

# 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin (TDN) in Riesling – Sensorische Relevanz und Minimierungsstrategie

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte

Dissertation

D 386

Vorgelegt von

**Staatl. gepr. Dipl.-Lebensmittelchemiker  
Michael Ziegler**

Angefertigt im Arbeitskreis von  
Prof. Dr. Ulrich Fischer

Vorsitzender der Prüfungskommission:  
Erstgutacher:  
Zweitgutachterin:

Prof. Dr. Werner Thiel  
Prof. Dr. Ulrich Fischer  
Prof. Dr. Elke Richling

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 05.11.2020



## **Rechtsverbindliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit mit dem Titel

**1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin (TDN) in Riesling –  
Sensorische Relevanz und Minimierungsstrategie**

selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Diese Arbeit oder Teile davon sind bislang keiner anderen Prüfungsbehörde als Prüfungsarbeit vorgelegt worden.

*Michael Ziegler*

Kaiserslautern, Juli 2020





## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ulrich Fischer für die Betreuung, vielseitige Unterstützung und für das Vertrauen, das er mir und meiner Arbeit stets entgegengebracht hat.

Frau Prof. Dr. Elke Richling danke ich herzlich für ihre Tätigkeit als Zweitgutachterin und die Mitwirkung in der Prüfungskommission. Herrn Prof. Dr. Werner Thiel danke ich vielmals für den Vorsitz der Prüfungskommission.

Dr. Hans-Georg Schmarr möchte ich für die leider kurze, aber intensive und fruchtbare Zusammenarbeit, die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung von Veröffentlichungen danken. Ebenso bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und den regen Meinungsaustausch bei meinen Projektpartnern von der Technischen Universität Braunschweig, Prof. Peter Winterhalter, Dr. Recep Gök und Pia Selhorst.

Bei Anette, Marty und Sandra möchte ich mich für die Planung und Zusammenarbeit bei der sensorischen Analytik der zahlreichen Weine bedanken, und auch den aufgeschlossenen und zuverlässigen Teilnehmern der Verkostungspanels.

Besonders danken möchte ich Max und Michael für die überaus unterhaltsamen und ergebnisreichen Stunden im GC-Raum sowie die stets unkomplizierte Zusammenarbeit, sowie Anne, Natalie und Michael für die Bereitschaft, mich auch am Wochenende zu unterstützen.

Vielen Dank an Dr. Pascal Wegmann-Herr und Sascha Wolz für die Unterstützung im Technikum und bei der Weinbereitung, außerdem an Benedikt, Florian, Laura und Marc. Ich bedanke mich auch herzlich bei Pascal und Jochen für die zahlreichen Anregungen zur Verbesserung meiner Arbeit und die Unterstützung bei der Ideenfindung für neue Versuche.

Mein besonderer Dank gilt auch allen Kollegen des DLR Rheinpfalz, vor allem des Instituts für Weinbau und Oenologie für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, den fachlichen Austausch und die stetige Hilfsbereitschaft. Danke auch an Daniel, Hannah, Michael und Patricia für die oftmals anstrengende, aber notwendige sportliche Abwechslung. Ein herzlicher Dank geht natürlich auch an das Doktorandenkolleg am DLR für die gegenseitigen fruchtbaren Ratschläge.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Verwandten, Freunden und Bekannten, die mich unterstützt und immer wieder aufgerichtet haben. Bei meiner Familie möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte Unterstützung während der Anfertigung der Doktorarbeit.

Dankbar bin ich vor allem meiner lieben Natalie, für das Korrekturlesen und dafür, dass sie mir stets zur Seite stand, immer Verständnis hatte und mich jederzeit unterstützt hat bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.



## I Publikationen

### Peer-reviewed Publikationen

Ziegler, M., Schmarr, H.-G. (2019): Comparison of Solid-Phase Microextraction Using Classical Fibers Versus Mini-Arrows Applying Multiple Headspace Extraction and Various Agitation Techniques. *Chromatographia*, 82 (2), 635-640.

Ziegler, M., Gök, R., Bechtloff, P., Winterhalter, P., Schmarr, H.-G., Fischer, U. (2019): Impact of matrix variables and expertise of panelists on sensory thresholds of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene known as petrol off-flavor compound in Riesling wines. *Food Quality and Preference*, 78, 103735.

Ziegler, M., Wegmann-Herr, P., Schmarr, H.-G., Gök, R., Winterhalter, P., Fischer, U. (2020): Impact of Rootstock, Clonal Selection and Berry Size of *Vitis vinifera* sp. Riesling on the Formation of TDN, Vitispiranes and Other Volatile Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 3834-3849

Ziegler, M., Petgen, M., Gök, R., Winterhalter, P., Fischer, U. (2020): Impact of Minimal Pruning, Harvest Time and Defoliation on Formation of TDN, Vitispiranes and Volatiles of *Vitis vinifera* sp. Riesling. In preparation.

Ziegler, M., Gök, R., Winterhalter, P., Fischer, U. (2020): Impact of Oenological Practices on Formation of TDN and Other Volatiles of *Vitis vinifera* sp. Riesling. In preparation.

Gök, R., Bechtloff, P., Ziegler, M., Schmarr, H.-G., Fischer, U., Winterhalter, P. (2019): Synthesis of Deuterium-Labeled 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and Quantitative Determination of TDN and Isomeric Vitispiranes in Riesling Wines by a Stable Isotope Dilution Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 6414-6422.

### Vorträge:

Ziegler, M., Schmarr, H.-G., Molenda, J., Gök, R., Klink, S., Fischer, U. (2016): Impact of varying ethanol and carbonation levels on the odor threshold of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (petrol off-flavor) and role of berry size and Riesling clones. *Macrowine 2016*, Changins, Switzerland.

Ziegler, M., Klink, S., Fischer, U. (2016): Auswirkungen von Weinvariablen auf die Geruchsschwelle von TDN. 62. Deutscher Weinbaukongress, Stuttgart, Germany.

Ziegler, M., Gök, R., Winterhalter, P., Fischer, U. (2017): Impact of clonal variety, berry size and defoliation on the formation of free and bound TDN. *Wine Active Compounds* international conference, Beaune, France.

Fischer, U., Ziegler, M., Gök, R., Bechtloff, P., Wacker, M., Schmarr, H.-G., Winterhalter, P. (2017): Petrolfehlnote in Rieslingweinen – pflanzenphysiologische, chemische und sensorische Ansätze zur Minimierung. *Jahrestagung 2017 des Forschungskreises der Ernährungsindustrie*, Stuttgart, Germany.

Fischer, U., Ziegler, M., Wacker, M., Schmarr, H.-G. (2018): Riesling im Klimawandel Ansätze zur Reduzierung der Petrolnote. *71. Pfälzer Weinbautage 2018*, Neustadt, Germany.

Ziegler, M., Klink, S., Gök, R., Bechtloff, P., Winterhalter, P., Fischer, U. (2018): Analyse und sensorische Relevanz von gebundenem und freiem TDN in Riesling. *9. Anwendertreffen Weinanalytik*, Weinsberg, Germany.

Ziegler, M., Gök, R., Bechtloff, P., Winterhalter, P., Fischer, U. (2018): Viticultural and oenological measures to minimize the petrol off-flavor in Riesling wines. *Wine Graduates' Forum at 63. Internationaler DWV-Kongress*, Stuttgart, Germany.

#### **Posterbeiträge:**

Ziegler, M., Schmarr, H.-G. (2016): Evaluation of various coating materials for SPME and the novel SPME mini-Arrow for the extraction of TDN and vitispirane in wine using multiple HS-SPME. *40th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC) & 13th GCxGC Symposium*, Riva del Garda, Italy.

Ziegler, M., Klink, S., Fischer, U. (2016): Impact of varying ethanol and carbonation levels on the odour threshold of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (petrol off-flavor) and role of berry size and Riesling clones. *45. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Freising, Germany.

## II Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	V
I Publikationen.....	VII
II Inhaltsverzeichnis.....	IX
III Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....	XI
1 Zusammenfassung.....	1
2 Abstract.....	3
3 Einleitung .....	5
4 Literaturübersicht.....	7
4.1 Rieslingwein.....	7
4.2 Glykosidisch gebundene Aromastoffe.....	13
4.3 Carotinoide .....	16
4.3.1 Vorkommen, Biosynthese und Funktionen .....	16
4.3.2 Abbau.....	21
4.4 C <sub>13</sub> -Norisoprenoide .....	23
4.5 TDN und Vitispiran.....	27
4.6 Analytik von Aromaverbindungen in Wein.....	32
4.6.1 Stabilisotopenverdünnungsanalyse .....	32
4.6.2 Festphasenmikroextraktion.....	34
4.7 Vermeidung der Petrolnote .....	36
4.7.1 Weinbauliche Einflussfaktoren auf die Bildung von TDN.....	36
4.7.2 Oenologische Einflussfaktoren auf die Bildung von TDN .....	38
5 Zielsetzung.....	41
6 Kumulativer Teil der Dissertation .....	44
6.1 Originalarbeit zum Thema sensorische Relevanz von TDN .....	45
6.2 Originalarbeit zum Thema Methodenetablierung.....	59
6.3 Originalarbeit zum Thema Einfluss weinbaulicher Methoden .....	67
6.4 Manuskript zum Thema Einfluss weinbaulicher Methoden Teil II .....	85
6.5 Manuskript zum Thema Einfluss oenologischer Methoden.....	113
7 Entfernung von TDN.....	153
7.1 Materialien .....	153
7.2 Ergebnisse und Diskussion .....	154
7.2.1 Modellwein als Matrix .....	154

7.2.2 Rieslingwein als Matrix .....	157
8 Zusammenfassung .....	161
9 Literaturverzeichnis .....	171
10 Abbildungsverzeichnis .....	188
11 Tabellenverzeichnis .....	191
12 Anhang .....	193
12.1 Quantitative Daten der Wettbewerbsweine .....	193
12.2 Bestimmung der TDN-Wahrnehmungsschwelle von Verbrauchern .....	203
12.3 Ergänzende Daten zu: Comparison of Solid-Phase Microextraction Using Classical Fibers Versus Mini-Arrows Applying Multiple Headspace Extraction and Various Agitation Techniques .....	208
12.4 Supporting information zu: Impact of Rootstock, Clonal Selection, and Berry Size of <i>Vitis vinifera</i> sp. Riesling on the Formation of TDN, Vitispiranes, and Other Volatile Compounds .....	211
12.5 Supporting info zu: Impact of Defoliation on the Formation of TDN, Vitispiranes and Other Volatiles of <i>Vitis vinifera</i> sp. Riesling .....	214
12.6 Supporting information zu: Impact of Oenological Practices on Formation of Free and Bound TDN and Other Volatiles of <i>Vitis vinifera</i> sp. Riesling .....	215
12.7 Ergänzende Daten zu: TDN-Entfernung .....	218
Lebenslauf .....	221

### III Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Å	Ångström (100 pm)
Ac	Acetat
ADP	Adenosindiphosphat
ATF	Acetyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BET	bester Schätzwert für den Schwellenwert (engl. best estimate threshold)
BAT	Verzweigtkettige Aminosäuren Aminotransferase (engl. branched-chain amino acid aminotransferase)
BVS	Flaschenverschlussart (fr. Bague Vin Suisse)
CA	Celluloseacetat
Car	Carotinoid
CCD	Carotinoidspaltende Dioxygenase (engl. Carotenoid cleavage dioxygenase)
Chl	Chlorophyll
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CRT	Ablehnungsschwelle für Verbraucher (engl. consumer rejection threshold)
DCCC	Tröpfchen-Gegenstromchromatographie (engl. droplet countercurrent chromatography)
DHA	Dehydroascorbinsäure
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DI	Direktimmersion (engl. direct immersion)
DOXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
DT	Wahrnehmungsschwelle (engl. detection threshold)
DXR	DOXP-Reduktoisomerase
FID	Flammenionisationsdetektor
FTIR	Fouriertransformations-Infrarotspektroskopie
GC	Gaschromatographie
GDP	Geranylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GGPS	Geranylgeranylphosphatsynthase
Glc	Glucose
ha	Hektar (10000 m <sup>2</sup> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HS	Kopfraum (engl. headspace)
IPP	Isopentenylpyrophosphat
ln	natürlicher Logarithmus
LOD	Nachweisgrenze (engl. limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. limit of quantitation)

LPP	Linalylpyrophosphat
MEP	Methylerythritol-4-phosphat
MHE	Multiple Kopfraumextraktion (engl. multiple headspace extraction)
MLF	Malolaktische Fermentation
MS	Massenspektrometrie
MVA	Mevalonsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinkleotidphosphat
NCED	9- <i>cis</i> -Epoxy-carotinoiddioxygenase (engl. nine- <i>cis</i> -epoxy-carotenoid dioxygenase)
NPP	Nerylpyrophosphat
PA	Polyacrylat
PAM	Polyamid
PDMS	Polydimethylsiloxan
PES	Polyethersulfon
PET	Polyethylenterephthalat
ppb	Anteile pro Milliarde, $10^{-9}$ (engl. parts per billion)
ppt	Anteile pro Billion, $10^{-12}$ (engl. parts per trillion)
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Quencher
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RC	regenerierte Cellulose
SDE	Simultane Destillation-Extraktion
SIDA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse (engl. stable isotope dilution assay)
SMM	single magnet mixer
SPME	Festphasenmikroextraktion (engl. solid phase microextraction)
Stabw	Standardabweichung
TDN	1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin
UDP	Uridindiphosphat
VS	Vitispiranisomere (2,10,10-trimethyl-6-methyl-6-en-1-oxaspiro[4.5]dec-7-en)
YAN	yeast assimilable nitrogen (Hefeverwertbarer Stickstoff)



## 1 Zusammenfassung

Riesling wird neben seiner mannigfaltigen Variabilität im Aromaprofil, das unter anderem durch die unterschiedliche Bodenbeschaffenheit entsteht, vor allem in Deutschland auch wegen seiner Kältetoleranz und Anpassungsfähigkeit geschätzt. Er gilt zudem auch als alterungsfähiger Wein, allerdings kommt es bei zu starker Sonnenexposition der Rebe und langer bzw. warmer Lagerung vermehrt zur Bildung von 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin (TDN). Dieser von Carotinoiden abstammende Aromastoff verursacht die sogenannte „Petrolnote“, die vor allem in wärmeren Anbauregionen zum sortentypischen Bukett des Rieslings gehört. Deutsche Rieslingweine zeichnen sich dagegen überwiegend durch einen säurebetonten, fruchtigen Charakter aus, bei dem das Auftreten einer Petrolnote vor allem im Fall von Jungweinen als unpassende Fehlnote empfunden wird.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deswegen, die sensorische Relevanz von TDN zu evaluieren und Maßnahmen zu realisieren, die geeignet sind, die Konzentrationen an freiem und gebundenem TDN zu verringern und dadurch das Auftreten der Petrolnote zu vermeiden.

Dafür wurde zunächst in Kapitel 6.1 die Empfindlichkeit von Verbrauchern und geschulten Prüfern gegenüber TDN sowie die Konzentration bestimmt, ab der die Petrolnote zu einer Ablehnung des Weins durch Verbraucher führt. Während geschulte Prüfer Rieslingweine bereits ab einem TDN-Gehalt von 2,3 µg/L unterscheiden konnten, lag die Wahrnehmungsschwelle von 156 Verbrauchern mit 14,7 µg/L um ein Mehrfaches darüber, und wurde außerdem durch das Geschlecht der Probanden beeinflusst. Die Petrolnote führte ab TDN-Gehalten von 60 µg/L bei einjährigem und 91 µg/L bei achtjährigem Riesling zur Ablehnung des Weins. Die Konzentration an freiem TDN in 261 Rieslingweinen aus drei verschiedenen Weinwettbewerben überstieg bei rund der Hälfte der Weine die Wahrnehmungsschwelle von geschulten Prüfern, während die Wahrnehmungsschwelle von Verbrauchern nur von 15% der Weine überschritten wurde. Gleichzeitig lag bei keinem der Weine der TDN-Gehalt über der Ablehnungsschwelle.

Durch die Evaluierung der instrumentellen Analyseparameter in Kapitel 6.2 wurde für die Untersuchung von freiem TDN und weiteren Aromastoffen eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, nicht nur die TDN-Konzentrationen zu erfassen, sondern auch eine umfassende Qualitätsbewertung der Versuchsweine durchzuführen. Parallel dazu wurde eine Schnellmethode zur Erfassung der Gehalte an gebundenem TDN und Vitispiran implementiert, um auch die Effektivität der in dieser Arbeit durchgeführten weinbaulichen und oenologischen Praktiken im Hinblick auf das TDN-Potential zu beurteilen.

Kapitel 6.3 und 6.4 beschreiben weinbauliche Maßnahmen, die in mehrjährigen Studien auf ihre Eignung zur Reduzierung der TDN-Konzentration untersucht wurden. Während bei den Weinen, die aus Beeren unterschiedlicher Größe hergestellt wurden, keine signifikanten Unterschiede über die Jahrgänge hinweg beobachtet wurden, konnte durch die Variation der Rebunterlagen der Gehalt an gebundenem TDN um rund 30% reduziert werden.

Ausgangspunkt einer weiteren Versuchsreihe waren acht verschiedene Rieslingklone auf derselben Unterlage, welche anschließend auf ihren TDN Gehalt untersucht wurden. Dabei wurden deutliche Differenzen in der Disposition einiger Klone zu höheren Gehalten an gebundenem TDN festgestellt. Hier ergab sich eine positive Korrelation zwischen der Lockerbeerigkeit der Trauben und der Menge an gebundenem TDN in den produzierten Weinen – je kompakter die Traube, desto weniger gebundenes TDN und gebundenes Vitispiran wurde gebildet. Die höhere Sonnenexposition der Beeren, die diesen Effekt hervorruft, beeinflusste auch die Gehalte an gebundenem TDN und Vitispiran in Weinen, die von Reben geerntet wurden, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in variierender Intensität entblättert wurden. Dabei führt sowohl eine maximale Entblätterung in der Traubenzone wie auch die Laubentfernung einen Monat nach der Blüte zu einer Erhöhung der Konzentration an gebundenem TDN und Vitispiran von rund 50%. Entblätterungsmaßnahmen zur Blüte oder zur Véraison, die der Regulierung der Erntemenge und der Traubengesundheit dienen, führten dagegen zu keinem Anstieg im Vergleich zur nicht-entblätterten Kontrolle.

Wie in Kapitel 6.5 ausgeführt wird, resultiert ein hoher Pressdruck beim Keltern sowie ein niedriger Stickstoffgehalt des Mosts in einer Zunahme des gebundenen TDN von 50-100%. Höhere Säuregehalte während der Lagerung verursachten in mehreren Versuchsreihen nicht nur eine höhere Freisetzungsrates von TDN, sondern auch einen verstärkten Abbau anderer Aromastoffe wie Ester,  $\beta$ -Damascenon oder Linalool. Dagegen hatte ein niedriger pH-Wert während der Gärung kaum Einfluss auf den Hefemetabolismus und die dadurch gebildeten Aromastoffe. Die Erhöhung der Gärtemperatur von 12 auf 24 °C hatte jedoch eine Zunahme von honig- oder petrolartigen Noten in den Rieslingweinen zur Folge. Die Verwendung unterschiedlicher Hefestämme führte zu einer Variation der Konzentrationen an gebundenem TDN zwischen 70 und 147  $\mu\text{g/L}$ , abhängig vom Hefestamm und dem Jahrgang. Zwei der untersuchten neun Hefen brachten Weine mit bis zu 40% geringeren Gehalten an gebundenem TDN in Mosten mit hohem Stickstoffgehalt hervor, während drei weitere Hefen besser für den Einsatz in nährstoffarmen Most geeignet waren. Bei der Lagerung der Weine spielte die Lagertemperatur eine entscheidende Rolle in Bezug auf den Gehalt an freiem TDN, gefolgt vom Material des Flaschenverschlusses und der Flaschenorientierung.

Mittels geeigneter Filtermaterialien, die in Kapitel 7 beschrieben sind, wurde der Gehalt an freiem Wein um bis zu 80% reduziert, ohne die meisten der anderen Aromastoffe signifikant zu beeinflussen.

Somit wurde durch diese Arbeit ein vielfältiger Maßnahmenkatalog für die Weinwirtschaft entwickelt, der geeignet ist, den Anforderungen des fortschreitenden Klimawandels entgegenzutreten und die herausragende Position des Rieslings in Deutschland zu sichern.

## 2 Abstract

Riesling is considered as one of the most noble wine varieties especially appreciated in Germany for its cold tolerance, drought resistance and high adaptability to a wide range of mesoclimates and soil types. Riesling wines are produced on every wine-growing continent and excel in the transfer of terroir, soil type and style into its aroma profile. High sun exposure of the vines and long-term storage of the wines cause formation of the C<sub>13</sub>-norisoprenoid 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) eliciting a kerosene-like flavor in Riesling wines. Being appreciated by numerous winemakers especially in the southern hemisphere and contributing to its aged character, early formation in young wine can disturb the balance of the wine evoking the 'petrol off-flavor' that might cause rejection of the wines by consumers.

In this thesis, numerous viticultural and enological practices are assessed towards their capability to reduce the formation of bound and free TDN, avoiding the emergence of the petrol off-flavor. For this purpose, sensory pertinence of TDN on the perception and rejection thresholds of trained panelists and consumers was investigated in Chapter 6.1. While trained panelists were able to distinguish Riesling wines with TDN levels of 2.3 µg/L, consumer detection threshold of 14.7 µg/L TDN determined with 156 consumers exceeded the threshold of the trained panel by a factor of five and varied by consumers' gender. Rejecting a Riesling wine due to its petrol off-flavor, 60 µg/L TDN were required in a young and 91 µg/L in an eight-year-old Riesling wine. Based on analytical data for 261 commercial Riesling wines, geographic origin and to a smaller extent wine age contributed to large differences in TDN concentrations. About half of the investigated wines exceeded the detection threshold of the trained panel, whereas consumers would have noticed TDN in only less than 15% of the Riesling wines. None of the wines exceeded the consumer rejection threshold of TDN.

Evaluation of instrumental parameters in Chapter 6.2 enabled the development of an analytical method for the determination of free TDN and other volatile aroma compounds. This facilitated not only tracking TDN concentrations but also provided a more holistic view on the aroma profile of the resulting wines. At the same time a method was implemented for the rapid analysis of bound TDN and vitispirane to evaluate the viticultural and oenological measures on the TDN potential of Riesling wines.

Chapters 6.3 and 6.4 describe the impact of viticultural practices on the formation of free and bound TDN, vitispirane and other volatiles. Wines produced from the same Riesling clone, which was grafted on six different rootstocks, varied up to 30% throughout two vintages in respect to their concentrations of free and bound TDN and vitispirane as well as other volatiles. Over three vintages, the same compounds differed significantly among wines made from eight Riesling clones grafted on the same rootstock. Genetically determined loose grape clusters favored the formation of TDN and yielded wines of stronger sensory petrol intensity. Berry size, however, had no relevant impact on TDN and VS formation. Implementation of minimal pruning yielded significantly higher concentrations of bound TDN alike other volatiles compared to

vines trained in a vertical shoot positioning. Thus, processing grapes from minimal pruned Riesling vines may induce the undesired petrol off-flavor. Though, the simultaneous increase of other volatiles, might contribute to a favorable masking of the petrol note. Delaying harvest triggered formation of bound TDN as well as other C<sub>13</sub>-norisoprenoid, 4-vinylguaiaicol and linalool concentration, while no beneficial effect on other volatiles could be observed. Throughout three vintages, identical vines were subjected to defoliation treatments, varying in time point and extent of leaf removal. Defoliation of vines 30 days past bloom, likewise extension of leaf removal, raised levels of bound TDN and vitispirane by 50%. Gentle leaf removal at bloom or véraison yielded lowest levels of bound TDN, without compromising overall impression of the resulting wines at sensory analyses.

The effect of oenological practices was assessed in Chapter 6.5, elucidating their effects on the formation of TDN and release of the sensorial active free TDN. High pressure during grape juice production and low levels of yeast assimilable nitrogen in grape juice triggered concentration of bound TDN by 50-100%. Low pH during bottle storage had a detrimental effect on levels of ester compounds, linalool and  $\beta$ -damascenone, while the formation of free TDN and VS was fostered. At the same time, high acidity levels of the grape juice did not affect yeast metabolism during fermentation and the resulting aroma compounds. However, raising fermentation temperature from 12 to 24 °C yielded more honey-like and petrol-affine wines than cooler processing conditions. Nine commercial yeast strains were evaluated with a favorable outcome towards levels of bound TDN, altering concentrations between 70 and 147  $\mu\text{g/L}$  due to yeast strain and vintage effects. Two of the investigated nine yeasts were capable to reduce bound TDN by 40% applied in grape juice with high nitrogen levels, while three more yeasts were more suitable for the use in low nutrient grape juice. High storage temperatures were crucial for the release of free TDN, followed by choice of bottle closure type and storage position.

Using suitable filter materials in Chapter 7, the concentration of free TDN in wine could be diminished by up to 80% without losing substantial amounts of other volatile compounds.

In conclusion, the set of viticultural and oenological measures elucidated in this work provides suitable tools for winegrowers and winemakers to face advancing climate change and to ensure the production of high-quality Riesling wines.

### 3 Einleitung

Weintrauben gehören zu den wertvollsten angebauten Dauerkulturen weltweit. Der daraus durch Fermentation gewonnene Wein ist als Genussmittel nicht mehr aus dem gesellschaftlichen Leben wegzudenken, bedenkt man den Konsum von 20,5 L pro Person und Jahr.<sup>1</sup> So stellt Wein nach Bier das am meisten konsumierte alkoholische Getränk in Deutschland dar. Zu den wichtigsten Rebsorten gehört der Riesling, der in Europa seit über 600 Jahren kultiviert und vor allem an der Mosel, in der Pfalz, im Rheinland, in Baden-Württemberg und im Elsaß angebaut wird.<sup>2</sup> Die weltweite Anbaufläche von Riesling beträgt 64.000 ha, wobei Deutschland den größten Anteil mit 37,2% aufweist. Auf Rumänien entfallen dabei 9,6% der Gesamtanbaufläche, auf die USA 7,2%, und 6,3% auf Frankreich.<sup>3</sup>

Das Aroma ist eine entscheidende Komponente beim Genusserleben eines Weines. Bei den meisten Weinen ist von den über 800 identifizierten Aromaverbindungen nur ein relativ kleiner Teil für das sortentypische, in den Beeren gebildete Aroma verantwortlich. Bei diesen überwiegend im ppb- bis ppt-Bereich vorkommenden Verbindungen handelt es sich vor allem um Monoterpene, C<sub>13</sub>-Norisoprenoide, Thiole und Pyrazine.<sup>4</sup>

Für das charakteristische Primäraroma des Rieslings sind neben dem Monoterpen Linalool vor allem C<sub>13</sub>-Norisoprenoide verantwortlich.<sup>5</sup> Hierzu gehören  $\beta$ -Damascenon,  $\beta$ -Ionon, 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin (TDN) sowie die isomeren Vitispirane. Während  $\beta$ -Damascenon einen Geruch nach Frucht, Rosen oder gekochtem Apfel aufweist,<sup>6</sup> verursacht TDN eine petrol- oder kerosinartige Note in Riesling, die erstmals von Simpson 1978 beschrieben, und für die eine Geruchsschwelle von 20  $\mu\text{g/L}$  bestimmt wurde.<sup>7</sup> In einer neueren Studie von 2012 wurde durch die Aufdotierung eines Chardonnay die Wahrnehmungsschwelle mit 2  $\mu\text{g/L}$  neu festgelegt, bedingt unter anderem durch die Verwendung einer anderen Methodik hinsichtlich Matrix, Testdurchführung und Panelzusammensetzung.<sup>8</sup> Während TDN in gereiften Rieslingweinen – vor allem außerhalb Europas – in moderaten Konzentrationen zum normalen Bukett eines Rieslings gehört,<sup>9</sup> führen erhöhte Konzentrationen zu einer Petrol-Fehlnote, die unter Umständen zur Ablehnung des jeweiligen Weins führt. Dazu wurden 2014 in einer Studie die Wahrnehmungsschwellen sowie die Ablehnungsschwellen von TDN in Riesling an Verbrauchern aus den USA und Neuseeland getestet.<sup>10</sup> Die sich hieraus ergebenden Werte von ca. 38  $\mu\text{g/L}$  für die Wahrnehmungsschwelle und 82  $\mu\text{g/L}$  (USA) bzw. 157  $\mu\text{g/L}$  (Neuseeland) für die Ablehnungsschwelle liegen um ein Vielfaches über der von Sacks et al. ermittelten Wahrnehmungsschwelle von 2  $\mu\text{g/L}$ , die mit einem trainierten Panel durchgeführt wurde.<sup>8</sup>

Obwohl der genaue Bildungsweg noch nicht vollständig geklärt ist, stammen TDN wie auch die biogenetisch verwandten isomeren Vitispirane wahrscheinlich von Xanthophyllen, insbesondere Violaxanthin und Neoxanthin ab.<sup>11</sup> Dabei treten die C<sub>13</sub>-Norisoprenoide TDN und Vitispiran in Most und Wein vorwiegend als glykosidisch gebundene Vorstufen auf, aus denen während der Lagerung des Weins die aromaaktiven Verbindungen freigesetzt werden.<sup>12</sup>

Die Bildung von Carotinoiden, zu denen auch die Xanthophylle gehören, ist unter anderem von der Sonneneinstrahlung auf die Beeren abhängig,<sup>13</sup> sodass mit dem Anbau der Reben in sonnenreicheren Regionen auch der Anteil an C<sub>13</sub>-Norisoprenoidvorläufern steigt. Dementsprechend wurden in diesen Weinen auch höhere Gehalte an TDN und seinen Vorläufern nachgewiesen, als es in kühleren Regionen der Fall war.<sup>9</sup> Mit fortschreitendem Klimawandel und der damit verbundenen längeren und stärkeren Exposition der Reben gegenüber hohen Temperaturen und vermehrter Sonneneinstrahlung ist zu erwarten, dass die Carotinoid- und Norisoprenoid-Gehalte auch in gemäßigten Breiten wie Mitteleuropa in Zukunft steigen werden.<sup>14</sup> Gerade deutsche Verbraucher bevorzugen allerdings Rieslingweine mit einem frischen und fruchtigen Charakter; dem entgegen steht die Anwesenheit der Petrolnote. Vor allem in jungen Rieslingweinen ist das problematisch, da durch die steigende Anzahl an warmen Jahren in Europa in den letzten 30 Jahren mit einem vermehrten Auftreten der Petrolnote zu rechnen ist.<sup>15</sup>

Aus den in der Literatur sehr unterschiedlichen, teils sehr hoch erscheinenden Angaben für die Wahrnehmungs- und Ablehnungsschwellen ergibt sich die Notwendigkeit, die Sensitivität gegenüber TDN von Verbrauchern und geschulten Verkostern auch in Deutschland zu ermitteln, zumal sich die Literatur auf Untersuchungen aus USA und Neuseeland beziehen und sich die Wahrnehmungs- und Ablehnungsschwelle der deutschen Verbraucher unterscheiden können. Des Weiteren werden Rieslingweine vor allem in Deutschland auch für die Produktion von Schaumwein und restsüßer Weine verwendet, wodurch der Einfluss der Matrixbestandteile Ethanol und CO<sub>2</sub> auf die Wahrnehmungsschwelle von Bedeutung ist. Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur Bestimmung der sensorischen Relevanz der Petrolnote und damit auch zur Notwendigkeit von Maßnahmen, mit denen sich der TDN-Gehalt in Rieslingweinen beeinflussen lässt.

Neben der erstmals zu bestimmenden Wahrnehmungs- und Ablehnungsschwellen, die als Bezugswert und damit als Grundlage dienen, gilt es vor allem herauszufinden, welche weinbaulichen und oenologischen Handlungsmöglichkeiten die Gehalte von TDN und Vitispiran regulieren können. Dafür werden zahlreiche Einflussfaktoren über mehrere Jahrgänge hinweg untersucht, ausgehend von der Auswahl des Pflanzenmaterials, der Art des Rebschnitts und den verschiedenen Entblätterungsmaßnahmen über den Einsatz verschiedener Hefen, die Änderung der Fermentationsbedingungen und Filtrationsmaßnahmen bis hin zur Weinlagerung. Die Untersuchungen einer Vielzahl möglicher Einflussfaktoren ergeben ein Gesamtbild, aus dem sich spezifische Handlungsmöglichkeiten für Winzer, Kellermeister und Vermarkter ableiten lassen, und die somit Anwendung in der praktischen Umsetzung finden.



## 4 Literaturübersicht

### 4.1 Rieslingwein

Das Weinaroma trägt maßgeblich zur Weinqualität bei, sodass die grundlegende Zusammensetzung des Weinaromas von großem Interesse für die Weinindustrie ist. Die Kenntnis der grundlegenden chemischen Verbindungen und Prozesse ist essentiell, um potentielle Einflussmöglichkeiten auf die Aromabildung abzuleiten, die sich aus weinbaulichen Maßnahmen und während der Weinbereitung ergeben.

Grundsätzlich können die über 800 bekannten Aromastoffe des Weins in drei Gruppen unterteilt werden: Das sortentypische Primäraroma, welches bereits in den Trauben vorliegt, das Sekundäraroma, gebildet durch chemische und enzymatische Prozesse während der Beerenverarbeitung und der Gärung, und das Tertiäraroma, welches während der Lagerung in Fässern und Flaschen entsteht.<sup>16</sup> Die sortentypischen Aromen der 65 Weißwein- und 47 Rotweinsorten, die 2015 für den Anbau in Deutschland zugelassen waren,<sup>17</sup> setzen sich aus einer Vielzahl von Verbindungen zusammen. Diese kommen vor allem glykosidisch gebunden, aber auch in freier Form vor. Zu den bereits in der Beere frei vorkommenden Verbindungen gehören vor allem die für Sauvignon blanc und Cabernet Sauvignon charakteristischen Methoxypyrazine, die hauptsächlich in den Stielen, den Kernen und der Beerenhaut lokalisiert sind,<sup>18</sup> wie auch die für Muskateller und Gewürztraminer prägenden Monoterpene, wobei letztere zeitgleich zu ihrer freien Form als glykosidisch gebundene Verbindungen vorliegen.<sup>4</sup>

Beerenkomponente	Metabolismus	Metabolit / Produkt
Nährstoffe	Katabolisch/Anabolisch	Fermentationsbukett
Hexosen	Zucker- & Lipidstoffwechsel Zuckerstoffwechsel	Ester, höhere Alkohole, Säuren, Carbonyl Polysaccharide
Aminosäuren, Ammonium, Peptide	Stickstoffmetabolismus	Höhere Alkohole, Säuren, Carbonyle
Sulfate, Sulfite	Schwefelmetabolismus	Flüchtige Schwefelverbindungen
Aromavorläufer	Biotransformationen	Sortenspezifische Verbindungen
Glycoside	Hydrolyse	Monoterpene, Norisoprenoide, Kohlenwasserstoffe, Benzolderivate
Cystein-Konjugate	Nicht-hydrolytische Spaltung	Langkettige polyfunktionelle Thiole
Nicht konjugierte Sekundärmetabolite	Reduktion, Veresterung, Decarboxylierung	Umwandlungsprodukte
Vorläuferfreie aromaaktive Verbindungen	Metabolismus/Biotransformationen	Aromaaktive Verbindungen
Carbonsäuren	Tricarbonsäurezyklus	Carbonsäuren, Umwandlungsprodukte
Phenolische Verbindungen	(Hefemetaboliten)	Phenolische Addukte und Polymere

Abbildung 1: Übersicht über die Herkunft verschiedener Aromastoffklassen, modifiziert nach Moreno-Arribas und Polo<sup>19</sup>

Typische Komponenten, die in der Weinbereitung vor allem durch die metabolischen Aktivitäten der Hefen während der Gärung entstehen, sind unter anderem Acetat- und Ethylester, höhere Alkohole und Aldehyde, flüchtige Phenole und Hexanol (vgl. Abbildung 1).

Als höhere Alkohole werden im Weinbereich alle mono-funktionellen Alkohole bezeichnet, die mehr als zwei Kohlenstoffatome besitzen, und Nebenprodukte des Aminosäurestoffwechsels der Hefe darstellen. Diese Kategorisierung schließt Mehrfachalkohole wie Glycerin aus, aber auch flüchtige Phenole ebenso wie Monoterpenalkohole.<sup>20</sup> Zu den höheren Alkoholen gehören beispielsweise 2-Phenylethanol und sogenannte Fuselalkohole wie Isobutyl- und Amylalkohole (2-Methyl-1-propanol bzw. 2- und 3-Methyl-1-butanol), die im zwei- bis dreistelligen Milligramm pro Liter Bereich vorkommen und zur Komplexität des Weinaromas beitragen.<sup>21</sup> Sie werden durch die Hefe über die Ehrlich-Reaktion vor allem bei Stickstoffmangel aus den entsprechenden Aminosäuren unter Abspaltung der Aminofunktion gebildet. Die resultierenden  $\alpha$ -Keto-Carbonsäuren werden anschließend durch eine Pyruvatdecarboxylase in ein um ein Kohlenstoffatom verkürztes Aldehyd umgewandelt, das letztlich durch die Alkoholdehydrogenase in einer NADH-abhängigen Reaktion zum Alkohol reduziert wird.<sup>22</sup> Zusätzlich sind Hefen auch in der Lage, die  $\alpha$ -Keto-Säuren über den anabolischen Stoffwechselweg aus Glucose zu bilden.

Zudem können die verkürzten Aldehyde auch über eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Reaktion durch Aldehyddehydrogenasen zu den entsprechenden Carbonsäuren oxidiert werden.<sup>23</sup> Die Synthese höherer Alkohole hängt damit zum Einen von der beeinflussbaren Aktivität der Gene BAT1 und BAT2 ab, die die Transaminaseenzyme codieren.<sup>22</sup> Zum Anderen beeinflussen sowohl der Gehalt der jeweiligen Aminosäure, als auch die Menge an hefeverwertbarem Stickstoff (yeast assimilable nitrogen, YAN) die Produktion der höheren Alkohole durch die Hefe.<sup>20</sup>

Neben den höheren Alkoholen sind für das Weinaroma auch Alkohole mit C<sub>6</sub>-Körpern relevant, die vorwiegend aus Membranlipiden stammen, die insbesondere nach mechanischer Verletzung des Pflanzengewebes über den Lipooxygenase-Weg gebildet werden. Dabei werden Linol- und Linolensäure enzymatisch zum jeweiligen Aldehyd gespalten. Während die sensorisch höchst aktiven Aldehyde im Most noch in relevanten Mengen vorhanden sind, wird der Großteil dieser Verbindungen während der Gärung durch Alkoholdehydrogenasen zum Alkohol reduziert.<sup>24,25</sup> Aus den C<sub>6</sub>-Alkoholen, die vor allem in Form von 1-Hexanol und *trans*-3-Hexenol im Wein vorkommen, können aromaaktive Ester gebildet werden, vor allen Dingen Hexylacetat und 3-Hexenylacetat.<sup>20</sup>

Der Abbau im Most vorliegender Vorläufer von Hydroxycimtsäuren wie der Ferulasäure oder der p-Cumarsäure durch Decarboxylierung führt zur Bildung der flüchtigen Phenole 4-Vinylguaiacol (im Fall der Ferulasäure) und 4-Vinylphenol (für den Abbau von p-Cumarsäure).<sup>26</sup> Die weitere Reduktion zu 4-Ethylguaiacol bzw. 4-Ethylphenol erfolgt überwiegend nicht durch Hefen, sondern durch andere während der Gärung anwesende



Mikroorganismen wie *Brettanomyces*.<sup>27</sup> Während 4-Vinylphenol und 4-Ethylphenol vorwiegend negative Aromaeindrücke nach Pferdeschweiß und Heftpflaster im Wein bewirken, werden 4-Vinylguaiacol und 4-Ethylguaiacol mit einem rauchigen, würzigen, nelkenartigen Eindruck in Verbindung gebracht.<sup>28</sup> Dabei hängt der Gehalt der resultierenden Phenole im Wein in erster Linie von der genetischen Disposition der Hefe ab. So konnte gezeigt werden, dass sich der Gehalt an Vinylphenol – bei gleicher Ausgangskonzentration an Hydroxyzimtsäure als Substrat – durch die Verwendung unterschiedlicher Hefestämme um das Zehnfache unterscheiden kann.<sup>29</sup>

Acetatester wie Ethylacetat, Isoamylacetat oder 2-Phenylethylacetat werden von der Hefe insbesondere aus Acetyl-CoA und den entsprechenden Alkoholen (Ethanol, Isoamylalkohol, 2-Phenylethanol) durch Alkoholacetyltransferasen gebildet. Die Bildung der Ester kann dabei – abgesehen von der Expression des verantwortlichen Gens ATF1 durch die eingesetzten Hefen – durch hohe Temperaturen und Anwesenheit von gesättigten Fettsäuren und Sauerstoff beeinflusst werden.<sup>20</sup>

Die Gehalte der Ethylester gesättigter Fettsäuren wie Ethylhexanoat oder Ethyloctanoat hängen dagegen zunächst von der Bildung der gesättigten mittelkettigen Fettsäuren durch die Hefe ab, die durch niedrigere Gärtemperaturen und die Verfügbarkeit von Nährstoffen, aber auch den eingesetzten Hefestamm beeinflusst werden kann.<sup>25</sup> Während der Weinlagerung stellt sich im Laufe der Zeit ein thermodynamisches Gleichgewicht ein, das für den jeweiligen Ester spezifisch ist und durch die säurekatalysierten konkurrierenden, gleichzeitig ablaufenden Reaktionen der Esterspaltung und -kondensation erreicht wird.<sup>30</sup> Dabei wird durch Veränderungen in Temperatur und Säuregehalt des Weins zwar auch die Lage des Gleichgewichts beeinflusst, aber hauptsächlich die Geschwindigkeit, mit der sich dieses einstellt. Für die aliphatischen Ethylester befindet sich das thermodynamische Gleichgewicht in der Nähe der Konzentration, die im Wein nach der Gärung vorhanden ist, daher ändert sich im Laufe der Weinlagerung der Gehalt der Ethylester nur wenig. Da die post-fermentative Konzentration der Acetatester deutlich über dem Gleichgewicht liegt, ist hier eine Abnahme zu erwarten, die durch höhere Lagertemperaturen und einen niedrigeren pH-Wert deutlich beschleunigt wird.<sup>20</sup>

Neben der Abnahme der Acetatester lassen sich während der Lagerung noch weitere Veränderungen in der Zusammensetzung und der Aromatik der Weine, und somit des Tertiäraromas feststellen. Zum Einen nehmen die Gehalte an Bernsteinsäuremono- und -diethylestern einiger Dicarbonsäuren wie Glutar- und Äpfelsäure zu, zum Anderen entstehen Produkte aus dem Abbau von Kohlenhydraten und Carotinoiden sowie säurekatalysierte Reaktionen von Monoterpenen.<sup>31</sup>

Als Verbindungen, die aus dem Kohlenhydratabbau stammen, sind vor allem Sotolon (3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon), 2-Furfural, Furan-2-carbonsäureethylester und 5-Hydroxymethyl-2-furfural zu nennen. Sie stammen aus säurekatalysierten

Dehydratisierungsreaktionen von im Wein vorhandenen Restzucker und besitzen karamell-artige Noten, die für gealterten Wein typisch sind, aber auch in Eiswein gefunden werden können.<sup>16,32</sup>

Zu den Monoterpenen, die sowohl in Trauben, als auch in Wein vorkommen, zählen unter anderem *cis*-Rosenoxid, Linalool, Geraniol,  $\alpha$ -Terpineol, Nerol, Linalooloxide in ihrer Pyran- und Furanform, und polyhydroxylierte Formen, die während der Weinlagerung zu potenten Aromastoffen zerfallen können, z.B. Diendiol.<sup>6,33</sup> Monoterpene werden wie alle Terpenoide wie z.B. Sesquiterpene und Carotinoide aus einzelnen Einheiten von Isopren (2-Methyl-1,3-butadien) gebildet (vgl. Abbildung 2). Die Synthese von Terpenoiden erfolgt ausgehend von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP). Deren Bildung verläuft sowohl über den 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat/Methylerythritol-4-phosphat-Weg (DOXP/MEP-Weg) als auch über den klassischen Mevalonsäureweg (MVA-Weg).<sup>4</sup>

Die Synthese über den MVA-Weg findet im Cytosol statt, indem in einem ersten Schritt zwei Moleküle Acetyl-CoA zum  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl-glutaryl-CoA reagieren, katalysiert durch Acetoacetyl-CoA Thiolase. Durch eine enzymatische Reaktion unter Anwesenheit von NADPH/H<sup>+</sup> und Wasser wird Mevalonsäure (MVA) gebildet. Nach der anschließenden Phosphorylierung mit zwei Einheiten ATP entsteht nach Decarboxylierung und Dehydratisierung IPP. Dieses isomerisiert unter Anwesenheit einer Isomerase zu  $\gamma,\gamma$ -dimethylallyldiphosphat. Aus der Reaktion von IDP mit DMAPP entsteht Geranylpyrophosphat (GPP), der direkte Vorläufer der Monoterpene. Aus diesem kann durch weitere Anlagerungen von DMAPP die Kette verlängert werden, was zu Farnesyldiphosphat (C<sub>15</sub>-Körper), Geranylgeranyldiphosphat (C<sub>20</sub>-Körper), Squalen (C<sub>30</sub>-Körper) und schließlich zu Phytoen (C<sub>40</sub>-Körper) führt.<sup>34</sup> Der DOXP/MEP-Weg läuft dagegen in den Plastiden der Pflanze ab. Hier wird unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> bei Anwesenheit der DOXP-Synthase 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat gebildet. Eine DOXP-Reduktoisomerase (DXR) katalysiert die Reaktion aus DOXP zu 2-Methylerythritol-4-phosphat (MEP) unter Verwendung von NADPH und Anwesenheit von Mn<sup>2+</sup>.<sup>35</sup> Weitere Syntheseschritte führen schließlich zur Bildung von IPP und DMAPP.<sup>4</sup>

Aus GDP können bei Anwesenheit verschiedener Terpensynthasen entweder acyclische Monoterpene synthetisiert werden, wie Linalool durch die Linalool/Nerolidolsynthase, cyclische Monoterpene wie  $\alpha$ -Terpineol (durch die  $\alpha$ -Terpineolsynthase) oder weitere Terpene wie Geraniol oder Nerol.<sup>36</sup> Diese werden durch Isomerisierung und Umlagerungen von GDP zu Nerylpyrophosphat (NPP) bzw. Linalylpyrophosphat (LPP) gebildet.<sup>37</sup>



strukturell wohl vielfältigste Naturstoffgruppe im Weinaroma.<sup>4</sup> Zu den für Weißwein wichtigsten C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden zählen  $\beta$ -Damascenon,  $\beta$ -Ionon, Rieslingacetal, die isomeren Vitispirane – im Folgenden als Vitispiran bezeichnet – und TDN, wobei die letzten drei Verbindungen in relevanten Mengen nur in Riesling und Rebsorten vorkommen, die mit Riesling gekreuzt wurden.<sup>16,41</sup>

Das einzigartige Bukett von Rieslingweinen umfasst damit bereits im Traubensaft vorhandene primäre Aromastoffe wie Terpene und Hexanol, Fermentationsaromen wie Alkohole, Ester, flüchtige Phenole und Schwefelkomponenten, sowie Abbauprodukte von Carotinoiden, die vor allem während der Lagerung freigesetzt werden (vgl. Abbildung 3).

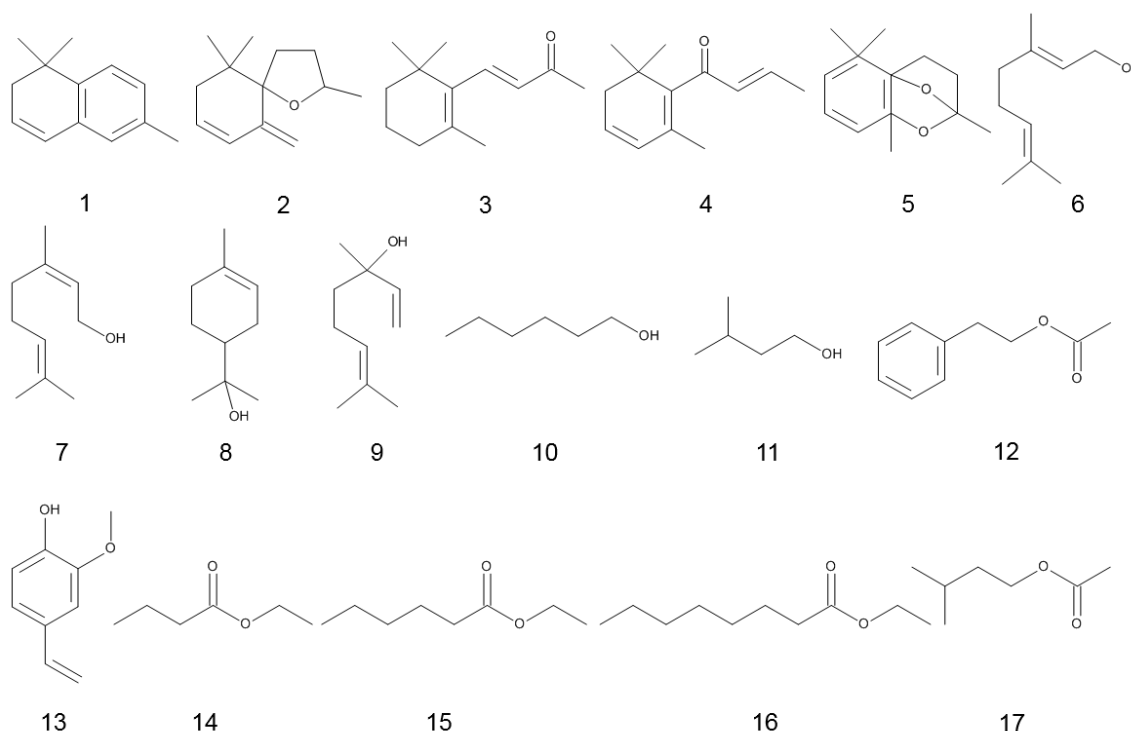


Abbildung 3: Strukturen verschiedener Aromastoffe des Rieslings: **1** TDN, **2** Vitispiran, **3**  $\beta$ -Ionon, **4**  $\beta$ -Damascenon, **5** Rieslingacetal, **6** Geraniol, **7** Nerol, **8**  $\alpha$ -Terpineol, **9** Linalool, **10** n-Hexanol, **11** Isoamylalkohol, **12** Phenylethylacetat, **13** Vinylguaiaicol, **14** Ethylbutanoat, **15** Ethylhexanoat, **16** Ethyloctanoat, **17** Isoamylacetat

Eine Eigenart des Rieslings ist die außergewöhnliche Suszeptibilität gegenüber der Lage, des Mikroklimas im Weinberg und der Bodenbeschaffenheit, insgesamt auch als Terroir bezeichnet. Dadurch sind je nach Intention des Kellermeisters verschiedenste Weinstilistiken innerhalb eines Anbaugebiets und Jahrgangs möglich. So werden Rieslinge, die auf Basaltböden angebaut werden, mit Citrus- und Passionsfruchtnoten und rauchigen Deskriptoren assoziiert, während Roter Sandstein zu Rieslingen mit zusätzlichen Attributen Honig/Karamell, Rhabarber beschrieben wird. Der Anbau auf Sandstein bringt Rieslinge mit ausgeprägter Mineralität hervor, Schieferböden dagegen sorgen für eine ausgeprägte Säure und starke Zitrusnoten.<sup>42</sup> Des Weiteren gehört Riesling zu den Rebsorten, die für ihre

Stresstoleranz gegenüber Umweltbedingungen bekannt sind. Dazu zählen im Besonderen eine hohe Toleranz gegenüber kalten Wintern, nährstoffarmen Böden, Trockenheit, sowie gegenüber Krankheiten.<sup>43</sup> Allerdings bergen insbesondere Stickstoffmangel und Wassermangel der Reben, vor allem in Verbindung mit erhöhter Sonneneinstrahlung, das Risiko der sogenannten Petrolnote im Riesling, verstärkt durch den fortschreitenden Klimawandel.<sup>44-46</sup>

Die dafür verantwortliche Verbindung TDN wurde in Wein erstmals 1978 von Simpson mit dem Auftreten einer kerosinartigen Note assoziiert,<sup>7</sup> und kurze Zeit später wurde beim Erhitzen von Most neun verschiedener Rebsorten beobachtet, dass insbesondere Riesling anfällig für die Ausprägung der Petrolnote bei langer Lagerung ist.<sup>47</sup> Australische Rieslinge beinhalten 78% höhere Gehalte an TDN als europäische Rieslinge; bei ihnen gehört die Petrolnote zur Typizität des Rieslings.<sup>4,15</sup> Während bis vor 30 Jahren vor allem australische und südafrikanische Rieslinge mit einer Petrolnote behaftet waren,<sup>9,48</sup> wurde bereits in den 2000er Jahren vorausgesagt, dass die seit den 90er Jahren vermehrt wärmeren Jahre in Europa die Petrolnote auch in deutschen Rieslingen hervorrufen könnte.<sup>15,49</sup> Die dafür verantwortliche höhere Sonneneinstrahlung und hohe Temperaturen verursachen eine verstärkte Carotinoidsynthese in den Beeren und begünstigen ebenfalls deren Abbau zu C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden und der Bildung von TDN.

## 4.2 Glykosidisch gebundene Aromastoffe

Glykoside sind sekundäre Pflanzenstoffe, die aus einem Aglykon sowie aus einem oder mehreren daran gebundenen Zuckern bestehen. Sie sind ubiquitär in allen Pflanzen und in den meisten Pflanzenteilen vorhanden, einschließlich Wurzeln, Rinde, Samen, Blüten, Blättern und Früchten. Die meisten Aglykone sind entweder unpolar oder semi-polar; die Verknüpfung mit einem Zuckerrest dient der Pflanze zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit und der Verringerung der Reaktivität. Dadurch werden Transport, Speicherung, sowie Anreicherung von Aglykonen in der Pflanze erleichtert, die chemische Reaktivität und damit auch die Toxizität der Verbindungen reduziert.<sup>50-52</sup> Beim Aglykon kann es sich entweder um nicht-flüchtige Verbindungen wie Anthocyane und Flavonole handeln, oder um flüchtige Komponenten, die zum Weinaroma beitragen können, und die aufgrund ihres deutlich höheren Gehalts im Vergleich zu den freien Aromastoffen ein erhebliches Aromapotential darstellen.<sup>4,53</sup> Die Freisetzung dieses Potentials erfolgt entweder während der Gärung oder der Lagerung durch säure- oder enzymkatalysierte Hydrolyse. Dabei entstehen entweder direkt aromaaktive Verbindungen wie bei den meisten Monoterpenen, oder nach der Abspaltung des Zuckerrests erfolgen weitere Umlagerungen, die dann zur geruchsaktiven Verbindung führen, wie es beispielsweise beim  $\beta$ -Damascenon der Fall ist.<sup>51,54</sup>

Bei den Aglykonen gibt es im Pflanzenreich eine große Diversität hinsichtlich der verschiedenen Stoffgruppen. So sind darunter aliphatische Alkohole, Shikimisäurederivat,

C<sub>13</sub>-Norisoprenoide, Monoterpene und Sesquiterpene zu finden.<sup>55</sup> In Rieslingwein wurden 1990 knapp 90 Aglykone nachgewiesen, von denen 40 zu den Norisoprenoiden zählen, sowie 27 Monoterpene und 20 Shikimisäure-Metabolite.<sup>56</sup>

Bei den glykosidischen Resten kann es sich entweder um ein einzelnes Molekül  $\beta$ -Glucose handeln oder um verschiedene Disaccharide, vereinzelt wurden auch Trisaccharide nachgewiesen.<sup>57</sup> Im Unterscheid zu z.B. Quercetin, das auch an Glucuronsäure gebunden sein kann,<sup>58</sup> sind die flüchtigen Verbindungen hauptsächlich an  $\beta$ -D-Glucose gebunden. Bei den Diglykosiden ist die an das Aglykon gebundene  $\beta$ -D-Glucopyranose über eine glykosidische Bindung mit einer weiteren  $\beta$ -D-Glucopyranose,  $\alpha$ -L-Rhamnopyranose,  $\alpha$ -L-Arabinopyranose,  $\beta$ -D-Xylopyranose,  $\beta$ -D-Apiofuranose,  $\alpha$ -L-Arabinofuranose oder Malonsäure verknüpft (vgl. Abbildung 4). Die Benennung einiger Diglykoside erfolgt in Anlehnung an die Pflanzenfamilie, aus der sie ursprünglich isoliert wurden. Es handelt sich hierbei um Vicianoside (6-O- $\alpha$ -L-Arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside), Rutinoside (6-O- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside), Gentobioside (6-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) und Primeveroside (6-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside).<sup>51,59</sup> Je nach Rebsorte machen Apiosylglykoside (6-O- $\beta$ -D-Apiofuranosyl-glucopyranoside) bis zu 50% der Glykoside aus, gefolgt von Rutinosiden mit 6-13% und  $\beta$ -D-Glucopyranoside mit 4-9%.<sup>59</sup>

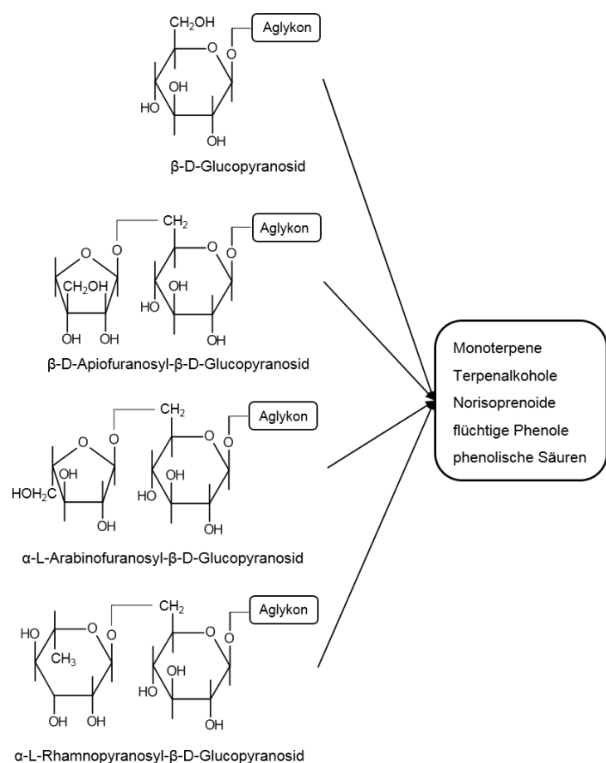


Abbildung 4: Struktur einiger Glykoside von Aromastoffen, modifiziert nach Maicas und Mateo<sup>59</sup>

Die Mechanismen, die die Biosynthese der Glykoside ermöglichen, vor allem bezüglich der Substratspezifität der Glykosyltransferasen, sind bis heute noch nicht vollständig geklärt.

Relativ sicher ist jedoch aufgrund von Untersuchungen in Modellpflanzen wie *Arabidopsis thaliana*, dass die Glykosylierungsreaktionen durch Glykosyltransferasen ablaufen, die mit Uridindiphosphat (UDP) aktivierte Glucose (UDP-Glucose) an das Aglykon transferieren. Weitere Glykosylierungsreaktionen mit weiteren UDP-aktivierten Glucose-, Rhamnose-, Galactose- oder Xylosemolekülen sind daraufhin möglich.<sup>60,61</sup> Dabei kann eine Reihe von funktionellen Gruppen den aktivierten Zuckern als Angriffsstellen dienen, darunter -NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH, -OH oder C-C. Auf Grundlage der Löslichkeit der Glykosyltransferasen wird angenommen, dass die Glykosyltransferasen im Cytosol, an der dem Cytosol zugewandten Seite von Membrankompartimenten, oder als Teil von Multienzymkomplexen lokalisiert sind.<sup>60-62</sup> Das Genom von *Vitis vinifera* besitzt Gene, die für über 240 mutmaßliche Glykosyltransferasen verantwortlich sein könnten. Allerdings wurde die tatsächliche Anzahl an codierenden Genen und an exprimierten Glykosyltransferasen bisher noch nicht bestimmt. Ebenso ist bisher wenig über die Substratspezifität von Glykosyltransferasen in Pflanzen bekannt.<sup>51</sup>

Durch die Bildung der Aglykone während der Vegetationsperiode nimmt auch die Konzentration an glykosidisch gebundenen Verbindungen während des Reifeverlaufs immer mehr zu, besonders nach dem Zeitpunkt der Véraison. Dies betrifft vor allem Monoterpene, C<sub>13</sub>-Norisoprenoide und Benzenoide, da hier durch die Pflanze zur Detoxifikation Glykosylierungen der lipophilen Verbindungen durchgeführt werden, um einer Schädigung der Zellmembranen durch eine zu hohe Konzentration an reaktiven Verbindungen vorzubeugen.<sup>63-66</sup> Durch Einflussfaktoren, die für die Bildung der Aglykone verantwortlich sind, wird die Bildung der entsprechenden glykosidischen Verbindungen stimuliert. So konnte gezeigt werden, dass durch Entblätterungsmaßnahmen die Gehalte an glykosidisch gebundenen Monoterpenen und C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden signifikant steigen.<sup>67,68</sup>

Die Spaltung der Glykoside und damit die Freisetzung der Aglykone kann grundsätzlich durch zwei verschiedene Mechanismen induziert werden. Die Spaltung kann durch säurekatalysierte Hydrolyse während der Weinbereitung und Weinlagerung erfolgen, die allerdings unter den normalen Bedingungen der Weinbereitung und Lagerung nur sehr langsam fortschreitet; bei einigen Aromastoffen wie Geraniol oder Linalool ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse kleiner als die der Abbaureaktionen, sodass während der Lagerung keine Akkumulation der Aglykone im Wein erfolgt, sondern hier sogar eine Abnahme festgestellt wurde. Auf der anderen Seite existieren auch Verbindungen wie *cis*-Roseoxid oder TDN, die sich als sehr stabil erwiesen haben, und sich deshalb deren Konzentration mit fortschreitender Hydrolyse stetig erhöht, solange ausreichende Mengen an glykosidischen Prekursoren vorhanden sind.<sup>20</sup>

Abhängig von der Struktur des Aglykons wird dabei entweder die Etherbindung (C-O-Bindung auf der Seite des Aglykons) oder die glykosidische Bindung (C-O-Bindung auf der Zuckerseite) gespalten. Nach der Spaltung laufen in den meisten Fällen weitere säurekatalysierte Umlagerungen ab, deren Geschwindigkeit sich mit niedrigerem pH-Wert und höherer



Temperatur erhöht.<sup>59</sup> Die deutliche Beschleunigung durch die Erhöhung der Temperatur oder die Verwendung extremer pH-Werte (um 1) kann genutzt werden, um die zu erwarteten Veränderungen während der Weinlagerung abzubilden. Durch die veränderten Bedingungen läuft die Reaktion deutlich schneller ab, die Verteilung der resultierenden Aromastoffe ändert sich aber nur geringfügig gegenüber der Verteilung, die sich aus der Spaltung während Fermentation und Lagerung ergibt; gerade während der Fermentation finden jedoch nicht nur säure-, sondern auch enzym-katalysierte Spaltungsreaktionen statt.<sup>69</sup>

Die Freisetzung durch Enzyme, die allgemein als Glucosidasen bezeichnet werden, kann entweder in einem einzelnen oder in mehreren Schritten erfolgen. Monoglykoside oder Disaccharide, die aus zwei Glucoseeinheiten bestehen, können durch eine einfache  $\beta$ -Glucosidase gespalten werden, die Spaltung von Disacchariden mit einem anderen terminalen Zuckerrest erfordern dagegen zunächst den Einsatz von spezifischen Enzymen, meist Exoglucosidasen wie  $\alpha$ -L-Arabinosidase,  $\beta$ -D-Apiosidase oder  $\alpha$ -L-Rhamnosidase, um die glykosidische Bindung zwischen den beiden Zuckern zu spalten.<sup>59</sup> Es existieren allerdings auch Disaccharidasen, die in der Lage sind, mehrere Zuckerreste in einem einzigen Schritt abzuspalten.<sup>70</sup> Weinbeeren enthalten endogene Glucosidasen – von denen  $\beta$ -Glucosidase die häufigste ist –, die allerdings beim nativen pH-Wert von Traubenmost kaum aktiv sind, da sie zusätzlich durch den hohen Zuckergehalt inhibiert werden.<sup>71</sup> Hefen und Bakterien dagegen besitzen Glucosidasen, die auch während der Fermentation aktiv sind; zusätzlich werden zur forcierten Freisetzung von Aromastoffen kommerzielle Enzympräparate eingesetzt, die exogene Glucosidase verwenden, die beispielsweise aus *Aspergillus niger* gewonnen werden. Die Enzyme aus solchen Präparaten haben meist eine höhere Toleranz gegenüber dem pH-Wert, der Temperatur und der Glucose- und Alkoholkonzentration. Wie beim Einsatz verschiedener Stämme von Hefen und Bakterien während der Gärung und der malolaktischen Fermentation (MLF) variiert die Spezifität der Enzympräparate gegenüber bestimmten Glykosiden, sodass es zu einer beabsichtigten oder unbeabsichtigten Verschiebung des Aromaprofils des resultierenden Weins kommen kann.<sup>20</sup>

### 4.3 Carotinoide

#### 4.3.1 Vorkommen, Biosynthese und Funktionen

Carotinoide nehmen aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften und Funktionen eine besondere Stellung unter den in der Natur vorkommenden Pigmenten ein. Sie sind essentiell für die Photosynthese und das Überleben in einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre. Einige der Carotinoide zeigen eine ernährungsphysiologisch wichtige Provitamin A-Aktivität oder weisen medizinisch relevante Eigenschaften auf, beispielsweise die Vorbeugung einiger Erkrankungen wie der Atherosklerose, Macula-Degeneration oder kardiovaskulären Erkrankungen.<sup>72,73</sup> Außerdem werden Carotinoide aufgrund ihrer Fähigkeiten, reaktiven Singulett-Sauerstoff zu deaktivieren und sich nach oraler Applikation verstärkt in der Haut



abzulagern, in der Behandlung von erythropoetischer Protoporphyrinose eingesetzt.<sup>74,75</sup> Des Weiteren dienen sie als nicht-toxische Farbstoffe für Lebensmittel, Futtermittel und Kosmetika.<sup>76</sup>

Gegenwärtig sind über 750 verschiedene Carotinoide bekannt, deren Anzahl ständig steigt, und von denen ungefähr 60 in Obst und Gemüse vorkommen, das von Menschen verzehrt wird.<sup>77,78</sup> In Humanserum konnten 34 verschiedene Carotinoide nachgewiesen werden, bei denen es sich vor allem um  $\beta$ -Carotin, Lycopin, Lutein, Zeaxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin und deren Isomere und Metabolite handelt.<sup>79</sup> Carotinoide dienen in Pflanzen auch als Vorläufermoleküle für Signal- und Lockstoffe. Das Hormon Abscisinsäure reguliert das Pflanzenwachstum und wird aus 9-*cis*-Violaxanthin gebildet,<sup>80</sup> und Strigolacton, das die Sprossbildung in Pflanzen reguliert, entsteht aus  $\beta$ -Carotin.<sup>81</sup> Das sich über den Großteil des Moleküls erstreckende  $\pi$ -Elektronensystem von Carotinoiden dient Bakterien und Pflanzen als Radikalfänger bei der Photosynthese. Zudem bewirken die Carotinoide im photosynthetischen Komplex durch ihre Fähigkeit zur Lichtabsorption einen erhöhten Wirkungsgrad.<sup>82,83</sup>

Carotinoide sind Polyenkohlenwasserstoffe, die aus acht Isopreneinheiten ( $C_5$ ) bestehen und damit zu den Tetraterpenen gehören. Die Biosynthese erfolgt durch Kondensation der  $C_5$ -Vorläufermoleküle Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) zu Geranylpyrophosphat. Die Anlagerung weiterer Isopreneinheiten unter Anwesenheit der Geranylgeranylpyrophosphatsynthase (GGPS) führt zunächst zu Farnesylpyrophosphat und anschließend zum Diterpen Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Das  $C_{40}$ -Grundgerüst von Carotinoiden wird durch eine Kopf-Kopf-Kopplung von zwei Molekülen GGPP durch die Phytoensynthase aufgebaut (vgl. Abbildung 5). Der Aufbau des konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems der Carotinoide erfolgt durch schrittweise Desaturierung von Phytoen zu  $\zeta$ -Carotin und von  $\zeta$ -Carotin zu tetra-*cis*-Lycopin durch die Enzyme Phytoen-Desaturase und  $\zeta$ -Carotin-Desaturase. In Pflanzen schließt die stufenweise Desaturierung mehrere *cis/trans*-Isomerisierungen mit ein, während sie in Prokaryoten ausschließlich über *trans*-Isomere erfolgt.<sup>84</sup> Nach der Dehydrogenisierungsreaktion, die unter Einwirkung der Carotinoidisomerase zu all-*trans*-Lycopin führt, teilt sich der Syntheseweg, sodass unterschiedliche zyklische Endgruppen entstehen. Die Bildung von Iononringen am Lycopin wird durch Lycopinzyklasen katalysiert, es entstehen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin.<sup>78</sup> Diese zyklischen Gruppen können um sauerstoffhaltige Gruppen erweitert sein: Wird  $\beta$ -Carotin durch die  $\beta$ -Ring Carotinhydroxylase hydroxyliert, entsteht zum Beispiel Zeaxanthin. Nach der Umwandlung durch das Enzym Zeaxanthinepoxidase zu all-*trans*-Violaxanthin kann es zu einer Isomerisierung zu 9-*cis*-Violaxanthin oder einer Epoxidierung zu all-*trans*-Neoxanthin kommen. Aus beiden Verbindungen kann 9'-*cis*-Neoxanthin gebildet werden, das durch eine 9-*cis*-Epoxycarotinoiddioxygenase (NCED) in *cis*-Xanthoxin umgewandelt wird, aus dem in zwei weiteren Oxidationsschritten Abscisinsäure entsteht.<sup>85</sup>



Abbildung 5: Vereinfachtes Schema der Enzyme und Hauptprodukte in der Carotinoidbiosynthese, modifiziert nach Just et al.<sup>86</sup>

Die Stoffgruppe der Carotinoide wird aufgrund der möglichen Implementierung funktioneller Gruppen daher in zwei Klassen unterteilt. Dabei handelt es sich um die Carotine, die ausschließlich aus Kohlenwasserstoffen bestehen, und zu denen unter anderem das β-Carotin und das Lycopin gehören. Die andere Hauptgruppe bilden die Xanthophylle, die mindestens eine sauerstoffhaltige funktionelle Gruppe beinhalten. Bei diesen funktionellen Gruppen handelt es sich um Alkohol-, Keto-, Aldehyd-, Epoxy-, Ether- oder Methoxygruppen. Bekannte Vertreter der Hydroxycarotinoide sind Lutein und Zeaxanthin, zu den Epoxycarotinoiden zählen Violaxanthin, Neoxanthin und Fucoxanthin. Astaraxanthin und Canthaxanthin besitzen Ketogruppen, und Methoxygruppen sind im Spirilloxanthin zu finden. Neben diesen funktionellen Gruppen treten einige Hydroxycarotinoide auch in Veresterung mit Fettsäuren auf.<sup>87</sup>

Carotine treten vor allem in Obst und Gemüse auf und nehmen als Bestandteile der nicht-grünen Pflanzenteile die Funktion von optischen Signalstoffen für Tiere ein, welche die Pollen und Samen der jeweiligen Pflanzen verbreiten sollen.<sup>88</sup> Für tierische Organismen stellen die Carotinoide, insbesondere β-Carotin, α-Carotin und β-Cryptoxanthin als Vitamin A-Vorläufer essentielle Nahrungsbestandteile dar, da z.B. das Chromophor des Rhodopsins im menschlichen Auge, das Retinal, aus der Spaltung der zentralen Doppelbindung des

$\beta$ -Carotins entsteht.<sup>88</sup> Häufig in der Nahrung kommen Lycopin und  $\zeta$ -Carotin vor, wobei  $\zeta$ -Carotin nur in geringen Mengen, dafür ubiquitär vorhanden ist, die höchsten Gehalte an Lycopin dagegen finden sich vor allem in roten Obst- und Gemüsesorten wie Tomaten, Guaven oder Wassermelonen.<sup>89</sup> Am weitesten in Lebensmitteln verbreitet ist das  $\beta$ -Carotin, das in den meisten Obst- und Gemüseprodukten als Minorkomponente und vor allem in Karotten, Kohl und Spinat als Majorkomponente vorkommt. Lutein bewirkt eine gelbliche Färbung und kommt überwiegend in Blättern und grünem Gemüse vor.<sup>90</sup> Carotinoide spielen eine essentielle Rolle bei der Photosynthese und sind daher in weit höheren Mengen in den Blättern von Pflanzen enthalten, als es in anderen Pflanzenteilen der Fall ist.<sup>91</sup>

Die Photosynthese selbst lässt sich in zwei Abschnitte einteilen: In die sogenannte Lichtreaktion, die in den Chloroplasten abläuft und der Umwandlung von Sonnenenergie in chemische Energie in Form von ATP und NADPH dient, und in die Dunkelreaktion, die im Stroma der Zellen stattfindet und die in der Lichtreaktion gewonnene Energie nutzt, um aus  $\text{CO}_2$  Energiespeicher in Form von Kohlenhydraten zu gewinnen. Die Carotinoide sind als Bestandteile der inneren Chloroplastenmembran, des Thylakoids, in die Lichtreaktion involviert, die sequenziell in zwei Chlorophyll-Protein-Komplexen abläuft. Diese Komplexe bestehen jeweils aus zwei Einheiten, dem Reaktionszentrum und den Antennenkomplexen, die für die Katalyse der photochemischen Reaktion verantwortlich sind, und in denen viel Chlorophyll wie auch Carotinoide gebunden sind.

