E., D. F. Lee und G. P. Jones (2006). "Influence of structure on the ionisation constants of anthocyanin and anthocyanin-like wine pigments" *Analytica Chimica Acta*, 563: 10-14.

Atanasova, V., H. Fulcrand, V. Cheynier und M. Moutounet (2002a). "Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of winemaking" *Analytica Chimica Acta*, 458 (1): 15-27.

Atanasova, V., H. Fulcrand, C. Le Guernevé, V. Cheynier und M. Moutounet (2002b). "Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product" *Tetrahedron Letters*, 43: 6151-6153.

Aznar, M., R. Lopez, J. Cacho und V. Ferreira (2003). "Prediction of Aged Red Wine Aroma Properties from Aroma Chemical Composition. Partial Least Squares Regression Models" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (9): 2700-2707.

Bakker, J., P. Bridle, T. Honda, H. Kuwano, N. Saito, N. Terahara und C. F. Timberlake (1997). "Identification of an Anthocyanin Occurring in Some Red Wines" *Phytochemistry*, 44 (7): 1375-1382.

Bakker, J. und C. F. Timberlake (1997). "Isolation, Identification, and Characterisation of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 35-43.

Baldi, A., A. Romani, N. Mulinacci, F. F. Vincieri und B. Casetta (1995). "HPLC/MS Application to Anthocyanins of Vitis vinifera L" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (8): 2104-2109.

Barril, C., A. C. Clark und G. R. Scollary (2012). "Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine" *Analytica Chimica Acta*, 732: 186-193.

Bate-Smith, E. C. (1954). "Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues" *Biochemical Journal*, 58 (1): 122-125.

Bekker, M. Z., M. P. Day, H. Holt, E. Wilkes und P. A. Smith (2016). "Effect of oxygen exposure during fermentation on volatile sulfur compounds in Shiraz wine and a comparison of strategies for remediation of reductive character" *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22 (1): 24-35.

Bishop, P. D. und C. W. Nagel (1984). "Characterization of the condensation product of malvidin 3,5-diglucoside and catechin" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32 (5): 1022-1026.

Blaauw, D. A., *Micro-oxygenation in contemporary winemaking*, Cape Wine Academy, Stellenbosch, South Africa, *Thesis*, 2009.

Blanchard, L., P. Darriet und D. Dubourdieu (2004). "Reactivity of 3-Mercaptohexanol in Red Wine: Impact of Oxygen, Phenolic Fractions, and Sulfur Dioxide" *American Journal of Enology and Viticulture*, 55 (2): 115-120.

Breslin, P. A. S., M. M. Gilmore, G. K. Beauchamp und B. G. Green (1993). "Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation" *Chemical Senses*, 18 (4): 405-417.

Brooks, L., L. McCloskey, D. McKesson und M. Sylvan (2008). "Adams-Harbertson protein precipitation-based wine tannin method found invalid" *Journal of AOAC International*, 91 (5): 1090-1094.

Brossaud, F., V. Cheynier und A. C. Noble (2001). "Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols" *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7 (1): 33-39.

Brouillard, R. und B. Delaporte (1977). "Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside" *Journal of the American Chemical Society*, 99 (26): 8461-8468.

Caillé, S., A. Samson, J. Wirth, J.-B. Diéval, S. Vidal und V. Cheynier (2010). "Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre and post bottling" *Analytica Chimica Acta*, 660 (1–2): 35-42.

Cameira dos Santos, P.-J., J.-M. Brillouet, V. Cheynier und M. Moutounet (1996). "Detection and Partial Characterisation of New Anthocyanin-Derived Pigments in Wine" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70: 204-208.

Cano-Lopez, M., F. Pardo-Minguez, J. M. Lopez-Roca und E. Gomez-Plaza (2007). "Chromatic characteristics and anthocyanin profile of a micro-oxygenated red wine after oak or bottle maturation" *European Food Research and Technology*, 225: 127-132.

Cano-López, M., F. Pardo-Minguez, J. M. López-Roca und E. Gómez-Plaza (2006). "Effect of Microoxygenation on Anthocyanin and Derived Pigment Content and Chromatic Characteristics of Red Wines" *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3): 325-331.

Cano-López, M., F. Pardo-Mínguez, G. Schmauch, C. Saucier, P.-L. Teissedre, J. M. López-Roca und E. Gómez-Plaza (2008). "Effect of Micro-oxygenation on Color and Anthocyanin-Related Compounds of Wines with Different Phenolic Contents" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (14): 5932-5941.

Carrascon, V., P. Fernandez-Zurbano, M. Bueno und V. Ferreira (2015). "Oxygen Consumption by Red Wines. Part II: Differential Effects on Color and Chemical Composition Caused by Oxygen Taken in Different Sulfur Dioxide-Related Oxidation Contexts" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (51): 10938-10947.

Cejudo-Bastante, M. J., I. Hermosin-Gutierrez und M. S. Perez-Coello (2011a). "Microoxygenation and oak chip treatments of red wines: Effects on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Part II: Merlot wines" *Food Chemistry*, 124: 738-748.

Cejudo-Bastante, M. J., M. S. Pérez-Coello und I. Hermosín-Gutiérrez (2011b). "Effect of wine micro-oxygenation treatment and storage period on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics" *LWT - Food Science and Technology*, 44 (4): 866-874.

Chatonnet, P., D. Dubourdie, J.-n. Boidron und M. Pons (1992). "The origin of ethylphenols in wines" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60 (2): 165-178.

Cheminat, A. und R. Brouillard (1986). "PMR investigation of 3-O-(β -d-glucosyl)malvidin structural transformations in aqueous solutions" *Tetrahedron Letters*, 27 (37): 4457-4460.

Cheynier, V., J.-M. Souquet, A. Kontek und M. Moutounet (1994). "Anthocyanin degradation in oxidising grape musts" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66 (3): 283-288.

Cheynier, V., M. Dueñas-Paton, E. Salas, C. Maury, J.-M. Souquet, P. Sarni-Manchado und H. Fulcrand (2006). "Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins" *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3): 298-305.

Chira, K., G. Schmauch, C. Saucier, S. Fabre und P. L. Teissedre (2009). "Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007)" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2): 545-553.

Clark, A. C. und G. R. Scollary (2003). "Influence of light exposure, ethanol and copper(II) on the formation of a precursor for xanthylium cations from tartaric acid" *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9 (1): 64-71.

Cliff, M. A., M. C. King und J. Schlosser (2007). "Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines" *Food Research International*, 40 (1): 92-100.