Einige Carotinoide, in Pflanzen vor allem  $\beta$ -Carotin, befinden sich zwar auch direkt im Reaktionszentrum des Komplexes, der Großteil, insbesondere Xanthophylle, sind aber in den lichtsammelnden Antennenkomplexen lokalisiert. Mit wenigen Ausnahmen enthalten die Chloroplasten und die grünen Pflanzenteile höherer Pflanzen dieselben Carotinoide in ähnlichen Anteilen: 40-45% Lutein, 20-25%  $\beta$ -Carotin, 10-15% Violaxanthin und 10-15% Neoxanthin.<sup>92</sup> Ebenfalls sind noch weitere Carotinoide als Minorkomponenten enthalten, v.a. Zeaxanthin,  $\alpha$ -Carotin, Lutein-5,6-epoxid und Antheraxanthin.<sup>93</sup> Das Verhältnis von Carotinoiden zu Chlorophyll in den Pigment-Protein-Komplexen beträgt zumeist 1 zu 3-4.<sup>92</sup>

Das Einfangen der Lichtenergie ist nicht die einzige Aufgabe, die die Carotinoide innerhalb des Photosynthese-Apparats der Pflanzen ausüben – sie spielen auch eine wichtige Rolle bei der Photoprotektion, also der Vermeidung lichtinduzierter Schäden. Die Gewinnung der Lichtenergie in den Antennenkomplexen gelingt bereits bei relativ niedriger Lichtintensität, bei einer hohen Sonneneinstrahlung wird mehr Lichtenergie absorbiert als für die Photosynthese verwendet werden kann. Das kann sowohl zum Verlust photosynthetischer Effizienz als auch zur Bildung von reaktivem Singulett Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) führen. Carotinoide spielen eine Schlüsselrolle im Quenchen der überschüssigen Energie und damit in der Vermeidung der Bildung von Singulett-Sauerstoff. Im Gegensatz zum angeregten Chlorophyll ( $^3\text{Chl}$ ), das beim Abfallen auf das Grundniveau Singulett-Sauerstoff erzeugen kann, ist das Energieniveau angeregter Carotinoidmoleküle ( $^3\text{Car}$ ) nicht hoch genug für diese Reaktion; die freiwerdende Energie beim Abfallen in den Grundzustand wird in Form von Wärme abgegeben

(vgl. Abbildung 6). In den Komplexen sorgen die Carotinoide somit durch die Absorption der Energie sowohl von angeregten Chlorophyllmolekülen wie auch von Singulett-Sauerstoff für den Schutz der Proteine, Lipide und Pigmente der Membran vor oxidativer Schädigung.<sup>92</sup>

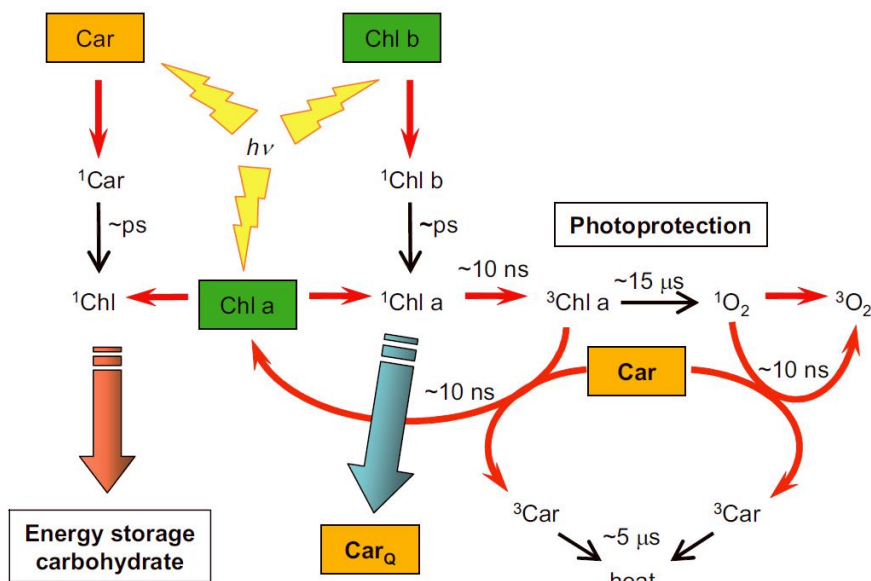


Abbildung 6: Schutzmechanismus der Carotinoide im photosynthetischen System nach Britton et al.<sup>92</sup>

Daneben fungieren Carotinoide auch als nicht-photochemische Quencher ( $Car_Q$ ), die vor allem für den Erhalt der Antennenproteine des PSII von essentieller Bedeutung sind. Dieser Prozess wird unter anderem durch den Xanthophyllzyklus bewerkstelligt, der in allen höheren Pflanzen zu finden ist, und dessen Eigenschaften und Funktionen bereits in den 1960ern und 70ern erstmals beschrieben wurden.<sup>94,95</sup>

Die Induktion der zweistufigen, lichtabhängigen De-Epoxygenierung von Violaxanthin in Zeaxanthin mit Antheraxanthin als Intermediat wird durch pH-Unterschiede im Zelllumen induziert, die durch das in der Thylakoidmembran befindliche PsbS Protein registriert werden.<sup>96-98</sup> Zeaxanthin fungiert als Akzeptor für die überschüssige Energie des angeregten Chlorophyll im Antennenpigment von Photosystem II, und wird als Rückreaktion bei wenig Licht oder im Dunkeln wieder in Violaxanthin umgewandelt.<sup>99</sup> Diese Reaktion wird durch die Zeaxanthinepoxidase unter Verbrauch von NADPH und reduziertem Ferredoxin katalysiert, und kann bei günstigen Bedingungen den Violaxanthinpool innerhalb von 20-40 Minuten wieder auffüllen (vgl. Abbildung 7). Die Umwandlung von Violaxanthin in Antheraxanthin und weiter in Zeaxanthin kann innerhalb von 15-30 Minuten erfolgen, und wird unter Oxidation von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure (DHA) durch die Violaxanthindeepoxidase katalysiert. Diese wird durch einen niedrigen pH-Wert des Lumen aktiviert, der eine hohe photochemische Aktivität indiziert.<sup>100</sup> Neben der Induzierung der Violaxanthinepoxidierung bei hoher Lichteinstrahlung scheinen sich Pflanzen sowohl an die täglichen wie auch langfristigen Lichtverhältnisse zu adaptieren, indem der Gesamtpool der zur Verfügung stehenden Xanthophylle mit zunehmender Lichtintensität erhöht wird.<sup>101,102</sup>

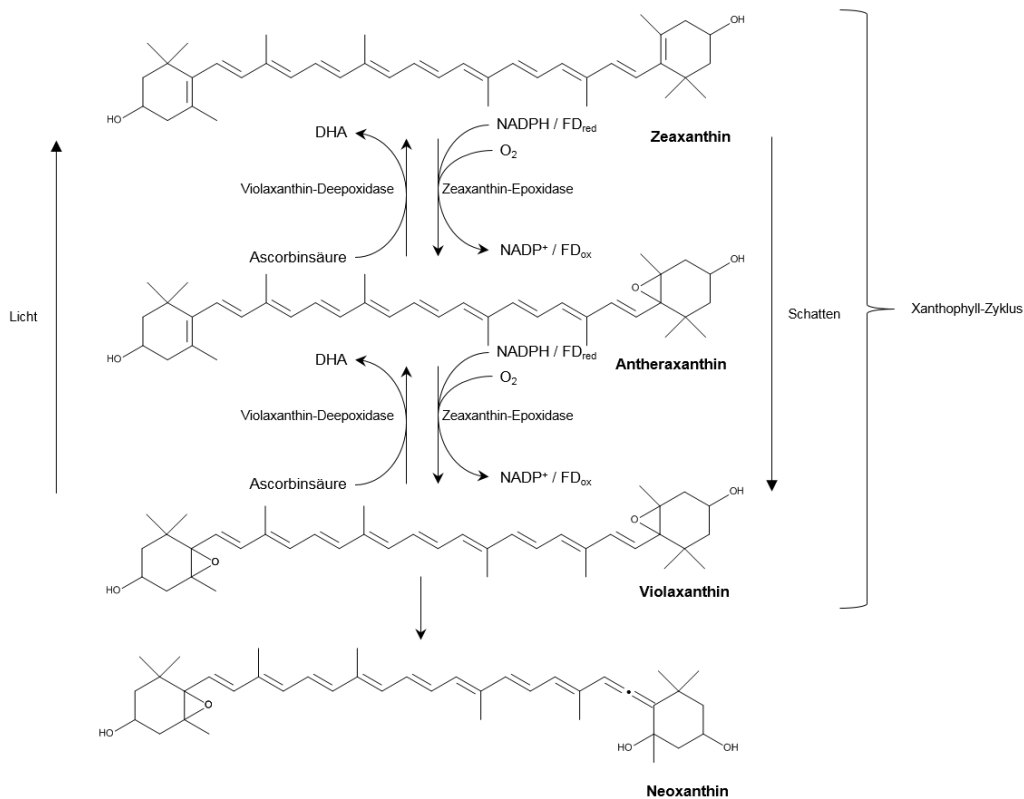


Abbildung 7: Xanthophyllzyklus und Umwandlung von Violaxanthin in Neoxanthin, modifiziert nach Baumes et al.<sup>91</sup>

#### 4.3.2 Abbau

Der Abbau von Carotinoiden kann durch nicht-spezifische Mechanismen wie der (photo)chemischen Oxidation oder der Oxidation durch nicht-spezifische Enzyme wie Lipoxygenasen und Peroxidasen ablaufen. Auf der anderen Seite stehen regiospezifisch wirkende Enzyme wie die  $\beta$ -Carotinoxygenase, die bei Tieren  $\beta$ -Carotin in zwei Moleküle Retinal spaltet.<sup>103</sup> In Pflanzen wirken vor allem Enzyme, die eine asymmetrische Spaltung der Carotinoide verursachen. So konnte 1997 ein Gen in Mais identifiziert werden (*vp14*), welches eine Dioxygenase codiert, die die Substrate 9-*cis*-Neoxanthin und 9-*cis*-Violaxanthin an der 11,12-Doppelbindung zu einem Molekül Xanthoxin und einem Molekül eines C<sub>25</sub>-Dialdehyds spaltet. In den darauffolgenden Jahren wurde eine Reihe homologer Dioxygenasen identifiziert, die – wie die von *vp14* codierte Dioxygenase – neben der 9-*cis*-Doppelbindung von Epoxycarotinoiden spalten, sie werden deshalb als NCEDs bezeichnet.<sup>104</sup>

Carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs) stellen die dritte Gruppe von Enzymen dar, die am Carotinoidabbau beteiligt sind. Von den NCEDs unterscheiden sie sich durch ein breiteres Spektrum an Substraten, wobei die Regiospezifität weiterhin sehr hoch ist,<sup>104</sup> die Schnittposition aber in manchen Fällen von denen der NCEDs abweicht. So wurde vermutet, dass das in *Arabidopsis thaliana* identifizierte Enzym AtCCD1 Carotinoide, Apocarotinoide und Xanthophylle symmetrisch an den 9,10- und 9',10'-Doppelbindungen spaltet. So konnte die

Bildung des C<sub>13</sub>-Norisoprenoids  $\beta$ -Ionon mit dem Transkriptionsniveau von CCD1-Genen korreliert werden.<sup>105</sup> Neuere Untersuchungen legen aber die Vermutung nahe, dass CCD1 aufgrund seiner Lokalisierung im Cytosol weniger für die Spaltung der C<sub>40</sub>-Carotinoide zuständig ist, sondern diese vielmehr bereits vor dem Eingreifen von CCD1 in ein C<sub>27</sub>-Apocarotinoid gespalten werden, und CCD1 dieses dann nach dem Transport in das Cytosol in ein weiteres C<sub>13</sub>-Norisoprenoid und in ein C<sub>14</sub>-Norisoprenoid trennt. Es wird vermutet, dass die initiale Spaltung der Carotinoide durch ein Enzym der CCD7 Familie in den Plastiden stattfindet.<sup>81</sup>

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* wurden weitere CCD codierende Gene gefunden, nach denen weitere Gruppen von CCDs benannt wurden: AtCCD4, AtCCD7 und AtCCD8.<sup>106,107</sup> Die CCD4-Enzyme besitzen wie CCD1-Enzyme eine 9,10/9',10'-Schnittaktivität, weisen jedoch keine Substratuniversalität auf.<sup>107</sup> Die Enzyme der CCD7- und CCD8-Familie sind außerdem an der Synthese von Strigolacton beteiligt, das unter anderem die Sprossverzweigung reguliert.<sup>108</sup>

Die gleichen Enzyme wurden auch in *Vitis vinifera* gefunden (vgl. Abbildung 8), demzufolge spielen auch dieselben Enzymfamilien bei der Umwandlung und dem Abbau von Carotinoiden in den Blättern und Beeren der Weinrebe eine Schlüsselrolle: Hier sind zum Einen die Enzyme des Xanthophyllzyklus zu nennen, Enzyme für die Biosynthese der Pflanzenhormone Abscisinsäure und Strigolacton, sowie Enzyme, aus deren Aktivität flüchtige Verbindungen wie die C<sub>13</sub>-Norisoprenoide hervorgehen.<sup>109</sup>

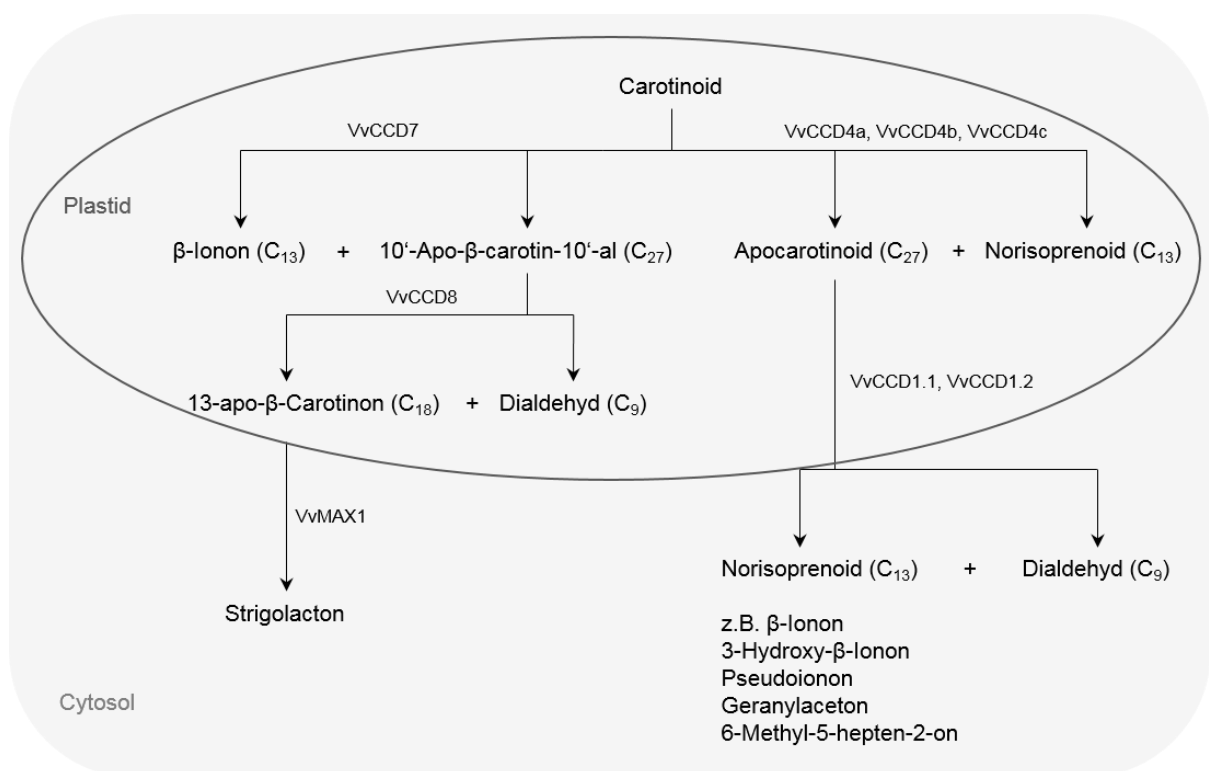


Abbildung 8: Abbau von Carotinoiden durch Carotenoid Cleavage Dioxygenases (CCDs) in *Vitis vinifera*, modifiziert nach Walter et al.<sup>108</sup> und Young et al.<sup>109</sup>



Die Aktivitäten der Enzyme sowohl für die Synthese als auch den Abbau der Carotinoide können durch äußere Faktoren wie jahreszeitliche Schwankungen beeinflusst werden. So steigt die Aktivität von CCD4b während der Wachstumsphase der Beeren um das 200-300-fache an, während bei CCD4a die Veränderung nur um das 13-fache steigt.<sup>109</sup> Die Aktivität von CCD1 beginnt dagegen kurz vor der Véraison um das Zwei- bis Vierfache zu steigen, und bleibt bis zur Ernte konstant.<sup>110</sup> Gleichzeitig ist die Aktivität stark von der Rebsorte abhängig, so wurde bei der Rebsorte Muskat Alexandria eine deutlich höhere Aktivität von CCD1 festgestellt, als es bei der Rebsorte Shiraz der Fall war.<sup>110</sup> Mit der Aktivitätssteigerung der Enzyme, die in den Carotinoidabbau involviert sind, sinkt im Reifeverlauf der Gehalt an Carotinoiden parallel mit dem Abbau von Chlorophyll stark ab.<sup>111</sup>

Nicht zu vernachlässigen ist auch der Einfluss weiterer extrinsischer Faktoren auf die Enzymaktivität bzw. den Carotinoidabbau. So kann Wasserstress zu einer erhöhten Bildung von Abscisinsäure führen, einhergehend mit einer erhöhten Aktivität der für die Bildung verantwortlichen Enzyme.<sup>85</sup> Beeren, die sich an höhere Lichtverhältnisse adaptiert haben, besitzen einen höheren Pool an Xanthophyllen, der allerdings bei geänderten Witterungsbedingungen, etwa bei längeren Regenperioden, wieder kleiner werden kann.<sup>112,113</sup> Ebenso ist in wärmeren Regionen ein erhöhter Gesamtgehalt an Carotinoiden festgestellt worden, vor allem in Reben, die nicht oder nur wenig beschattet wurden. Der erhöhten Biosynthese bei starker Lichteinstrahlung und einer höheren Carotinoidkonzentration steht allerdings ein verstärkter Abbau aufgrund photooxidativer und enzymatischer Spaltung der Carotinoide gegenüber.<sup>114</sup> Das wiederum führt zu einer insgesamt höheren Konzentration an Carotinoidabbauprodukten – wie etwa den C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden – in Beeren, die verstärkter Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind.<sup>115</sup>

#### 4.4 C<sub>13</sub>-Norisoprenoide

Unter den aus dem Carotinoidabbau stammenden Norisoprenoiden sind einige hochpotente Aromaverbindungen zu finden. Dazu zählen beispielsweise das  $\beta$ -Ionon, das ursprünglich in Rosen entdeckt wurde und eine Geruchsschwelle von 90 ng/L besitzt,<sup>116</sup> und  $\beta$ -Damascenon, das ebenfalls einen floralen Geruch vermittelt und ab 50 ng/L wahrnehmbar ist.<sup>20</sup> Neben diesen beiden C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden können auch flüchtige Verbindungen mit einem C<sub>9</sub>-, C<sub>10</sub>-, C<sub>11</sub>- oder auch C<sub>15</sub>-Körper gebildet werden (vgl. Abbildung 9), ebenso wie C<sub>20</sub>-Körper, die für die Bildung von Vitamin A und anderen Retinoiden wichtig sind. Die C<sub>10</sub>-Verbindung Safranal ist der Schlüsselaromastoff für Safran und kann sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch aus Vorläufercarotinoiden gebildet werden.<sup>117</sup> Das Lacton Dihydroactinidiolid wird durch lichtinduzierten Abbau von  $\beta$ -Carotin gebildet und gehört zu den aromaaktivsten Verbindungen in Longjingtee.<sup>118</sup>

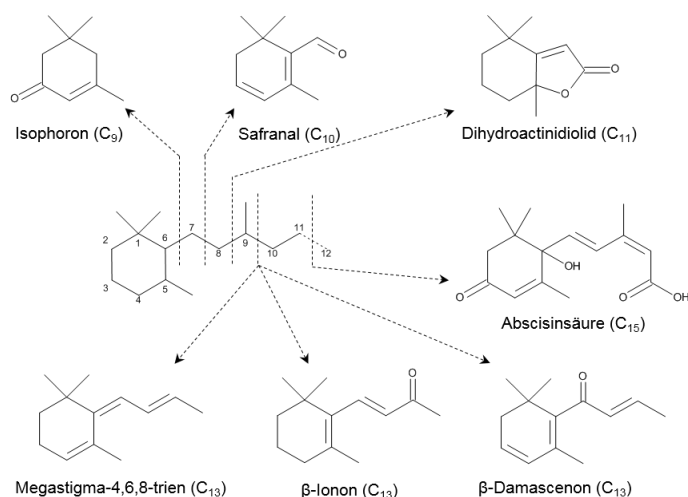


Abbildung 9: Abbauprodukte von Carotinoiden, modifiziert nach Winterhalter und Rouseff<sup>119</sup>

Von den zahlreichen Aromastoffen, die aus Carotinoiden gebildet werden können, gehen nur wenige frei vorkommende Verbindungen direkt aus ihren Vorläufern hervor. So wird zum Beispiel  $\beta$ -Damascenon in einem mehrstufigen, teilweise enzym-katalysierten Prozess gebildet (vgl. Abbildung 10), bei dem an erster Stelle eine oxidative Spaltung steht, gefolgt von enzymatischen Umwandlungen, und als letzter Schritt eine säurekatalysierte Umsetzung stattfindet. Andere Norisoprenoide wie  $\beta$ -Ionon werden dagegen in einem einzelnen Schritt durch oxidative Spaltung aus ihrem Ursprungscarotinoid gebildet.<sup>92</sup>

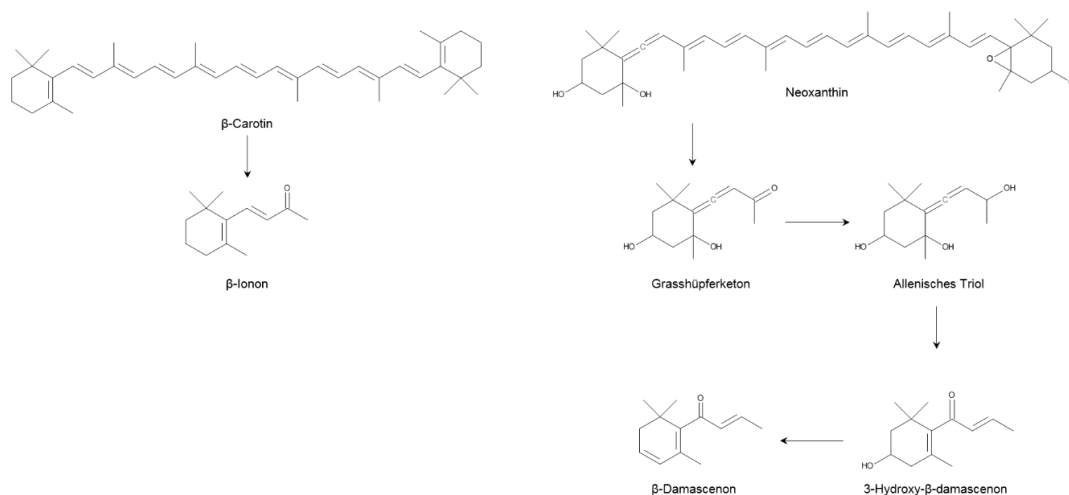


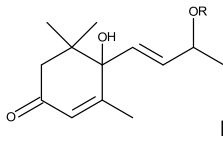
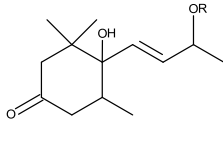
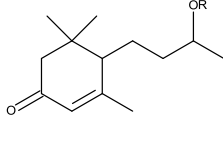
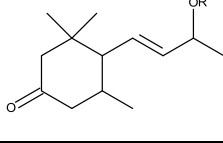
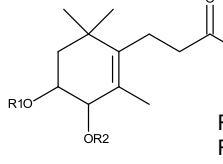
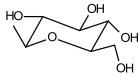
Abbildung 10: Bildungsweg von  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Damascenon aus Carotinoiden, modifiziert nach Skouroumounis und Sefton<sup>120</sup>

In vielen Fällen sind die Reaktionsprodukte zwar identisch mit den finalen Aromaverbindungen, allerdings liegen diese nicht frei vor – vielmehr sind sie an Glykoside gebunden und werden erst im Laufe der Reifung freigesetzt.<sup>121,122</sup> Die Aromafreisetzung ist damit vom Carotinoidabbau abgekoppelt und wird durch die enzymatischen Freisetzung der glykosidisch gebundenen Norisoprenoide initiiert.<sup>123</sup> Während die Glykosylierung immer noch intensiv untersucht wird, ist der grundsätzliche Mechanismus der enzymatischen Freisetzung



bereits entschlüsselt worden.<sup>50</sup> Die C<sub>13</sub>-Norisoprenoide lassen sich dabei in die Gruppe der Megastigmane und der Nicht-Megastigman-Typen unterscheiden. Zu den Megastigman-Typen gehören unter anderem  $\beta$ -Ionon als auch  $\beta$ -Damascenon.<sup>120,124</sup> Die Verbindungen vom Nicht-Megastigman-Typ, wie zum Beispiel Vitispiran und TDN dagegen lassen sich nicht direkt auf carotinoidische Vorläufer zurückführen, sie gehen vielmehr durch säurekatalysierte Umlagerungen aus anderen Megastigman-Vorläufern hervor.<sup>125</sup> Der Großteil der C<sub>13</sub>-Norisoprenoide liegt in Trauben und im Wein in glykosidisch gebundener Form vor, lediglich  $\beta$ -Damascenon findet sich in relevanten Mengen als freie Verbindung bereits in jungem Wein.<sup>4,31</sup> Strauss et al. untersuchten und bestätigten 1986 den Zusammenhang zwischen dem Zuckergehalt und damit dem Reifegrad der Beeren und den glykosidisch gebundenen C<sub>13</sub>-Norisoprenoidvorläufern. In Folge identifizierten Winterhalter et al. 40 glykosidisch gebundene C<sub>13</sub>-Norisoprenoide in Rieslingwein, die die Konzentrationen an glykosidisch gebundenen Monoterpenen um 40% überschritten.<sup>56</sup> In den kommenden Jahren wurden, auch um die Bildungswege von TDN und Vitispiran zu beleuchten, diverse weitere glykosidisch gebundene Norisoprenoide in Blättern, Beeren, Most und Wein der Rebsorte Riesling isoliert und identifiziert (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Glykosidisch gebundene C<sub>13</sub>-Norisoprenoide aus verschiedenen Quellen von *Vitis vinifera* cv. Riesling

Struktur	Bezeichnung des Aglykons	Literatur (Quelle)
 R = Glc(Ac) <sub>4</sub>	Vomifolioside (Roseoside)	Sefton et al. <sup>126</sup> (Wein)
 R = Glc(Ac) <sub>4</sub>	4,5-Dihydrovomifolioside	Sefton et al. <sup>126</sup> (Wein)
 R = Glc(Ac) <sub>4</sub>	3-Oxo-7,8-dihydro- $\alpha$ -ionol	Roscher & Winterhalter <sup>127</sup> (Blätter)
 R <sub>1</sub> = Glc(Ac) <sub>4</sub> R <sub>2</sub> = Ac	3-Oxo-4,5-dihydro- $\alpha$ -ionol	Roscher & Winterhalter <sup>127</sup> (Blätter)
 R <sub>1</sub> = Glc(Ac) <sub>4</sub> R <sub>2</sub> = Ac	3,4-Dihydroxy-7,8-dihydro- $\beta$ -ionon (TDN-Vorläufer)	Roscher & Winterhalter <sup>127</sup> (Blätter)
	$\beta$ -D-Glucopyranosid (Glc)	

## 4 Literaturübersicht

	Tetracetyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Glc(Ac) <sub>4</sub> )	
	3,4-Dihydroxy- $\beta$ -ionon R = Glc	Roscher & Winterhalter <sup>127</sup> (Blätter)
	3-Oxo- $\alpha$ -ionol R = Glc	Roscher & Winterhalter <sup>127</sup> (Blätter)
	3-Oxo- <i>retro</i> - $\alpha$ -ionol R = Glc	Roscher & Winterhalter <sup>127</sup> (Blätter)
	3-Hydroxy- $\beta$ -damascenon R = Glc	Baumes et al. <sup>128</sup> (Wein)
	3,4-Dihydroxy-7,8-dihydro- $\alpha$ -ionol (Vitispiran-Vorläufer) R = Glc o. Glc(Ac) <sub>4</sub>	Full & Winterhalter <sup>129</sup> (Wein & Blätter)
	3-Oxo-megastigman-9-ol R = Glc o. Glc(Ac) <sub>4</sub>	Skouroumounis & Winterhalter <sup>130</sup> (Blätter)
	3-Hydroxy-5,6-epoxy- $\beta$ -ionon (TDN-Vorläufer) R = Glc o. Glc(Ac) <sub>4</sub>	Skouroumounis & Winterhalter <sup>130</sup> (Blätter)
	Grashüpferketon ( $\beta$ -Damascenon-Vorläufer)	Skouroumounis & Winterhalter <sup>130</sup> (Blätter)
	4,6-Dihydroxy-7,8-dihydro- $\alpha$ -ionol (TDN-Vorläufer) R1 = Glc o. DiGlc R2 = Glc o H	Versini et al. <sup>125</sup> (Trauben/Wein)
	7,8-Dihydrovomifoliol OR	Winterhalter et al. <sup>131</sup> (Wein)

#### 4.5 TDN und Vitispiran

Eine Besonderheit des Rieslings ist die verstärkte Bildung von C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden, die das Aroma wesentlich beeinflussen. Bei anderen Rebsorten kommen diese nur in Spuren vor und besitzen im Gegensatz zum Riesling keine sensorische Relevanz. TDN wurde 1976 erstmals in Extrakten bzw. dem Headspace von Weinen nachgewiesen,<sup>132,133</sup> und kurz darauf von Simpson als Verursacher der „Petrolnote“ beschrieben, die ein kerosinartiges Aroma hervorruft und ab einer Konzentration von 20 µg/L wahrnehmbar ist.<sup>7</sup> Der Versuchsbeschreibung zu entnehmen ist, dass es sich hierbei nicht um die Bestimmung der Wahrnehmungsschwelle handelt, sondern lediglich die Versuchsprobe von den Referenzproben unterschieden wird, allerdings ohne die Möglichkeit einer qualitativen Beschreibung der Veränderung.<sup>41</sup> Vielmehr wurde durch Aufdotierung einer nicht näher bekannten Matrix mit einer zeitgleichen Abfrage der Beschreibung des zu erkennenden Geruchs ein Differenzschwellenwert in Kombination mit dem Erkennungsschwellenwert bestimmt. Die Beziehung zwischen der Konzentration des Stimulus und der psychophysischen Wahrnehmung verläuft nicht linear, sondern hat vielmehr eine logarithmische Dosis-Wirkungs-Beziehung.<sup>134,135</sup> Das hat bei der Verwendung einer bezüglich des zu evaluierenden Stimulus nicht-neutralen Matrix zur Folge, dass für die Wahrnehmung des Unterschieds der aufdotierten Probe eine vergleichsweise große Menge zugegeben werden muss. Dadurch wird der Differenzschwellenwert stark positiv verzerrt und liefert für diesen Fall sehr hohe Werte. Der Erkennungsschwellenwert liegt naturgemäß ebenfalls über der Wahrnehmungsschwelle, da neben der reinen Erkennung der unterschiedlichen Proben eine zusätzliche Menge an Stimulus erforderlich ist, um diesen qualitativ beschreiben zu können.<sup>136</sup>

Für die Beurteilung des Einflusses einer Verbindung auf die Gesamtaromatik eines Lebensmittels ist nicht nur die Erkennungs-, sondern vor allem auch die Wahrnehmungsschwelle relevant, weshalb 2012 von Sacks et al. die Wahrnehmungsschwellenwerte von TDN in Modellwein und einem weitestgehend TDN-freiem neutralen Chardonnay bestimmt wurden.<sup>8</sup> Diese Bestimmungen resultierten in einem deutlich niedrigeren Wert von ca. 2 µg/L, der allerdings durch die Teilnahme von nur zehn trainierten Panelteilnehmern und unter Einsatz von verformbaren Teflonflaschen – die einen unnatürlich raschen und starken Transfer des Kopfraums in die Nase der Panelisten bewerkstelligen – möglicherweise dazu führt, dass hier die Wahrnehmungsschwelle gegenüber den normalen Bedingungen einer Weinverkostung als zu niedrig bewertet wurde. Zusätzlich wurden bei einer Studie an Verbrauchern aus den USA und Neuseeland die Wahrnehmungsschwellenwerte (detection threshold, DT) von TDN in einjährigem Rieslingwein sowie die Konzentration bestimmt, ab der der hohe TDN-Gehalt zu einer Ablehnung des Weins führt (CRT = consumer rejection threshold, Ablehnungsschwelle bei Verbrauchern).<sup>10</sup> Für die Ablehnungsschwelle wurde für Verbraucher aus den USA ein Wert von 82 µg/L ermittelt, während die Verbraucher aus Neuseeland den vorliegenden Wein erst ab einer Konzentration von 157 µg/L signifikant negativer bewerteten als die Kontrollprobe. Zeitgleich wurde festgestellt, dass sich die

Wahrnehmungsschwellen im Gegensatz zu den Ablehnungsschwellen zwischen den Studienteilnehmern aus den USA und Neuseeland kaum unterschieden und in einem deutlich höheren Wert resultieren, sobald die Berechnungsgrundlage geändert wird – von 20 auf 36 µg/L (Neuseeland) bzw. von 18 auf 38 µg/L (USA). Diese Werte, insbesondere die Ablehnungsschwellen sind damit um ein Vielfaches höher als die zuvor bestimmten Schwellenwerte. Das kann neben der unterschiedlichen Berechnungsmethode unter Umständen auch dadurch erklärt werden, dass Verbraucher, die bereits an höhere TDN-Konzentrationen im Wein gewöhnt sind, erst deutlich später die auftretende Petrolnote als negativ beurteilen. Während in mitteleuropäischen Weinen nur Gehalte von bis zu 22 µg/L an freiem TDN enthalten sind,<sup>137,138</sup> wurden in südafrikanischen und australischen Rieslingen Höchstwerte von bis zu 55 bzw. 255 µg/L gemessen.<sup>48,139</sup>

Während die Erkenntnisse über die weinbaulichen und oenologischen Einflussfaktoren auf die Bildung von TDN zunehmen, ist immer noch nicht abschließend geklärt, weshalb die Petrolnote primär in Rieslingweinen auftritt. Das Auftreten von TDN-Vorläufern ist in jedem Fall nicht auf die Beeren der Rebsorte Riesling beschränkt, da diese sowohl in anderen Früchten wie in Quitten (*Cydonia oblonga* Mill.) oder in Passionsfrüchten (*Passiflora edulis* Sims), in den Blättern der Roten Johannisbeere (*Ribes rubrum* L.) und auch in Rieslingblättern nachgewiesen wurden.<sup>127,140,141</sup> Insbesondere das erhöhte Vorkommen in Blättern bestätigt die Vermutung, dass es sich bei TDN um ein Abbauprodukt eines oder mehrerer Carotinoide handeln muss. Aus dem glykosidischen Extrakt eines Rieslingweins wurde die Verbindung 2,6,10,10-Tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-6-en-2,8-diol identifiziert.

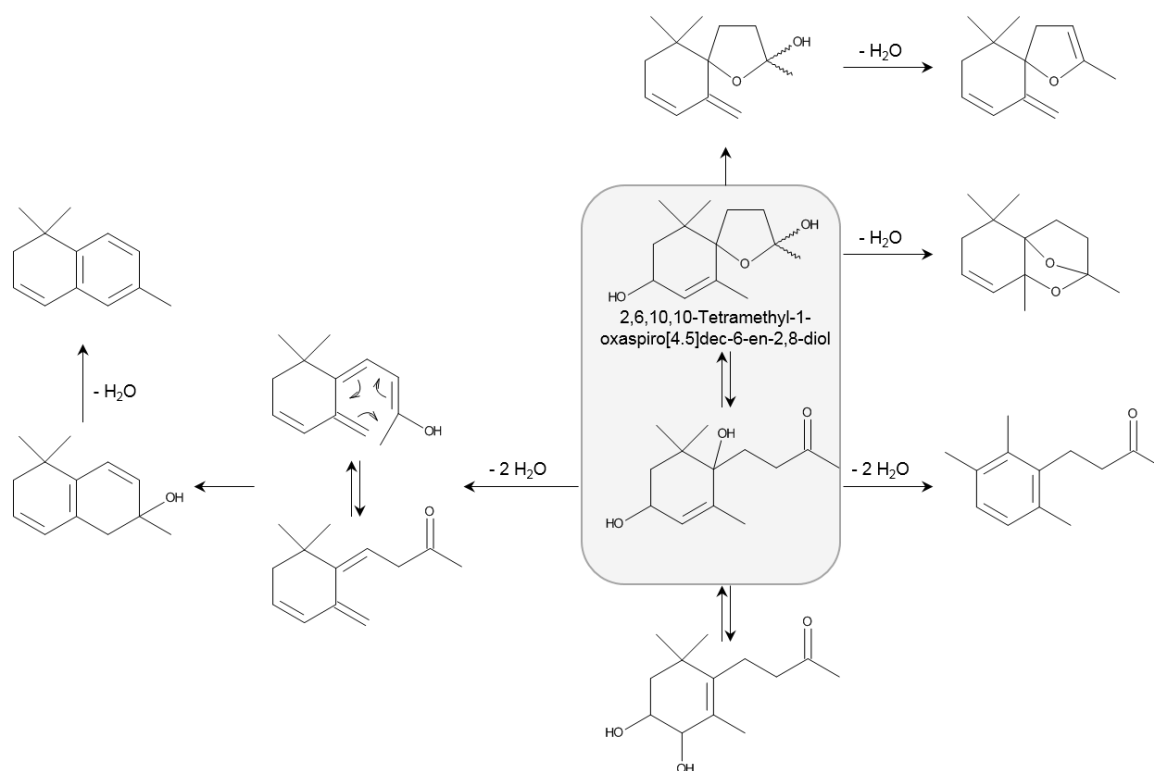


Abbildung 11: Postulierter TDN-Bildungsweg<sup>142</sup>, modifiziert nach Winterhalter und Gök<sup>11</sup>

Die anschließende säurekatalysierte Hydrolyse unter Erhitzen der synthetisierten (racemischen) Verbindung lieferte neben anderen C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden und weiteren Abbauprodukten TDN und Rieslingacetal (2,2,6,8-Tetramethyl-7,11-dioxatricyclo[6.2.1.0]undec-4-en. Des Weiteren wurde die Mischung der diastereomeren 3,4-Dihydroxy-7,8-dihydro- $\beta$ -ionone im zugrunde liegenden Rieslingextrakt als Abbauprodukte der Ausgangsverbindung nachgewiesen. Diese werden aus der offenkettigen Form durch eine allylische Umlagerung gebildet, die wiederum im Gleichgewicht mit dem korrespondierenden Hemiacetal steht (vgl. Abbildung 11).

Mit dem Nachweis eines Hydroxylderivats des TDN, das bereits zuvor in gealtertem Rieslingwein gefunden und als 1,1,6-Trimethyl-4-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin bezeichnet wurde,<sup>143</sup> ist 1991 ein erster Bildungsweg für TDN postuliert, und das Hydroxylderivat als 6-Hydroxy-1,1,6-trimethyl-1,2,5,6-tetrahydronaphthalin identifiziert worden.<sup>142</sup>

Bereits zuvor wurde festgestellt, dass sowohl Vitispiran als auch  $\beta$ -Damascenon aus mehreren Aglykonen hervorgehen, die zudem noch mit einigen unterschiedlichen Zuckerresten verbunden sind, was die breite Streuung in der beobachteten Polarität der DCCC-Extrakte erklärt. Eine ähnliche Verteilung bei den Polaritäten wurde bei TDN beobachtet, allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt noch kein direkter Vorläufer identifiziert werden. Jedoch sind zahlreiche Verbindungen nachgewiesen worden, die als Vorläufer für TDN in Frage kommen, und für die verschiedene Möglichkeiten der Glykosylierung existieren. Deshalb wurde der Begriff multiple Präkursoren für Verbindungen mit dem Potential zur TDN-Bildung verwendet.<sup>12</sup> Aufgrund der fehlenden Möglichkeit, die finalen C<sub>13</sub>-Norisoprenoide auf eine einzelne Verbindung zurückzuführen, aus der sich bei enzymatischer, säurekatalytischer und/oder thermischer Behandlung die jeweiligen Produkte bilden, werden seitdem neben der Analyse der Konzentrationen an freien Verbindungen auch die Gehalte an potentiellen Norisoprenoiden angegeben – als Summenparameter für alle Verbindungen, aus denen sich nach Spaltung und Freisetzung der jeweilige Analyt nachweisen lässt. Allerdings unterscheiden sich die Angaben in der Literatur durch die angewandte Methodik, zum Beispiel durch Variierung der Temperatur, des pH-Werts, der Behandlungsdauer sowie der angewandten Extraktions- und Analysemethoden.<sup>46,47,111,144-149</sup>

Deswegen sind direkte Vergleiche der Gehalte an potentiell TDN oder Vitispiran zwischen unterschiedlichen Studien nur sehr begrenzt möglich; es empfiehlt sich daher, nur die jeweiligen Varianten innerhalb der spezifischen Studie miteinander zu vergleichen.

Versini et al. entdeckten einen weiteren potentiellen TDN-Vorläufer vom Megastigman-Typ, ein Megastigma-4-en-9-on mit einer Etherfunktion in der C<sub>6</sub>-Position und einer weiteren Hydroxy- oder glykosylierten Hydroxyfunktion in der C<sub>4</sub>-Position. Dieser Vorläufer führt nach säurekatalysierter Umlagerung und Hydrolyse zur Bildung von TDN. Dabei wurde jedoch postuliert, dass dieser Vorläufer aufgrund der langsamen Reaktionsgeschwindigkeit nur wenig

zum gesamten freien TDN beiträgt – im Vergleich zu dem von Winterhalter et al. 1991 entdeckten Verbindung.<sup>125</sup> Zusätzlich wurde festgestellt, dass bei harschen Hydrolysebedingungen aus einem gemeinsamen Vorläufer, 1,1,5-trimethyl-3,6-dihydroxy-9,9-ethylenedioxy-megastigm-4-en, TDN und Rieslingacetal gebildet werden, aus Rieslingacetal selbst aber über ein Intermediat wiederum TDN entstehen kann.<sup>150</sup>

Als weitere potentielle TDN-Prekursoren wurden das in Quitten (*Cydonia oblonga* Mill.) vorkommende 3-Hydroxy- $\beta$ -ionon<sup>140</sup>, das aus Passionsfrucht (*Passiflora edulis* Sims) isolierte 3-Hydroxy-1,1,6-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin<sup>151</sup> sowie das 3,4-Didehydro-7,8-dihydro-6-hydroxy- $\gamma$ -ionon identifiziert, das mit 2,6,6-trimethyl-10-methylen-1-oxaspiro[4.5]dec-8-en-2-ol im Gleichgewicht steht und nach Dehydrierung und Zyklisierung zum Hydroxy-Derivat des TDN führen kann (vgl. Abbildung 12).<sup>11</sup>

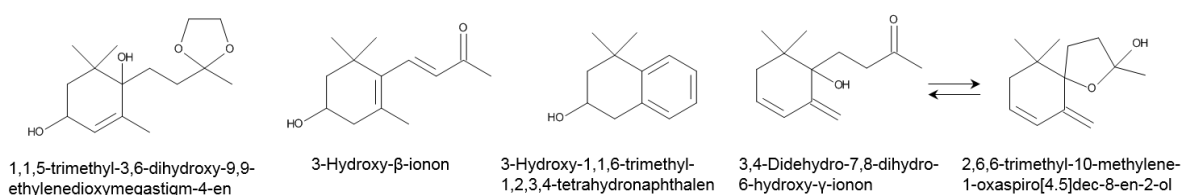


Abbildung 12: Weitere bestätigte und potentielle TDN-Vorläufer

Biosynthetisch eng verwandt mit TDN sind die isomeren Vitispirane (vgl. Abbildung 13). Sie wurden aus Wein erstmals 1977 von Simpson et al. isoliert, und bereits zum damaligen Zeitpunkt wurde ein gemeinsamer Vorläufer von TDN und Vitispiran vermutet, da sich die Konzentrationen der Verbindungen bei Alterung der Weine ähnlich verhielten.<sup>152</sup> Die Geruchsschwelle für das Isomerengemisch wurde zunächst mit 800  $\mu\text{g/L}$  angegeben.<sup>30</sup>

Angesichts der Verwendung einer identischen Methodik wie bei TDN ist davon auszugehen, dass die Wahrnehmungsschwelle nicht durch diesen Wert repräsentiert wird, sondern vermutlich – ebenso wie es bei TDN der Fall ist – um den Faktor 10 darunter liegt. Nach der Synthese der einzelnen Vitispiranisomere durch Schulte-Elte et al. wurde das Aroma für die *cis*-Verbindungen mit einer grünen, chrysanthemen-artigen Note und für die *trans*-Verbindungen mit einer exotischen Blütennote mit einem erdigen Unterton beschrieben.<sup>153</sup> Die Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse der vier Stereoisomere gelang erst 1994, ebenso wie der Nachweis des glykosylierten Vorläufers 3,4-Dihydroxy-7,8-dihydro- $\beta$ -ionol als 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid.<sup>129</sup> Bereits zuvor wurde beobachtet, dass aus der synthetischen Verbindung 3,6-Dihydroxy-7,8-dihydro- $\alpha$ -ionol durch Erhitzen auf 100 °C bei einem pH-Wert von 3 Vitispiran gebildet werden kann; zudem wurden mit den glykokonjugierten Isomeren von 1-(3-hydroxybutyl)-6,6-Dimethyl-2-methylene-3-cyclohexen-1-ol erste biosynthetische Vorläufer von Vitispiran identifiziert.<sup>154</sup>

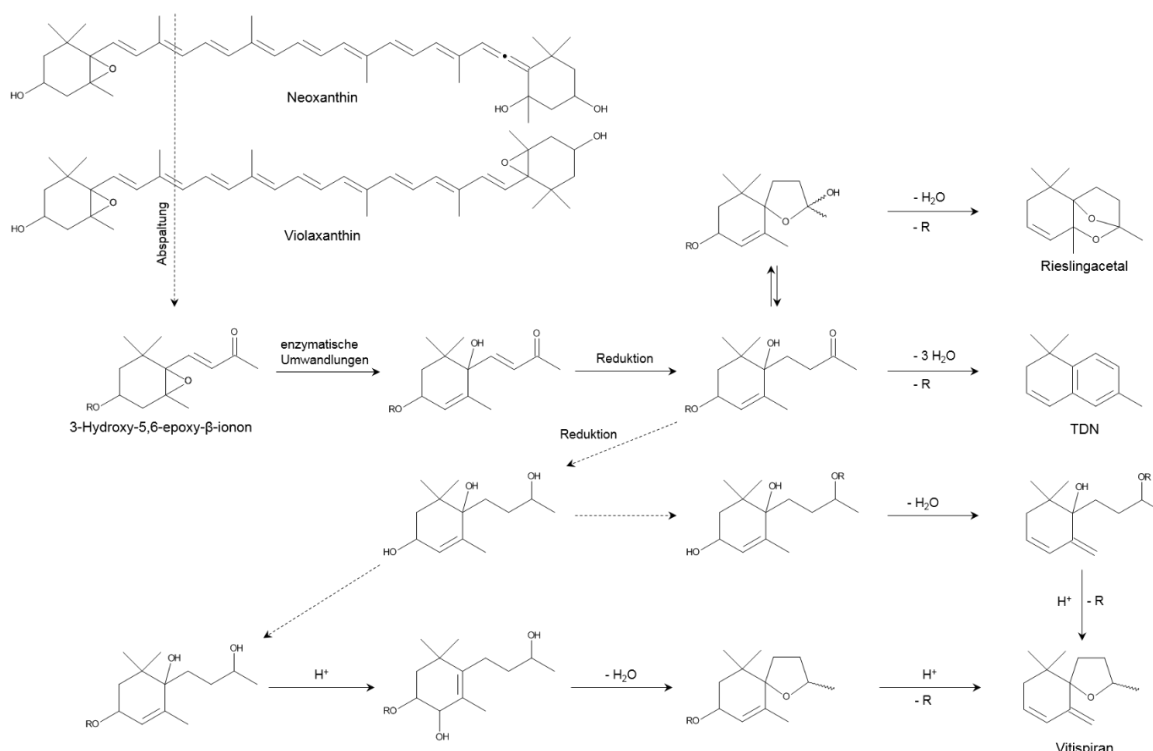


Abbildung 13: Bildungswege von Rieslingacetal, TDN und Vitispiran aus den glykosidischen Vorstufen, modifiziert nach Winterhalter & Gök<sup>11</sup>

Die Gehalte, die bisher in Weinen beobachtet wurden, reichen mit bis zu 81 µg/L nicht annähernd an die postulierten Geruchsschwellen, sodass davon auszugehen ist, dass der Beitrag von Vitispiran zum Aromaeindruck des Rieslings eher gering ausfällt.<sup>6,137,155</sup> Im Gegensatz zu β-Damascenon ist bisher nicht festgestellt worden, dass Vitispiran die Funktion eines Aromaverstärkers besitzt, die für β-Damascenon zumindest in Rotwein nachgewiesen wurde.<sup>156</sup>

Eine weitere Gruppe von Verbindungen mit demselben Ursprung wie TDN und Vitispiran bilden die isomeren Actinidole. Sie wurden erstmals aus dem ätherischen Öl des Matatabi (*Actinidia polygama*) extrahiert,<sup>157</sup> bestehen ebenso wie Vitispiran aus vier Isomeren, die einen kampher-artigen, harzigen Geruch besitzen, und die aus Traubensaft mittels Wasserdampfdestillation gewonnen wurden.<sup>158</sup> Die von Strauss et al. durchgeführten Untersuchung zur Hydrolyse mehrerer Megastigmatriole lieferte neben TDN, Vitispiran und anderer C<sub>13</sub>-Norisoprenoide ebenfalls die isomeren Actinidole, was auf die gleichen Ursprungsverbindungen schließen lässt; zumindest können aber aus mechanistischer Sicht die Actinidole, Vitispiran und TDN wenigstens teilweise auf demselben Weg gebildet werden.<sup>159</sup>

Obwohl der Syntheseweg dieser Verbindungen noch nicht abschließend geklärt ist, ist aus biogenetischen und mechanistischen Überlegungen davon auszugehen, dass diese C<sub>13</sub>-Norisoprenoide aus Violaxanthin und/oder Neoxanthin gebildet werden. Das in einem ersten Schritt abgespaltene 3-Hydroxy-5,6-epoxy-β-ionon wird durch enzymatische



Umwandlungen in das 3,6-Dihydroxy- $\alpha$ -ionon überführt, das weiter zur bereits bekannten Vorläuferverbindung führt.<sup>11</sup> Neben den Reaktionen hin zu Rieslingacetal sowie TDN wurde auch eine mögliche, gegebenenfalls hefeinduzierte Reduktion der Keto-Funktion des Ionons angenommen, die den Bildungsweg von TDN- zu Vitispiran-Prekursoren verschieben kann.

Neben Neoxanthin und Violaxanthin kann TDN auch aus Lutein gebildet werden; so liefert eine thermische Behandlung von Lutein bei einem pH-Wert von 1 unter Anderem TDN als Produkt, während  $\beta$ -Carotin als direkter Ursprung für TDN ausgeschlossen werden konnte.<sup>160</sup> Die Bildung von TDN kann dabei über 3-Hydroxy- $\beta$ -ionon erfolgen, das in einem Modellversuch aus Lutein gebildet wurde.<sup>140</sup> In den Jahren 1993 und 1994 wurden weitere glykosidisch gebundene C<sub>13</sub>-Norisoprenoide aus Rieslingblättern isoliert, von denen einige als TDN-Vorläufer vermutet wurden (vgl. Tabelle 1).<sup>127,130</sup> Eine dieser Verbindungen, das 3,4-Dihydroxy-7,8-dihydro- $\beta$ -ionon, ist mittlerweile auch als intaktes Mono- und Diglykosid in Rieslingwein bestätigt worden.<sup>161</sup> Der Nachweis weiterer intakter Glykoside, wie des 3,4-Didehydro-7,8-dihydro-6-hydroxy- $\gamma$ -ionon, das ebenfalls als TDN-Vorstufe postuliert wurde,<sup>162</sup> steht derzeit noch aus.

## 4.6 Analytik von Aromaverbindungen in Wein

### 4.6.1 Stabilisotopenverdünnungsanalyse

Die Anwendung der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (stable isotope dilution assay, SIDA) ist für die quantitative Analyse der Gaschromatographie, insbesondere im Bereich der Analytik von komplexen, aromareichen Lebensmitteln oder Umweltproben in den meisten Fällen die Methode der Wahl. Während die Ursprünge der Isotopenverdünnungsanalyse in den Anfängen des 20. Jahrhunderts liegen,<sup>163</sup> wird die erste Anwendung unter Verwendung nicht radioaktiver (stabiler) Isotope durch die Kopplung von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie im Bereich der medizinischen Analytik auf Sweeley et al. zurückgeführt. Dabei wurde siebenfach deuterierte Glucose nach Derivatisierung zur Pentatrimethylsilyl-glucose als interner Standard verwendet.<sup>164</sup> Das Prinzip der SIDA ist in Abbildung 14 dargestellt.

Nach der Equilibrierung des zugegebenen internen Standards erfolgt während der Extraktion und weiteren potentiellen Derivatisierungsschritten keine oder eine nur sehr geringe Diskriminierung zwischen dem Zielanalyten und dem isotopologen Standard; dagegen kann es bei der Verwendung eines strukturell zwar ähnlichen, sich im chemischen Verhalten aber zum Teil deutlich unterscheidenden Standards zu Variationen in der Ausbeute während der Extraktion, der Derivatisierung oder der Detektion im Massenspektrometer kommen.<sup>163</sup> Vor allem bei Verbindungen, bei denen die Aufarbeitungs- und Derivatisierungsschritte mit hohen Verlusten einhergehen, sowie in der Spurenanalytik ist der Einsatz von isotopologen Standards sinnvoll, da der relative Messfehler in der instrumentellen Analytik zunimmt, je geringer die Konzentration des Analyten ist.<sup>165</sup>



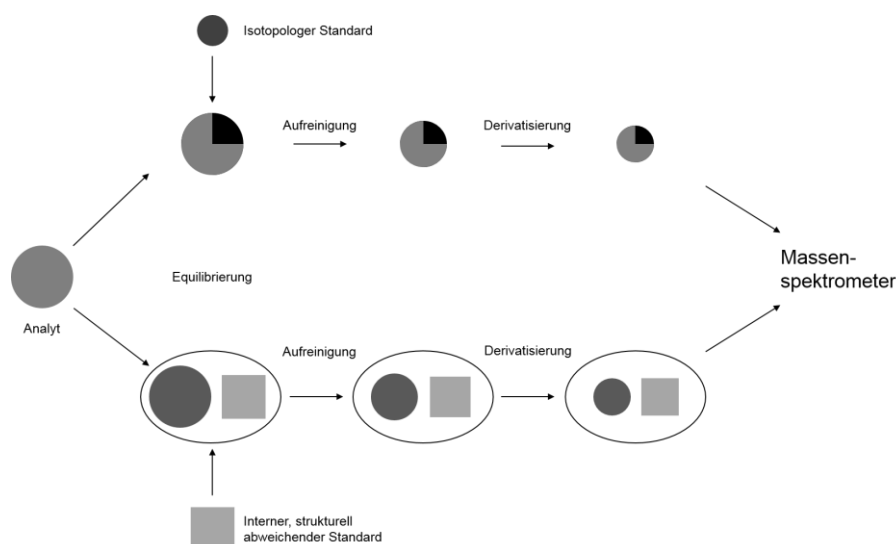


Abbildung 14: Schema der Standardisotopenverdünnungsanalyse, nach Rychlik und Asam<sup>163</sup>

Außerdem kann es bei der Ionisierung der Verbindungen im Rahmen der Massenspektrometrie zu starken Variationen bei der Umsetzungsrate kommen, daher bedeutet die Verwendung eines isotopologen Standards hier eine deutliche Erhöhung in der Verlässlichkeit der Quantifizierung, da störende Matrixkomponenten den isotopologen Standard ebenfalls betreffen.<sup>163</sup> Bei der Auswahl bzw. der Synthese der markierten Standardverbindungen ist darauf zu achten, dass in der Matrix und während der Aufarbeitung keine Umwandlung des isotopologen Standards stattfindet, zum Beispiel durch den Austausch von  $[^2\text{H}]$  durch  $[^1\text{H}]$  an aciden Positionen der Zielverbindung. Bei besonders niedrigem pH-Wert kann an diesen Stellen – aber auch an aromatischen Positionen – durch Säure-Base-Reaktionen ein Austausch erfolgen, weswegen durch die Markierung mit  $[^{13}\text{C}]$  oder  $[^{15}\text{N}]$  stabilere Standards erzeugt werden.<sup>166</sup> Allerdings ist der natürliche Anteil an  $[^{13}\text{C}]$  mit 1,10% deutlich höher als der natürliche Anteil von  $[^2\text{H}]$  von 0,015%,<sup>167</sup> weshalb der Einsatz von Deuterium einen geringeren Fehler verursacht; zusätzlich können in der Regel – gerade bei der Analytik kleiner Moleküle – deutlich mehr Wasserstoff- als Kohlenstoffatome durch die Isotope ersetzt werden, und dadurch ein größerer Masseunterschied erzeugt wird. Außerdem unterscheiden sich die Bindungslängen zwischen Kohlenstoff und Wasserstoff durch den großen relativen Masseunterschied zwischen Protium und Deuterium um 0,005 Å (0,5 pm),<sup>168</sup> was zu einem kleineren Molekül und einem damit einhergehenden negativen Isotopeneffekt durch die schwächere Wechselwirkung mit der stationären Phase führt. Deswegen kann durch den Einsatz mehrfach deuterierter Standards eine chromatographische Trennung zwischen der Zielverbindung und ihrem isotopologen Standard erreicht werden.<sup>169</sup> Dadurch ist der Einsatz eines Massenspektrometers nicht zwingend erforderlich, gleichzeitig bleiben die Vorteile des isotopologen Standards bei der Aufarbeitung und Detektion erhalten.<sup>170</sup> Aus den vorgenannten Gründen, und angesichts der leichteren Verfügbarkeit von  $[^2\text{H}]$ -markierten Verbindungen werden daher hauptsächlich deuterierte Standards in der Aromaanalytik eingesetzt.<sup>166</sup>

## 4.6.2 Festphasenmikroextraktion

Eines der Hauptziele bei der Analyse von Umwelt- wie auch Lebensmittelproben ist, die benötigte Zeit und den Arbeitsaufwand für die Probenvorbereitung zu minimieren. Mit diesem Hintergrund wurde Anfang der 1990er Jahre von Arthur und Pawliszyn die Methode der Festphasenmikroextraktion (solid phase microextraction, SPME) entwickelt, die einige Probenaufarbeitungsschritte vereint. So werden die Probenahme, Aufreinigung, Aufkonzentrierung und Transfer in das instrumentelle Analysensystem in einem einzigen Prozess verwirklicht.<sup>171</sup> Zusätzlich stellt die SPME eine einfache und bedienerfreundliche Methode dar, die im Gegensatz zur Flüssig-Flüssig-Extraktion, zur SPE (solid phase extraction, Festphasenextraktion) oder zur SDE (simultane Destillation-Extraktion) ohne Lösungsmittel auskommt. Unterschieden werden hier zwei grundlegende Anwendungspraktiken: Einerseits kann die feste Sorptionsphase direkt in der zu untersuchenden Probe platziert werden (direct immersion, DI), andererseits kann nur der Kopfraum (headspace, HS) über der Probe analysiert werden, was vor allem zur Untersuchung von (flüchtigen) Aromastoffen häufig die geeignetere Methode darstellt.<sup>172</sup> Zusätzlich wird durch die räumliche Trennung der Probenmatrix vom Extraktionsmaterial die Gefahr einer Beeinträchtigung durch Matrixbestandteile wie hochsiedende unpolare Substanzen, Proteine, Salze oder Säuren minimiert. Somit kann auch die Probenmatrix durch Aussalzen oder Einstellung des pH-Werts für eine verstärkte Verflüchtigung der Zielanalyten modifiziert werden, ohne das Extraktionsmaterial zu beschädigen.<sup>173</sup> Meist werden als Extraktionsphase Polymerfasern eingesetzt, die sich in eine Metallkanüle zurückziehen lassen, um die Fasern außerhalb des eigentlichen Extraktionsprozesses gegen Beschädigungen oder Kontaminationen zu schützen. Abbildung 15 stellt die Durchführung einer Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) dar, gefolgt von der Überführung in das gaschromatographische Trennsystem durch thermische Desorption im Injektor. Dem Extraktionsprozess ist in den meisten Fällen eine Äquilibrierungsphase vorgeschaltet, in der sich der Analyt zwischen der festen/flüssigen Probenphase und dem Kopfraum verteilt, um die mechanische Belastung der SPME-Faser zu vermeiden.

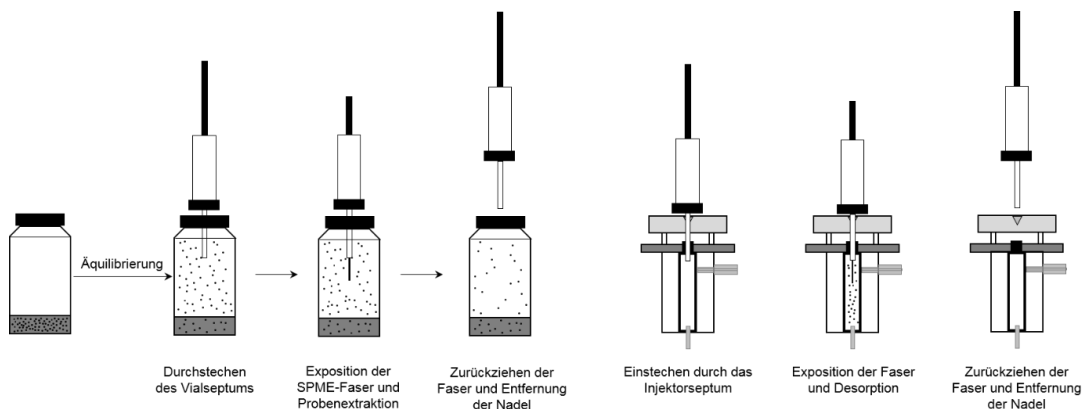


Abbildung 15: Prinzip der Headspace solid phase micro extraction (HS-SPME), modifiziert nach Ahmed et al.<sup>174</sup> und Pawliszyn<sup>175</sup>

Das Gleichgewicht des Analyten stellt sich zwischen der Gasphase und der Extraktionsphase aufgrund der höheren Teilchengeschwindigkeit deutlich schneller ein als beim Übergang von der festen bzw. flüssigen Probenmatrix in die Gasphase, sodass eine Reduzierung der eigentlichen Extraktionszeit erreicht wird.<sup>176</sup> Bei der SPME handelt es sich um eine nicht-erschöpfende Extraktionstechnik; daher ist es sinnvoll, eine genügend lange Äquilierungs- und Extraktionszeit zu wählen, damit sich der Analyt zum Ende der Extraktion bereits im Gleichgewicht befindet und sich entsprechend seiner Verteilungskoeffizienten zwischen den einzelnen Phasen verteilt hat. Andernfalls kommt es zu Verzerrungen in der Extraktionsrate zwischen den Analyten und den internen Standardverbindungen, was sich direkt auf die Quantifizierung auswirkt. Sind sowohl die Verteilungskoeffizienten als auch der Grad bekannt, zu dem sich das Gleichgewicht zu einem bestimmten Zeitpunkt eingestellt hat, kann die Extraktionsrate auch im Nicht-Gleichgewichtszustand bestimmt werden – zu beachten ist allerdings der damit verbundene erhöhte Aufwand.<sup>177</sup> Es gibt zwei Ansätze, dieses Problem zu umgehen: Zum Einen durch die Verwendung isotopologer Standards im Rahmen einer SIDA, da die Verteilungskoeffizienten und die Geschwindigkeit des Erreichens des Gleichgewichtszustands beider Verbindungen weitestgehend identisch sind. Zum Anderen kann auch durch eine wiederholte Extraktion derselben Probe eine nahezu erschöpfende Extraktion durchgeführt werden, mit Hilfe derer die absolute Menge des Analyten festgestellt wird.<sup>177,178</sup> Die letztgenannte Methode der multiplen Headspace-Extraktion (MHE) kann auch angewendet werden, um Matrixeffekte zu eliminieren.<sup>179</sup> Hier wird über die Aufsummierung der erhaltenen Peakflächen aus der FID oder MS-Analyse die Gesamtkonzentration des Analyten bestimmt, und aus der Steigung, die sich aus der Abnahme der Peakflächen aus den einzelnen Extraktionen ergibt, die Extraktionseffizienz des jeweiligen Extraktionsschrittes berechnet.<sup>180</sup>

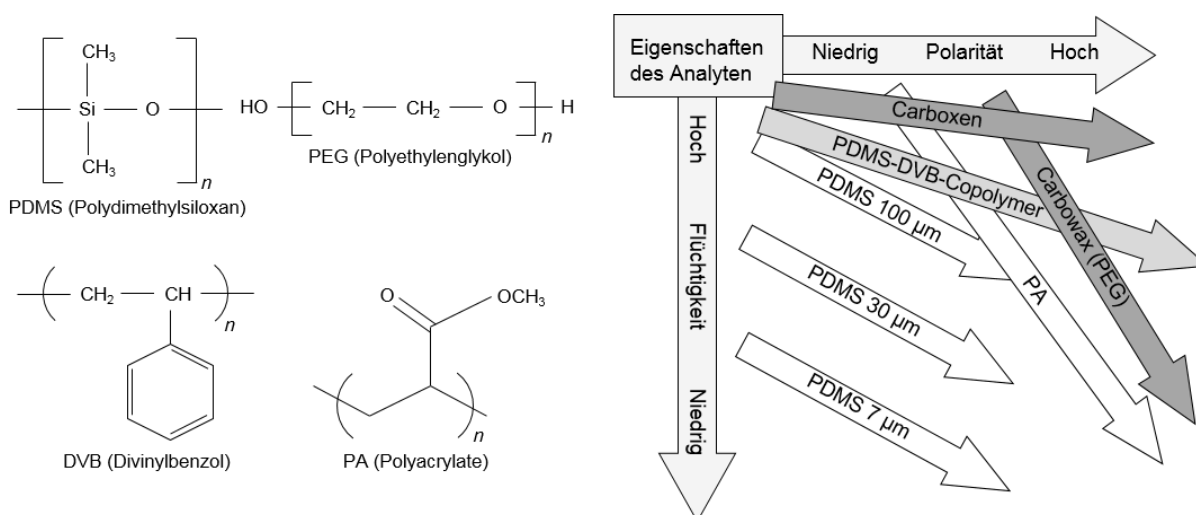


Abbildung 16: Chemische Struktur einiger Fasermaterialien und Eignung im Hinblick auf die chemischen Eigenschaften des Analyten, nach Pawliszyn<sup>175</sup>

Daraus lassen sich die Extraktionsbedingungen für spezifische Analyten optimieren, was deshalb wichtig ist, da sich die verfügbaren Fasermaterialien in ihren chemischen

Eigenschaften und damit in ihrer Eignung bei der Extraktion spezifischer Zielverbindungen stark unterscheiden (vgl. Abbildung 16).

Zudem wird die Ausbeute durch Extraktionsbedingungen wie der Salzkonzentration, dem pH-Wert oder der Extraktionstemperatur beeinflusst.<sup>175</sup> Die Anpassung der Rührgeschwindigkeit führt zu einer schnelleren Einstellung des Gleichgewichts,<sup>181</sup> ebenso wie die Art der Agitierung – wie die Verwendung eines Schüttlers oder die Benutzung eines Rührfischs.<sup>182</sup> Die Optimierung der instrumentellen sowie methodischen Extraktionsparameter ist nicht auf die Anwendung der multiplen Headspace-Extraktion beschränkt, sondern ist auch bei der Durchführung einer HS-SPME unter Verwendung isotopologischer Standards zu beachten, um die Analysezeit zu reduzieren oder die Methodensensitivität zu erhöhen.

### 4.7 Vermeidung der Petrolnote

#### 4.7.1 Weinbauliche Einflussfaktoren auf die Bildung von TDN

Die früheste Möglichkeit, die Ausbildung der Petrolnote zu reduzieren bzw. zu regulieren, beginnt bereits mit der Pflanzung, genauer gesagt der Veredelung der Weinreben. Die Selektion der Unterlage, die für die jeweilige Pflanzung eingesetzt wird, basiert auf einer Vielzahl vor allem physiologischer und phytosanitärer Aspekte wie der Wüchsigkeit, der Kalk-, Trocken- und Kältetoleranz oder der Resistenz gegenüber Schädlingen wie der Reblaus (*Daktulosphaira vitifoliae*). Die Unterlagenart ist entscheidend für die Versorgung der Rebe mit Wasser und Nährstoffen, resultierend in schwächerem oder stärkerem Wachstum des vegetativen Teils der Pflanze, sowie auf die Anzahl und Größe der Trauben.<sup>183,184</sup> Folglich liegt der Schwerpunkt bisheriger Untersuchungen auf dem Einfluss der Unterlagenwahl auf allgemeine Parameter wie dem Ertrag oder dem Zucker- und Säuregehalt.<sup>185-190</sup> Untersuchungen, die sich mit dem Flavonoidgehalt oder dem Aromaprofil der ausgebauten Weine beschäftigt haben, legten ihren Fokus meist auf Rotweine.<sup>191-194</sup> In anderen bereits durchgeführten Studien wurde der generelle Einfluss der Wasser- und Stickstoffversorgung im Weinberg auf den Metabolismus von Weißweinreben und insbesondere Riesling untersucht, unter anderem auch im Hinblick auf die Bildung glykosidisch gebundener Aromastoffe inklusive TDN.<sup>44,195-197</sup> Allerdings wurde in diesen Studien die Rebstockunterlage nicht variiert, genauere Informationen über die Möglichkeit, mit einem Wechsel der Unterlage den Gehalt an Norisoprenoid-Vorläufern zu beeinflussen, fehlen daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt.

Die Auswahl des Klons, der auf die Unterlage gepfropft wird, erfolgt – neben einer angestrebten Unempfindlichkeit gegenüber Krankheiten wie dem Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) oder der Grauschimmelfäule (verursacht durch *Botrytis cinerea*) – mit dem Fokus auf Ertrag, Weinqualität und Traubenarchitektur.<sup>183,198,199</sup> Vor allem die letzten beiden Kriterien gehen mit der Anzahl der Beeren pro Traube und der Beerengröße einher, da durch weniger oder kleinere Beeren eine Auflockerung der Traubenarchitektur erfolgt, resultierend in einem trockenerem Mikroklima, das das Botrytisrisiko reduziert.<sup>184,200</sup> Auf der

anderen Seite kann eine Verringerung der Beerengröße und eine aufgelockerte Traubenstruktur dazu führen, dass die einzelnen Beeren verstärkter Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind, was eine erhöhte Carotinoidbildung zur Folge hat. Die Carotinoide entstehen hauptsächlich in der Beerenhaut (siehe Kapitel 4.3.1), sodass folglich höhere Carotinoid- bzw. Norisoprenoidgehalte in kleineren Beeren – mit einem höheren relativen Anteil der Beerenhaut im Vergleich zur gesamten Beerenmasse – zu erwarten sind. Sponholz und Hühn sowie Rudy stellten Unterschiede in der Ausbildung von freiem TDN wie auch Gesamt-TDN bei einer Auswahl von vier bzw. acht Rieslingklonen fest.<sup>146,201</sup> Weitere Untersuchungen zur Ausprägung von Terpenegehalten führten ebenfalls zu Unterschieden in den Terpenprofilen der eingesetzten Rieslingklone,<sup>202</sup> ebenso wurde bei anderen Rebsorten wie Sauvignon blanc und Merlot noir Variationen bei der Bildung von Methoxypyrazinen, Thiolen,  $\beta$ -Damascenon und anderen Aromastoffen beobachtet.<sup>203,204</sup>

Unterschiede in der Beerengröße scheinen keinen direkten Einfluss auf die Gesamt-Weinqualität zu haben.<sup>205</sup> Allerdings konnten Unterschiede bei der Ausprägung von Norisoprenoid-Vorläufern und anderer Aromastoffe sowohl bei Riesling als auch anderen Rebsorten festgestellt werden, die sich sowohl auf den Reifegrad der einzelnen Beeren wie auch auf die Beerengröße selbst zurückführen lassen.<sup>147,206</sup>

Eine Änderung der Reberziehung kann die Anzahl und Größe der Trauben in ähnlicher Weise beeinflussen, wie es zum Beispiel für die Praktik der Minimalschnitterziehung berichtet wird. Die Veränderung des Blatt-Frucht-Verhältnisses führt zu höheren Erntemengen mit einer höheren Anzahl an Trauben, und zur Reduzierung der Beerenanzahl pro Traube und einem niedrigeren Beerengewicht, gleichzeitig wurde ein verzögerter Reifeverlauf und eine langsamere Zuckerakkumulation festgestellt.<sup>205-210</sup> Der beobachtete Anstieg von Aromastoffen in Rieslingweinen, die aus der Minimalschnitterziehung stammen,<sup>211</sup> kann zudem durch den Erntezeitpunkt beeinflusst werden. Die Stoffwechselaktivität in den Beeren ändert sich im Reifeverlauf und hat auch über die Vollreife hinaus Einfluss auf die Zucker-, Säure- und Aromazusammensetzung.<sup>32,148,212,213</sup> Eine spätere Ernte führt zu höheren Gehalten an Monoterpenen und Norisoprenoiden, während damit eine Abnahme des Gehalts an flüchtigen Säuren und „grünen“ Verbindungen wie n-Hexanol einhergeht.<sup>214,215</sup>

Die Pflanzung von Rebstöcken, die Veredelung mit verschiedenen Klonselektionen und die Anpassung der Reberziehung über mehrere Jahre hinweg stellen Maßnahmen dar, die eine langfristige Planung erfordern. Daneben existieren kurzfristige Maßnahmen, die sich an die jeweiligen Witterungsbedingungen der Saison anpassen lassen. Im Weinbau ist die Anwendung der Laubwandausdünnung gängige Praxis, um eine Auflockerung der Traubenstruktur zu erreichen. Dies wird durch eine Entblätterung während der Blüte erreicht, die zu einer schlechteren Versorgung der Infloreszenzen und der Reduzierung ihrer Anzahl führt.<sup>216,217</sup> Entblätterungsmaßnahmen der Traubenzone im späteren Reifeverlauf verbessern dagegen während der feucht-kühlen Witterung im Herbst die Durchlüftung und soll gegen Fäulnisbildung vorbeugen.<sup>218,219</sup>

In einer einjährigen Studie wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten die Blätter in der Traubenzone in gleichem Maße entfernt, was zu unterschiedlichen Gehalten an gebundenem TDN zwischen 52 und 138 µg/L führte. Die niedrigsten Gehalte wurden dabei nach Entblätterung während des Fruchtansatzes und bei Unterlassen jeglicher Entblätterung gemessen, während die Laubentfernung einen Monat nach der Blüte zu den höchsten Gehalten führte.<sup>111</sup> Eine Intensivierung der Entblätterung sowohl zur Blüte als auch zur Véraison führte jeweils zu einer deutlichen Erhöhung der Gesamt-TDN-Gehalte im untersuchten Jahrgang.<sup>220</sup> Umgekehrt führte eine Beschattung der Trauben zu einer deutlichen Reduzierung der Norisoprenoid-Gehalte um bis zu 80%,<sup>46</sup> was allerdings auch mit einer Reduzierung anderer wertvoller Aromakomponenten und einem zusätzlichen Fäulnisrisiko einherging.<sup>221</sup> Neben dem Einfluss auf die Norisoprenoid-Gehalte wurde ebenfalls eine deutliche Erhöhung von Flavanolen und Flavonolen durch die Entblätterung beobachtet, die sich vor allem auf die Erhöhung der UV-Einstrahlung und nicht auf den parallelen Anstieg der Temperatur zurückführen lässt, aber unter Umständen auch eine unerwünschte Adstringenz in den resultierenden Weinen erzeugen kann.<sup>222</sup>

### 4.7.2 Oenologische Einflussfaktoren auf die Bildung von TDN

Neben der Möglichkeit, die Bildung von gebundenen C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden bereits während der Wachstums- und Reifeperiode zu beeinflussen, kommen auch nach der Ernte der Beeren weitere Optionen in Frage. Zum Einen sind das verschiedene Maßnahmen beim Keltern, und zum Anderen kann auf den Hefemetabolismus und damit auf den Bildungsweg von Norisoprenoiden Einfluss genommen werden. Die erste Eingriffsmöglichkeit nach der Ernte der Beeren bietet sich bei der Mostgewinnung aus den Trauben an, da die glykosidisch gebundenen Aromavorläufer nicht nur im Fruchtfleisch, sondern auch in der Beerenhaut vorhanden sind.<sup>223-225</sup> Die Extraktionsrate der Aromavorläufer aus der Beerenhaut kann zum Beispiel durch Maischegärung oder Kaltmazeration erhöht werden.<sup>226-228</sup> Entsprechend wird auch die Zusammensetzung des Mostes verändert, wenn beim Keltern des Weins ein anderes Druckprofil beim Pressen der Trauben verwendet wird, da es hier durch den erhöhten mechanischen Stress auf die Zellwände der Schalen zu einem stärkeren Eintrag der Inhaltsstoffe kommt. Insbesondere werden in den ersten Pressfraktionen, bei denen kein oder nur ein sehr niedriger Druck angewendet wird, niedrigere Gehalte an Phenolen festgestellt, dafür ist bei diesen Fraktionen der Gehalt an titrierbarer Säure höher. Das wird durch den Umstand verursacht, dass bei höherem Druck auch mehr Kalium in den Most eingebracht wird, das durch die Fällung der Weinsäure in Form von Dikaliumtartrat den Gehalt an titrierbarer Säure verringert.<sup>229,230</sup> Extensiver Kontakt kann zur Extraktion potentiell unerwünschter phenolischer Verbindungen führen, die bittere Noten im erzeugten Wein verursachen.<sup>231</sup> Daher werden zum Beispiel bei der Champagnerproduktion nur die ersten Pressfraktionen verwendet, um unerwünschte Bitternoten zu vermeiden.<sup>232</sup> Aufgrund der Lokalisierung in den



Beerenschalen ist mit zunehmender Kontaktzeit zwischen Most und Beerenschalen auch ein Anstieg der glykosidisch gebundenen C<sub>13</sub>-Norisoprenoide zu erwarten, wie er bereits 2006 für die Rebsorten Fiano und Nero d'Avola beobachtet wurde.<sup>226</sup>

Eine Schlüsselrolle bei der Bildung zahlreicher Aromastoffe spielen die Hefen, entweder durch eine *de novo*-Synthese aus diversen Vorstufen als Nebenprodukte des Fettsäure- oder Aminosäurestoffwechsels oder aus der Freisetzung glykosidisch gebundener Vorläuferverbindungen.<sup>22,23,233</sup> Letzteres gilt besonders für Terpene als auch Norisoprenoide.<sup>4</sup> Die Bildung eines Großteils dieser Verbindungen kann durch eine Veränderung des Hefemetabolismus beeinflusst werden, um z.B. die Bildung unerwünschter Komponenten wie Ethylacetat zu verringern oder die Gehalte an fruchtigen Estern zu erhöhen.<sup>234,235</sup> Es ist davon auszugehen, dass eine enzymatische Modifizierung des Aglykons der glykosidisch gebundenen Aromastoffe unter bestimmten Umständen möglich ist.<sup>162,236</sup> Aufgrund der Annahme, dass diese enzymatische Umsetzung durch Hefen erfolgt, sind Auswirkungen auf diese Reaktionen durch die Veränderung des Hefemetabolismus denkbar, vor allem, da die Vorläuferverbindungen einiger Norisoprenoide, darunter TDN, VS und Rieslingacetal ineinander umgewandelt werden können.<sup>11</sup> Die Vielzahl an Hefestämmen, die nach jahrzehntelanger Forschung und Selektion verfügbar sind, unterscheiden sich stark in ihrem Stoffwechsel und werden nach unterschiedlichen Präferenzen in der Weißweinproduktion eingesetzt.<sup>22,201,237</sup> Zusätzlich kann der Hefemetabolismus durch die Veränderung äußerer Parameter beeinflusst werden. Neben der allgemeinen, schwierig zu beeinflussenden Zusammensetzung des Mostes spielen hier vor allem die Gärtemperatur, der pH-Wert und die Verfügbarkeit von Stickstoffverbindungen eine maßgebliche Rolle.<sup>238-243</sup> Dadurch ergeben sich Möglichkeiten, die Gehalte an TDN-Vorläufern zu verringern, allerdings besteht die Gefahr, dass neben der beabsichtigten Reduktion der TDN-Gehalte andere unerwünschte Nebenreaktionen auftreten, die sich auf die Qualität der erzeugten Weine niederschlagen.

Schließlich kann das Aroma der fermentierten Weine auch durch die Weiterverarbeitung vor der Abfüllung und Lagerung gesteuert werden. Eine Filtration des Weins hat primär den Hintergrund, Trubstoffe und unerwünschte Mikroorganismen zu entfernen, um einen vorzeitigen Verderb zu umgehen,<sup>244</sup> sowie die Weinstabilität durch Entfernen kolloidaler Proteine zu erhöhen.<sup>245</sup> Gleichzeitig kann die Filtration auch negative Auswirkungen auf die Weine haben, etwa durch die Entfernung von erwünschten Polyphenolen in Rotwein,<sup>246</sup> oder die Verringerung der Aromaintensität, die in ultrafiltrierten Weinen festgestellt wurde.<sup>247</sup> Andererseits konnten von anderen Forschungsgruppen keine negativen Auswirkungen der Filtration auf das Gesamtaroma der untersuchten Weine festgestellt werden.<sup>248,249</sup> Zu beachten ist, dass durch die Filtration bereits ausgefallener Weinstein entfernt wird,<sup>244</sup> wodurch sich der pH-Wert der filtrierten Weine geringfügig erhöht, und sich die Geschwindigkeit säurekatalysierter Reaktionen verringert. Darüber hinaus können durch das in nicht-filtrierte Weinen vorhandene Hefelager unter anderem Mannoproteine, Polysaccharide, Polyphenole und Fettsäuren während der Hefe-Autolyse freigesetzt werden.<sup>250,251</sup> Während die

Polymerverbindungen flüchtige Phenole adsorbieren können,<sup>252</sup> führt eine Freisetzung von Fettsäuren im Wein zu einer Erhöhung der Ethylesterkonzentration.<sup>253,254</sup>

Eine postulierte Entfernung von glykosidisch gebundenen Aromavorläufern<sup>255</sup> durch die Filtration kann zu einer Reduktion von freien Terpenen und C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden wie TDN, VS und Linalool im Wein führen, da diese während der Lagerung aus ihren glykosidischen Vorläufern hervorgehen.<sup>256</sup>

Während der Lagerung kommt es zu säurekatalysierten Umlagerungen und Spaltungsreaktionen, die unter anderem auch zur Freisetzung von gebundenem TDN führen.<sup>12,257</sup> Diese Reaktionen werden mit steigender Temperatur stark beschleunigt und durch einen hohen Säuregehalt ebenfalls begünstigt.<sup>139,258,259</sup> Neben der höheren Reaktionsgeschwindigkeit bei wärmerer Lagerung kommt es zu einem schnelleren Erreichen, aber auch zu einer leichten Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen der Bildung und der Spaltung der im Wein enthaltenen Ester und den entsprechenden organischen Säuren und Ethanol.<sup>260</sup>

Zudem treten auch oxidative Reaktionen auf, die zu einem Abbau bestimmter Aromastoffe wie Linalool und 4-Vinylguaiaicol führen können.<sup>261,262</sup> Diese können durch bereits im Wein gelösten Sauerstoff begünstigt werden, und zusätzlich kann auch der Flaschenverschluss zum Sauerstoffeintrag in den Wein führen.<sup>263</sup>

Obwohl zunächst davon ausgegangen wurde, dass Oxidation ebenfalls die Freisetzung von TDN erleichtert,<sup>30</sup> wurde in anderen Studien kein relevanter Einfluss des Sauerstoffs auf die Freisetzungsgeschwindigkeit festgestellt.<sup>264</sup> Die Unterschiede in den TDN-Konzentrationen wurden hier vielmehr auf die Art des Flaschenverschlusses zurückgeführt. Je nach Material besteht hier eine unterschiedliche Permeationsrate für Sauerstoff,<sup>48,263</sup> zusätzlich besteht die Möglichkeit des „Scalpings“, also der Absorption von Aromastoffen durch das Material des Flaschenverschlusses.<sup>265,266</sup> Dieser Effekt kann zusätzlich noch durch die stehende oder liegende Lagerung der Flaschen durch den direkten Kontakt zwischen Wein und Verschluss beeinflusst werden.<sup>264,267</sup>

In den letzten 15 Jahren wurden technische Möglichkeiten entwickelt, um spezifische Fehlnoten aus Weinen zu entfernen. So konnten 2,4,6-Trichloranisol, 2,4,6-Tribromanisol sowie Geosmin – die für die Fehlnoten „Kork“ bzw. „erdig“ verantwortlich sind – mit speziell entwickelten Filterschichten auf einer Zeolith-Basis (Aluminat-Silikate) nahezu vollständig entfernt werden, ohne das Weinaroma gravierend zu beeinträchtigen.<sup>268,269</sup> Außerdem gelang es Behr et al., Geosmin sowie die Verbindung 1-Octen-3-on, die eine pilzartige Fehlnote hervorruft, durch die Verwendung von Aktivkohle um bis zu 92% bzw. 73% aus Wein zu reduzieren.<sup>270</sup>



## 5 Zielsetzung

Während die 1978 bestimmte Geruchsschwelle von TDN 35 Jahre später um den Faktor 10 nach unten korrigiert wurde, ist eine erneute Bestimmung der Geruchsschwelle von Vitispiran bisher nicht durchgeführt worden. Ebenso wurden bislang keine Studien an europäischen Verbrauchern zur Sensitivität und Akzeptanz gegenüber TDN durchgeführt, stattdessen existiert bisher nur eine Studie aus Neuseeland bzw. den USA, die in einer zehn- bzw. zwanzigmal höheren Wahrnehmungsschwelle resultierte, als es bei einem trainierten Panel zwei Jahre zuvor der Fall war.<sup>8,10</sup> Eine Re-Evaluierung mit dem Fokus auf hiesige Verbraucher ist angebracht, da die publizierte Ablehnungsschwelle weit über den Maximalgehalten an TDN liegt, die bisher in europäischen Rieslingen gemessen wurden. Zudem ist es von besonderem Interesse, den Einfluss der Ethanolkonzentration wie auch des Carbonisierungsniveaus zu bestimmen, da vor allem in Deutschland Rieslingwein auch als restsüßer Wein mit einem niedrigeren Alkoholgehalt und ebenso als Sekt bzw. Schaumwein vertrieben wird. Des Weiteren ist aufgrund der postulierten Möglichkeit, die in Most und Wein vorhandenen TDN- in Vitispiran-Vorläuferverbindungen umzuwandeln, eine Neubestimmung der Wahrnehmungsschwelle von Vitispiran sinnvoll. Die Untersuchungen auf diese Aspekte dienen zur Ermittlung der Effizienz der durchgeführten weinbaulichen und oenologischen Maßnahmen und zur Bewertung, ab welchem zu erwartenden TDN-Gehalt überhaupt Maßnahmen zur Minimierung erforderlich sind. Für eine bessere Bewertung der sensorischen Relevanz liegt es nahe, dass auch die Weine mehrerer Wettbewerber und ihre Gehalte an TDN und Vitispiran herangezogen und untersucht werden. Dafür wird zunächst eine hausinterne Methode zur Bestimmung der freien Analyten implementiert, ebenso wird für die Bestimmung der Gehalte an gebundenen TDN- und Vitispiranvorläufern eine Schnellmethode am Forschungsstandort etabliert.

In der Vergangenheit wurden bereits von anderen Forschungsgruppen Maßnahmen evaluiert, die beispielsweise durch Beschattung eine Verringerung der TDN-Gehalte erreicht haben. Genauso wie eine generelle Verringerung der Sonneneinstrahlung scheint auch der Zeitpunkt der durchgeführten weinbaulichen Maßnahmen eine Rolle bei der Biosynthese von Carotinoiden und C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden zu spielen. Eine Entblätterung ist allerdings aus phytosanitären Gründen zur Fäulnisvermeidung sinnvoll; es ist daher erforderlich, die in den USA ermittelten Ergebnisse auch in Mitteleuropa zu evaluieren. Neue Untersuchungen und Re-Evaluierungen sind vor allem im Hinblick darauf wichtig, dass in Deutschland bezüglich des optimalen Zeitpunkts der Entblätterung bereits gegenteilige Ergebnisse beobachtet wurden, dies aber ausschließlich aus einjährigen Studien hervorgeht. Angesichts starker saisonaler Wetterschwankungen ergibt sich daher die Notwendigkeit, mehrjährige Untersuchungen durchzuführen.

Neben saisonal einsetzbaren weinbaulichen Maßnahmen wie der Beschattung oder Entblätterung scheint grundsätzlich auch die Wahl der Unterlage den Metabolismus der Pflanzen zu beeinflussen. Da dies bisher noch nicht im Hinblick auf die Ausbildung des TDN-Potentials geschehen ist, beschäftigt sich ein Teil dieser Arbeit mit der Untersuchung der Rolle der Rebstockunterlage. Ebenso wie die Unterlage können sich die genetischen Unterschiede der eingesetzten Rieslingklone auf die TDN-Bildung auswirken. Frühere Klonzüchtungen haben sich auf die Selektion ertragreicher Varianten wie N90 fokussiert, wohingegen neuere Züchtungen aus Geisenheim (z.B. Gm312) oder dem Elsaß (z.B. Klon B1090) das Ziel haben, Klone mit einer aufgelockerten Traubenarchitektur zu erzeugen. Die lockere Struktur, die sowohl durch die verringerte Anzahl an Infloreszenzen pro Traube als auch durch kleinere Beeren verursacht wird, führt neben einer höheren Beerengesundheit auch dazu, dass die einzeln sitzenden Beeren eine höhere Sonnenlichtexposition erfahren; außerdem besitzen kleinere Beeren ein höheres Verhältnis von Schalenanteil zu Fruchtfleisch als große Beeren. Da die Konzentration der gebundenen  $C_{13}$ -Norisoprenoid-Vorläufer in den Schalen der Weinbeeren deutlich höher als im Fruchtfleisch ist, kann sich hieraus ein erhöhtes TDN-Bildungspotential ergeben. Daher wird in dieser Arbeit die Verbindung zwischen der Beerengröße, der Lockerheit der Trauben und dem jeweiligen Rieslingklon untersucht, ob und in welchem Ausmaß sich festgestellte Unterschiede in den Gehalten an  $C_{13}$ -Norisoprenoiden auf rein physiologische Unterschiede zwischen den Rieslingklonen zurückführen lassen. Auffällig ist, dass in den meisten bisherigen Studien saisonale Effekte nicht berücksichtigt sind, die sich zwischen den einzelnen Jahrgängen stark unterscheiden können. Folglich ist es überaus wichtig, den Einfluss der Unterlage, des Rieslingklons und der saisonalen weinbaulichen Maßnahmen über mehrere Jahrgänge hinweg zu evaluieren.

Neben den weinbaulichen Maßnahmen, deren optimaler Einsatz von Saison zu Saison aufgrund unterschiedlicher Witterungsbedingungen variieren kann, haben auch Maßnahmen bei der Weinverarbeitung, die erst nach der Beerenlese zum Einsatz kommen, einen großen Einfluss auf die Qualität der Weine. In dieser Arbeit wird zunächst der Einfluss der Mostgewinnung beleuchtet, da aufgrund der Erfahrungen aus der Champagnerproduktion davon ausgegangen werden kann, dass sich Fraktionen, die bei unterschiedlichem Pressdruck gewonnen werden, sich in ihrer Zusammensetzung stark unterscheiden. Diverse Forschungsgruppen haben gezeigt, dass unterschiedliche Hefestämme während der Fermentation das Potential haben, den Gehalt an TDN-Vorläufern im resultierenden Wein zu reduzieren. Da für den Hefemetabolismus eine Vielzahl von Einflussfaktoren eine Rolle spielen, werden in dieser Arbeit Parameter wie pH-Wert, Umgebungstemperatur, und der Einfluss der Nährstoffversorgung des Mostes auf den TDN-Gehalt und andere Aromastoffe der resultierenden Weine in mehreren Jahrgängen untersucht. Bereits lange ist bekannt, dass die Freisetzung von TDN und damit die Ausbildung der Petrolnote durch einen niedrigen pH-Wert und hohe Temperaturen begünstigt werden. Zusätzlich können weitere Einflussfaktoren

wie die Wahl des Flaschenverschlusses und der Lagerungsposition für die Zusammensetzung der Weine eine Rolle spielen. Deswegen wird der Einfluss dieser Parameter auf die hergestellten Weine im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht. Zusätzlich wird eine ganzheitliche Betrachtung angestrebt, sodass die produzierten Weine nach Möglichkeit neben der chemischen Analyse ebenfalls sensorischen Bewertungen unterzogen werden, um ausschließen zu können, dass die durchgeführten Maßnahmen zu negativen Beeinträchtigungen der Weine führen, die mit der zielgerichteten chemischen Analytik nicht erfasst werden. Diese Arbeit leistet daher eine umfassende Betrachtungsweise auf die das Gesamt-Aromaprofil von Rieslingwein.

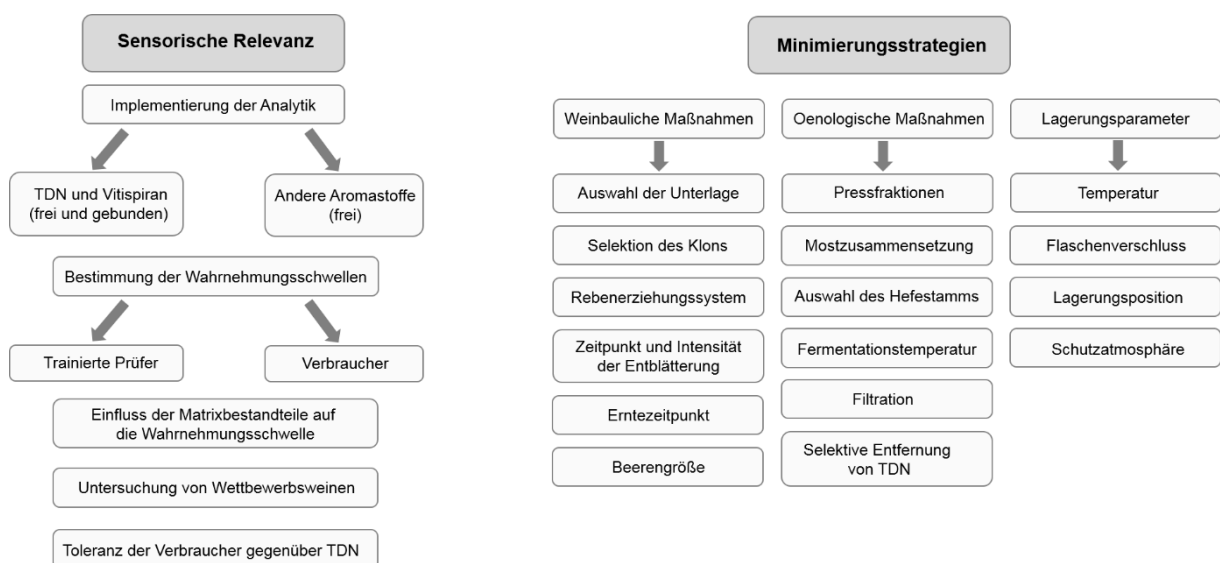


Abbildung 17: Zielsetzung der Arbeit



## 6 Kumulativer Teil der Dissertation

### 6.1 Originalarbeit zum Thema sensorische Relevanz von TDN

Einfluss von Matrixvariablen und Expertise von Verkostern auf die Geruchsschwellenwerte von 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin (TDN), bekannt als Petrol-Fehlnote in Rieslingweinen

Im Zuge des Klimawandels ist mit dem Anstieg warmer Jahre in Mitteleuropa auch mit einem vermehrten Auftreten der Petrolnote in Rieslingweinen zu rechnen, die von 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin (TDN) verursacht wird. Daher ist es auch aus ökonomischen Gesichtspunkten notwendig, die Schwellenwerte zu bestimmen, ab denen die Petrolnote wahrgenommen werden kann, und ab welcher TDN-Konzentration es zur Ablehnung der Weine durch Verbraucher kommt.

Der Einfluss des Alkoholgehalts und des Carbonisierungsniveaus auf die Geruchsschwellen ist auch deswegen wichtig, da auf dem deutschen Markt häufig restsüße Rieslingweine mit einem niedrigeren Alkoholgehalt angeboten werden, und Rieslingwein oft als Grundlage für die Herstellung von Schaumweinen dient. Während die Carbonisierung in einer wässrigen Matrix zu einer Verdoppelung der Wahrnehmungsschwelle von TDN führte, konnte für Wein kein Unterschied ermittelt werden. Eine Erhöhung des Alkoholgehalts der Weine von 8% auf 14% verursacht nur einen geringen Anstieg der Wahrnehmungsschwelle von 1,8 auf 2,4 µg/L. Die Wahrnehmungsschwelle von Verbrauchern lag mit 14,7 µg/L um den Faktor fünf über der von geschulten Verkostern, zusätzlich beeinflusst vom Geschlecht der 156 Verbraucher, die an der Studie teilgenommen haben. Dagegen lag die Ablehnungsschwelle mit 60 µg/L zwar deutlich über der Wahrnehmungsschwelle, aber erheblich unterhalb der bisher berichteten Ablehnungsschwellen von 82 (USA) beziehungsweise 157 µg/L (Neuseeland). Vergleicht man die analytischen Daten von über 250 Wettbewerbsweinen mit den ermittelten Geruchsschwellen, so lag die Hälfte der Weine über der Wahrnehmungsschwelle von geschulten Verkostern, und bei immerhin 15% der Weine hätten auch Verbraucher einen Unterschied aufgrund der TDN-Konzentration bemerkt.

#### Hinweis zum Copyright

Reprinted with permission from M. Ziegler, R. Gök, P. Bechtloff, P. Winterhalter, H.-G. Schmarr, U. Fischer: Impact of matrix variables and expertise of panelists on sensory thresholds of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene known as petrol off-flavor compound in Riesling wines, Food Quality and Preference, 78, 103735, 2019.  
Copyright © Elsevier Ltd. 2019

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0950329318309303>

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.103735>



Contents lists available at ScienceDirect

## Food Quality and Preference

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodqual](http://www.elsevier.com/locate/foodqual)

## Impact of matrix variables and expertise of panelists on sensory thresholds of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene known as petrol off-flavor compound in Riesling wines

Michael Ziegler<sup>a,b</sup>, Recep Gök<sup>c</sup>, Pia Bechtloff<sup>c</sup>, Peter Winterhalter<sup>c,2</sup>, Hans-Georg Schmarr<sup>a,d</sup>, Ulrich Fischer<sup>a,b,\*,1</sup><sup>a</sup> Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Institute for Viticulture and Oenology, Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße, Germany<sup>b</sup> Kaiserslautern University of Technology, Department of Chemistry, Erwin-Schrödinger-Straße 52, 67663 Kaiserslautern, Germany<sup>c</sup> Technische Universität Braunschweig, Department of Life Sciences, Institute of Food Chemistry, Schleinitzstraße 20, 38106 Braunschweig, Germany<sup>d</sup> University Duisburg-Essen, Faculty for Chemistry, Instrumental Analytical Chemistry, Universitätsstraße 5, 45141 Essen, Germany

## ARTICLE INFO

## Keywords:

TDN  
Vitispirane  
Riesling wine  
Odor detection threshold  
Ethanol  
Carbonation  
Consumer rejection  
Gas-liquid partition coefficient

## ABSTRACT

1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) is known to elicit the perception of “petrol off-flavor” in wine, most prominent in the variety Riesling. This study was focused on the impact of matrix variables such as ethanol and carbonation on the odor detection threshold of TDN. Increasing carbonation nearly doubled the detection threshold in water, however, this effect could not be observed in alcoholic matrices. Ethanol enhanced detection thresholds presumably due to diminished volatilization, which was only partially supported by measurement of partition coefficients using GC–MS. Overall, the impact of matrix changes was small ranging from 1.1 µg/L in still water to 4.0 µg/L in Riesling sparkling wine. Consumer detection threshold of 14.7 µg/L TDN determined with 156 consumers exceeded the threshold of the trained panel by a factor of five and varied by consumers’ age and gender. Rejecting a Riesling wine due to its petrol off-flavor, 60 µg/L TDN were required in a young and 91 µg/L in an eight-year-old Riesling wine. Based on analytical data for more than 250 commercial Riesling wines, geographic origin and to a smaller extent wine age contributed to large differences in TDN concentrations. About half of the investigated wines exceeded the detection threshold of the trained panel, whereas consumers would have noticed TDN in only less than 15% of the Riesling wines. Merely 3% of the wines actually exceeded the consumer rejection threshold of TDN. For both, detection and consumer rejection thresholds, the applied methodology contributed considerably to the final values, which is discussed critically.

## 1. Introduction

One of the most controversial flavor compounds in Riesling wines is 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN), which exhibits a kerosene- and petrol-like off-flavor (Simpson, 1978a). Adding increasing amounts of TDN to non-oaked Chardonnay wine, revealed that intermediate TDN levels between 10 and 30 µg/L misled wine experts to classify the Chardonnay as a typical Riesling wine (Acree, Williams, & Sacks, 2010). Below 10 µg/L, fruity aspects of the wine were masked, while above 30 µg/L the petrol off-flavor was perceived. Thus, TDN is an ambiguous aroma compound, defining the varietal character of Riesling wine but also constituting a repelling taint (Acree et al., 2010).

TDN and the biosynthetically related vitispirane (VS, 2,10,10-trimethyl-6-methylen-1-oxaspiro[4.5]dec-7-ene) are predominantly found in Riesling wines, with VS exhibiting a camphraceous, eucalyptus odor (Simpson, 1978b). They are known degradation products of grape derived carotenoids (Simpson & Miller, 1983; Winterhalter, 1991; Marais, Van Wyk, & Rapp, 1992; Mendes-Pinto, 2009). Lowering the sun exposure of grapes leads to a reduction in TDN and VS concentrations (Marais et al., 1992; Gerdes, Winterhalter, & Ebeler, 2002; Kwasniewski, Vanden Heuvel, Pan, & Sacks, 2010), while aging of wines will increase their concentration, triggered by low wine pH and elevated temperatures (Marais et al., 1992; Rudy, 2015). In European Riesling wines TDN concentrations range from 0.5 up to 22 µg/L and up

\* Corresponding author at: Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Institute for Viticulture and Oenology, Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße, Germany.

E-mail address: [ulrich.fischer@dlr.rlp.de](mailto:ulrich.fischer@dlr.rlp.de) (U. Fischer).

<sup>1</sup> Orcid ID: [orcid.org/0000-0003-1566-8516](https://orcid.org/0000-0003-1566-8516).

<sup>2</sup> Orcid ID: [orcid.org/0000-0003-3417-6023](https://orcid.org/0000-0003-3417-6023).

<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.103735>

Received 13 December 2018; Received in revised form 5 June 2019; Accepted 2 July 2019

Available online 03 July 2019

0950-3293/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.



to 12 µg/L for VS (Ferreira & Guedes de Pinho, 2003; Schuettler, Friedel, Jung, Rauhut, & Darriet, 2015). In warmer climates Black et al. (2012) reported a concentration range for TDN of 2–255 µg/L in Australian Riesling wines whereas Marais and coworkers report a range of 3–55 µg/L for Riesling wines from South Africa (Marais et al., 1992). Within the last 35 years, the maturation of German Riesling grapes has shifted forward by four weeks, mainly due to the effects of climate change. Grapes are thus exposed to warmer temperatures and more intense sunlight exposure (Schultz, 2000; Van Leeuwen & Darriet, 2016), increasing the potential for TDN and VS formation in Riesling grapes even when grown in cool climates.

Forty Years ago, Simpson published odor thresholds of 20 µg/L for TDN and 800 µg/L for VS presumably in Riesling wine, applying the method of Meilgaard for determining the odor threshold (Simpson, 1978a; Simpson, Strauss, & Williams, 1977; Meilgaard, 1975).

In a recent study, Sacks and coworkers determined a 10 times lower detection threshold of 2 µg/L by using spiked model wine and non-oaked Chardonnay in 250 mL Teflon sniff bottles, applying a three alternative forced choice (3-AFC) test and calculation according to ASTM (American Society for Testing and Materials) E679-04 (Sacks et al., 2012). In a recent study, two cohorts of 36 consumers from New Zealand (NZ) and the State of Washington (US) were selected due to their consumption of 2 to 5 wine drinks per week and affinity for Riesling wines. Using two different one-year-old Riesling wines from New Zealand consumer detection thresholds of 20.6 (NZ) and 18.2 µg/L (US) were determined applying the 5% significance criterion to calculate the group threshold (Ross, Zwink, Castro, & Harrison, 2014). Applying the best estimate threshold method according to ASTM E679-04 (BET), detection thresholds for TDN increased to 35.8 (NZ) and 37.6 µg/L (US). The same study determined via a replicated paired preference test with the same cohorts consumer rejection thresholds of 157.4 (NZ) and 82.4 µg/L (US). According to these values most of the warm climate Riesling wines would not be rejected by consumers, despite of their much higher TDN levels than those found in European Riesling wines (Gök, 2015). Although Europe comprises with 54,000 ha nearly 75% of the worldwide cultivation of Riesling (Deutsches Weininstitut, 2017/2018), no studies have so far been conducted regarding the sensitivity and rejection of European consumers towards TDN levels in Riesling wine. At the same time a wide array of wine styles are produced from Riesling grapes, such as sparkling wines with up to 6 bar of CO<sub>2</sub> or sweet wines, having alcohol levels between 5.5 and 10 vol%. Thus, the impact of carbonation and ethanol content on the detection thresholds of TDN and VS are of vital interest to the wine industry and the wine trade. So far, the impact of the wine constituents such as ethanol, glucose, glycerol, pH, catechin and proline on the headspace partitioning of aroma compounds have only been studied by analytical means (Fischer, Fischer, & Jakob, 1996; Robinson et al., 2009). Information regarding the modification of sensory thresholds by wine matrix variables are thus limited. Whilst studies on the impact of matrix variables on odor thresholds focus primarily on ethanol and on major flavor compounds with a higher polarity than TDN (e.g. aldehydes, alcohols, esters), the results in the literature are heterogeneous. Addition of ethanol most often diminishes volatility of the investigated flavor compounds and thus elevates odor thresholds (Villamor, Evans, Mattinson, & Ross, 2013). However, for some aroma compounds the adverse effect was reported (Le Berre, Atanasova, Langlois, Etievant, & Thomas-Danguin, 2007; Goldner, Zamora, Lira, Gianninoto, & Bandoni, 2009; Ickes & Cadwallader, 2017; Peltz & Shellhammer, 2017). Therefore, analytical investigation of the matrix impact on the volatility of TDN and VS was conducted, utilizing the phase variation method (Ettre, Welter, & Kolb, 1993). This method is based on the principle that the reciprocal peak area of an analyte and the phase ratio of liquid and gas phase in a sample vial relate to each other. This can be used to determine the partition coefficient – represented by the distribution ratio of an analyte between the liquid sample phase and the headspace phase – via equilibrium headspace gas chromatography (HS-GC).

The impact of carbonation on aroma perception has been investigated most notably in model systems with a limited quantity of aroma compounds like alcohols or esters. While carbonation fostered aroma release in some of the studied compounds, no effect was observed for others (Clark, Linforth, Bealin-Kelly, & Hort, 2011; Saint-Eve et al., 2009).

In order to close this knowledge gap, this research study investigated the impact of different matrices on the detection thresholds of TDN by varying ethanol and carbonation in concentrations relevant for wine and applying four different methods to determine detection thresholds (Roessler, Pangborn, Sidel, & Stone, 1978; Lawless, 2010; ASTM E1432-04, 2011a; ASTM E679-04, 2011b). Furthermore, odor detection thresholds of German consumers were established and their rejection thresholds were determined in one- and eight-year-old Riesling wines to study the influence of a young versus a bottle-aged wine matrix. Relevance of the obtained thresholds will be discussed in context of the TDN and VS concentrations determined in a wide array of 250 commercial Riesling wines that were taken from the entries of three international wine competitions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sensory matrices for detection and rejection threshold determination

Odor detection and rejection thresholds were determined in local tap water, carbonized tap water (CO<sub>2</sub> pressure of 2.6 or 5.9 bar, respectively), model wine (CO<sub>2</sub> pressure of 0.0, 2.4, and 5.8 bar), 2015 Riesling wine (native CO<sub>2</sub> pressure, 2.3 and 5.8 bar) and a 2014 Riesling sparkling wine (CO<sub>2</sub> pressure of 6.2 bar). Tap water was used because it is frequently monitored according to the German drinking water authorities and is free of any foreign odors, which may be present in bottled water. Distilled water was not used because it differs regarding its ionic strength much more from wine than tap water does. Ionic strength as such has and impact on aroma volatilization and we tried to minimize this effect. Both, the still wine and sparkling wine were provided by the Henkell Sparkling Winery in Wiesbaden, Germany. The sparkling wine was made according to the EU wine laws, requiring a minimum of 9 month contact time with the yeast lees. Thus, a vintage difference of one year between the still wine prior secondary fermentation and finished sparkling wine was inevitable. The levels of CO<sub>2</sub> in the samples were determined with a CarboQC instrument (Anton Paar GmbH, Graz, Austria). Consumer detection threshold was investigated in a one-year-old Riesling wine (vintage 2015), and rejection thresholds in the same Riesling wine and an eight-year-old Riesling wine (vintage 2008), which was stored at 12 °C in the wine library of the Staatsweingut Neustadt an der Weinstraße, Germany. Chemical data of the wines is displayed in Table 1. Following the specifications of Sacks et al. (2012) the model wine consisted of 10 g/L tartaric acid, 12 vol% ethanol, and was adjusted to a pH of 3.0 using 1 N sodium hydroxide. All samples were presented in INAO glasses at 15 °C with a sample volume of 30 mL.

### 2.2. Sensory panels

Detection thresholds of TDN and VS in different matrices were

**Table 1**  
Basic chemical composition data of Riesling wines used for threshold determination.

	Ethanol [vol%]	residual sugar [g/L]	titratable acidity [g/L]	pH	TDN [µg/L]
Model wine	12.0	0	10.0	3.0	0.0
2015 Riesling wine	12.0	1.6	7.8	3.1	0.3
2014 sparkling wine	11.5	2.6	7.9	3.0	0.4
2008 Riesling wine	11.2	8.9	7.6	3.1	5.0

determined by a panel of 14 female and 13 male judges in total with a minimum attendance of 15 persons (19–64 years, average 41 years). All of them had experience with sensory evaluation of wine, although most of them had no experience in determining detection thresholds of TDN or VS.

156 Consumers (86 male and 70 female, 18–68 years, and average 38 years) participated in the determination of the detection threshold. Rejection thresholds were established in an one-year old Riesling wine using 120 consumers (68 male and 52 female, 19–68 years, and average 48 years), while 69 consumers (24 female, 45 male, 23–67 years, average 47 years) participated in determining the rejection threshold in an eight-year old Riesling wine. All subjects were visitors of the open house day at the DLR Rheinpfalz (3rd and 4th September 2016), indicated to regularly consume wine and showed interest in sensory evaluation of wine. In order to prevent any presumption regarding the petrol off-flavor, which is a typical sensory trait of Riesling wines, we did not inquire any liking or consumption of Riesling wines in particular. Thus we could not identify those consumers who may have shown an aversion towards Riesling wines in general. Still, consumers compared original Riesling and TDN spiked Riesling wines and their individual choice was presumably made independent on their overall preference for Riesling wines. The study was conducted in an odor-free, well-lit room with an ambient temperature of 21 °C that was equipped according to ISO13301 (ISO 13301:2002E, 2002).

### 2.3. Determination of odor thresholds

#### 2.3.1. Determination of detection thresholds of TDN and VS

Detection thresholds of the trained panel were determined according to ASTM E679-04 using a 3-AFC test (ASTM E679-04, 2011b). The actual protocols were as follows: TDN concentrations in the wine samples increased from 0.3, 1, 3, 10 to 30 µg/L for the water or model wine matrix, and from 1, 3, 10, 30, to 100 µg/L for the Riesling wine and sparkling wine, respectively. VS concentrations varied from 3, 10, 30, 100 to 100 µg/L in water, and from 10, 30, 100, 300 to 1000 µg/L in wine and sparkling wine. They were presented in an ascending staircase with a randomized order of the control and the spiked samples for each concentration step. For every variant, a repetition was conducted on a different day, and the judges continued every series to the highest concentration. To avoid the panelists' fatigue, only two different variants were evaluated per session. Best Estimate Threshold (BET) values were determined from the results of the 3-AFC tests by calculating the geometric mean of the highest concentration giving a false response and the adjacent lowest concentration yielding the first correct response (ASTM E679-04, 2011b). When the judge gave a correct answer at the lowest presented concentration, the geometric mean of this concentration and the next lower one were used for the BET calculation, according to Peng, Jaeger, and Hautus (2012). For wines a lower concentration was not possible due to the native content of 0.3 and 0.4 µg/L TDN in the Riesling wine and sparkling wine, respectively. For each replication the group BET was calculated based on individual BETs, and finally the mean of both replications determined. Alternatively, we applied the 50% above chance criterion for the determination of detection thresholds (Lawless, 2010). Here the proportion of panelists' correct answers for each concentration step were calculated and plotted against the logarithm of the TDN concentration. The detection threshold was defined as the intersection point of the obtained regression line with the level of 67% correct answers and the logarithm of the TDN concentration. Confidence interval was set to 95% and applied to the regression line to determine the upper and lower limit of the confidence interval. Finally, the ASTM E1432-04 method was applied to determine the detection threshold. This approach also uses the 67% proportion of correct answers criterion to determine the odor threshold, but the regression is non-linear using the turning point of a sigmoidal curve as criterion for the odor threshold (ASTM E1432-04, 2011a).

#### 2.3.2. Determination of consumer detection thresholds of TDN

Consumer detection threshold were determined in the same manner as the thresholds in Section 2.3.1 using the 3-AFC test in ascending staircases of concentrations of 1, 3, 10, 30 and 100 µg/L. In order to compare our thresholds with the publication of Ross et al. (2014), the detection threshold was also defined as the concentration which yielded a significant number of correct answers ( $p < 0.05$ ) as suggested by Prescott, Norris, Kunst, and Kim (2005). Odor activity values (OAV) were calculated by dividing the analyzed concentration of TDN by the detection threshold in the appropriate matrix (Grosch, 1993). TDN concentrations were determined from the headspace above the wine, similar to odor perception by humans, using a stable isotope of TDN for exact quantification purpose. Dividing TDN concentrations by the detection threshold of consumers, we were able to report for the first time odor significance values (OSV).

#### 2.3.3. Determination of consumer rejection thresholds of TDN

Consumer rejection thresholds were determined by a paired preference test where the native wine and a spiked sample were presented to the panelists in an ascending order of TDN concentrations, following the method described by Prescott and coworkers for the musty trichloroanisole in wine (Prescott et al., 2005). Consumers were asked to select the wine from the pair they prefer. As TDN concentrations increase during aging, its petrol flavor is often associated with aged wines. Thus, we determined the TDN rejection threshold also in an aged Riesling wine. Concentrations of the young 2015 Riesling wine were 3, 10, 30, and 100 µg/L, and 10, 30, 100, and 300 µg/L for the aged 2008 wine. Following Lawless (Lawless, 2010), the consumer rejection threshold is equal to the TDN concentration at which 75% of the panelists rejected the spiked wine, according to the 50% above chance criterion. Dividing TDN concentrations by the rejection threshold of consumers, we were able to report odor rejection values (ORV) for the first time.

### 2.4. Benchmarking of common wines

#### 2.4.1. Samples

TDN concentrations were measured in 52 wines from the competition "Best of Riesling 2016" (vintage range from 2002 to 2015, mean age 3.5 years), in 97 wines from the competition "Mundus Vini 2016 – Spring Tasting" (vintages 2001–2015, mean age 2.1 years) as well as in 112 wines from the competition "Mundus Vini 2016 – Summer Tasting" (vintages 2009–2015, mean age 1.7 years). The wines and information regarding country of origin and vintage as well as analytical data (alcohol content, residual sugar, and titratable acidity) were provided by the organizer of the wine competitions (Meininger Verlag GmbH, Neustadt an der Weinstraße, Germany). In total, 197 wines were from Germany, 62 wines from other European countries and 2 from Australia.

#### 2.4.2. Gas chromatographic analysis of TDN and VS by HS-SPME-GC-MS

Based on the SIM method described by Gök et al. (2019), quantitative analyses of TDN and VS in the commercial wines were conducted by headspace solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). Quantification was performed via a stable isotope dilution assay (SIDA) using deuterated standards of TDN and VS. Modifications are stated as followed: A saturated aqueous sodium chloride solution ("brine") was prepared in tap water. In a 20 mL headspace vial with a screw cap and a PTFE-lined silicone septum (CZT, Kriftel, Germany), 8 mL of brine and 2 mL of sample wine were mixed. Subsequently, 10 µL of an ethanolic solution of deuterated analytes (5,7,8-trideuterio-1,1-dimethyl-6-(trideuteriomethyl)-2H-naphthalene; TDN-d<sub>6</sub>, 3,3-dideuterio-6,6-dimethyl-10-methylene-2-(trideuteriomethyl)-1-oxaspiro[4.5]dec-8-ene; VS-d<sub>5</sub>) were added via a microliter syringe, resulting in a final concentration of 1.1 µg/L TDN-d<sub>6</sub> and 4.1 µg/L VS-d<sub>5</sub>. HS-SPME was carried out with a Combi PAL



**Table 2**

Detection thresholds of TDN and vitispirane in matrices water, model wine and Riesling wine varying in carbonation or ethanol content using duplicated 3-AFC tests and threshold calculation according to ASTM E679-04 (2011b). BET = Best Estimate Threshold value, UL = upper, and LL = lower limit of 95% confidence interval, respectively.

	Carbonation level [bar]	TDN BET [ $\mu\text{g/L}$ ]	Upper limit [ $\mu\text{g/L}$ ]	Lower limit [ $\mu\text{g/L}$ ]	n	Vitispirane BET [ $\mu\text{g/L}$ ]	UL [ $\mu\text{g/L}$ ]	LL [ $\mu\text{g/L}$ ]	n
Water	0.0 <sup>2</sup>	1.1	1.6	0.7	16	25.9	42.1	15.9	18
Water	2.5	1.3	2.0	0.9	18				
Water	6.0	2.0	2.7	1.4	15				
Model wine	0.0 <sup>2</sup>	1.5	1.9	1.1	19				
Model wine	2.5	1.6	2.3	1.1	20				
Model wine	6.0	1.5	2.2	1.0	20				
Riesling wine <sup>1</sup>	0.0 <sup>2</sup>	2.3	3.1	1.8	21				
Riesling wine	2.5	2.4	3.1	1.8	22				
Riesling wine	6.0	2.2	2.9	1.6	22				
Riesling wine 8%	0.0 <sup>2</sup>	1.8	2.5	1.3	21				
Riesling wine 10%	0.0 <sup>2</sup>	2.1	2.8	1.4	20				
<b>Riesling wine 12%<sup>1</sup></b>	<b>0.0<sup>2</sup></b>	<b>2.3</b>	<b>3.1</b>	<b>1.8</b>	<b>21</b>	<b>101.0</b>	<b>149.1</b>	<b>68.4</b>	<b>16</b>
Riesling wine 14%	0.0 <sup>2</sup>	2.4	3.2	1.8	20				
Riesling sparkling wine	6.0	4.0	6.0	2.5	22	151.3	266.7	85.8	17

Bold italics refers to the native wine which yields the most representative thresholds for dry Riesling wines.

<sup>1</sup> Identical.

<sup>2</sup> Native pressure.

autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland), using the agitator module of the autosampler for incubation and extraction. Samples were incubated for 5 min at 40 °C and then extracted for 20 min with the SPME fiber (1 cm PDMS, 100  $\mu\text{m}$  df, CTC Analytics AG) at the same temperature. Desorption in the GC injector took place at 240 °C for 2 min using splitless mode and purged after 2 min. Prior to each sample extraction, fibers were conditioned at 250 °C for 2 min. The GC analyses were conducted with a Trace GC Ultra coupled to a Trace DSQ quadrupole mass spectrometer (both ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany). The separation column used was a 30 m  $\times$  0.25 mm i.d. fused silica capillary, coated with a 5% phenyl containing polydimethylsiloxane stationary phase of 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness (Rxi-5SilMS from Restek Corporation (Bellefonte, USA)). The temperature of the GC oven was held at 40 °C for 2 min, then programmed at 10 °C/min to 300 °C, with a final conditioning period of 5 min. Electron impact ionization (EI+) was done at 70 eV and a total ion chromatogram was generated with a range of  $m/z$  = 29–300. Extracted ion chromatograms with  $m/z$  = 157 (TDN), 163 (TDN- $d_6$ ), 192 (VS), and 197 (VS- $d_5$ ) were used for quantification, while  $m/z$  = 142 and 172 (TDN), 145 and 178 (TDN- $d_6$ ), 162 and 177 (VS), and 165 and 182 (VS- $d_5$ ) were used as qualifier ions.

## 2.5. Determination of liquid-gas partition coefficients of TDN and vitispirane

### 2.5.1. Samples

Tap water, a dry 2017 Riesling wine (Staatsweingut mit Johannergergut, Neustadt an der Weinstraße, Germany) and a model wine were used as matrices for analysis. The model wine was prepared with 1.5 g/L L-tartaric acid, 1.5 g/L D-malic acid, 1.7 g/L L-lactic acid, 15 g/L D-glucose, 15 g/L D-fructose, 6 g/L glycerol, 1 g/L 2,3-*threo*-butanediol and 100 mg/L sodium azide, 120 mL ethanol, adjusted to a pH of 3.5 with 1 M potassium hydroxide, and brought to volume (1 L) with demineralized water. Samples were spiked with diluted stock solutions of TDN and VS resulting in final concentrations of 100  $\mu\text{g/L}$  for each analyte. Volumes of 1 mL, 3 mL, and 5 mL of the sample matrices were used as liquid phase in the headspace vials resulting in liquid to gas ratios of 0.05, 0.17 and 0.31.

### 2.5.2. HS-GC utilizing the phase ratio variation method

Samples were prepared in 20 mL headspace vials (actual volume: 20.91 mL) with silicone septa and aluminum crimp caps. Automated headspace extraction was performed with a HS2000 sampler mounted on a Trace GC Ultra, equipped with a programmed temperature

vaporizing injector (PTV) and a flame ionization detector (FID); all instruments were from ThermoFisher Scientific. Headspace injection (2 mL) was performed after sample incubation at the relevant temperatures for 10 min. To determine the minimum equilibration time, 5 mL samples of each matrix were incubated for 2 min, 5 min, 10 min and 20 min. The PTV was used in split mode with a split flow of 12 mL  $\text{min}^{-1}$  and set to a constant temperature of 230 °C. GC separation occurred on a fused silica capillary (11 m  $\times$  0.32 mm i.d., coated with 0.25  $\mu\text{m}$  of DB5-MS (J&W Scientific, Folsom, USA), using hydrogen as carrier gas with a constant flow of 3 mL/min. Instrument control and data acquisition were done with Chrom-Card data system (version 2.9; ThermoFisher Scientific). Applying the phase ratio variation method described by Ettre et al. (1993), liquid-gas partition coefficients for the different matrices were calculated at three different temperatures (40 °C, 50 °C, 60 °C) and extrapolated to the temperature of 15 °C, equivalent to the sample temperature of the detection threshold determinations. For visualization reasons, partition coefficients were stated as liquid-gas partition coefficients, reciprocal to the work of Ettre and coworkers where gas-liquid partition coefficients were indicated (Ettre et al., 1993).

## 2.6. Chemicals

Ethanol ( $\geq 99.8\%$ ) was purchased from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany), L-tartaric acid (puriss.), D-glucose (puriss.), D-fructose (puriss.) were purchased from AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany), D-malic acid (p.a.), sodium azide (p. a.), potassium hydroxide (p.a.), 2,3-*threo*-butanediol (puriss.) and toluene (puriss.) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), and glycerol (p.a.) was purchased from neoLabMigge GmbH (Heidelberg, Germany). Synthesis of analytical standards (TDN, VS, and deuterated isotopologues) were described earlier (Gök, 2015). The chemical purity of TDN and VS was determined by HS-SPME-GC-MS, and the odor purity was confirmed by GC-Olfactometry.

## 3. Results

### 3.1. Detection thresholds in various matrices

The detection thresholds of TDN determined via BET of the trained panel (Table 2) revealed a moderate increase of the threshold from 1.1  $\mu\text{g/L}$  to 2.0  $\mu\text{g/L}$  due to carbonation in the water matrix. Conversely, carbonation did not modify detection thresholds using model wine and Riesling wine as a matrix. The TDN detection threshold rose

from 2.2 to 4.0 µg/L when Riesling wine with a technical carbonation of 6 bar was compared to Riesling sparkling wine with the same CO<sub>2</sub> pressure, but introduced by a secondary alcoholic fermentation throughout a nine month contact time with yeast in the bottle. The largest increment for the detection threshold from 2.3 to 4.0 µg/L occurred between the matrix of a still wine and the sparkling wine (Fig. 2). While the TDN threshold of 2.3 µg/L in a 12% vol. ethanol Riesling corresponds to the recently reported 2 µg/L (Sacks et al., 2012), the detection threshold for vitispirane of 101 µg/L in the same Riesling wine was eight times lower than the only reported threshold of 800 µg/L (Simpson, 1978b). In water, vitispirane was detected at 25.9 µg/L and its threshold was four times lower than in wine. The fact that vitispirane responded more sensitive to the matrix modification than TDN (Table 2) is presumably due to the more polar character of its molecule. However comparing the wine to the sparkling wine matrix, the detection threshold of VS rose equivalent to TDN.

Surprisingly, ethanol did not raise the TDN detection threshold substantially, as it has been reviewed for aroma compounds such as β-damascenone that increased from 0.4 µg/L in water to 50 µg/L in an aqueous solution with 10 vol% ethanol (Ickes & Cadwallader, 2017).

Increasing ethanol concentration from 8 to 14 vol% in the identical Riesling wine matrix – reflecting the variation among sweet and dry Riesling wines – raised the detection threshold of TDN only slightly from 1.8 to 2.4 µg/L. This is in accordance with the behavior of hexyl acetate, where the odor threshold increased from 4.8 to 6.4 mg/L by elevating the ethanol content from 11 to 14 vol% ethanol (Fischer et al., 1996).

Determining the liquid-gas partition coefficients of TDN at 15 °C in water and the model wine, the volatility of TDN decreased by a factor of three (Fig. 1), presumably due to the co-solvent effect of ethanol. This physical effect is more pronounced than the observed sensory modification in detection threshold. Comparing the partition threshold of the model and authentic Riesling wine, volatility of TDN increased by a factor of two, presumably due to a higher ionic strength due to a range of natural wine constituents such as cations, acids or glycerol.

Comparing all four methods described to calculate the detection thresholds in Fig. 2, those determined according to ASTM E1432-04 and Lawless (ASTM E1432-04, 2011a; Lawless, 2010) were 40–50% higher than the group BET according to ASTM E679-04 or the threshold obtained by the application of the 5% significance criterion according to Ross et al. (2014).

### 3.2. Detection and rejection thresholds of consumers

The TDN detection threshold of 14.7 µg/L recorded by 156 German consumers were nearly five times higher than the detection threshold of 3.1 µg/L (Fig. 2) determined by the trained panel in the same wine (12 vol% alc.) and applying the same calculation method (Lawless, 2010). Applying the 95% confidence interval to the regression line in Fig. 3, the extrapolation yielded an upper and lower detection limit of consumers of 8.4 and 34.6 µg/L, respectively. Applying the BET method (ASTM E679-04) yielded a similar threshold of 12.2 µg/L with a lower and upper limit of detection of 9.4 and 16.0 µg/L TDN based on the 95% confidence interval (data not shown). The application of the 5% significance criterion for statistical significance ( $p < 0.05$ ) with  $N = 156$  requested 63 correct judgments (proportion of correct answers ca. 0.4), which yielded an odor detection threshold of 3.0 µg/L.

Due to the large number of 156 subjects, we could plot frequency of individual BETs among the participating consumers (Fig. 4). Some of them were highly sensitive and their threshold of 0.55 µg/L may have been even lower, if we could have used a Riesling wine with less than 0.3 µg/L native TDN content. On the other hand the least sensitive group of 14 consumers revealed a more than 300 times higher threshold of 173 µg/L TDN.

Female consumers with a detection threshold of 8.7 µg/L TDN were nearly two times more sensitive than their male counterparts with 17.7 µg/L TDN (Fig. 5). While the gender difference corresponds with the reported general higher sensitivity of female judges (Dalton, Doolittle, & Breslin, 2002), age of the subjects was not linked with a declining sensitivity for TDN, as reported for other aroma compounds such as benzaldehyde, eucalyptol or amyl acetate (Hummel, Sekinger, Wolf, Pauli, & Kobal, 1997; Evans, Cui, & Starr, 1995).

In the young 2015 Riesling wine tasted one year after harvest, consumers rejected the TDN-spiked wine at 60 µg/L TDN, while for the eight-year-old 2008 Riesling wine the consumer rejection threshold increased to 91 µg/L TDN (Fig. 6). Again, gender had a similar impact on consumer rejection thresholds than for detection thresholds: Female panelists started to reject Riesling wine at 38 µg/L for the young, and 67 µg/L TDN for the aged Riesling wine, while males tolerated TDN concentrations up to 80 µg/L in the young and 109 µg/L in the aged Riesling wine (data not shown).

### 3.3. Sensory relevance of TDN concentrations from commercial Riesling wines

Examining a total of 207 Riesling wines, mainly from Germany,

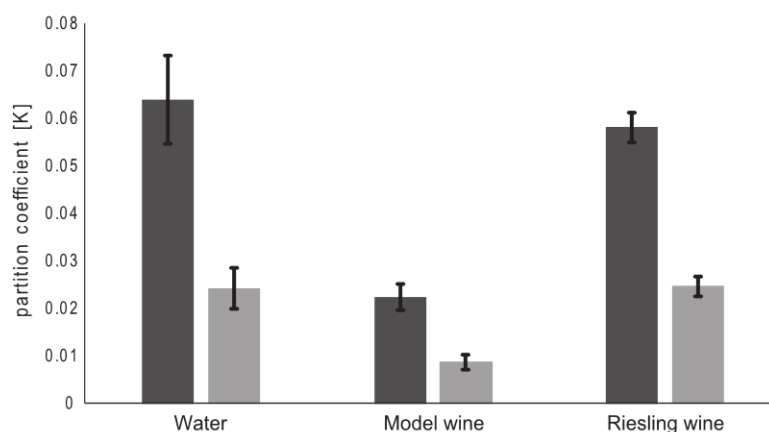


Fig. 1. Liquid-gas partition coefficients of TDN (black) and vitispirane (grey) at 15 °C and a liquid to gas ratio of 0.17, matching the ratio in INAO glasses with a 30 mL sample volume,  $n = 3$ .

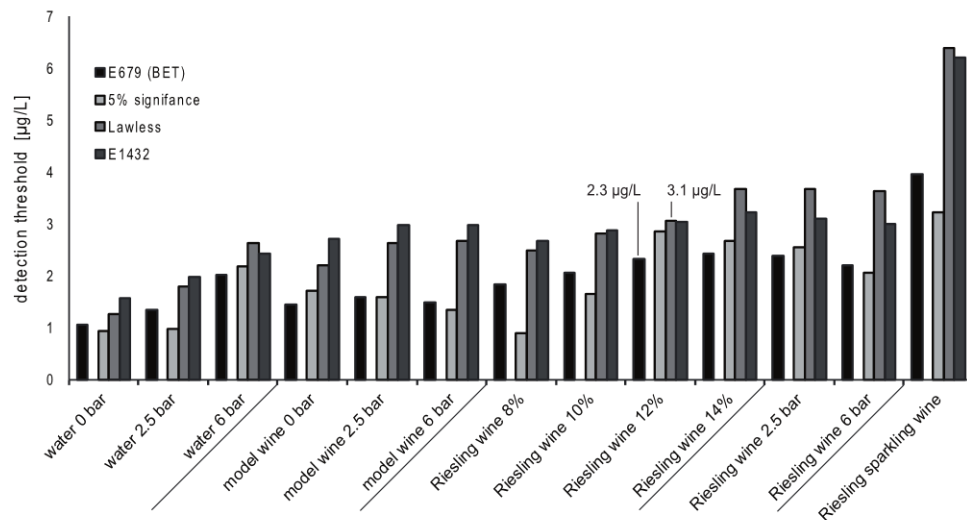


Fig. 2. Detection thresholds of TDN in various matrices using the 3-AFC, varying the method of calculation.

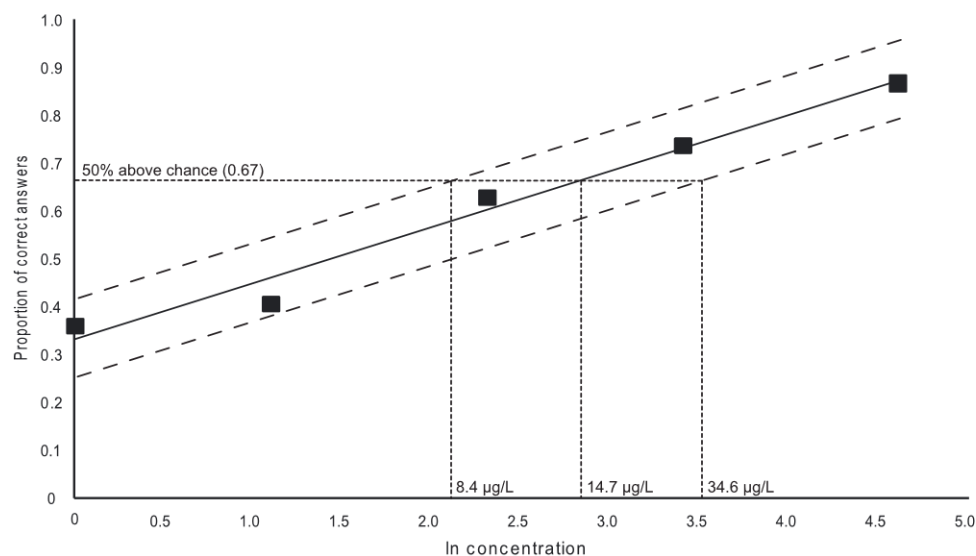


Fig. 3. Consumer detection threshold of TDN in one-year-old Riesling wine using a 3-AFC test followed by calculation according to Lawless (2010). The solid line shows the regression line of the natural logarithm (ln) of TDN concentration versus proportion of correct answers, the dotted lines represent the upper and lower limit of the confidence interval. Intersection points of the 50% above chance level and the lines represent the detection limit (solid line) and intersection with the dotted lines the upper and lower limit of the confidence interval.  $n = 156$ .

which were obtained from the international Mundus Vini Wine Award held in summer 2016, the OAV for TDN increased with wine age (Fig. 9.) However, the youngest wines from 2015 showed larger OAV than wines from the one year older 2014 vintage. Presumably the much warmer and drier vegetation period in 2015 favored TDN formation versus the more moderate year 2014. While 114 wines exceeded the TDN OAV of one, only 17 wines yielded an odor significance value above one (Fig. 9), which indicates detection of TDN by average German consumers. In contrast, none of the 207 examined wines would have been rejected by consumers, as the largest odor rejection value (ORV) was only 0.31 and thus far below one.

During the international wine competition “Best of Riesling” held in 2016 the experts were requested to rate the perceived petrol intensity of

TDN in each wine. Analyzing those 52 German Riesling wines, having at least a minor petrol flavor, all younger wines from the current vintages 2014 and 2015 revealed an OAV for TDN below one (Fig. 7). In contrast, the OAV for TDN in wines from older vintages always exceeded 1, reaching a maximum of 11. Sacks and coworkers reported similar OAV values between 1 and 8.5 in 28 Riesling wines grown in Upper New York State (Sacks et al., 2012). Replacing the detection threshold of the trained panel by the one determined by consumers, only three aged wines yielded an odor significance value (OSV) above 1. However, we have to bear in mind, that some consumers were at least as sensitive as the trained panel (Figs. 4 and 5). In contrast to the general trend, two aged Riesling wines exhibited very low TDN values, which did not correspond to elevated pH-values, which could have

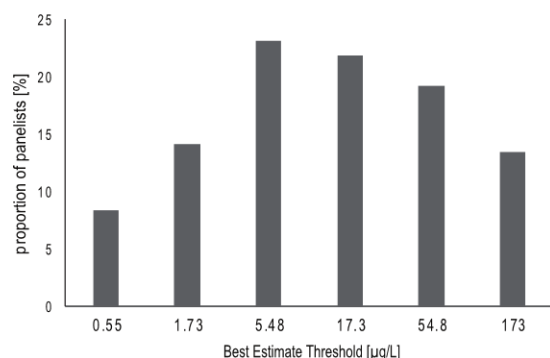


Fig. 4. Distribution of best estimate thresholds (BET) values of consumers for TDN in a one-year-old Riesling wine. Group BET was 12.2 µg/L (n = 156).

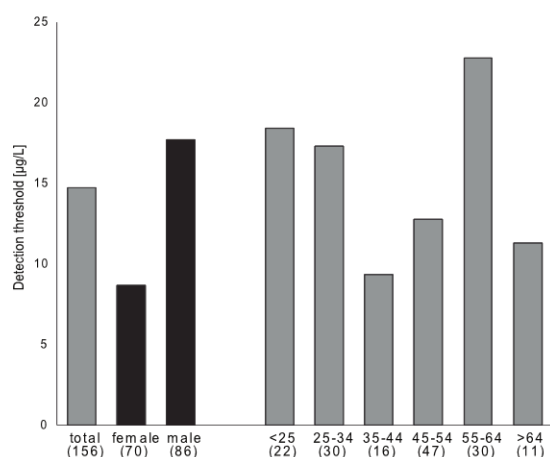


Fig. 5. Distribution of consumer detection thresholds of TDN calculated by the method according to Lawless (2010) depending on gender and age of panelists. Number of subjects per group (n) is stated in brackets.

hindered the release of TDN from its odorless precursors by acid hydrolysis. However, low TDN values may be explained by low storage temperatures, which slow down release of free TDN from their precursors (Marais et al., 1992). At the same time, in all wines vitispirane concentrations were below the OAV of one and reached a maximum value of 0.44 only, indicating no sensory relevance at all.

For a representative data set of 30 international Riesling wines, obtained from the “Best of Riesling” competition organized in 2014, free TDN concentrations varied from 9 µg to 172 µg/L (Gök, 2015), yielding an OAV above one for each wine. More than two-thirds of the wines exceeded the OSV and nine wines were even above the consumer rejection threshold (ORV) for TDN. Most notably, all six Australian Riesling wines belonged to this group as well as one Riesling wine from Germany, Austria and France, respectively (Fig. 8). Comparing these findings to the range of TDN concentrations reported by Black and coworkers from a representative study of 110 Australian Riesling wines from various regions and vintages (Black et al., 2012), the median TDN concentrations of five regions varied in the OSV from 3.0 to 7.2 and in their ORV from 0.6 to 1.4. In warmer regions such as Clare and Eden valley, more than half of the analyzed wines would exceed the consumer rejection threshold determined with consumers in Germany. Thus most of the German consumers would not only detect a petrol flavor in these Australian Riesling wines, but would even reject the majority of them. However, calculating consumer rejection values using the rejection threshold of 157 µg/L TDN determined by Ross and coworkers for New Zealand consumers, Riesling wines of only three out of five regions would exceed a value of one (Ross et al., 2014).

#### 4. Discussion

The detection threshold of TDN in the native Riesling wine with 12 vol% ethanol was similar to the 2 µg/L threshold reported by Sacks et al. (2012). This is noteworthy because Sacks and coworkers used a TDN spiked Chardonnay wine in Teflon bottles, which were squeezed by the judges to deliver the headspace into their nostrils. Thus both application methods, emulating common wine drinking habits of consumers or implementing experimental olfactometric conditions, yielded nearly identical results. This can be rationalized by the common use of a 3-AFC test and similar matrix parameters (12% vol. alcohol in dry Riesling and Chardonnay wines) but also by the fact that the petrol note of TDN is so foreign to any wine matrix, that it is easily detected. In

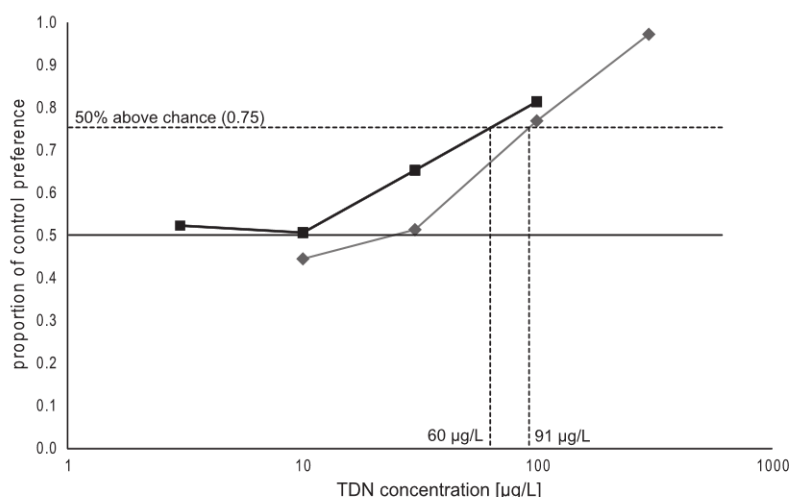
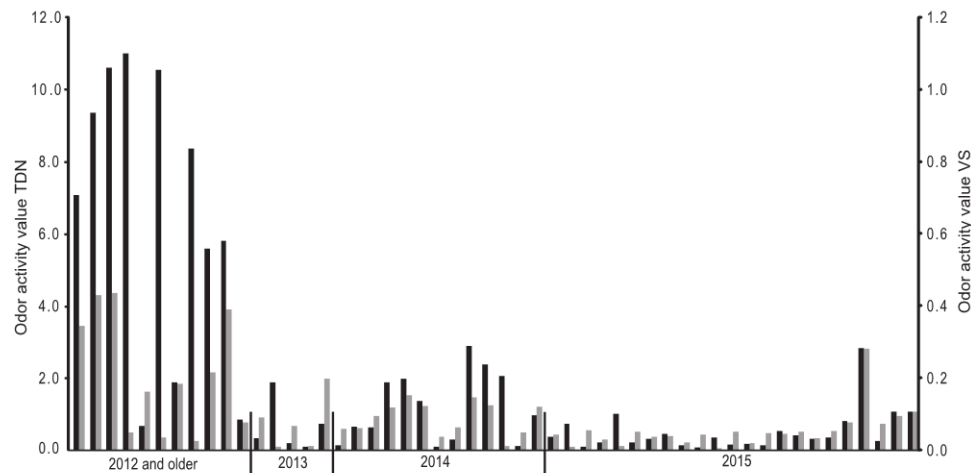
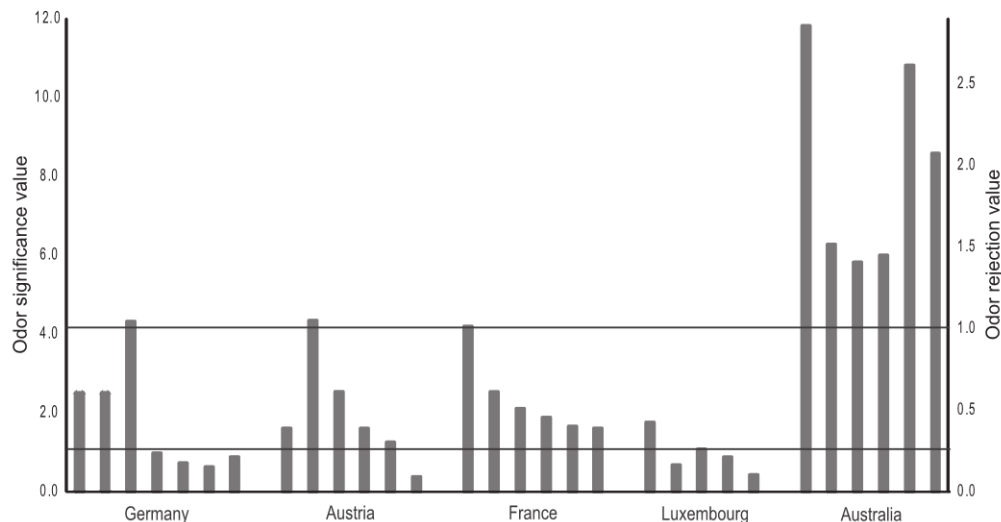


Fig. 6. Proportion of consumers' preference of a wine without adding TDN, using a 2015 Riesling wine (■) and a 2008 Riesling wine (◆) in a paired preference test. The solid line shows no preference (50%), the dashed line reflects the 50% above chance level used to assess the rejection threshold. n (2015) = 120, n (2008) = 69.



**Fig. 7.** Odor activity values (OAV) of TDN (■) and VS (■) for 52 German Riesling wines from the “Best of Riesling 2016” competition, results represent the average value with  $n = 2$  for each measurement.



**Fig. 8.** Odor significance values (OSV) and odor rejection values (ORV) for international Riesling wines from the “Best of Riesling 2014” competition, horizontal lines represented the OSV (lower line) and ORV (upper line), referring to Gök (2015).

contrast, Simpson reported a 10-times higher threshold of  $20 \mu\text{g/L}$  (Simpson, 1978a), which may be explained by the application of a different sensory method: Simpson spiked an Australian Riesling wine which had presumably a much higher TDN concentration than the extremely low value of  $0.3 \mu\text{g/L}$  analyzed in the Riesling wine used in this study. Thus it may be more likely, that Simpson determined a difference threshold rather than a detection threshold. Furthermore, he asked for an explicit recognition of the “kerosene-like” odor quality of TDN, while we asked for the odd sample within a group of three. Assuming that Simpson applied the same sensory method for the determination of the vitispirane odor threshold (Simpson, 1978b) the factor 8 between his recognition threshold of  $800 \mu\text{g/L}$  VS and the detection threshold of  $101 \mu\text{g/L}$  in this study is reasonable. Bearing that in mind, this study reports for the first time the detection threshold for vitispirane and the sensory impact of a water, wine and sparkling wine matrix.

Due to its chiral properties, vitispirane occurs as four stereoisomers

and odor thresholds of its epimers may vary as the thresholds of the four epimers of rose-oxide (4-Methyl-2-(2-methylprop-1-en-1-yl)tetrahydro-2H-pyran) range from  $0.5$  to  $160 \mu\text{g/L}$  (Yamamoto, Matsuda, Utsumi, Hagiwara, & Kanisawa, 2002). However, due to its formation by acid hydrolysis the vitispirane isomers occur naturally in almost racemic proportion (Full & Winterhalter, 1994) and not in excess of one epimer, as it is the case for enzymatically formed aroma compounds.

So far, none of the three papers reporting TDN thresholds studied the impact of carbonation or ethanol concentrations on TDN perception. Varying  $\text{CO}_2$  pressure up to 6 bar and ethanol levels between 8 and 14% vol. alc., the detection TDN threshold varied only slightly and much less than expected. The same was true for varying the matrices from water to model wine to authentic wine and sparkling wine. This small variation in odor thresholds was partially confirmed by the gas-liquid partition coefficients determined by headspace-GC-MS for TDN, which were much lower than those reported for the similar non-polar



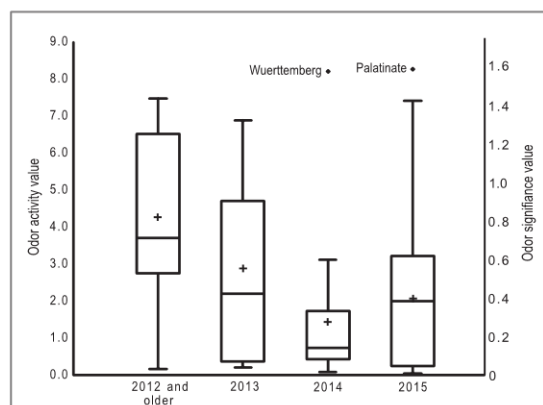


Fig. 9. Odor activity values (OAV) and odor significance values (OSV) for 207 Riesling wines from Mundus Vini 2016 wine competitions sorted by vintage. The bottom and top of the box represent the 25th and 75th percentile, respectively. The median is represented by the horizontal mark in the boxes and the mean by an (+). Wines identified as outliers are labelled.

compound  $\beta$ -damascenone (Ickes & Cadwallader, 2017). In order to explain the impact of matrix variables on odor thresholds, both, physical effects and sensory traits should be considered. Comparing the matrix water versus the model wine with 12% vol. alc., the presence of ethanol will increase the solubility of non-polar compounds such as TDN, which is indeed reflected by the three times lower gas-partition coefficient displayed in the model wine in Fig. 3. The fact that the odor detection threshold only increased from 1.1  $\mu\text{g/L}$  in water to 1.5  $\mu\text{g/L}$  in model wine with 12% vol. alc. may be due to the striking foreign odor of TDN, reminiscent of petroleum, kerosene or diesel which does not blend at all into the wine aroma as other more common aroma compounds such as fruity esters or floral monoterpenes do.

Assessing model wine versus authentic wine, the presence of salts, acids, glycerol or sugar increase the ionic strength of the liquid matrix. Thus, the overall rise in the molar concentration of dissolved compounds in the hydro-alcoholic matrix will subsequently reduce the solubility of non-polar aroma compounds, leading to their better volatilization (Mitchell, Brunton, & Wilkinson, 2011). This is reflected by the 2.5-fold increase of the gas partition coefficient for TDN in Fig. 3, which suggests a decrease in the odor threshold to a similar extent. However the opposite is the case and the odor threshold of TDN even increase by a factor of 1.5 from 1.5 to 2.3  $\mu\text{g/L}$ . Obviously, the amplifying physical effect on volatilization is superimposed by the sensory activity of additional odor compounds in the authentic wine which masks the perception of TDN.

The largest rise in odor threshold occurred from 2.2  $\mu\text{g/L}$  in carbonated wine to 4.0  $\mu\text{g/L}$  in sparkling wine of the same ethanol and carbonation strength. In Europe, production of sparkling wines with a closer indication of geographic origin than just the country, requires a minimal yeast contact of 9 month. During this long time period, deposited yeast cells autolyze and release mannoproteins from the breakdown of their cell walls. Several studies revealed the adsorptive character of the mannoproteins, which may hinder the volatilization of TDN or VS in the sparkling wine (Guilloux-Benatier & Chassagne, 2003; Caridi, 2006; Pozo-Bayon, Martinez-Rodriguez, Pueyo, & Moreno-Arribas, 2009). Continuously monitoring headspace concentration of aroma compounds in alcoholic solutions and sparkling wines (here Champagne) using a dynamic set-up revealed, that the volatilization of several aroma compounds were lowered by the presence of polysaccharides and mannoproteins. In general, ethanol lowers the surface tension in a liquid, which enhances the evaporation of the ethanol. This creates a kind of turbulence under the liquid surface, the so-called

Marangoni effect, which transports aroma compounds to the surface and triggers their faster evaporation. It was argued that the mannoproteins might disrupt this Marangoni convection as well as the  $\text{CO}_2$  bubbles vanishing at the surface of the sparkling wine (Ickes & Cadwallader, 2017; Tsachaki et al., 2008; Taylor et al., 2010). Both together may explain the higher odor thresholds found in sparkling wine versus the carbonated Riesling still wine.

Not only matrix effects modulate thresholds, but also application of various methods to determine thresholds. While ASTM E679-04 neglects the false positive results created by chance, all other methods integrate false positive, potentially guessed results to a certain degree and thus tend to yield higher thresholds (Viswanathan, Mathur, Gnyp, & St. Pierre, 1983). In case of a very sensitive subject, which detected already the lowest presented concentration, the individual threshold according to the BET method (ASTM E679-04) will be calculated as the geometric mean between the lowest concentration and the next lower, but not tested concentration. Vice versa, the same procedure is applied when an insensitive subject does not detect the highest presented concentration. This enlarges the spread of individual BET thresholds beyond the tested sample range and may lead to more extreme group thresholds (Peng et al., 2012; Ross et al., 2014).

Using the geometric mean between the concentrations steps as well as for calculation of the group threshold will partially compensate for this effect, because the geometric mean is close to the median for a right-skewed distribution (Lawless, 2010), as the median represents the discrimination criterion between 50% false and 50% correct answers (Lawless & Heymann, 2010). This phenomenon was already described by Lawless as a downward bias in the resulting thresholds (Lawless, 2010). Calculating BET group thresholds based on individual BET thresholds of each subject requires replications for each judge. At the same time it is more beneficial to use a larger cohort of tasters with no or few replications than to use a smaller panel and more replications to reach the same N. Therefore we chose the first approach to determine consumer detection and rejection thresholds. In addition, both the ASTM E1432-04 and simple method of Lawless (2010) are designed for a panel size of 100 or more judges, whereas the ASTM E679-04 is intended for a limited panel size and proposed for a fast threshold determination, which aims not for a precise group threshold but yields "rather a best estimate not far there from" (ASTM E679-04, 2011b).

Applying ASTM E679-04, Ross and coworkers published for 36 consumers either from Washington State (USA) or New Zealand odor detection thresholds for TDN of 35.8 and 37.6  $\mu\text{g/L}$ , respectively (Ross et al., 2014). Parallel to ASTM E679-04, Ross and coworkers also applied the 5% significance criterion based on binomial equations to define thresholds by the concentration at which a significant number of judges have detected the TDN addition. This method yielded nearly two-times lower consumer detection thresholds for TDN of 18.2 and 20.6  $\mu\text{g/L}$  for both respective groups. Although these thresholds are closer to the 14.7  $\mu\text{g/L}$  determined in this study with 156 German consumers, the thresholds are questionable since the wines in which both threshold were determined had already a natural content of 12 and 16  $\mu\text{g/L}$  TDN, respectively. Thus both non-spiked Riesling base wines exhibited TDN concentrations very close to the detection thresholds, which may have impeded the discrimination between control and spiked samples. In contrast, the Riesling wine used in this study contained only 0.3  $\mu\text{g/L}$  TDN. Thus being 50 times lower than the determined consumer detection threshold it is guaranteed that even sensitive judges could perceive differences between control and the lowest spiked sample with 1  $\mu\text{g/L}$  TDN. This allowed us to show that 8 judges had a BET group detection threshold of only 0.55  $\mu\text{g/L}$  or even lower and 14 of only 1.73  $\mu\text{g/L}$ . Thus both groups were below the BET group threshold of 2.3  $\mu\text{g/L}$  determined by the sensory panel. This is of relevance because 14% of the consumers were highly sensitive to TDN and will reject wines due to their petrol off-flavor at much lower TDN concentrations, than the average consumer. This study not only reports for the first time consumer thresholds for TDN from a European

country, but also determined gender differences: While 70 female judges displayed a lower TDN detection threshold of 8 µg/L, 86 males yielded a more than two-times higher TDN detection threshold of 18 µg/L. Thus it may be speculated, that women perceive a petrol off-flavor at lower TDN concentrations and may reject wines more frequently than their male counterparts.

In a novel approach we investigated the impact of consumer age on TDN perception as well as the effect of experience by comparing the TDN-thresholds of a trained versus a consumer panel. Indeed, age altered TDN detection thresholds by a factor of 3 between 8.5 µg/L in the most sensitive group of 35 to 44 years old subjects and 23 µg/L in the least sensitive group of 55–64 years old consumers. However, these thresholds are impeded by varying numbers of subjects involved. Further on, the data do not show an expected decrease of overall odor sensitivity of humans older than 50 years, which may be explained by the very foreign odor quality of TDN to wine.

Consumer rejection thresholds of 60 µg/L TDN in this study ( $N = 120$ ) were 2.5 times lower than those reported for New Zealand consumers of 157 µg/L ( $N = 36$ ) and 1.5 times lower than for US consumers from the state of Washington of 82 µg/L TDN ( $N = 36$ ) (Ross et al., 2014). The differences among panels could be rationalized by using three different groups of subjects, varying in their sensorial performance. This has been already demonstrated by the discrepancy between the US and New Zealand panel in the same study of Ross and coworkers. However, it may be also speculated that NZ and US consumers are more accustomed to Australian or Washington state Riesling wines, which come from warmer regions and thus have higher TDN-levels, as shown in Fig. 8. Inter-cultural differences in the preference of taste and odor have been verified for different food items including wine (Druz & Baldwin, 1982; Mennella, Pepino, & Reed, 2004; Bruwer, Saliba, & Miller, 2011; Yoo, Saliba, Prenzler, & Ryan, 2012). In line of this argument, we could demonstrate, that in context of an eight-year-old Riesling wine, German consumers accepted a higher TDN concentration, as shown by the increased rejection threshold of 91 µg/L.

The methods to calculate consumer thresholds have a significant impact as well. Applying the 5% significance criterion and binomial tables to determine the consumer rejection threshold, we would have obtained a very low rejection threshold of only 16 µg/L TDN, which would have exceeded the detection threshold of the same cohort only by 1.3 µg/L. Thus we refused this calculation method, partially also because the large number of 120 subjects participating in the determination of the rejection thresholds required only 69 correct answers to obtain a significant difference ( $p < 0.05$ ). This value is very close to the number of 60 which would be obtained by chance. In contrast, using the 50% above chance criterion, 90 correct answers were required to pin point the threshold.

Rejection thresholds of consumers were four times higher than their detection threshold, which may be partially explained by the psychophysical data published by Sacks and coworkers, where the perceived petrol intensity of 3 versus 100 µg/L TDN in a wine matrix only rose on an unstructured scale of 1–9 from 2.2 to 5.5 (Sacks et al., 2012). This indicates that consumers need an intense sensory signal to switch from an acceptable perception of TDN to an disturbing foreignness in order to reject the wine. The observed deviation of the rejection threshold between a young and aged Riesling wine is not surprising, because a remarkable strong petrol note is perceived quite inappropriate and unexpected in a young Riesling wine, while it is considered more adequate or even desirable in context of an aged Riesling wine (Acree et al., 2010).

Since more than 50 years (Rothe & Thomas, 1963; Guadagni, Buttery, & Harris, 1966) analytically determined concentrations of aroma compounds are divided by their respective sensory thresholds in order to determine their sensory impact in various food items. This approach has been criticized by sensory experts due to the imprecise determination of odor thresholds but also due to the significant impact of matrix variation and use of different methods on the absolute

threshold values. Furthermore, extraction procedures of aroma compounds prior their chemical analysis and use of different quantification methods strongly modify concentration data as well (Lawless & Heymann, 2010). This study however tried to minimize these factors by determining the variation of detection thresholds in a wide range of matrices and measured TDN concentrations in more than 250 commercial Riesling wines using state of the art quantification with a stable isotope dilution assay (Gök et al., 2019). Still working with averaged data across 156 and 120 subjects, the huge individual sensitivity differences as shown in Figs. 4 and 5 are not taken into account by calculating OAV, OSV and ORV.

Besides the odor activity value (OAV) where individual concentrations are divided by the detection threshold of a trained panel, we propose the new concept of *odor significance value* (OSV) using the detection threshold of consumers as the denominator as well as the *odor rejection value* (ORV) applying the rejection thresholds of consumers as the denominator. Application of these two new concepts to a wide range of commercial Riesling wines revealed that only very few Riesling wines exhibited TDN concentrations high enough to stimulate consumer's rejection. Thus, the concepts of OSV and ORV might – now as well as for future studies – be useful to assess the critical limits regarding consumer's perception of flavors and rejection of off-flavors in wine, particularly for the petrol off-flavor, that is predicted to ascend with advancing climate change.

## 5. Conclusion

To our knowledge, this is the first publication that systematically studied TDN detection thresholds in sparkling wine, also with varying ethanol or CO<sub>2</sub> content. Investigating the impact of carbonation and ethanol in an aqueous and in a wine matrix on the odor detection thresholds of TDN, the observed variation was much smaller than observed for other aroma compounds. The limited impact of ethanol could partially be explained by the liquid-gas partition coefficients of TDN at varying ethanol levels, which were determined for the first time. Asking consumers rather than trained panelists, the determined odor detection threshold increased by a factor of 5 from 3.1 to 14.7 µg/L. However, individual sensitivity for TDN varied even by a factor of 300, and females on average were twice as sensitive as male judges. Determination of aroma values by dividing the concentration by the sensory threshold of the particular compound is a common procedure, but calculation of odor significance values by dividing the concentration through the consumer detection threshold is a novel concept. This is also true for the first time reported odor rejection value by dividing the concentration through the consumer rejection threshold.

Familiarization with warm climate Riesling wines with higher TDN concentrations by New Zealand and US consumers lead to higher rejection thresholds for TDN than those determined for German consumers, which were more accustomed to cool climate Riesling having less TDN. At the same time, German consumers were sensitive to the bottle age accepting a 50% higher TDN concentration in an eight-year-old Riesling wine compared to a young, one-year-old wine. Determining TDN contents in more than 250 commercial international Riesling wines, half of the wines exceeded the detection threshold of trained panelists, but only 15% surpassing the detection threshold of consumers. Only a few wines, most notably from warmer climates, were above the consumer rejection threshold. As climate change enhances the potential for TDN, viticultural and enological measures to lower TDN formation and release during winemaking and wine storage should be studied and implemented to counteract a higher risk for consumer rejection for Riesling wines in the future.

## Declaration of Competing Interest

The authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest, or non-



financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

## Acknowledgments

This IGF Project (project no. AiF 16680N) of the FEI is/was supported via AiF within the program for promoting the Industrial Collective Research (IGF) of the German Ministry of Economic Affairs and Energy (BMWi), based on a resolution of the German Parliament.

The authors are thankful to Sandra Klink and Michael Wacker (DLR Rheinland) for technical assistance.

In case of further interest in the raw data, the authors are willing to share them on a personal request to the corresponding author.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.103735>.

## References

- Acree, T. E., Williams, R. C., & Sacks, G. L. (2010). The flavor chemistry of Riesling. In T. Hofmann, W. Meyerhof, & P. Schieberle (Eds.). *The proceedings of the 9th wartburg symposium on flavor chemistry and biology, held in Eisenach, Germany on April 13th-April 16th, 2010*. (pp. 106–111). Garching, Germany: Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie.
- ASTM E1432-04 (2011a). *Standard practice for defining and calculating individual and group sensory thresholds from forced-choice data sets of intermediate size*. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- ASTM E679-04 (2011b). *Standard practice for determination of odor and taste thresholds by a forced-choice ascending concentration series method of limits*. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- Black, C., Francis, L., Henschke, P., Capone, D., Anderson, S., Day, M., ... Johnson, D. (2012). Aged Riesling and the development of TDN. *Wine & Viticulture Journal*, 27, 20–26.
- Bruwer, J., Saliba, A., & Miller, B. (2011). Consumer behaviour and sensory preference differences: Implications for wine product marketing. *Journal of Consumer Marketing*, 28(1), 5–18. <https://doi.org/10.1108/07363761111101903>.
- Caridi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie Van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology*, 89, 417–422. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9050-x>.
- Clark, R., Linforth, R., Bealin-Kelly, F., & Hort, J. (2011). Effects of ethanol, carbonation and hop acids on volatile delivery in a model beer system. *Journal of The Institute of Brewing*, 117, 7481.
- Dalton, P., Doolittle, N., & Breslin, P. A. S. (2002). Gender-specific induction of enhanced sensitivity to odors. *Nature Neuroscience*, 5, 199–200.
- Deutsches Weininstitut (2017/2018). *Deutscher Wein Statistik 2017/2018*. Bodenheim, Germany: Deutsches Weininstitut GmbH.
- Druz, L. L., & Baldwin, R. E. (1982). Taste Thresholds and Hedonic Responses of Panels Representing Three Nationalities. *Journal of Food Science*, 47, 561–563. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb10123.x>.
- Ettre, L. S., Welter, C., & Kolb, B. (1993). Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace-gas chromatography utilizing the phase ratio variation method. *Chromatographia*, 35, 73–84. <https://doi.org/10.1007/BF02278560>.
- Evans, W. J., Cui, L., & Starr, A. (1995). Olfactory event-related potentials in normal human subjects: Effects of age and gender. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 95, 293–301. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(95\)00055-4](https://doi.org/10.1016/0013-4694(95)00055-4).
- Ferreira, A. C. S., & Guedes de Pinho, P. (2003). Analytical method for determination of some aroma compounds on white wines by solid phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Food Science*, 68, 2817–2820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05811.x>.
- Fischer, C., Fischer, U., & Jakob, L. (1996). Impact of matrix variables ethanol, sugar, glycerol, pH and temperature on the partition coefficients of aroma compounds in wine and their kinetics of volatilization. In E. Henick-Kling, T. E. Wolf, & E. M. Harkness (Eds.). *Proceedings of 4th Conference of Cool Climate Viticulture and Enology* Rochester, NY: American Society of Viticulture and Oenology (pp. VII 42–46).
- Full, G., & Winterhalter, P. (1994). Application of online coupled mass spectrometric techniques for the study of isomeric vitispiranes and their precursors of grapevine cv. Riesling. *Vitis*, 33, 241.
- Gerdas, S. M., Winterhalter, P., Ebeler, S. E. (2002). Effect of sunlight exposure on nor-isoprenoid formation in White Riesling grapes. ACS Symposium Series, 802 (Carotenoid-Derived Aroma Compounds), pp. 262–272. <https://doi.org/10.1021/bk-2002-0802.ch019>.
- Gök, R. (2015). *Einfluss von Hefen auf die glykosidisch gebundenen Aromavorstufen und Untersuchungen zur Vermeidung der TDN-Fehlnote in Riesling* PhD Thesis, Technische Universität Braunschweig. München: Verlag Dr. Hut.
- Gök, R., Bechtloff, P., Ziegler, M., Schmarr, H.-G., Fischer, U., & Winterhalter, P. (2019). Synthesis of deuterium-labeled 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and quantitative determination of TDN and isomeric vitispiranes in Riesling wines by a stable-isotope-dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 6414–6422. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01428>.
- Goldner, M. C., Zamora, M. C., Lira, P. D. L., Gianninoto, H., & Bandoni, A. (2009). Effect of ethanol level in the perception of aroma attributes and the detection of volatile compounds in red wine. *Journal of Sensory Studies*, 24, 243–257. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2009.00208.x>.
- Grosch, W. (1993). Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 4, 68–73. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90187-F](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90187-F).
- Guadagni, D. G., Buttery, R. G., & Harris, J. (1966). Odour intensities of hop oil components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17, 142–144. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740170311>.
- Guillou-Benatier, M., & Chassagne, D. (2003). Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 746–751. <https://doi.org/10.1021/jf020135j>.
- Hummel, T., Sekinger, B., Wolf, S. R., Pauli, E., & Kobal, G. (1997). 'Sniffin' Sticks': Olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chemical Senses*, 22, 39–52. <https://doi.org/10.1093/chemse/22.1.39>.
- Ickes, C. M., & Cadwallader, K. R. (2017). Effects of ethanol on flavor perception in alcoholic beverages. *Chemosensory Perception*, 10, 119–134. <https://doi.org/10.1007/s12078-017-9238-2>.
- ISO 13301:2002(E) (2002). *Sensory analysis – Methodology – general guidance for measuring odour, flavour and taste detection thresholds by a three-alternative forced-choice (3-AFC) procedure*. Berlin, Germany: Beuth Verlag GmbH.
- Kwasniewski, M. T., Vanden Heuvel, J. E., Pan, B. S., & Sacks, G. L. (2010). Timing of cluster light environment manipulation during grape development affects C<sub>13</sub> nor-isoprenoid and carotenoid concentrations in Riesling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6841–6849. <https://doi.org/10.1021/jf904555p>.
- Lawless, H. T. (2010). A simple alternative analysis for threshold data determined by ascending forced-choice methods of limits. *Journal of Sensory Studies*, 25, 332–346. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2009.00262.x>.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food: Principles and practices*. New York: Springer Science + Business Media LLC.
- Le Berre, E., Atanasova, B., Langlois, D., Etievant, P., & Thomas-Danguin, T. (2007). Impact of ethanol on the perception of wine odorant mixtures. *Food Quality and Preference*, 18, 901–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2007.02.004>.
- Marais, J., Van Wyk, C. J., & Rapp, A. (1992). Effect of storage time, temperature and region on the levels of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene and other volatiles, and on quality of Weisser Riesling wines. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 13, 33–44. <https://doi.org/10.21548/13-1-2197>.
- Meilgaard, M. C. (1975). Flavour chemistry of beer. Part i: Flavour interaction between principal volatiles. *Master Brewers Association of the Americas – Technical Quarterly*, 12, 107–117.
- Mendes-Pinto, M. M. (2009). Carotenoid breakdown products the – norisoprenoids – in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483, 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.01.008>.
- Mennella, J. A., Pepino, M. Y., & Reed, D. R. (2004). Genetic and environmental determinants of bitter perception and sweet preferences. *Pediatrics*, 115, e216. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1582>.
- Mitchell, M., Brunton, N. P., & Wilkinson, M. G. (2011). Impact of salt reduction on the instrumental and sensory flavor profile of vegetable soup. *Food Research International*, 44, 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.007>.
- Peltz, M., & Shellhammer, T. (2017). Ethanol content has little effect on the sensory orthonasal detection threshold of hop compounds in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 75, 221–227. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-3994-01>.
- Peng, M., Jaeger, S. R., & Hautus, M. J. (2012). Determining odour detection thresholds: Incorporating a method-independent definition into the implementation of ASTM E679. *Food Quality and Preference*, 25, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.02.006>.
- Pozo-Bayon, M. A., Martinez-Rodriguez, A., Pueyo, E., & Moreno-Arribas, M. V. (2009). Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: From a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.03.011>.
- Prescott, J., Norris, L., Kunst, M., & Kim, S. (2005). Estimating a “consumer rejection threshold” for cork taint in white wine. *Food Quality and Preference*, 16, 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.05.010>.
- Robinson, A. L., Ebeler, S. E., Heymann, H., Boss, P. K., Solomon, P. S., & Trengove, R. D. (2009). Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10313–10322. <https://doi.org/10.1021/jf902586n>.
- Roessler, E. B., Pangborn, R. M., Sidel, J. L., & Stone, H. (1978). Expanded statistical tables for estimating significance in paired preference, paired difference, duo-trio and triangle tests. *Journal of Food Science*, 43, 940–943. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1978.tb02458.x>.
- Ross, C. F., Zwick, A. C., Castro, L., & Harrison, R. (2014). Odour detection threshold and consumer rejection of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene in 1-year-old Riesling wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20, 335–339. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12085>.
- Rothe, M., & Thomas, B. (1963). Aromastoffe des Brotes. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 119, 302–310. <https://doi.org/10.1007/BF01891082>.
- Rudy, H. (2015). Petrolnote: Entstehung und Reduzierung. *Der Deutsche Weinbau*, 70, 32–35.