Coetzee, C., K. Lisjak, L. Nicolau, P. Kilmartin und W. J. du Toit (2013). "Oxygen and sulfur dioxide additions to Sauvignon blanc must: effect on must and wine composition" *Flavour and Fragrance Journal*, 28 (3): 155-167.

Cruz, L., N. Mateus und V. de Freitas (2012). "Identification by mass spectrometry of new compounds arising from the reactions involving malvidin-3-glucoside-(O)-catechin, catechin and malvidin-3-glucoside" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26 (18): 2123-2130.

Danilewicz, J. C. (2003). "Review of Reaction Mechanisms of Oxygen and Proposed Intermediate Reduction Products in Wine: Central Role of Iron and Copper" *American Journal of Enology and Viticulture*, 54 (2): 73-85.

Danilewicz, J. C. (2007). "Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine-Model System: Central Role of Iron and Copper" *American Journal of Enology and Viticulture*, 58 (1): 53-60.

Danilewicz, J. C. und P. J. Wallbridge (2010). "Further Studies on the Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfite in Wine" *American Journal of Enology and Viticulture*, 61 (2): 166-175.

Danilewicz, J. C. (2012). "Review of Oxidative Processes in Wine and Value of Reduction Potentials in Enology" *American Journal of Enology and Viticulture*, 63 (1): 1-10.

Day, M. P., S. A. Schmidt, P. A. Smith und E. N. Wilkes (2015). "Use and impact of oxygen during winemaking" *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21: 693-704.

de Beer, D., E. Joubert, J. Marais und M. Manley (2008). "Effect of Oxygenation During Maturation on Phenolic Composition, Total Antioxidant Capacity, Colour and Sensory Quality of Pinotage Wine" *South African Journal for Enology and Viticulture*, 29 (1): 13-25.

del Alamo-Sanza, M. und I. Nevares (2014). "Recent Advances in the Evaluation of the Oxygen Transfer Rate in Oak Barrels" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (35): 8892-8899.

del Alamo-Sanza, M., V. F. Laurie und I. Nevares (2015). "Wine evolution and spatial distribution of oxygen during storage in high-density polyethylene tanks" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (6): 1313-1320.

del Carmen Llaudy, M., R. Canals, S. González-Manzano, J. M. Canals, C. Santos-Buelga und F. Zamora (2006). "Influence of Micro-Oxygenation Treatment before Oak Aging on Phenolic Compounds Composition, Astringency, and Color of Red Wine" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (12): 4246-4252.

Dipalmo, T., P. Crupi, S. Pati, M. L. Clodoveo und A. Di Luccia (2016). "Studying the evolution of anthocyanin-derived pigments in a typical red wine of Southern Italy to assess its resistance to aging" *LWT - Food Science and Technology*, 71: 1-9.

Drinkine, J., Y. Glories und C. Saucier (2005). "(+)-Catechin-Aldehyde Condensations: Competition between Acetaldehyde and Glyoxylic Acid" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (19): 7552-7558.

Drinkine, J., P. Lopes, J. A. Kennedy, P.-L. Teissedre und C. Saucier (2007a). "Ethylidene-Bridged Flavan-3-ols in Red Wine and Correlation with Wine Age" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (15): 6292-6299.

Drinkine, J., P. Lopes, J. A. Kennedy, P. L. Teissedre und C. Saucier (2007b). "Analysis of Ethylidene-Bridged Flavan-3-ols in Wine" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1109-1116.

Du Toit, W. und I. Pretorius (2002). "The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking" *Annals of Microbiology*, 52 (2): 155-179.

Du Toit, W., K. Lisjak, J. Marais und M. Du Toit (2006a). "The effect of microoxygenation on the phenolic composition, quality and aerobic wine-spoilage microorganisms of different South African red wines" *South African Journal for Enology and Viticulture*, 27 (1): 57.

Du Toit, W., J. Marais, I. Pretorius und M. Du Toit (2006b). "Oxygen in must and wine: A review" *South African Journal for Enology and Viticulture*, 27 (1): 76-94.

Du Toit, W. J., I. S. Pretorius und A. Lonvaud-Funel (2005). "The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of Acetobacter pasteurianus and a strain of Brettanomyces bruxellensis isolated from wine" *Journal of Applied Microbiology*, 98 (4): 862-871.

Dubernet, M., P. Ribereau-Gayon, H. R. Lerner, E. Harel und A. M. Mayer (1977). "Purification and properties of laccase from Botrytis cinerea" *Phytochemistry*, 16 (2): 191-193.

Dueñas, M., H. Fulcrand und V. Cheynier (2006a). "Formation of anthocyanin-flavanol adducts in model solutions" *Analytica Chimica Acta*, 563 (1-2): 15-25.

Dueñas, M., E. Salas, V. Cheynier, O. Dangles und H. Fulcrand (2006b). "UV-Visible Spectroscopic Investigation of the 8,8-Methylmethine Catechin-malvidin 3-Glucoside Pigments in Aqueous Solution: Structural Transformations and Molecular Complexation with Chlorogenic Acid" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 189-196.

Durner, D., S. Ganss und U. Fischer (2010a). "Monitoring Oxygen Uptake and Consumption during Microoxygenation Treatments before and after Malolactic Fermentation" *American Journal of Enology and Viticulture*, 61 (4): 465-473.

Durner, D., F. Weber, J. Neddermeyer, K. Koopmann, P. Winterhalter und U. Fischer (2010b). "Sensory and Color Changes Induced by Microoxygenation Treatments of Pinot noir before and after Malolactic Fermentation" *American Journal of Enology and Viticulture*, 61 (4): 474-485.

Durner, D., *Mikrooxygenierung von Rotweinen*, Fakultät für Lebenswissenschaften, TU Braunschweig, *Dissertation*, 2011.

Dykes, S., The Effect of Dosage Rate on The Chemical and Sensory Changes Occurring During Micro-oxygenation of New Zealand Red Wine, The university of Auckland, Dissertation, 2008.

Eder, R., S. Wendelin und J. Barna (1994). "Klassifizierung von Rotweinsorten mittels Anthocyananalyse: 1. Mitteilung: Anwendung multivariater statistischer Methoden zur Differenzierung von Traubenproben" *Mitteilungen Klosterneuburg*, 44: 201-212.