- Sacks, G. L., Gates, M. J., Ferry, F. X., Lavin, E. H., Kurtz, A. J., & Acree, T. E. (2012). Sensory threshold of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and concentrations in young Riesling and non-Riesling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2998–3004. <https://doi.org/10.1021/jf205203b>.
- Saint-Eve, A., Deleris, I., Aubin, E., Semon, E., Feron, G., Rabillier, J.-M., ... Souchon, I. (2009). Influence of composition (CO<sub>2</sub> and sugar) on aroma release and perception of mint-flavored carbonated beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5891–5898. <https://doi.org/10.1021/jf900542j>.
- Schuettler, A., Friedel, M., Jung, R., Rauhut, D., & Darriet, P. (2015). Characterizing aromatic typicality of Riesling wines: Merging volatile compositional and sensory aspects. *Food Research International*, 69, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.010>.
- Schultz, H. R. (2000). Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00156.x>.
- Simpson, R. F. (1978a). 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene: An important contributor to the bottle aged bouquet of wine. *Chemistry & Industry (London, United Kingdom)*, 37.
- Simpson, R. F. (1978b). Aroma and compositional changes in wine with oxidation, storage and ageing. *Vitis*, 17, 274–287.
- Simpson, R. F., & Miller, G. C. (1983). Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis*, 22, 51–63.
- Simpson, R. F., Strauss, C. R., & Williams, P. J. (1977). Vitispirane: A C<sub>13</sub>-spiro-ether in the aroma volatiles of grape juice, wines and distilled grape spirits. *Chemistry & Industry (London, United Kingdom)*, 1977, 663–664.
- Taylor, A. J., Tsachaki, M., Lopez, R., Morris, C., Ferreira, V., Wolf, B. (2010). Odorant release from alcoholic beverages. ACS Symposium Series, 1036 (Flavors in Noncarbonated Beverages), 161–175. <https://doi.org/10.1021/bk-2010-1036.ch012>.
- Tsachaki, M., Gady, A.-L., Kalopesas, M., Linforth, R. S. T., Athès, V., Marin, M., & Taylor, A. J. (2008). Effect of ethanol, temperature, and gas flow rate on volatile release from aqueous solutions under dynamic headspace dilution conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5308–5315. <https://doi.org/10.1021/jf800225y>.
- Van Leeuwen, C., & Darriet, P. (2016). The impact of climate change on viticulture and wine quality. *Journal of Wine Economics*, 11, 150–167. <https://doi.org/10.1017/jwe.2015.21>.
- Villamor, R. R., Evans, M. A., Mattinson, D. S., & Ross, C. F. (2013). Effects of ethanol, tannin and fructose on the headspace concentration and potential sensory significance of odorants in a model wine. *Food Research International*, 50, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.037>.
- Viswanathan, S., Mathur, G. P., Gnyp, A. W., & St. Pierre, C. C. (1983). Application of probability models to odor threshold determinations. *Atmospheric Environment*, 17, 139–143. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(83\)90018-5](https://doi.org/10.1016/0004-6981(83)90018-5).
- Winterhalter, P. (1991). 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) formation in wine. 1. Studies on the hydrolysis of 2,6,10,10-tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-6-ene-2,8-diol rationalizing the origin of TDN and related C<sub>13</sub> norisoprenoids in Riesling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1825–1829. <https://doi.org/10.1021/jf00010a027>.
- Yamamoto, T., Matsuda, H., Utsumi, Y., Hagiwara, T., & Kanisawa, T. (2002). Synthesis and odor of optically active rose oxide. *Tetrahedron Letters*, 43, 9077. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)02311-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)02311-0).
- Yoo, Y. J., Saliba, A. J., Prenzler, P. D., & Ryan, D. (2012). Total phenolic content, antioxidant activity, and cross-cultural consumer rejection threshold in white and red wines functionally enhanced with catechin-rich extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 388–393. <https://doi.org/10.1021/jf203216z>.



## 6.2 Originalarbeit zum Thema Methodenetablierung

Verwendung der multiplen Headspace-Extraktion für den Vergleich von klassischen Fasern und mini-Arrows für die Festphasenmikroextraktion, und verschiedenen Methoden der mechanischen Probenvorbereitung

Das Verfahren der multiplen Headspace-Extraktion (multiple headspace extraction, MHE) wurde herangezogen, um unter Ausschluss von Matrixeinflüssen eine absolute quantitative Bestimmung von flüchtigen Verbindungen durchzuführen. Eine weitere Anwendung stellt die Bestimmung der Extraktionsleistung einer Methode dar, indem aus der Abnahme der Analyten in aufeinander folgenden Extraktionsschritten eine Funktion gebildet wird, deren Steigung die Extraktionseffizienz abbildet. Die beiden weinrelevanten Aromastoffe 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin (TDN) und 2,10,10-Trimethyl-6-methylen-1-oxaspiro[4.5]dec-7-en (Vitispiran) wurden als Beispielverbindungen in Modellwein eingesetzt, um verschiedene Fasermaterialien miteinander zu vergleichen, die für die Festphasenmikroextraktion (solid-phase microextraction, SPME) verwendet werden. Darüber hinaus wurden die klassischen SPME-Fasern mit den neu entwickelten mini-Arrows miteinander verglichen und der Einfluss des für die Durchmischung der Probe verwendeten Instruments erfasst. Die mini-Arrow Systeme zeigten für das identische Sorptionsmaterial deutlich höhere Extraktionsraten aufgrund ihres höheren Sorptionsvolumens, und aus ihrer robusteren Bauweise ergibt sich eine erhöhte Lebensdauer aufgrund der geringeren mechanischen Belastung der Sorptionsphase. Die PDMS-Carboxen Fasern wiesen im Vergleich zu den Polyacrylat- und PDMS-Fasern die höchste Extraktionseffizienz für die beiden gewählten Verbindungen auf, allerdings zeigte sich hier die Wichtigkeit der Desorptionstemperatur, da nur bei erhöhter Injektortemperatur ein vollständiger Transfer in das gaschromatographische System gewährleistet werden konnte. Schließlich spielte auch die Wahl des Agitierungsgeräts eine entscheidende Rolle für die Geschwindigkeit, mit der die Analyten sich in den drei Phasen des Systems verteilen.

### Hinweis zum Copyright

Reprinted with permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH (license number 4856460872792): Springer Nature, Chromatographia, Comparison of Solid-Phase Microextraction Using Classical Fibers Versus Mini-Arrows Applying Multiple Headspace Extraction and Various Agitation Techniques, M. Ziegler, H.-G. Schmarr, Chromatographia, 82, 635-640.

Copyright © Springer Nature 2018

URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10337-018-3659-1>

DOI: <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3659-1>

Chromatographia (2019) 82:635–640  
<https://doi.org/10.1007/s10337-018-3659-1>

## SHORT COMMUNICATION



## Comparison of Solid-Phase Microextraction Using Classical Fibers Versus Mini-Arrows Applying Multiple Headspace Extraction and Various Agitation Techniques

Michael Ziegler<sup>1,2</sup> · Hans-Georg Schmarr<sup>1,3</sup>

Received: 30 July 2018 / Revised: 5 October 2018 / Accepted: 15 November 2018 / Published online: 23 November 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

### Abstract

Multiple headspace extraction allowed the comparison of extraction efficiencies for solid-phase microextraction (SPME) using classical fiber-type sorbents versus the relatively novel mini-Arrows. A hydro-alcoholic matrix and two wine aroma compounds (1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and 2,10,10-trimethyl-6-methylen-1-oxaspiro[4.5]dec-7-ene (vitispirane)) were exemplarily chosen for the evaluation. SPME fiber coating materials were compared with their corresponding SPME mini-Arrow counterparts. With chemically equivalent sorption phases, higher extraction efficiencies were found for the SPME mini-Arrow system due to the larger sorption volume. The comparison of diverse agitation devices revealed a significant influence of the agitation mode on extraction kinetics and extracted analyte amount in non-equilibrium conditions. Furthermore, the evaluation of SPME fibers or SPME mini-Arrow coatings containing a carboxen-type material revealed the importance of an appropriate desorption (injection) temperature. If not chosen carefully, analyte injection may not be complete, possibly resulting in reduced detection limits or generation of carryover problems. Also noteworthy is the construction of the SPME mini-Arrow device as such, as this is more robust compared to the classical SPME fiber, enhancing the lifetime of the extraction device.

**Keywords** SPME · SPME arrow · Multiple headspace extraction · Boundary layer · Agitation · Extraction efficiency

### Introduction

Recently, the SPME Arrow system was introduced as a novel technology for microextraction that contains a larger volume of sorbent material compared to a standard SPME fiber, combined with an increased mechanical robustness [1–3]. Commercially available are two types of the SPME Arrow, a regular type (sorption phase volume 11.8  $\mu\text{L}$ , outer diameter 1.5 mm) and a mini-Arrow with somewhat reduced diameter

(sorption phase volume 3.8  $\mu\text{L}$ , outer diameter 1.1 mm) [4]. By comparison, a SPME fiber with a length of 1 cm has a sorption phase volume of 0.6  $\mu\text{L}$ . Higher sorbent capacities are suitable for lower detection limits in trace-level analysis but may also prevent saturation (overloading) of the fiber, then guaranteeing an increased dynamic range. Furthermore, the construction of the SPME Arrow (and mini-Arrow) device is more robust compared to the classical SPME fiber, most likely enhancing the lifetime of the extraction device as such. However, it requires some adaptation of the injector inlet to handle the wider diameter within the upper injection head and it also generates additional mechanical stress on the septum, potentially causing problems with septum bleed.

In our study, we wanted to compare the extraction efficiencies of classical SPME fibers with the SPME Arrow, respectively, the SPME mini-Arrow, for the headspace extraction of exemplarily chosen wine aroma compounds. Furthermore, we wanted to evaluate a potential influence of the agitation technique applied, since various modes involving classical magnetic stirring with a stir bar, agitation, or mixing in cycloidal motion were available to us. In literature,

✉ Hans-Georg Schmarr  
[hans-georg.schmarr@dlr.rlp.de](mailto:hans-georg.schmarr@dlr.rlp.de)

<sup>1</sup> Institute for Viticulture and Oenology,  
Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz,  
Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße, Germany

<sup>2</sup> Faculty for Chemistry, Food Chemistry, Kaiserslautern  
University of Technology, Erwin-Schrödinger-Straße 52,  
67663 Kaiserslautern, Germany

<sup>3</sup> Faculty for Chemistry, Instrumental Analytical Chemistry,  
University Duisburg-Essen, Universitätsstraße 5,  
45141 Essen, Germany

this has occasionally been described as an important parameter for the overall performance of a SPME method [5, 6].

The theoretical background of SPME has been summarized earlier, e.g. by Pawliszyn [7]. To compare extraction efficiencies between fibers, respectively, the fiber coatings, absolute peak areas obtained under extraction conditions kept constant might be used. However, besides peak areas, the kinetics of the extraction process is another issue for method development in practical situations, since faster extraction kinetics allow a higher sample throughput. In the early 1980s, Kolb introduced a method called “multiple headspace extraction” (MHE) for quantitative headspace analysis [8] that can also be used in combination with SPME [9], and is often abbreviated as MHS–SPME (multiple headspace–SPME). The principle of MHE is the repeated extraction of a single sample, and thus a repeated removal of analyte from the headspace that leads to a re-equilibration of the concentration ratio of the analyte between the sample and the headspace (and the coating material in MHS–SPME) in each extraction step. The MHE method follows a logarithmic function (Eq. (1)), allowing the calculation of the total amount of analyte present in the sample from the slope of the function and the concentration at a given time [10]. Since the extraction is not continuous but rather performed stepwise, and the peak area relates directly to the amount of extracted analyte, the concentration  $c$  might be replaced by the peak area  $A$  obtained at a given extraction step (Eq. (2)). Finally, the total amount of analyte can be obtained by the sum of all peak areas (Eq. (3)). As a simplified alternative, the slope of the function ( $-q$ ) can be calculated from the peak areas of the first two extraction steps by Eq. (4) [8]. Due to the fact that some instrumental parameters are included in the pure mathematical constant,  $-q$  was replaced by  $q'$  as suggested by Kolb and Ettre [10], resulting in Eq. (5).

$$c_i = c_1 * e^{-q*i} \quad (1)$$

$$A_i = A_1 * e^{-q(i-1)} \quad (2)$$

$$\sum_{i=1}^{i=\infty} A_i = \frac{A_1}{1 - e^{-q}} \quad (3)$$

$$-q = \ln \frac{A_1}{A_2} \quad (4)$$

$$q' = \ln \frac{A_1}{A_2} \quad (5)$$

Furthermore, the slope is an indicator for the extraction performance, here with respect to the extraction kinetics. Therefore, we compared the extraction performance of SPME fibers and SPME mini-Arrows in a MHE operating mode, allowing to experimentally access two important

parameters, notably extraction efficiency (peak area) and extraction kinetics.

As model compounds for our study, two aroma compounds found in white wines made of *Vitis vinifera* species should be used: 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and 2,10,10-trimethyl-6-methylen-1-oxaspiro[4.5]dec-7-ene (vitispirane)). These are known degradation products of carotenes, with TDN evoking the odor reminiscent of petrol and kerosene notes [11].

## Experimental

### Materials

Preparation of saturated aqueous sodium chloride solution (brine) was done in tap water. A model wine with about 12 vol-% ethanol was prepared with 10 g/L tartaric acid, and pH adjusted to 3.0 with a 2N sodium hydroxide solution. Analytical standards (TDN and vitispirane) were kindly provided by Dr. Recep Gök, Technische Universität Braunschweig, Germany. Model wine and brine (5 mL each) were mixed in a 20-mL headspace vial. Subsequently, 10 µL of an ethanolic standard solution were added via a microliter syringe, resulting in a final concentration of 1 µg/L TDN and 4 µg/L vitispirane.

### Instrumental Analysis

Commercial fiber types used for the extraction of the aroma compounds were polydimethylsiloxane (PDMS), polyacrylate (PA) and Carboxen/PDMS or carbon wide range (Carbo-WR), respectively. SPME fibers (PDMS and PA: 100 µm × 10 mm, Carboxen/PDMS: 85 µm × 10 mm) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA) and the corresponding SPME fibers (PDMS and PA: 100 µm × 10 mm, Carbo-WR: 95 µm × 10 mm) as well as SPME mini-Arrows (PDMS, PA and CarboWR: 100 µm × 20 mm) were obtained from CTC Analytics AG (Zwingen, Switzerland). Headspace sampling was carried out with a Combi PAL autosampler and a PAL RSI autosampler (both CTC Analytics AG).

Sample conditioning and extraction was conducted using four different mixing systems: (i) a single magnet mixer (SMM; CHROMTECH, Bad Camberg, Germany), (ii) the agitator of the Combi PAL autosampler, (iii) a conventional laboratory magnet mixer from IKA (Staufen, Germany) with an in-house-manufactured heating block (an aluminum cylinder with drilled bores fitting HS vials), and (iv) the Heatex stirrer module of the PAL RSI. In all cases, the samples were incubated for 10 min at 40 °C followed by an extraction time of 20 min at 40 °C at a stirring rate of 400 rpm (as indicated by the particular instrument and kept constant for better comparability). Desorption was performed in the injector



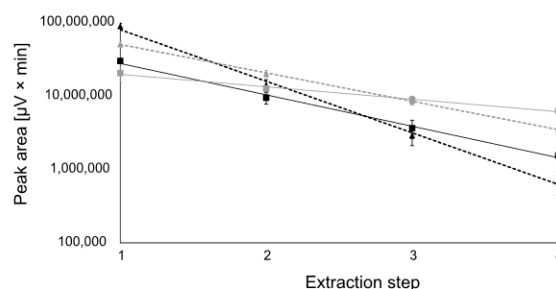
of the corresponding gas chromatograph (GC). Cleaning and conditioning of the fiber (or mini-arrow) was conducted at 290 °C for 3 min under a nitrogen flow of 6 mL/min in the conditioning station of the autosampler, before and after each analysis.

The experiments were conducted with a Trace GC coupled to a Trace DSQ quadrupole MS, besides those with the Heatex stirrer (available only for the PAL RSI) that was installed on a Trace GC Ultra connected to a TSQ Quantum triple quadrupole MS (all ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany). The temperature of the GC oven was held at 40 °C for 2 min and then programmed at 10 °C/min to 300 °C, with a final conditioning period of 5 min. Helium was used as carrier gas in constant flow mode (1.2 mL/min). The separation column used was a 30 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary, coated with a 5% phenyl containing polydimethylsiloxane stationary phase of 0.25 µm (ZB-5, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany, or a Rxi-5SilMS from Restek Corporation (Bellefonte, PA, USA)). For injection, the SPME fibers (or mini-Arrows) were thermally desorbed in the split/splitless injector (injector head adapted for Arrow operation; adaptation sets available from CTC Analytics AG) of the corresponding GC using splitless mode (splitless time 2 min). The injector was equipped with a 2.0-mm i.d. liner (BGB Analytik AG, Böckten, Switzerland) and was operated at 220 °C unless stated otherwise. The SPME fiber (and mini-Arrow) penetration into the injector was set to a depth of 54 mm. The GC–MS transfer line was kept at 250 °C and the ion source was set to 240 °C. Positive electron ionization (EI+) was done at 70 eV and a total ion chromatogram was generated with a range of  $m/z$  = 29–300. Extracted ion chromatograms with  $m/z$  = 157 (base peak) for TDN and  $m/z$  = 192 (base and molecular ion peak) for vitispirane were applied to calculate the peak areas.

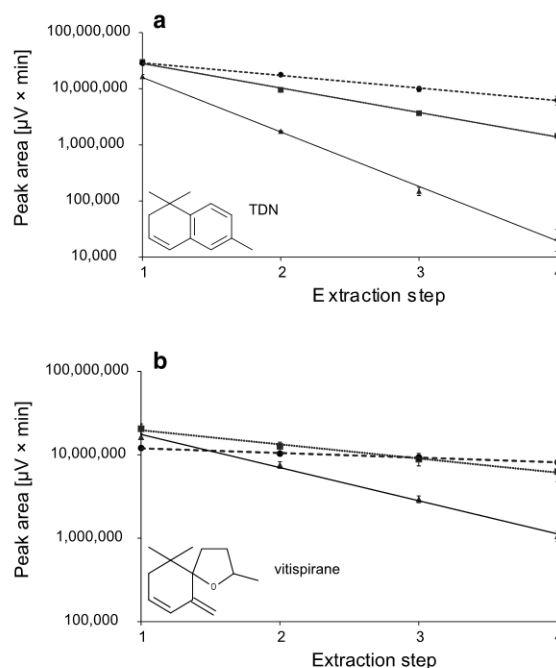
## Results and Discussion

### Comparison of SPME Fiber and Mini-Arrow

Consecutive extraction steps using MHS–SPME for TDN and vitispirane are presented in Fig. 1 for SPME fiber and SPME mini-Arrow. The decline of peak areas followed a logarithmic function as predicted by Eq. (1), yielding straight lines after logarithmizing. Comparing the extraction functions for the SPME fiber and mini-arrow, a significantly higher slope is observed with the mini-arrow for both TDN and vitispirane. The first extraction step with the SPME mini-Arrow yielded a peak area about three times higher as with the extraction using the SPME fiber. Using otherwise identical extraction conditions, for a practical application this means that a higher sensitivity or a faster analysis due to shorter extraction times could be achieved.



**Fig. 1** HS–SPME extractions with PDMS as sorbent material of TDN (black) and vitispirane (gray) with fiber (filled square, solid line) and mini-Arrow (filled triangle, dashed line), applying consecutive extraction steps (MHE);  $n=3$ . Trace GC–DSQ with sampler and agitation system (ii); for other conditions see “Materials” section



**Fig. 2** Comparison of HS–SPME extractions of TDN and vitispirane (upper (a) and lower (b) graphics, respectively) with different fiber sorbent materials (filled square PDMS, filled circle PA, filled triangle Carbo-WR), applying consecutive extraction steps (MHE);  $n=3$ . Trace GC–DSQ with sampler and agitation system (ii); for other conditions see “Materials” section

Due to the chemical differences among the sorbent materials,  $q'$  values were remarkably higher for the Carbo-WR (resulting in  $q' = 2.25$  for TDN and  $q' = 0.87$  for vitispirane) and PDMS ( $q'$  (TDN) = 1.16,  $q'$  (vitispirane) = 0.48) sorbent materials, and lowest for PA ( $q'$  (TDN) = 0.47,  $q'$  (vitispirane) = 0.15), as illustrated in Fig. 2. This effect

can be explained by the low chemical polarity of TDN and vitispirane. Whereas PA is an adsorbent with enhanced affinity for more polar compounds, PDMS and particularly the Carbo-type fibers show higher affinity for apolar compounds.

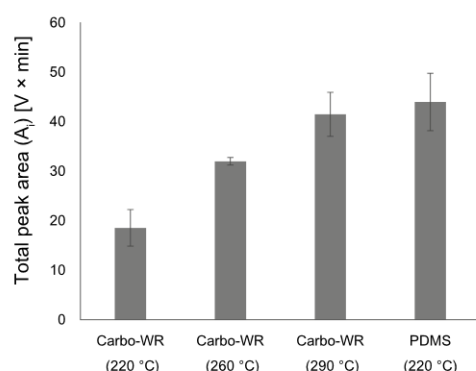
### Effect of the Desorption Temperature

Although the carbo-type fibers resulted in the highest extraction efficiency (Fig. 2a), the peak area obtained for the first extraction of TDN was by a factor of two lower than the peak area of the extraction using PDMS as sorbent (Fig. 3). Exhaustive extraction was achieved with the eighth extraction step using the PDMS fiber but already with the fifth extraction step using the carbo-type fibers (data not shown). The lower peak area after the first extraction might only be explained by the adsorption performance of the carbo-type fibers, particularly for such apolar analytes, possibly leaving part of the material still adsorbed on the fiber. With this hypothesis in mind, we raised the initial desorption (injector) temperature from 220 °C to 260 °C and later to 290 °C. The higher desorption temperatures indeed resulted in higher peak areas (Fig. 3), underlining the hypothesis that the desorption temperature of 220 °C was too low for a complete thermal desorption of this apolar analyte. On the other hand, the PDMS fiber obtained higher peak areas at a desorption temperature of only 220 °C. This result has to be considered when sorbent materials have to be chosen and must be evaluated during method development. Some fiber materials restrict very high desorption temperatures or yield an excessively high bleed or a reduced live-time. As a technical aspect, one should also consider the thermal profile of commercial injector designs, particularly as excessively high desorption temperatures can sometimes not be applied (e.g. if the thermal profile is linear up to the very

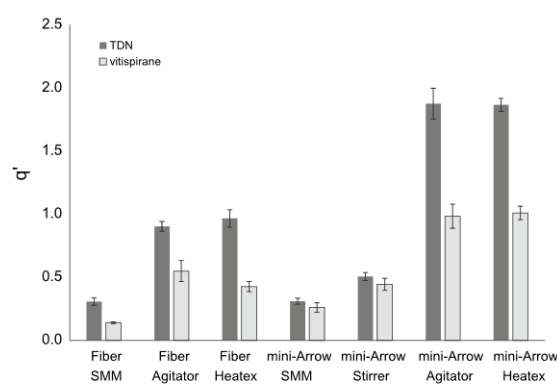
upper septum cap) as the combined thermal and mechanical stress to the septum of the injection port increases dramatically and may at some point cause instrumental (leakage) as well as analytical problems (break-down products, noise). The non-linear temperature profile alongside the injector section below the septum cap may render real temperatures that deviate from set-values considerably. Since instrument manufacturers normally do not provide temperature profiles for their injectors, for thermal desorption of analytes from the coating material this should also be considered and the position of the SPME fiber or SPME (mini-)Arrow device within the injector has to be optimized accordingly, as was mentioned in few cases in literature [5, 12, 13]. Furthermore, our result with the carbo-type fibers implies that a potential risk for cross-contamination between samples due to material still residing on the fiber should be paid attention for.

### Effect of the Agitation Device

Comparing different agitation options (Fig. 4),  $q'$  values for the extraction of TDN and vitispirane were substantially lower for the SMM (i) and the magnetic stirrer (iii) than those values obtained with the CTC agitator (ii) or the novel Heatex system (iv). Looking closer into the agitation principle, both the agitator and the Heatex system move the vial as such, therefore, introducing a mechanical motion of both the liquid and gas phases within the vial. On the other hand, the SMM and the magnetic stirrer create a more static situation, as basically only the liquid phase is set in motion. Furthermore, with the SMM and the lab stirrer the fiber itself is rather static, whereas with the agitator it is also set in motion. The latter aspect is discussed with a longer lifetime of the fiber due to a reduced mechanical stress, then favoring the SMM or magnetic stirrer. According to the manufacturer, the Heatex



**Fig. 3** Influence of desorption temperature (injector temperature) on total peak areas ( $A_T$ ) for HS-SPME of TDN using Carbo-WR or PDMS as fiber sorbent material;  $n=3$ . Trace GC-DSQ with sampler and agitation system (ii); for other conditions see “Materials” section



**Fig. 4** Influence of agitation technique applied for HS-SPME extractions of TDN and vitispirane on extraction efficiency ( $q'$ ) using PDMS as sorbent material;  $n=3$ . Conditions see “Materials” section

stirrer mixes samples applying a cycloid-shaped mixing pattern without the need for stir bars. It is also argued that for SPME headspace and immersion sampling the design ensures that the delicate fiber is not damaged. Generally speaking, reduced agitation causes longer times to achieve an equilibrium and thus leads to reduced extraction rates when the equilibrium is not reached in non-equilibrium extraction situations. Similar results with respect to the agitation effect seen in our study had been described by Darrouzès et al. [6], comparing two types of stirring (mechanical and magnetic stirring) for the extraction of organotin compounds from aqueous samples. The positive influence of monoterpene signal intensity for a HS-SPME application in wine aroma analysis by increased stirring rates and stirring time was demonstrated by De la Calle García et al. [5]. Helin et al. compared stirring rate and stir bar size for magnetic stirring with a HS-SPME fiber and Arrow application for volatile amine analysis in an aqueous environment [1]. These findings are not surprising considering the theory of solid-phase microextraction, as summarized e.g. by Pawliszyn [14, 15]. The boundary layer model described in these publications is an important aspect limiting the mass transfer rate from the surrounding phase to the sorbent. This model is well described for direct immersion SPME, and basically represents a static zone, the *Prandtl* boundary layer, surrounding the fiber in which the mass transport to the fiber is determined by diffusion coefficients rather than distribution constants. Analyte flux outside of the boundary layer is assumed to be controlled by convection, whereas analyte flux within the boundary layer is assumed to be controlled by diffusion [15]. With respect to our experimental results, it is noteworthy that the thickness of this boundary layer is determined by the rate of convection (agitation) in the sample and analyte diffusion. Semenov et al. differentiated between several agitation levels from “no agitation” to “perfect agitation” and used a mathematical model to describe the analyte concentration distribution in the vicinity of the adsorbent boundary layer [16]. In HS-SPME, a boundary layer is found between the aqueous and gaseous phases, as well as between the gaseous and sorbent phases. Mass transfer from the aqueous to the gas phase may also be affected by sorption-induced effects of pollutants (or dissolved substances) in the aqueous phase [17]. Since diffusion coefficients are usually more than 100,000 times higher in a gas phase than in a condensed phase, in HS-SPME the sample agitation does not show a great effect on analyte mass transfer from the headspace to the fiber coating [18], although higher convection in the gas phase will minimize the boundary layer as well. The most important effect of sample agitation can thus be seen in the accelerated mass transfer of analytes from the aqueous phase to the headspace.

## Conclusion

HS extraction efficiencies with respect to extraction kinetics and extraction yield were compared for SPME fibers and the novel SPME mini-Arrow. Applying MHE (here MHS-SPME and MHS-SPME mini-Arrow) allowed a direct comparison of the extraction efficiency via the slope of the logarithmic equation. As expected, comparable coating materials yield better extraction characteristics with the mini-Arrow system, most probably due to the increase in sorbent phase volume. Care has to be taken when using coating materials with adsorption characteristics (e.g. Carboxen-type materials), as desorption temperatures should be considerably higher than with partitioning-type materials (e.g. PDMS). Otherwise, analytes may not be fully injected (thermally desorbed) resulting in considerably lower peak areas than possible. This may lead to higher detection limits due to analytes still remaining on the fiber coating, or cause carryover effects if the fiber is not conditioned properly in between analytical runs. Comparing different agitation systems available for HS-SPME (fiber and mini-Arrow) applications revealed the importance of this technical detail when optimizing a HS-SPME application. In principle, fast extraction is hindered by the boundary layers between phase borders and mechanical agitation should be applied as efficient as possible to minimize the dimensions of such boundary layers. This then allows for faster extraction kinetics favoring non-equilibrium conditions, thus suiting high-throughput HS-SPME applications.

To end our comparison between SPME fibers and the SPME mini-Arrow, the higher capacity and mechanical robustness of the SPME (mini-)Arrow system renders the novel (mini-)Arrow system a promising and powerful extraction device for the analysis of volatile analytes.

**Acknowledgements** The authors are thankful to CTC Analytics AG for the supply of SPME fibers and SPME mini-Arrows, and Beat Schilling (BGB Analytik AG) for technical support. We are also thankful to CHROMTECH for the supply of the SMM and the conditioning station. We appreciate the donation of TDN and vitispirane samples by Dr. Recep Gök. Part of this research project was supported by the German Ministry of Economics and Technology (via AiF) and the FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie.V., Bonn, Germany); Project AiF 16680N.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare no conflict of interest.

**Ethical approval** This article does not contain any studies involving human or animal participants.



## References

- Helin A, Rönkkö T, Parshintsev J, Hartonen K, Schilling B, Läubli T, Riekkola M-L (2015) Solid phase microextraction arrow for the sampling of volatile amines in wastewater and atmosphere. *J Chromatogr A* 1426:56–63
- Kremser A, Jochmann MA, Schmidt TC (2016) PAL SPME arrow-evaluation of a novel solid-phase microextraction device for freely dissolved PAHs in water. *Anal Bioanal Chem* 408(3):943–952
- Kremser A, Jochmann MA, Schmidt TC (2016) Systematic comparison of static and dynamic headspace sampling techniques for gas chromatography. *Anal Bioanal Chem* 408(24):6567–6579
- CTC Analytics AG (2016) PAL SPME Arrow—the better SPME. Manufacturer publication, CTC Analytics AG, Zwingen
- De la Calle García D, Magnaghi S, Reichenbacher M, Danzer K (1996) Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction. *J High Resolut Chromatogr* 19(5):257–262
- Darrouzès J, Bueno M, Pécheyran C, Holeman M, Potin-Gautier M (2005) New approach of solid-phase microextraction improving the extraction yield of butyl and phenyltin compounds by combining the effects of pressure and type of agitation. *J Chromatogr A* 1072(1):19–27
- Pawliszyn J (2010) Theory of extraction. In: Pawliszyn J, Lord HL (eds) *Handbook of sample preparation*. Wiley-Blackwell, Hoboken, pp 3–24
- Kolb B (1982) Multiple headspace extraction—a procedure for eliminating the influence of the sample matrix in quantitative headspace gas chromatography. *Chromatographia* 15(9):587–594
- Hakkarainen M (2007) Developments in multiple headspace extraction. *J Biochem Biophys Methods* 70(2):229–233
- Kolb B, Ettre LS (1991) Theory and practice of multiple headspace extraction. *Chromatographia* 32(11–12):505–513
- Mendes-Pinto MM (2009) Carotenoid breakdown products the—norisoprenoids—in wine aroma. *Arch Biochem Biophys* 483(2):236–245
- Langen J, Wang C-Y, Slabizki P, Wall K, Schmarr H-G (2013) Quantitative analysis of  $\gamma$ - and  $\delta$ -lactones in wines using gas chromatography with selective tandem mass spectrometric detection. *Rapid Commun Mass Spectrom* 27:2751–2759
- Aisala H, Linderborg KM, Sandell M (2018) Fiber depth, column coating and extraction time are major contributors in the headspace solid-phase microextraction—gas chromatography analysis of Nordic wild mushrooms. *Eur Food Res Technol* 244(5):841–850
- Pawliszyn J (1999) Quantitative aspects of SPME. In: Pawliszyn J (ed) *Applications of solid phase microextraction. RSC chromatography monographs*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 3–21
- Pawliszyn J (2000) Theory of solid-phase microextraction. *J Chromatogr Sci* 38(7):270–278
- Semenov SN, Koziel JA, Pawliszyn J (2000) Kinetics of solid-phase extraction and solid-phase microextraction in thin adsorbent layer with saturation sorption isotherm. *J Chromatogr A* 873(1):39–51
- Ramus K, Kopinke F-D, Georgi A (2012) Sorption-induced effects of humic substances on mass transfer of organic pollutants through aqueous diffusion boundary layers: the example of water/air exchange. *Environ Sci Technol* 46(4):2196–2203
- Ai J (1999) Quantitation by SPME before reaching a partition equilibrium. In: Pawliszyn J (ed) *Applications of solid phase microextraction. RSC Chromatography Monographs*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 22–37

Anmerkung:

In diesem Kapitel wurden verschiedene instrumentelle Parameter untersucht, unter anderem das Material und die Architektur der Extraktionsfasern. Dabei wurden auch die herkömmlichen SPME-Fasern mit den neu entwickelten mini-Arrow-Systemen verglichen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde auf die Verwendung der mini-Arrow-Systeme verzichtet, da die für diese Arbeit notwendige Analytik nicht im Ultraspurenbereich liegt, und es sich beim dem mini-Arrow-Modul des Autosamplers sowie den Fasern selbst nur um eine Leihgabe des Herstellers für die Dauer des Anwendungstests handelte. Dennoch wurden aus den Versuchsreihen wertvolle Erkenntnisse für die Optimierung der instrumentellen Parameter gewonnen, die im weiteren Verlauf umgesetzt wurden. Insbesondere der gravierende Einfluss des gewählten Moduls für die Durchmischung der Probe während der Äquilibrierungsphase wurde in diesem Ausmaß erstmalig untersucht.

Für das neu entwickelte mini-Arrow-System kann eine höhere Extraktionsrate und damit eine Steigerung der Sensitivität prognostiziert werden, da sich das Sorptionsvolumen gegenüber einer konventionellen SPME-Faser vervielfacht. Gleichzeitig bringt das Arrow-System eine höhere mechanische Stabilität mit sich, die eine höhere Lebensdauer verspricht. Allerdings ist aufgrund der größeren Dimensionen der Arrow-Systeme auch eine Anpassung des Injektors des Gaschromatographen nötig; hier ist der Austausch des Liners und die Ausweitung der Injektorkopf-Öffnung ausdrücklich zu erwähnen.

### 6.3 Originalarbeit zum Thema Einfluss Weinbaulicher Methoden

Bildung von TDN, Vitispiran und anderen Aromastoffen in *Vitis vinifera* sp. Riesling in Abhängigkeit von der Rebstockunterlage, der Klonselektion und der Beerengröße

TDN und Vitispiran sind zwei wichtige Aromastoffe, die vor allem in Rieslingweinen vorkommen und aus glykosidisch gebundenen Vorstufen gebildet werden, die aus dem Carotinoidabbau entstehen. Die Carotinoidbildung findet hauptsächlich während der Wachstums- und Reifephase der Rebe statt, daher wurde der Einfluss der Unterlagsrebe, des verwendeten Rieslingklons und der Beerengröße auf die Bildung der gebundenen TDN- und Vitispiranvorläufer in einer mehrjährigen Studie untersucht.

Es wurde festgestellt, dass sich die Wahl der Rebstockunterlage neben dem Einfluss auf die Wüchsigkeit und den Ertrag auch auf die Menge an gebundenem TDN und Vitispiran ausgewirkt hat. Trotz der starken saisonalen Schwankungen wurden durch je eine der sechs Unterlagen in beiden untersuchten Jahrgänge die höchsten beziehungsweise niedrigsten Werte an gebundenem TDN gemessen. Obwohl das Verhältnis von Beerenschale zu Fruchtfleisch stark von der Beerengröße abhängt, und der Anteil der Carotinoidabbauprodukte in den Schalen der Beeren deutlich höher ist, konnte kein über die Jahrgänge reproduzierbarer Einfluss der Beerengröße auf die Konzentration an gebundenem TDN und Vitispiran festgestellt werden.

Deutlicher war dagegen der Einfluss des selektierten Rieslingklons auf TDN, Vitispiran und andere Aromastoffe der produzierten Weine, der vor allem im Hinblick auf TDN mit der Lockerbeerigkeit der Trauben korreliert werden konnte. In den Weinen, die aus den Klonselektionen mit einer stark aufgelockerten Traubenstruktur erzeugt wurden, wurden jahrgangsübergreifend bis zu 40% höhere Gehalte an gebundenem TDN und eine stärker ausgeprägten Petrolnote in der sensorischen Analyse festgestellt. Sowohl chemisch-analytisch wie auch sensorisch ergaben sich zudem starke saisonale Schwankungen, die durch die unterschiedlichen Witterungsbedingungen in den Jahrgängen erklärt werden konnten.

#### Hinweis zum Copyright

Reprinted with permission from M. Ziegler, P. Wegmann-Herr, H.-G. Schmarr, R. Gök, P. Winterhalter, U. Fischer: Impact of Rootstock, Clonal Selection, and Berry Size of *Vitis vinifera* sp. Riesling on the Formation of TDN, Vitispiranes, and Other Volatile Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 3834-3849, 2020.

Copyright © 2020 American Chemical Society

URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c00049>

DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00049>

Impact of Rootstock, Clonal Selection, and Berry Size of *Vitis vinifera* sp. Riesling on the Formation of TDN, Vitispiranes, and Other Volatile Compounds

Michael Ziegler, Pascal Wegmann-Herr, Hans-Georg Schmarr, Recep Gök, Peter Winterhalter, and Ulrich Fischer\*

Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 3834–3849

Read Online

ACCESS |



Metrics &amp; More



Article Recommendations



Supporting Information

**ABSTRACT:** The  $C_{13}$ -norisoprenoid aroma compounds 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and biosynthetically related vitispirane (VS) are important contributors to the varietal aroma of Riesling wines and are released from glycosidically bound carotenoid breakdown products during bottle aging. TDN is appreciated by numerous winemakers, particularly in aged Riesling wines. Higher levels of TDN, however, are perceived as a “petrol” off-flavor, which is expected to increase due to ongoing climate change. Wines produced from the same Riesling clone, which was grafted on six different rootstocks, varied significantly throughout two vintages in respect to their concentrations of free and bound TDN and VS as well as other volatiles. Over three vintages, the same compounds differed significantly among wines made from eight Riesling clones grafted on the same rootstock. Genetically determined loose grape clusters favored the formation of TDN and yielded wines of stronger sensory petrol intensity. Berry size, however, had no relevant impact on TDN and VS formation.

**KEYWORDS:** TDN, Riesling, clones, rootstock, precursor, wine, volatiles

## ■ INTRODUCTION

Riesling has been cultivated for almost 600 years and belongs to the most important grape varieties globally with a worldwide vineyard area of 64,000 ha. Germany accounts for 37.2% of the cultivated area, while the United States has 7.2%, followed by France (6.3%) and Australia (4.9%).<sup>1</sup> One of the most controversial flavor compounds in Riesling wines is 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN), which exhibits a kerosene- and petrol-like off-flavor.<sup>2</sup> TDN and the biosynthetically related vitispirane isomers (2,10,10-trimethyl-6-methylene-1-oxaspiro[4.5]dec-7-ene, VS) are predominantly found in Riesling wines, with VS expressing a camphoraceous, eucalyptus odor.<sup>3</sup> Both are known degradation products of grape-derived carotenoids.<sup>4–8</sup> Addition of increasing amounts of TDN to Chardonnay wine showed that intermediate TDN levels between 10 and 30  $\mu\text{g/L}$  misled wine experts to classify the Chardonnay as a typical Riesling wine.<sup>9</sup> Below 10  $\mu\text{g/L}$ , the fruity aspects of the wine were masked, while above 30  $\mu\text{g/L}$ , the petrol off-flavor was recognized. Thus, TDN is an ambiguous aroma compound, defining the varietal character of Riesling wine but also constituting a repelling taint.<sup>9</sup> The recognition threshold of TDN has been reported by Simpson to be in the range of 20  $\mu\text{g/L}$ ,<sup>2</sup> while Sacks et al. determined a detection threshold of 2  $\mu\text{g/L}$  in a Chardonnay wine,<sup>10</sup> which has been confirmed in a Riesling wine by a German panel.<sup>11</sup> While the latter values represent the detection threshold for trained panelists, the detection threshold for consumers is higher, ranging between 14.7  $\mu\text{g/L}$  determined with 156 German consumers<sup>11</sup> and 38  $\mu\text{g/L}$  with 36 New Zealand consumers.<sup>12</sup> The first reported recognition threshold of VS of

800  $\mu\text{g/L}$  (Simpson) exceeded the more recent detection threshold of 101  $\mu\text{g/L}$  by a factor of eight, which is partially explained by the application of different sensory methods as recently discussed by Ziegler and co-workers.<sup>11</sup>

Exposing the grapes to more sunlight by defoliation increases both TDN and VS concentrations.<sup>6,13,14</sup> Low pH and bottle aging will increase their concentration likewise due to hydrolytic cleavage of the TDN precursors.<sup>6,15</sup> Due to the chemical diversity of TDN precursors,<sup>16</sup> it is common to express the total TDN concentration via the equivalent of the amount of TDN released by thermal hydrolysis.<sup>17</sup> In European Riesling wines, free TDN concentrations range from 2 up to 22  $\mu\text{g/L}$ <sup>18</sup> and between 0.4 and 23  $\mu\text{g/L}$  in a more recent survey of 250 Riesling wines sampled from two international wine competitions.<sup>17</sup> In the same set of wines, VS varied between 3 and 80  $\mu\text{g/L}$ , while another study reported a maximum value of only 12  $\mu\text{g/L}$ .<sup>19</sup> In warmer climates, Black and co-workers<sup>20</sup> found in Australian Riesling wines TDN concentrations from 2 to 255  $\mu\text{g/L}$ , whereas Marais and co-workers report a range of 3 to 55  $\mu\text{g/L}$  for South African Riesling wines.<sup>21</sup>

Over the time period of 35 years, official records show a 4 week earlier grape maturation to the equal level of 170 g sugar per liter or 10.5% potential alcohol in 10 Riesling vineyards in

Received: January 3, 2020

Revised: February 6, 2020

Accepted: February 7, 2020

Published: February 7, 2020



ACS Publications

© 2020 American Chemical Society

3834

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00049>  
*J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 3834–3849



the Palatinate region in Germany. Grapes are exposed to higher temperatures and more intense sunlight,<sup>22,23</sup> increasing the potential for TDN and VS formation in Riesling grapes even in a cool climate such as Germany. Therefore, it is essential to study viticultural strategies to reduce the formation of carotenoid metabolites in the berries, which function as TDN precursors in the final wines and counteract at an early stage a potential refusal of Riesling wines by consumers.

Due to the dominating effect of sunlight on the formation of TDN precursors in the berries, three viticultural factors were studied in three successive vintages (2015–2017): (i) rootstocks determining vigor of shoot growth and cluster shading, (ii) Riesling clones differing in density of their grape clusters, and (iii) distribution of their berry diameter.

Besides uptake of water and nitrogen,<sup>23–25</sup> the choice of rootstocks has a long-term influence on shoot growth as well as number and size of clusters due the spatial exploration of the soil by their roots.<sup>26–28</sup> So far, the effect of rootstocks on grape composition has been only studied regarding general parameters such as yield, sugar, acidity, and pH as well as phenolic composition of whole berries, skins and pulp.<sup>27,29,30</sup> Thus, this paper reports for the first time the impact of rootstocks on volatiles in the finished wines and TDN and VS in particular.

Sponholz and Huehn report 0.2 to 8.7  $\mu\text{g/L}$  TDN in 12 vintages of Riesling wines made from four Riesling clones of the same breeder (Gm64, Gm110, Gm198, and Gm239).<sup>31</sup> Rudy observed variation in total TDN between 23 and 36  $\mu\text{g/L}$  among eight German Riesling clones.<sup>15</sup> Since smaller berries cause a larger skin-to-pulp ratio, it may be concluded that smaller berries possess higher levels of carotenoids and, therefore, the subsequent wines may contain more volatile  $\text{C}_{13}$ -norisoprenoids.<sup>32</sup>

The increase in TDN concentration due to sun-exposed versus shaded Riesling grapes as well as longer hang time were first described by Marais et al.<sup>33</sup> Through the application of shade cloths, the ambient light was gradually varied from 4 to 97% and could be correlated with the concentration of total TDN in the Riesling grape juice.<sup>13</sup>

Overall, the literature on TDN formation due to viticultural practices is rather limited and lacks a systematic approach. Most studies rely on 1 year experiments, neglecting the significant variation in weather conditions between years in cool climate viticulture regions.<sup>13,14,16,30,32,33</sup> Other reports measured only total TDN values, which cannot be directly related to the olfactory active free TDN in the wine, governing sensory thresholds as well as consumer perception and rejection.<sup>16,19</sup> Furthermore, aroma compounds of Riesling wines, which may mask TDN perception, have not been studied in the context of strategies to lower TDN formation in the vineyards. The same is true for sensory evaluation of wines obtained from different viticultural trials.

It was our objective to study the genetically determined variation in free and bound TDN and VS among different rootstocks and Riesling clones in context of the changing weather conditions during two or three consecutive years, respectively. Furthermore, we link the observed concentrations of TDN and VS with physiological factors such as berry size or bunch compactness, which partially govern sun exposure of single berries. Since off-flavors such as TDN are always perceived against the background of other sensory relevant volatiles, we analyzed a wide range of aroma compounds in the

wines made from different clones and rootstock–clone combinations.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Ethanol ( $\geq 99.8\%$ ), sodium chloride ( $\geq 99\%$ ), potassium hydroxide (p.a.), and L(+)-tartaric acid (p.a.) were purchased from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany). For calibration of gas chromatographic analysis, a model wine with 12 vol % ethanol was prepared with 10 g/L tartaric acid and adjusted pH to 3.0 using potassium hydroxide solution (2N). Preparation of saturated aqueous sodium chloride solution (brine) was done in tap water boiled for 5 min. TDN,  $d_6$ -TDN, and VS were synthesized as described earlier.<sup>17</sup> Other target compounds as well as deuterated standards were purchased from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA). Pectinase (Lafazym CL) and *Saccharomyces cerevisiae* strain (Zymaflore delta) were purchased from Laffort (Bordeaux, France).  $\text{KHSO}_4$  solution (Sulfureuse P150) and gelatine were obtained from Erbslöh AG (Geisenheim, Germany). Nutrition aid (GoFerm) was purchased from Lallemand Inc. (Montreal, Canada).

**Sensory Evaluation.** Sensory analysis was conducted with a trained panel (14 females and 13 males; 19–64 years, average of 41 years), all of whom had previously participated in other descriptive analysis of wine. The study was conducted in an odor-free, well-lit room with an ambient temperature of 21 °C that was equipped according to ISO 13301.<sup>34</sup>

The list of sensory attributes in Table 1 was obtained by panel discussion after tasting a subgroup of experimental wines. Using the

Table 1. Sensory Attributes for Descriptive Analysis

attribute	verbal description	standard recipe
color	color intensity	no standards provided, training with exemplary wines
smell		
citrus	smell of fresh lemons	40 mL/L freshly pressed lemon juice
petrol	kerosene-like smell	300 $\mu\text{L/L}$ stock solution of 100 mg/L TDN in ethanol
peach	smell of peach	50 mL/L peach juice (Granini Inc.)
passion fruit	smell of passion fruit	5 mL/L peach syrup (Monin Inc.)
floral	smell of flowers	40 $\mu\text{L/L}$ stock solution linalool (1 mg/L in ethanol) + 300 $\mu\text{L/L}$ stock solution of rose oil (1 mL in ethanol)
smoky	smell of whiskey/smoked ham	1 mL/L stock solution vinylguaiacol (1 mg/mL in ethanol) + 300 $\mu\text{L/L}$ 10 year-old Malt Whisky (Laphroaig Inc.)
taste		
sweet	sweet taste	3 g/L fructose
sour	sour taste	4 g/L tartaric acid
body	bitter taste	no standards provided, training with exemplary wines
bitter	bitter taste	1 g/L caffeine

sensory method of Napping, all experimental wines were grouped in the two-dimensional matrix, and wines from the corners and center were selected to represent the maximum sensory variance of all the wines. For each training and tasting session, standard solutions were freshly prepared in a dry Riesling (Staatsweingut mit Johannitergut, Neustadt/Weinstraße, Germany) from the same vintage as the experimental wines. During three training sessions, judges were familiarized with the standard solutions in varying concentrations. For descriptive analysis, six to eight wines were presented in randomized order at 12 °C in clear tulip-shaped glasses (Sensus, DIN 10960, Zwiesel Kristallglas, Zwiesel, Germany). Replicates of the experimental treatments were served in different sessions. Panelists rated attribute intensities on a 10 cm line scale, which was anchored by “not detectable” on the left end and “very strong” on the right end. Odor descriptors were assessed in a comparative set-up, rating the intensity

of one attribute in all wines before assessing the next attribute. Orally perceived attributes were evaluated monadically, assessing all descriptors in one wine before continuing to the next one after cleansing the palate with tap water at room temperature.

**Clonal and Rootstock Trials.** Vines for clonal experiments (Riesling clones B1090, B1091, B1094, N90, Red Riesling, DN500, GM312, and TR34) were planted in 2009 and 2010, and grown in an experimental vineyard of the Staatsweingut mit Johannitergut (Neustadt/Weinstraße, Germany). Vines were cane pruned in a VSP trellising system with rows orientated north–south. In the same vineyard, the Riesling clone N90 was grafted on the rootstocks SO4, BörnerZ, 140 Ruggeri, Gravesac, Richter 110, and 3309 Couderc, planted in 2002. Additional varietal information on rootstocks is provided in Table 2. All of the vines were once defoliated in the

Table 2. Rootstock Crossings

rootstock variant	variety
SO4	<i>Vitis berlandieri</i> × <i>Vitis riparia</i>
BörnerZ	<i>V. riparia</i> × <i>Vitis cinerea</i>
140 Ruggeri	<i>V. berlandieri</i> × <i>Vitis rupestris</i>
110 Richter	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>
3309 Couderc	<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>
Gravesac	161–49 C ( <i>Vitis riparia</i> × <i>Vitis rupestris</i> ) × 3.309 Couderc

bunch zone by 75% on the eastern side before véraison (August 06 in 2015, August 24 in 2016, and August 09 in 2017, respectively). Harvest dates were September 21 in 2015, October 6 in 2016, and September 13 in 2017 for the clonal experiments and September 30 in 2016 and September 20 in 2017 for the rootstock experiments.

Table 3. Investigated Volatile Compounds

analyte	abbreviation	deuterated standard	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	calibration range ( $\mu\text{g/L}$ )	$R^2$	$V_K$ (%)	quantifier ions ( $m/z$ )	$t_R$ (min)
deuterated standards								
$d_6$ -1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene	$d_6$ -TDN						148, 163, 178	31.74
$d_4$ - $\beta$ -damascenone	$d_4$ - $\beta$ -Dama						73, 194	32.89
$d_5$ -4-ethylguaiaicol	$d_5$ -4-EG						139, 157	28.68
$d_5$ -linalool	$d_5$ -LinOH						98, 126, 141	21.15
$d_5$ -2-phenylethanol	$d_5$ -2-PhEtOH						96, 97, 126, 127	17.30
$d_{13}$ -hexanol	$d_{13}$ -HexOH						64, 78	10.67
$d_5$ -ethylacetate	$d_5$ -EtAc						93	3.16
$d_5$ -ethylhexanoate	$d_5$ -EtHex						93, 106, 120	16.65
$d_5$ -hexylacetate	$d_5$ -HexAc							
wine compounds								
1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene	TDN	$d_6$ -TDN	0.01	0.05–20.1	0.9996	1.4	142, 157, 172	31.87
vitispiranes	VS	$d_6$ -TDN	0.05	0.2–20.9	0.9982	1.9	163, 177, 192	29.02
$\beta$ -damascenone	$\beta$ -Dama	$d_4$ - $\beta$ -Dama	0.1	0.2–21.4	0.9991	1.9	69, 190	32.99
4-ethylguaiaicol	4-EG	$d_5$ -4-EG	0.9	4.8–477.0	0.9991	3.7	137, 152	28.83
4-vinylguaiaicol	4-VinG	$d_5$ -4-EG	0.9	4.8–477.0	0.9979	3.4	107, 135, 150	30.20
linalool	LinOH	$d_5$ -LinOH	1.4	6.1–609.0	0.9992	2.3	93, 121, 136	21.27
2-phenylethanol	2-PhEtOH	$d_5$ -2-PhEtOH	96.1	303–30,294	0.9988	3.2	91, 92, 121, 122	21.94
3-methylbutanol	3-MeBuOH	$d_{13}$ -HexOH	55.9	1012.5–101250.0	0.9978	2.8	55, 70	5.95
1-hexanol	HexOH	$d_{13}$ -HexOH	12.6	41.0–4100.0	0.9928	2.3	56, 69, 84	11.02
ethylacetate	EtAc	$d_5$ -EtAc	158.5	988.0–98802.0	0.9948	1.7	88	3.20
ethylbutanoate	EtBu	$d_5$ -EtHex	1.4	4.8–478.6	0.9967	2.8	71, 88	8.29
ethylhexanoate	EtHex	$d_5$ -EtHex	1.6	15.1–1507.3	0.9978	1.4	88, 101, 115	16.80
ethyloctanoate	EtOct	$d_5$ -EtHex	1.6	17.1–1705.2	0.9962	4.1	88, 101, 127	25.37
hexylacetate	HexAc	$d_5$ -HexAc	1.0	9.9–990.5	0.9994	1.3	43, 61, 73	17.41
2-phenylethylacetate	2-PhEtAc	$d_5$ -2-PhEtOH	3.1	10.2–1021.6	0.9961	1.4	57, 67, 82	27.90
3-methylbutylacetate	3-MeBuAc	$d_5$ -HexAc	2.7	21.7–2168.1	0.9973	1.8	55, 70, 87	11.38
2-methylbutylacetate	2-MeBuAc	$d_5$ -HexAc	1.4	2.1–216.8	0.9966	1.8	55, 70, 87	11.49



treated as described above and fermented in 1000 mL Erlenmeyer flasks (VWR International LLC, Radnor, USA). Upon completion of fermentation, wines were chilled to 5 °C, racked from the lees, and bottled unfiltered with 30 mg/L free SO<sub>2</sub> into 250 mL screw cap bottles and stored at 5 °C. In vintages 2016 and 2017, berry fractionation was done at a larger scale but with only three clones (N90, B1090, and GM312). This allowed the fermentation of a higher number of size fractions, which were composed of berries with diameters of <11, 11–13, and >13 mm for 2016 and <9, 9–11, 11–13, 13–15, and >15 mm for 2017. Microvinification was identically as described above for the 2015 vintage.

**Wine Analysis.** Fermentation of experimental trials was monitored via specific gravity using a densimeter (DMA 35, Anton Paar GmbH, Graz, Austria). Additional wine parameters such as ethanol, glucose, fructose, pH, total acidity, and yeast assimilable nitrogen were measured in grape juice and wine via Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) (WineScan FT120 Basic, Foss, Hilleroed, Denmark).

**Analysis of Volatiles, Bound TDN, and Bound VS via HS-SPME-GC–MS.** For the analysis of bound TDN and bound VS, 3 mL wine was hydrolyzed for 30 h at 90 °C, cooled to ambient temperatures, and 1:50 diluted with model wine, according to the method described earlier.<sup>17</sup> For chemical analysis, 8 mL of brine and 2 mL of sample wine (sample was diluted with model wine, if necessary) were mixed in a 20 mL headspace vial with a screw cap and a polytetrafluoroethylene-lined silicone septum (CZT, Kriftel, Germany). Ten microliters of an ethanolic solution of deuterated analytes (see Table 3) was added via a microliter syringe. Calibration ranges were determined by a nine-point calibration curve plotting analyte concentration versus area ratio between the analyte and the deuterated standard. Good coefficients of determination ( $R^2 > 0.99$ ) were obtained in all cases. Coefficients of variation ( $V_c$ ) were below 5% for all analytes. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) sampling was carried out with a Combi PAL autosampler using a polydimethyl siloxane SPME fiber of 1 cm in length and 100  $\mu$ m in thickness (both from CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Samples were incubated for 10 min at 40 °C followed by an extraction time of 20 min at 40 °C and a stirring rate of 500 rpm. Gas chromatographic analyses were conducted with a Trace GC coupled to a Trace DSQ quadrupole mass spectrometer (both from Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany). Desorption was performed in the split/splitless injector of the gas chromatograph at a temperature of 240 °C using splitless mode (Splitless time of 2 min, followed by a split flow of 15 mL/min). Before and after each analysis, cleaning and conditioning of the fiber was conducted at 250 °C for 3 min under a nitrogen flow of 6 mL/min in the conditioning station of the autosampler. The SPME fiber penetrated the injector to a depth of 54 mm. The temperature of the GC oven was held at 40 °C for 2 min and then programmed at 3.5 °C/min to 200 °C, followed by a ramp of 25 °C/min up to 300 °C with a final conditioning period of 5 min. Helium was used as a carrier gas in constant flow mode (1.0 mL/min). The separation column was a 30 m  $\times$  0.25 mm inner-diameter fused silica capillary coated with a 5% phenyl containing polydimethylsiloxane stationary phase of 0.5  $\mu$ m in film thickness (ZB-5 from Phenomenex (Aschaffenburg, Germany)). The GC–MS transfer line was kept at 250 °C, and the ion source was set to 240 °C. Positive electron ionization (EI+) was done at 70 eV with an emission current of 50  $\mu$ A. A total ion chromatogram was generated with a range of  $m/z = 29$ –300. Extracted ion chromatograms with the parameters listed in Table 3 were used to calculate the peak areas, using XCalibur 2.2 (ThermoFisher Scientific) for data analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Impact of Rootstock Selection on Free and Bound TDN and VS.** To determine the influence of rootstock selection on the formation of free and bound TDN and VS, the wines from vintages 2016 and 2017 were analyzed, resulting in the concentrations displayed in Table 4. Free TDN varied significantly among rootstocks and between vintages

(ANOVA). In 2016, free TDN varied significantly among all rootstocks by a factor of 2, and all rootstocks exceeded the sensory detection threshold of 2  $\mu$ g/L by a factor of 2.5 (3309 Couderc) or even 6 (BörnerZ). In 2017, only BörnerZ exceeded the threshold by a factor of 3, while all other rootstocks produced Riesling wines with TDN concentrations significantly below the threshold. This corresponds with levels of bound TDN, where BörnerZ displayed in both vintages the second highest values. Contrarily, the rootstocks SO4 and 3309 Couderc with their low free TDN values also showed the lowest bound TDN in both vintages. While free TDN varied significantly between both vintages, this was not the case for the bound TDN.

The sum of all four VS isomers yielded values 10 times lower than the detection threshold of 101  $\mu$ g/L. Even if all bound VS would be instantly hydrolyzed, the obtained theoretical free VS would be still below (2016) or only slightly above the threshold (2017). For bound VS, vintage had a larger significant influence than the rootstock varieties, while for the free VS, the contrary was the case.

The quantity of grapes differed significantly between years as well as among rootstocks, with rootstock SO4 providing the lowest yield in both vintages and BörnerZ the highest in 2017 and the third highest in 2016. Significant differences in sugar accumulation due to rootstock and vintage could be explained by the inverse relationship between yield and sugar content in the berries, which depends to a large extent on the leaf-to-fruit ratio.<sup>35</sup> Weather conditions in 2016 promoted vine nutrient supply due to high precipitation in the first half of the year (385 mm), while rainfall in 2017 was extraordinary low with 143 mm compared to the 25 year average of 274 mm.<sup>36</sup> It is interesting to note that, despite large differences in yield, the yeast available nitrogen (YAN), which is comprised of ammonium and alpha-amino nitrogen of all amino acids except for proline, differed only to small extent, but still significantly, between both vintages. Although YAN varied significantly among rootstocks (83 to 145 mg/L), these concentrations could not meet the nitrogen requirement of yeast of at least 150 mg/L YAN.<sup>37</sup> Since the nutritional status of the vine might impact the formation of TDN,<sup>38</sup> the observed negative correlation between YAN and bound TDN in 2017 ( $r$  (Pearson) =  $-0.86$ ) might be conclusive, although in 2016, no correlation was observed. Perhaps the nutritional status in 2016 was sufficient enough to avoid stimulation of TDN formation, while the lower measured level of YAN in 2017 triggered a higher bound TDN concentration. Similarly, concentrations of bound VS decreased with higher YAN, but not significantly.

In regard to the significant variation of free and bound TDN due to the choice of rootstocks, the literature is scarce. For four rootstocks (SO4, 3309 Couderc, 5 BB, and 5 C) in a Riesling trial in British Columbia,<sup>26</sup> only small effects of rootstocks regarding physiological parameters and juice composition were reported, except for pH. Examining rootstocks grafted to Shiraz or Cabernet Sauvignon, they had an effect on pruning weight,<sup>39</sup> grape yield,<sup>40</sup> C<sub>13</sub>-norisoprenoids,<sup>41</sup> anthocyanins, and carotenoids.<sup>30</sup> According to Schmid et al., the rootstocks examined in this study differ in terms of vigor, drought resistance, and length of ripening period.<sup>42</sup> Vine vigor in the experimental vineyard was visually assessed on a 0-to-9 scale with 10 replicates. Average values were correlated (Pearson) with free and bound TDN and VS in Table 5. Although not significant in every vintage and for each parameter, in general,



Table 4. Viticultural Parameters, Grape Juice Composition, Wine Volatiles, and Bound TDN/VS of Riesling Wines Made from Different Rootstocks (After 9 Months of Bottle Aging)<sup>a</sup>

rootstock variety	2016						2017						significance		
	SO4	BörnerZ	Richter 110	Gravesac	140 Ruggeri	3309 Couderc	SO4	BörnerZ	Richter 110	Gravesac	140 Ruggeri	3309 Couderc	odor threshold	rootstock	vintage
yield (t/ha)	20.8	22.2	20.8	27.0	23.7	21.5	8.7	14.6	11.2	12.4	13.0	12.8		***	***
sugar (g/L)	191	187	182	175	176	190	213	209	206	211	206	208		**	***
titratable acidity (g/L)	9.8	10.5	10	9.8	10.6	9.5	10.1	10.3	9.1	9.3	9.2	9.7		*	*
pH	2.95	2.93	2.95	2.97	2.9	2.98	3.04	3.06	3.1	3.08	3.06	3.07		ns	*
YAN (mg/L)	111	138	109	145	121	106	112	107	83	113	104	109		***	***
vigor	7	8	9	8	8	7	7	9	8	8	8	8		*	ns
TDN-bound (μg/L)	77.4 c	125.4 a	126.7 a	107.0 b	82.2 c	81.3 c	88.5 d	106.3 b	124.5 a	96.6 c	92.6 cd	86.1 d		***	ns
VS-bound (μg/L)	71.5 c	97.1 a	96.9 a	85.7 bc	80.6 c	90.9 ab	105.8 c	130.8 ab	135 a	115.3 c	111.8 c	125.2 b		***	***
TDN-free (μg/L)	6.8 c	12 a	8.7 b	7.0 c	6.5 cd	5.4 d	2.5 bc	10.2 a	2.6 bc	3.0 b	2.3 c	2.5 bc	2 <sup>b</sup>	***	***
VS-free (μg/L)	2.7 c	3.4 c	10.0 a	10.1 a	7.8 b	6.7 b	4.5 c	8.3 a	4.8 b	5.0 b	3.4 d	4.3 c	101 <sup>b</sup>	***	***
β-Dama (μg/L)	2.5 a	2.5 a	1.5 c	1.6 c	1.1 d	2.2 b	1.7 b	2.1 ab	0.8 c	0.6 c	1.0 c	2.6 a	0.05 <sup>c</sup>	***	**
VinG (μg/L)	39.3 a	32.4 b	26.1 c	20.1 d	20.1 d	20.1 d	30.5 b	49.7 a	32.5 b	22.5 c	17.8 cd	12.7 d	40 <sup>c</sup>	**	ns
LinOH (μg/L)	72.1 a	53.6 b	74.7 a	58.7 b	53.9 b	72.8 a	102.7 c	68.4 e	113.6 b	82.5 d	80.6 d	126.7 a	25 <sup>c</sup>	***	***
2-PhEtOH (mg/L)	15.4 c	18.7 b	27.0 a	10.4 e	13.6 d	15.4 c	9.7 e	14.7 a	12.9 b	10.6 d	11.2 c	10.7 d	14 <sup>c</sup>	***	***
3-MeBuOH (mg/L)	255.3 c	265.8 c	363.2 a	225.3 c	265.7 b	285.7 b	171.9 c	225 a	197.5 b	174.6 c	204.8 ab	168.5 c	30 <sup>c</sup>	***	ns
HexOH (mg/L)	1.1 d	1.0 d	2.8 a	1.4 c	1.4 c	1.6 b	1.3 c	2.1 b	2.8 a	1.3 c	2.2 b	2.7 a	8 <sup>c</sup>	***	***
EtAc (mg/L)	82.8 a	59.9 bc	73.5 ab	52.1 c	61.3 bc	51.5 c	88.4 ab	65.3 c	69.6 bc	83.9 abc	86.1 ab	89.3 a	12 <sup>c</sup>	*	**
EtBu (μg/L)	213.5 b	211.0 c	209.4 c	297.9 a	293.2 a	296.0 a	289.9 b	249.6 c	297.1 ab	301.2 ab	311.4 ab	318.2 a	20 <sup>c</sup>	***	***
EtHex (μg/L)	1371.8 b	1059.3 c	880.7 d	1875.6 a	1869.8 a	1846.4 a	1800.6 b	1560.9 c	1860.5 ab	1860.6 ab	1990.2 a	1813.0 b	14 <sup>c</sup>	***	***
EtOct (μg/ L)	1650.3 b	1478.3 b	2009.3 b	3656.0 a	3799.0 a	3624.8 a	3869.1 a	3287.7 b	3526.8 ab	3814.3 a	3903.4 a	3878.6 a	5 <sup>c</sup>	***	***
HexAc (μg/ L)	72.1 d	66.8 d	96.6 c	165.3 a	98.3 c	127.8 b	75.3 d	62.9 e	92.9 c	72.2 d	146.5 b	171.2 a	1800 <sup>c</sup>	***	ns
2-PhEtAc (μg/L)	23.4 cd	25.9 bc	27.4 ab	27.9 ab	21.7 d	29.8 a	30.4 a	18.3 c	31.4 a	26.3 b	31.6 a	30.6 a	2400 <sup>c</sup>	***	**
3-MeBuAc (μg/L)	915.7 e	730.3 f	1651.4 c	2182.7 a	1540.0 d	1848.7 b	2260.4 a	1018.5 d	1838.7 c	2042.5 b	2367.9 a	1922.4 bc	160 <sup>c</sup>	***	***
2-MeBuAc (μg/L)	76.1 bc	69.4 d	92.7 a	79.1 b	72.1 cd	74.4 c	99.9 a	78.6 b	92.4 ab	95.2 a	103.8 a	88.9 ab	1600 <sup>c</sup>	**	***

<sup>a</sup>Letters indicate significant differences among the variants within the individual vintage. Data represent mean values with  $n = 2$ . Significance is indicated with ns (not significant), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ . <sup>b</sup>Ziegler et al.<sup>11</sup> <sup>c</sup>Waterhouse et al.<sup>44</sup>

**Table 5. Correlation Coefficients  $r$  (Pearson) of Viticultural Parameters and Leaves of Bound and Free TDN and VS, Respectively<sup>a</sup>**

correlation	2016	2017	2016 + 2017
vigor vs bound TDN	<b>0.79</b>	0.39	<b>0.63</b>
vigor vs bound VS	0.56	<b>0.67</b>	<b>0.42</b>
vigor vs free TDN	0.47	<b>0.78</b>	0.23
vigor vs free VS	<b>0.61</b>	<b>0.72</b>	<b>0.54</b>
vigor vs yield	0.13	<b>0.93</b>	0.04
yield vs bound TDN	0.05	0.11	0.05
yield vs bound VS	-0.10	0.50	-0.78
YAN vs yield	0.79	0.04	<b>0.67</b>
YAN vs bound TDN	0.42	-0.86	0.05
YAN vs bound VS	0.15	-0.65	-0.56

<sup>a</sup>Bold numbers indicate significance ( $p < 0.05$ ) of parameters with  $n = 2$ .

bound and free TDN and VS increased with more vigorous growth of the vines. The opposite was expected because increasing vine vigor favors the shading of grape clusters, which is linked to less TDN formation.<sup>13</sup> Excluding any sun exposure for red Shiraz grapes by using cardboard boxes, bound TDN decreased from 162 to 39  $\mu\text{g/L}$  and  $\beta$ -damascenone from 45 to 4  $\mu\text{g/L}$ , while the levels of free  $\beta$ -damascenone remained constant at 3.6  $\mu\text{g/L}$ .<sup>43</sup> However, levels of free TDN were below the limit of detection.

Our results suggest that there are two opposing effects regarding the formation of bound or free TDN/VS: while shading due to high vigor suppresses the formation of TDN and VS via limited sun exposure and diminished carotenoid synthesis and breakdown, enhanced TDN and VS concentrations in vigorous rootstocks are an unexpected finding, which requires more detailed investigations in the future.

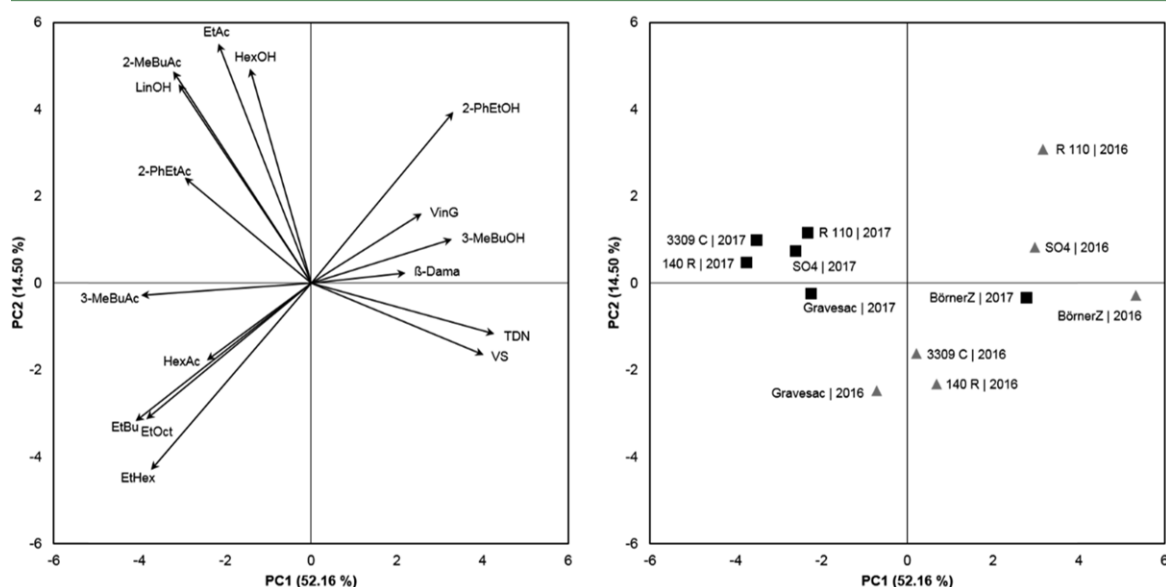
**Impact of Rootstock Selection on Wine Volatiles.** In the wines made in 2016 and 2017 from the N90 Riesling clone

grafted to several rootstocks, all aroma compounds varied significantly due to the choice of rootstocks; however, not all of them surpassed the published thresholds listed in Table 4. Thus, we will discuss only those at or above their thresholds.<sup>44</sup>

Linalool varied between 54 and 127  $\mu\text{g/L}$ , being two to five times higher than the odor threshold. Vintage had a significant effect, yielding higher concentrations in the warmer vintage 2017. The fruity esters ethyl octanoate (peach), ethyl butanoate (apple), and 2-phenylethyl acetate (rose and honey) varied significantly among rootstocks and vintages at levels of 400-fold the sensory threshold, twice the threshold and half the threshold, respectively. 4-Vinylguaiacol (smoky and phenolic) varied significantly between 12.7 and 49.7  $\mu\text{g/L}$  among rootstocks but not between vintages. Only for the rootstocks SO4 in 2016 and BörnerZ in 2017, the published threshold of 40  $\mu\text{g/L}$  was reached or slightly exceeded.

In a principal component analysis (PCA) of all significant aroma compounds in the Riesling wines, the horizontal PC explained half of the variation and was defined by elevated ester and monoterpene concentrations on the right side and higher concentrations of alcohols, C<sub>13</sub>-norisoprenoids, and volatile phenols on the left side (Figure 1). Except for the 2017 Riesling on BörnerZ rootstock, the 2016 wines were shifted to the left side, while the 2017 wines were located on the right side. In the warm vintage 2017, the yield was smaller, and higher soluble solids indicated an advanced maturation than in the colder vintage 2016. This may have contributed to an enhanced ester formation in 2017, while lower pH values in 2016 may have favored TDN formation by hydrolysis.

The observation that vintage had a larger effect than choice of rootstocks may be explained by large yield differences between both vintages. High yields coincide with bigger grape bunches and large berries. Consequently, the sun-exposed berry skin area is relatively smaller than at lower yields, with less packed bunches and smaller berry diameters. This may explain the higher linalool content in low-yielding 2017 but is



**Figure 1.** Scores and loadings plot of principal component analysis (PCA) of free volatiles for wines obtained from different rootstocks in vintages 2016 and 2017. Black triangles represent 2016 wines, and gray squares represent 2017 wines; data represent mean values with  $n = 2$ .

in contrast to the higher TDN,  $\beta$ -damascenone, and 4-vinylguaicol concentrations in the high-yielding 2016 vintage. The fact that vintage effects were more dominant than the choice of rootstocks may be also explained by the similar growth behavior of the rootstocks, expressed by visually assessed vigor values of 7 to 9.

In conclusion, after reporting for the first time the significant impact of rootstocks on the volatile composition of Riesling wines, further studies with more balanced yields and a larger variation in vigor among the studied rootstocks are necessary to study, in more detail, the underlying physiological factors for these phenomena.

**Impact of Riesling Clones on TDN Formation and Volatiles.** Free TDN and VS of wines obtained from different Riesling clones were the lowest or second lowest in the N90 clone for each of the three vintages, whereas the highest concentrations were found in the clone B1094 in 2015 and DN500 in 2016 and 2017 (Table 6). TDN concentrations surpassed the odor threshold of 2  $\mu\text{g/L}$  by up to three times. Only in 4 out of 24 wines, concentrations remained below the odor threshold, all of them from the 2017 vintage. At the same time, none of the wines matched the consumer perception threshold of 14.7  $\mu\text{g/L}$  or even their rejection threshold of 60  $\mu\text{g/L}$ . For VS, the concentrations remained much below the odor detection threshold of 101  $\mu\text{g/L}$ .<sup>11</sup>

Comparing the *F* values in Table 6, vintage had a larger effect on all volatiles than clonal variation. Still, within each vintage, differences among the clones were highly significant. In general, wines from the colder 2016 vintage showed higher free TDN concentrations than the ones made in warmer vintages 2015 and 2017. VS varied less, but still significant. Opposite to free TDN/VS, bound TDN and VS were lower in 2016, while vintages 2015 and 2017 displayed higher levels. Similar to the free TDN, clone N90 showed the lowest concentrations of bound TDN and VS, while the clones B1094 and DN500 yielded the highest bound TDN levels.

Figure 2 displays only those volatiles that varied significantly among clones and exceeded the published thresholds.<sup>44</sup> Although  $\beta$ -damascenone varied significantly among clones and vintages, the sensory effect may be limited because the obtained values surpassed the published odor threshold by a factor of 20 to 60, limiting the perceptual odor difference due to the effect of saturation. All of the 2015 and 2016 wines exceeded the sensory threshold of linalool, but in 2017, most of them were below the threshold. The 2016 wines contained less esters but more TDN, linalool, and 4-vinylguaicol, which may have favored a more intense petrol note perception. The largest variation was observed for the smoky and phenolic 4-vinylguaicol (6.8–49.7  $\mu\text{g/L}$ ), surpassing the odor threshold only in a few wines in 2016. As already observed in the rootstock trials, wines made from clones in vintage 2016 displayed lower ester concentrations than those made in the warmer years 2015 and 2017.

According to the PCA displayed in Figure 2, all esters are grouped on the right side of the horizontal PC1, while TDN,  $\beta$ -damascenone, 4-vinylguaicol, and linalool are loaded on the negative branch of PC1. Esters are mainly generated during fermentation, governed by amino acid composition of the grape juice as well as used yeast strains and fermentation temperature. In contrast, precursors of TDN,  $\beta$ -damascenone, 4-vinylguaicol, and linalool are formed in the grape berry skin, and formation of carotenoids, glycosylated linalool, or ferulic acid is favored by better sun exposure.

**Impact of Riesling Clones on Sensory Properties.** The PCA in Figure 3 is limited to the significant odor attributes of wines obtained from all three vintages. We omitted significant taste attributes because volatiles in general and TDN in particular contribute predominantly to odor perception and only little to gustatory cues. Color assessment was incorporated because of the possible contribution of carotenoids. Overall, different clones caused a similar sensory variation within the three vintages. The highest odor intensities occurred in the cooler vintage 2016 (growing degree days (GDD) = 1467) followed by the warmer vintage 2015 (GDD = 1591). By far, the lowest intensities were scored in the warmest year 2017 (GDD = 1643).

Wines from the warmer vintage 2015 were rated the highest in yellow color and for the petrol note. However, this does not coincide with the concentrations of free TDN in Table 6, where the 2016 wines showed the largest free TDN values. At the same time, wines from 2016 displayed the strongest intensities of citrus, peach/passion fruit, floral, and smoky odors, which may have masked the perception of a more intense petrol note associated with elevated TDN levels in 2016. Wines made from the clones in 2017 were the lowest in all odor attributes, which correlates with low volatile concentrations, including the smallest TDN values. Correlation of sensory intensity of the petrol note with the concentration of free TDN yields a correlation coefficient of merely  $r = 0.38$  ( $p = 0.07$ ). One possible explanation for this unexpected low correlation could be the significant positive correlation of TDN and linalool concentrations over all vintages with  $r = 0.72$  (Pearson). Among other aroma compounds, linalool levels well above the sensory thresholds may have masked TDN and diminished perception of the petrol note despite higher TDN concentrations.<sup>45</sup>

Obviously, in all three vintage clusters, N90 was located at the most right position, associated with the lowest petrol flavor and smoky intensities, which coincide with the lowest TDN concentrations measured in the particular wines.

**Impact of Riesling Clones on Cluster Density and Berry Size Distribution.** Clonal selection in the 1950s and 1960s focused mainly on high-yielding clones, such as N90. More current selections such as the B1090, B1091, and B1094 clones are selected for loose clusters, lower yield, and more sun exposure of single berries. Loose clusters limit *Botrytis cinerea* infections because single berries have more space to grow without pressing against each other and avoiding possible berry disruption. To study these differences among bunches, we calculated cluster density by dividing the weight of single grape clusters through the length of the bunch. Further on, we fractionated the berries according to their diameter to obtain the distribution of berry sizes across the different clones.

Grape bunch weight and cluster length were measured for five bunches from each of the four field replicates in 2015 and for 10 bunches from three field replicates in 2016 and 2017. Clones varied significantly in all three parameters, and neither field replicates ( $n = 4$ ) nor vintage ( $n = 3$ ) had a significant effect. Thus, the genetically determined differences among the clones are the dominating factor for cluster density and were consistent over vintages and soil variation within the same vineyard.

While the grape cluster length of most of the clones varied only slightly between 13 and 16 cm, weight differed more substantially and was the highest for the clones N90 and Red Riesling (RR). The lowest cluster weight and densities were

Table 6. TDN, VS, and Free Volatiles of Wines Made from Different Riesling Clones<sup>a</sup>

clone	vintage	bound TDN (μg/L)	bound VS (μg/L)	free TDN (μg/L)	free VS (μg/L)	β-Dama (μg/L)	VinG (μg/L)	LinOH (μg/L)	PhEtOH (mg/L)	3- MeBuOH (mg/L)	HexOH (mg/L)	EtAc (mg/L)	EtBu (μg/L)	EtHex (μg/L)	EtOct (μg/L)	HexAc (μg/L)	3- MeBuAc (μg/L)	2- MeBuAc (μg/L)	2- PhEtAc (μg/L)
N90	2015	126.3 b	97.3 d	3.2 de	6.7 b	2.6 ab	13.5 a	39.5 c	11.4 b	289.8	1.4 a	103.4 cd	392.6	2131.8 a	4210.2 bc	50.5 ab	2717.2 a	132.6 bc	27.6 bc
B1090		161.8 a	106.4 cd	4.5 c	9.2 b	2.2 cd	15.1 a	67.6 a	11.1 bc	296.2	1.2 bc	125.3 abc	329.7	1898.9 cd	3551.2 cde	39.4 e	2714.8 a	148.5 a	27.5 c
B1091		157.6 a	121.2 abc	2.7 e	8.9 b	2.6 ab	7.9 cd	40.0 c	10.5 cd	273.2	0.9 e	94.5 d	351.9	1770.9 d	3344.7 de	38.9 e	2573.2 ab	133.2 bc	28.7 abc
B1094		160.1 a	134.7 a	7.2 a	13.8 a	2.2 cd	6.8 d	38.8 c	10.8 bcd	267.1	1.0 de	137.0 ab	322.5	1571.8 e	2970.3 e	23.8 f	2096.7 c	121.6 d	20.4 d
Gm312		110.1 c	110.8 bcd	5.4 b	8.1 b	2.8 a	13.4 a	50.7 b	13.1 a	288.2	1.3 ab	114.5 bcd	360.9	2051.1 abc	4349.5 ab	52.5 a	2685.7 ab	139.5 ab	31.4 a
Red Riesling		117.1 c	96.2 d	3.9 cd	8.2 b	2.4 bc	9.6 bc	21.1 d	10.5 cd	283.0	1.0 de	144.6 a	363.1	2092.9 ab	4999.5 a	42.4 de	2448.4 ab	133.7 bc	30.7 a
DN500		126.7 b	103.1 d	3.5 d	7.3 b	2.7 ab	10.3 b	42.3 c	10.2 d	251.6	0.9 de	116.1 bcd	363.5	1952.8 bc	3909.4 bcd	45.9 cd	2365.9 bc	124.3 cd	30.5 ab
TR34		127.3 b	124.3 ab	3.3 de	8.2 b	2.0 d	9.3 bc	37.3 c	10.4 cd	277.5	1.1 cd	119.2 bc	397.6	2073.9 ab	4132.9 bc	47.9 bc	2595.9 ab	138.1 b	30.9 a
N90	2016	85.9 c	71.5 c	3.3 c	11.3 de	2.5 cd	39.3 ab	72.1 a	15.4 a	225.8 ab	1.1 ab	82.8 ab	262.6	1371.8	1650.3	72.1 c	915.7 e	76.1 b	5.5 bc
B1090		100.7 b	82.4 ab	4.9 b	12.4 de	2.5 de	31.8 c	51.1 c	15.9 a	194.2 c	1.0 c	61.2 c	260.0	1047.7	1435.3	77.2 c	1029.5 b	78.5 b	5.0 c
B1091		99.5 b	76.4 bc	5.7 ab	13.1 cd	2.3 e	35.9 bc	50.0 c	8.4 e	164.6 de	0.8 de	92.0 a	280.7	1353.8	1886.5	74.8 b	992.0 c	77.4 b	6.5 b
B1094		106.8 ab	90.5 a	6.4 a	10.4 de	2.4 de	40.0 ab	51.0 c	11.7 bcd	248.0 a	1.2 a	79.8 b	280.0	1346.4	2150.1	77.8 a	945.7 d	76.0 b	4.8 c
Gm312		112.0 a	92.4 a	6.0 ab	21.3 a	2.7 b	40.5 a	62.9 b	13.5 abc	153.6 e	0.8 e	60.6 c	242.8	1368.3	1591.4	67.3 e	761.4 f	70.4 cd	9.4 a
Red Riesling		83.2 c	69.5 c	3.4 c	9.1 e	2.3 e	40.4 a	49.0 c	14.2 ab	188.8 cd	0.9 cd	66.2 c	273.5	1342.6	1892.6	77.2 a	1076.4 a	82.6 a	5.2 bc
DN500		113.2 a	84.9 ab	6.5 a	20.5 ab	2.7 bc	40.5 a	61.4 b	9.3 de	161.9 e	0.8 e	83.1 ab	243.5	1364.0	1754.7	66.7 e	764.7 f	72.7 c	10.0 a
TR34		103.8 ab	83.4 ab	6.2 a	17.0 bc	2.9 a	34.7 c	66.6 ab	11.3 cd	210.6 bc	1.0 bc	40.3 d	225.9	1225.1	1654.6	68.9 d	777.9 f	68.6 d	9.6 a
N90	2017	101.5 e	125.8 bcd	1.3 cd	3.7 de	2.7 a	10.4 de	12.7 d	12.6 d	247.8 b	1.0 f	46.8 d	293.1 a	1966.4 a	3621.9	43.7 c	2417.6 b	131.8 b	39.5 b
B1090		123.7 cd	114.0 de	0.8 d	2.7 e	2.2 b	20.1 c	26.8 a	9.5 f	202.4 de	1.6 e	74.4 b	285.2 ab	1666.3 b	3280.1	89.0 a	3169.1 a	149.5 a	45.8 a
B1091		113.7 de	108.1 e	1.6 c	4.2 d	1.0 d	7.8 e	18.2 c	10.0 ef	195.9 e	1.1 f	78.0 b	308.1 a	1902.3 a	3474.6	42.1 c	1907.5 c	116.7 bc	29.7 c
B1094		142.8 b	113.0 de	3.8 b	8.8 c	1.3 c	10.4 de	9.3 e	11.1 e	212.0 d	1.9 c	108.1 a	276.3	1640.7 b	3399.8	32.9 d	1117.2 e	88.9 d	20.2 e
Gm312		134.3 bc	137.5 ab	7.0 a	11.2 ab	2.1 b	11.7 d	13.3 d	18.7 a	258.7 a	1.7 e	71.8 b	220.8 d	1207.2 c	2419.2	25.4 e	1049.8 e	91.6 d	23.6 de
Red Riesling		103.5 e	122.6 cd	1.3 cd	4.0 d	0.9 d	9.8 de	11.8 d	14.1 c	243.9 b	2.2 a	53.2 cd	301.5 a	1700.4 b	2984.5	68.5 b	1959.0 c	114.0 c	39.5 b
DN500		166.5 a	148.3 a	7.2 a	12.4 a	2.3 b	27.0 b	28.0 a	17.1 b	248.0 b	1.8 d	67.4 b	259.0 bc	1582.4 b	3372.7	42.1 c	1362.9 d	97.7 d	39.1 b
TR34		117.3 d	130.2 bc	6.9 a	11.0 b	2.9 a	49.7 a	22.8 b	14.7 c	225.0 c	2.1 b	65.3 bc	249.6 cd	1560.9 b	3287.7	41.5 c	1157.3 e	90.2 d	27.9 cd
odor threshold		2.3 <sup>b</sup>	101.3 <sup>b</sup>	0.05 <sup>c</sup>	40 <sup>c</sup>	25 <sup>c</sup>	14 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>	8.0 <sup>c</sup>	14 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>	1800 <sup>c</sup>	1600 <sup>c</sup>	1600 <sup>c</sup>	1600 <sup>c</sup>	1600 <sup>c</sup>	1600 <sup>c</sup>	1600 <sup>c</sup>	2400 <sup>c</sup>
F value	clone	50.3 ***	8.0 ***	56.9 ***	33.2 ***	49.5 ***	52.7 ***	52.4 ***	23.5 ***	6.0 ***	55.7 ***	11.6 ***	3.5 ***	8.5 ***	1.2 ns	151.8 ***	66.4 ***	26.3 ***	43.5 ***
p		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
F value	vintage	204.4 ***	207.4 ***	242.1 ***	158.2 ***	148.2 ***	1407.9 ***	1250.0 ***	39.2 ***	164.4 ***	886.1 ***	239.1 ***	126.5 ***	219.7 ***	116.8 ***	1764.6 ***	1151.2 ***	599.7 ***	1672.0 ***
p		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***



Table 6. continued

Data represent mean values with  $n = 2$ . Letters indicate significant differences among variants of individual vintages. Significance is indicated with ns (not significant), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ). <sup>a</sup>Ziegler et al.<sup>11</sup> <sup>b</sup>Waterhouse et al.<sup>44</sup>

obtained for the B clones. The differences in cluster weight were primarily caused by the number and size of berries, leading to tightly packed clusters for N90 and RR and more single berries in the B clones. Thus, berries of the loose-cluster clones were exposed to higher solar radiation, which may have triggered enhanced concentrations of carotenoids and, subsequently, C<sub>13</sub>-norisoprenoid precursors. To prove the hypothesis that the loose clusters have higher bound and free TDN, we correlated cluster density with concentrations of bound TDN (Figure 4) and free TDN in bottled wines of vintages 2015–2017.

Indeed, clones N90 and RR with the highest cluster density of 12 to 13 g/cm showed in each year the lowest bound TDN. Vice versa, clones with lower density displayed higher bound TDN values. Coefficients of determination (Pearson) for each vintage were significant ( $R^2 = 0.50^*$  (2015),  $0.70^{**}$  (2016), and  $0.50^*$  (2017)). Thus, 50 to 70% of the variation of TDN measured in the final wines could be explained by the calculated cluster density parameter.

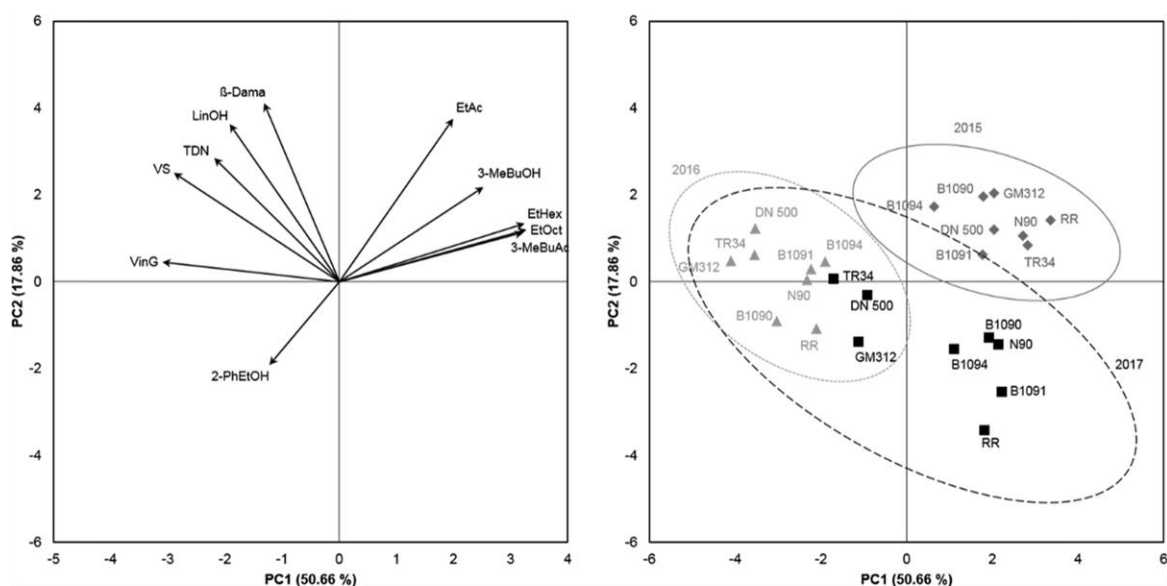
For free TDN coefficients of determination (Pearson), variation among years was similar ( $R^2 = 0.39$  (2015),  $0.78^{**}$  (2016)), except for 2017 ( $R^2 = 0.10$ ). In contrast to bound TDN, free TDN depends not only on precursor formation in the berries but also on cleavage of precursors as a function of pH, temperature, and bottle aging. Still, the overall pattern observed in Figure 4 for bound TDN is also present for the sensory relevant free TDN, and correlation might get better during bottle aging due to ongoing release of free TDN. For the first time, obtained TDN concentrations in finished wines could be linked to and partially explained by genetically determined physiological factors such as cluster length and weight, which give important clues for further selection of Riesling clones.

#### Impact of Berry Size on Free and Bound TDN and VS.

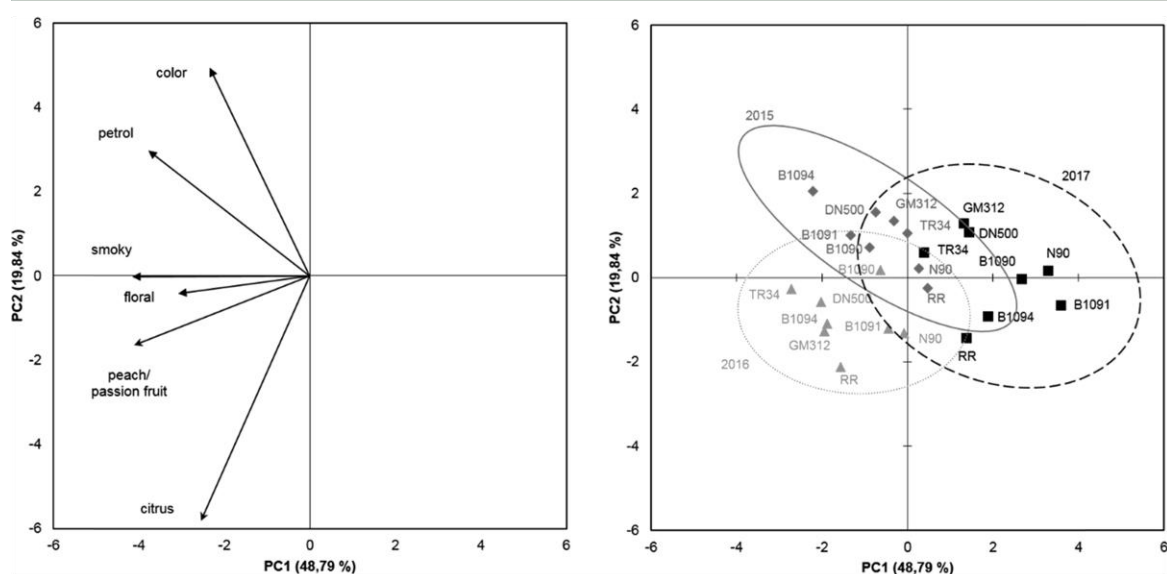
Distribution of berry diameters of eight clones from 2015 and of three clones from 2016 and 2017 revealed remarkable differences in the weight of the individual berry fractions (Figure 5). Clones with the lowest cluster density, such as B1090, B1091, and B1094, exhibited lower weight for berries with a diameter of >13 mm (54.4, 38.9, and 50.1%, respectively), while the highest proportion of large berries was found in clones with more dense clusters, such as N90 and RR (62.3 and 69.8%).

Weight proportion of small berries (<11 mm) remained almost constant over clones and vintages, primarily caused by their little influence on the overall weight. Differentiation of clones is driven mainly by the variation of berries with diameters of 11–13 and 13–15 mm, representing the highest variation among clones (20.6 to 50.8% for 11–13 mm-sized berries and 37.9 to 66.7% for 13–15 mm-sized berries). Although berry distribution is quite similar for some clones, for example B1090, B1094, and GM312, the average grape cluster weight differs remarkably among the eight clones from 74 g (B1094) to 151 g (N90) in 2015. Differences in the subsequent vintages were lower, ranging from a minimum of 113 g to a maximum of 135 g per bunch. However, for the three selected clones N90, B1090, and GM312, the distribution pattern of berry diameters remains similar in 2016 and 2017 compared to results obtained in 2015.

*Vitis vinifera* clones have been selected over decades for different objectives such as avoidance of humid microclimate in bunches by more loose clusters or increase of yield, which is often linked to tighter packed grape clusters. Cluster



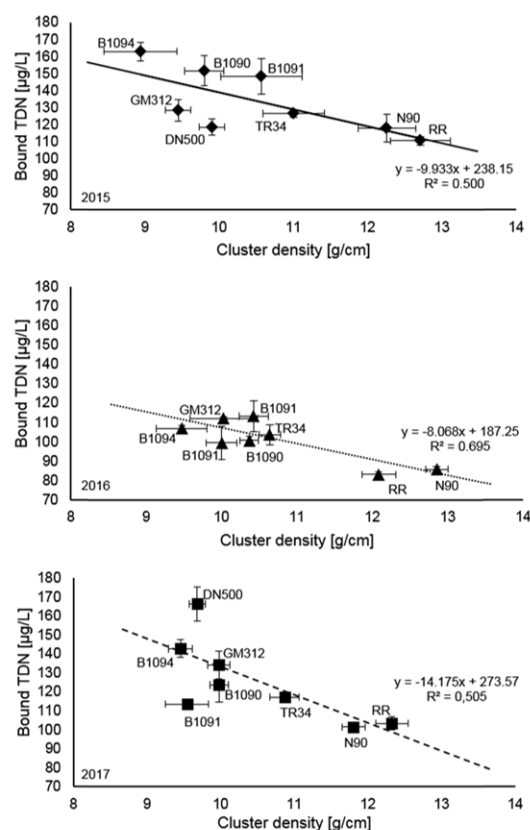
**Figure 2.** Scores and loadings plot of principal component analysis (PCA) for volatile compounds of wines made from different Riesling clones in vintages 2015 (gray diamond), 2016 (gray triangle), and 2017 (black square). Data represent mean values with  $n = 2$ , and  $p = 0.9$  for confidence intervals.



**Figure 3.** Scores and loadings plot of principal component analysis (PCA) for sensory analysis of wines made from different Riesling clones in vintages 2015 (gray diamond), 2016 (gray triangle), and 2017 (black square). Data represent mean values with  $n = 2$ , and  $p = 0.9$  for confidence intervals.

compactness is a complex trait, which is triggered by physiological factors such as internode length of the inflorescence rachis or simply smaller berries.<sup>46–49</sup> At the same time, genetically defined quality trait loci for loose clusters have been reported for Pinot Noir<sup>50</sup> and the crossing GF.GA-47-42  $\times$  “Villard Blanc”,<sup>51</sup> but to our knowledge, the linkage between the degree of loose clusters and formation of volatiles has not been reported yet. Berry diameters change the skin-to-pulp ratio, which may have an impact on aroma

composition of final wines because many aroma precursors are located in the berry skin.<sup>52</sup> To test the relevance for free and bound TDN and VS, we focused in 2015 on the two major berry fractions (diameters of 11–13 and 13–15 mm) because they were responsible for most of the total weight of the bunches (Figure 5). TDN and VS were analyzed in wines obtained from berries with either small (<13 mm) or large (>13 mm) diameter (Table 7). The compact clones Red Riesling and N90 yielded the lowest TDN, both free and



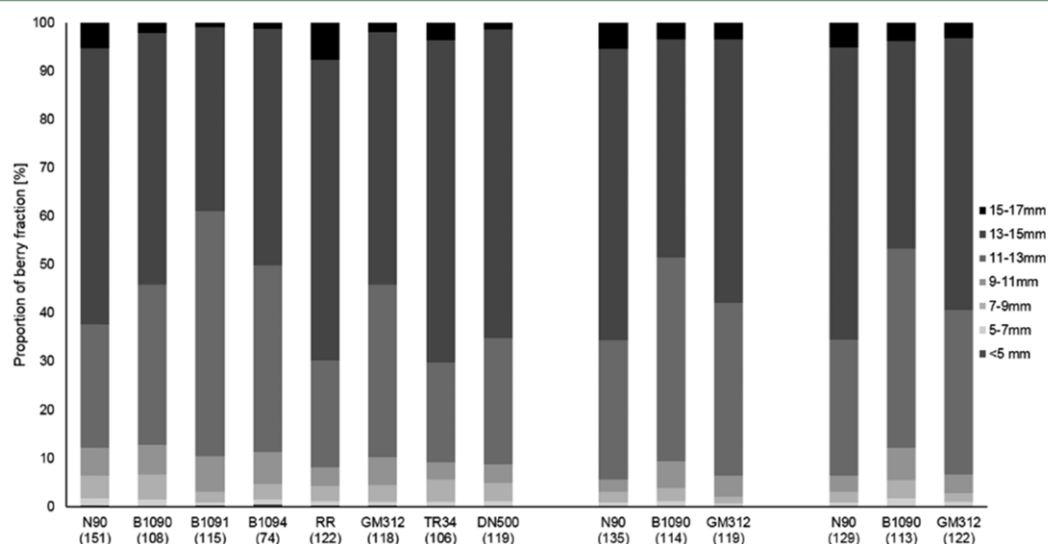
**Figure 4.** Correlation between cluster density (g/cm) and bound TDN (µg/L) in wines obtained from eight different clones and three vintages (top, 2015; middle, 2016; bottom, 2017). Data represent mean values of  $n = 3$  for determination of cluster density and  $n = 2 \times 2$  for chemical analysis.

bound, while the highest values were measured for B1090, B1091, and B1094 clones expressing loose clusters. Investigations of the effect of berry size revealed in six out of eight clones that larger berries yielded lower levels of bound TDN. For bound VS, the opposite was observed. For vintages 2016 and 2017, we decreased the number of clones but made wines from more berry fractions (Table 7). The only significant effect of berry size for bound TDN occurred in the compact clone N90 due to lower bound TDN concentrations in the smaller berries. For all other clones, no significant effect was observed for bound TDN and for all clones in respect to bound VS.

In 2016, the effect of berry size on bound TDN was again only significant for the compact N90 clone and, in 2017, additionally for the medium compact GM312 clone. Bound TDN increased with berry size, showing vice versa the lowest values in the smallest berries. In the loosest clustered clone B1090, no effect of berry size was observed, presumably because of the homogeneous sun exposure to all berries within the cluster.

In general, the same vintage effects regarding bound TDN and VS, which occurred in the previously discussed rootstock and clonal experiments, were also observed in wines made from single berry fractions.

Friedel et al. could not establish any differences in free and bound monoterpenes and  $C_{13}$ -norisoprenoids, including TDN and VS, when they studied three berry fractions, which varied in diameter but had equal total soluble solids ( $^{\circ}$ Brix).<sup>32</sup> The slightly deviating results in respect to significant effects observed in the N90 clone can be rationalized by the fact that berries were obtained only from a single Riesling clone (GM198) in 1 year. Only when berry fractions were further separated according to their color intensity, bound TDN was significantly higher in the medium (12–14 mm) versus large berries (14–16 mm) and significantly higher in the more intense colored berries. No differences were observed for VS and  $\beta$ -damascenone. Investigating Merlot and Cabernet Gernischt,  $C_{13}$ -norisoprenoids peaked in the mid-sized berry



**Figure 5.** Distribution of weight of berries with different diameters of different clones in vintages 2015 (left), 2016 (middle), and 2017 (right). Mean weights of grape cluster of individual clones are stated in parentheses.



**Table 7. Concentrations of Bound and Free TDN and VS of Wines Obtained from Different Berry Fractions in Vintages 2015–2017 with  $n = 2^a$** 

clone	cluster density	vintage	berry size (mm)	bound TDN ( $\mu\text{g/L}$ )	bound VS ( $\mu\text{g/L}$ )	free TDN ( $\mu\text{g/L}$ )	free VS ( $\mu\text{g/L}$ )
B1094	low	2015	<13	131.0 e	106.8 def	6.0 a	11.3 abc
			>13	137.1 de	131.6 c	5.4 b	13.4 a
GM312	low-medium		<13	152.8 bc	95.2 gh	4.3 c	3.7 g
			>13	139.4 de	99.6 fg	3.9 c	3.0 g
B1090	low-medium		<13	142.1 cde	110.1 de	2.5 ef	8.5 def
			>13	146.5 bcd	114 d	2.7 de	7.8 ef
DN500	low-medium		<13	108.3 fg	107.5 def	1.8 g	11.5 ab
			>13	89.3 hij	91.5 h	1.6 g	9.9 bcde
B1091	medium		<13	171.9 a	161.5 b	3.0 de	8.6 def
			>13	155.5 b	171.5 a	3.2 d	9.0 cdef
TR34	medium		<13	99.8 gh	88.1 hi	2.1 fg	10.2 bcd
			>13	84.8 j	73.4 j	1.9 g	9.6 bcde
N90	high		<13	115.5 f	90.7 h	0.8 i	8.8 def
			>13	99.7 gh	105.7 ef	1.0 hi	7.2 f
Red Riesling	high		<13	96.5 hi	82.3 i	2.0 fg	4.1 g
			>13	86.1 ij	112.5 de	1.5 gh	4.5 g
Gm312	low-medium	2016	<11	119.0 a	116.6 a	3.0 bcde	20.0 ab
			11–13	123.1 a	101.2 bc	4.4 ab	20.5 ab
			>13	116.6 a	108.6 abc	5.0 a	22.9 a
B1090	low-medium		<11	129.6 a	117.4 a	2.0 de	12.5 cde
			11–13	116.9 a	107.4 abc	3.9 abc	16.4 bcd
			>13	123.4 a	112.0 ab	3.6 abcd	16.7 bc
N90	high		<11	92.3 b	97.7 cd	1.4 e	10.0 e
			11–13	89.7 b	87.0 d	2.2 cde	11.7 e
			>13	122.6 a	101.9 bc	2.4 cde	12.0 de
Gm312	low-medium	2017	<9	89.2 e	120.7 a	2.4 efg	7.1 bcd
			9–11	135.6 a	101.5 cde	2.3 efg	6.5 de
			11–13	134.9 ab	122.3 a	2.0 fg	4.9 fg
			13–15	115.3 cd	101.5 cde	3.8 a	10.0 a
			15–17	131.8 ab	103.0 cd	2.7 cde	7.4 bcd
B1090	low-medium		<9	87.3 e	94.2 ef	1.5 h	4.4 g
			9–11	84.8 e	88.6 f	2.0 g	4.7 g
			11–13	106.2 d	111.5 b	3.0 bcd	6.6 de
			13–15	86.1 e	99.6 cde	2.2 efg	5.4 efg
			15–17	88.8 e	98.3 de	2.5 def	7.3 bcd
N90	high		<9	71.3 e	99.9 cde	2.1 fg	6.2 def
			9–11	86.0 e	107.1 bc	2.2 efg	7.1 bcd
			11–13	113.8 d	127.5 a	3.4 ab	8.1 bc
			13–15	109.9 d	126.4 a	3.1 bc	8.6 ab
			15–17	124.5 bc	122.5 a	2.6 cde	6.8 cde
significance		clone		***	***	***	***
		berry size		***	***	***	**
		vintage		**	***	***	***

<sup>a</sup>Letters indicate significant differences among the variants. Significance is indicated with ns (not significant), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ .

fraction of 12–14 mm, but TDN and VS were not detected at all.<sup>53</sup>

In conclusion, variation in berry size among Riesling clones seems not to be the major explanation of the different TDN and VS levels observed across the three vintages.

**Influence of Berry Size on Free Volatiles.** To study further the possible impact of clone and berry size, concentrations of several free volatiles were investigated in wines from vintages 2016 and 2017 (Table 8). Wines from 2016 revealed higher concentrations of free TDN, VS, 4-vinylguaiacol, 2-phenylethyl acetate, and ethyl octanoate. Wines from 2017 were higher in most esters but also linalool, 2-phenylethanol, and  $\beta$ -damascenone. Examining correlations

among the aroma compounds, TDN was positively correlated with VS ( $R^2 = 0.52$ ) but not with the  $\text{C}_{13}$ -norisoprenoid  $\beta$ -damascenone, the monoterpene linalool, or the volatile phenol 4-vinylguaiacol. Most esters were negatively correlated with TDN. In conclusion, none of the studied aroma compounds with a fruity, floral, or spicy odor were increasing with rising TDN concentrations. Thus, a possible masking of the petrol off-flavor by fruity, floral, or spicy odors seems not to occur. Overall, due to the insignificance of berry size on the concentration of bound and free TDN, optical sorting of small versus large berries does not open a technological avenue to lower TDN concentrations in the latter wines. At the same

Table 8. Concentrations of Free Volatiles of Wines Obtained from Berries of Three Different Clones with Different Berry Diameters<sup>a</sup>

vintage	clone	berry size (mm)	$\beta$ -Dama ( $\mu$ g/L)	VinG ( $\mu$ g/L)	LinOH ( $\mu$ g/L)	2-PHEOH ( $\mu$ g/L)	HexOH ( $\mu$ g/L)	EtAc ( $\mu$ g/L)	EtBu ( $\mu$ g/L)	EtHex ( $\mu$ g/L)	EtOct ( $\mu$ g/L)	HexAc ( $\mu$ g/L)	3-MeBuAc ( $\mu$ g/L)	2-MeBuAc ( $\mu$ g/L)	3-MeBuOH (mg/L)
2016	N90	<11	3.0 b	40.7 ab	24.0 de	12.2 ab	1.4 a	54.5 a	127.8 bc	234.2 c	647.7 bc	31.1 d	17.9 d	24.5 c	51.3 b
		11–13	2.2 d	41.7 ab	34.1 b	8.9 f	1.0 b	36.1 bc	100.8 de	246.0 c	802.3 b	25.9 e	9.4 ef	9.9 de	40.0 c
		>13	1.5 e	40.8 ab	26.9 cde	10.5 e	0.6 e	45.8 ab	133.4 b	273.1 b	705.8 bc	35.9 b	48.4 b	34.6 b	40.8 c
		<11	2.6 c	33.2 d	28.3 bcd	12.8 a	0.9 c	35.9 bc	114.2 bcd	187.8 d	535.3 c	14.2 f	12.2 e	14.3 d	62.5 a
2017	N90	11–13	1.3 e	38.0 bc	14.8 f	9.2 f	0.7 e	26.2 cd	177.7 a	399.7 a	1176.9 a	80.9 a	108.2 a	64.9 a	52.4 b
		>13	2.0 d	43.4 a	42.0 a	12.0 bc	0.7 e	39.0 b	82.5 e	185.1 d	551.4 c	6.4 g	5.2 f	7.2 e	36.3 c
		<11	3.7 a	35.7 cd	24.3 cde	11.2 de	0.8 cd	35.9 bc	110.9 cd	185.9 d	481.7 c	36.3 b	21.9 d	24.8 b	47.8 b
		11–13	3.0 b	34.9 cd	21.3 e	11.5 cd	0.7 e	22.0 d	122.0 bcd	233.5 c	695.5 bc	37.3 b	34.2 c	21.1 c	53.3 b
2017	N90	>13	2.9 bc	34.8 cd	30.1 bc	12.4 ab	0.7 de	16.5 d	130.0 bc	264.2 b	700.9 bc	34.1 c	48.1 b	25.2 c	50.3 b
		<9	1.8 d	28.2 cdef	9.4 f	13.3 ab	1.2 ab	57.5 cde	158.1 cde	496.9 abc	788.1 a	17.9 fg	176.9 cde	27.4 de	323.8 ab
		9–11	3.3 c	34.0 abcd	36.9 bcd	12.4 ab	0.9 bcde	58.4 cde	157.8 cde	523.5 ab	722.5 ab	22.6 efg	187.1 cde	30.2 de	286.7 abc
		11–13	2.0 d	27.7 cdef	36.9 bcd	11.7 ab	0.9 bcde	40.9 de	135.1 e	544.7 a	777.9 ab	11.6 g	109.4 e	18.1 e	256.3 abc
2017	B1090	13–15	1.7 d	39.3 ab	41.4 bc	12.3 ab	0.8 bcde	36.3 e	139.6 de	574.1 a	782.2 ab	12.1 g	111.9 de	18.4 e	314.9 abc
		15–17	5.4 a	40.1 a	64.5 a	12.5 ab	0.8 cde	74.7 bcde	206.2 abcde	413.5 bcd	719.7 ab	32.2 cdef	226.3 c	41.7 bcd	289.7 abc
		<9	1.4 d	21.3 f	10.9 f	13.6 ab	0.6 e	90.5 bc	180.4 bcde	361.6 de	171.2 g	29.5 defg	257.5 bc	40.4 bcd	321.6 ab
		9–11	0.2 e	23.7 ef	29.1 cde	13.0 ab	0.9 bcde	107.4 b	165.9 bcde	319.2 defg	600.0 bc	21.7 efg	214.8 c	40.3 bcd	351.5 a
2017	GM312	11–13	1.6 d	41.5 a	42.1 b	12.0 ab	1.1 abcd	57.8 cde	160.4 bcde	495.3 abc	864.9 a	47.5 bcd	171.9 cde	29.5 de	310.1 abc
		13–15	0.3 e	35.0 abc	31.5 bcde	14.3 a	0.6 e	86.7 bc	215.9 abcd	236.6 fg	488.2 cd	74.7 a	217.0 c	44.5 bcd	295.8 abc
		15–17	5.5 a	29.6 bcdef	61.6 a	14.1 a	0.8 bcde	99.1 b	277.1 a	353.3 def	485.2 cd	45.6 bcd	336.7 ab	58.5 ab	307.4 abc
		<9	4.5 b	19.9 f	10.3 f	13.7 ab	1.6 a	160.5 a	239.7 ab	389.2 cd	264.7 efg	51.1 b	360.6 a	66.4 a	305.2 abc
2017	GM312	9–11	0.6 e	23.9 def	20.1 ef	10.3 b	1.2 abc	98.1 b	200.9 abcde	251.7 efg	301.3 efg	50.0 bc	260.8 abc	52.4 abc	219.0 bc
		11–13	1.5 d	25.2 cdef	29.0 cde	10.4 b	0.7 de	83.0 bc	168.5 bcde	205.9 g	185.1 fg	31.1 def	181.6 cde	38.2 cd	212.6 c
		13–15	1.8 d	29.6 bcdef	28.4 de	12.7 ab	0.8 bcde	79.3 bcd	217.9 abcd	298.0 defg	365.3 def	41.5 bcd	211.0 cd	44.7 bcd	277.1 abc
		15–17	3.7 c	33.9 abcde	60.6 a	12.7 ab	1.2 ab	88.0 bc	234.5 abc	348.9 def	420.8 cde	40.3 bcde	250.1 bc	49.5 abc	298.4 abc
odor threshold significance	clone	0.05 <sup>b</sup>	0.05 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	1800 <sup>b</sup>	160 <sup>b</sup>	1600 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>
		*	*	*	***	***	ns	ns	*	***	***	*	***	*	ns
		***	***	***	***	***	***	ns	***	ns	*	ns	***	ns	ns
		ns	ns	ns	***	***	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	***

<sup>a</sup>Data represent mean values with  $n = 2$ . Letters indicate significant differences among the clones and berry fractions. Significance of clone, berry size, and vintage for each parameter is indicated with ns (not significant), \* $p < 0.05$ ), \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ . <sup>b</sup>Waterhouse et al.<sup>44</sup>

time, fractionation of berries according to their color may be more expedient to avoid a future petrol off-flavor.

For the first time and consistent over three vintages, the choice of Riesling clones had a significant impact on free and bound TDN levels and also caused highly significant deviations in the petrol off-flavor as well as in the smoky odor. Free and bound TDN was negatively correlated with the clonally determined compactness of the clusters, but no link could be established with berry size. Changing weather conditions over three vintages even had a larger impact on TDN formation and the linked petrol note, as clones. Furthermore, we could demonstrate for the first time that even the choice of rootstocks exerted via their varying vigor, a significant effect on free and bound TDN. Significant vintage effects emphasize the strong need to conduct studies over several years. These results give a valuable advice to winegrowers, to lower TDN formation already with the long-term choice of clones and rootstocks, when planting the vineyards.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c00049>.

Figure S1, climate data (temperature and precipitation) of vintages 2015–2017, including growing degree days (GDD) and Hugin index (HI) and time points of bud break, véraison, and harvest; Figure S2, correlation between cluster density (g/cm) and free TDN (μg/L) in wine obtained from eight different clones and three vintages (top, 2015; middle, 2016; bottom, 2017); Table S1, phenological data of clones from vintages 2015 to 2017; Table S2, sensory data of wines obtained from eight different clones of vintages 2015–2017 (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

**Ulrich Fischer** – Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Institute for Viticulture and Oenology, Neustadt an der Weinstraße 67435, Germany; Department of Chemistry, Kaiserslautern University of Technology, Kaiserslautern 67663, Germany; Phone: +49 6321 671 294; Email: [ulrich.fischer@dlr.rlp.de](mailto:ulrich.fischer@dlr.rlp.de); Fax: +49 6321 671 375

### Authors

**Michael Ziegler** – Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Institute for Viticulture and Oenology, Neustadt an der Weinstraße 67435, Germany; Department of Chemistry, Kaiserslautern University of Technology, Kaiserslautern 67663, Germany; [orcid.org/0000-0002-5377-7919](https://orcid.org/0000-0002-5377-7919)

**Pascal Wegmann-Herr** – Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Institute for Viticulture and Oenology, Neustadt an der Weinstraße 67435, Germany

**Hans-Georg Schmarr** – Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Institute for Viticulture and Oenology, Neustadt an der Weinstraße 67435, Germany; Faculty for Chemistry, Instrumental Analytical Chemistry, University Duisburg-Essen, Essen 45141, Germany; [orcid.org/0000-0003-1443-1162](https://orcid.org/0000-0003-1443-1162)

**Recep Gök** – Technische Universität Braunschweig, Institute of Food Chemistry, Braunschweig 38106, Germany

**Peter Winterhalter** – Technische Universität Braunschweig, Institute of Food Chemistry, Braunschweig 38106, Germany

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.0c00049>

### Funding

This research project was supported by the German Ministry of Economics and Technology (via AiF) and the Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e.V. (FEI, Bonn, Germany) project AiF 16680.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to Michael Wacker, Sandra Klink, and Anna Dießlin for their technical support.

## ■ DEDICATION

This work is dedicated to the late Hans-Georg Schmarr who inspired many of us with his verve, enthusiasm, and proficient knowledge on chromatographic techniques and aroma chemistry.

## ■ REFERENCES

- (1) *Deutscher Wein Statistik 2018/2019*; Deutsches Weininstitut GmbH, 2019. [https://www.deutscheweine.de/fileadmin/user\\_upload/Website/Intern/Dozentenportal/Statistik\\_2018-2019.pdf](https://www.deutscheweine.de/fileadmin/user_upload/Website/Intern/Dozentenportal/Statistik_2018-2019.pdf) (accessed Oct 12, 2019).
- (2) Simpson, R. F. 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene: an important contributor to the bottle aged bouquet of wine. *Chem. Ind.* **1978**, *1*, 37.
- (3) Simpson, R. F.; Strauss, C. R.; Williams, P. J. Vitispirane: a C13-spiro-ether in the aroma volatiles of grape juice, wines and distilled grape spirits. *Chem. Ind.* **1977**, *15*, 663–664.
- (4) Simpson, R. F.; Miller, G. C. Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis* **1983**, *22*, 51–63.
- (5) Winterhalter, P. 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) formation in wine. 1. Studies on the hydrolysis of 2,6,10,10-tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-6-ene-2,8-diol rationalizing the origin of TDN and related C13 norisoprenoids in Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1825–1829.
- (6) Marais, J.; Van Wyk, C. J.; Rapp, A. Effect of Storage Time, Temperature and Region on the Levels of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene and other Volatiles, and on Quality of Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 33–44.
- (7) Mendes-Pinto, M. M. Carotenoid breakdown products the-norisoprenoids-in wine aroma. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *483*, 236–245.
- (8) Winterhalter, P.; Gök, R. TDN and  $\beta$ -Damascenone: Two important carotenoid metabolites in wine. In *Carotenoid Cleavage Products*; Winterhalter, P., Ebeler, S. E., Eds.; ACS Symposium Series 1134; American Chemical Society: Washington, DC, 2013; 125–137, DOI: [10.1021/bk-2013-1134.ch011](https://doi.org/10.1021/bk-2013-1134.ch011).
- (9) Acree, T. E.; Williams, R. C.; Sacks, G. L. The flavor chemistry of Riesling. In *The Proceedings of the 9th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology*; Hofmann, T., Meyerhof, W., Schieberle, P., Eds.; Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie: Eisenach, Germany, 2010; 106–111.
- (10) Sacks, G. L.; Gates, M. J.; Ferry, F. X.; Lavin, E. H.; Kurtz, A. J.; Acree, T. E. Sensory Threshold of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and Concentrations in Young Riesling and Non-Riesling Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2998–3004.
- (11) Ziegler, M.; Gök, R.; Bechtloff, P.; Winterhalter, P.; Schmarr, H.-S.; Fischer, U. Impact of matrix variables and expertise of panelists on sensory thresholds of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene



known as petrol off-flavor compound in Riesling wines. *Food Qual. Prefer.* **2019**, *78*, 103735.

(12) Ross, C. F.; Zwink, A. C.; Castro, L.; Harrison, R. Odour detection threshold and consumer rejection of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene in 1-year-old Riesling wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2014**, *20*, 335–339.

(13) Gerdes, S. M.; Winterhalter, P.; Ebeler, S. E. Effect of sunlight exposure on norisoprenoid formation in White Riesling grapes. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*; Winterhalter, P., Rouseff, R. L. Eds.; ACS Symposium Series 802, American Chemical Society: Washington, DC, 2001; 262–272, DOI: 10.1021/bk-2002-0802.ch019.

(14) Kwasniewski, M. T.; Vanden Heuvel, J. E.; Pan, B. S.; Sacks, G. L. Timing of cluster light environment manipulation during grape development affects C<sub>13</sub> norisoprenoid and carotenoid concentrations in Riesling. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6841–6849.

(15) Rudy, H. Petrol note in wine: origin and reduction. In *Der Deutsche Weinbau*; Der Deutsche Weinbau: 2015, vol. 21, 32–35.

(16) Hixson, J.; Grebneva, Y.; Glameyer, N.; Vollmer, K.; Black, C.; Krstic, M.; Herderich, M. Shedding light on the modulation of key Riesling wine aroma compounds in a changing climate. In *XV Weurman Flavour Research Symposium*; Siegmund, B., Leitner, E. Eds.; Verlag der Technischen Universität Graz: Graz, Austria, 2018; 19–24.

(17) Gök, R.; Bechtloff, P.; Ziegler, M.; Schmarr, H.-G.; Fischer, U.; Winterhalter, P. Synthesis of Deuterium-Labeled 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and Quantitative Determination of TDN and Isomeric Vitispiranes in Riesling Wines by a Stable Isotope Dilution Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 6414–6422.

(18) Ferreira, A. C. S.; Uedes de Pinho, P. G. Analytical method for determination of some aroma compounds on white wines by solid phase microextraction and gas chromatography. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 2817–2820.

(19) Schüttler, A.; Guthier, C.; Stoll, M.; Darriet, P.; Rauhut, D. Impact of grape cluster defoliation, grape must clarification and yeast strain on TDN potential in cool climates wines. *Wine Vitic. J.* **2016**, *31*, 51–54.

(20) Black, C.; Francis, L.; Henschke, P.; Capone, D.; Anderson, S.; Day, M.; Holt, H.; Pearson, W.; Herderich, M.; Johnson, D. Aged Riesling and the development of TDN. *Wine Vitic. J.* **2012**, *27*, 20–22.

(21) Marais, J.; Versini, G.; van Wyk, C. J.; Rapp, A. Effect of region on free and bound monoterpene and C<sub>13</sub>-norisoprenoid concentrations in Weisser Riesling wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 71–77.

(22) Schultz, H. Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 2–12.

(23) van Leeuwen, C.; Darriet, P. The Impact of Climate Change on Viticulture and Wine Quality. *J. Wine Econ.* **2016**, *11*, 150–167.

(24) Spayd, S. E.; Wample, R. L.; Evans, R. G.; Stevens, R. G.; Seymour, B. J.; Nagel, C. W. Nitrogen Fertilization of White Riesling Grapes in Washington Must and Wine Composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, *45*, 34–42.

(25) Berdeja, M.; Nicolas, P.; Kappel, C.; Dai, Z. W.; Hilbert, G.; Peccoux, A.; Lafontaine, M.; Ollat, N.; Gomès, E.; Delrot, S. Water limitation and rootstock genotype interact to alter grape berry metabolism through transcriptome reprogramming. *Hortic. Res.* **2015**, *2*, 15012.

(26) Reynolds, A. G.; Wardle, D. A. Rootstocks Impact Vine Performance and Fruit Composition of Grapes in British Columbia. *HortTechnology* **2001**, *11*, 419–427.

(27) Habran, A.; Comisso, M.; Helwi, P.; Hilbert, G.; Negri, S.; Ollat, N.; Gomès, E.; van Leeuwen, C.; Guzzo, F.; Delrot, S. Rootstocks/Scion/Nitrogen Interactions Affect Secondary Metabolism in the Grape Berry. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1134.

(28) Zhang, L.; Marguerit, E.; Rossdeutsch, L.; Ollat, N.; Gambetta, G. A. The influence of grapevine rootstocks on scion growth and drought resistance. *Theor. Exp. Plant Physiol.* **2016**, *28*, 143–157.

(29) Cheng, J.; Wei, L.; Mei, J.; Wu, J. Effect of rootstock on phenolic compounds and antioxidant properties in berries of grape

(*Vitis vinifera* L.) cv. 'Red Alexandria'. *Sci. Hortic.* **2017**, *217*, 137–144.

(30) da Silva, M. J. R.; Vedoato, B. T. F.; Pace, G.; Lima, P.; Moura, M. F.; Coser, G. M. D. A. G.; Watanabe, C. Y.; Tecchio, M. A. Phenolic compounds and antioxidant activity of red and white grapes on different rootstocks. *Afr. J. Biotechnol.* **2017**, *16*, 664–671.

(31) Sponholz, W. R.; Huehn, T. Factors influencing the ageing of Riesling wines - Clonal material and used yeast strain. *Wein Wiss.* **1997**, *52*, 103–108.

(32) Friedel, M.; Sorrentino, V.; Blank, M.; Schüttler, A. Influence of berry diameter and colour on some determinants of wine composition of *Vitis vinifera* L. cv. Riesling. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2016**, *22*, 215–225.

(33) Marais, J.; Van Wyk, C. J.; Rapp, A. Effect of sunlight and shade on norisoprenoid levels in maturing Weisser Riesling and Chenin blanc grapes and Weisser Riesling wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 23–32.

(34) ISO 13301:2002(E) *Sensory analysis – Methodology – general guidance for measuring odour, flavour and taste detection thresholds by a three-alternative forced-choice (3-AFC) procedure*. Beuth Verlag: Berlin, Germany, 2002.

(35) Iland, P.; Dry, P.; Proffitt, T.; Tyerman, S. *The Grapevine: from the science to the practice of growing vines for wine*. Patrick Iland Wine Promotions Pty Ltd: Adelaide, Australia, 2011.

(36) *Agrarmeteorologie Rheinland-Pfalz*. <http://www.wetter.rlp.de> (accessed 14.10.2019).

(37) Bell, S. J.; Henschke, P. A. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 242–295.

(38) Linsenmeier, A. W.; Löhnertz, O. Changes in norisoprenoid levels with long-term nitrogen fertilisation in different vintages of *Vitis vinifera* var. Riesling wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2007**, *28*, 17–24.

(39) Jones, T. H.; Cullis, B. R.; Clingeleffer, P. R.; Rühl, E. H. Effects of novel hybrid and traditional rootstocks on vigour and yield components of Shiraz grapevines. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2009**, *15*, 284–292.

(40) Stevens, R. M.; Pech, J. M.; Gibberd, M. R.; Walker, R. R.; Nicholas, P. R. Reduced irrigation and rootstock effects on vegetative growth, yield and its components, and leaf physiological responses of Shiraz. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2010**, *16*, 413–425.

(41) Wang, Y.; Chen, W.-K.; Gao, X.-T.; He, L.; Yang, H.-X.; He, F.; Duan, C.-Q.; Wang, J. Rootstock-Mediated Effects on Cabernet Sauvignon Performance: Vine Growth, Berry Ripening, Flavonoids, and Aromatic Profiles. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 401–416.

(42) Schmid, J.; Manty, F.; Lindner, B. Geisenheimer Rebsorten und Klone. In *Geisenheimer Berichte*; Gesellschaft zur Förderung der Forschungsanstalt Geisenheim: Geisenheim, Germany, 2019.

(43) Ristic, R.; Downey, M. O.; Iland, P. G.; Bindon, K.; Francis, I. L.; Herderich, M.; Robinson, S. P. Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2007**, *13*, 53–65.

(44) Waterhouse, A. L.; Sacks, G. L.; Jefferey, D. W. *Understanding Wine Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, UK, 2016.

(45) Johnson, A. J.; Hjelmeland, A. K.; Heymann, H.; Ebeler, S. E. GC-Recomposition-Olfactometry (GC-R) and multivariate study of three terpenoid compounds in the aroma profile of Angostura bitters. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7633–7640.

(46) Hed, B.; Ngugi, H. K.; Travis, J. W. Relationship Between Cluster Compactness and Bunch Rot in Vignoles Grapes. *Plant Dis.* **2009**, *93*, 1195–1201.

(47) Tello, J.; Ibáñez, J. What do we know about grapevine bunch compactness? A state-of-the-art review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2018**, *24*, 6–23.

(48) Palacios, F.; Diago, M. P.; Tardaguila, J. A Non-Invasive Method Based on Computer Vision for Grapevine Cluster Compactness Assessment Using a Mobile Sensing Platform under Field Conditions. *Sensors* **2019**, *19*, 3799–3815.

(49) Grimplet, J.; Tello, J.; Laguna, N.; Ibáñez, J. Differences in Flower Transcriptome between Grapevine Clones Are Related to

Their Cluster Compactness, Fruitfulness, and Berry Size. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 632.

(S0) Rossmann, S.; Richter, R.; Sun, H.; Schneeberger, K.; Töpfer, R.; Zyprian, E.; Theres, K. Mutations in the miR396 binding site of the growth-regulating factor gene VvGRF4 modulate inflorescence architecture in grapevine. *Plant J.* **2019**, DOI: [10.1111/tpj.14588](https://doi.org/10.1111/tpj.14588).

(S1) Richter, R.; Gabriel, D.; Rist, F.; Töpfer, R.; Zyprian, E. Identification of co-located QTLs and genomic regions affecting grapevine cluster architecture. *Theor. Appl. Genet.* **2019**, *132*, 1159–1177.

(S2) Fischer, U. Wine Aroma. In *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*; Berger, R. G. Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, Germany, 2007; 241–267.

(S3) Xie, S.; Tang, Y.; Wang, P.; Song, C.; Duan, B.; Zhang, Z.; Meng, J. Influence of natural variation in berry size on the volatile profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Merlot and Cabernet Gernischt grapes. *PLoS One* **2018**, *13*, No. e0201374.





## 6.4 Manuskript zum Thema Einfluss Weinbaulicher Methoden Teil II

Einfluss von Entblätterungsmaßnahmen auf die Bildung von TDN, Vitispiran und anderen Aromastoffen von *Vitis vinifera* sp. Riesling

Nach den Ergebnissen, die in Kapitel 6.3 beschrieben wurden, werden in diesem Abschnitt weitere Weinbauliche Methoden untersucht, die im Vergleich zur langfristigen Selektion von Unterlagsrebe und Rieslingklon als relativ kurzfristige Methoden anzusehen sind.

TDN geht aus dem Abbau von Carotinoiden hervor, der durch die Exposition der Reben und Beeren gegenüber Sonnenlicht induziert wird. Da höhere Gehalte an TDN vor allem in jungem Wein als unerwünscht gelten, werden in dieser Studie drei Weinbauliche Strategien beleuchtet, die den Gehalt an gebildetem TDN regulieren können: Die Wahl des Reberziehungssystems, der Erntezeitpunkt und die Laubwandbearbeitung der Reben.

Die Implementierung der Minimalschnitterziehung führte zu einer signifikanten Steigerung der Konzentration an freiem TDN von rund 39%. Gleichzeitig stieg der Gehalt anderer Aromastoffe wie  $\beta$ -Damascenon, Linalool und einiger Esterverbindungen ebenfalls stark an, was eine Maskierung der Petrolnote durch die anderen Aromastoffe möglich erscheinen lässt. Ein späterer Erntezeitpunkt resultierte ebenfalls in höheren Konzentrationen an TDN – vor allem seiner gebundenen Form –, der anderen  $C_{13}$ -Norisoprenoide, 4-Vinylguaicol und Linalool, allerdings ohne eine Zunahme der Esterkonzentrationen herbeizuführen.

In drei aufeinander folgenden Jahrgängen wurde ein Teil der Reben zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlichem Ausmaß entblättert. Die beidseitige Entfernung aller Blätter in der Traubenzone resultierte in einer Zunahme von gebundenem TDN und Vitispiran um 43-98% gegenüber einer einseitigen, moderaten Entblätterung zum gleichen Zeitpunkt, beeinflusst durch die saisonalen Wetterbedingungen. Ebenfalls entscheidend für die späteren Gehalte an gebundenem TDN in den Weinen war der Zeitpunkt der Entblätterung: Durch Entblätterungsmaßnahmen einen Monat nach der Blüte hat sich der Gehalt im Durchschnitt um 25% erhöht, während die Laubentfernung zur Blüte sowie zwei Monate danach zu den niedrigsten TDN-Konzentrationen führte, ohne die Weine bei den anschließenden Verkostungen negativ zu beeinflussen.

## **Impact of Defoliation on the Formation of TDN, Vitispiranes and Other Volatiles of *Vitis vinifera* sp. Riesling**

Michael Ziegler<sup>†,‡</sup>, Matthias Petgen<sup>†</sup>, Recep Gök<sup>§</sup>, Peter Winterhalter<sup>§</sup>, Ulrich Fischer<sup>\*,†,‡</sup>

<sup>†</sup> Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Institute for Viticulture and Oenology, Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße, Germany

<sup>‡</sup> Kaiserslautern University of Technology, Department of Chemistry, Erwin-Schrödinger-Straße 52, 67663 Kaiserslautern, Germany

<sup>§</sup> Technische Universität Braunschweig, Institute of Food Chemistry, Schleinitzstraße 20, 38106 Braunschweig, Germany

\* Corresponding author

E-mail: [ulrich.fischer@dlr.rlp.de](mailto:ulrich.fischer@dlr.rlp.de). Tel. No. +49 6321 671 294. Fax: +49 6321 671 375.

### **ORCID**

Michael Ziegler: 0000-0002-5377-7919

Recep Gök: 0000-0002-1231-8679

Peter Winterhalter: 0000-0003-3417-6023

Ulrich Fischer: 0000-0003-1566-8516

**Abstract**

The C<sub>13</sub>-norisoprenoid 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) derives from carotenoid breakdown products and its formation is triggered by sun-light exposure of grapes. Higher levels of TDN are perceived as a petrol like aroma, which is undesired in young Riesling wines, and expected to increase due to ongoing climate change. Three strategies considered for TDN management were vine training systems, three harvest time points and canopy management of the vines.

Implementation of minimal pruning yielded significantly higher concentrations of bound TDN alike other volatiles compared to vines trained in a vertical shoot positioning. Thus, processing grapes from minimal pruned Riesling vines may induce the undesired petrol off-flavor. Though, the observed simultaneous increase of other volatiles, might contribute to a favorable masking of the petrol note. Delaying harvest time point triggered formation of bound TDN as well as other C<sub>13</sub>-norisoprenoid, 4-vinylguaiacol and linalool concentration, while no beneficial effect on other volatiles was revealed.

Throughout three vintages, identical vines were subjected to defoliation treatments, varying in time point and extent of leaf removal. Defoliation of vines 30 days past bloom, likewise extension and abdication of leaf removal, resulted in the highest levels of bound TDN. Gentle leaf removal at bloom or véraison yielded lowest levels of bound TDN, without compromising overall impression of the resulting wines at sensory analyses.

**Keywords**

TDN, Riesling wine, volatiles, defoliation, harvest date, sensory

## Introduction

Wine is obtained from the fermentation of berries of *Vitis vinifera* and includes more than a thousand volatile compounds. Some of them contribute to wine aroma representing one of the most important factors of wine character and quality.<sup>1</sup> Responsible molecules derive from synthesis in the berries, microbiological metabolism or chemical modifications during storage.<sup>2</sup> Understanding how these factors govern grape and wine composition is crucial to develop adaptation strategies to compensate ongoing climate change.<sup>3</sup>

Norisoprenoids, in particular C<sub>13</sub>-norisoprenoids, are derived from the biodegradation of carotenoids and subsequent enzymatic transformation into glycosidically bound aroma precursors. Free volatiles are released by acid-catalyzed rearrangements and cleavage to the free aroma-active compounds.<sup>4,5</sup> Among these, TDN (1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene), TCH (2,2,6-trimethylcyclohexanone), isomeric vitispiranes (2,10,10-trimethyl-6-methylene-1-oxaspiro[4.5]dec-7-ene, VS),  $\beta$ -damascenone,  $\beta$ -ionone, actinidol, and riesling acetal have been studied in wine.<sup>6</sup> The biosynthetically related TDN and VS are predominantly found in Riesling wines, with VS exhibiting a camphoraceous and eucalyptus odor,<sup>7</sup> while TDN showing a kerosene scent, representing the well-known petrol off-flavor in Riesling wines.<sup>8,9</sup> Detection threshold of TDN in Riesling amounts 2  $\mu\text{g/L}$ ,<sup>10</sup> while VS is perceived only above 101  $\mu\text{g/L}$ .<sup>11</sup> Consumer perceive TDN above 14.7  $\mu\text{g/L}$  and reject Riesling wines, if they contain more than 62  $\mu\text{g/L}$ .<sup>11</sup> In European Riesling wines reported TDN concentrations range from 2 up to 22  $\mu\text{g/L}$ <sup>12</sup> and more recently variation between 0.4 and 23  $\mu\text{g/L}$  has been measured in a survey of 250 Riesling wines from two international wine competitions.<sup>13</sup> Black et al. reported even a concentration range for TDN of 2 to 255  $\mu\text{g/L}$  in Australian Riesling wines,<sup>14</sup> whereas Marais found 3 to 55  $\mu\text{g/L}$  in South African Riesling wines.<sup>15</sup> VS were reported to vary between 3 and 80  $\mu\text{g/L}$ ,<sup>13</sup> while in a different set of Riesling wines the maximum concentration of VS was only 12  $\mu\text{g/L}$ .<sup>16</sup>

Formation of precursors of both compounds are triggered by enhanced sun-light exposure.<sup>17,18,19</sup> Hydrolytic and enzymatic cleavage of the precursors will increase TDN and VS concentrations during wine maturation, favored by low pH.<sup>20,21</sup> Due to the chemical diversity of TDN precursors,<sup>22</sup> it is common to express the bound TDN concentration via the equivalent of the amount of TDN released by a thermal hydrolysis.<sup>13</sup>

Over the time period of 35 years, official records show that grape maturation to the level of 170 g sugar per liter or 10.5% potential alcohol in 10 Riesling vineyards in the Palatinate region shifted forward by 4 weeks. Due to climate change, grapes are exposed to higher temperatures and more intense sunlight,<sup>3,23</sup> which may trigger a higher TDN and VS formation in Riesling grapes in cool climates such as in Germany. In lieu of the detection and rejections threshold for consumers for TDN, enhanced TDN formation in the vineyard may cause an earlier and pronounced rise of TDN in Riesling wines, which may lead to increasing rejection by

consumers. Thus, it is essential to study viticultural strategies such as timing and degree of defoliation to reduce the formation of carotenoids in the berries, which function as TDN precursors in the final wines, in order to safeguard appreciation of Riesling wines by consumers in context of global warming.

Metabolic activity of grapes modulate concentrations of grape-derived aroma compounds during berry development,<sup>24,25</sup> and even beyond berry maturity.<sup>26,27</sup> Thus, different harvest dates do not only change sugar and acid concentrations in grapes, but affect wine aroma composition as well.<sup>28,29</sup> Postponed grape harvest could be linked to increased concentrations of monoterpenes and norisoprenoids with a simultaneous reduction of volatile acids and green compounds such as n-hexanol, while Boss et al. report only positive correlations between sugar accumulation and the content of monoterpenes and norisoprenoid, but not for different harvest dates.<sup>28</sup> Since both studies were limited to a single vintage, and thus vintage effects could not be taken into account, we considered further studies on timing of harvest as necessary.

The concept of minimal pruning where pruning, hedging and harvesting is done only by machines, has turned into an economically valuable option compared to traditional cultivation with more manually labor. Higher yields go along with a shift in leaf-fruit ratio and improvements in fruit composition.<sup>30</sup> Several studies showed a favorable outcome on vine performance, grape yield, anthocyanins and subsequent wine quality.<sup>30,31,32</sup> In Riesling, minimal pruning increased cluster quantity with a simultaneous decrease of number and size of berries within the bunches as well as a delayed maturation and sugar accumulation.<sup>33,34</sup> Furthermore, accumulation of glycosidically bound aroma compounds increased in berries of minimal pruned vines, yielding Riesling wines with more intense fruity, citrus and passion fruit odor.<sup>35</sup> Yet, no studies report on the impact of minimal pruning on wine volatiles, which is expected due to enhanced glycosidically bound aroma compounds, such as monoterpenes and C<sub>13</sub>-norisoprenoids. Thus, this present work intends to close this gap in knowledge.

The increase of TDN concentration due to sun-exposed versus shaded Riesling grapes as well as longer hang-time were first described by Marais and coworkers.<sup>17</sup> Applying shade cloth the ambient light were gradually varied from 4 to 97% and total TDN in the Riesling grape juice increased with light intensity.<sup>18</sup>

Defoliation of grape leaves at bloom promote looser clusters due to malnutrition of the inflorescence with photosynthesis products and subsequent loss of unfertilized berries.<sup>36,37</sup> Later applied defoliation aims to increase sun exposure of grapes to improve flavor formation and facilitates a better ventilation and drying of the grapes, which is crucial in humid climates to prevent growth of *Botrytis cinerea* molds on wet grapes.<sup>38</sup> According to a one-year

experiment in a Upper New York state Riesling vineyard, three different time points for equally intense defoliating of the bunch zone varied free TDN between 7 and 20 µg/L in the obtained wines and total TDN between 52 and 138 µg/L.<sup>19</sup> The highest values were measured when defoliation took place one month after bloom, while the non-defoliated control or the early defoliation at berry set revealed the lowest values. Varying the intensity of defoliation by removing leaves on one or on both sides at bloom and on both sides at véraison, total TDN in the grape juice and subsequent wines were highest for the double-sided defoliation at berry set and lowest in the non-defoliated control.<sup>16</sup>

Overall the literature on TDN formation modulated by viticultural practices is rather limited and often lacks a systematic approach. Most studies are limited to annual experiments, neglecting the significant variation in weather conditions between years in cool climate viticulture regions. Others report only total TDN values, which cannot be directly related to the olfactory active free TDN in the wine, which impacts sensory thresholds, consumer perception and rejection. Furthermore, aroma compounds which may mask TDN perception in Riesling wines have not been studied in regard to strategies to lower TDN formation in the vineyards, which is also true for sensory evaluation of the obtained wines. Due to the dominating effect of sunlight on formation of TDN precursors in the berries, timing and degree of defoliation (2015-2017) were conducted to evaluate their impact on TDN formation. Furthermore, the influence of training systems and harvest date on volatile composition was assessed in 2015.

## Materials and methods

### Chemicals

Ethanol (≥99.8 %), sodium chloride (≥99%), potassium hydroxide (p.a.) and L(+) tartaric acid (p.a.) were purchased from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany). For gas chromatographic analysis, a model wine with 12 vol-% ethanol was prepared with 10 g/L tartaric acid, and pH was adjusted to 3.0 using a potassium hydroxide solution (2N). Preparation of saturated aqueous sodium chloride solution (brine) was done in tap water boiled for 5 min. TDN, *d*<sub>6</sub>-TDN and VS were synthesized as described earlier.<sup>13</sup> Other target compounds as well as deuterated standards were purchased from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA). Pectinase (Lafazym CL) was purchased from Laffort (Bordeaux, France). KHSO<sub>4</sub> solution (Sulfureuse P150) and gelatin were obtained from Erbslöh AG (Geisenheim, Germany), nutrition aid (GoFerm) was purchased from Lallemand Inc. (Montreal, Canada). *Saccharomyces cerevisiae* strain (Anaferm Riesling) was purchased from ZEFÜG GmbH (Bingen, Germany).



## Sensory evaluation

Sensory analysis was conducted with a trained panel (14 female and 13 male participants; 19-64 years, average 41 years) all of whom had previously participated in other descriptive analyses of wine. The study was conducted in an odor-free, well-lit room with an ambient temperature of 21 °C that was equipped according to ISO13301.<sup>39</sup>

The list of sensory attributes in Table 1 was obtained by panel discussion after tasting a subgroup of experimental wines. Using the sensory method of Napping®, all experimental wines were grouped in the two-dimensional matrix and wines from the corners and center were selected to represent the maximum sensory variance of all the wines. For each training and tasting session, standard solutions were freshly prepared in a dry Riesling (Staatsweingut mit Johannertergut, Neustadt/Weinstraße, Germany) from the same vintage as the experimental wines.

Table 1: Sensory Attributes for Descriptive Analysis

attribute	verbal description	standard recipe
<i>color</i>	color intensity	no standards provided, training with exemplary wines
<i>smell</i>		
lemon	smell of fresh lemons	40 mL/L freshly pressed lemon juice
petrol	kerosene-like smell	300 µL/L stock solution of 100 mg/L TDN in ethanol
peach	smell of peach	50 mL/L peach juice (Granini Inc.)
green apple	smell of fresh, green apple	50 g/L freshly cut apple peel (Granny Smith)
floral	smell of flowers	40 µL/L stock solution linalool (1 mg/L in ethanol) + 300 µL/L stock solution of rose oil (1 mL in ethanol)
smoky	smell of whisky/smoked ham	1 mL/L stock solution 4-vinylguaiacol (1 mg/mL in ethanol) + 300 µL/L 10 years-old Malt Whisky (Laphroaig Inc.)
honey	smell of honey	10 g/L honey
fruity	intense of fruitiness	no standards provided, training with exemplary wines
<i>taste</i>		
sweet	sweet taste	3 g/L fructose
sour	sour taste	4 g/L tartaric acid
body	bitter taste	no standards provided, training with exemplary wines
mouthfeel	thickness/Viscosity	no standards provided, training with exemplary wines
bitter	bitter taste	1 g/L caffeine

During three training sessions, judges were familiarized with the standard solutions in varying concentrations. For descriptive analysis, six wines were presented in randomized order at 12 °C in clear tulip shaped glasses (Sensus, DIN 10960, Zwiesel Kristallglas, Zwiesel, Germany). Replicates of the experimental treatments were served in different sessions. Panelists rated attribute intensities on a 10 cm line-scale, which was anchored by “not detectable” on the left end and “very strong” on the right end. Odor descriptors were assessed in a comparative set-up, rating the intensity of one attribute in all wines before assessing the next attribute. Orally perceived attributes were evaluated monadically, assessing all descriptors in one wine before continuing to the next one after cleansing the palate with tap water at room temperature.

Viticultural treatments

Defoliation experiments and training system

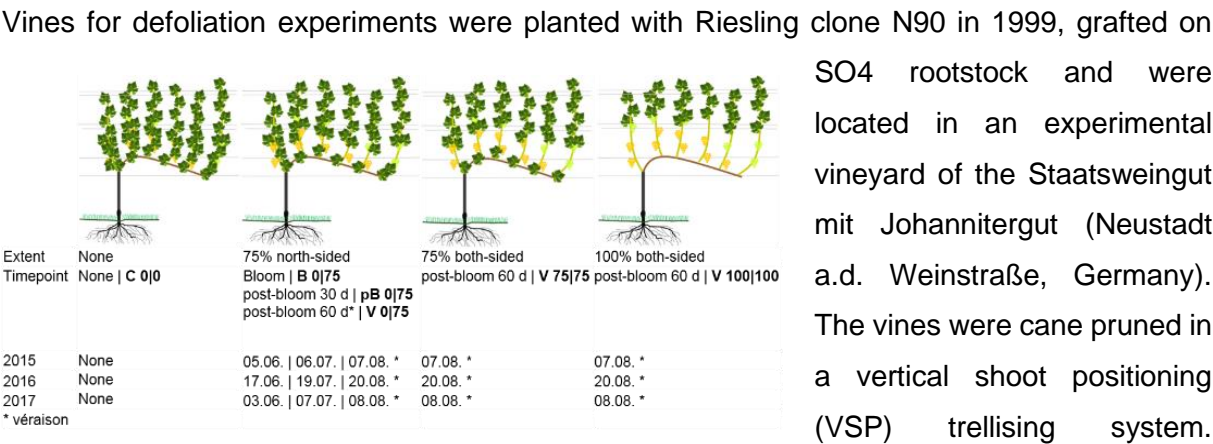


Figure 1: Pattern of defoliation experiments, separated in time point and intensity of leaf removal.

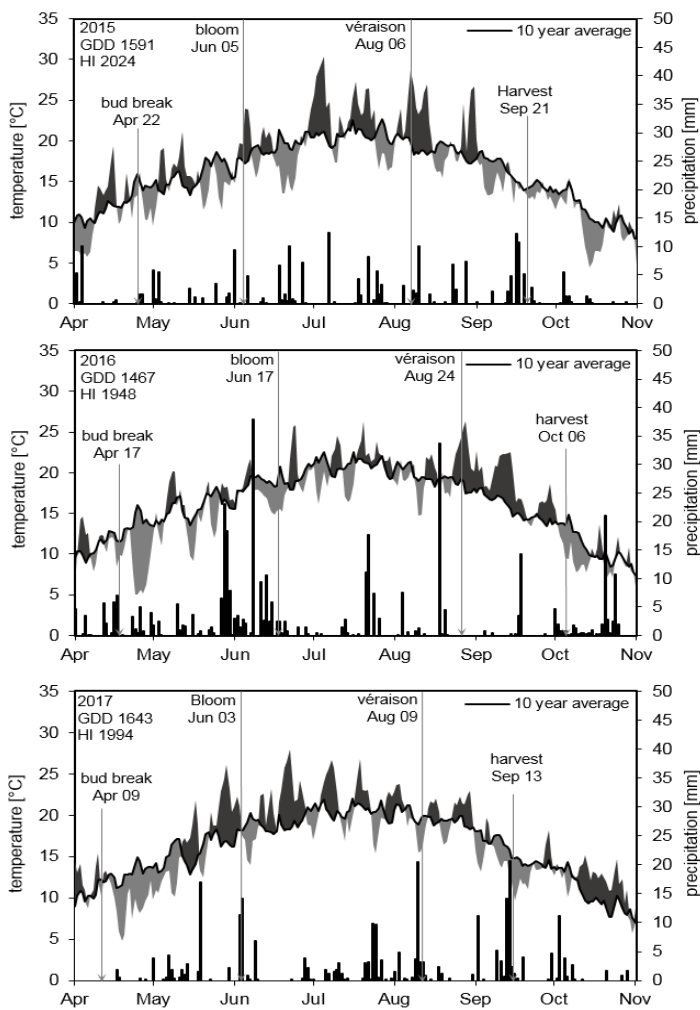


Figure 2: Climate data (temperature, precipitation) of vintages 2015-2017 including growing degree days (GDD) and Huglin index (HI), time points of bud break, defoliation treatment and harvest.

#### *Determination of temperature and light exposure*

A total of 24 point loggers (HOBO® Pendant Temperature/Light Data Logger, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) were positioned in the respective defoliation trials and field replications. The ceptometers were orientated parallel to the ground with the sensors facing directly upward toward the sky. They recorded continuously temperature and light intensity at intervals of 10 min on top of representative grape clusters. Measurements were limited to the vegetation periods 2016 and 2017. Individual measurements for each logger were averaged per day. Daily mean values were averaged over the monitoring period for each trial as well as added up to generate cumulated values for temperature and light exposure.

#### **Experimental winemaking**

For each experimental treatment 110 kg grapes were crushed, supplemented with 2 g pectinase and pressed. SO<sub>2</sub> (50 mg/L; KHSO<sub>4</sub> solution) and 2 g/L gelatin were added to the obtained grape juice. Grape solids were removed via flotation with compressed air and the clear juice was racked after 2 h into two 25 L carboys. Fermentation was initiated by inoculation of the grape juice with re-hydrated 30 g/hl *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures. Two weeks after fermentation was completed, wines were racked off the lees, sulphited with 60 mg/L SO<sub>2</sub> and moved to cold storage at 7 °C. Two months later, wines were bottled with 25 mg/L free SO<sub>2</sub> after membrane filtration (0.45 µm), using screw cap closures. Samples for analysis of bound TDN and VS were taken right after fermentation, while sensory properties and free volatiles were determined after storage at 18 °C for nine months.

#### **Wine analysis**

Fermentation of experimental wines was monitored via specific gravity using a densimeter (DMA™ 35, Anton Paar GmbH, Graz, Austria). Additional wine parameters (ethanol, glucose, fructose, pH, total acidity and yeast assimilable nitrogen) were measured in grape juice and wine via Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) (WineScan™ FT120 Basic, Foss, Hilleroed, Denmark).

#### **Quantitation of bound TDN, bound VS and other volatiles via HS-SPME-GC-MS**

For the analysis of bound TDN and bound VS, 3 mL wine was hydrolyzed for 30 h at 90 °C, cooled to ambient temperatures and 1:50 diluted with model wine, according to the method described earlier.<sup>13</sup> Analysis of released TDN, VS, as well as investigation of other free volatiles was conducted as published previously,<sup>40</sup> using by a stable isotope dilution assay (SIDA).

## Results and discussion

### Impact of harvest date and training system on bound TDN, VS and other wine volatiles

Grapes from cordon pruned vertical shoot positioning (VSP) and minimal pruning (MP) vines were harvested and processed at three different time-points. Increments of two weeks allowed the evaluation of harvesting date on aroma composition. Analyses of bound TDN and bound VS were conducted directly after finished fermentation by thermal hydrolysis and GC-MS, while free volatiles were measured in wines after ten months of storage at 18 °C (Table 2).

Most aroma compounds increased with progressing maturation except for n-hexanol, hexyl acetate and ethyl hexanoate. Most notably, 4-vinylguaiacol increased by a factor of 8 in VSP vines and even by factor 11 in the more sun exposed clusters of minimal pruning. Levels of bound TDN increased by 36% and of bound VS by 26% in average of both pruning experiments due to progressing maturation. Free and thus sensory active TDN increased by 67% from 2.5 to 4.6 µg/L, both exceeding the sensory threshold of 2 µg/L in Riesling wine.<sup>11</sup> For minimal pruned vines TDN rose similarly from 4.0 to 6.2 µg/L. VS changed slightly and remained way below its sensory threshold of 101 µg/L. β-Damascenone tripled its concentration during maturation in VSP, but only by 59% in minimal pruned vines. Linalool levels doubled in both trellising systems surpassing the sensory threshold by factors of 1.8 to 6. Ethyl esters did not change much during prolonged hang-time, whilst 2-phenylethanol, 3-methylbutanol and 2- and 3-methylbutyl acetate rose by 39 to 56%. Contrary, hexyl acetate decreased by 37%. For the average of both trellising systems, the first two weeks of maturation enhanced the sum of significantly changing aroma compounds by 19% and the next two weeks by 25%.

Stronger sun exposure in minimal pruning vines yielded a 18% surplus of all significantly modulated aroma compounds by comparison to the VSP trained vines. For β-damascenone the largest excess of 110% occurred at the early ripening stage and declined during further hang-time. The reverse pattern was observed for 4-vinylguaiacol, where the surplus enlarged to 71% during maturation in the minimal pruning trail. The excess of linalool was stable during maturation at 63%, except for the middle date (30 %). A similar pattern could be observed for free TDN, 2-phenylethyl acetate, ethyl octanoate, and 2- and 3-methylbutyl acetate.

Bound TDN revealed positive and highly significant correlations with bound VS ( $R^2 = 0.77$ ), free TDN ( $R^2 = 0.86$ ), β-damascenone ( $R^2 = 0.83$ ), 4-vinyl guaiacol ( $R^2 = 0.98$ ), linalool ( $R^2 = 0.84$ ) and 2-phenylethyl acetate ( $R^2 = 0.98$ ), while a negative correlation occurred with hexyl acetate ( $R^2 = 0.73$ ), which remained well below its sensory threshold. Overall, C<sub>13</sub>-norisoprenoids and acetate esters were positively related.

Table 2: Bound TDN, VS and Free Volatiles of Wines Made of Grapes from Different Pruning Systems and Harvest Dates.<sup>a</sup>

harvest date	September 2			September 15			September 29			significance	
pruning system	VSP	minimal pruning		VSP	minimal pruning		VSP	minimal pruning		odor threshold	training system
TDN bound	(µg/L)	92.5 d	95.8 d	108.4 c	109.9 c		119.9 b	135.8 a			***
VS bound	(µg/L)	77.0 c	87.0 b	85.5 bc	87.7 b		104 a	102.5 a			**
TDN free	(µg/L)	2.5 c	4.0 b	4.0 b	4.3 b		4.6 b	6.2 a		2 b	**
VS free	(µg/L)	21.0 c	25.4 abc	28.3 ab	25.9 abc		30.2 a	22.6 bc		101 b	ns
β-damascenone (β-Dama)	(µg/L)	3.0 d	6.3 c	6.4 c	7.1 bc		8.9 ab	10.0 a		0.05 c	**
4-vinylguaiacol (VinG)	(µg/L)	3.1 d	4.0 d	14.7 c	14.6 c		26.6 b	45.4 a		40 c	***
linalool (LinOH)	(µg/L)	42.9 e	69.8 cd	59.3 d	77.2 bc		86.8 b	139.9 a		25 c	***
2-phenylethanol (2-PhEtOH)	(mg/L)	11.2 d	12.3 cd	20.8 a	14.2 bc		20.7 a	15.6 b		14 c	**
3-methylbutanol (3-MeBuOH)	(mg/L)	2365.3 ab	2555.4 a	2542.5 a	2019.4 c		2421.5 a	2181.4 bc		30 c	**
n-hexanol (HexOH)	(µg/L)	59.3 c	65.9 c	101.6 b	106.7 b		120.4 b	172.8 a		8000 c	ns
ethyl acetate (EtAc)	(µg/L)	50.3 bcd	56.2 abc	46.9 d	49.6 cd		57.0 ab	62.7 a		12 c	**
ethyl butanoate (EtBu)	(µg/L)	427.8 b	503.3 a	384.5 b	506.7 a		401.8 b	403.3 b		20 c	**
ethyl hexanoate (EtHex)	(µg/L)	2027.7 ab	2294 a	1755.7 bc	2008.7 ab		1597.0 c	1891.7 bc		14 c	*
ethyl octanoate (EtOct)	(µg/L)	3716.0 b	4922.4 ab	4214.9 b	4790.2 ab		3753.5 b	6121.3 a		5 c	ns
hexyl acetate (HexAc)	(µg/L)	371.8 a	363.0 a	224.2 c	278.7 b		249.5 bc	215.1 c		1800 c	**
3-methylbutyl acetate (3-MeBuAc)	(mg/L)	4.0 c	5.2 b	4.8 bc	7.9 a		5.6 b	7.1 a		0.16 c	**
2-methylbutyl acetate (2-MeBuAc)	(µg/L)	180.9 c	216.8 bc	215.3 bc	371.3 a		256.2 b	358.3 a		1600 c	**
2-phenylethyl acetate (2-PhEtAc)	(µg/L)	271.3 d	265.5 d	433.9 a	355.9 c		384.6 bc	416.8 ab		2400 c	***

<sup>a</sup> Letters indicate significant differences among variants of individual vintages. Data represent mean values with n = 2. Significance is indicated with ns (not significant), \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) and \*\*\* (p<0.001). <sup>b</sup> Ziegler et al.<sup>11</sup> <sup>c</sup> Waterhouse et al.<sup>49</sup>

Table 3: Mean Values and Cumulated Values (summed Day Mean Values) of Light Exposure and Temperature of Defoliation Experiments of 2016 and 2017.<sup>a</sup>

vintage	2016				2017			
mean temperature	C 0/0	B 0/75	pB 0/75	V 0/75	C 0/0	B 0/75	pB 0/75	V 0/75
cumulative temperature	[°C]	20.99	21.19	21.18	20.79	20.56	20.72	20.48
	[°C]	1322 b	1361 a	1359 a	1377 a	1336 b	1347 a	1331 bc
mean light exposure	[Lux]	10921	11836	16419	14414	15180	18264	12516
cumulative light exposure	[kLux]	710 c	910 b	758 c	1018 a	987 ab	1187 a	826 bc
				1067 a				15059
								953 ab

<sup>a</sup> Letters indicate significant differences among variants of individual vintages. Data represent mean values with n = 4.