Es-Safi, N.-E., H. Fulcrand, V. Cheynier, M. Moutounet, M. Hmamouchi und E. M. Essassi (1996). "Kinetic Studies of Acetaldehyde-induced Condensation of Flavan-3-ols and Malvidin-3-Glucoside in Solution Systems" *Polyphenols Communications*: 279-280.

Es-Safi, N.-E., H. Fulcrand, V. Cheynier und M. Moutounet (1999a). "Competition between (+)-Catechin and (–)-Epicatechin in Acetaldehyde-Induced Polymerization of Flavanols" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (5): 2088-2095.

Es-Safi, N.-E., H. Fulcrand, V. Cheynier und M. Moutounet (1999b). "Studies on the Acetaldehyde-Induced Condensation of (-)-Epicatechin and Malvidin-3-O-Glucoside in a Model Solution System" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (5): 2096-2102.

Es-Safi, N.-E., C. L. Guernevé, B. Labarbe, H. Fulcrand, V. Cheynier und M. Moutounet (1999c). "Structure of a new xanthylium salt derivative" *Tetrahedron Letters*, 40 (32): 5869-5872.

Es-Safi, N.-E., C. Le Guernevé, H. Fulcrand, V. Cheynier und M. Moutounet (1999d). "New Polyphenolic Compounds with Xanthylium Skeletons Formed through Reaction between (+)-Catechin and Glyoxylic Acid" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (12): 5211-5217.

Es-Safi, N.-E., V. Cheynier und M. Moutounet (2002). "Role of Aldehydic Derivatives in the Condensation of Phenolic Compounds with Emphasis on the Sensorial Properties of Fruit-Derived Foods" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (20): 5571-5585.

Escribano-Bailón, M. T., M. Álvarez-Garcia, J. C. Rivas-Gonzalo, F. J. Heredia und C. Santos-Buelga (2001). "Color and Stability of Pigments Derived from the Acetaldehyde-Mediated Condensation between Malvidin-3-O-Glucoside and (+)-Catechin" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (3): 1213-1217.

Escudero, A., J. Cacho und V. Ferreira (2000a). "Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography–olfactometric study" *European Food Research and Technology*, 211 (2): 105-110.

Escudero, A., P. Hernández-Orte, J. Cacho und V. Ferreira (2000b). "Clues about the Role of Methional As Character Impact Odorant of Some Oxidized Wines" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (9): 4268-4272.

EU (2009). "Verordnung (EG) Nr. 606/2009 der Kommission vom 10. Juli 2009 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 479/2008 des Rates hinsichtlich der Weinbauerzeugniskategorien, der önologischen Verfahren und der diesbezüglichen Einschränkungen." *Amtblatt der Europäischen Union*, L193: 1-59.

Favretto, D. und R. Flamini (2000). "Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry to the Study of Grape Anthocyanins" *American Journal of Enology and Viticulture*, 51 (1): 55-64.

Fedrizzi, B., G. Zapparoli, F. Finato, E. Tosi, A. Turri, M. Azzolini und G. Versini (2011). "Model Aging and Oxidation Effects on Varietal, Fermentative, and Sulfur Compounds in a Dry Botrytized Red Wine" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (5): 1804-1813.

Fell, A. J., S. I. Dykes, L. Nicolau und P. A. Kilmartin (2007). "Electrochemical Microoxidation of Red Wine" *American Journal of Enology and Viticulture*, 58 (4): 443-450.

Fenton, H. J. H. (1894). "LXXIII. Oxidation of tartaric acid in presence of iron" *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65: 899-910.

Ferreira, V., A. Escudero, P. Fernández und J. F. Cacho (1997). "Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process" *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 205 (5): 392-396.

Ferrer-Gallego, R., J. M. Hernández-Hierro, J. C. Rivas-Gonzalo und M. T. Escribano-Bailón (2014). "Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: synergistic effect and modulation by aromas" *Food Research International*, 62: 1100-1107.

Fischer, U. und A. C. Noble (1994). "The Effect of Ethanol, Catechin Concentration, and pH on Sourness and Bitterness of Wine" *American Journal of Enology and Viticulture*, 45 (1): 6-10.

Folin, O. und V. Ciocalteu (1927). "On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins" *The Journal of Biological Chemistry*, 73 (2): 627-650.

Fossen, T., L. Cabrita und O. M. Andersen (1998). "Color and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region" *Food Chemistry*, 63 (4): 435-440.

Francia-Aricha, E. M., M. T. Guerra, J. C. Rivas-Gonzalo und C. Santos-Buelga (1997). "New Anthocyanin Pigments Formed after Condensation with Flavanols" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (6): 2262-2266.

Friedrich, W., A. Eberhardt und R. Galensa (2000). "Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry" *European Food Research and Technology*, 211 (1): 56-64.

Fulcrand, H., P.-J. Cameira dos Santos, P. Sarni-Manchado, V. Cheynier und J. Favre-Bonvin (1996a). "Structure of new anthocyanin-derived wine pigments" *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 7: 735-739.

Fulcrand, H., T. Doco, N.-E. Es-Safi, V. Cheynier und M. Moutounet (1996b). "Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry" *Journal of Chromatography, A*, 752: 85-91.

Fulcrand, H., V. Cheynier, J. Oszmianski und M. Moutounet (1997). "An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-OL condensation" *Phytochemistry*, 46 (2): 223-227.

Fulcrand, H., C. Benabdeljalil, J. Rigaud, V. Cheynier und M. Moutounet (1998). "A New Class of Wine Pigments Generated by Reaction between Pyruvic Acid and Grape Anthocyanins" *Phytochemistry*, 47 (7): 1401-1407.

Fulcrand, H., V. Atanasova, E. Salas und V. Cheynier (2004). *Red Wine Color*, American Chemical Society, 886: 68-88.

Furtado, P., P. Figueiredo, H. Chaves das Neves und F. Pina (1993). "Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins" *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 75 (2): 113-118.

Gambuti, A., G. Han, A. L. Peterson und A. L. Waterhouse (2015). "Sulfur Dioxide and Glutathione Alter the Outcome of Microoxygenation" *American Journal of Enology and Viticulture*, 66 (4): 411-423.

Gawel, R., A. Oberholster und I. L. Francis (2000). "A 'Mouth-feel Wheel': terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine" *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6 (3): 203-207.

Gawel, R., A. Schulkin, P. A. Smith und E. J. Waters (2014). "Taste and textural characters of mixtures of caftaric acid and Grape Reaction Product in model wine" *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20 (1): 25-30.