Carotenoids reach their maximum levels before *véraison*,<sup>25</sup> and are subsequently degraded by photo-chemical and enzymatic breakdown, which continues beyond *véraison* into the berry maturation stage.<sup>41,42</sup> This initiates ongoing formation of apo-carotenoids and C<sub>13</sub>-norisoprenoids,<sup>6,42,43</sup> which explains accumulation of C<sub>13</sub>-norisoprenoids during prolonged hang-time. Steady increase of linalool during maturation, may be explained by continuing monoterpene biosynthesis via linalylsynthase beyond *véraison*.<sup>41</sup> The sources of 4-vinylguaiaicol in white wines without any oak contact are either glycoconjugated precursors<sup>44</sup> or origin from decarboxylation of ferulic acid.<sup>45</sup> Due to the accumulation of ferulic acid or its tartrate ester, fertaric acid, during grape maturation<sup>46</sup> the observed rise in 4-vinylguaiaicol in wines during maturation can be rationalized. Our findings in regard to C<sub>13</sub>-norisoprenoids and linalool are confirmed by the literature,<sup>28</sup> but not for 4-vinylguaiaicol.

The observed increments of 2-phenylethyl acetate and hexyl acetate in wines of later harvested grapes are supported by literature.<sup>28</sup> However, formation of 2-phenylethyl acetate is predominantly due to yeast metabolism during fermentation with tyrosine as precursor.<sup>5,47</sup> Since tyrosine origins from the shikimate pathway like 4-vinylguaiaicol, a positive correlation of these compounds seems reasonable. However, this could also be a random observation since the impact of delayed harvesting are deviating among individual vintages. Morena Luna et al. investigated the effect of delayed harvest on volatile composition of Riesling wines.<sup>29</sup> Among other results, formation of n-hexanol, 3-methylbutyl acetate and ethyl acetate showed opposite trends between the examined vintages 2011 and 2012, resulting in an increment in one vintage and a decrease in the other.

The ability of minimal pruned vines to enhance aroma concentration in final wines in comparison to VSP trained vines, are mostly due to elevated concentrations of bound and free TDN,  $\beta$ -damascenone, 4-vinylguaiaicol, linalool, 2-phenylethyl acetate, ethyl octanoate, 2-methylbutyl-, and 3-methylbutyl acetate. At first sight, the opposite would be expected since higher yields and lower fruit-leaf-ratio, which are typical for minimal pruned vines, would diminish sugar accumulation.<sup>34,35</sup> Further studies report lighter bunches with fewer and smaller berries,<sup>33,30</sup> but no significant deviation in soluble solids or titratable acidity.<sup>33</sup> Indeed, larger skin to pulp ratio was proposed to explain the elevated concentrations of glycoconjugated aroma compounds found in grapes and wines of minimal pruned Riesling.<sup>35</sup> Glycoconjugated aroma compounds were only expressed as the sum of the glycosidically bound glucose (GG) (1987 Williams et al.) and no information was provided regarding specific volatiles or their precursors. Thus, our study not only corroborates the importance of the skin to pulp ratio for bound aroma compounds predominantly formed in the berry skin, but offers further information measuring individual C<sub>13</sub>-norisoprenoids such as  $\beta$ -damascenone, TDN and VS. While the



observed increase of TDN and VS in minimal pruned Riesling may induce the unwanted petrol off-flavor, the observed simultaneous increase of other volatiles might contribute to a favorable masking of the petrol note.

### **Impact of defoliation treatments on levels of bound TDN and bound VS**

Temperature and sun exposure are the main factors triggering carotenoid formation and both were monitored from July to harvest in September for the 2016 and 2017 vintage. Means and the sum of daily means over the whole period are presented in Table 3. Temperature varied significantly between vintages but not among defoliation treatments. Leaf removal significantly fostered light exposure, increasing the cumulative light exposure versus the control between 7% and 50% in 2016, and 23% up to 80% in 2017. In 2016, the maximum light exposure was achieved in the most intense defoliation treatment, represented by the double sided 100% leaf removal at véraison (V 100|100). In contrast, in 2017 the highest light exposure was determined in the one sided 75% leaf removal 30 days past bloom (pB 0|75).

Levels of bound TDN and bound VS were measured in wine directly after completed fermentation. Concentrations of bound TDN and VS in recently fermented wines were significantly affected both by time point and intensity of defoliation treatment (Table 4). Leaf removal at bloom versus the non-defoliated control reduced bound TDN levels by 24% in 2015 (2016: 4%, 2017: 16%). In contrast, applying defoliation 30 d past bloom increased bound TDN by 16% (2015), 31% (2016) and 33% (2017), respectively. Late defoliation 60 d past bloom were indifferent towards the control (2015: -22%, 2016: +4%, 2017: +14%). Similar trends could be observed for bound VS.

Amplification of leaf removal from one-sided moderate defoliation (75% removal) to both-sided 100% removal of leaves in the bunch zone – triggered in all vintages a stronger formation of both bound TDN (44 to 99%) and bound VS (43-55%). Comparing vintage effect, 2016 yielded higher concentrations of bound TDN and VS than 2015 and 2017.

It is well known, that exposure to sunlight elicits formation of norisoprenoids, and in particular bound TDN and VS.<sup>14,17,18,22</sup> Linking levels of light exposure to concentrations of bound TDN and VS, we observed in 2016 a positive correlation between cumulative light exposure and bound TDN ( $R^2 = 0.84$ ) or VS ( $R^2 = 0.85$ ), respectively. In 2017 however, this correlation was neither significant for TDN or VS. Two effects could be decisive: On the one hand, early leaf removal at bloom or 30 d post bloom led to more accumulated light exposure than defoliation 60 d post bloom at véraison. New development of foliation and subsequent shading of clusters were only observed for the early defoliation at bloom, but not for the 30 d post bloom trial. On the other hand, light exposure was only measured on the east facing side of the clusters which is affected by the one-sided leaf removal. Thus, increased sun exposure of both sided

defoliation at véraison could be quantified by the light sensors. However, complete removal of the leaves in the bunch zone still led to a measurable increase in light exposure. In general, the use of point measurements via ceptometers is a common, but no exclusive method to determine light exposure,<sup>51,52</sup> and poses challenges regarding replication accuracy or calculation bias.<sup>53,54</sup>

The observed variation of bound TDN and VS among vintages as well as timing and intensity of defoliation might be partially explained by seasonal weather deviation, as displayed in Figure 2. In 2015, following the third defoliation treatment temperature rose well above the average value, favoring carotenoid synthesis, which may have contributed to the observed differences in concentrations of bound TDN and VS. In contrast, in 2017 a humid period followed the third defoliation treatment and temperature deviated around average temperatures, which may have diminished the differences among varying degrees of leaf removal in 2017. Still, total leaf removal in the bunch zone raised TDN levels by 49% and VS concentrations by 43%.

In 2016, strong rainfalls occurred two weeks prior bloom and the first defoliation as well as a few days before the third leaf removal. In contrast to 2015 and 2017, the weather between all defoliation treatments remained cloudy and cool. Sunshine hours accumulated in June only to 164 h and way below the 25-year average (1991-2016) of 232 h.<sup>55</sup> Subsequent less intense sun exposure may have contributed to smaller TDN and VS differences among wines made from different defoliation treatments. It was unexpected that bound and free TDN and VS levels of 200 and 170 µg/L, respectively, were higher in the wet, cooler and less sunny vintage 2016 compared to 2015 and 2017 (GDD 1389 in 2016 vs. 1447 and 1591 in 2015 and 2017, respectively). As pointed out in the introduction, carotenoid formation and breakdown to C<sub>13</sub>-norisoprenoids such as TDN and VS are favored by sun-exposure of the grape berries. It could be speculated, that the more vigorous growth conditions in the first half of the vegetation period may have generated more photosynthesis products into the grapes, which may have fostered precursor formation of TDN and VS. Another argumentation could be linked to the weather conditions after the third defoliation treatment at véraison, when temperatures rose well above the ten-year average in 2016, while in 2015 the surplus was smaller and in 2017 no difference to the average occurred at all (Figure 2).

Kwasniewski et al. conducted an one-vintage experiment in 2008 on the effect of defoliation time point on levels of C<sub>13</sub>-norisoprenoids and carotenoids by comparing juice and wine samples obtained from vines defoliated 2 d, 33 d and 68 d past berry set (PBS) and a control with no leaf removal at all.<sup>19</sup> Concentrations of bound TDN in wines varied from 52 µg/L (control), 61 µg/L (2 d PBS), 81 µg/L (68 d PBS) up to 138 µg/L (33 d PBS) whilst VS and carotenoid concentrations were solely elevated for the 33 d PBS experiment (56 µg/L)

compared to the control (37 µg/L). Thus, the largest bound TDN occurred when leaves were removed a month after bloom. Opposing results were reported by Schüttler et al.,<sup>16</sup> where the lowest levels of bound TDN in grape juice of a non-defoliated variant (63 µg/L), while the largest TDN concentration of 154 µg/L was observed in the early and intense two sided leaf-removal at bloom, followed by medium levels of 112 and 119 µg/L in the one-sided early and both-sided late treatment, respectively. In accordance with both other studies, the lowest concentration was found in the untreated control.

Results obtained in this study corroborate findings of Kwasniewski et al., yielding lower levels of bound TDN for late leaf removal compared to the control, while defoliation 30 d after bloom resulted in highest bound TDN concentrations. However, the plus of 37 to 58% in bound TDN due to defoliation 30 d after bloom versus early leaf removal at bloom during the three vintages in this study was distinctly lower compared to the 126% gain reported by Kwasniewski et al. This variation may be caused by higher mean July temperatures of 21.5°C in the vicinity of Seneca Lake (NY) compared to 18.7°C in Neustadt/Weinstraße.<sup>56</sup> Similar differences of the more continental climate of Upper State of New York are recorded for June and August. Additionally, the vineyard in the 2008 experiment is located on a slope,<sup>19</sup> enhancing sunlight exposure compared to the plain vineyard in this study. Both factors, sun exposure and higher temperature, trigger carotenoid synthesis and subsequently formation of C<sub>13</sub>-norisoprenoids such as TDN and VS.<sup>6,18,20</sup> At the same time, this study demonstrates the striking effect of vintage on overall levels of bound TDN and VS. Furthermore, impact of varying defoliation time points depends on the weather conditions, which differ from vintage to vintage. While in years such as 2016, defoliation at bloom or véraison may not significantly affect TDN and VS concentrations, in other years such as 2015 and 2017, the timing of leaf removal timing is very important. Thus, the mismatch among the present study and the results obtained by other work groups might also be governed by the seasonal weather conditions.

The beneficial outcome for winegrowers is the fact, that a late moderate leaf removal, which is often applied to increase ventilation of the bunch zone to avoid growth of spoilage molds after precipitation during the late summer, does either not affect or even lower the potential for TDN formation. On the other side, the period between bloom and véraison seems to be critical for the biosynthesis for TDN precursors, so defoliation treatments in this time should be avoided unless higher concentration of TDN are desired.

### **Impact of defoliation treatments on levels of free volatiles**

Concentrations of free volatiles in wine aged for nine months at 18 °C are displayed in Table 4. Timing and intensity of defoliation, as well as vintage, had a striking influence on most of the volatiles. In 2016, wines surpassed both other vintages in terms of free TDN (+56% towards 2015 and 106% towards 2017), n-hexanol (67% and 90%) and 2-phenylethanol

(26% and 62%). In contrast 2015 wines had 78% higher levels of linalool than 2016 wines and 36% more than 2017 wines. VS concentrations were highest in 2017 (+27% towards 2015 and 28% towards 2016), while 3-methylbutanol concentrations in 2017 were approximately half the concentrations yielded in 2015 and 2016.  $\beta$ -Damascenone and 4-vinylguaiacol were only little changed by vintage effects, whilst impact was decisive particularly for alcoholic compounds and acetate esters.

Timing of leaf removal was particularly affecting levels of TDN,  $\beta$ -damascenone, linalool and aliphatic acetate esters. Calculating average values over all vintages, defoliation at bloom (B 0|75) lowered final wine concentrations of TDN by (18%),  $\beta$ -damascenone by 36%, hexyl acetate by 37% and n-hexanol by 31%, while other volatiles remained almost unchanged. On the other hand, leaf removal 30 d past bloom (pB 0|75) increased concentrations of TDN and  $\beta$ -damascenone (both 20%), hexyl acetate (70%), linalool (22%) and 4-vinylguaiacol (24%) compared to the early defoliation. Postponing the defoliation to véraison diminished levels of  $\beta$ -damascenone, hexyl acetate, 3-methylbutyl acetate, linalool and 4-vinylguaiacol by 48%, 41%, 31%, 48% and 29%, respectively. Thus, wines obtained from one-sided leaf removal at véraison yielded lowest concentrations for 7 out of 16 volatiles, whereas omission of any defoliation led to maximum levels for eight of the investigated volatiles.

Amplifying defoliation from one-side removal of 75% of leaves in the bunch zone (V 0|75) over both-sided removal to the same degree (V 75|75) and even to total defoliation of the bunch zone (V 100|100) modified wine volatiles in many ways: TDN, VS,  $\beta$ -damascenone, 4-vinylguaiacol, linalool and n-hexanol increased between 65 up to 154% while ethyl and acetate esters, 3-methylbutanol and 2-phenylethanol were only barely affected. Further impact was induced by seasonal variation: In 2017 for example, the change from moderate to total leaf removal had twice the effect than in both other vintages.

Throughout all treatments and vintages significant correlations occurred between bound TDN and free TDN as well as 4-vinylguaiacol ( $r = 0.54$ ;  $p = 0.02$  for both). Thus, treatments increasing the potential for the petrol note enhanced as well the spicy-smoky odor of 4-vinylguaiacol. This is corroborated by the positive correlation of free TDN and 4-vinylguaiacol ( $r=0.46$ ;  $p=0.053$ ). Concentrations of linalool were positively related to those of  $\beta$ -damascenone ( $r = 0.66$ ,  $p = 0.003$ ), which is noteworthy, because, at least for red wines,  $\beta$ -damascenone is discussed as a general flavor enhancer.<sup>57</sup> The significant correlation between concentrations of linalool and free TDN ( $r = 0.84$ ,  $p = 0.04$ ) was only present in 2017, which is interesting in respect to putative sensory masking, as discussed in the following section.

Table 4: Bound TDN, VS and Free Volatiles of Wines Made from Different Defoliation Treatments.<sup>a</sup>

defoliation treatment	vintage	TDN bound (µg/L)	VS bound (µg/L)	TDN free (µg/L)	VS free (µg/L)	β-Dama (µg/L)	VinG (µg/L)	LinOH (µg/L)	PhEtOH (mg/L)	2-MeBuOH (mg/L)	HexOH (mg/L)	EtAc (mg/L)	EtBu (µg/L)	EtHex (µg/L)	EtOct (mg/L)	HexAc (µg/L)	3-MeBuAc (mg/L)	2-MeBuAc (µg/L)	2-PhEtAc (µg/L)
C 0/0		127.8 c	106.4 c	8.6 a	28.6 a	1.5 a	33.3 a	62.6 c	10.4 ab	271.6	2.1 a	67.2 bc	354.2 d	1586.6 c	3.3 c	98.0 b	1.7 d	74.8 d	25.8 d
B 0/75		97.3 d	126.8 b	8.2 a	29.6 a	1.2 b	24.7 b	97.6 b	10.6 a	248.1	1.3 d	55.7 c	395.9 c	2023 ab	4.2 ab	78.6 c	2.0 bc	83.7 bc	42.6 ab
pB 0/75	2015	145.6 b	157.6 a	7.4 ab	15.1 bc	1.2 b	35.3 a	112.8 a	9.4 d	256.8	1.5 bcd	87.9 a	437.8 ab	2082.8 ab	4.4 a	123.1 a	2.5 a	103.5 a	45.8 a
V 0/75		100.5 d	76.1 d	3.9 d	11.6 d	1.1 a	32.8 a	58.9 c	9.9 c	263.5	1.4 cd	70.6 b	408.4 bc	1940.1 ab	4.3 a	91.7 b	2.1 b	82.3 bcd	39.5 b
V 75/75		147.6 b	86.9 d	5.6 c	14.1 cd	0.9 c	31.8 a	90.2 b	10.0 bc	253.3	1.6 bc	77.6 ab	442.3 ab	2151.3 a	4.3 a	95.9 b	1.9 bcd	90.3 b	31.1 c
V 100/100		198.9 a	115.1 bc	6.9 bc	17.7 b	1.5 bc	34.6 a	99 ab	8.1 e	228.1	1.8 ab	67.9 b	386.9 c	1885.0 b	3.8 bc	98.5 b	1.8 cd	79.7 cd	30.2 c
C 0/0		131.2 c	111.9 cd	8.2 cd	12.2 d	1.4 bc	32.6	42.1 e	12.7 bc	277.0	2.5 b	116.7	296.0	1565.1	3.3	126.0 b	1.7 bc	65.2 a	27.2
B 0/75		125.9 c	129.1 c	7.4 d	13.6 cd	1.0 a	36.6	50.9 c	13.4 a	291.6	3.0 a	107.0	296.3	1609.0	3.2	79.0 de	1.9 ab	62.9 a	28.4
pB 0/75	2016	171.9 ab	171.2 a	9.9 b	19.2 b	1.3 ab	42.2	64.0 a	11.4 c	270.5	2.9 a	110.1	311.6	1719.8	3.5	139.8 a	2.0 a	65.7 a	30.1
V 0/75		135.0 c	109.2 d	9.4 bc	17.6 bc	0.7 c	30.0	33.1 d	13.9 a	267.5	2.4 b	99.1	282.9	1529.5	3.2	82.3 d	1.4 d	57.8 b	29.1
V 75/75		175.0 b	150.9 b	15 a	25.9 a	1.1 ab	33.6	46.1 b	10.5 d	279.9	2.6 b	116.2	287.1	1470.9	3.0	98.0 c	1.4 d	52.4 c	19.5
V 100/100		195.9 a	169.4 a	13.6 a	27.4 a	1 abc	48.6	55.8 f	11.5 c	275.2	2.9 a	117.4	282.9	1570.3	3.2	70.9 e	1.6 cd	58.1 b	24.0
C 0/0		112.8 e	99.6 c	5.5 b	23.0 b	1.3 b	36.2 b	54.8 c	11.7 a	201.1 a	2.5 a	101.8 b	376.1 bc	1571.7 c	3.2 bc	156.3 a	3.0 a	99 b	57.5 a
B 0/75		95.3 f	79.1 d	3.4 cd	19.7 b	0.5 c	28.9 c	19.7 d	6.9 d	129.8 c	0.6 e	150.2 a	399.5 ab	1623.4 c	3.0 c	72.5 e	1.4 c	61.7 d	47.3 b
pB 0/75	2017	150.2 c	147.1 ab	4.7 bc	22.8 b	1.5 ab	11.6 d	87.9 b	5.1 e	130.2 c	1.5 c	108.1 b	372.7 bc	1864.3 a	4.1 a	101.6 d	1.9 b	67 cd	38.9 c
V 0/75		129.2 d	106.9 c	2.4 d	15.3 b	0.8 c	18.2 d	25.4 d	8.9 b	141.2 bc	1 de	88.2 c	380.2 abc	1856.2 a	3.7 ab	134.6 bc	3.1 a	132 a	54.9 a
V 75/75		169.1 b	136.7 b	8.0 a	33.0 a	1.7 a	41.6 b	87.2 b	5.0 e	127.7 c	2.0 d	110.7 b	345.8 c	1743.3 b	3.7 ab	131.4 c	1.9 b	70.2 cd	33.0 d
V 100/100		192.4 a	152.6 a	7.4 a	34.3 a	1.8 a	56.6 a	108.4 a	7.6 c	152.7 b	0.9 b	145.8 a	425.6 a	1756.3 ab	2.9 c	141.4 b	2.0 b	77.9 c	45.6 b
odor threshold				2 <sup>b</sup>	101 <sup>b</sup>	0.05 <sup>c</sup>	40 <sup>c</sup>	25 <sup>c</sup>	14 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>	8 <sup>c</sup>	12 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>	14 <sup>c</sup>	0.005 <sup>c</sup>	1800 <sup>c</sup>	0.16 <sup>c</sup>	1600 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>
significance	time point	***	***	***	**	***	ns	***	***	***	ns	***	*	***	***	***	***	***	*
	intensity	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	***	***	***	***	***	*
vintage		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

<sup>a</sup> Letters indicate significant differences among variants of individual vintages. Data represent mean values with n = 2. Significance is indicated with ns (not significant), \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) and \*\*\* (p<0.001). <sup>b</sup> Ziegler et al.<sup>11 c</sup> Waterhouse et al.<sup>49</sup>

The PCA biplot in Figure 3 separates along the first principal component (PC) vintage 2016 on the left and both other vintages on the right side. The orthogonal second PC however discriminates defoliation treatments. Notably, wines from 2016 varied the least due to defoliation, while in 2017 the largest variation occurred. Main drivers to distinguish between vintages were TDN, n-hexanol and acetate esters along PC1. PC2 was governed by VS,  $\beta$ -damascenone, linalool and 4-vinylguaiacol, which were mostly modified by defoliation treatments.

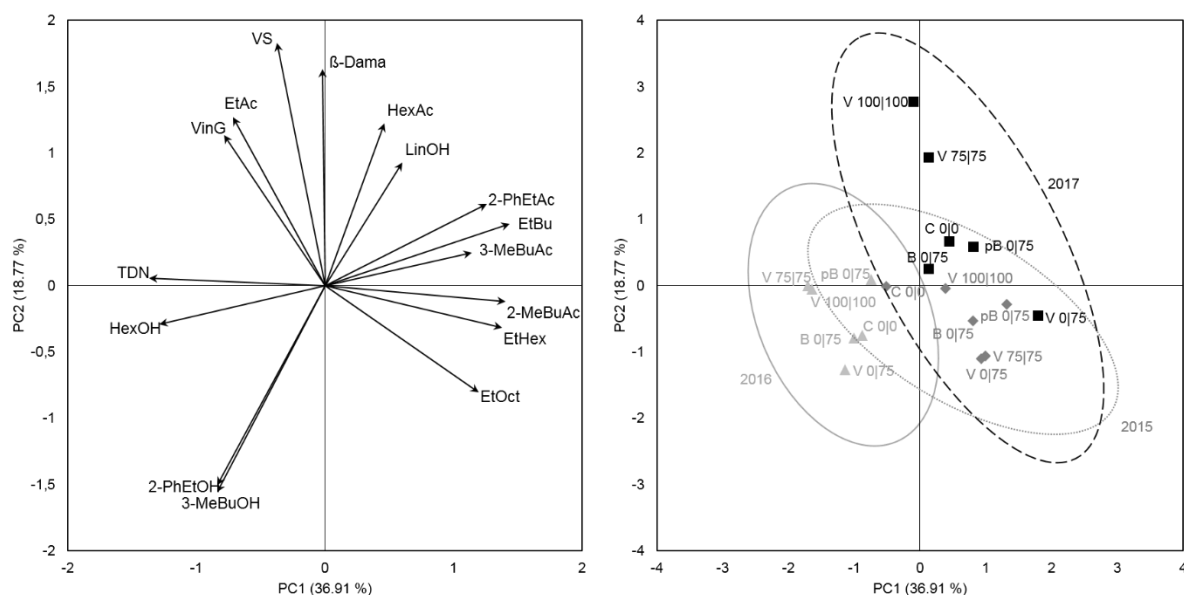


Figure 1: Biplot of principal component analysis (PCA) for free volatile compounds of wines made from different defoliation treatments in vintages 2015 (♦), 2016 (▲) and 2017 (■). Data represent mean values with  $n = 2$ .

Vintage was the major factor modifying composition and quantity of volatiles, which has been reported by several authors,<sup>58,59</sup> and might exceed the effect of different vineyards or enological measures.<sup>60</sup> Seasons differed regarding water supply, temperature, humidity and solar radiation, affecting growth and metabolism of the vines and subsequently changing grape juice composition, including yeast nutrition, and finally volatiles.<sup>61</sup>

On the other hand, unlike intensity of leaf removal, variation of defoliation time point was detrimental to hexyl acetate and 3-methylbutyl acetate concentration, though these compounds are formed during fermentation.<sup>50</sup> Hexyl acetate originates from n-hexanol, thus it was surprising that no significant correlation between these compounds could be established. On the other hand, Dennis et al. reported more compounds to contribute to the hexyl acetate formation potential, namely hexanal, (E)-2-hexenal, (E)-2-hexen-1-ol, and (Z)-3-hexen-1-ol.<sup>62</sup> Thus, independent trends for n-hexanol and hexyl acetate seem to be possible, and potentially



the other mentioned C<sub>6</sub>-aldehydes and -alcohols may be affected by defoliation time point, but were not investigated in the present study. Likewise, no correlation was observed between 3-methylbutyl acetate and its precursor 3-methylbutanol, but in this case, the reason for differing decrease among the defoliation treatments remains unclear.

4-Vinylguaiacol originates predominantly from ferulic acid, a hydroxycinnamic acid<sup>45</sup> being synthesized in the berries before véraison as tartrate ester. In the grape juice its degradation is catalyzed by hydroxycinnamoyl esterase releasing ferulic acid,<sup>49,63</sup> which is subsequently decarboxylated to 4-vinylguaiacol by a wide array of microorganisms. As 4-vinylguaiacol increase with the degree of defoliation, it could be speculated, that encoding genes for ferulic acid production are triggered by exposure to sunlight.<sup>64</sup> This affects formation of tartrate esters before véraison and the degradation of tartrate esters and subsequently ferulic acid resulting in enhanced levels of 4-vinylguaiacol.

Carotenoids, monoterpenes, other isoprenoids<sup>5</sup> and their degradation products like TDN, VS,  $\beta$ -damascenone originate from mevalonate, and at least for carotenoids it is known that concentrations in plants reach maximum concentration between berry-set and véraison, being subsequently degraded during berry maturation.<sup>19,25</sup> Thus, this period seems to be critical for elevated sun-exposure for vines to activate this pathway synthesizing carotenoids and monoterpenes as protection agents against UV-radiation and pathogens.<sup>43,65</sup> In addition, increasing degree of leaf removal clearly yields higher levels of these compounds in the resulting wines.

These findings are in accordance to the results obtained by most other work groups, at least regarding ester and alcohol concentrations. Defoliation did not significantly modify ester concentrations Sauvignon blanc,<sup>66</sup> Nero d'Troia,<sup>67</sup> while linalool increased upon leaf removal at bloom<sup>67</sup> or at véraison.<sup>68,69</sup> Defoliation also raised flavonols and skin phenols such as quercetin-glycosides of Riesling.<sup>70,71</sup>  $\beta$ -Damascenone in Riesling wines remained unchanged by defoliation,<sup>19</sup> while Verzera et al. reported increasing  $\beta$ -damascenone levels in wines made from defoliated vines.<sup>67</sup> Thus, optimizing the time point and intensity of sun exposure to berries could enable winegrowers to modify berry composition and wine aroma of the resulting wines.

### **Impact of defoliation treatments on sensory properties**

Results of sensory analyses of wines obtained from defoliation experiments were used for the PCA in Figure 4, limited to those odor attributes, which significantly varied due to defoliation treatment and vintage. Furthermore, most orally perceived attributes were omitted since volatiles in general and TDN in particular contribute predominantly to odor perception and barely to gustatory cues. Bitterness however were kept in order to take the sensory effect of phenolic content into account, which may increase with defoliation and sun exposure.

Principal component 1, explaining 41% of the variance, were dominated by fruity, floral, honey and smoky attributes, while PC2 (31%) displays the antagonist between the retronasally perceived fruitiness versus bitterness, the petrol note and a hard mouthfeel. PC 1 separates the warmer vintage 2015 (growing degree days (GDD) = 1591) from the cooler vintage 2016 (GDD = 1467), while the 2017 wines (GDD = 1643) were in-between.<sup>55</sup> Although the sensory variation due to the defoliation treatments were larger in 2017 than in the other vintages, the 2017 wines tended to be more fruity on the palate and showed less petrol off-flavor, bitterness and hard mouthfeel.

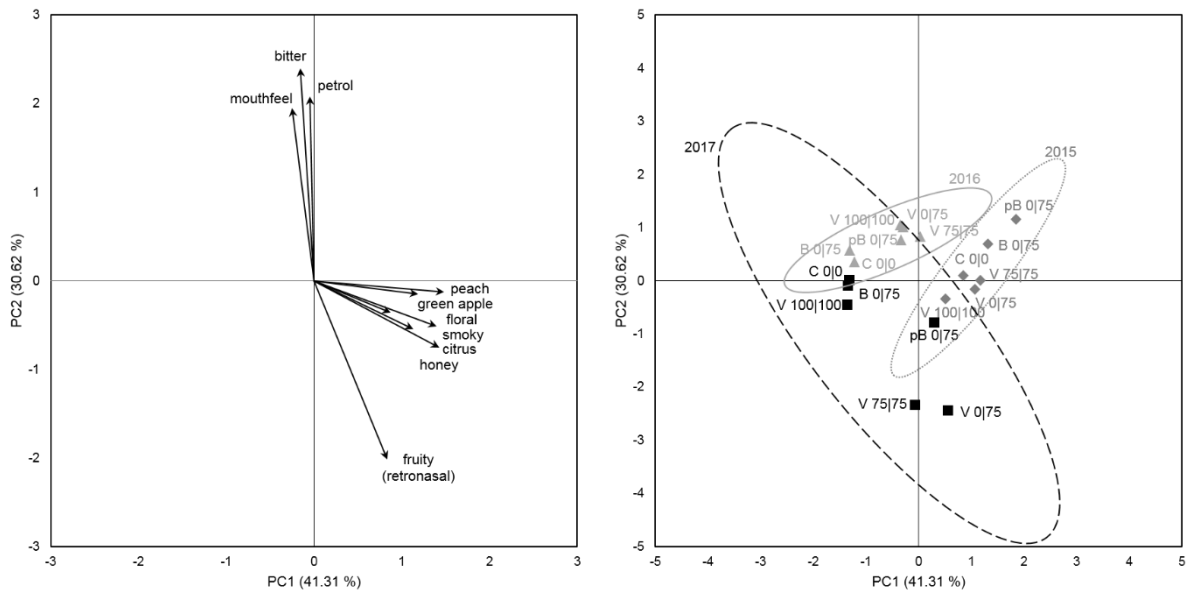


Figure 2: Biplot of principal component analysis (PCA) for sensory analysis of wines made from different Riesling clones in vintages 2015 (♦), 2016 (▲) and 2017 (■). Data represent mean values with  $n = 2$ .

To display the impressive sensory impact of the defoliation treatments, Figure 5 shows sensory intensities of all significant attributes. Furthermore, it is a holistic view on the interactions of many aroma compounds which can act synergistically but also suppressive. While free TDN varies between 2.4 and 8  $\mu\text{g/L}$ , the petrol intensity varies only from 2.1 and 3.5. This is due to the psychophysical function according to Stevens' law, but also due to the masking effect of other aroma compound such as linalool: the defoliation treatment V 0|75 had the lowest TDN concentration of 2.4  $\mu\text{g/L}$  but also the lowest linalool content of 25  $\mu\text{g/L}$ , which both barely exceeded their respective odor thresholds of 2.3 and 25  $\mu\text{g/L}$ . Still, a medium intensity of petrol was perceived with 2.7. In contrast, both-sided leaf removal at the same time (V 75|75) resulted in the highest TDN level of 8  $\mu\text{g/L}$  but due to a linalool concentration of 87  $\mu\text{g/L}$  the perceived petrol intensity was the lowest with 2.1. Of course, other aroma compounds mask as well the petrol note and there are several volatiles in Figure 3, which show negative correlations to the TDN concentration such as most esters and linalool.

From a sensory perspective the wines from grapes undergoing moderate and not too early defoliation treatments 30 days after bloom (pB 0|75) or 60 days after bloom (V 0|75 and V 75|75) yielded the most fruity and floral wines with a lower petrol perception. In contrast the undefoliated control, but also late and severely defoliated vines (V 100|100) yielded the least attractive wines.

It is one objective to lower TDN formation by viticultural means such as a moderate and not too late defoliation. On the other hand, if defoliation favors aroma compounds such as linalool, putative mask the petrol note, more severe defoliation could be beneficial, although it enhances TDN levels. This may explain the fact, that in each year another defoliation treatment was most successful to diminish perception of the petrol note. In fact, in 2015 the one-sided moderate defoliation at véraison yielded the lowest petrol note, in 2016 earl defoliation at bloom and in 2017 the two-sided moderate leaf removal at véraison. Vice versa, the most intense petrol note

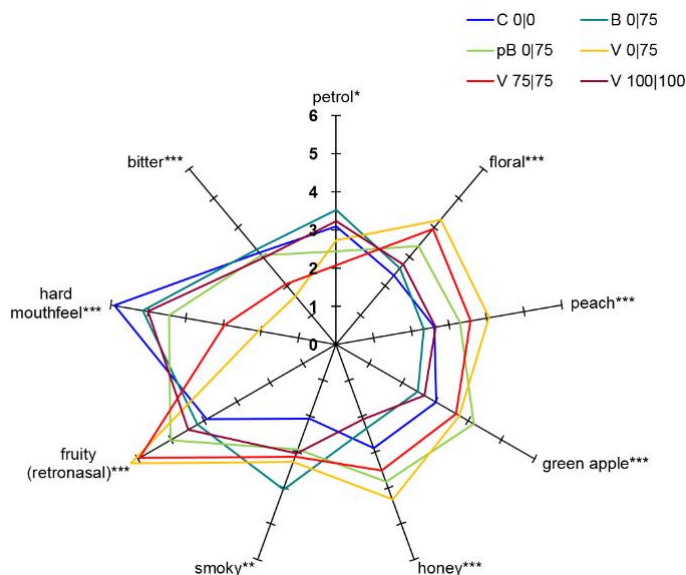


Figure 3: Spider web for sensory analysis of wines obtained from defoliation experiments in 2017, reduced to significant attributes. Significance is indicated by \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ) with  $n$  (judges) = 22.

was obtained by wines from defoliation 30 days (pB 0|75) past bloom in 2015 and 2017, and for both sided defoliation at véraison (V 100|100) in 2016. At the same time, in 2017, gentle defoliation at véraison (V 0|75) yielded highest perception of floral, peach, honey, fruitiness and lowest levels of bitterness. Throughout all three years, defoliation intensity correlated negatively and significantly with citrus odor and positively correlated with petrol note.

Further significant positive correlation occurred between petrol perception and TDN concentrations ( $r = 0.661$ ;  $p = 0.003$ ), citrus and linalool concentration ( $r = 0.526$ ;  $p = 0.025$ ) and between fruitiness and levels of ethyl butanoate ( $r = 0.533$ ;  $p = 0.023$ ) as well as ethyl hexanoate ( $r = 0.518$ ;  $p = 0.028$ ). Retronasally perceived fruitiness however was negatively correlated with concentrations of 3-methylbutanol ( $r = -0.593$ ;  $p = 0.01$ ) and the sensory intensity of the petrol note ( $r = -0.604$ ;  $p = 0.008$ ).

In summary, sensory differences among the defoliation treatments were much lower than for concentrations of aroma compounds, which is partially the result of the psychophysical function

where odor intensity relates to the stimulus concentration raised to the power of 0.1 to 0.9 only.<sup>72</sup> Thus, for an exponent of 0.4, concentration of an aroma compound needs to increase by a factor of five in order to double the perceived odor intensity. Still, perception of the petrol note was highly significantly governed by free TDN in the wines.

Several studies were conducted on the impact of leaf removal on wine composition and sensory properties, although the results are multifactorial. Arnold et al. as well as Tardáguila et al. conducted experiments of varying time points of defoliation in Sauvignon blanc and Grenache, respectively.<sup>37,73</sup> While Arnold et al. elucidated a decrease of vegetal aromas due to leaf removal, which is related to the degradation of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine, Tardáguila reported a decrease of floral and fruity properties due to early (fruit-set after bloom) as well as late (véraison) leaf removal treatments. In contrast, Vilanova et al. observed increasing levels the fruity esters 3-methylbutyl acetate and 2-phenylethyl acetate due to defoliation of Tempranillo vines at fruit-set,<sup>74</sup> while Diago et al. yielded decreasing levels of fruity and floral attributes applying similar defoliation treatments in Tempranillo.<sup>75</sup> After véraison, increased sunlight exposure seems to boost the breakdown of carotenoids to norisoprenoids<sup>76</sup> and the synthesis of free and bound monoterpenes.<sup>77,78</sup>

Finally, in Riesling, no sensory impact of leaf removal at véraison could be found,<sup>68</sup> though volatile composition was substantially affected by defoliation.

Contradictory statements in the literature are often a result of incomparable treatments, climatic conditions or grape varieties. Keeping most factors, except for vintage dependent climate, constant, this study could reveal significant impact of defoliation on sensory intensities and volatiles.

Some of the investigated volatiles were distinctly increased or diminished, however human perception follows a psychophysical function in a logarithmic scale,<sup>79</sup> mitigating analytical differences among the wines when assessed in sensory experiments. Additionally, chemical analysis always examine the concentration of single compounds, neglecting their sensory interference such as suppressing or enhancing effects of odor-active compounds, especially in complex mixtures.<sup>49,79,80</sup> Moreover, sensory differences may increase over bottle-aging, as fruity aroma compounds such as esters hydrolyze or monoterpenes oxidize, while free TDN increases due to liberation from odorless precursors.

In summary, prolonged maturation time of the grapes as well as minimal pruning results in higher levels of investigated free and bound C<sub>13</sub>-norisoprenoids. Minimal pruning of the vines may counterbalance this potentially unwanted effect by a simultaneous increase of fruity aroma compounds in the resulting wines, which was not the case for wines derived from late harvested grapes. Appropriate canopy management using defoliation to govern sun-exposure

to grape berries could serve winegrowers as a tool for the reduction of an undesired petrol off-flavor in Riesling wines. However, impact of varying defoliation time points depends on the weather conditions, which differ from vintage to vintage. While in years such as 2016, defoliation at bloom or véraison may not significantly have influenced TDN concentrations, in other years such as 2015 and 2017, the timing of leaf removal timing emerged to be decisive. At least, beneficial effect of moderate leaf removal at véraison on petrol note levels could be confirmed by sensory analysis, while defoliation between bloom and véraison yields is detrimental on wine quality. So far, elucidating the impact on defoliation on wine composition and quality might help winegrowers to manage viticultural approaches for the production of high-quality Riesling wines facing climate change.

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## Acknowledgments

The authors are thankful to Michael Wacker, Sandra Klink and field personnel of viticulture department for their technical support. We are particularly grateful to the late Dr. Hans-Georg Schmarr who inspired us with his knowledge and enthusiasm in the field of flavor chemistry and instrumental analytics.

## Funding

This research project was supported by the German Ministry of Economics and Technology (via AiF) and the Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI, Bonn, Germany) - Project AiF 16680.

## Supporting Information

Table S1: Sensory data of wines obtained from defoliation experiments of vintages 2015 – 2017. Data represent mean values of tastings with  $n$  (replication) = 2 and  $n$  (judge) = 19 (2015), 25 (2016) and 22 (2017) on a scale from 0 (not detectable) to 10 (very strong). Letters indicate significant differences among variants of individual vintages. Significance is indicated with ns (not significant), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

## References

- (1) Rocha, S. M.; Coutinho, P.; Coelho, E.; Barros, A. S.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. Relationships between the varietal volatile composition of the musts and white wine aroma quality. A four year feasibility study. *LWT--Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 1508-1516.
- (2) Styger, G.; Prior, B.; Bauer, F. F., Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 1145-1159.
- (3) van Leeuwen, C.; Darriet, P. The Impact of Climate Change on Viticulture and Wine Quality. *J. Wine Econ.* **2016**, *11*, 150-167.
- (4) Winterhalter, P.; Sefton, M. A.; Williams, P. J. Volatile C<sub>13</sub>-Norisoprenoid Compounds in Riesling wine are Generated from Multiple Precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 277-283.
- (5) Robinson, A. L.; Boss, P. K.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D.; Heymann, H.; Ebeler, S. E. Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *Am. J. Enol. Vitic.* **2014**, *65* (1), 1-24.
- (6) Mendes-Pinto, M. M. Carotenoid breakdown products the-norisoprenoids-in wine aroma. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *483*, 236-245.
- (7) Simpson, R. F.; Strauss, C.R.; Williams, P.J. Vitispirane: a C<sub>13</sub>-spiro-ether in the aroma volatiles of grape juice, wines and distilled grape spirits. *Chem. Ind.* **1977**, *15*, 663-664.
- (8) Simpson, R. F. 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene: an important contributor to the bottle aged bouquet of wine. *Chem. Ind.* **1978**, *1*, 37.
- (9) Acree, T. E.; Williams, R.C.; Sacks, G.L. The flavor chemistry of Riesling. In *The Proceedings of the 9th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology*; Hofmann, T., Meyerhof, W., Schieberle, P., Eds.; Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie: Eisenach, Germany, **2010**; 106-111.
- (10) Sacks, G. L.; Gates, M. J.; Ferry, F. X.; Lavin, E. H.; Kurtz, A. J.; Acree, T. E. Sensory Threshold of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and Concentrations in Young Riesling and Non-Riesling Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2998-3004.
- (11) Ziegler, M.; Gök, R.; Bechtloff, P.; Winterhalter, P.; Schmarr, H.-G.; Fischer, U. Impact of matrix variables and expertise of panelists on sensory thresholds of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene known as petrol off-flavor compound in Riesling wines. *Food Qual. Pref.* **2019**, *78*, 103735.
- (12) Ferreira, A. C. S.; Guedes de Pinho, P. Analytical Method for Determination of Some Aroma Compounds on White Wines by Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 2817-2820.
- (13) Gök, R.; Bechtloff, P.; Ziegler, M.; Schmarr, H.-G.; Fischer, U.; Winterhalter, P. Synthesis of Deuterium-Labeled 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and Quantitative Determination of TDN and Isomeric Vitispiranes in Riesling Wines by a Stable Isotope Dilution Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 6414-6422.
- (14) Black, C.; Francis, L.; Henschke, P.; Capone, D.; Anderson, S.; Day, M.; Holt, H.; Pearson, W.; Herderich, M.; Johnson, D. Aged Riesling and the development of TDN. *Wine Vitic. J.* **2012**, *27*, 20-26.
- (15) Marais, J.; Versini, G.; van Wyk, C. J.; Rapp, A. Effect of Region on Free and Bound Monoterpene and C<sub>13</sub>-Norisoprenoid Concentrations in Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 71-77.



- 
- (16) Schüttler, A.; Guthier, C.; Stoll, M.; Darriet, P.; Rauhut, D. Impact of grape cluster defoliation, grape must clarification and yeast strain on TDN potential in cool climates wines. *Wine Vitic. J.* **2016**, *31*, 51-54.
- (17) Marais, J.; Van Wyk, C. J.; Rapp, A. Effect of Sunlight and Shade on Norisoprenoid Levels in Maturing Weisser Riesling and Chenin blanc Grapes and Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 23-32.
- (18) Gerdes, S. M.; Winterhalter, P.; Ebeler, S. E. Effect of Sunlight Exposure on Norisoprenoid Formation in White Riesling Grapes. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*; Winterhalter, P., Rouseff, R. L., Eds.; *ACS Symposium Series 802*, American Chemical Society: Washington, DC, **2001**; 262-272.
- (19) Kwasniewski, M. T.; Vanden Heuvel, J. E.; Pan, B. S.; Sacks, G. L. Timing of Cluster Light Environment Manipulation during Grape Development Affects C<sub>13</sub> Norisoprenoid and Carotenoid Concentrations in Riesling. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6841-6849.
- (20) Marais, J., Van Wyk, C. J.; Rapp, A., E Effect of Storage Time, Temperature and Region on the Levels of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene and Other Volatiles, and on Quality of Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 33-44.
- (21) Rudy, H. Petrol note in wine: origin and reduction. *Der Deutsche Weinbau* **2015**, *21*, 32-35.
- (22) Hixson, J.; Grebneva, Y.; Glameyer, N.; Vollmer, K.; Black, C.; Krstic, M.; Herderich, M. Shedding light on the modulation of key Riesling wine aroma compounds in a changing climate. *XV Weurman Flavour Research Symposium*; Siegmund, B., Leitner, E., Eds.; Verlag der Technischen Universität Graz: Graz, Austria, **2018**; 19-24.
- (23) Schultz, H. R. Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 2-12.
- (24) Kalua, C. M.; Boss, P. K. Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) from fruitset to harvest. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2010**, *16*, 337-348.
- (25) Yuan, F.; Qian, M. C. Development of C<sub>13</sub>-norisoprenoids, carotenoids and other volatile compounds in *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot noir grapes. *Food Chem.* **2016**, *192*, 633-641.
- (26) Khairallah, R.; Reynolds, A. G.; Bowen, A. J. Harvest date effects on aroma compounds in aged Riesling icewines. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 4398-4409.
- (27) Moreno, J. J.; Cerpa-Calderón, F.; Cohen, S. D.; Fang, Y.; Qian, M.; Kennedy, J. A. Effect of postharvest dehydration on the composition of pinot noir grapes (*Vitis vinifera* L.) and wine. *Food Chem.* **2008**, *109*, 755-762.
- (28) Boss, P. K.; Böttcher, C.; Davies, C. Various Influences of Harvest Date and Fruit Sugar Content on Different Wine Flavor and Aroma Compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* **2014**, *65*, 341-353.
- (29) Morena Luna, L. H.; Reynolds, A. G.; di Profio, F. A.; Zhang, L.; Kotsaki, E. Crop Level and Harvest Date Impact on Four Ontario Wine Grape Cultivars. II. Wine Aroma Compounds and Sensory Analysis. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2018**, *39*, 246-270.
- (30) Reynolds, A. G.; Wardle, D. A. Evaluation of Minimal Pruning upon Vine Performance and Berry Composition of Chancellor. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 45-48.
- (31) Bowed, P. A., Kliwer, W.M. Influence of Clonal Variation, Pruning Severity, and Cane Structure on Yield Component Development in 'Cabernet Sauvignon' Grapevines. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1990**, *115*, 530-534.
-

- (32) Holt, H. E.; Francis, I. L.; Field, J.; Herderich, M. J.; Iland, P. G. Relationships between berry size, berry phenolic composition and wine quality scores for Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) from different pruning treatments and different vintages. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2008**, *14*, 191-202.
- (33) Clingeffer, P. R. Response of Riesling clones to mechanical hedging and minimal pruning of cordon trained vines (MPCT)-implications for clonal selection. *Vitis* **1988**, *27*, 87-93.
- (34) McCarthy, M. G.; Ciriaco, R. M. Minimal pruning effects on the performance of selections of four *Vitis vinifera* cultivars. *Vitis* **1990**, *29*, 85-96.
- (35) Schultz, H.; Kraml, S.; Werwitzke, U.; Zimmer, T.; Schmid, J. Adaptation and Utilization of Minimal Pruning Systems for Quality Production in Cool Climates. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 185-190.
- (36) Poni, S.; Casalini, L.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Intrieri, C. Effects of Early Defoliation on Shoot Photosynthesis, Yield Components, and Grape Composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 397-407.
- (37) Tardáguila, J.; Diago, M. P.; de Toda, F. M.; Poni, S.; Vilanova, M. Effects of Timing of Leaf Removal on Yield, Berry Maturity, Wine Composition and Sensory Properties of cv. Grenache Grown under Non Irrigated Conditions. *OENO One* **2008**, *42*, 221-229.
- (38) Percival, D. C.; Fisher, K. H.; Sullivan, J. A. Use of Fruit Zone Leaf Removal With *Vitis vinifera* L. cv. Riesling Grapevines. II. Effect on Fruit Composition, Yield, and Occurrence of Bunch Rot *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.). *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, *45*, 133-140.
- (39) ISO 13301:2002(E) Sensory analysis – Methodology – general guidance for measuring odour, flavour and taste detection thresholds by a three-alternative forced-choice (3-AFC) procedure. Beuth Verlag: Berlin, Germany, **2002**.
- (40) Ziegler, M.; Wegmann-Herr, P.; Schmarr, H.-G.; Gök, R.; Winterhalter, P.; Fischer, U. Impact of Rootstock, Clonal Selection and Berry Size of *Vitis vinifera* sp. Riesling on the Formation of TDN, Vitispiranes and Other Volatile Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 3834-3849. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00049>.
- (41) Baumes, R.; Wirth, J.; Bureau, S.; Gunata, Y.; Razungles, A. Biogenesis of C<sub>13</sub>-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 3-14.
- (42) Mathieu, S.; Terrier, N.; Procureur, J.; Bigey, F.; Günata, Z. A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C<sub>13</sub>-norisoprenoid accumulation. *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 2721-2731.
- (43) Walter, M. H.; Strack, D., Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 663-692.
- (44) Winterhalter, P.; Sefton, M. A.; Williams, P. J. Two-dimensional GC-DCCC Analysis of the Glycoconjugates of Monoterpenes, Norisoprenoids, and Shikimate-Derived Metabolites from Riesling Wine. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1041-1048.
- (45) Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J.-N.; Lavigne, V. Synthesis of Volatile Phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in Wines. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *62*, 191-202.
- (46) Tian, R.-R.; Pan, Q.-H.; Zhan, J.-C.; Li, J.-M.; Wan, S.-B.; Zhang, Q.-H.; Huang, W.-D. Comparison of Phenolic Acids and Flavan-3-ols during Wine Fermentation of Grapes with Different Harvest Times. *Molecules* **2009**, *14* (2), 827-838.

- 
- (47) Lambrechts, M. G.; Pretorius, I. S. Yeast and its Importance to Wine Aroma-a Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2000**, *21*, 97-129.
- (48) D'Onofrio, C. Changes in volatile compounds. *Sweet, Reinforced and Fortified Wines*, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd. **2013**, 91-103.
- (49) Waterhouse, A. L.; Sacks, G. L.; Jefferey, D. W., Understanding Wine Chemistry. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, **2016**.
- (50) Swiegers, J. H.; Bartowsky, E. J.; Henschke, P. A.; Pretorius, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 139-173.
- (51) Schultz, H. R. Grape canopy structure, light microclimate and photosynthesis. I. A two-dimensional model of the spatial distribution of surface area densities and leaf ages in two canopy systems. *Vitis* **1995**, *34*, 211-216.
- (52) Zufferey, V.; Murisier, F.; Schultz, H. R., A model analysis of the photosynthetic response of *Vitis vinifera* L. cvs Riesling and Chasselas leaves in the field: I. Interaction of age, light and temperature. *Vitis* **2000**, *39*, 19-26.
- (53) Meyers, J. M.; Vanden Heuvel, J. E. Enhancing the Precision and Spatial Acuity of Point Quadrat Analyses via Calibrated Exposure Mapping. *Am. J. Enol. Vitic.* **2008**, *59*, 425-431.
- (54) Petrie, P.; Black, C.; Krstic, M.; Herderich, M. Evaluating methods for measuring fruit exposure. AWRI: **2017**.
- (55) Agrarmetereologie Rheinland-Pfalz. <http://www.wetter.rlp.de> (accessed 12/14/2020).
- (56) Climate-Data.org. <https://de.climate-data.org> (accessed 11/19/19).
- (57) Pineau, B.; Barbe, J.-C.; Van Leeuwen, C.; Dubourdieu, D. Which Impact for  $\beta$ -Damascenone on Red Wines Aroma? *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4103-4108.
- (58) Ferreira, V.; López, R.; Cacho, J. F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1659-1667.
- (59) Louw, L.; Tredoux, A.; Van Rensburg, P.; Kidd, M.; Naes, T.; Nieuwoudt, H. Fermentation-derived Aroma Compounds in Varietal Young Wines from South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2010**, *31*, 213-225.
- (60) Fischer, U.; Roth, D.; Christmann, M. The impact of geographic origin, vintage and wine estate on sensory properties of *Vitis vinifera* cv. Riesling wines. *Food Qual. Pref.* **1999**, *10*, 281-288.
- (61) Marais, J.; Hunter, J.; Haasbroek, P. Effect of Canopy Microclimate, Season and Region on Sauvignon blanc Grape Composition and Wine Quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1999**, *20*, 19-30.
- (62) Dennis, E. G.; Keyzers, R. A.; Kalua, C. M.; Maffei, S. M.; Nicholson, E. L.; Boss, P. K. Grape Contribution to Wine Aroma: Production of Hexyl Acetate, Octyl Acetate, and Benzyl Acetate during Yeast Fermentation Is Dependent upon Precursors in the Must. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2638-2646.
- (63) Ong, B.; Nagel, C., Hydroxycinnamic Acid-Tartaric Acid Ester Content in Mature Grapes and during the Maturation of White Riesling Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1978**, *29*, 277-281.
- (64) Diago, M. P.; Ayestarán, B.; Guadalupe, Z.; Garrido, Á.; Tardaguila, J. Phenolic composition of Tempranillo wines following early defoliation of the vines. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 925-934.
- (65) Gershenzon, J.; Dudareva, N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 408-414.
-

- (66) Šuklje, K.; Antalick, G.; Buica, A.; Langlois, J.; Coetzee, Z. A.; Gouot, J.; Schmidtke, L. M.; Deloire, A. Clonal differences and impact of defoliation on Sauvignon blanc (*Vitis vinifera* L.) wines: a chemical and sensory investigation. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 915-926.
- (67) Verzera, A.; Tripodi, G.; Dima, G.; Condurso, C.; Scacco, A.; Cincotta, F.; Giglio, D. M. L.; Santangelo, T.; Sparacio, A. Leaf removal and wine composition of *Vitis vinifera* L. cv. Nero d'Avola: the volatile aroma constituents. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 150-159.
- (68) Kozina, B.; Karoglan, M.; Herjavec, S.; Jeromel, A.; Orlić, S. Influence of basal leaf removal on the chemical composition of Sauvignon Blanc and Riesling wines. *J. Food Agric. Environ.* **2008**, *6*, 28-33.
- (69) Baiano, A.; Mentana, A.; Quinto, M.; Centonze, D.; Previtali, M. A.; Varva, G.; Del Nobile, M. A.; De Palma, L. Volatile composition and sensory profile of wines obtained from partially defoliated vines: the case of Nero di Troia wine. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 247-261.
- (70) Friedel, M.; Frotscher, J.; Nitsch, M.; Hofmann, M.; Bogs, J.; Stoll, M.; Dietrich, H. Light promotes expression of monoterpene and flavonol metabolic genes and enhances flavour of winegrape berries (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling). *Austr. J. Grape Wine Res.* **2016**, *22*, 409-421.
- (71) Brandt, M.; Scheidweiler, M.; Rauhut, D.; Patz, C.-D.; Will, F.; Zorn, H.; Stoll, M. The influence of temperature and solar radiation on phenols in berry skin and maturity parameters of *Vitis vinifera* L. cv. Riesling. *OENO One* **2019**, *2*, 287-302.
- (72) Chastrette, M.; Thomas-Danguin, T.; Rallet, E. Modelling the Human Olfactory Stimulus-Response Function. *Chem. senses* **1998**, *23*, 181-196.
- (73) Arnold, R. A.; Bledsoe, A. M. The Effect of Various Leaf Removal Treatments on the Aroma and Flavor of Sauvignon blanc Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 74-76.
- (74) Vilanova, M.; Diago, M. P.; Genisheva, Z.; Oliveira, J. M.; Tardaguila, J. Early leaf removal impact on volatile composition of Tempranillo wines. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 935-942.
- (75) Diago, M. P.; Vilanova, M.; Tardaguila, J. Effects of Timing of Manual and Mechanical Early Defoliation on the Aroma of *Vitis vinifera* L. Tempranillo Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, *61*, 382-391.
- (76) Ristic, R.; Downey, M. O.; Iland, P. G.; Bindon, K.; Francis, I. L.; Herderich, M.; Robinson, S. P. Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2007**, *13*, 53-65.
- (77) Reynolds, A. G.; Wardle, D. A.; Naylor, A. P. Impact of Training System, Vine Spacing, and Basal Leaf Removal on Riesling. Vine Performance, Berry Composition, Canopy Microclimate, and Vineyard Labor Requirements. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47*, 63-76.
- (78) Zoecklein, B. W.; Wolf, T. K.; Duncan, S. E.; Marcy, J. E.; Jasinski, Y. Effect of Fruit Zone Leaf Removal on Total Glycoconjugates and Conjugate Fraction Concentration of Riesling and Chardonnay *Vitis vinifera* L.) Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 259-265.
- (79) Lawless, H. T.; Heymann, H., *Sensory evaluation of food: principles and practices*. Springer Science + Business Media, LLC: New York, 2010.
- (80) Cain, W. S.; Drexler, M. Scope and evaluation of odor counteraction and masking. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1974**, *237*, 427-439.

## 6.5 Manuskript zum Thema Einfluss oenologischer Methoden

Der Einfluss oenologischer Praktiken auf die Bildung von freiem und gebundenem TDN und anderen Aromastoffen von *Vitis vinifera* sp. Riesling

Im Anschluss an die zahlreichen Handlungsmöglichkeiten, die im Weinberg zur Beeinflussung der TDN-Bildung durchgeführt wurden, werden in diesem Abschnitt die Maßnahmen behandelt, die ab der Ernte der Trauben umgesetzt werden können. Dabei liegen die Schwerpunkte einerseits auf der Beeinflussung der Mostzusammensetzung beim Keltern und vor der Fermentation mit dem Ziel, geringere Gehalte an gebundenem TDN durch eine veränderte Mostzusammensetzung und die Manipulation des Hefemetabolismus zu erreichen. Da auch die natürliche Mostzusammensetzung durch die klimatischen Gegebenheiten stark schwanken kann, wurden auch diese Versuchsreihen in mehreren aufeinander folgenden Jahrgängen durchgeführt. Andererseits werden auch Möglichkeiten untersucht, die die Freisetzung des freien TDN und die Gehalte der anderen Aromastoffe der Rieslingweine betreffen.

Die Erhöhung des Pressdrucks beim Keltern der Trauben auf bis zu 1,5 bar verursachte einen Anstieg an gebundenem TDN um 67% in den aus den einzelnen Pressfraktionen hergestellten Weinen; gleichzeitig stieg auch die Konzentration anderer Aromastoffe durch die verstärkte Extraktion der Beerenschalen, ebenso wie der pH-Wert des Mostes. Dagegen wurde durch den höheren Säuregehalt der Pressfraktionen, die bei 0 und 0,4 bar gewonnen wurden, die Freisetzung von TDN und Vitispiran aus den gebundenen Vorläufern stark beschleunigt, ebenso wie der Abbau der Esterverbindungen während der Lagerung. Die Anreicherung des Mostes mit hefeverwertbarem Stickstoff hatte vor allem in nährstoffarmen Most eine deutliche Senkung der Gehalte an gebundenem TDN und Vitispiran nach der Fermentation zur Folge. Bei einer weiteren Versuchsreihe zeigte sich, dass die eingesetzten Hefestämme unterschiedliche Anforderungen an den Nährstoffbedarf mit Auswirkung auf die Bildung von gebundenem TDN und Vitispiran besitzen. Während der Hefemetabolismus durch hohe Säuregehalte kaum beeinflusst wurde, führten hohe Gärtemperaturen zu einer Zunahme der TDN-Konzentration und zu Weinen, die bei der sensorischen Analyse vermehrt mit Attributen wie „Honig“ oder „Petrol“ in Verbindung gebracht wurden.

Während der Lagerung hatte vor allem die Lagertemperatur Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit von TDN und Vitispiran, allerdings wurden auch Unterschiede durch den Einsatz verschiedener Flaschenverschlüsse und der Lagerungsposition beobachtet.

## **Impact of Oenological Practices on Formation of Free and Bound TDN and Other Volatiles of *Vitis vinifera* sp. Riesling**

Michael Ziegler<sup>†,‡</sup>, Recep Gök<sup>§</sup>, Peter Winterhalter<sup>§</sup>, Ulrich Fischer<sup>\*,†,‡</sup>

<sup>†</sup> Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Institute for Viticulture and Oenology, Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße, Germany

<sup>‡</sup> Kaiserslautern University of Technology, Department of Chemistry, Erwin-Schrödinger-Straße 52, 67663 Kaiserslautern, Germany

<sup>§</sup> Technische Universität Braunschweig, Institute of Food Chemistry, Schleinitzstraße 20, 38106 Braunschweig, Germany

\* Corresponding author

E-mail: [ulrich.fischer@dlr.rlp.de](mailto:ulrich.fischer@dlr.rlp.de). Tel. No. +49 6321 671 294. Fax: +49 6321 671 375.

### **ORCID**

Michael Ziegler: 0000-0002-5377-7919

Recep Gök: 0000-0002-1231-8679

Peter Winterhalter: 0000-0003-3417-6023

Ulrich Fischer: 0000-0003-1566-8516



**Abstract**

The C<sub>13</sub>-norisoprenoid 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) is known to elicit the perception of “petrol off-flavor” in wine, most prominent in the variety Riesling. Like the biosynthetically related isomeric vitispiranes (VS), it is released from glycosidically bound carotenoid breakdown products during bottle aging. This study focused on oenological parameters influencing the levels of bound precursors and their release, as well as volatile composition of the resulting Riesling wines. Low pressure during grape juice production and enhanced yeast assimilable nitrogen in grape juice ready for fermentation yielded significant lower levels of bound TDN and VS. Yeasts were non-sensitive to environmental stress caused by high acidity, however setting the fermentation temperature to 24 °C yielded more honey-like and petrol-affine wines than cooler processing conditions. Nine commercial yeast strains were evaluated with a favorable outcome within a single vintage, though being outweighed by vintage effects leaving no specific yeast to excel throughout the whole experiment. Low pH during bottle storage had a detrimental effect on ester composition, while the formation of free TDN and VS was fostered, just as by high temperatures, choice of bottle closure type and storage position.

**Keywords**

TDN, Riesling wine, press fractions, yeast metabolism, storage, temperature

### Introduction

One of the most controversial flavor compounds in Riesling wines is 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN), which exhibits a kerosene- and petrol-like off-flavor.<sup>1</sup> TDN and the biosynthetically related vitispirane isomers (2,10,10-trimethyl-6-methylen-1-oxaspiro[4.5]dec-7-ene, VS) are predominantly found in Riesling wines, with VS exhibiting a campheraceous, eucalyptus odor.<sup>2</sup> They are known degradation products of grape derived carotenoids.<sup>3-6</sup>

Reported TDN concentrations in European Riesling wines range from 0.5 up to 22 µg/L and up to 12 µg/L for VS.<sup>7,8</sup> In warmer climates Black and coworkers reported a concentration range for TDN of 2 to 255 µg/L in Australian Riesling wines<sup>9</sup>, whereas Marais and coworkers report a range of 3 to 55 µg/L for Riesling wines from South Africa.<sup>5</sup> Within the last 35 years, the maturation of German Riesling grapes has shifted forward by four weeks, mainly due to the effects of climate change. Grapes are thus exposed to warmer temperatures and more intense sunlight exposure,<sup>10,11</sup> increasing the potential for TDN and VS formation in Riesling grapes even when grown in cool climates. Referring to the detection threshold for consumers of 14.7 µg/L for TDN,<sup>12</sup> this may address even fresh produced wines in the foreseeable future; therefore, strategies to reduce formation of TDN precursors and release of volatile TDN are getting gradually relevant for winegrowers and winemakers, whilst suffering of wine quality has to be avoided.

The amount of precursors in grape juice might be diminished by application of viticultural measures like defoliation or bunch shading leading to a lower sun exposure of the berries.<sup>9,13-16</sup> Furthermore, differences in rootstocks, clonal selection and pruning system are also influencing the TDN concentration in wines<sup>17,18</sup> as well as berry size and water availability.<sup>19,20</sup> However, viticultural practices like clonal and rootstock selection are long-term decisions, and seasonal alternation of weather conditions complicate short-term measures like defoliation since vintage variation may compensate the beneficial impact or rendering it unnecessary. Additionally, enhancing the water status of vines might be very expensive depending on region and structure of the vineyards. Consequently, measures for governing TDN development after grape harvest need to be investigated, either to diminish the concentration of TDN precursors before or during fermentation, or to govern release and accumulation during storage of the wine.

The first decisive point capable of governing concentrations of glycoconjugated norisoprenoids is represented with the grape juice production. Since glycoconjugated aroma compounds are not only present in the juice but also in the pulp and skin of the berries,<sup>21,22,23</sup> different pressing regimes during must production may lead to higher extraction rate of several compounds from pulp and skin. This effect may be enhanced by enabling endured skin contact for several hours or days before induced fermentation.<sup>24,25</sup> However, extensive skin contact may also introduce the levels of unwanted phenolic compounds in the must causing bitter notes in the resulting

wines.<sup>26</sup> The practice of use of different press fractions is well known for being mandatory in the production of champagne avoiding bitter substances in the cuvee.<sup>27</sup> Though there are many studies on the effects of skin contact on polyphenols, there is a lack of knowledge on the importance of press fractions for the aroma composition of wines. Hence, this work addresses the production of wines from different pressing fractions of Riesling must and the impact on norisoprenoid precursors and free volatiles.

It is well known that yeasts play a key role in the formation of several aroma compounds, whether by biosynthesis, e.g. ethyl esters, sulfur compounds, branched or higher alcohols<sup>28,29</sup> or by release of glycoconjugated compounds like monoterpenes or norisoprenoids.<sup>30</sup> The formation of most of these compounds might be influenced by a fostered, diminished or modulated yeast metabolism to avoid certain compounds like ethyl acetate or trigger the formation of others, like fruity esters.<sup>31,32</sup> It is also postulated that in certain cases a enzymatic modification of the aglycons of glycoconjugated aroma compounds preceding the release may occur.<sup>33,34</sup> This enzymatic conversion may be conducted by yeasts and might thus be modulated by a change in parts of the yeasts metabolism. For some norisoprenoids having similar precursors, this might be used to shift the resulting free compounds in a more favored direction.

Model reactions with yeasts showed that TDN progenitors may be converted into precursors of isomeric vitispiranes which are more tolerated in wine due to their higher odor detection threshold.<sup>34</sup> Keeping in mind that there is an enormous range of different yeast strains with varying metabolism rates and preferences, the choice of the yeast strain is of crucial interest not only for a fast fermentation but also for fostered production of favored aroma compounds and diminishing unwanted ones.<sup>16,17,28,29</sup> To our knowledge, these reactions are not fully understood and further research on this field is reasonable. This work deals with some influence factors of the yeast metabolism, i.e. nutrition status, pH, temperature during fermentation and sugar/alcohol stress caused by raising the musts sugar concentration, and their effect on TDN, isomeric vitispiranes and other volatiles.

Eventually, handling the finished wines governs the release and the resulting concentrations of free TDN. The kinetics of the release of the glycoconjugated compounds are thermodynamically driven, consisting of acid catalyzed rearrangement and cleavage reactions.<sup>35,36</sup> This hypothesis leads to storage conditions being preferably cool and with a low acidity. Studies conducted in the past confirmed these considerations: While a low storage temperature reveals a slow release of TDN, raising the storage temperature multiplies the liberation rate.<sup>37,38,39</sup> While similar results are reported for a low pH, enhancing the formation of free TDN,<sup>37,38</sup> disparate results can be found for the impact of present oxygen. While it was previously assumed that oxidation fosters TDN formation,<sup>40</sup> others report that the influence of oxygen as promotor of TDN release is neglectable under common storage conditions,<sup>41</sup> but

rather trace back to the use of different closure types. On one hand, different closures have different permeation rates for oxygen,<sup>42,43</sup> on the other hand the closure material itself can cause scalping of various flavor compounds and thus have an impact on the concentrations in the wine.<sup>44,45</sup> This effect may be enhanced by different bottle orientation, storing the bottles in horizontal position instead of an upright orientation intensifying the contact with the closure material.<sup>41,46</sup>

After harvesting grape berries, influence on grape-derived non-volatile precursors of C<sub>13</sub>-norisoprenoids is limited, so we wanted to elucidate the impact of some oenological practices. Beginning with variation in pressing regimes, subsequent response of yeasts to changed nutritional and environmental conditions, i.e. sugar and alcohol concentration, fermentation temperature and acidity, and the impact of selected yeast strain were investigated. Though effective measures towards the levels of bound norisoprenoids do not necessarily imply overall improvement of wine quality, the concentrations of some other wine volatiles were determined, with a special focus on impact by filtration and storage parameters such as temperature, closure type and bottle orientation.

## Materials and methods

### Chemicals

Ethanol ( $\geq 99.8\%$ ), sodium chloride ( $\geq 99\%$ ), potassium hydroxide (p.a.), and L(+)-tartaric acid (p.a.) were purchased from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany), sodium hydrogen carbonate (p.a.) was purchased from AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany). A model wine with 12 vol-% ethanol was prepared with 10 g/L tartaric acid, and pH adjusted to 3.0 with a 2N potassium hydroxide solution for calibration of gas chromatographic analysis. Preparation of saturated aqueous sodium chloride solution (brine) was done in tap water boiled for 5 min. TDN, TDN-*d6* and VS were synthesized as described earlier.<sup>47</sup> Other target compounds as well as deuterated standards were purchased from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA). Pectinase (Lafazym CL) was purchased from Laffort (Bordeaux, France), KHSO<sub>4</sub> solution (Sulfureuse P150) and gelatin were obtained from Erbslöh AG (Geisenheim, Germany). Nutrition aids (LittoThiamol P, GoFerm, FermAid) were purchased from Erbslöh AG (Littothiamol P), Lallemand Inc. (GoFerm, Montreal, Canada) and Eaton Electric GmbH (FermAid, Bonn, Germany). *Saccharomyces cerevisiae* strains were obtained from Lallemand Inc. (EC1118, uvaferm SLO, uvaferm CEG, uvaferm exence), Erbslöh AG (Oenoferm Riesling, Oenoferm X-treme, Oenoferm Freddo), Laffort (Zymaflore delta) and ZEFÜG GmbH (Anaferm Riesling), Bingen, Germany).

### General winemaking

The experimental musts of vintages 2016 and 2017 were provided by the Staatsweingut mit Johannertergut (Neustadt an der Weinstraße, Germany) and treated with SO<sub>2</sub> (50 mg/L; KHSO<sub>4</sub> solution). If not stated otherwise, the grape juice was racked in two 25 L carboys, and acidity and sugar content were adjusted to 9 g/L total acidity and 19 °Brix. Fermentation was initiated by inoculation of the grape juice with re-hydrated 0.30 g/L *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures (Zymaflore delta), supplemented with 0.25 g/L nutrition aid. Two weeks after fermentation was completed, wines were racked off the lees, sulphited with 60 mg/L SO<sub>2</sub>, and moved to cold storage at 7 °C. After four weeks the wines were cross-flow filtrated using a filter cartridge (Sartopure S; Sartorius AG, Göttingen, Germany), filled in screw cap bottles and stored under ambient basement conditions (18 ± 1 °C). Samples for analysis of bound TDN and VS were taken right after fermentation, while sensory properties and free volatiles were determined after storage for nine months. Fermentation of experimental trials was monitored via specific gravity using a densimeter (DMA™ 35, Anton Paar GmbH, Graz, Austria). Additional wine parameters such as ethanol, glucose, fructose, pH, total acidity, ammonium and yeast assimilable nitrogen were measured in grape juice and wine via Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) (WineScan™ FT120 Basic, Foss, Hilleroed, Denmark).

### **Impact of pressing regime**

200 kg berries were crushed with a hydraulic press (Scharfenberger GmbH & Co. KG, Bad Dürkheim, Germany), and during the pressing protocol four different fractions were produced: Free-run obtained without applied pressure (0 bar) and the fractions yielded by steps with pressure of 0.4, 1.0 and 1.5 bar. The must of every fraction was collected, 50 mg/L SO<sub>2</sub> and 2 g/L gelatine were added to the obtained grape juice. Grape solids were removed via flotation using compressed air after 2 h of sedimentation. Further processing was conducted as described in the previous section, though without adjustment of acidity or sugar content.

### **Yeast-related modifications**

To investigate the effect of yeast nutrition, grape juice yielded in 2016 was racked in carboys and the five following variants were generated: an untreated control without nutrition aid (CON), addition of 400 mg/L Diammoniumphosphate and 350 µg/L vitamin B<sub>1</sub> (DV) (addition of 1 mL/L LittoThiamol P), addition of 0.25 g/L yeast autolysate (GoFerm; YA), addition of 1 mL/L LittoThiamol P and 0.25 g/L GoFerm (DVA) and addition of the above mentioned amounts of LittoThiamol P, GoFerm and 0.25 g/L yeast hulls (Fermaid; DVAH). In 2017, the experiment was replicated except replacing the single LittoThiamol P variant through a variant with addition of 0.25 g/L Fermaid (YH) and adding a variant with 1 mL/L LittoThiamol P and 0.25 g/L Fermaid (DVH). Four different environmental temperatures were chosen (12 °C, 16 °C, 20 °C, 24 °C) to investigate the impact of fermentation temperature in 2016 and 2017. In two further experiments, the pH of grape juice from 2016 and 2017 was modified using tartaric acid or KHCO<sub>3</sub> to obtain pH values of 2.8, 3.0, 3.2 and 3.4. Half of the amount of young wine obtained from the pH related experiments was filtrated as described in general winemaking, for the other half filtration was omitted to determine potential impact of filtration. Five different commercial yeast strains were used for grape juice fermentation in 2015: Lalvin® EC1118 (Y1), uvaferm SLO (Y2), uvaferm CEG (Y3), uvaferm exence™ (Y4) and Oenoferm Riesling (Y5). The experiment was extended to nine yeasts in 2016 and 2017 with the yeast strains Oenoferm Xtreme (Y6), Oenoferm Freddo (Y7), Zymaflore delta (Y8) and Anaferm Riesling (Y9).

### **Storage parameters**

To investigate the impact of closure type, protective atmosphere, storage orientation and temperature, a total of 72 bottles were filled with a fresh wine of 2017 vintage, and half of them were covered with N<sub>2</sub> to reduce potential oxidation. Subsequently, every variant was sealed either with a technical cork or a BVS screw cap (both Reis Flaschengroßhandel GmbH, Neustadt, Germany) and stored either upright or in horizontal position at a temperature of 5 °C,



16 °C or 25 °C, respectively. The experiment was conducted in triplicate and was stopped after a storage time of five months.

### Sensory evaluation

Sensory analysis was conducted with a trained panel (14 female and 13 male participants; 19-64 years, average 41 years) all of whom had previously participated in other descriptive analyses of wine. The study was conducted in an odor-free, well-lit room with an ambient temperature of 21 °C that was equipped according to ISO13301.<sup>48</sup> The list of sensory attributes in Table 1 was obtained by panel discussion after tasting of experimental wines. For each training and tasting session, standard solutions were freshly prepared in a dry Riesling (Staatsweingut mit Johannertergut, Neustadt/Weinstraße, Germany) of the same vintage as the experimental wines.

Table 1: Sensory Attributes for Descriptive Analysis

<b>attribute</b>	<b>verbal description</b>	<b>standard recipe</b>
<i>color</i>	color intensity	no standards provided, training with exemplary wines
<i>smell</i>		
lemon	smell of fresh lemons	40 mL/L freshly pressed lemon juice
petrol	kerosene-like smell	300 µL/L stock solution of 100 mg/L TDN in ethanol
peach	smell of peach	50 mL/L peach juice (Granini Inc.)
green apple	smell of fresh, green apple	50 g/L freshly cut apple peel
honey	smell of honey	10 g/L honey
<i>taste</i>		
sweet	sweet taste	3 g/L fructose
sour	sour taste	4 g/L tartaric acid
body	bitter taste	no standards provided, training with exemplary wines
mouthfeel	thickness/viscosity	no standards provided, training with exemplary wines
bitter	bitter taste	1 g/L caffeine

During two training sessions, judges were familiarized with the standard solutions in varying concentrations. For descriptive analysis, four wines were presented in randomized order at 12 °C in clear tulip shaped glasses (Sensus, DIN 10960, Zwiesel Kristallglas, Zwiesel, Germany). Replicates of the experimental treatments were served in different sessions. Panelists rated attribute intensities on a 10 cm line-scale, which was anchored by “not detectable” on the left and “very strong” on the right end. Odor descriptors were assessed in a comparative set-up, rating the intensity of one attribute in all wines before assessing the next attribute. Orally perceived attributes were evaluated monadically, assessing all descriptors in one wine before continuing to the next one after cleansing the palate with tap water at room temperature.

### Quantitation of bound TDN, bound VS and volatiles via HS-SPME-GC-MS

For the analysis of bound TDN and bound VS, 3 mL wine was hydrolyzed for 30 h at 90 °C, cooled to ambient temperatures and 1:50 diluted with model wine, according to the method described earlier.<sup>47</sup> Analysis of released TDN, VS, as well as investigation of free volatiles was conducted as published previously,<sup>18</sup> using by a stable isotope dilution assay (SIDA).

Table 2: Total Acidity, pH, Bound TDN/VS and Free Volatiles of Riesling Wines Made from Different Press Fractions after Fermentation.<sup>a</sup>

vintage	press fraction	2016					2017					odor threshold	significance		interaction press fr. * vintage
		0 bar	0.4 bar	1.0 bar	1.5 bar		0 bar	0.4 bar	1.0 bar	1.5 bar			press fraction	vintage	
total acidity	(g/L)	9.5 a	9.2 a	7.9 b	8.2 b		8.6 a	7.6 b	6.3 c	6.4 c			***	***	***
pH		2.6	2.7	3.0	2.9		2.7	2.9	3.5	3.6			**	***	**
TDN bound	(µg/L)	113.0 b	116.8 b	147.9 a	165.1 a		70.2 d	127.6 c	141.5 b	159.1 a			***	**	**
VS bound	(µg/L)	74.2 b	90.1 b	151.2 a	144.1 a		78.3 d	95.4 c	170.7 b	203.7 a			***	**	**
TDN free	(µg/L)	1.0 a	0.9 b	0.6 c	0.5 c		0.5 a	0.3 b	0.3 c	0.3 c		2 <sup>b</sup>	**	**	***
VS free	(µg/L)	6.7 a	6.7 a	4.4 b	3.6 b		6.9 a	4.9 b	3.8 c	2.7 c		101 <sup>b</sup>	***	***	***
β-damascenone	(µg/L)	12.3 c	13.6 c	19.0 b	25.5 a		13.2 c	14.1 c	18.1 b	20.3 a		0.05 <sup>c</sup>	***	ns	**
(β-Dama)															
4-vinylguaiacol	(µg/L)	63.0 b	70.9 b	141.1 a	157.9 a		63.8 d	124.6 c	182.3 b	251.3 a		40 <sup>c</sup>	***	***	**
(VinG)															
linalool	(µg/L)	68.0 d	85.4 c	114.9 b	180.2 a		95.1 d	185.6 c	270.6 b	343.1 a		25 <sup>c</sup>	***	***	***
(LinOH)															
2-phenyl ethanol	(mg/L)	45.7 a	41.3 b	31.3 c	25.8 d		20.4 a	14.4 b	12.1 bc	10.7 c		14 <sup>c</sup>	***	***	***
(2-PhEtOH)															
3-methyl butanol	(mg/L)	129.3 a	126.9 a	91.9 b	83.5 b		125.4 a	115.6 ab	107.1 b	111.0 b		30 <sup>c</sup>	***	ns	**
(3-MeBuOH)															
n-hexanol	(mg/L)	2.9 ab	3.1 a	2.5 c	2.6 bc		1.3 c	1.4 c	2.9 bc	4.4 a		8 <sup>c</sup>	***	**	***
(HexOH)															
ethyl acetate	(mg/L)	78.8 a	57.3 ab	53.9 b	63.3 ab		63.0 a	69.0 a	60.7 ab	52.7 b		12 <sup>c</sup>	*	ns	*
(EtAc)															
ethyl butanoate	(µg/L)	601.4 a	516.6 b	556.3 ab	560.9 ab		559.7 a	561.3 a	566.2 a	520.1 a		20 <sup>c</sup>	ns	ns	ns
(EtBu)															
ethyl hexanoate	(mg/L)	0.9 c	0.7 d	1.7 b	2.1 a		1.6 b	1.7 b	2.1 a	1.6 b		0.014 <sup>c</sup>	***	***	***
(EtHex)															
ethyl octanoate	(mg/L)	0.8 b	0.7 b	2.0 a	2.3 a		2.3 b	2.6 a	2.4 ab	2.0 c		0.005 <sup>c</sup>	***	***	***
(EtOct)															
hexyl acetate	(µg/L)	249.7 c	166.3 d	486.2 b	644.8 a		507.2 c	650.2 b	1047.8 a	1059.7 a		1800 <sup>c</sup>	***	***	**
(HexAc)															
3-methylbutyl acetate	(mg/L)	1.7 b	1.3 c	3.1 a	3.8 a		2.0 d	2.8 c	3.6 b	5.4 a		0.16 <sup>c</sup>	***	***	**
(3-MeBuAc)															
2-methylbutyl acetate	(µg/L)	207.1 c	185.7 d	281.0 b	315.6 a		264.6 a	292.8 a	295.9 a	282.3 a		1600 <sup>c</sup>	**	**	**
(2-MeBuAc)															
2-phenylethyl acetate	(µg/L)	50.5 b	36.1 c	85.4 a	88.5 a		108.1 a	98.1 ab	81.9 b	58.6 c		2400 <sup>c</sup>	ns	**	***
(2-PhEtAc)															

<sup>a</sup> Letters Indicate Significant Differences among the Variants within the Individual Vintage. Data Represent Mean Values with n = 2. Significance is Indicated with ns (not significant), \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) and \*\*\* (p<0.001). <sup>b</sup> Ziegler et al.<sup>12</sup> <sup>c</sup> Waterhouse et al.<sup>81</sup>

## Results and discussion

### Press fractions

Total acidity, pH, bound TDN, VS and free volatiles of wines (with abbreviations) derived from four different press fractions are listed in Table 2. Concentrations of bound C<sub>13</sub>-norisoprenoids TDN and VS increase applying more intense pressure during grape juice extraction. Applying 1.5 bar increased levels of bound TDN by 46% in 2016 and 127% in 2017, while VS was raised by 95% in 2016 and 161% in 2017, compared to juice yielded at 0 bar. Total acidity dropped by 14% in 2016 and 25% in 2017 with increasing pressure, with a simultaneous increase in levels of  $\beta$ -dama (+80% in average of both vintages), VinG (+222%), LinOH (+213%), HexAc (+134%) and 3-MeBuAc (+142%) for 1.5 bar compared to 0 bar. Concentrations of 2-PhEtOH, 3-MeBuOH, EtAc were diminished in 1.5 bar fraction by 18% (EtAc) up to 46% (2-PhEtOH) in average. EtHex, EtOct, 2-PhEtAc and 2-MeBuAc rose by 52% up to 181% in 2016, while remained unchanged in 2017, or even halved the concentration (2-PhEtAc), while for HexOH, the opposite was true (-10% in 2016, +247% in 2017).