Giusti, M. M., L. E. Rodríguez-Saona und R. E. Wrolstad (1999). "Molar Absorptivity and Color Characteristics of Acylated and Non-Acylated Pelargonidin-Based Anthocyanins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (11): 4631-4637.

Gómez-Plaza, E., R. Gil-Muñoz, J. M. López-Roca und A. Martínez (1999). "Color and phenolic compounds of a young red wine as discriminanting variables of its ageing status" *Food Research International*, 32 (7): 503-507.

Gómez-Plaza, E., R. Gil-Muñoz, J. M. López-Roca und A. Martínez (2000). "Color and Phenolic Compounds of a Young Red Wine. Influence of Wine-Making Techniques, Storage Temperature, and Length of Storage Time" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (3): 736-741.

Gómez-Plaza, E. und M. Cano-López (2011). "A review on micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying chemistry" *Food Chemistry*, 125 (4): 1131-1140.

González-del Pozo, A., Í. Arozarena, M.-J. Noriega, M. Navarro und A. Casp (2010). "Short- and long-term effects of micro-oxygenation treatments on the colour and phenolic composition of a Cabernet Sauvignon wine aged in barrels and/or bottles" *European Food Research and Technology*, 231 (4): 589-601.

Gonzalez-Neves, G., G. Gil, L. Barreiro und G. Favre (2010). "Pigment profile of red wines cv. Tannat made with alternative winemaking techniques" *Journal of Food Composition and Analysis*, 23 (5): 447-454.

González-Paramás, A. M., F. Lopes da Silva, P. Martín-López, G. Macz-Pop, S. González-Manzano, C. Alcalde-Eon, J. J. Pérez-Alonso, M. T. Escribano-Bailón, J. C. Rivas-Gonzalo und C. Santos-Buelga (2006). "Flavanol–anthocyanin condensed pigments in plant extracts" *Food Chemistry*, 94 (3): 428-436.

González-Sanjosé, M. L., M. Ortega-Heras und S. Pérez-Magariño (2008). "Microoxygenation Treatment and Sensory Properties of Young Red Wines" *Food Science and Technology International*, 14 (5 suppl): 123-130.

Gore, P. H. und P. J. Newman (1964). "Quantitative Aspects of the Colour Reaction between Iron(III) and Phenols" *Analytica Chimica Acta*, 31: 111-120.

Grimbach, S., Sensorische und Analytische Untersuchungen zur Lagerstabilität eines Spätburgunders in Abhängigkeit von verschiedenen Oenologischen Maßnahmen, Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern, Diplomarbeit, 2015.

Guglielmi, F. und C. Simoncelli (2002). *Process for controlled evolution of wines and relevant realisation device*, US Patent 2004/0137109 A1.

Hagermann, A. E. und L. G. Butler (1978). "Protein Precipitation for the Quantitative Determination of Tannins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 809-812.

Hamatschek, J. (2015). Technologie des Weines. Stuttgart (Hohenheim), Ulmer Verlag.

Harbertson, J. F., J. A. Kennedy und D. O. Adams (2002). "Tannins in Skins and Seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir Berries during Ripening" *American Journal of Enology and Viticulture*, 53: 54-59.

Harbertson, J. F., E. A. Picciotto und D. O. Adams (2003). "Measurement of Polymeric Pigments in Grape Berry Extracts and Wines Using a Protein Precipitation Assay Combined with Bisulfite Bleaching" *American Journal of Enology and Viticulture*, 54 (4): 301-306.

Harbertson, J. F., D. DeBeer, A. L. Waterhouse und D. O. Adams (2004). "Use of Ferric Chloride for the Measurement of Total Phenolics in Red and White Wines" *American Journal of Enology and Viticulture*, 55 (3): 295A.

Harbertson, J. F. und S. Spayd (2006). "Measuring Phenolics in the Winery" *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3): 280-288.

Harbertson, J. F., G. P. Parpinello, H. Heymann und M. O. Downey (2012). "Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character" *Food Chemistry*, 131 (3): 999-1008.

Harbertson, J. F., R. L. Kilmister, M. A. Kelm und M. O. Downey (2014). "Impact of condensed tannin size as individual and mixed polymers on bovine serum albumin precipitation" *Food Chemistry*, 160: 16-21.

Haslam, E. (1977). "Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry" *Phytochemistry*, 16 (11): 1625-1640.

Hayasaka, Y. und J. A. Kennedy (2003). "Mass spectrometric evidence for the formation of pigmented polymers in red wine" *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9 (3): 210-220.

He, J., C. Santos-Buelga, A. M. S. Silva, N. Mateus und V. de Freitas (2006). "Isolation and Structural Characterization of New Anthocyanin-Derived Yellow Pigments in Aged Red Wines" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (25): 9598-9603.

He, J., A. R. F. Carvalho, N. Mateus und V. De Freitas (2010). "Spectral Features and Stability of Oligomeric Pyranoanthocyanin-flavanol Pigments Isolated from Red Wines" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (16): 9249-9258.

Heier, A., W. Blaas, A. Droß und R. Wittkowski (2002). "Anthocyanin Analysis by HPLC/ESI-MS" *American Journal of Enology and Viticulture*, 53 (1): 78-85.

Heredia, F. J., E. M. Francia-Aricha, J. C. Rivas-Gonzalo, I. M. Vicario und C. Santos-Buelga (1998). "Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes—I. pH effect" *Food Chemistry*, 63 (4): 491-498.

Hernández-Orte, P., A. C. Lapeña, A. Escudero, J. Astrain, C. Baron, I. Pardo, L. Polo, S. Ferrer, J. Cacho und V. Ferreira (2009). "Effect of micro-oxygenation on the evolution of aromatic compounds in wines: Malolactic fermentation and ageing in wood" *LWT - Food Science and Technology*, 42 (1): 391-401.

Hesse, M., H. Meier und B. Zeeh (2005). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.

Hrazdina, G. und A. J. Franzese (1974). "Oxidation products of acylated anthocyanins under acidic and neutral conditions" *Phytochemistry*, 13 (1): 231-234.

Hufnagel, J. C. und T. Hofmann (2008). "Orosensory-Directed Identification of Astringent Mouthfeel and Bitter-Tasting Compounds in Red Wine" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 1376-1386.

Iacobucci, G. A. und J. G. Sweeny (1983). "The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylium salts" *Tetrahedron*, 39 (19): 3005-3038.

Jurd, L. (1964). "Reactions Involved in Sulfite Bleaching of Anthocyanins" *Journal of Food Science*, 29: 16-19.

Jurd, L. und T. C. Somers (1970). "The Formation of Xanthylium Salts from Proanthocyanidins" *Phytochemistry*, 9: 419-427.

Kennedy, J. A., J. Ferrier, J. F. Harbertson und C. P. des Gachons (2006). "Analysis of Tannins in Red Wine Using Multiple Methods: Correlation with Perceived Astringency" *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (4): 481-485.

King, M. C., M. A. Cliff und J. Hall (2003). "Effectiveness of the 'Mouth-feel Wheel' for the evaluation of astringent subqualities in British Columbia red wines" *Journal of Wine Research*, 14 (2-3): 67-78.

Kontoudakis, N., E. González, M. Gil, M. Esteruelas, F. Fort, J. M. Canals und F. Zamora (2011). "Influence of Wine pH on Changes in Color and Polyphenol Composition Induced by Micro-oxygenation" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (5): 1974-1984.

Laurie, V. F., S. Salazar, M. I. Campos, A. Cáceres-Mella und Á. Peña-Neira (2014). "Periodic Aeration of Red Wine Compared to Microoxygenation at Production Scale" *American Journal of Enology and Viticulture*, 65 (2): 254-260.

Lee, D. F., E. E. Swinny und G. P. Jones (2004). "NMR identification of ethyl-linked anthocyanin–flavanol pigments formed in model wine ferments" *Tetrahedron Letters*, 45 (8): 1671-1674.

Liao, H., Y. Cai und E. Haslam (1992). "Polyphenol interactions. Anthocyanins: Copigmentation and colour changes in red wines" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59 (3): 299-305.

Lopes, P., M. A. Silva, A. Pons, T. Tominaga, V. Lavigne, C. Saucier, P. Darriet, P.-L. Teissedre und D. Dubourdieu (2009). "Impact of Oxygen Dissolved at Bottling and Transmitted through Closures on the Composition and Sensory Properties of a Sauvignon Blanc Wine during Bottle Storage" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (21): 10261-10270.

Malien-Aubert, C., O. Dangles und M. J. Amiot (2002). "Influence of Procyanidins on the Color Stability of Oenin Solutions" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (11): 3299-3305.

Marquez, A., M. P. Serratosa und J. Merida (2014). "Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines" *Food Chemistry*, 146: 507-514.

Mateus, N. und V. de Freitas (2001). "Evolution and Stability of Anthocyanin-Derived Pigments during Port Wine Aging" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11): 5217-5222.

Mateus, N., A. M. S. Silva, C. Santos-Buelga, J. C. Rivas-Gonzalo und V. De Freitas (2002). "Identification of Anthocyanin-Flavanol Pigments in Red Wines by NMR and Mass Spectrometry" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (7): 2110-2116.

Mateus, N., A. M. S. Silva, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga und V. De Freitas (2003). "A New Class of Blue Anthocyanin-Derived Pigments Isolated from Red Wines" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1919-1923.

McRae, J. M., M. P. Day, K. A. Bindon, S. Kassara, S. A. Schmidt, A. Schulkin, R. Kolouchova und P. A. Smith (2015). "Effect of early oxygen exposure on red wine colour and tannins" *Tetrahedron*, 71 (20): 3131-3137.

Mercurio, M. D. und P. A. Smith (2008). "Tannin quantification in red grapes and wine: Comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 5528-5537.

Morata, A., M. C. Gómez-Cordovés, J. Suberviola, B. Bartolomé, B. Colomo und J. A. Suárez (2003). "Adsorption of Anthocyanins by Yeast Cell Walls during the Fermentation of Red Wines" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (14): 4084-4088.

Morata, A., M. C. Gómez-Cordovés, B. Colomo und J. A. Suárez (2005). "Cell wall anthocyanin adsorption by different Saccharomyces strains during the fermentation of Vitis vinifera L. cv Graciano grapes" *European Food Research and Technology*, 220 (3-4): 341-346.

Morata, A., F. Calderón, M. C. González, M. C. Gómez-Cordovés und J. A. Suárez (2007). "Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde" *Food Chemistry*, 100 (3): 1144-1152.

Nagel, C. W. und L. W. Wulf (1979). "Changes in the Anthocyanins, Flavonoids and Hydroxycinnamic Acid Esters during Fermentation and Aging of Merlot and Cabernet Sauvignon" *American Journal of Enology and Viticulture*, 30 (2): 111-116.

Narukawa, M., H. Kimata, C. Noga und T. Watanabe (2010). "Taste characterisation of green tea catechins" *International Journal of Food Science & Technology*, 45 (8): 1579-1585.

Nave, F., N. Teixeira, N. Mateus und V. de Freitas (2010). "The fate of flavanolanthocyanin adducts in wines: Study of their putative reaction patterns in the presence of acetaldehyde" *Food Chemistry*, 121 (4): 1129-1138.

Nevares, I. und M. del Álamo (2008). "Measurement of dissolved oxygen during red wines tank aging with chips and micro-oxygenation" *Analytica Chimica Acta*, 621 (1): 68-78.

Nguyen, D.-D., L. Nicolau, S. I. Dykes und P. A. Kilmartin (2010). "Influence of Microoxygenation on Reductive Sulfur Off-Odors and Color Development in a Cabernet Sauvignon Wine" *American Journal of Enology and Viticulture*, 61 (4): 457-464.

Nielsen, J. C. und M. Richelieu (1999). "Control of Flavor Development in Wine during and after Malolactic Fermentation by Oenococcus oeni" *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (2): 740-745.

Oberholster, A., B. L. Elmendorf, L. A. Lerno, E. S. King, H. Heymann, C. E. Brenneman und R. B. Boulton (2015). "Barrel maturation, oak alternatives and micro-oxygenation: Influence on red wine aging and quality" *Food Chemistry*, 173: 1250-1258.

OIV (2006). "Determination of the Chromatic Characteristics of Wine According to CIELab" *Resolution Oeno 1/2006*, OIV-MA-AS2-11.

OIV (2009a). "Chromatic Characteristics" Resolution OENO 2009, OIV-MA-AS2-07B.

OIV (2009b). "Sulfur Dioxide" Resolution Oeno 377/2009, OIV-MA-AS323-04B.

Oliveira, J., V. de Freitas, A. M. S. Silva und N. Mateus (2007). "Reactions between Hydroxycinnamic acids and Anthocyanin-Pyruvic Acid Adducts Yielding New Portisins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 6349-6356.