Wines yielded in 2017 contained in average 17% lower levels of total acidity and 8% less bound TDN, but VS concentrations amounted 19% higher. In average, wines obtained in 2017 contained 13% higher concentration of aroma compounds than 2016 wines. Pressing regime had also a strong impact on free TDN and free VS, but concentrations ranged at a very low level due to the recent finished fermentation.

Significant correlations could be established between bound TDN and bound VS, VinG, 3-MeBuOH and 3-MeBuAc, with *r* (Pearson) ranging from 0.74 for bound TDN/3-MeBuAc up to *r* = 0.82 for bound TDN/ $\beta$ -dama with *p* = 0.04 or below. LinOH concentrations were significantly correlating with levels of bound VS ( $R^2$  = 0.74), VinG ( $R^2$  = 0.89), 2-PhEtOH ( $R^2$  = 0.67), HexAc ( $R^2$  = 0.90) and 3-MeBuAc ( $R^2$  = 0.82).

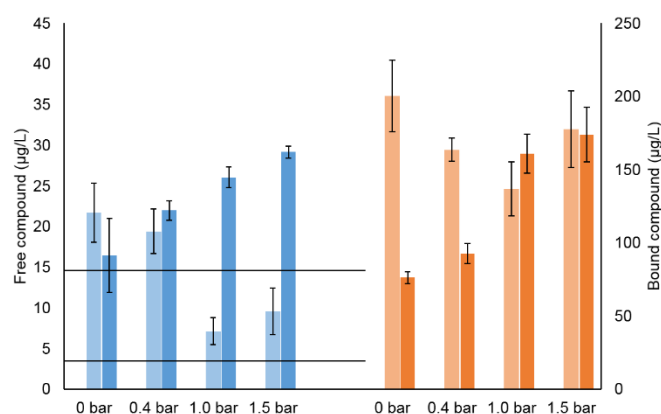


Figure 4: Bound TDN/VS (dark blue/orange) in freshly fermented wines and free TDN/VS (light blue/orange) in wines after bottle aging for 9 months, obtained from different press fractions. Data represent mean values of vintages 2016 and 2017 with *n* = 2.

Bottle aging for nine months at an ambient cellar temperature of 18 °C yielded TDN and VS concentrations displayed in Figure 1. Due to the higher concentrations of bound TDN and bound VS in the fractions yielded at 1.0 and 1.5 bar, higher concentrations in wines obtained from these fractions would be expected. In contrast, free TDN and free VS levels were in the same range (VS) or even doubled (TDN) in wines made from 0 and 0.4 bar. 3-MeBuOH and HexOH

increased slightly within nine months storage (Figure 2), while  $\beta$ -dama, VinG and EtBu concentrations decreased between 45 to 87%, however, no difference could be observed among the variants. On the other hand, LinOH and acetate esters responded to low pH of the wines: Concentrations nearly remained at their initial levels for 1.5 bar, while for 0 bar, between 35% (3-MeBuAc) and 92% (2-PhEtAc) of the initial content faded away, presumably to acid catalyzed cleavage (esters) and oxidation (LinOH).

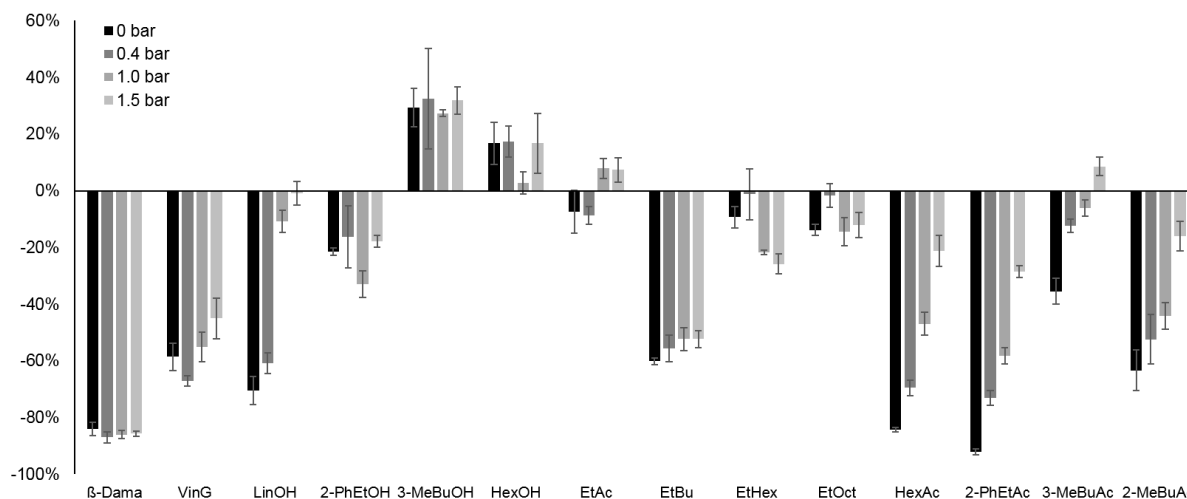


Figure 5: Impact of bottle aging of 9 months on volatile compounds in wines from different press fractions. Data represent mean values of vintages 2016 and 2017 with  $n = 2$ .

Enhancing pressure during grape juice production lowers pH of the resulting must due to the fostered extraction of potassium, in agreement with previous studies,<sup>27,49,50</sup> assuming the first press fraction owning the highest acid content. Intensified mechanical extraction of the berry skins increases also aroma compounds and precursors located in the berry skins. Gunata et al. revealed LinOH being predominantly located in berry skins,<sup>22</sup> and Cabaroglu et al. observed increasing concentrations of VinG in wine with intense skin contact,<sup>23</sup> fortifying the results obtained in this study. The same applies for elevated levels of  $C_{13}$ -norisoprenoids,  $\beta$ -dama, bound TDN and bound VS, since they represent carotenoid breakdown product accumulated partially as glycoconjugates in the berry skins.<sup>15,51,52</sup>

As bottle aging proceeds, aroma compounds are subjected to oxidative and hydrolytic reactions affecting their concentrations during storage. VinG exhibits a time-dependent decrease converting presumably to 4-(ethoxyethyl)guaiacol,<sup>53</sup> and similar kinetics apply for  $\beta$ -dama, regardless to pH of the wine, but triggered by the presence of  $SO_2$ .<sup>54</sup> The decrease rate of LinOH and acetate esters is governed by acid content of the wine, since reactions of LinOH to furan linalooloxides and  $\alpha$ -terpineol as well as acetate ester cleavage are suggested to be acid-catalyzed.<sup>55,56,57</sup> Formation of TDN and VS is reported to be accelerated by low pH and high temperatures,<sup>36,40</sup> enhancing rearrangement and cleavage from their glycosidically bound precursors.<sup>35</sup> Thus, elevated levels were expected in low pH press fractions despite their lower

content of bound precursors. However, with ongoing aging concentrations of other press fractions will approximate these ranges.

The presented results illuminated the impact of mechanical stress for the extraction of varietal flavors during pressing of grapes. In order to produce high quality wines, preferring fractions yielded at low pressure seems to be beneficial. However, the crucial influence of acid content of wines rendering low pH wines to depletion of fruity aroma compounds with a simultaneous increase of undesired substances should be taken into consideration for wine making.

## Yeast modulation

### Nutritional status

Enhancing nutritional status of grape juice by supplementation with nutrients diminished formation of bound TDN and VS (Figure 3). Bound TDN concentrations decreased by 34% in 2016 and 26% in 2017, while VS concentrations were lowered by 19% (2016) and

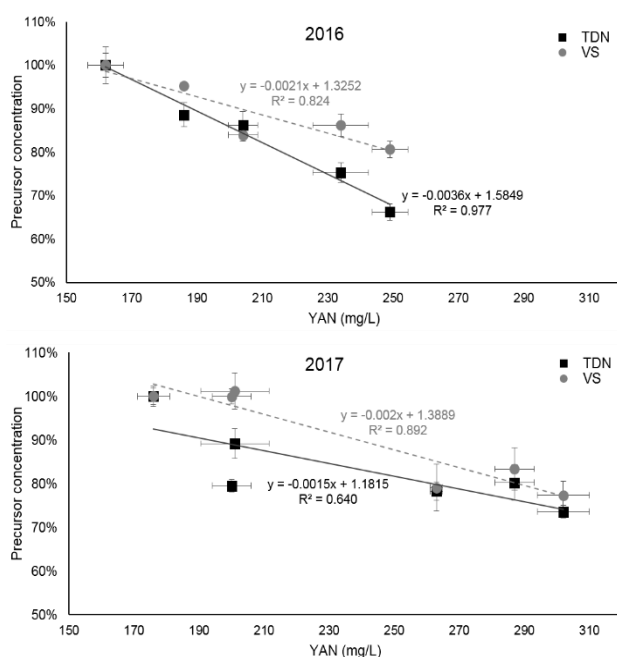


Figure 6: Correlation between yeast assimilable nitrogen (NOPA +  $\text{NH}_4$ ), bound TDN (■) and bound VS (●) in wines obtained in vintages 2016 (top) and 2017 (bottom). Data represent mean values of  $n = 2$ .

23% (2017), comparing the maximum supplemented wine with the untreated control. For both vintages, a negative correlation could be established between bound TDN and the sum of quantified levels of ammonium and NOPA (yeast assimilable nitrogen, YAN), resulting in  $R^2 = 0.89$  (2017: 0.61) for bound TDN and  $R^2 = 0.91$  (2017: 0.93) for bound VS. In 2016, the decrease of TDN and VS precursors runs parallel with increasing supplementation, while in 2017, no further decrease of precursors could be observed at the two maximum supplemented wines. This could not be observed in 2016, presumably due to lower nutritional status of the untreated grape juice.

The grape juice concentrations of NOPA, ammonium ( $\text{NH}_4$ ) and added amounts of vitamin  $\text{B}_1$  are displayed in Table 3. Changing the nutritional status did not only affect bound precursor compounds, but also free volatiles. Comparing the maximum supplemented variant with the untreated wine, levels of VinG, 2-PhEtOH and 3-MeBuOH were diminished by 72%, 24% and 32% in average of both vintages.

Table 3: Nutritional Data of Grape Juice (NOPA, NH<sub>4</sub>, added Vitamin B<sub>1</sub>), pH, Bound TDN/VS and Free Volatiles of Wines Obtained from Grape Juice with Variation in Nutritional Status.<sup>a</sup>

	2016					2017					Odor threshold	Significance		
	control (CON)	DAP vit. B1 (DV)	Y autol. (YA)	DAP vit. B1 Y autol. (DVA)	DAP vit. B1 Y autol. Y hulls (DVAH)	control (CON)	Y hulls (YH)	Y autol. (YA)	DAP vit. B1 Y hulls (DVH)	DAP vit. B1 Y autol. Y hulls (DVA)			DAP vit. B1 Y autol. Y hulls (DVAH)	
NOPA	(mg/L)	132	140	145	152	166	150	165	162	176	211	216		
NH <sub>4</sub>	(mg/L)	30	64	41	82	83	26	35	39	87	76	86		
sum (YAN)	(mg/L)	162	204	186	234	249	176	200	201	263	287	292		
added vitamin B <sub>1</sub>	(µg/L)	-	350	-	350	350	-	-	-	350	350	350		
pH		3.08	3.05	3.03	3.02	3.04	3.21	3.21	3.17	3.20	3.12	3.15		**
TDN bound	(µg/L)	90.4 a	77.9 b	80.1 b	68.1 c	59.8 d	104.0 a	92.8 b	82.8 c	81.4 c	83.5 bc	76.6 c		**
VS bound	(µg/L)	116.9 a	98.1 b	111.4 a	100.8 b	94.3 b	153.7 a	155.6 a	153.7 a	121.6 b	128.2 b	118.9 b		
TDN free	(µg/L)	2.3 b	3.2 a	2.2 b	2.6 b	3.5 a	4.2 a	3.2 b	3.8 ab	3.9 ab	3.4 b	3.9 ab	2 <sup>b</sup>	*
VS free	(µg/L)	8.5 a	8.7 a	7.3 a	10.1 a	9.3 a	11.3 a	9.4 a	10.9 a	9.8 a	8.4 a	10.8 a	101 <sup>b</sup>	ns
β-Dama	(µg/L)	1.5 ab	1.7 a	1.6 ab	1.2 c	1.5 b	2.2 a	2.5 a	2.6 a	2.7 a	2.6 a	1.8 a	0.05 <sup>c</sup>	ns
VinG	(µg/L)	28.9 a	14.0 b	7.0 c	5.2 c	6.5 c	21.5 a	10.3 b	8.5 c	6.5 d	8.6 c	7.1 cd	40 <sup>c</sup>	***
LinOH	(µg/L)	96.8 b	97.2 b	103.4 b	118.1 a	119.9 a	91.4 d	98.8 cd	101.4 bc	102.1 bc	109.0 ab	115.3 a	25 <sup>c</sup>	***
2-PhEtOH	(mg/L)	12.5 a	9.6 b	9.5 b	9.5 b	8.2 c	9.6 a	9.2 ab	8.7 bc	8.5 c	7.7 d	8.4 c	14 <sup>c</sup>	**
3-MeBuOH	(mg/L)	220.7 a	166.7 bc	205.8 a	170.9 b	147.0 c	153.8 a	126.8 b	122.7 b	128.5 b	126.9 b	105.8 c	30 <sup>c</sup>	**
HexOH	(mg/L)	2.1 ab	2.1 ab	2.2 a	1.9 b	1.9 b	2.9 a	3.1 a	3.1 a	2.9 a	3.0 a	3.0 a	8 <sup>c</sup>	ns
EtAc	(mg/L)	84.0 a	81.4 a	70.9 b	52.9 c	41.1 d	113.9 ab	125.4 a	124.5 ab	109.4 b	122.6 ab	119.0 ab	12 <sup>c</sup>	*
EtBu	(µg/L)	247.1 d	310.9 c	305.0 c	353.7 b	423.5 a	427.9 d	487.2 c	538.8 bc	501.1 c	575.9 b	647.8 a	20 <sup>c</sup>	**
EtHex	(mg/L)	1.4 b	1.8 ab	1.9 ab	1.7 ab	2.3 a	1.7 e	2.0 d	2.1 c	2.2 b	2.4 a	2.4 a	0.014 <sup>c</sup>	*
EtOct	(mg/L)	3.1 d	3.9 c	4.5 b	4.0 c	5.2 a	3.4 b	3.8 ab	4.2 a	3.9 ab	4.4 a	4.3 a	0.005 <sup>c</sup>	*
HexAc	(µg/L)	141.6 e	192.8 d	269.5 c	335.3 b	363.2 a	181.1 e	275.8 d	305.3 c	291.0 cd	338.4 b	368.5 a	1800 <sup>c</sup>	***
3-MeBuAc	(mg/L)	1.1 e	1.8 d	2.5 c	3.1 b	3.3 a	1.0 e	1.3 d	1.3 c	1.3 cd	1.5 b	1.5 a	0.16 <sup>c</sup>	***
2-MeBuAc	(µg/L)	82.3 e	116.7 d	135.4 c	155.5 b	166.8 a	58.4 e	95.1 d	104.0 c	103.2 c	114.6 b	122.9 a	1600 <sup>c</sup>	***
2-PhEtAc	(mg/L)	33.2 d	49.0 c	53.6 b	54.1 b	67.6 a	23.9 e	32.1 de	39.0 cd	42.7 bc	49.2 b	60.7 a	2400 <sup>c</sup>	***

<sup>a</sup> Letters Indicate Significant Differences among the Variants within the Individual Vintage. Data Represent Mean Values with n = 2. Significance is Indicated with ns (not significant), \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) and \*\*\* (p<0.001). <sup>b</sup> Ziegler et al.<sup>12</sup> <sup>c</sup> Waterhouse et al.<sup>81</sup>



On the other hand, ethyl esters were increased by 47% (EtOct) up to 61% (EtBu) and acetate esters between 107% (2-MeBuAc) and 130% (HexAc), while free VS,  $\beta$ -dama and HexOH did not significantly altered by maximum supplementation.

Vintages exhibited diverging effects for free TDN and EtAc, increasing TDN concentration by use of nutritional aids by 51% and diminishing EtAc by 51% in 2016, but with only negligible change for both compounds in 2017.

Variational trends between the vintages could also be observed for EtBu, EtHex, EtOct, HexAc and 3-MeBuAc. For these compounds, supplementation resulted in a distinctly higher change in 2016. This supports the observations for bound compounds TDN and VS: Grape juice with an initially higher nutritional status was less affected by supplementation. Thus, an optimum for the yeast nutrition was exceeded in 2017 with no further change in yeast metabolism – unlike the 2016 grape juice representing an undersupplied must regarding yeast metabolism needs.

Observations regarding alcohols, ethyl and acetate esters – except EtAc and HexOH – are in agreement with previous studies for Chardonnay wines,<sup>58,59</sup> suggesting elevated concentrations of these compounds after high nitrogen treatments due to increased yeast fermentation rate. However, other work groups did not observe a significant impact of nitrogen availability for ethyl ester formation.<sup>60,61</sup> As Vilanova et al. conclude the yeast strain used for fermentation has a crucial impact regarding nitrogen consumption. Using a highly nitrogen consuming yeast strain renders the nitrogen availability a key factor for ester production, otherwise precursor concentrations are more likely to affect ester concentration in the final wine.<sup>60</sup> Similar results regarding importance of yeast strain selection to development of single volatile were recently made by Tahim:<sup>62</sup> While 3-MeBuAc concentration was tripled after fermentation with yeast strain “EC1118”, applying “Côte des Blancs” as yeast for alcoholic fermentation raised its level only by 40%. Same observations were made for HexOH, EtHex and other compounds.

VinG is suggested to be also synthesized from ferulic acid present in the must by cinnamate decarboxylase in a non-oxidative environment.<sup>63,64</sup> and its activity is presumably be negatively affected by sugar concentration<sup>65</sup>. Hence an accelerated fermentation due to higher nitrogen supplementation, resulting in higher bio mass,<sup>66</sup> leads to a faster degradation of sugar. This might explain the lower content of VinG in wines obtained from nitrogen supplemented musts. Additionally, levels of VinG decrease with bottle aging<sup>64,67</sup> by the conversion into 4-(ethoxyethyl)-guaiacol,<sup>53</sup> and is thus affected by high acidity levels of the wine, fostering degradation of VinG. Yeast growth was boosted by nitrogen supplementation and it is known, that yeasts emitting  $H^+$  during fermentation,<sup>68</sup> higher supplemented wines exhibited a slightly lower pH compared to the less supplemented wines. This might also trigger liberation of TDN and VS, elevating their concentrations in well supplemented musts despite lower levels of precursors, resulting in a correlation of  $r$  (Pearson) = 0.74 with  $p$  = 0.02.

In conclusion, nitrogen supplementation of must yields lower levels of unwanted C<sub>13</sub>-norisoprenoids and higher alcohols with a simultaneous increase in desired ethyl and acetate esters, though both effects are predominantly occurring for under-nutrient grape juice.

Although the benefits of nitrogen supply for high quality production of wines are known facts for a long time, the impact on bound TDN and VS has not been studied in the past to our knowledge.

### *Acidity*

Increasing the acidity of the grape juice lowers concentrations of both TDN and VS precursors slightly for both vintages (Table 4).

While the variant with an initial pH of 3.4 exhibits the highest precursor concentrations, the resulting concentrations after finished fermentation are lowest for both variants with a pH of 2.8 and 3.0, respectively. Fermentation at pH 3.4 resulted in higher levels of bound VS (+47%) and bound TDN (+8%, not significant) compared to wine fermented at pH 2.8, but did not affect concentrations of 3-MeBuOH and HexOH. Concentrations of free TDN, free VS, and EtAc were diminished by 92%, 94% and 48%, respectively. Most volatile compounds showed differing behavior between the two vintages. While  $\beta$ -dama, LinOH, EtBu, HexAc and 3-MeBuAc were diminished by 50%, 34%, 23%, 20% and 16% in 2016, their concentrations increased in 2017 by 57%, 4%, 35%, 35% and 34%. Similar trends were observed for 2-PhEtOH, EtHex, EtOct, 2-MeBuAc and 2-PhEtAc, remaining almost unchanged due to changes in acidity in 2016, but increasing in 2017 by 92%, 90%, 114%, 89% and 111%, respectively. The opposite was true for VinG with a reduction by 24% in 2017, while concentration increased in 2016 by 113%, comparing the variant with a pH of 3.4 with 2.8.

Correlations could be established between bound TDN and bound VS ( $R^2 = 0.50$ ) and 2-PhEtAc ( $R^2 = 0.98$ ), and between free TDN and free VS,  $\beta$ -dama (both  $R^2 = 0.98$ ), LinOH ( $R^2 = 0.97$ ) and total acidity ( $R^2 = 0.85$ ).

Comparison of volatiles in wines after nine months and recently fermented wines yielded changes for several compounds. Concentration of free TDN tripled for the wine fermented and stored at low pH of 2.8 (11.6  $\mu\text{g/L}$ ) compared to pH 3.4 (3.8  $\mu\text{g/L}$ ), while VS concentrations was similar among the variants.

Changes for 2-PhEtOH, HexOH and EtOct were negligible, the other volatiles were diminished by 20% (EtAc, pH 3.4) up to 94% (2-PhEtAc, pH 2.8). Different acidity levels influenced especially reduction rate of  $\beta$ -dama, LinOH and acetate esters with being highest for wine with lowest pH, depleting acetate ester content by 73% (2-MeBuAc) up to 94% (2-PhEtAc) and LinOH by 83%, while LinOH remained unchanged in wine at pH 3.4.

Table 4: Bound TDN and VS and Free Volatiles of Wines with Different Acidification Levels after Fermentation (young) and after Bottle Aging for 9 Months (aged).<sup>a</sup>

2016										2017				Significance		
		pH 2.8	pH 3.0	pH 3.2	pH 3.4	pH 2.8	pH 3.0	pH 3.2	pH 3.4	Odor threshold	pH	Vintage	Aging			
TDN bound	[µg/L]	83 ab	74.3 b	86.1 ab	93.2 a	98.9 a	95.4 a	99.9 a	103.3 a		*					
VS bound	[µg/L]	103.2 b	115.1 b	134.2 a	142.6 a	101.6 c	113.1 c	127.7 b	158.3 a		***	ns				
TDN free	[µg/L]	0.3 a	0.3 a	nd	nd	0.7 a	0.3 b	0.1 c	nd	2 <sup>b</sup>	***	**	***			
		13.6 a	8.6 b	5.5 c	5.2 c	10.7 a	9.3 b	4.9 c	2.4 d		***	**				
VS free	[µg/L]	7.6 a	4.7 b	0.4 c	0.2 c	6.3 a	3.9 b	1.4 c	0.6 c	101 <sup>b</sup>	***	ns	***			
		25 a	22.7 ab	16.2 bc	16.9 c	18.5 a	18.0 a	12.3 b	7.9 c		**					
β-Dama	[µg/L]	12.7 a	11.8 a	7.0 b	6.3 b	8.7 c	11.7 b	13.8 a	13.6 a	0.05 <sup>c</sup>	*	***	***			
		0.6 d	0.9 c	1.7 b	2.1 a	0.7 c	1.4 b	2.7 a	2.9 a		***	***				
VinG	[µg/L]	24.9 b	28.5 b	33.8 b	53.1 a	21.1 a	15.6 b	15.9 b	16.1 b	40 <sup>c</sup>	***	***	ns			
		32.6 d	35.4 c	40.0 b	54.4 a	25.4 a	19.0 b	18.9 b	19.3 b		***	***				
LinOH	[µg/L]	105.3 a	95.3 a	51.5 c	69.8 b	85.3 a	69.1 b	74.8 b	88.7 a	25 <sup>c</sup>	***	***	***			
		6.2 d	12.1 c	32.7 b	77.1 a	23.6 d	42.6 c	61.4 b	82.5 a		***	***				
2-PhEtOH	[mg/L]	23.4 c	26.9 b	33.9 a	27.5 b	9.3 d	14.3 c	15.7 b	17.9 a	14 <sup>c</sup>	***	***	ns			
		21.4 d	26.2 b	30.0 a	25.8 b	7.9 c	10.4 b	13.2 a	12.7 a		**	***				
3-MeBuOH	[mg/L]	92.2 a	77.8 b	72.2 b	79.2 b	100.3 b	90.9 c	62.1 d	113.3 a	30 <sup>c</sup>	***	ns	***			
		72.3 b	86.0 a	85.3 a	77.1 a	27.6 c	36.1 b	39.7 a	42.0 a		***	***				
HexOH	[µg/L]	1639.2 c	1678.8 c	2001.5 a	1844.8 b	1216.1 b	1374.8 a	1297.1 ab	1212.6 b	8 <sup>c</sup>	**	***	*			
		1534.1	1637.5	1616.3	1524.0	1094.4 a	1145.4 a	1107.9 a	938.1 b		**	***				
EtAc	[mg/L]	79.2 a	50.5 b	43.2 b	42.6 b	79.5 a	68.2 b	48.0 c	40.5 c	12 <sup>c</sup>	***	ns	ns			
		49.4 a	34.4 b	30.5 b	31.8 b	60.8 a	52.6 b	37.0 c	33.5 c		***	***				
EtBu	[µg/L]	321.2 a	265.6 ab	248.5 b	247.5 b	218.3 d	281.0 c	278.7 b	295.5 a	20 <sup>c</sup>	ns	ns	*			
		214.2	201.8	191.3	216.0	123.1 c	151.3 b	156.6 ab	179.2 a		*	***				
EtHex	[µg/L]	743 b	618.2 c	526 c	881.9 a	549.5 d	735.0 c	826.4 b	1042.0 a	14 <sup>c</sup>	***	***	*			
		670.3 a	698.2 b	536.3 c	577.3 b	372.3 d	477.4 c	501.6 b	549.5 a		**	***				
EtOct	[mg/L]	2.0 ab	1.8 b	1.8 b	2.2 a	1.2 d	1.7 c	2.2 b	2.6 a	5 <sup>c</sup>	***	ns	ns			
		2.2	2.0	1.7	1.8	0.9	1.3	1.5	1.6		ns	**				
HexAc	[µg/L]	183.4 a	148.4 b	118.2 c	146.9 b	121.6 b	157.5 a	166.1 a	163.8 a	1800 <sup>c</sup>	*	ns	***			
		6.2 d	16.5 c	34.3 b	88.4 a	32.6 d	55.1 c	86.9 b	114.9 a		***	***				
3-MeBuAc	[µg/L]	2361.2 ab	2072.6 a	1890.6 ab	1985.5 b	1360.3 d	1309.5 c	1473.0 b	1826.2 a	160 <sup>c</sup>	***	***	***			
		210.1 d	392.5 c	715.3 b	1764.5 a	519.8 d	899.9 c	1418.2 b	1991.8 a		***	***				
2-MeBuAc	[µg/L]	156.5 a	147.7 ab	124.4 b	141.9 ab	67 bc	94.6 c	107.0 b	126.4 a	1600 <sup>c</sup>	**	***	***			
		17.9 c	21.7 c	35.8 b	79.4 a	28.0 d	42.8 c	69.3 b	98.1 a		***	***				
2-PhEtAc	[µg/L]	58.3 a	61.4 a	57.6 b	56.1 ab	17.0 d	26.2 c	30.6 b	35.8 a	2400 <sup>c</sup>	***	***	***			
		2.1 d	5.4 c	16.3 b	27.0 a	1.6 d	6.3 c	16.6 b	33.0 a		***	**				

Letters Indicate Significant Differences among the Variants within the Individual Vintage; Data Represent Mean Values with n = 2. Significance is Indicated with ns (not significant), \* (p<0.05), \*\* (p<0.01)

<sup>a</sup> Letters indicate significant differences among the variants within the individual vintage. Data represent mean values with n = 2. Significance is indicated with ns (not significant), \* (p < 0.05), \*\* (p < 0.01) and \*\*\* (p < 0.001). <sup>b</sup> Ziegler et al.<sup>12</sup>, <sup>c</sup> Waterhouse et al.<sup>81</sup>

Acidity levels could be significantly correlated with the differences of free TDN ( $r$  (Pearson) = 0.88\*\*),  $\beta$ -dama (-0.87\*\*), LinOH (-0.83\*), HexAc (-0.75\*), 2-PhEtAc (-0.80\*) with \* expressing  $p < 0.05$  and \*\* expressing  $p < 0.01$ . Free TDN was significantly negative correlated with  $\beta$ -dama, LinOH, EtAc, HexAc, 2-PhEtAc, 3-MeBuAc and 2-MeBuAc with  $R^2$  ranging from 0.60 up to 0.78.

The observations yielded from the experiments of varying acidity levels for alcoholic fermentation supported the outcome of the press fractions experiments, regarding the behavior of wine volatiles subjected to different acidity levels. Thus, lower pH triggers release of TDN and VS, at the same time abating in particular the concentration of acetate esters. Fermenting wine at a very low pH of 2.8 bears the risk of stuck fermentations due to the natural growth and fermentation limit of *Saccharomyces* yeast,<sup>68</sup> potentially resulting in residual sugar. This happened to experimental wines in this study in 2017, with a residual sugar of 12.8 g/L for variant pH 2.8 and 5.9 g/L for variant pH 3.0. Though a pH of 2.8 represents the lower limit of growth, protons are released during fermentation by yeast cells,<sup>68</sup> lowering the pH causing inhibition of fermentation activity. Additionally, increasing alcohol stress with ongoing fermentation, in combination with high acidity levels, might also have affected yeast metabolism.<sup>69</sup> On the other hand, low pH prevents undesired spoilage with other bacterial microorganism since below a pH of 3.0, bacterial growth is merely possible.<sup>66,70</sup>

#### *Fermentation temperature*

In two subsequent vintages, fermentation temperature had a significant impact on bound and free aroma compounds (Table 5).

Raising fermentation temperature from 12 °C to 24 °C increased levels of bound TDN and bound VS to a similar extent in 2016 (47% for TDN, 26% for VS) and 2017 (49% for TDN, 22% for VS). For free C<sub>13</sub>-norisoprenoids, highest fermentation temperature exhibited 30% more TDN, 52% more VS and 184% more  $\beta$ -damascenone in 2016, while in 2017 the effect was even higher (94%, 76% and 481%, respectively). While VS was increased by a warmer fermentation only by 15% in 2016, in 2017 the concentration was doubled in the wine fermented at 24 °C. 2-PhEtOH and 2-PhEtAc exhibited a similar trend with elevated concentration at higher fermentation temperatures to a stronger extent in 2017. While in 2016, no change in levels of 3-MeBuOH could be determined, the concentration was doubled in the wine fermented at the highest temperature. Varying the fermentation temperature had no significant effect on HexOH, EtAc and EtOct.

On the other hand, lower fermentation temperature triggered concentrations of linalool and the other ethyl and acetate esters, however for 3-MeBuAc and 2-MeBuAc this effect could only be observed in 2016. Increment of concentration ranged from 26% for linalool up to 81% for hexyl acetate as average for both vintages.

Table 5: Bound TDN and VS and Free Volatiles of Wines Fermented at Four Different Temperatures after 9 Months of Bottle Aging. <sup>a</sup>

		2016				2017				odor threshold		significance		interaction	
		12 °C	16 °C	20 °C	24 °C	12 °C	16 °C	20 °C	24 °C	threshold		temperature	vintage	temp. *	vintage
		[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]						
TDN bound	[µg/L]	74.0 c	81.6 bc	93.3 b	109.0 a	77.1 b	78.1 b	87.4 b	115.2 a			***	ns	ns	
VS bound	[µg/L]	62.6 b	71.3 a	71.8 a	78.8 a	77.4 b	79.7 b	81.8 b	94.4 a			**	**	ns	
TDN free	[µg/L]	4.8 b	5.1 b	6.1 a	6.2 a	2.9 c	3.3 bc	4.2 b	5.5 a	2 <sup>b</sup>		***	***	ns	
VS free	[µg/L]	15.4 b	15.1 b	17.3 b	23.4 a	13.6 d	16 c	18.5 b	23.9 a	101 <sup>b</sup>		***	ns	ns	
β-Dama	[µg/L]	1.4 b	1.2 b	2.0 b	3.9 a	1.0 b	2.0 b	5.4 a	5.9 a	0.05 <sup>c</sup>		***	***	**	
VinG	[µg/L]	12.4 a	14.2 a	13.3 a	14.3 a	6.9 d	9.0 c	10.5 b	14.4 a	40 <sup>c</sup>		*	**	ns	
LinOH	[µg/L]	103.3 a	83.5 bc	92.3 ab	73.8 c	131.3 a	103.9 c	126.5 bc	110.8 c	25 <sup>c</sup>		**	**	*	
2-PhEtOH	[mg/L]	12.0 c	9.1 d	17.7 b	20.2 a	7.6 d	14.0 c	17.5 b	19.8 a	14 <sup>c</sup>		***	ns	***	
3-MeBuOH	[mg/L]	213.5 a	213.6 a	225.3 a	234.2 a	142.7 c	222.7 c	270.3 b	308.3 a	30 <sup>c</sup>		**	***	ns	
HexOH	[mg/L]	2.3 b	2.7 a	2.3 b	2.3 b	2.1 a	2.0 b	2.0 b	2.0 b	8 <sup>c</sup>		**	***	**	
EtAc	[mg/L]	30.9 a	25.2 a	29.8 a	31.2 a	91.8 a	77.3 a	79.9 a	74.5 a	12 <sup>c</sup>		ns	***	ns	
EtBu	[µg/L]	471.4 b	622.2 a	333.1 c	270.5 d	266.2 ab	274.6 a	236.4 b	199.5 c	20 <sup>c</sup>		***	***	***	
EtHex	[mg/L]	2.7 ab	2.9 a	2.1 bc	1.7 c	1.7 a	1.6 a	1.4 b	1.1 c	0.014 <sup>c</sup>		**	***	ns	
EtOct	[mg/L]	4.5 ab	5.1 a	4.3 ab	3.5 b	2.7 a	2.7 a	2.3 a	1.8 a	0.005 <sup>c</sup>		ns	**	ns	
HexAc	[µg/L]	82.7 b	102.7 a	56.7 c	46.6 c	146.5 ab	118.7	92.0 bc	79.3 c	1800 <sup>c</sup>		***	***	ns	
3-MeBuAc	[mg/L]	1.2 a	1.2 a	0.8 b	0.7 b	1.6 c	1.9 ab	2.0 a	1.8 b	0.16 <sup>c</sup>		**	***	ns	
2-MeBuAc	[µg/L]	62.4 a	62.9 a	62.3 a	39.3 a	83.3 c	92.4 ab	97.6 a	88.8 bc	1600 <sup>c</sup>		*	***	ns	
2-PhEtAc	[mg/L]	19.9 b	22.2 b	31.8 a	31.7 a	18.7 c	31.1 b	30.9 b	36.0 a	2400 <sup>c</sup>		***	*	*	

<sup>a</sup> Letters Indicate Significant Differences among the Variants within the Individual Vintage. Data Represent Mean Values with n = 2. Significance is Indicated with ns (not significant), \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) and \*\*\* (p<0.001). <sup>b</sup> Ziegler et al. <sup>12</sup> <sup>c</sup> Waterhouse et al. <sup>81</sup>

In general, total concentration of bound and free aroma compounds were 17% higher in average in wines obtained in 2017. Especially  $\beta$ -damascenone, EtAc, HexAc, 3-MeBuAc and 2-MeBuAc were elevated in 2017, while free TDN, VinG, EtBu, EtHex and EtOct were significantly lower in 2017 wines.

Bound TDN showed positive correlations with bound VS ( $R^2 = 0.77$ ), free TDN ( $R^2 = 0.86$ ),  $\beta$ -damascenone ( $R^2 = 0.83$ ), 4-vinyl guaiacol ( $R^2 = 0.98$ ), linalool ( $R^2 = 0.84$ ) and 2-phenylethyl acetate ( $R^2 = 0.98$ ), while a negative correlation was observed with hexyl acetate ( $R^2 = 0.73$ ). The principal component analysis (PCA) in Figure 4 is limited to the significant attributes of wines obtained from both vintages. We omitted significant taste attributes, since volatiles in general and TDN in particular contribute predominantly to odor perception and only little to gustatory cues. Color assessment was incorporated because of the possible contribution of carotenoids. Overall, different fermentation temperatures caused similar sensory variation within the two vintages.

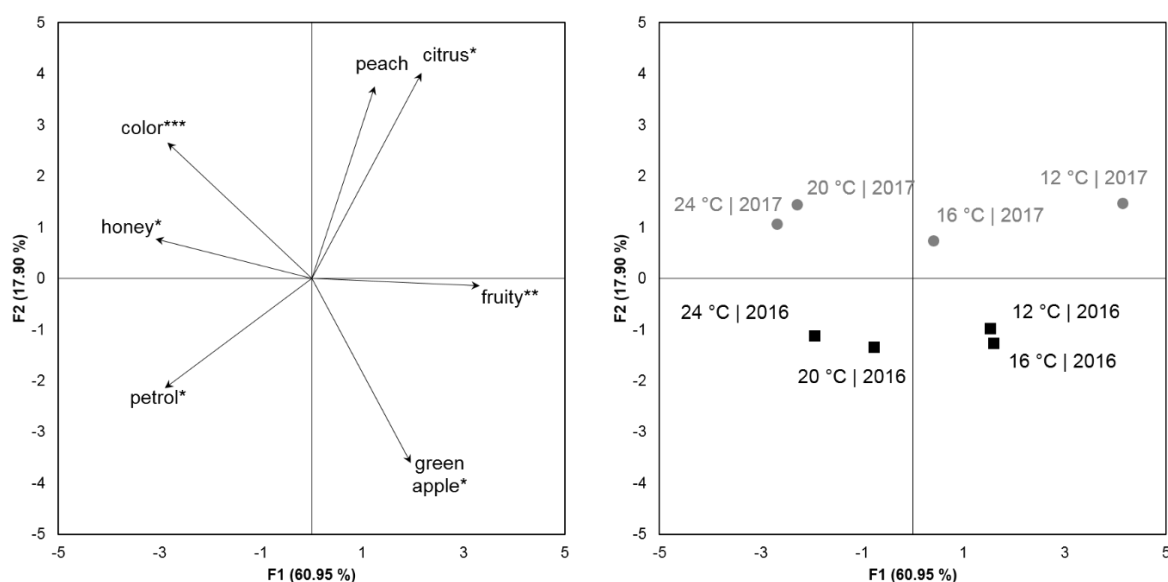


Figure 7: Scores and loadings plot of principal component analysis (PCA) for sensory analysis of wines fermented at different temperatures in vintages 2016 (■) and 2017 (●). Data represent mean values with  $n = 2$ .

Principal component 1, explaining 49% of the variance, separates according to fermentation temperature, rendering cool fermented wines to possess higher ratings for fruitiness, green apple and citrus sensations. On the other hand, warm fermented wines are more colorful and incorporate petrol and honey scents. Incorporating volatiles above odor threshold in the PCA rendered ethyl butanoate and ethyl hexanoate being congruent with green apple sensation ( $R^2 = 0.75$  and  $0.68$ , respectively), while  $\beta$ -dama interrelated with color ( $R^2 = 0.93$ ) and honey ( $R^2 = 0.74$ ), and TDN with petrol scent ( $R^2 = 0.68$ ). On the other side, fruitiness could be negatively correlated with  $\beta$ -dama ( $R^2 = 0.73$ ) and 2-PhEtOH ( $R^2 = 0.81$ ).

Principal component 2 with a variance explanation rate of 35% represents the two vintages, with higher expressions of citrus and peach and a lower level of green apple in wines obtained



in 2017. LinOH could not be linked significantly to peach scent, but citrus sensation was negatively correlated with TDN concentration ( $R^2 = 0.94$ ).

In conclusion, lower fermentation temperature yields higher sensations of fruitiness and fresh scents like apple and peach, and simultaneously higher concentrations of terpenoid and ester compounds and lower levels of C<sub>13</sub>-norisoprenoids. These observations are in agreement with previous studies investigating various white grape varieties<sup>71-74</sup>. Additionally, elevated fermentation temperature could trigger loss of volatile aroma compounds caused by stripping by CO<sub>2</sub> during fermentation<sup>75</sup>, leading to lower final concentrations in the resulting wines.

While the impact of temperature was crucial to the formation of aroma compounds, vintage effect were distinctly lower than expected.<sup>76-78</sup>. Though, to our best knowledge, this is the first study to investigate the effect of fermentation temperature in more than one vintage.

The benefits of low temperature fermentation oppose the struggle of the yeasts at the very beginning and towards end of fermentation resulting in prolonged fermentation time and possibly residual sugar due to stuck fermentation.<sup>68</sup> However, application of yeast strains suitable for low temperatures could solve this problem.<sup>79,80</sup>

#### *Yeast strain*

Application of different yeast strains for alcoholic fermentation yielded significant levels of bound TDN and VS for all three vintages (Table 6). Though, results were alternating among the vintages for the individual strains. Fermentation with yeast 3 yielded the lowest concentrations of bound TDN, highest in 2016, and second highest in 2017. On the other side, TDN concentration in wines fermented with yeast 4 were among the highest in 2015 and 2016, though exhibiting lowest concentration in 2017. Overall results in 2015 and 2016 were quite similar among the strains differing for about 20% in total TDN levels while the lowest bound TDN concentration in 2017 was 56% compared to the highest one. Expanding the experimental strains in 2016 and 2017 seemed to be beneficial since application of yeast 8 yielded moderate bound TDN and VS concentrations in 2016, and lowest in 2017.

Similarly, analysis of volatile compounds yielded diverging trends between vintages 2016 and 2017. Further description and discussion of data is restricted to aroma compounds exhibiting concentrations above sensory thresholds. In average, wines fermented with yeast 1 and yeast 8 provided lowest concentrations of free TDN, while application of yeast 4 yielded highest TDN concentrations. Yeast 5 exhibited highest levels of EtHex and EtOct, while being lowest in  $\beta$ -dama. Yeast 8 was characterized by generally low levels of fruity aroma compounds, especially in  $\beta$ -dama, 3-MeBuOH, EtBu and 3-MeBuAc, while yeast 5 exhibited same low  $\beta$ -dama concentration, though representing highest concentrations of EtBu and EtOct.

Table 6: Bound TDN and VS and Volatiles of Wines Fermented with Nine Different Yeast Strains after Storage for 9 Months. <sup>a</sup>

yeast strain	vintage	TDN bound [µg/L]	VS bound [µg/L]	TDN free [µg/L]	VS free [µg/L]	β-Dama [µg/L]	VinG [µg/L]	LinOH [µg/L]	PhEtOH [mg/L]	2- MeBuOH [mg/L]	HexOH [mg/L]	EtAc [mg/L]	EtBu [µg/L]	EtHex [mg/L]	EtOct [mg/L]	HexAc [µg/L]	3- MeBuAc [mg/L]	2- MeBuAc [µg/L]	2- PhEtAc [µg/L]
yeast 1	2015	126 b	143 bc	5.8 d	12.4 b	1.0 b	35.1 b	75.8 bcd	23.9 b	122 ab	2.2 bc	28.5 e	353 b	1.7 ab	2.8 ab	285 cd	1.6 cde	45.1 g	35.6 f
yeast 2		124 b	131 c	6.1 cd	11.8 b		40.8 a	86.4 ab	11.7 e	79 ef	2.4 bc	81.1 a	310 bcd	1.0 e	1.2 d	190 e	1.6 de	103.6 a	52.9 e
yeast 3		121 b	175 a	6.7 bc	14.0 ab		35.2 b	96.9 a	16.9 d	95 de	2.7 a	35.5 d	415 a	1.5 bc	2.3 c	204 e	1.5 e	57.4 def	81.3 b
yeast 4		147 a	138 bc	7.1 b	14.4 ab		33.1 b	78.4 bc	29.9 a	137 a	2.2 bc	26.9 ef	427 a	1.4 cd	2.1 c	295 b	2.6 a	90.6 b	52.0 e
yeast 5		142 a	150 b	8.3 a	16.0 a		34.1 b	74.2 bcd	19.9 c	98 cd	2.1 bc	27.8 ef	334 bc	1.6 ab	2.8 a	339 a	2.2 b	65.8 d	77.6 bc
yeast 6	2016	107 ab	107 ab	5.8 e	14.4 c	0.7 c	34.4 b	56.0 e	23.3 b	114 bc	2.2 bc	38.7 d	294 cd	1.3 d	2.0 c	242 d	1.8 c	64.9 de	85.9 ab
yeast 7		92 de	91 c	6.8 abc	15.0 bc	1.0 b	34.7 b	67.1 cde	18.7 cd	102 cd	2.2 bc	46.7 c	297 cd	1.5 c	2.0 c	186 e	1.7 cd	54.8 f	66.3 d
yeast 8		87 e	74 d	6.4 cde	16.3 ab	0.7 c	33.4 b	70.3 cd	13.8 e	77 f	2.0 c	58.1 b	281 d	1.5 bc	2.4 bc	242 d	1.5 e	56.4 ef	92.1 a
yeast 9		98 bcde	89 c	7.3 a	16.9 a	1.1 b	40.3 a	63.9 de	29.9 a	138 a	2.0 c	22.6 f	418 a	1.8 a	2.7 ab	280 bc	2.6 a	79.5 c	71.3 cd
yeast 1	2017	80 ef	149 d	3.6 c	10.1 d	2.1 cd	13.4 d	101.7 a	10.3 cd	212 ab	3.0 a	91.2 bc	480 cd	2.1 cd	3.1 cd	375 ab	4.4 c	159.1 b	68.4 b
yeast 2		93 d	107 f	5.4 a	15.8 a	2.8 a	14.2 cd	96.0 ab	7.9 e	167 cd	2.9 a	70.7 d	510 bc	2.3 abc	3.7 ab	342 bc	3.2 ef	159.6 b	51.5 d
yeast 3		114 ab	184 ab	4.9 ab	13.6 b	2.5 ab	11.8 de	94.6 ab	14.4 ab	226 a	2.6 ab	83.4 bcd	628 a	2.2 bcd	3.6 ab	404 a	5.6 a	201.1 a	112.5 a
yeast 4		70 f	161 cd	5.5 a	15.6 a	2.6 ab	16.3 c	92.1 ab	15.1 a	207 ab	2.4 b	71.8 d	659 a	2.2 bcd	3.7 ab	374 ab	4.9 b	182.1 a	105.1 a
yeast 5		88 de	130 e	4.3 bc	12.5 bc	1.9 d	21.8 ab	96.5 ab	7.8 e	169 cd	2.9 a	92.3 b	555 b	2.5 a	4.0 a	321 cd	2.9 f	95.1 d	40.2 e
yeast 6		125 a	198 a	4.3 bc	12.4 bc	2.8 a	10.4 e	87.8 b	13.4 b	211 ab	2.6 ab	78.8 cd	510 bc	2.4 ab	3.6 abc	290 d	3.8 d	133.8 c	70.1 b
yeast 7		109 bc	176 bc	3.9 c	10.6 d	2.3 bc	10.2 e	97.1 ab	10.7 c	189 bc	2.9 a	85.8 bc	426 d	2.0 d	3.0 d	323 cd	3.6 de	133.4 c	61.7 bc
yeast 8		78 ef	150 d	4.3 bc	12.8 bc	1.5 e	19.7 b	91.9 ab	9.2 d	152 d	2.8 ab	81.5 bcd	481 cd	2.3 abc	3.6 ab	341 bc	2.7 f	121.9 c	50.9 d
yeast 9		99 cd	166 cd	4.2 bc	11.7 cd	2.4 b	22.6 a	93.0 ab	10.1 cd	193 bc	2.8 ab	109.2 a	434 d	2.1 cd	3.3 bcd	318 cd	3.8 d	133.4 c	57.4 cd
odor threshold		2 <sup>b</sup>			101 <sup>b</sup>	0.05 <sup>c</sup>	40 <sup>c</sup>	25 <sup>c</sup>	14 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>	8 <sup>c</sup>	12 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>	0.014 <sup>c</sup>	0.005 <sup>c</sup>	1800 <sup>c</sup>	0.16 <sup>c</sup>	1800 <sup>c</sup>	2400 <sup>c</sup>
significance	yeast vintage	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***	*** ***

<sup>a</sup> Data Represent Mean Values with n = 3. Significance is Indicated with ns (not significant), \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) and \*\*\* (p<0.001). <sup>b</sup> Ziegler et al.<sup>12</sup>, <sup>c</sup> Waterhouse et al.<sup>81</sup>

Significant correlations could be established between several volatile compounds. Free TDN correlated significantly with all other volatiles except 2-PhEtAc, either positive with VS ( $r = 0.72$ ), VinG (0.83), 2-PhEtOH (0.70), or negative with  $\beta$ -dama (-0.67), LinOH (-0.72), 3-MeBuOH (-0.77) and ethyl and acetate esters ( $r = -0.56$  up to -0.80) with  $p < 0.01$  except for EtBu ( $p = 0.017$ ). All ethyl esters were significantly ( $p < 0.05$ ) correlated with  $\beta$ -dama ( $r = 0.60 - 0.80$ ), LinOH ( $r = 0.56 - 0.72$ ), 3-MeBuOH ( $r = 0.62 - 0.84$ ), 3-MeBuAc ( $r = 0.60 - 0.85$ ) and 2-MeBuAc ( $r = 0.62 - 0.82$ ), and negatively with VinG ( $r = -0.71 - -0.83$ ).

In a PCA of all significant aroma compounds in the yielded wines, the horizontal PC explained 62% of the variation, representing variation between vintages, and was defined by elevated TDN and VinG concentrations in 2016, and higher concentrations of esters and  $\beta$ -dama in 2017 (Figure 5). Discrimination among yeast strains yielded 13% of the remaining variation, predominantly governed by differing levels of VS, LinOH and acetate esters. Though most of the yeasts resembled among each other, yeast 2 revealed higher levels of  $\beta$ -dama, VinG, EtAc and 2-MeBuAc, and lower concentrations of other ethyl esters, resulting in a separation from the other yeasts. The same was true for yeasts 3 and 4 in 2017, mainly driven by higher levels of acetate esters, 2-PhEtOH and 3-MeBuOH.

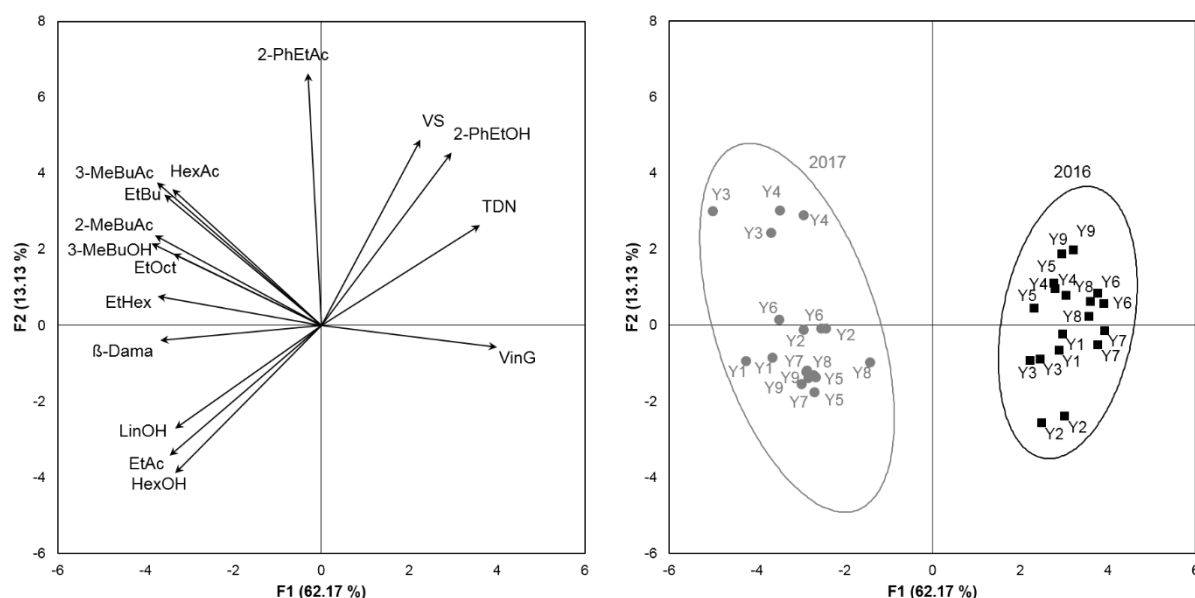


Figure 8: Scores and loadings plot of principal component analysis (PCA) for free volatiles of wines fermented with nine yeast strains in 2016 (■) and 2017 (●). Data represent mean values with  $n = 2$ .

Numerous aroma precursors are generated in grape berries during growing season rendering vintage effects to be the main driver for differences of volatile levels. Like other  $C_6$  alcohols, HexOH is formed by enzymatic oxidation of fatty acids in grape berries induced by damage of plant tissue.<sup>81</sup> Thus, seasonal differences in vine metabolism have a direct impact on HexOH, as was revealed earlier and confirmed in this study.<sup>82</sup> Differing weather conditions, for example water stress and sun-light exposure of the grapes, among vintages affect plant metabolism promoting formation of carotenoids, hydroxycinnamic acids and terpenes.<sup>9,11,14,83</sup> Since these

are progenitors for bound TDN, bound VS,  $\beta$ -dama, VinG and LinOH, varying concentrations among vintages determined in this study were to be expected. Most important, nitrogen supply has a decisive impact on formation of aroma compounds in wine, as yeast growth, viability and metabolism is affected by the nutritional status of the must.<sup>32,81,84,85</sup> This affects formation of ethyl esters from acetyl-CoA and fatty acids by acyltransferases as well as acetate ester synthesis from acetyl-CoA and higher alcohols by acetyltransferase enzymes.<sup>86,87</sup> The grape juices used in this study exhibited levels of NOPA and  $\text{NH}_4$  of 94 mg/L (2015), 117 mg/L (2016) and 174 mg/L in 2017. Thus, the differences found among the vintages, especially in ester concentrations, might be rationalized by an increased yeast metabolism rate due to higher nitrogen supply of the grape juice.

The warmest and sun-richest of the three vintages was 2017 with a growing degree days (GDD) number of 1643 compared to 2015 with GDD = 1591 and 2016 with 1467 GDD.<sup>88</sup> This would suggest to yield highest levels of bound TDN and VS in 2017. While this applies for bound VS, for TDN the opposite is true, with mean values being lowest in 2017, followed by 2016, and 2015 with the highest concentrations of bound TDN. This corresponds find the findings of the previous section on the impact of nutritional status on the formation of bound TDN in wines. Additionally, different yeast strains exhibit varying transformation activity on the same starting material. One of the key progenitors of TDN is assumed to be 3,6-dihydroxy- $\alpha$ -ionone,<sup>34,89</sup> being converted by yeast-related enzyme activity either to follow the TDN pathway, the VS pathway or the pathway leading to actinidol, resulting in bound TDN, bound VS or bound actinidol being present in the must, and subsequently released by re-arrangement and acid-hydrolysis into their free forms.<sup>35,90</sup> Apparently different yeast strains exhibit different behavior in the expression of the still unknown enzymes responsible for these reaction. However, their activity might be influenced to a certain level by nitrogen supplementation, as it also the case for decarboxylase enzymes resulting in diminished levels of 2-PhEtOH or *de novo* linalool synthesis in yeasts, increasing with elevated nitrogen levels.<sup>82,91,92</sup>

Besides the generally enhanced yeast metabolism due to nitrogen supply, varying behavior in formation of aroma compounds has been intensively studied, regarding ethyl esters,<sup>93</sup> acetate esters,<sup>86</sup> alcohols,<sup>94</sup> terpenes<sup>95,96</sup> or norisoprenoids.<sup>97</sup> While trends for a yeast-related enhanced or diminished formation of a group of certain aroma compounds, for example ethyl esters, can be established within an individual vintage, the opposite might be true for the subsequent vintage with different grape juice composition affecting yeast metabolism. Besides the possibility of must supplementation by fermentation aid products, application of *non-Saccharomyces* strains, hybrid yeasts or genetically modified yeasts is suggested to be beneficial to wine quality.<sup>98-100</sup> However, these recent studies on Riesling wine did not incorporate the impact of applied practices on levels of TDN. Thus, further studies for the elucidation of yeast-related mechanisms in the formation or prevention of TDN seem to be

necessary. To conclude the results yielded in this study regarding formation of bound TDN, yeasts 1-3 seem to be better suited for low nutritional status of the grape juice, while yeast 4 and 8 should be preferred at higher nitrogen levels.

## Wine processing

### Filtration

Subjecting wines obtained from acidity experimental series of vintage 2017 to filtration yielded distinct differences among acidity levels and between filtered and non-filtered wines (Figure 6). PC1 explained 48% of the variation, primarily caused by acidity level, resulting in a gain of TDN, VS and HexOH and a simultaneous degradation of VinG, LinOH, ethyl and acetate esters. The second principal component separates filtered from non-filtered wines. While for TDN, VS,  $\beta$ -dama, ethyl esters and HexAc this effect gets smaller with increasing pH, the ratio between filtered and non-filtered wines remains unchanged for alcoholic compounds and other acetate esters. Levels of TDN amount 64% higher at pH 2.8 for non-filtered wine, while at pH 3.4, the non-filtered variant contains only 11% more TDN, compared to wine subjected to filtration. The same applies for VS (42% and 15%, respectively) and  $\beta$ -dama (25% and 10%). For esters, impact of low pH increases with increasing chain length. While EtAc concentration ranges 25% higher in the non-filtered wine at lowest pH and 7% lower at highest pH, EtOct is increased by 55% at pH 2.8 and decreased by 5% at pH 3.4; the same is true for HexAc (74% and 43%). These observations are reflected by the displayed similarity of experimental wines with pH 3.4, either filtered or not, in the principal component analysis, as well as the decreasing differences between the replications with decreasing acidity.

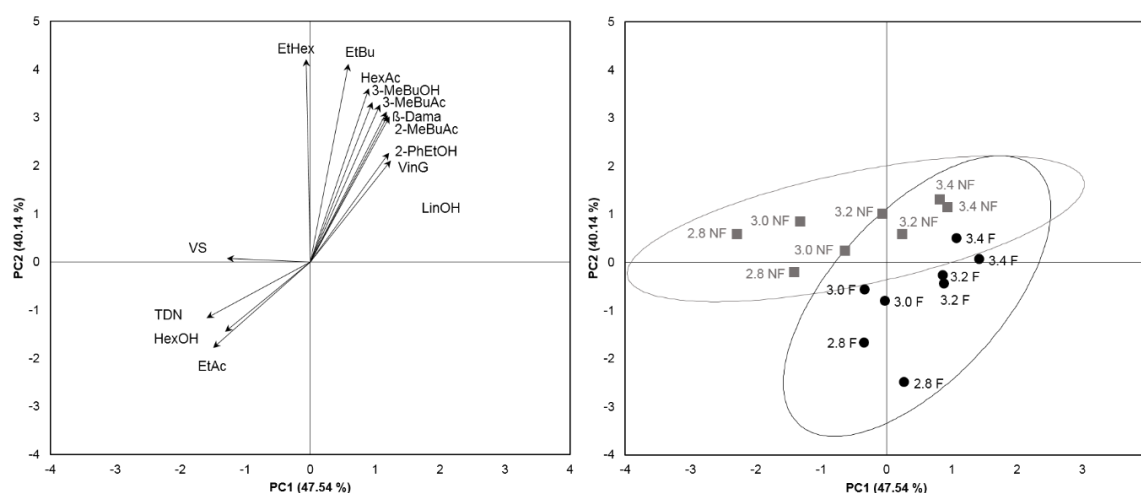


Figure 9: Scores and loadings plot of principal component analysis (PCA) for free volatiles of wines with different pH with (●) or without (■) filtration before bottling after storage of nine months. Data represent mean values with  $n = 2$ .

As being investigated by other work groups, filtration itself is primarily applied to remove turbidity and undesired microorganisms to prevent spoilage or to improve stability due to the

removal of colloidal proteins.<sup>101,102</sup> At the same time, filtered wine may be negatively affected by removal of colloids e.g. polyphenols in red wine,<sup>103</sup> or unwanted reduction of aroma intensity of white wines subjected to ultra-filtration.<sup>104</sup> While ultra-filtration is conducted represents an intense level, filtration with membranes similar to the ones used in this study were reported to remain wines almost unchanged in terms of aromatic profile and volatile concentrations.<sup>105,106</sup> However, filtered wines exhibit lower acidity levels due to the removal of tartrate,<sup>101</sup> governing degradation and formation reactions as observed in the present study. Thus, wine filtration may not have an immediate impact on the volatile composition, though evolving during bottle aging is predicted. Albeit the majority of sedimented yeast is removed by racking, residues of yeast, proteins, polysaccharides and other colloids may form fine lees during bottle aging, resulting in yeast autolysis.<sup>107,108</sup> This complex mixture is capable of sorption of volatile phenols,<sup>109</sup> but also releases lipids, i.e. fatty acids into the wine, leading to increased contents of ethyl esters due to esterification during bottle aging.<sup>110,111</sup> This could explain the increased content of esters for the non-filtered wines, resulting from a prolonged contact with fine lees. Additionally, filtration might result in a decrease of glycosidically bound compounds,<sup>112</sup> reducing the potential of formation for components like TDN, VS and LinOH being released from glycosidic precursors over time.<sup>113</sup> Thus, filtration of wines might have a detrimental impact on wine stability,<sup>103</sup> and reduces concentrations of fruity esters in the resulting wine, however formation of potentially undesired compounds like TDN is diminished by de-acidification of the wine and reduction of the precursor compounds. Albeit differences between filtered and non-filtered wines fade with increasing pH, wines are more threatened by microbial spoilage at higher pH, rendering a filtration step more expedient than low pH wines.

### *Storage parameters*

Storage of wines for five months at three different temperatures, with cork or screw caps as closure types, stored in horizontal or vertical position, and with or without N<sub>2</sub> as protective gas yielded volatile concentrations in Table 7. Throughout all treatments, storage at 5 °C remained volatiles almost unchanged, except TDN and VS, with an average increase by 50% for VS and 95% for TDN after a storage duration of 5 months. Concentration of free TDN amounted in average 1.2 µg/L, being still distinctly below the odor threshold of 2.3 µg/L. However, increments of TDN concentrations at lowest temperature were predominantly observed for storage in screw cap bottles. Raising storage temperature to 16 °C and 25 °C yielded a further increase of TDN, resulting in a 6-fold (16 °C) and 15-fold (25 °C) TDN concentration compared to the concentration on the initial wine. VS exhibited the same pattern, although at a lower extent, whilst storage at higher temperature did not affect levels of alcohols and ethyl esters. For β-dama, VinG, LinOH and acetate esters, higher storage temperatures resulted in a decline of aroma compounds, ranging between 23% for VinG at 16 °C and 52% for LinOH at 25 °C.



Table 7: Free Volatiles of Wines Stored for Five Months Applying Different Storage Conditions. <sup>a</sup>

Initial wine																	
	TDN (µg/L)	VS (µg/L)	β-Dama (µg/L)	VinG (µg/L)	LinOH (µg/L)	PhEtOH (mg/L)	2- MeBuOH (mg/L)	HexOH (mg/L)	EtAc (mg/L)	EtBu (µg/L)	EtHex (mg/L)	EtOct (mg/L)	HexAc (µg/L)	3- MeBuAc (mg/L)	2- MeBuAc (µg/L)	2-PHEtAc (µg/L)	
	0.4	1.8	2.2	14.1	91.4	13.5	194.3	1.2	62.9	254.7	1.4	2.8	67.8	2.1	99.9	56.7	
N <sub>2</sub>	5 °C	0.5 e	3.2 e	2.0 ab	81.9 b	13.3	198.1	1.2 ab	60.2 c	242.8	1.4 b	3.3 a	70.4 ab	2.0 a	97.9 a	56.2 a	
	16 °C	2.9 c	12.6 b	1.7 b	11.0 bc	13.1	189.7	1.2 ab	73.1 a	252.8	1.5 ab	3.2 a	50.3 c	1.6 b	75.8 b	44.3 b	
	25 °C	6.1 a	21.4 a	1.6 b	10.0 c	13.0	195.1	1.3 a	75.8 a	257.1	1.5 ab	3.2 a	38.7 d	1.3 c	61.4 c	32.3 b	
	5 °C	1.5 d	1.5 f	2.3 a	13.2 ab	13.3	183.9	1.1 b	60.5 c	258.1	1.4 b	2.6 c	70.8 ab	2.2 a	104.4 a	57.1 a	
	16 °C	1.5 d	6.0 cd	1.5 bc	10.5 c	12.8	188.2	1.2 ab	71.0 ab	243.2	1.4 b	3.2 a	50.7 c	1.5 b	74.9 b	42.8 b	
	25 °C	3.9 b	12.8 b	1.4 bc	12.7 ab	13.4	196.9	1.2 ab	69.0 ab	247.4	1.5 ab	3.2 a	38.1 d	1.2 c	62.2 c	33.1 b	
cork	5 °C	0.4 e	2.2 f	1.9 ab	15.1 a	13.4	188.8	1.2 ab	66.2 bc	244.0	1.4 b	3.4 a	72.8 a	2.1 a	99.1 a	56.3 a	
	16 °C	2.9 c	13.0 b	1.9 ab	10.5 c	12.8	190.2	1.2 ab	74.1 a	262.1	1.6 a	3.1 ab	52.0 c	1.6 b	83.4 b	40.0 b	
	25 °C	6.8 a	25.1 a	2.0 ab	10.8 bc	12.9	196.2	1.3 a	73.2 a	260.9	1.5 ab	3.0 ab	39.4 d	1.3 c	71.5 bc	33.0 b	
	5 °C	1.2 d	4.5 d	2.1 a	14.7 a	13.5	195.1	1.2 ab	62.1 c	253.5	1.4 b	2.8 bc	70.2 ab	2.1 a	99.6 a	55.4 a	
	16 °C	1.2 d	8.2 c	1.2 c	11.2 bc	12.8	186.5	1.2 ab	67.0 bc	234.6	1.4 b	3.4 a	49.8 c	1.5 b	68.9 bc	41.5 b	
	25 °C	4.1 b	14.0 b	1.5 bc	11.1 bc	13.1	186.2	1.2 ab	68.1 bc	244.0	1.4 b	3.1 ab	37.9 d	1.2 c	65.1 bc	33.8 b	
screw cap	5 °C	0.5 e	2.8 g	1.8 bc	15.0 a	13.9 a	194.5 ab	1.2 b	62.6 cd	232.5 b	1.4 b	3.5 a	72.8 a	2.0 b	92.0 b	57.7 a	
	16 °C	2.4 e	9.2 e	1.7 cd	10.8 c	12.9 b	186.8 b	1.2 b	63.7 cd	247.2 ab	1.5 a	3.4 a	50.7 b	1.5 c	70.2 d	44.4 b	
	25 °C	9.0 a	37.5 a	2.4 ab	11.2 c	13.0 b	202.3 a	1.3 ab	78.5 a	262.8 a	1.5 a	2.4 c	40.2 c	1.3 d	65.9 e	32.0 c	
	5 °C	2.3 e	5.9 f	2.6 a	12.8 b	13.8 a	194.4 ab	1.2 b	64.0 bcd	270.2 a	1.4 b	2.4 c	72.2 a	2.3 a	108.4 a	58.7 a	
	16 °C	3.5 d	15.1 d	2.0 b	11.2 c	13.5 ab	195 ab	1.2 ab	70.5 b	265.0 a	1.5 a	2.8 ab	52.3 b	1.7 c	79.4 cd	41.9 b	
	25 °C	5.1 c	25.5 c	1.6 d	10.1 d	13.1 ab	196.2 ab	1.3 a	68.8 b	255.8 ab	1.5 a	3.0 ab	40.7 c	1.3 d	66.3 de	35.1 c	
odor threshold ANOVA	5 °C	0.5 e	2.7 g	1.8 bc	12.9 b	13.3 ab	193.1 ab	1.2 ab	56.8 d	233.9 b	1.4 b	3.4 a	71.1 a	2.0 b	89.4 bc	59.0 a	
	16 °C	2.3 e	8.6 e	1.5 d	11.3 c	13.1 b	190.8 ab	1.2 b	72.7 ab	239.9 b	1.5 ab	3.4 a	50.8 b	1.5 cd	70.6 d	43.5 b	
	25 °C	7.9 b	30.0 b	2.1 b	10.4 d	13.4 ab	193.9 ab	1.2 b	70.1 b	259.6 ab	1.5 ab	2.8 ab	40.2 c	1.3 d	68.8 de	32.6 c	
	5 °C	2.0 e	13.5 d	2.6 a	14.2 ab	13.5 ab	193.5 ab	1.2 b	63.8 bcd	265.9 a	1.4 b	2.6 b	72.3 a	2.2 a	105.4 a	55.2 a	
	16 °C	3.5 d	25.3 c	1.9 bc	10.1 d	13.7 ab	201.4 a	1.3 a	68.8 b	266.5 a	1.5 ab	2.6 b	52.5 b	1.6 c	83.7 c	44.7 b	
	25 °C	4.7 c	33.9 ab	1.6 cd	11.6 bc	13.3 ab	187.6 b	1.2 ab	67.8 bc	239.7 b	1.5 ab	3.2 ab	40.8 c	1.3 d	65.7 e	34.2 c	
df	2 <sup>b</sup>	101 <sup>b</sup>	0.05 <sup>c</sup>	40 <sup>c</sup>	25 <sup>c</sup>	14 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>	8 <sup>c</sup>	12 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>	0.014 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>	1800 <sup>c</sup>	0.16 <sup>c</sup>	1600 <sup>c</sup>	2400 <sup>c</sup>	
temperature	2	425.5 / ***	27.9 / ***	37.7 / ***	1468.6 / ***	5.2 / **	0.9 / ns	3.9 / *	16.5 / ***	0.6 / ns	38.1 / ***	3.1 / ns	2721.9 / ***	1295.8 / ***	263.6 / ***	694.2 / ***	
closure type	1	40.8 / ***	21.2 / ***	0.3 / ns	12.9 / **	4.5 / *	2.3 / ns	4.5 / *	0.5 / ns	1.6 / ns	4.4 / *	6.2 / *	13.3 / **	2.2 / ns	0.1 / ns	4.5 / *	
position	1	22.8 / ***	5.2 / *	0.1 / ns	50.1 / ***	1.50 / ns	0.4 / ns	5.4 / *	2.2 / ns	2.4 / ns	3.0 / ns	21.3 / ***	0.1 / ns	11.2 / **	6.63 / *	0.1 / ns	
headspace	1	1.2 / ns	1.3 / ns	0.1 / ns	0.5 / ns	0.1 / ns	0.6 / ns	0.9 / ns	0.2 / ns	1.0 / ns	1.2 / ns	0.7 / ns	0.2 / ns	0.3 / ns	0.7 / ns	1.1 / ns	
replication	2	0.1 / ns	0.2 / ns	0.2 / ns	0.5 / ns	0.5 / ns	0.4 / ns	0.7 / ns	0.8 / ns	0.2 / ns	0.1 / ns	0.2 / ns	0.2 / ns	0.7 / ns	0.5 / ns	3.7 / *	

<sup>a</sup> h = horizontal, v = vertical, N<sub>2</sub> = nitrogen, O<sub>2</sub> = air, 5/16/25 °C = Storage Temperature. Letters Represent Significant Differences among the Individual Groups. Data Represent Mean Values with n = 3. <sup>b</sup> Ziegler et al. <sup>12, c</sup> Waterhouse et al. <sup>81</sup>

Enabling a nitrogen saturated headspace in the bottle did not affect any of the investigated volatiles at none of the storage temperatures. Bottle orientation had a significant impact on 7 out of 16 volatiles, resulting in lower concentration of TDN, VS, LinOH, 3-MeBuAc and 2-MeBuAc in wines horizontally stored at lowest temperature, while EtOct levels were higher in vertically positioned stored at the same temperature of 5 °C. Interestingly, ratio of aroma compounds between horizontal and vertical position changed with increasing temperature. While the concentration ration between horizontal and vertical stored wines for TDN was 0.30 for 5 °C, the ratio changed to 1.44 for 16 °C and to 1.67 for 25 °C. Similar trends were observed for VS, LinOH, 3-MeBuAc and 2-MeBuAc, while for EtOct the opposite was true, rendering concentrations being higher in vertical stored wines.

Choice of closure type had a significant impact on 11 out of 16 volatiles, namely norisoprenoids, alcohols and half of the esters. Except for EtOct, concentrations of aroma compounds were higher in bottles with screw caps. Using screw caps as closure yielded only slightly higher concentrations of alcohols and esters, with a ratio of screw cap/corc between 1.01 and 1.05. For C<sub>13</sub>-norisoprenoids ratio increased to 1.19 for β-dama, 1.27 for TDN and 1.28 for VS. Throughout all storage variants, concentrations of TDN were negatively correlated to VinG ( $r = -0.52$ ), LinOH ( $r = -0.75$ ), EtOct ( $r = -0.38$ ) and all acetate esters ( $r = -0.72$ ) with  $p = 0.001$  or below. Highly significant correlations could be established between TDN and VS ( $r = 0.95$ ), HexOH ( $r = 0.40$ ) and the other ethyl esters ( $r = 0.54$  for EtAc,  $r = 0.38$  for EtBu,  $r = 0.60$  for EtHex).

Results of quantitation of aroma compounds were used for the discrimination analysis in Figure 7, limited to those volatiles, which significantly varied due to storage parameters. Principal component 1, explaining 90% of the variance represents the striking impact of storage temperature on wine composition. Both other variables, closure type and bottle orientation sum up for 6% of the remaining variation, while the differences emerge with increasing temperature. The investigated storage parameters had either no or only little effect on aliphatic and aromatic alcohols and two of the ethyl esters. Low impact of bottle aging on alcohols was expected due to the absence of assumed reaction or harsh conditions, as it was reported by other groups.<sup>53,57,114</sup>

Observed changes in ethyl esters and acetate esters, either increasing or decreasing were predominantly caused by the progression towards an equilibrium between esterification and hydrolysis of the ester compounds.<sup>40</sup> Since the equilibrium is temperature-dependent,<sup>115</sup> and setting of the equilibrium is accelerated by higher temperatures, the observed reduction of especially acetate esters can be explained. Additionally, revealed minor differences between closure types may be caused by absorption effects by the use of technical corc as closure. Thus, the present study corroborates the findings of other work groups.<sup>43,44</sup>

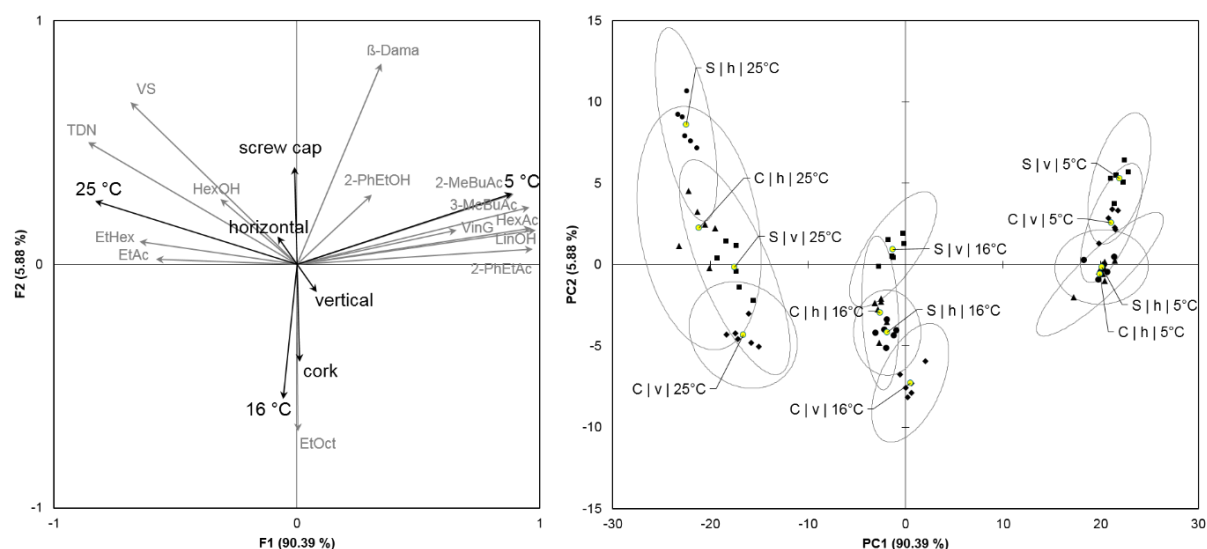


Figure 10: Loadings and scores of discrimination analysis for wines stored for five months varying closure type (C = cork, S = screw cap), bottle orientation (h = horizontal, v = vertical) and temperature (5 °C, 16 °C, 25 °C). Replications of headspace experiments have been integrated to the respective groups. Centroids represent mean values with  $n = 6$  and confidence interval with  $p = 0.9$ .

Replacing the air consisting headspace by nitrogen during bottling surprisingly did not exhibit an effect of any of the investigated volatiles, as it was reported for some compounds sensitive to oxidation, namely LinOH and VinG.<sup>67,116</sup> This might be caused by the initial concentration of dissolved oxygen already present in all of the wines at the beginning of the experiment. Additionally, in the brief storage time, the low amount of consumed oxygen might be delivered by oxygen ingress, as it was revealed for both closure types.<sup>42</sup>

Two of the  $C_{13}$ -norisoprenoids, TDN and VS, derive from multiple, non-volatile precursors present in young wines.<sup>35,117</sup> These precursors form a potential to be released during storage, with the liberation rate being influenced by pH and temperature of the wines, as was repeatedly reported.<sup>36-38,40,43</sup> Thus, the manifold higher concentrations found at 16 °C and 25 °C storage temperature might easily be explained.

Additionally, using synthetic cork as closure type, as in the present study, was reported to decrease norisoprenoid concentration due to absorption, so-called flavor “scalping”.<sup>41</sup> In the present study, the reduction of TDN, VS and β-dama by technical cork sealed bottles amounted 21%, 22% and 16% respectively, compared to screw cap bottles. Black et al. reported a removal of over 50% of the TDN, and Capone discovered an reduction of 70%, both in wines stored for two years in bottles with technical closures.<sup>43,44,</sup>

With progressing depletion of bound TDN and bound VS by release of their free forms during long-term storage, concentrations in bottles sealed with screw caps will further increase, while the concentration in cork sealed bottles will drop in the end, albeit assuming unlimited sorption potential of the cork. Hypothetically, absorbed molecules could migrate through the closure material outside the bottle, regenerating the extraction potential of the sorptive phase. Otherwise, an equilibrium between concentrations in the liquid phase, the gaseous phase and

the solid phase is supposed to emerge<sup>118</sup> without further decrease of C<sub>13</sub>-norisoprenoids due to absorption. The cork surface enables absorption of norisoprenoids, as our findings indicate regarding bottle orientation. Storing bottles in a vertical position prevents direct contact between the liquid phase and the sorption phase minimizing occurrence of a boundary layer impeding absorption.<sup>119</sup> On the other side, sorption of aroma compounds at an upright bottle orientation needs an evaporation of the volatiles into the gaseous phase. Since higher temperatures facilitate volatilization, one would expect higher differences between concentrations in wine with screw caps compared to cork sealed bottles at higher storage temperature. However, the opposite was true in our experiment. Highest ratio between screw cap and cork occurred at 16 °C and lowest at 25 °C. Here, two opposing effects occur: Raising temperature enhances volatilization of analytes, enhancing sorption at 16 °C, compared to storage at 5 °C. On the other hand, increased temperature affects extraction efficiency of the solid phase,<sup>120</sup> thus declining sorption on the cork sealing at highest storage temperature. Our results regarding bottle orientation corroborate the work of Mas et al., suggesting horizontal position to be beneficial to wine quality at temperatures of approximately 15 °C, while Skouroumounis et al. were not able to detect differences between upright and inverted stored wines.<sup>41,121</sup> Thus, further investigations on the physico-chemical interaction between wine and closure material, including long-term storage, seems to be advised.