Oliveira, J., N. Mateus, A. M. S. Silva und V. de Freitas (2009). "Equilibrium Forms of Vitisin B Pigments in an Aqueous System Studied by NMR and Visible Spectroscopy" *Journal of Physical Chemistry B*, 113: 11352-11358.

Oliveira, J., J. Azevedo, A. M. Silva, N. Teixeira, L. Cruz, N. Mateus und V. de Freitas (2010). "Pyranoanthocyanin dimers: a new family of turquoise blue anthocyanin-derived pigments found in Port wine" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (8): 5154-5159.

Oliveira, J., N. Mateus, J. E. Rodriguez-borges, E. J. Cabrita, A. M. S. Silva und V. de Freitas (2011). "Synthesis of a new pyranoanthocyanin dimer linked through a methylmethine bridge" *Tetrahedron Letters*, 52 (23): 2957-2960.

Oliveira, J., M. A. da Silva, A. Jorge Parola, N. Mateus, N. F. Brás, M. J. Ramos und V. de Freitas (2013). "Structural characterization of a A-type linked trimeric anthocyanin derived pigment occurring in a young Port wine" *Food Chemistry*, 141 (3): 1987-1996.

Ortega-Heras, M., M. D. Rivero-Pérez, S. Pérez-Magariño, C. González-Huerta und M. L. González-Sanjosé (2008). "Changes in the volatile composition of red wines during aging in oak barrels due to microoxygenation treatment applied before malolactic fermentation" *European Food Research and Technology*, 226 (6): 1485-1493.

Osborne, J. P., R. Mira de Orduña, G. J. Pilone und S. Q. Liu (2006). "Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria" *FEMS Microbiology Letters*, 191 (1): 51-55.

Oszmianski, J., V. Cheynier und M. Moutounet (1996). "Iron-Catalyzed Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (7): 1712-1715.

Parish, M., D. Wollan und R. Paul (2000). "Micro-oxygenation - a review" *The Australian Grapegrower & Winemaker*: 47-52.

Parpinello, G. P., A. Versari, F. Chinnici und S. Galassi (2009). "Relationship among sensory descriptors, consumer preference and color parameters of Italian Novello red wines" *Food Research International*, 42 (10): 1389-1395.

Parpinello, G. P., F. Plumejeau, C. Maury und A. Versari (2012). "Effect of microoxygenation on sensory characteristics and consumer preference of Cabernet Sauvignon wine" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92 (6): 1238-1244.

Pati, S., M. T. Liberatore, G. Gambacorta, D. Antonacci und E. La Notte (2009). "Rapid screening for anthocyanins and anthocyanin dimers in crude grape extracts by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and tandem mass spectrometry" *J Chromatogr A*, 1216 (18): 3864-3868.

Peleg, H., K. Gacon, P. Schlich und A. C. Noble (1999). "Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79 (8): 1123-1128.

Pérez-Magariño, S., M. Sánchez-Iglesias, M. Ortega-Heras, C. González-Huerta und M. L. González-Sanjosé (2007). "Colour stabilization of red wines by microoxygenation treatment before malolactic fermentation" *Food Chemistry*, 101 (3): 881-893.

Pérez-Magariño, S., M. Ortega-Heras, E. Cano-Mozo und M. L. González-Sanjosé (2009). "The influence of oak wood chips, micro-oxygenation treatment, and grape variety on colour, and anthocyanin and phenolic composition of red wines" *Journal of Food Composition and Analysis*, 22 (3): 204-211.

Picariello, L., A. Gambuti, B. Picariello und L. Moio (2017). "Evolution of pigments, tannins and acetaldehyde during forced oxidation of red wine: Effect of tannins addition" *LWT - Food Science and Technology*, 77: 370-375.

Pizarro, C., S. Rodríguez-Tecedor, I. Esteban-Díez, N. Pérez-del-Notario und J. M. González-Sáiz (2014). "Experimental design approach to evaluate the impact of oak chips and micro-oxygenation on the volatile profile of red wines" *Food Chemistry*, 148: 357-366.

Prieur, C., J. Rigaud, V. Cheynier und M. Moutounet (1994). "Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds" *Phytochemistry*, 36 (3): 781-784.

Remy-Tanneau, S., C. Le Guernevé, E. Meudec und V. Cheynier (2003). "Characterization of a Colorless Anthocyanin–Flavan-3-ol Dimer Containing Both Carbon–Carbon and Ether Interflavanoid Linkages by NMR and Mass Spectrometry" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (12): 3592-3597.

Remy, S., H. Fulcrand, B. Labarbe, V. Cheynier und M. Moutounet (2000). "First Confirmation in Red Wine of Products Resulting from direct Anthocyanin-Tannin Reactions" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (6): 745-751.

Rentzsch, M., F. Weber, D. Durner, U. Fischer und P. Winterhalter (2009). "Variation of pyranoanthocyanins in red wines of different varieties and vintages and the impact of pinotin A addition on their color parameters" *European Food Research and Technology*, 229 (4): 689-696.

Revilla, E., E. Garcia-Beneytez, F. Cabello, G. Martin-Ortega und J. M. Ryan (2001). "Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them" *Journal of Chromatography A*, 915: 53-60.

Ribéreau-Gayon, P. und E. Stonestreet (1965). "Determination of anthocyanins in red wine" *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 9: 2649-2652.

Ribéreau-Gayon, P., P. Pontallier und Y. Glories (1983). "Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34 (5): 505-516.

Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean und D. Dubourdieu (2006a). *Handbook of Enology Volume 1*. West Sussex, England, John Wiley and Sons, Ltd.

Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean und D. Dubourdieu (2006b). *Handbook of Enology Volume 2*. West Sussex, England, John Wiley and Sons, Ltd.

Rigaud, J., V. Cheynier, J.-M. Souquet und M. Moutounet (1991). "Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57 (1): 55-63.

Rivas-Gonzalo, J. C., S. Bravo-Haro und C. Santos-Buelga (1995). "Detection of Compounds Formed through the Reaction of Malvidin 3-Monoglucoside and Catechin in the Presence of Acetaldehyde" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (6): 1444-1449.

Robichaud, J. L. und A. C. Noble (1990). "Astringency and bitterness of selected phenolics in wine" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53 (3): 343-353.

Salas, E., H. Fulcrand, E. Meudec und V. Cheynier (2003). "Reactions of Anthocyanins and Tannins in Model Solutions" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (27): 7951-7961.

Salas, E., V. Atanasova, C. Poncet-Legrand, E. Meudec, J. P. Mazauric und V. Cheynier (2004a). "Demonstration of the occurrence of flavanol–anthocyanin adducts in wine and in model solutions" *Analytica Chimica Acta*, 513 (1): 325-332.

Salas, E., C. L. Guernevé, H. Fulcrand, C. Poncet-Legrand und V. Cheynier (2004b). "Structure determination and colour properties of a new directly linked flavanol– anthocyanin dimer" *Tetrahedron Letters*, 45 (47): 8725-8729.

Salmon, J.-M., C. Fornairon und P. Barre (1998). "Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of Saccharomyces cerevisiae during enological fermentation" *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86 (2): 154-163.

Salmon, J.-M. (2006). "Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: Practical implications" *LWT - Food Science and Technology*, 39 (9): 959-965.

Sánchez-Ilárduya, M. B., C. Sánchez-Fernández, M. Viloria-Bernal, D. M. López-Márquez, L. A. Berrueta, B. Gallo und F. Vicente (2012). "Mass spectrometry fragmentation pattern of coloured flavanol-anthocyanin and anthocyanin-flavanol derivatives in aged red wines of Rioja" *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18 (2): 203-214.

Sánchez-Ilárduya, M. B., C. Sánchez-Fernández, S. Garmón-Lobato, B. Abad-García, L. A. Berrueta, B. Gallo und F. Vicente (2014). "Detection of non-coloured anthocyanin–flavanol derivatives in Rioja aged red wines by liquid chromatography–mass spectrometry" *Talanta*, 121: 81-88.

Santos-Buelga, C., S. Bravo-Haro und J. C. Rivas-Gonzalo (1995). "Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in model solutions" *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 201 (3): 269-274.

Sarneckis, C. J., R. G. Dambergs, P. Jones, M. Mercurio, H. M.J. und P. A. Smith (2006). "Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis" *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12: 39-49.

Sarni, P., H. Fulcrand, V. Souillol, J.-M. Souquet und V. Cheynier (1995). "Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69 (3): 385-391.

Sartini, E., G. Arfelli, A. Fabiani und A. Piva (2007). "Influence of chips, lees and microoxygenation during aging on the phenolic composition of a red Sangiovese wine" *Food Chemistry*, 104 (4): 1599-1604.

Saucier, C., G. Bourgeois, C. Vitry, D. Roux und Y. Glories (1997a). "Characterization of (+)-Catechin–Acetaldehyde Polymers: A Model for Colloidal State of Wine Polyphenols" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (4): 1045-1049.

Saucier, C., C. Guerra, I. Pianet, M. Laguerre und Y. Glories (1997b). "(+)-Catechin—acetaldehyde condensation products in relation to wine-ageing" *Phytochemistry*, 46 (2): 229-234.

Saucier, C., D. Little und Y. Glories (1997c). "First Evidence of Acetaldehyde-Flavanol Condensation Products in Red Wine" *American Journal of Enology and Viticulture*, 48 (3): 370-373.

Schäfer, C., Chromatographische Untersuchungen flavonoider Weininhaltsstoffe während der Mikrooxygenierung verschiedener Rotweine, Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern, Diplomarbeit, 2016.

Schmalfuß, E., *Charakterisierung von polymeren Pigmenten in Rotwein*, Fakultät für Lebenswissenschaften, Verlag Dr. Hut, München (zugleich Technische Universität Braunschweig), *Dissertation*, 2017.

Schmarr, H.-G., J. Bernhardt, U. Fischer, A. Stephan, P. Müller und D. Durner (2010). "Two-dimensional gas chromatographic profiling as a tool for a rapid screening of the changes in volatile composition occurring due to microoxygenation of red wines" *Analytica Chimica Acta*, 672 (1): 114-123. Schmidtke, L. M., A. C. Clark und G. R. Scollary (2011). "Micro-Oxygenation of Red Wine: Techniques, Applications, and Outcomes" *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51 (2): 115-131.

Schwarz, M., G. Jerez und P. Winterhalter (2003a). "Isolation and structure of Pinotin A, a new Anthocyanin derivative from Pinotage wine" *Vitis*, 42 (2): 105-106.

Schwarz, M., T. Wabnitz und P. Winterhalter (2003b). "Pathway leading to the Formation of Anthocyanin-Vinylphenol Adducts and Related Pigments in Red Wines" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3682-3687.

Schwarz, M., G. Hofmann und P. Winterhalter (2004). "Investigations on Anthocyanins in Wines from Vitis vinifera cv. Pinotage: Factors Influencing the Formation of Pinotin A and Its Correlation with Wine Age" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (3): 498-504.

Sigrist, I. A., G. G. Manzardo und R. Amadò (2003). "Aroma Compounds Formed from 3-Methyl-2,4-nonanedione under Photooxidative Conditions" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (11): 3426-3428.

Silva Ferreira, A. C., T. Hogg und P. Guedes de Pinho (2003). "Identification of Key Odorants Related to the Typical Aroma of Oxidation-Spoiled White Wines" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (5): 1377-1381.

Sims, C. A. und J. R. Morris (1985). "A Comparison of the Color Components and Color Stability of Red Wine from Noble and Cabernet Sauvignon at Various pH Levels" *American Journal of Enology and Viticulture*, 36 (3): 181-184.

Singleton, V. (1962). "Aging of wines and other spiritous products, acceleration by physical treatments" *Hilgardia*, 32 (7): 319-392.

Singleton, V. L. (1987). "Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications" *American Journal of Enology and Viticulture*, 38 (1): 69-77.

Singleton, V. L., R. Orthofer und R. M. Lamuela-Raventós (1999). "Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent" *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.

Somers, T. C. (1966). "Wine Tannins-Isolation of Condensed Flavonoid Pigments by Gel-Filtration" *Nature*, 209 (5021): 368-370.

Somers, T. C. (1971). "The Polymeric Nature of Wine Pigments" *Phytochemistry*, 10: 2175-2186.

Somers, T. C. und E. E. Evans (1977). "Spectral Evaluation of Young Red Wines: Anthocyanin Equilibria, Total Phenolics, Free and Molecular SO₂, "Chemical Age"" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28: 279-287.

Souquet, J.-M., V. Cheynier, F. Brossaud und M. Moutounet (1996). "Polymeric Proanthocyanidins from Grape Skins" *Phytochemistry*, 43 (2): 509-512.

Squadrito, M., O. Corona, G. Ansaldi und R. Di Stefano (2010). "Evolution of anthocyanin profile from grape to wine" *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 44 (3): 167-177.

Sun, B., C. P. Santos, M. C. Leandro, V. De Freitas und M. I. Spranger (2007). "Highperformance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of new products formed by the reaction between flavanols and malvidin 3-glucoside in the presence of acetaldehyde" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21 (14): 2227-2236.

Sun, B., T. Barradas, C. Leandro, C. Santos und I. Spranger (2008). "Formation of new stable pigments from condensation reaction between malvidin 3-glucoside and (–)-epicatechin mediated by acetaldehyde: Effect of tartaric acid concentration" *Food Chemistry*, 110 (2): 344-351.

Sun, B., T. A. Fernandes und M. I. Spranger (2010). "A new class of anthocyaninprocyanidin condensation products detected in red wine by electrospray ionization multistage mass spectrometry analysis" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24 (3): 254-260.

Sun, B., M. d. Sá, C. Leandro, I. Caldeira, F. L. Duarte und I. Spranger (2013). "Reactivity of Polymeric Proanthocyanidins toward Salivary Proteins and Their Contribution to Young Red Wine Astringency" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (4): 939-946.

Tanaka, T., R. Takahashi, I. Kouno und G.-i. Nonaka (1994). "Chemical evidence for the de-astringency (insolubilization of tannins) of persimmon fruit" *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* (20): 3013-3022.

Timberlake, C. und P. Bridle (1976a). "The effect of processing and other factors on the colour characteristics of some red wines" *Vitis*, 15: 37-49.

Timberlake, C. F. und P. Bridle (1976b). "Interactions between Anthocyanins, Phenolic Compounds, and Acetaldehyde and their Significance in Red Wines" *American Journal of Enology and Viticulture*, 27 (3): 97-105.

Troost, G. (1988). "Handbuch der Lebensmitteltechnologie. Technologie des Weines" 6. Auflage, Ulmer-Verlag, Stuttgart.

Ugliano, M. (2013). "Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (26): 6125-6136.

Valero, E., R. Varon und F. Garcia-Carmona (1990). "Inhibition of grape polyphenol oxidase by several natural aliphatic alcohols" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (4): 1097-1100.

Valero, E., C. Millán und J. Ortega (2001). "Influence of oxygen addition during growth phase on the biosynthesis of lipids in Saccharomyces cerevisiae (M330-9) in enological fermentations" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (1): 33-38.

Vasserot, Y., S. Caillet und A. Maujean (1997). "Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of Some Physicochemical Parameters" *American Journal of Enology and Viticulture*, 48 (4): 433-437.

Vidal, S., D. Cartalade, J.-M. Souquet, H. Fulcrand und V. Cheynier (2002). "Changes in Proanthocyanidin Chain Length in Winelike Model Solutions" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (8): 2261-2266.

Vidal, S., L. Francis, S. Guyot, N. Marnet, M. Kwiatkowski, R. Gawel, V. Cheynier und E. J. Waters (2003). "The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 564-573.

Vidal, S., L. Francis, A. Noble, M. Kwiatkowski, V. Cheynier und E. Waters (2004a). "Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine" *Analytica Chimica Acta*, 513 (1): 57-65.

Vidal, S., E. Meudec, V. Cheynier, G. Skouroumounis und Y. Hayasaka (2004b). "Mass Spectrometric Evidence for the Existence of Oligomeric Anthocyanins in Grape Skins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (23): 7144-7151.

Waterhouse, A. L. und V. F. Laurie (2006). "Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses" *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3): 306-313.

Weber, F., K. Greve, D. Durner, U. Fischer und P. Winterhalter (2013). "Sensory and Chemical Characterization of Phenolic Polymers from Red Wine Obtained by Gel Permeation Chromatography" *American Journal of Enology and Viticulture*, 64 (1): 15-25.

Weber, F. und P. Winterhalter (2014). "Synthesis and structure elucidation of ethylidenlinked anthocyanin — Flavan-3-ol oligomers" *Food Research International*, 65 (Part A): 69-76.

Wenzel, K., H. H. Dittrich und M. Heimfarth (1987). "Die Zusammensetzung der Anthocyane in den Beeren verschiedener Rebsorten" *Vitis*, 26: 65-78.

Wenzel, K. (1989). "The selection of a yeast mutant to reduce colour losses during red wine fermentation" *Vitis*, 28: 111-120.

Wirth, J., C. Morel-Salmi, J. M. Souquet, J. B. Dieval, O. Aagaard, S. Vidal, H. Fulcrand und V. Cheynier (2010). "The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines" *Food Chemistry*, 123: 107-116.

Wissemann, K. W. und C. Y. Lee (1980). "Polyphenoloxidase Activity During Grape Maturation and Wine Production" *American Journal of Enology and Viticulture*, 31 (3): 206-211.

Wolfender, J.-L., P. Waridel, K. Ndjoko, K. Hobby, H. Major und K. Hostettmann (2000). "Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts" *Analusis*, 28 (10): 895-906.

Würdig, G. und R. Woller (1989). *Handbuch der Lebensmitteltechnologie: Chemie des Weines*. Stuttgart, Eugen Ulmer Verlag.

Zimman, A. und A. L. Waterhouse (2004). "Incorporation of Malvidin-3-Glucoside into High Molecular Weight Polyphenols during Fermentation and Wine Aging" *American Journal of Enology and Viticulture*, 55 (2): 139-146.

7 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Patrick Nickolaus

Berufliche Tätigkeiten

seit 06/2015:	Laborleiter des Analyselabors am DLR Rheinpfalz, Neustadt
a.d.W.	
03/2013 - 05/2015:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dominik Durner am DLR Rheinpfalz, Neustadt a.d.W.
09/2012 - 02/2013:	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dominik Durner am DLR Rheinpfalz, Neustadt a.d.W.

Hochschulausbildung

10/2007 – 12/2012:	Studium der Chemie an der TU Kaiserslautern
	Vertiefungsrichtung Life Science
	Abschluss als Diplom-Chemiker, Titel der Diplomarbeit:
	"Untersuchung der Reaktionen zwischen Anthocyanen und
	Proanthocyanidinen mittels LC-QToF-MS"

Schulbildung

- 08/1998-03/2007: Albert-Schweitzer-Gymnasium, Kaiserslautern
- 03/2007: Allgemeine Hochschulreife
- 08/1994 07/1998: Münchhofschule Grundschule, Hochspeyer