In conclusion, this study elucidated the impact of several oenological practices on wine composition and sensory properties. Concentration of bound C<sub>13</sub>-norisoprenoids were greatly affected by the applied pressure during grape juice production, resulting in elevated concentrations with increasing mechanical stress. Thus, producing wine with low TDN potential could be established limiting further grape juice processing including fermentation to juice fraction yielded by low pressure. However, if the acidity is not adjusted to moderate levels, liberation of undesired aroma compounds and decrease of favorable fruity esters is fostered by the low pH incorporated in these fractions. Fermentations at low pH seem not be detrimental to wine quality, although bearing the risk of stuck fermentations, just as for fermentation at low temperatures. Though fermentation time is distinctly reduced, increasing fermentation temperature to red wine like temperatures seems not advisable in terms of volatile composition and sensory properties, yielding higher levels of TDN, petrol note and more tainted wines. Enhancing the nutritional status of grape juice in vintages yielding low nitrogen grape juice was proven to be beneficial to both reduction of norisoprenoid precursors and simultaneous increase of favored fruity esters. The response of different yeast strains to vintage related conditions turned out to be striking compared to differences among individual yeast strains, in terms of C<sub>13</sub>-norisoprenoid precursor formation and composition of wine volatiles. While wine filtration was proven to be beneficial to wine composition, the outstanding impact of temperature on wine composition was observed. Additionally, choice of closure type and

storage position were revealed to influence volatile composition to a lower extent. In the end, this work helps winemakers to select appropriate conditions to reduce the occurrence of the petrol off-flavor in Riesling wines and gives advice for the production of high-quality wines.

## Acknowledgments

The authors are thankful to Pascal Wegmann-Herr, Florian Schraut, Michael Wacker and Sandra Klink for their technical support at winemaking and sensory analysis. We are particularly grateful to the late Dr. Hans-Georg Schmarr who inspired us with his knowledge and enthusiasm in the field of flavor chemistry and instrumental analytics.

## Funding

This research project was supported by the German Ministry of Economics and Technology (via AiF) and the Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI, Bonn, Germany) - Project AiF 16680.

## Supporting Information

Figure S1: Fermentation course of wines fermented at different temperatures. Error bars represent standard deviation across two replications in two vintages.

Table S1: Total Acidity, Volatiles and Bound TDN/VS of Riesling Wines Made from Different Press Fractions after 9 Months of Bottle Aging. Letters Indicate Significant Differences among the Experiments within the Individual Vintage. Data Represent Mean Values with  $n = 2$ . Significance is Indicated with ns (not significant), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

Table S2: Free volatiles of Wines Bottle Aged for 9 Months, with or without Filtration prior to Bottling. Letters Indicate Significant Differences among the Experiments within the Individual Vintage. Data Represent Mean Values with  $n = 2$ . Significance is Indicated with ns (not significant), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

## References

- (1) Simpson, R. F., 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene: an important contributor to the bottle aged bouquet of wine. *Chem. Ind.* **1978**, 1, 37.
- (2) Simpson, R. F., Strauss, C.R., Williams, P.J., Vitispirane: a C13-spiro-ether in the aroma volatiles of grape juice, wines and distilled grape spirits. *Chem. Ind.* **1977**, 15, 663-664.
- (3) Simpson, R. F.; Miller, G. C., Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis* **1983**, 22, 51-63.

- (4) Winterhalter, P., 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) formation in wine. 1. Studies on the Hydrolysis of 2,6,10,10-Tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-6-ene-2,8-diol Rationalizing the Origin of TDN and Related C<sub>13</sub> Norisoprenoids in Riesling Wine. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 1825-1829.
- (5) Marais, J.; Versini, G.; van Wyk, C. J.; Rapp, A., Effect of Region on Free and Bound Monoterpene and C<sub>13</sub>-Norisoprenoid Concentrations in Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, 13 (2), 71-7.
- (6) Mendes-Pinto, M. M., Carotenoid breakdown products the-norisoprenoids-in wine aroma. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, 483, 236-245.
- (7) Ferreira, A. C. S.; Guedes de Pinho, P., Analytical Method for Determination of Some Aroma Compounds on White Wines by Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography. *J. Food Sci.* **2003**, 68, 2817-2820.
- (8) Schuettler, A., Friedel, M., Jung, R., Rauhut, D., Darriet, P., Characterizing aromatic typicality of Riesling wines: merging volatile compositional and sensory aspects. *Food Res. Int.* **2015**, 69, 26-37.
- (9) Black, C. A.; Parker, M.; Siebert, T. E.; Capone, D. L.; Francis, I. L., Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2015**, 21, 582-600.
- (10) Schultz, H. R., Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2000**, 6, 2-12.
- (11) van Leeuwen, C.; Darriet, P., The Impact of Climate Change on Viticulture and Wine Quality. *J Wine Econ.* **2016**, 11, 150-167.
- (12) Ziegler, M. G., R.; Bechtloff, P.; Winterhalter, P.; Schmarr, H.-G.; Fischer, U., Impact of matrix variables and expertise of panelists on sensory thresholds of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene known as petrol off-flavor compound in Riesling wines. *Food Qual. Pref.* **2019**, 78, 103735.
- (13) Marais, J.; Wyk, C.; Rapp, A., Effect of Sunlight and Shade on Norisoprenoid Levels in Maturing Weisser Riesling and Chenin blanc Grapes and Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, 13, 23-32.
- (14) Gerdes, S. M.; Winterhalter, P.; Ebeler, S. E. Effect of Sunlight Exposure on Norisoprenoid Formation in White Riesling Grapes. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*; Winterhalter, P., Rouseff, R. L., Eds.; ACS Symposium Series 802, American Chemical Society: Washington, DC, **2001**; 262-272.
- (15) Kwasniewski, M. T.; Vanden Heuvel, J. E.; Pan, B. S.; Sacks, G. L. Timing of Cluster Light Environment Manipulation during Grape Development Affects C<sub>13</sub> Norisoprenoid and Carotenoid Concentrations in Riesling. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 6841-6849.
- (16) Schüttler, A.; Guthier, C.; Stoll, M.; Darriet, P.; Rauhut, D. Impact of grape cluster defoliation, grape must clarification and yeast strain on TDN potential in cool climates wines. *Wine Vitic. J.* **2016**, 31, 51-54.
- (17) Sponholz, W. R.; Hühn, T., Factors influencing the ageing of Riesling wines - Clonal material and used yeast strain. *Vitic. Enol. Sci.* **1997**, 52, 103-108.
- (18) Ziegler, M.; Wegmann-Herr, P.; Schmarr, H.-G.; Gök, R.; Winterhalter, P.; Fischer, U., Impact of Rootstock, Clonal Selection and Berry Size of *Vitis vinifera* sp. Riesling on the Formation of TDN, Vitispiranes and Other Volatile Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, 68, 3834-3849.



- 
- (19) Bindon, K. A.; Dry, P. R.; Loveys, B. R., Influence of Plant Water Status on the Production of C<sub>13</sub>-Norisoprenoid Precursors in *Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Sauvignon Grape Berries. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4493-4500.
- (20) Friedel, M.; Sorrentino, V.; Blank, M.; Schuettler, A., Influence of berry diameter and colour on some determinants of wine composition of *Vitis vinifera* L. cv. Riesling. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2016**, *22*, 215-225.
- (21) Ough, C. S., Substances Extracted during Skin Contact with White Musts. I. General Wine Composition and Quality Changes with Contact Time. *Am. J. Enol. Vitic.* **1969**, *20*, 93-100.
- (22) Gunata, Y. Z.; Bayonove, C. L.; Baumes, R. L.; Cordonnier, R. E., The Aroma of Grapes. Localisation and Evolution of Free and Bound Fractions of Some Grape Aroma Components c.v. Muscat During first Development and Maturation. *J. Sci. Food Agric.* **1985**, *36*, 857-862.
- (23) Cabaroglu, T.; Canbas, A.; Baumes, R.; Bayonove, C.; Lepoutre, J.P.; Günata, Z., Aroma Composition of a White Wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir as Affected by Skin Contact. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 680-683.
- (24) Esti, M.; Tamborra, P., Influence of winemaking techniques on aroma precursors. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 173-179.
- (25) Pedroza, M. A.; Zalacain, A.; Lara, J. F.; Salinas, M. R., Global grape aroma potential and its individual analysis by SBSE–GC–MS. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1003-1008.
- (26) Sokolowsky, M.; Rosenberger, A.; Fischer, U., Sensory impact of skin contact on white wines characterized by descriptive analysis, time–intensity analysis and temporal dominance of sensations analysis. *Food Qual. Pref.* **2015**, *39*, 285-297.
- (27) Jégou, S.; Hoang, D. A.; Salmon, T.; Williams, P.; Oluwa, S.; Vrigneau, C.; Doco, T.; Marchal, R., Effect of grape juice press fractioning on polysaccharide and oligosaccharide compositions of Pinot meunier and Chardonnay Champagne base wines. *Food Chem.* **2017**, *232*, 49-59.
- (28) Zoecklein, B. W.; Hackney, C. H.; Duncan, S. E.; Marcy, J. E., Effect of fermentation, aging and thermal storage on total glycosides, phenol-free glycosides and volatile compounds of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *22*, 100-107.
- (29) Swiegers, J.H.; Bartowsky, E.J.; Henschke, P.A.; Pretorius, I.S., Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 139-173.
- (30) Wüst, M., Wein — Qualität entscheidet sich in Nanogramm: Zur Biochemie des sortentypischen Weinaromas. *Chemie in unserer Zeit* **2003**, *37*, 8-17.
- (31) Berger, S.; Schober, V.; Korntheuer, K.; Fardossi, A., Influence of assimilable nitrogen on the fermentation of musts of the grape cultivars Gruener Veltliner, Rhine Riesling, Italian Riesling and Neuburger. *Mitt. Klosterneuburg* **1999**, *49*, 117-123.
- (32) Bell, S. J.; Henschke, P. A., Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 242-295.
- (33) Fernández-González, M.; Di Stefano, R., Fractionation of glycoside aroma precursors in neutral grapes. Hydrolysis and conversion by *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT--Food Sci. Technol.* **2004**, *37*, 467-473.
- (34) Winterhalter, P.; Gök, R. TDN and  $\beta$ -Damascenone: Two important carotenoid metabolites in wine. In *Carotenoid Cleavage Products*; Winterhalter, P., Ebeler, S. E., Eds.; ACS Symposium Series 1134; American Chemical Society: Washington, DC, 2013; 125–137, <https://doi.org/10.1021/bk-2013-1134.ch011>.
-

- (35) Winterhalter, P.; Sefton, M. A.; Williams, P. J., Volatile C<sub>13</sub>-Norisoprenoid Compounds in Riesling Wine are Generated From Multiple Precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 277-283.
- (36) Versini, G.; Carlin, S.; Dalla Serra, A.; Nicolini, G.; Rapp, A., Formation of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene and Other Norisoprenoids in Wine: Considerations on the Kinetics. *ACS Symposium Series* **2002**, *802*, 285-299.
- (37) Marais, J., Van Wyk, C. J.; Rapp, A., Effect of Storage Time, Temperature and Region on the Levels of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene and Other Volatiles, and on Quality of Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 33-44.
- (38) Silva Ferreira, A. C.; Guedes de Pinho, P., Nor-isoprenoids profile during port wine ageing - influence of some technological parameters. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 169-176.
- (39) Robinson, A. L.; Mueller, M.; Heymann, H.; Ebeler, S. E.; Boss, P. K.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D., Effect of Simulated Shipping Conditions on Sensory Attributes and Volatile Composition of Commercial White and Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, *61*, 337-347.
- (40) Simpson, R. F., Aroma and compositional changes in wine with oxidation, storage and ageing. *Vitis* **1978**, *17*, 274-87.
- (41) Skouroumounis, G. K.; Kwiatkowski, M. J.; Francis, I. L.; Oakey, H.; Capone, D. L.; Duncan, B.; Sefton, M. A.; Waters, E. J., The impact of closure type and storage conditions on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 369-384.
- (42) Lopes, P.; Saucier, C.; Teissedre, P.-L.; Glories, Y., Impact of Storage Position on Oxygen Ingress through Different Closures into Wine Bottles. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6741-6746.
- (43) Black, C.; Francis, L.; Henschke, P.; Capone, D.; Anderson, S.; Day, M.; Holt, H.; Pearson, W.; Herderich, M.; Johnson, D., Aged Riesling and the development of TDN. *Wine Vitic. J.* **2012**, *27*, 20-26.
- (44) Capone, D.; Sefton, M.; Pretorius, I.; Høj, P., Flavour 'scalping' by wine bottle closures - the 'winemaking' continues post vineyard and winery. *Austr. New Zeal. Wine Ind. J.* **2003**, *18*, 16-20.
- (45) Ling, M.-Q.; Xie, H.; Hua, Y.-B.; Cai, J.; Li, S.-Y.; Lan, Y.-B.; Li, R.-N.; Duan, C.-Q.; Shi, Y., Flavor Profile Evolution of Bottle Aged Rosé and White Wines Sealed with Different Closures. *Molecules* **2019**, *24*, 836.
- (46) Silva, M. A.; Jourdes, M.; Darriet, P.; Teissedre, P.-L., Scalping of Light Volatile Sulfur Compounds by Wine Closures. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10952-10956.
- (47) Gök, R., Bechtloff, P., Ziegler, M., Schmarr, H.-G., Fischer, U., Winterhalter, P., Synthesis of Deuterium-Labeled 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and Quantitative Determination of TDN and Isomeric Vitispiranes in Riesling Wines by a Stable Isotope Dilution Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 6414-6422.
- (48) Beuth Verlag GmbH, Sensory analysis - Methodology - general guidance for measuring odour, flavour and taste detection thresholds by a three-alternative forced-choice (3-AFC) procedure. In *ISO 13301:2002(E)*, Beuth Verlag GmbH: Berlin, Germany, **2002**.
- (49) Yokotsuka, K., Effect of Press Design and Pressing Pressures on Grape Juice Components. *J. Ferment. Bioeng.* **1990**, *70*, 15-21.

- 
- (50) Darias-Martín, J.; Díaz-González, D.; Díaz-Romero, C., Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production. *J. Food Eng.* **2004**, *63*, 335-340.
- (51) Marais, J.; Van Wyk, C. J.; Rapp, A. Effect of Sunlight and Shade on Norisoprenoid Levels in Maturing Weisser Riesling and Chenin blanc Grapes and Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 23-32.
- (52) Schultz, H.; Kraml, S.; Werwitzke, U.; Zimmer, T.; Schmid, J. Adaptation and Utilization of Minimal Pruning Systems for Quality Production in Cool Climates. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 185-190.
- (53) Oliveira, J. M.; Oliveira, P.; Baumes, R. L.; Maia, O., Changes in aromatic characteristics of *Loureiro* and *Alvarinho* wines during maturation. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21*, 695-707.
- (54) Daniel, M. A.; Elsey, G. M.; Capone, D. L.; Perkins, M. V.; Sefton, M. A., Fate of Damascenone in wine: The Role of SO<sub>2</sub>. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 8127-8131.
- (55) Loscos, N.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V., Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine aging. *Food Chem.* **2010**, *120*, 205-216.
- (56) Papadopoulou, D.; Roussis, I. G., Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetylcysteine. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, *43*, 1053-1057.
- (57) Pérez-Coello, M. S.; González-Viñas, M. A.; García-Romero, E.; Díaz-Maroto, M. C.; Cabezudo, M. D., Influence of storage temperature on the volatile compounds of young white wines. *Food Contr.* **2003**, *14*, 301-306.
- (58) Miller, A. C.; Wolff, S. R.; Bisson, L. F.; Ebeler, S. E., Yeast Strain and Nitrogen Supplementation: Dynamics of Volatile Ester Production in Chardonnay Juice Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58*, 470-483.
- (59) Torrea, D.; Varela, C.; Ugliano, M.; Ancin-Azpilicueta, C.; Francis, I. L.; Henschke, P. A., Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice—Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1072-1083.
- (60) Saerens, S.; Delvaux, F.; Verstrepen, K.; Van Dijck, P.; Thevelein, J.; Delvaux, F., Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 454-461.
- (61) Vilanova, M.; Siebert, T. E.; Varela, C.; Pretorius, I. S.; Henschke, P. A., Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. *Food Chem.* **2012**, *133*, 124-131.
- (62) Tahim, C. M.; Mansfield, A. K., Yeast Assimilable Nitrogen Optimization for Cool-Climate Riesling. *Am. J. Enol. Vitic.* **2019**, *70*, 127-138.
- (63) Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J.-N.; Lavigne, V., Synthesis of Volatile Phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in Wines. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *62*, 191-202.
- (64) Dugelay, I.; Gunata, Z.; Sapis, J. C.; Baumes, R.; Bayonove, C., Role of Cinnamoyl Esterase Activities from Enzyme Preparations on the Formation of Volatile Phenols during Winemaking. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2092-2096.
- (65) Silva, I.; Campos, F. M.; Hogg, T.; Couto, J. A., Factors influencing the production of volatile phenols by wine lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *145*, 471-475.
-

- (66) Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A., *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications*. Second Edition, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, **2006**.
- (67) Vanbeneden, N.; Saison, D.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R., Decrease of 4-Vinylguaiacol during Beer Aging and Formation of Apocynol and Vanillin in Beer. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11983-11988.
- (68) Bisson, L. F., Stuck and Sluggish Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 107-119.
- (69) Heard, G. M.; Fleet, G. H., The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* **1988**, *65*, 23-28.
- (70) Lonvaud-Funel, A., Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. *FEMS Microbio. Lett.* **1995**, *126*, 209-214.
- (71) Killian, E.; Ough, C., Fermentation esters - formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* **1979**, *30*, 301-305.
- (72) Beltran, G.; Novo, M.; Guillamón, J. M.; Mas, A.; Rozès, N., Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int. J Food Microbiol.* **2008**, *121*, 169-177.
- (73) Deed, R. C.; Fedrizzi, B.; Gardner, R. C., Influence of Fermentation Temperature, Yeast Strain, and Grape Juice on the Aroma Chemistry and Sensory Profile of Sauvignon Blanc Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 8902-8912.
- (74) Schwinn, M.; Durner, D.; Wacker, M.; Delgado, A.; Fischer, U., Impact of fermentation temperature on required heat dissipation, growth and viability of yeast, on sensory characteristics and on the formation of volatiles in Riesling. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2019**, *25*, 173-184.
- (75) Morakul, S.; Mouret, J.-R.; Nicolle, P.; Agüera, E.; Sablayrolles, J.-M.; Athès, V., A Dynamic Analysis of Higher Alcohol and Ester Release during Winemaking Fermentations. *Food Bioproc. Technol.* **2013**, *6*, 818-827.
- (76) Fischer, U.; Roth, D.; Christmann, M., The impact of geographic origin, vintage and wine estate on sensory properties of *Vitis vinifera* cv. Riesling wines. *Food Qual. Pref.* **1999**, *10*, 281-288.
- (77) Lee, J.-E.; Hwang, G.-S.; Van Den Berg, F.; Lee, C.-H.; Hong, Y.-S., Evidence of vintage effects on grape wines using <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic study. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *648*, 71-76.
- (78) Vigentini, I.; De Lorenzis, G.; Fabrizio, V.; Valdetara, F.; Faccincani, M.; Panont, C. A.; Picozzi, C.; Imazio, S.; Failla, O.; Foschino, R., The vintage effect overcomes the terroir effect: a three year survey on the wine yeast biodiversity in Franciacorta and Oltrepò Pavese, two northern Italian vine-growing areas. *Microbiol.* **2015**, *161*, 362-373.
- (79) Charoenchai, C.; Fleet, G. H.; Henschke, P. A., Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 283-288.
- (80) Kourkoutas, Y.; Koutinas, A.; Kanellaki, M.; Banat, I.; Marchant, R., Continuous wine fermentation using a psychrophilic yeast immobilized on apple cuts at different temperatures. *Food Microbiol.* **2002**, *19*, 127-134.
- (81) Waterhouse, A. L.; Sacks, G. L.; Jefferey, D. W., *Understanding Wine Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, **2016**.
- (82) Rankine, B.; Pocock, K.,  $\beta$ -Phenethanol and n-hexanol in wines: Influence of yeast strain, grape variety and other factors; and taste thresholds. *Vitis* **1969**, *8*, 23.

- 
- (83) Diago, M. P.; Ayestarán, B.; Guadalupe, Z.; Garrido, Á.; Tardaguila, J., Phenolic composition of Tempranillo wines following early defoliation of the vines. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, 92, 925-934.
- (84) Amerine, M. A.; Ough, C. S., Studies on Controlled Fermentations III. *Am. J. Enol. Vitic.* **1957**, 8, 18-30.
- (85) Bely, M.; Sablayrolles, J.-M.; Barre, P., Automatic Detection of Assimilable Nitrogen Deficiencies during Alcoholic Fermentation in Oenological Conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **1990**, 70, 246-252.
- (86) Rojas, V.; Gil, J. V.; Piñaga, F.; Manzanares, P., Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, 86, 181-188.
- (87) Lilly, M.; Bauer, F. F.; Lambrechts, M. G.; Swiegers, J. H.; Cozzolino, D.; Pretorius, I. S., The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* **2006**, 23, 641-659.
- (88) Agrarmetereologie Rheinland-Pfalz, [www.wetter.rlp.de](http://www.wetter.rlp.de). (accessed 2019/10/14).
- (89) Grebneva, Y.; Bellon, J. R.; Herderich, M. J.; Rauhut, D.; Stoll, M.; Hixson, J. L., Understanding Yeast Impact on 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene Formation in Riesling Wine through a Formation-Pathway-Informed Hydrolytic Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, 67, 13487-13495.
- (90) Strauss, C. R.; Wilson, B.; Anderson, R.; Williams, P. J., Development of Precursors of C<sub>13</sub> Nor-Isoprenoid Flavorants in Riesling Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, 38, 23-27.
- (91) Äyräpää, T., Formation of phenethyl alcohol during alcoholic fermentation, compared with the formation of aliphatic fusel alcohols, In *9th European Brewery Convention Congress*, **1963**, 276-287.
- (92) Carrau, F. M.; Medina, K.; Boido, E.; Farina, L.; Gaggero, C.; Dellacassa, E.; Versini, G.; Henschke, P. A., De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, 243, 107-115.
- (93) Soles, R.; Ough, C.; Kunkee, R., Ester Concentration Differences in Wine Fermented by Various Species and Strains of Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1982**, 33, 94-98.
- (94) Torija, M. J.; Beltran, G.; Novo, M.; Poblet, M.; Guillamón, J. M.; Mas, A.; Rozes, N., Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, 85, 127-136.
- (95) Cabrera, M.; Moreno, J.; Ortega, J.; Medina, M., Formation of Ethanol, Higher Alcohols, Esters, and Terpenes by Five Yeast Strains in Musts from Pedro Ximénez Grapes in Various Degrees of Ripeness. *Am. J. Enol. Vitic.* **1988**, 39, 283-287.
- (96) Zoecklein, B. W.; Marcy, J. E.; Williams, J. M.; Jasinski, Y., Effect of Native Yeasts and Selected Strains of *Saccharomyces cerevisiae* on Glycosyl Glucose, Potential Volatile Terpenes, and Selected Aglycones of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) Wines. *J. Food Compos. Anal.* **1997**, 10, 55-65.
- (97) Crandles, M.; Reynolds, A. G.; Khairallah, R.; Bowen, A., The effect of yeast strain on odor active compounds in Riesling and Vidal blanc icewines. *LWT--Food Sci. Technol.* **2015**, 64, 243-258.
- (98) Dutraive, O.; Benito, S.; Fritsch, S.; Beisert, B.; Patz, C.-D.; Rauhut, D., Effect of Sequential Inoculation with Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition. *Fermentation* **2019**, 5, 79.
-



- (99) Kanter, J.-P.; Benito, S.; Brezina, S.; Beisert, B.; Fritsch, S.; Patz, C.-D.; Rauhut, D., The impact of hybrid yeasts on the aroma profile of cool climate Riesling wines. *Food Chem.* **2020**, *5*, 100072.
- (100) van Wyk, N.; Grossmann, M.; Wendland, J. r.; von Wallbrunn, C.; Pretorius, I. S., The Whiff of Wine Yeast Innovation: Strategies for Enhancing Aroma Production by Yeast during Wine Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 13496-13505.
- (101) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D., *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine-Stabilization and Treatments*. Second Edition, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, **2006**.
- (102) Flores, J. H.; Heatherbell, D. A.; McDaniel, M. R., Ultrafiltration of Wine: Effect of Ultrafiltration on White Riesling and Gewürztraminer Wine Composition and Stability. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 207-214.
- (103) Peri, C.; Riva, M.; Decio, P., Crossflow Membrane Filtration of Wines: Comparison of Performance of Ultrafiltration, Microfiltration, and Intermediate Cut-Off Membranes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1988**, *39*, 162-168.
- (104) Flores, J.; Heatherbell, D.; Henderson, L.; McDaniel, M., Ultrafiltration of wine: Effect of Ultrafiltration on the Aroma and Flavor Characteristics of White Riesling and Gewürztraminer Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 91-96.
- (105). Gergely, S.; Bekassy-Molnar, E.; Vatai, G., The use of multiobjective optimization to improve wine filtration. *J. Food Eng.* **2003**, *58*, 311-316.
- (106) Arriagada-Carrazana, J. P.; Sáez-Navarrete, C.; Bordeu, E., Membrane filtration effects on aromatic and phenolic quality of Cabernet Sauvignon wines. *J. Food Eng.* **2005**, *68*, 363-368.
- (107) Leroy, M.; Charpentier, M.; Duteurtre, B.; Feuillat, M.; Charpentier, C., Yeast Autolysis During Champagne Aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 21-28.
- (108) Charpentier, C.; Feuillat, M., Yeast autolysis. *Wine Microbiol. Biotechnol.* **1993**, 225-242.
- (109) Chassagne, D.; Guilloux-Benatier, M.; Alexandre, H.; Voilley, A., Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chem.* **2005**, *91*, 39-44.
- (110) Troton, D.; Charpentier, M.; Robillard, B.; Calvayrac, R.; Duteurtre, B., Evolution of the Lipid Contents of Champagne Wine During the Second Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*, 175-182.
- (111) Gallart, M.; López-Tamames, E.; Suberbiola, G.; Buxaderas, S., Influence of Fatty Acids on Wine Foaming. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7042-7045.
- (112) Moio, L.; Ugliano, M.; Gambuti, A.; Genovese, A.; Piombino, P., Influence of Clarification Treatment on Concentrations of Selected Free Varietal Aroma Compounds and Glycoconjugates in Falanghina (*Vitis vinifera* L.) Must and Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55*, 7-12.
- (113) Loscos, N.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V., Fate of Grape Flavor Precursors during Storage on Yeast Lees. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5468-5479.
- (114) Marais, J.; Pool, H., Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis* **1980**, *19*, 151-164.
- (115) Ramey, D. D.; Ough, C. S., Volatile Ester Hydrolysis or Formation During Storage of Model Solutions and Wines. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 928-934.
- (116) Ferreira, V.; Escudero, A.; Fernández, P.; Cacho, J. F., Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. A* **1997**, *205*, 392-396.



- (117) Loscos, N.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V., Release and Formation of Varietal Aroma Compounds during Alcoholic Fermentation from Nonfloral Grape Odorless Flavor Precursors Fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6674-6684.
- (118) Pawliszyn, J., Theory of solid-phase microextraction. *J. Chrom. Sci.* **2000**, *38*, 270-278.
- (119) Pawliszyn, J., Theory of extraction. In *Handbook of Sample Preparation*, Eds.: Pawliszyn, J.; Lord, H. L., Wiley-Blackwell: Hoboken, **2010**, 3-24.
- (120) Pawliszyn, J., 2 - Theory of Solid-Phase Microextraction. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*, Elsevier: Oxford, **2012**, 13-59.
- (121) Mas, A.; Puig, J.; Lladoa, N.; Zamora, F., Sealing and Storage Position Effects on Wine Evolution. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 1374-1378.



## 7 Entfernung von TDN

Entsprechend den Ausführungen in Kapitel 4.7.2 ist es möglich, bestimmte Aromastoffe wie beispielsweise Trichloranisol zielgerichtet aus Wein zu entfernen. Der Großteil der Adsorbentien wurde allerdings bisher bei der Weinherstellung eingesetzt, um unerwünschte Stoffgruppen wie Polyphenole oder Trubstoffe mittels PVPP<sup>271</sup>, Aktivkohle<sup>272</sup> oder Kieselgur<sup>244</sup> zu entfernen. Die Behandlung mit Aktivkohle führt darüber hinaus zu einer Entfärbung und meist auch zu einer Entaromatisierung des Weins<sup>273</sup> und wird daher meist nur im Moststadium bei Weißweinen zur Fehlerentfernung eingesetzt<sup>274</sup>, kann aber auch für spezifische Entfernungen von unerwünschten Stoffen wie Ochratoxin A verwendet werden.<sup>275</sup> Wie in Kapitel 6.5 gezeigt wurde, ist eine selektive Entfernung schwierig, ohne andere, unter Umständen erwünschte Aromastoffe ebenfalls zu entfernen. Im folgenden Abschnitt werden geeignete Methoden zur möglichst selektiven Entfernung von TDN aus Modellwein und Wein aufgeführt.

### 7.1 Materialien

Ethanol (≥99.8%), Natriumchlorid (≥99%), Natriumhydroxid (p.a.), L(+)-Weinsäure und Methanol (≥99.5%) wurden von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. PVPP (Divergan®) stammte von BASF AG (Ludwigshafen, Deutschland), Aktivkohle von KLUG Fachgroßhandel für Kellereibedarf GmbH (Langenlonsheim, Deutschland), Zeolith Y von Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland). Die SPE-Kartuschen wurden von BEKOlut GmbH & Co. KG (BEKOlut® Leox, BEKOlut® C18e; Hauptstuhl, Deutschland) bzw. Merck KGaA (LiChrolut® EN; Frankfurt, Deutschland) erworben. Die Filterkerze (Sartoguard PES) stammte von Sartorius AG (Göttingen, Deutschland), und die Spritzenvorsatzfilter (Chromafil® Xtra: CA, PAM, PES, PET, PTFE, RC) von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland).

Linalool,  $\beta$ -Damascenon, 4-Ethylguaiaicol, 4-Vinylguaiaicol, 2-Phenylethanol, 3-Methylbutanol, 1-Hexanol, Ethylacetat, Ethylbutanoat, Ethylhexanoat, Ethyloctanoat, Hexylacetat, 2-Phenylethylacetat, 3-Methylbutylacetat und 2-Methylbutylacetat sowie die deuterierten Verbindungen  $d_4$ -4-Ethylguaiaicol,  $d_5$ -Linalool,  $d_5$ -2-Phenylethanol,  $d_{13}$ -1-Hexanol,  $d_5$ -Ethylacetat,  $d_5$ -Ethylhexanoat und  $d_3$ -Hexylacetat stammten von Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA). TDN,  $d_6$ -TDN,  $d_4$ - $\beta$ -Damascenon, Vitispiran und  $d_5$ -Vitispiran wurden von Dr. Recep Gök (TU Braunschweig, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Zur Analyse der Modell- und Rieslingweine wurde die in Kapitel 6.3 beschriebene Methode angewendet.

Für die Adsorptionsversuche wurde ein Modellwein hergestellt, der 12% vol. Alkohol und 3 g/L Weinsäure enthielt, und mittels 1N NaOH auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt wurde. Die folgenden Aromastoffe wurden dem Modellwein zugegeben: TDN (5  $\mu$ g/L),  $\beta$ -Damascenon (20  $\mu$ g/L), 4-Ethylguaiaicol (1,2 mg/L), 1-Hexanol (1,2 mg/L), Linalool (50  $\mu$ g/L),

2-Phenylethanol (6 mg/L), Ethylacetat (5 mg/L), Ethylhexanoat (200 µg/L), Hexylacetat (200 µg/L). Der Rieslingwein wurde vom Staatsweingut mit Johannitergut (Neustadt/Weinstraße, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

## 7.2 Ergebnisse und Diskussion

### 7.2.1 Modellwein als Matrix

Zur Ermittlung der Adsorptionskapazität verschiedener Materialien gegenüber freiem TDN wurden diese zunächst in einem Modellsystem getestet, das aus einem Modellwein mit weinähnlichen Grundparametern bezüglich des Alkoholgehalts und pH-Werts bestand.

Neben der Zielverbindung TDN wurden dem Modellwein weitere Aromaverbindungen in weinüblichen Konzentrationen zugesetzt, um die Auswirkungen auf andere wichtige Aromastoffe abschätzen zu können. Die mehrtägige Lagerung des aromatisierten Modellweins bei Raumtemperatur in Gefäßen aus Polyethylen und Polypropylen führte zu einer drastischen Abnahme von TDN und längererkettigen Estern (vgl. Abbildung 18), während die anderen Aromastoffe kaum beeinflusst wurden. Erwähnenswert ist außerdem, dass die Lagerung in einem als Referenz geplanten Glasbehälter auch zu einer – wenn auch geringfügigen Abnahme – von TDN um ca. 20% geführt hat. Dies lässt sich am ehesten durch den niedrigen Verteilungskoeffizienten von TDN (siehe Kapitel 6.1) erklären, der zu einer schnellen Verflüchtigung des freien TDN aus dem Modellwein geführt hat, und weniger mit Abbau- oder Adsorptionsvorgängen während der Lagerung.

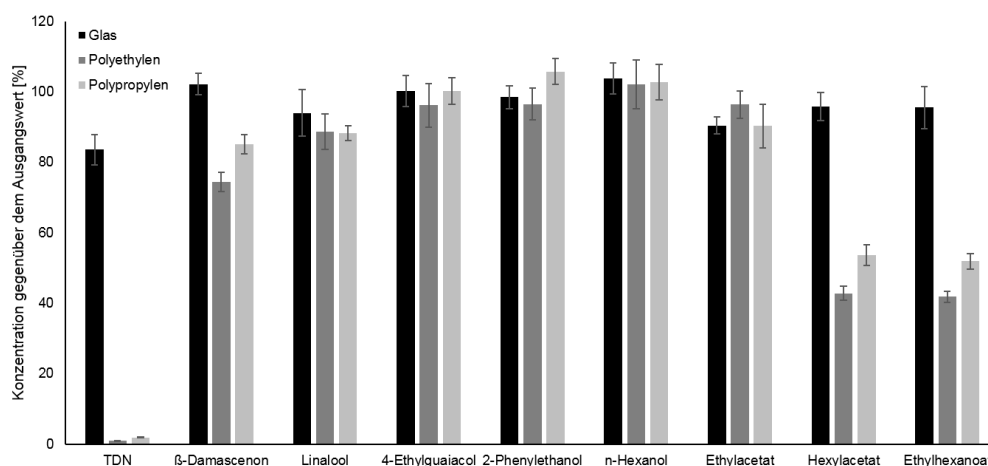


Abbildung 18: Einfluss des Behältermaterials auf die Aromastoffkonzentration in Modellwein nach dreitägiger Lagerung, n = 2

Die beiden Kunststoffe Polyethylen und Polypropylen eignen sich demzufolge zur Entfernung des unpolaren Aromastoffs TDN, jedoch ist eine Lagerung des Weins in Kunststoffgefäßen zur Absorption des frei gesetzten TDN in der kommerziellen Anwendung nicht realisierbar. Deswegen wurden jeweils zwei Gramm des Materials als runde Platte mit dem Durchmesser eines Schraubverschlussdeckels in einen Glasbehälter transferiert und diese mehrere Tage

bei Raumtemperatur gelagert. Während auch hier die meisten Aromaverbindungen kaum beeinflusst wurden, ist die Konzentration an TDN um 30-50% zurückgegangen (vgl. Abbildung 19). Allerdings wurde einerseits auch beim als inert anzusehenden PTFE (Teflon) eine Abnahme festgestellt, andererseits fällt die Abnahme deutlich geringer aus, als es bei der Lagerung im vorhergehenden Versuch der Fall war.

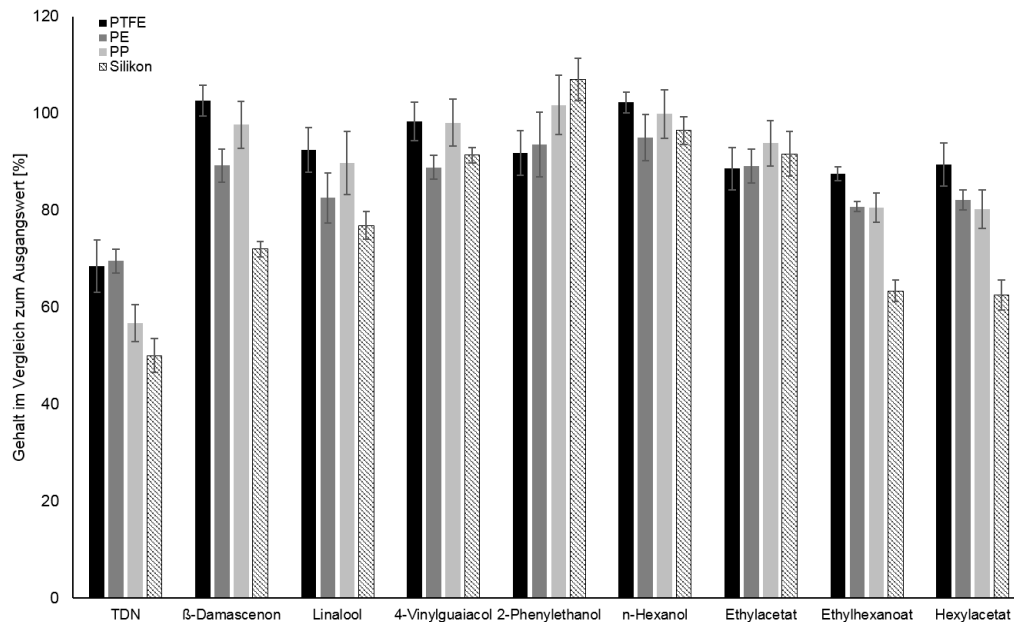


Abbildung 19: Adsorption von Aromastoffen an Materialien in Modellwein nach mehrtägiger Lagerung, n = 3

Die höchste Abnahme an Aromastoffen ist demzufolge mit der Verwendung von Silikon verbunden. Silikon in Form einer PDMS-Faser wird auch für die HS-SPME verwendet, daher war dieser Befund zu erwarten. Die deutlich geringere Absorption im Vergleich zur Lagerung in Behältern aus dem jeweiligen Material lässt sich durch den geringeren Materialeinsatz und die damit wesentlich geringere Oberfläche des Adsorptionsmaterials begründen.

Die Applikation gängiger Fällungs- bzw. Filtrationshilfsmittel, hier PVPP, Aktivkohle und Zeolith Y führt insbesondere bei Anwendung von Aktivkohle zu einer sehr hohen Abnahme an freien Aromastoffen (vgl. Abbildung 20). Der Einsatz von Aktivkohle reduziert jedoch nicht nur die TDN-Konzentration, sondern auch die der anderen – positiv besetzen – Aromastoffe im Modellsystem, sodass der Einsatz von Aktivkohle zu bereits fermentiertem Rieslingwein als nicht zielführend zu betrachten ist. Die Verwendung von PVPP und Zeolith Y führte zwar zu einer Reduzierung von TDN auf ca. die Hälfte des Anfangsgehalts des aromatisierten Modellweins, allerdings ist hier zu beachten, dass bereits das 15-minütige Rühren und die darauffolgende Filtration durch einen Papierfilter (Kontrolle) zu einer Reduzierung des TDN-Gehalts um ca. ein Drittel geführt hat, sodass der Effekt der beiden Adsorbentien den der Kontrolle nicht weit übersteigt.

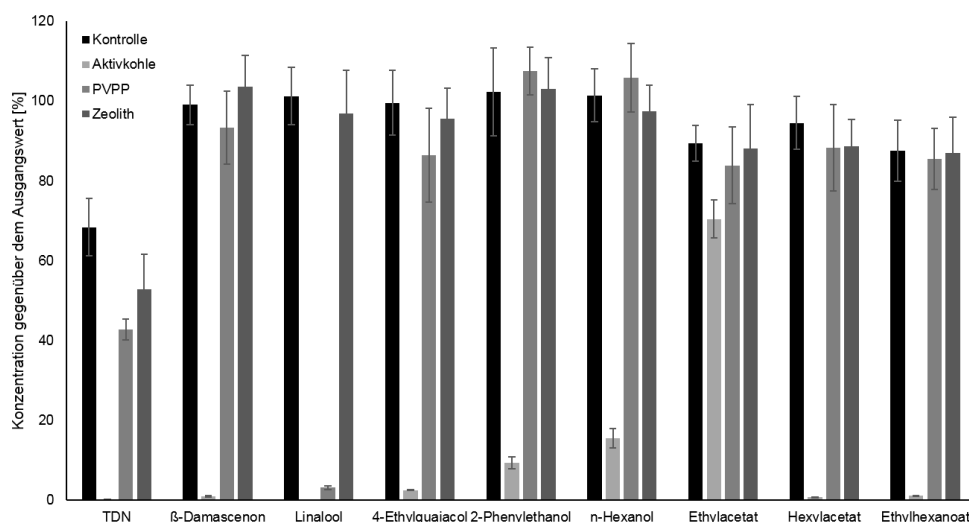


Abbildung 20: Adsorption von Aromastoffen in aromatisiertem Modellwein nach 15-minütiger Behandlung mit drei verschiedenen Adsorbentien und einer Kontrolle ohne Adsorbenszugabe im Vergleich zu Modellwein vor der Behandlung, n = 2

Ähnliche Ergebnisse wurden für die – hier nicht dargestellte – Extraktion der Aromastoffe mit Hilfe von Festphasenextraktionskartuschen beobachtet. Hierdurch wurde zwar TDN nahezu vollständig aus der Modelllösung entfernt, allerdings auch alle anderen Aromaverbindungen mit Ausnahme von Ethylacetat und 2-Phenylethanol, sodass die Realisierung dieser Methode ebenfalls als nicht zielführend angesehen wird. Im Zuge der Evaluierung weiterer Adsorptionsmaterialien wurden sieben verschiedene Materialien in Form von Spritzenvorsatzfiltern in Mikroansätzen von 10 mL auf ihre Extraktionskapazität getestet (vgl. Abbildung 21). Die Verwendung von Materialien auf Cellulosebasis sowie Polyester- und Teflon-basierten Filtern führte nur zu einer marginalen Abreicherung des freien TDN; wesentlich höhere Extraktionsraten von 60-80% wurden durch die Applizierung von PVDF (Polyvinylidendifluorid), Polyamid (PAM) und Polyethersulfon (PES) erzielt.

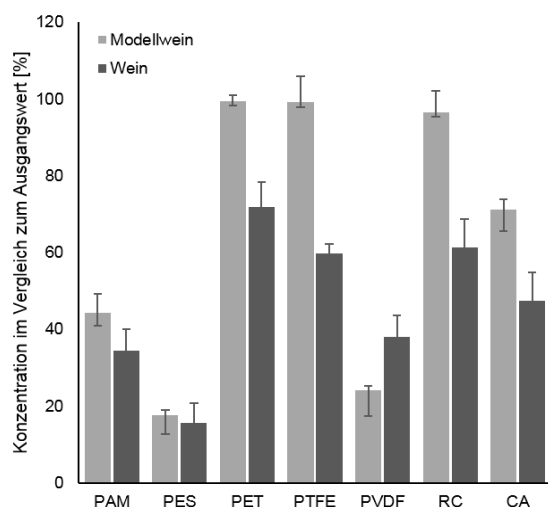


Abbildung 21: Abnahme von TDN nach Filtration durch Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 µm) aus verschiedenen Filtermaterialien. PAM = Polyamid, PES = Polyethersulfon, PET = Polyethylenterephthalat, PTFE = Polytetrafluorethylen, PVDF = Polyvinylidendifluorid, RC = Regenerierte Cellulose, CA = Celluloseacetat, n = 2



### 7.2.2 Rieslingwein als Matrix

Aufgrund der vielversprechenden Resultate der Filtermaterialien wurden diese auch für einen Adsorptionsversuch bei einem aromatisierten Rieslingwein angewendet. Während die Resultate für PAM, PES und PVDF annähernd gleiche Resultate ergaben, divergierten die Extraktionsraten für die anderen Filtermaterialien stark von denen, die beim Einsatz im Modellsystem erzielt wurden; jedoch lagen die Extraktionsraten immer noch deutlich unterhalb von 60% (vgl. Abbildung 21).

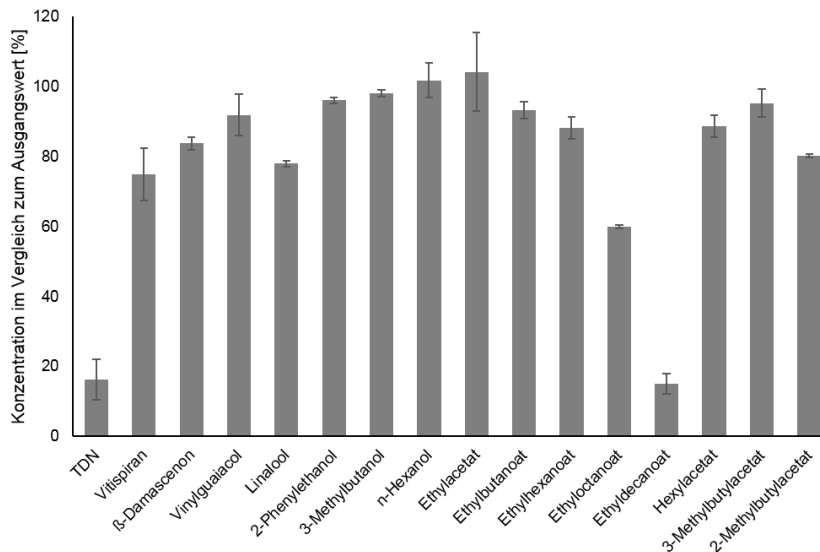


Abbildung 22: Abnahme von Aromastoffen in Riesling nach Filtration durch PES-Kerzenfilter, n = 3

Anschließend wurden mit einer Filterkerze mit PES als Filtermaterial zehn Liter Wein filtriert, der zuvor zwei Wochen auf 30 °C temperiert wurde, um eine vorzeitige Alterung zu simulieren und einen nennenswerten Gehalt an TDN freizusetzen. Neben der starken Abreicherung des freien TDN wurde auch festgestellt, dass mit zunehmender Kettenlänge der Esterverbindungen die Konzentration im Filtrat ebenfalls abnimmt (vgl. Abbildung 22). Daher bietet die Filtration mit geeigneten Filtermaterialien eine brauchbare Möglichkeit, vorhandenes freies TDN aus dem Wein zu entfernen. Allerdings ist es in der Praxis erstrebenswert, möglichst wenig Eingriffe in bereits abgefüllten Wein vorzunehmen, da jeder Eingriff mit einer zusätzlichen Belastung des Weins verbunden ist, und der mit Sauerstoff zu Qualitätseinbußen führt.<sup>30,276</sup> Daher wird eine Filtration bereits abgefüllten Weins nur in Ausnahmefällen durchgeführt, um die Verkehrsfähigkeit des Weins wiederherzustellen, wie es beispielsweise bei der Beeinträchtigung durch eine stark ausgeprägte Korknote der Fall ist.

Deswegen wurde durch die Applikation der in den vorherigen Versuchen erfolgreich angewandten Filtermaterialien in die Schraubverschlüsse der Flaschen und anschließender forcierter Alterung der Weine versucht, das sich im Wein bildende und in den Kopfraum der Flasche übertretende freie TDN zu binden, damit möglichst wenig freies TDN im Wein

zurückbleibt. Die forcierte Alterung führte zu einem gewünschten Anstieg der Konzentration an freiem TDN von 14,3 µg/L gegenüber 1,8 µg/L im nicht erhitzten Wein, sodass genügend freies TDN vorhanden war. Allerdings wurde durch keinen der verwendeten Kunststoffe die Konzentration an TDN oder anderen Aromastoffen nennenswert reduziert (vgl. Abbildung 23); lediglich die Konzentration an Ethyldecanoat sank um wenige Prozent ab.

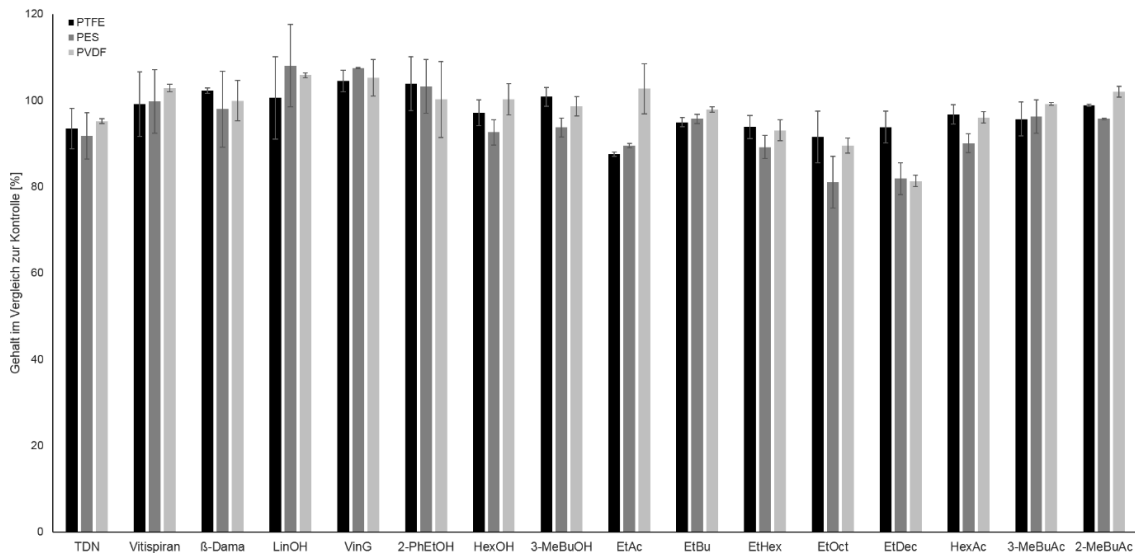


Abbildung 23: Abnahme von Aromastoffen durch Adsorption von an Schraubverschlüsse applizierte Filtermaterialien, n = 2

Da dieses letzte Ergebnis den bisherigen Erkenntnissen entgegen steht, wurden durch eine ethanolische Extraktion die von den Materialien an der Innenseite des Flaschen-Schraubverschlusses adsorbierten Aromastoffe zurückgewonnen, und der Gehalt an Aromastoffen im Extrakt untersucht (vgl. Abbildung 24). Nachfolgende Extraktionen der Materialien enthielten keine nennenswerten Gehalte an Aromastoffen, daher ist davon auszugehen, dass die ethanolische Extraktion des Filtermaterials eine vollständige Abbildung der durch das Filtermaterial absorbierten Aromastoffe widerspiegelt.

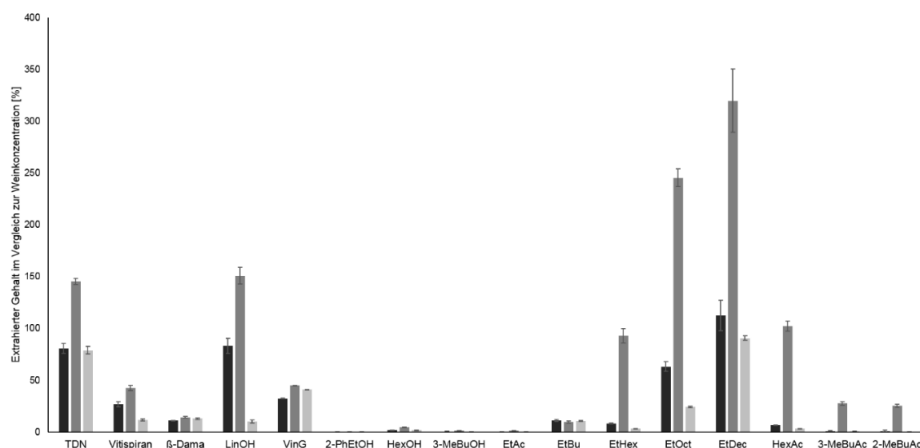


Abbildung 24: Gehalt an Aromastoffen in den Filtermaterialien, die in Schraubverschlüsse appliziert wurden, extrahiert mit Ethanol, im Vergleich mit der originären Weinkonzentration, n = 2

Aus der Rückrechnung auf die ursprünglich im Wein enthaltene Konzentration an Aromastoffen lässt sich feststellen, dass die jeweiligen Filtermaterialien zur Extraktion einiger Aromaverbindungen grundsätzlich geeignet sind. Jedoch übersteigt der Gehalt der flüchtigen Verbindungen, die in 750 mL Wein enthalten sind, die Extraktionskapazität der geringen Menge an Adsorbens (ca. 1 g) bei Weitem, sodass keine spürbare Wirkung auf die Konzentration im Wein beobachtet wurde.

Es bleibt festzuhalten, dass eine wirklich spezifische, vollständige Entfernung des freien TDN bei einer gleichzeitigen Konservierung der anderen enthaltenen Aromastoffe kaum zu realisieren ist. Gleichzeitig scheinen weitere Untersuchungen in diese Richtung vielversprechend, da eine größere TDN-Entfernung mit einer verbesserten Methode zu der hier dargestellten denkbar ist. Dieses Ergebnis ist demnach als Grundstein für weitere Forschungen anzusehen. Die bisherigen Ergebnisse lassen eine Entfernung von ca. 80% des freien TDN möglich erscheinen, was bei der TDN-Konzentration mit einem nicht allzu hohen Ausgangsgehalt höchstwahrscheinlich in einer finalen Konzentration unterhalb der Wahrnehmungsschwelle resultieren sollte. Das setzt allerdings voraus, dass der Wein entweder filtriert wird, oder die Applikation einer deutlich größeren Menge an Adsorbens in der Flasche technisch umgesetzt wird. Aufgrund der stark hydrophoben Eigenschaften der Zielverbindung TDN sind die Adsorptionsversuche mit den ebenfalls vergleichsweise hydrophoben Filterpolymeren PAM, PES und PVDF (vgl. Abbildung 25) deutlich erfolgreicher als der Einsatz hydrophiler Verbindungen wie Polyestern oder auf Cellulose basierende Materialien. PTFE besitzt zwar ebenfalls einen hydrophoben Charakter, kann aber aufgrund seiner elektrischen und chemischen Neutralität kaum Bindungen mit anderen Verbindungen aufbauen, weder mit anderen PTFE-Strängen, noch mit anderen Molekülen, und gilt daher als inert.<sup>277</sup>

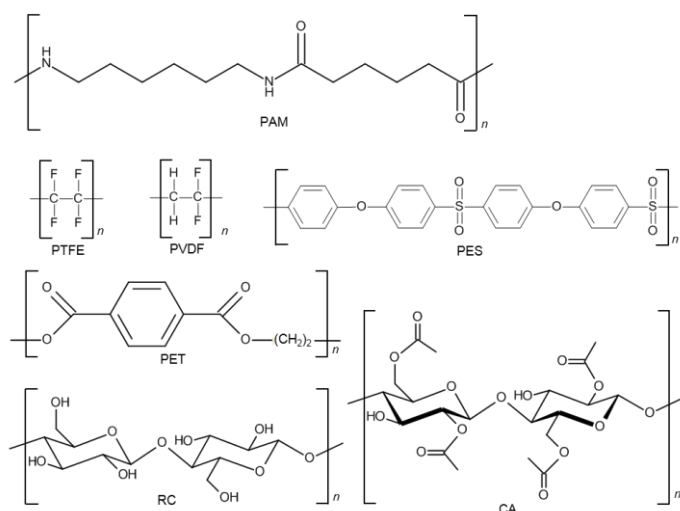


Abbildung 25: Chemische Strukturen der eingesetzten polymeren Filterschichten. PAM = Polyamid, PTFE = Polytetrafluorethylen, PVDF = Polyvinylidendifluorid, PES = Polyethersulfon, PET = Polyethylenterephthalat, RC = Regenerierte Cellulose, CA = Celluloseacetat

Für die Bindung sind daher Polymere mit längeren unpolaren Abschnitten wie beispielsweise Polyamid, oder aromatischen Abschnitten wie es bei Polyethylterephthalat oder Polyethersulfon der Fall ist, wesentlich besser geeignet. Eine weit höhere Affinität besteht daher auch zwischen TDN und unpolaren Polymeren wie Polyethylen oder Polypropylen, wie durch den Lagerungsversuch des Modellweins gezeigt wurde. Durch die Verwendung dieser Polymere wurden allerdings auch Aromastoffe abgereichert, deren Verbleib im Wein ausdrücklich erwünscht ist. Daher muss eine sorgfältige Abwägung getroffen werden zwischen dem Vorteil, TDN aus der Matrix zu entfernen, und dem Risiko, den Wein insgesamt zu beeinträchtigen und einem Qualitätsverlust auszusetzen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Technik des „molecular imprinting“, bei dem durch die passgenaue Ausbildung einer Cavität innerhalb eines Polymers eine zielgerichtete Extraktion einzelner Moleküle möglich ist.<sup>278</sup> Der Einsatz erfolgt dann nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und wird hauptsächlich in der Bioanalytik eingesetzt, da die Bindung mit hydrophilen Makromolekülen deutlich spezifischer gestaltet werden kann. Es sind aber auch Anwendungen für die Analytik entwickelt worden, beispielsweise für die Extraktion des ebenfalls hydrophoben Cholesterins.<sup>279</sup> Daher scheint der Einsatz „molecular imprinting“ spezifisch auf TDN zugeschnittener Materialien im Bereich des Möglichen zu liegen, und bietet somit einen weiteren Ansatzpunkt für zukünftige Forschungen.

## 8 Zusammenfassung

Die Rieslingrebe gilt aufgrund ihrer Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und der bemerkenswerten Suszeptibilität gegenüber dem Terroir als die Vorzeigerebe Deutschlands. Durch starke Sonnenexposition der Reben oder lange Lagerung der Rieslingweine tritt jedoch im Zuge des Klimawandels vermehrt eine „Petrol-Fehlnote“ auf, die durch 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin verursacht wird. Ziel dieser Arbeit war es, die Konzentration an TDN zu bestimmen, ab der sich Rieslingweine wahrnehmbar verändern oder sogar abgelehnt werden, sowie gezielt weinbauliche und oenologische Maßnahmen zu entwickeln, um die Gehalte an gebundenem und freiem TDN zu reduzieren. Dafür wurde zunächst eine Methode am Forschungsstandort etabliert, um sowohl die Gehalte an gebundenem TDN und Vitispiran, freiem TDN und weiteren wichtigen Aromastoffen zu bestimmen.

Um die sensorische Relevanz von TDN beurteilen zu können, wurden entsprechende Wahrnehmungsschwellen von geschulten Prüfern ermittelt. Dabei wurde sowohl die grundlegende Matrix durch die Verwendung von Wasser, Modellwein und Rieslingwein variiert, als auch die Matrixparameter Alkoholgehalt und Carbonisierungsniveau, um die Varianz der in Deutschland vorkommenden Produkte adäquat abzubilden. Dabei konnte der in den USA ermittelte Wahrnehmungsschwellenwert von ca. 2 µg/L bestätigt werden;<sup>8</sup> gleichzeitig wurde beobachtet, dass sich die Schwellenwerte zwischen den Matrices Wasser, Modellwein und Rieslingwein weniger unterscheiden, als es aufgrund der Verteilungskoeffizienten zu erwarten war. TDN geht in einer rein wässrigen Matrix leichter in die Gasphase über als es bei Modellwein der Fall ist, was an der besseren Löslichkeit in Anwesenheit von Ethanol in der flüssigen Phase liegt. In Wein führt die erhöhte Ionenstärke dazu, dass die Löslichkeit von TDN abnimmt und der Übertritt in die Gasphase erleichtert wird. Sensorisch scheint vor allem die Maskierung von TDN durch Alkohol, CO<sub>2</sub> und andere Aromastoffe eine Rolle zu spielen, die zu einer Verringerung der Geruchsschwelle gegenüber dem berechneten Erwartungswert führt.

Gleichzeitig wurde die Relevanz der angewandten Methodik bei der Berechnung von Schwellenwerten dargelegt. Bei der Anwendung rein statistischer Berechnungen werden die psycho-physiologischen Gegebenheiten durch die menschlichen Prüfer weitgehend ignoriert, was zu einer Verzerrung der ermittelten Schwellenwerte nach unten führt. Die Anwendung von drei anderen möglichen Methoden, die auf sensorischen Erfahrungen basieren, lieferte jedoch nahezu die gleichen Ergebnisse für die ermittelten Schwellenwerte. Bei der Anwendung dieser Methoden auf die Bestimmung der Wahrnehmungsschwelle von TDN durch Verbraucher ergab sich ein Wert von 14,7 µg/L, der um ein Mehrfaches über dem Schwellenwert von geschulten Prüfern liegt. Dies liegt zum einen an der zusätzlichen Erfahrung der geschulten

Prüfer im Umgang mit sensorischen Prüfungen, zum anderen kann bei Verbrauchern nicht kontrolliert werden, ob diese frei von äußeren Beeinträchtigungen wie einer kürzlichen Nahrungsaufnahme oder individueller, geringerer sensorischer Empfindlichkeit sind. Zeitgleich repräsentiert eine Studie unter Verbrauchern ein realitätsnäheres Bild für die Beurteilung der sensorischen Relevanz der Petrolnote, sobald es um Vermarktungsaspekte für den breiten Konsumentenmarkt geht.

Allerdings lag der Wert deutlich unterhalb der Werte, die in Neuseeland und den USA ermittelten wurden,<sup>10</sup> was sich unter Umständen durch Gewöhnungseffekte der dortigen Verbraucher gegenüber TDN erklären lässt, die hierzulande nicht oder kaum ins Gewicht fallen. Dies gilt in gleichem Maße für die Konzentration, ab der TDN von Verbrauchern überwiegend als negativ bewertet wurde; sie lag mit 60 µg/L für einen einjährigen Rieslingwein deutlich unterhalb den bisher publizierten Ablehnungsschwellen von 157 µg/L für neuseeländische und 82 µg/L für US-Verbraucher.<sup>10</sup> Während das Alter der Probanden die Sensitivität gegenüber TDN nicht zu beeinflussen scheint, wurden zwei weitere Einflussfaktoren auf die Ablehnung von TDN-reichen Weinen durch Verbraucher identifiziert: Die akzeptierte TDN-Konzentration steigt mit zunehmendem Alter des Weins auf 91 µg/L für einen achtjährigen Riesling; außerdem wurden die eingesetzten Rieslingweine von weiblichen Verkostern bereits bei einer rund 40 µg/L niedrigeren TDN-Konzentration abgelehnt als von männlichen Probanden. Dies wiederum scheint aber auch mit der höheren Empfindlichkeit von weiblichen Verkostern gegenüber TDN zusammen zu hängen; so lag die Wahrnehmungsschwelle im Mittel bei 14,7 µg/L, während sie von den weiblichen Probanden bereits bei 9 µg/L detektiert wurde, von den männlichen dagegen erst bei rund 18 µg/L. Die Bestimmung der Wahrnehmungsschwelle durch geschulte Prüfer wurde auch für Vitispiran durchgeführt, resultierend in einem Wert von 101 µg/L, der – ebenso wie es bei TDN der Fall war – deutlich unterhalb der ursprünglich berichteten Geruchsschwelle von 800 µg/L lag.

Um die ermittelten Geruchsschwellen in die Praxis zu übertragen, wurden die Gehalte an freiem TDN und Vitispiran in 261 Weinen aus drei verschiedenen Weinwettbewerben gemessen und in Bezug zu den ermittelten Geruchsschwellen gesetzt. Dabei überschritt keiner der Weine die Wahrnehmungsschwelle von Vitispiran, sodass von keinem signifikanten Beitrag des Vitispiran zum Weinaroma auszugehen ist. Dagegen besaß rund die Hälfte der Weine TDN-Konzentrationen über der Wahrnehmungsschwelle von geschulten Prüfern, und bei 15% der Weine überstiegen die TDN-Konzentrationen auch die Wahrnehmungsschwelle von Verbrauchern. Allerdings lag bei keinem der Weine der TDN-Gehalt über der Ablehnungsschwelle. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die untersuchten Weine prämierte Teilnehmerweine mehrerer Wettbewerbe waren und in diesem Preis- und Qualitätssegment eine vorhandene, massiv ausgeprägte Petrolnote aufgrund einer Fehllagerung, die einen starken Anstieg der TDN-Konzentration zur Folge hätte, auszuschließen ist. Zudem lag das Durchschnittsalter der Weine bei nur 1,9 Jahren, sodass die Freisetzung des TDN-Potentials der Weine noch nicht so weit fortgeschritten war. Dennoch wurde bereits hier eine deutliche



Korrelation zwischen dem Alter der Weine und der Überschreitung der Wahrnehmungsschwelle festgestellt. So wiesen rund 90% der Weine aus den beiden Mundus Vini Wettbewerben, die älter als vier Jahre waren, TDN-Konzentrationen über der Wahrnehmungsschwelle von 2 µg/L auf. Daher ist damit zu rechnen, dass mit zunehmendem Alter der Weine und der in Zukunft weiter zunehmenden Sonneneinstrahlung auch die TDN-Konzentrationen eines Gros der Weine nicht nur die Wahrnehmungsschwellen von Verbrauchern überschreiten wird, sondern unter Umständen auch die Ablehnungsschwelle erreichen wird.

Mit Hilfe der MHS-SPME wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Parameter identifiziert, die maßgeblich für die Effizienz der instrumentellen Analytik sind, insbesondere im Bereich der Probenvorbereitung. Die Auswahl des Materials für die Sorptionsphase stellt hier einen elementaren Schritt dar. Schließlich konnte durch die mehrfache Extraktion derselben Probe und der Berechnung der Extraktionsrate belegt werden, dass zur Analytik der vergleichsweise unpolaren C<sub>13</sub>-Norisoprenoide durch die Verwendung von Carboxen- und PDMS-Fasern deutlich höhere Extraktionsraten erreicht werden als bei einer Faser auf Polyacrylat-Basis. Gleichzeitig ist darauf zu achten, dass auch eine adäquate Desorptionsrate beim Transfer der Analyten auf das Trennsystem erreicht werden kann. Eine starke Erhöhung der Injektortemperatur von 220 auf 290 °C war für die vollständige Desorption der Analyten von der Carboxen-Faser nötig, um einerseits eine möglichst große Menge an Analyten in die Gaschromatographie zu überführen, und andererseits mögliche Carry-Over-Effekte auf nachfolgende Proben zu vermeiden. Allerdings verursacht eine dauerhaft höhere Injektortemperatur eine höhere thermische Belastung und damit einen schnelleren Verschleiß der Komponenten wie dem Septum oder dem Anfang der Trennsäule. Deshalb wurde für die weitere HS-SPME-Analytik die PDMS-Faser als Extraktionsfaser gewählt. Einen weiteren kritischen Punkt bei der Probenvorbereitung stellt die Methode der Probendurchmischung in der Äquilibrationsphase dar. Der Vergleich zwischen einem konventionellen Magnetrührer sowie den SMM-, Agitator- und Heatex-Modulen der Autosampler zeigte eine deutlich geringere Extraktionsleistung bei der Verwendung der Geräte, die nur die flüssige Phase durch Rühren bewegen. Eine zusätzliche Bewegung der Probengefäße, wie es beim Agitator und Heatex der Fall ist, führte zu einer schnelleren Einstellung des Gleichgewichts, für das vor allem der Transfer der Analyten von der flüssigen Phase in die Gasphase ausschlaggebend ist. Auch wenn die mechanische Bewegung zu einer verkürzten Lebensdauer der Extraktionsfaser führen kann, bedeutet eine schnellere Verteilung entweder eine höhere Extraktionsrate für den Fall, dass das Gleichgewicht noch nicht erreicht wurde, oder eine verkürzte Dauer der Äquilibrationsphase und damit eine kürzere Probenvorbereitungszeit. Aufbauend auf den Ergebnissen wurde die Methode zur Analytik von TDN, Vitispiran und anderen flüchtigen Inhaltsstoffen angepasst und implementiert, und wurde für die Analyse der hergestellten Weine in der weiteren Arbeit genutzt wurde.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden mehrere lang- und kurzfristige weinbauliche Maßnahmen in zwei- bis dreijährigen Versuchsreihen hinsichtlich ihrer Eignung zur Reduzierung von freiem und gebundenem TDN evaluiert. Dafür wurde die von Gök et al. publizierte Schnellmethode zur Erfassung von gebundenem TDN und Vitispiran am Forschungsinstitut etabliert und angewendet.<sup>280</sup> Außerdem wurden die Weine auch auf ihre Gehalte an anderen wichtigen Aromastoffen untersucht, ebenso wie einige Weine einer sensorischen Prüfung unterzogen wurden, um potentielle Qualitätsverluste zu identifizieren, die mit der zielgerichteten instrumentellen Analytik nicht zu erfassen sind.

Die Wahl der Unterlage hat dabei sowohl einen Einfluss auf die Wüchsigkeit, den Ertrag als auch auf die Menge an gebundenem TDN. Während für die Unterlage „Richter 110“ in zwei aufeinander folgenden Jahrgängen die höchsten und für die Unterlage „SO4“ jeweils die niedrigsten Gehalte an gebundenem TDN gemessen wurden, wiesen die anderen Parameter Schwankungen zwischen den Jahrgängen auf, die stärker waren als die Schwankungen innerhalb eines Jahrgangs. So lagen die Gehalte an gebundenem TDN und Vitispiran in den Rieslingweinen des relativ kühlen und feuchten Jahrgangs 2016 – mit einem niedrigen Wert an hefeverfügbarem Stickstoff – deutlich über den Gehalten der Weine des darauffolgenden Jahrgangs 2017. Insgesamt besaßen die 2017er Weine höhere Gehalte an Aromastoffen, als es 2016 der Fall war, allerdings neigten die Weine aus dem Jahr 2016 aufgrund des niedrigeren pH-Werts zu einer verstärkten hydrolytischen Freisetzung von TDN.

Des Weiteren wurde der Einfluss des Rieslingklons auf die hergestellten Weine betrachtet. Dies erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Jahrgängen und leistete damit einen wichtigen Beitrag bezüglich des Ausmaßes saisonaler Schwankungen. Wie in der Versuchsreihe mit variierenden Unterlagen hatte der Jahrgang selbst den stärksten Einfluss auf die untersuchten Merkmale, aber die Unterschiede zwischen den Klonselektionen wiederholten sich signifikant. Bei der tiefergehenden Beleuchtung der Gründe für die Unterschiede zwischen den Klonen ist festzuhalten, dass die Traubenstruktur einen gravierenden Einfluss auf die Bildung von gebundenem TDN hatte – je lockerbeeriger die Traube, desto mehr gebundenes TDN war vorhanden. Dies lässt sich vor allem durch die Sonnenexposition der einzelnen Traube erklären, die umso höher ist, je freier die Beere in der Traube positioniert ist. Je dichter dagegen die Traube gepackt ist, desto weniger Carotinoide werden in der Beerenhaut durch die UV-Strahlung abgebaut, resultierend in einem niedrigeren Gehalt an gebundenem TDN.

Für Beeren unterschiedlicher Größe waren ähnliche Ergebnisse zu erwarten, da mit einem geringeren Beerendurchmesser der Anteil der Schale und damit der Anteil der Carotinoidabbauprodukte am gesamten Beerengewicht steigt. Deswegen wurden die Beeren der einzelnen Klone nach ihrer Größe sortiert, und die aus den einzelnen Beerenfraktionen hergestellten Weine untersucht. Entgegen dieser Annahme konnte hinsichtlich der Beerengröße kein reproduzierbarer Trend in den Jahrgängen 2015-2017 festgestellt werden, weder bezüglich freiem oder gebundenem TDN noch in Bezug auf andere Aromastoffe.

Auch hier ist zu konstatieren, dass saisonale Schwankungen den Löwenanteil der Varianz verursachen, und daher Ergebnisse aus Studien, die weinbauliche Aspekte nur in einem einzelnen Jahrgang beleuchten, nicht beliebig auf andere Jahrgänge übertragen werden können, vor allem bezüglich einer besseren Eignung eines einzelnen spezifischen Parameters wie einer bestimmten Unterlage, einem spezifischen Klon oder einer bestimmten Beerengröße.

Ebenfalls untersucht wurde die weinbauliche Praxis der Minimalschnitterziehung, bei der ein Anstieg an freiem TDN von durchschnittlich 39% ermittelt wurde. Dabei stieg allerdings auch der Gehalt anderer Aromastoffe, insbesondere von  $\beta$ -Damascenon, Linalool, 4-Vinylguaiaicol und einiger Esterverbindungen signifikant an, die unter Umständen das Auftreten der Petrolnote durch Maskierungseffekte unterbinden können. Ein ähnlicher Anstieg der  $C_{13}$ -Norisoprenoide wurde bei einer verlängerten Reifezeit – bedingt durch eine spätere Ernte – festgestellt, allerdings ohne gleichzeitige Akkumulierung von positiv besetzten Aromastoffen oder deren Vorläufern.

Eine weitere Eingriffsmöglichkeit in den Stoffwechsel der Weinrebe stellen Entblätterungsmaßnahmen dar. Dadurch, dass eine höhere Exposition der Reben und Beeren gegenüber Temperatur und Sonnenexposition die Bildung von Carotinoiden anregt, führt eine intensive Entblätterung zu einem deutlichen Anstieg der  $C_{13}$ -Norisoprenoide als Abbauprodukte der Carotinoide. Verglichen mit der einseitigen Entfernung von 75% der Blätter in der Traubenzone zum Zeitpunkt der Véraison führte eine zeitgleiche, vollständige Laubentfernung zu einer Erhöhung von gebundenem TDN und Vitispiran um 43-98%, abhängig vor allem von den saisonalen Witterungsbedingungen. Ebenfalls entscheidend für die späteren Gehalte an gebundenem TDN und Vitispiran in Most und Wein war der Zeitpunkt der Entblätterung. So scheint eine Entblätterung zur Blüte die Carotinoidsynthese zu reduzieren, sodass in Folge auch weniger gebundene  $C_{13}$ -Norisoprenoide in den Beeren enthalten sind; die Laubentfernung einen Monat später dagegen führte zu einer Steigerung der Gehalte an gebundenen  $C_{13}$ -Norisoprenoiden, als es zur Blüte, oder einen Monat später zur Véraison der Fall war. Der vollständige Verzicht auf eine Entblätterung ist neben phytosanitären Gründen auch hinsichtlich der Gehalte an gebundenem TDN nicht sinnvoll: Die Gehalte an gebundenem TDN waren in den Weinen, die aus der nicht entblätterten Kontrollvariante hergestellt wurden, in jedem der drei untersuchten Jahrgänge höher als es bei den Weinen der Fall war, die von Reben geerntet wurden, die zur Blüte entblättert wurden. Die Gehalte an freiem TDN und Vitispiran folgten einem ähnlichen Verlauf, wenngleich die Unterschiede weniger ausgeprägt waren als bei den gebundenen Varianten. Die Analyse der anderen freien Aromastoffe und die Ergebnisse der Verkostung der hergestellten Weine betonen ebenfalls die Vorteile der Entblätterungsmaßnahmen zur Blüte oder zur Véraison. Hier wurden im Durchschnitt die höheren Gehalte an Estern gemessen und parallel dazu eine höhere Fruchtigkeit festgestellt, während unerwünschte sensorische Merkmale wie ein hartes Mundgefühl oder Bitterkeit verstärkt bei den Weinen aus der Kontrollvariante und der Variante

auftraten, die einen Monat nach der Blüte entblättert wurden. Die gängige Praxis der späten Entblätterung zur Fäulnisvermeidung aufgrund einer besseren Durchlüftung der Traubenzone im Herbst, kann durch diese Arbeit bestätigt werden, da durch die Entblätterung zu diesem Zeitpunkt auch keine unerwünschte Erhöhung des TDN-Potenzials auftritt, solange die Entblätterung in einem moderaten Maße durchgeführt wird.

Bei der Weinherstellung, im Speziellen beim Keltern der Trauben, hatte eine Erhöhung des Pressdrucks von 0 auf 1,5 bar einen starken Anstieg an gebundenem TDN und Vitispiran um 67% bzw. 128% im Mittel aus zwei aufeinander folgenden Jahrgängen zur Folge. Gleichzeitig stieg auch die Konzentration von  $\beta$ -Damascenon, 4-Vinylguaiaicol, Linalool und einiger Esterverbindungen zwischen 80% und 222% an, während sich der Gesamtsäuregehalt um 19% verringerte. Durch den höheren Säuregehalt der Fraktionen, die bei 0 bar und 0,4 bar gewonnen wurden, stieg allerdings die Freisetzungsrates von TDN und Vitispiran, sodass die Weine, die aus diesen beiden Fraktionen hergestellt wurden, nach einer neunmonatigen Lagerung die höchsten Konzentrationen an freiem TDN und Vitispiran aufwiesen. Außerdem führte der hohe Säuregehalt dazu, dass vor allem die Acetatester einer rapiden säurekatalysierten Spaltung unterlegen waren, die zu einer Abnahme zwischen 35% und 92% des ursprünglich in frisch fermentiertem Wein vorhandenen Gehalts führten. Ein hoher Gesamtsäuregehalt während der Gärung selbst, der durch Säuerung bzw. Entsäuerung des Mosts erreicht wird und zu Veränderungen im Hefemetabolismus führen kann, hatte dagegen auf die Menge des gebundenen TDN kaum Einfluss. Ein niedriger pH-Wert sorgt einerseits dafür, dass das Risiko eines bakteriellen Verderbs insbesondere zwischen dem Ende der Fermentation und der Abfüllung stark sinkt, andererseits kann ein zu niedriger pH-Wert, gemeinsam mit dem durch die Fermentation gebildeten Alkohol, dazu führen, dass es zu Gärstörungen kommt, die unter Umständen ein vorzeitiges Ende der Fermentation bewirken. Zusätzlich fördert ein hoher Säuregehalt den Abbau und die Oxidation von positiv besetzten Aromastoffen wie Linalool oder diversen Acetatestern. Während ein moderater Säuregehalt bei der Herstellung der Weine durchaus positiv betrachtet werden kann, so ist eine zu starke Säuerung aufgrund der Freisetzung von TDN, dem Abbau anderer Aromastoffe und der möglichen Verringerung der Hefeaktivität zu vermeiden.

Bei der Anreicherung des Mostes verringerte vor allem die Zugabe von stickstoffbasierten Nährsubstraten die Bildung von gebundenem TDN und Vitispiran, bedingt durch die Vermeidung der Unterversorgung der eingesetzten Hefen. Dabei wurde festgestellt, dass in einem Jahr, in dem der natürliche Stickstoffgehalt relativ niedrig ist, die Nährstoffgabe wesentlich effektiver war als in Jahren, in denen die Beeren bereits einen höheren Gehalt an nativem hefeverfügbarem Stickstoff aufweisen. Die generelle Anregung des Hefemetabolismus führte darüber hinaus auch zu einer Zunahme von Ethyl- und Acetatestern um 47% bis 130%;

gleichzeitig wurde eine Verringerung von 4-Vinylguaiacol und Fuselalkoholen um bis zu 72% in den Varianten mit einer höheren Stickstoffgabe festgestellt. Auch hier wirkt sich die Supplementierung weniger stark auf bereits zuvor stickstoffreichen Most aus.

Hohe Gärtemperaturen führten bei Hefen, die vor allem für die Gärung von Weißwein selektiert wurden, tendenziell zu einer verringerten Ausprägung grüner und fruchtiger Aromenoten, dagegen stieg die Bildung von würzigen und auch oxidierten Noten. Darunter scheint auch die verstärkte Bildung von gebundenen C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden zu fallen. So führte die Anhebung der Gärtemperatur von 12 auf 24 °C zu einer Steigerung der Konzentration an gebundenem TDN von knapp 50% in den zwei untersuchten Jahrgängen. Ebenso stiegen die Gehalte an  $\beta$ -Damascenon, 2-Phenylethanol und 2-Phenylethylacetat mit höherer Temperatur stark an, einhergehend mit einer Abnahme von Linalool und einigen Esterverbindungen. Die sensorische Verkostung der Weine spiegelt diese Beobachtungen in beiden untersuchten Jahrgängen wider. Die bei hohen Temperaturen fermentierten Weine waren deutlich dunkler und wurden verstärkt durch die Attribute „Honig“ und „Petrol“ beschrieben, während die bei 12 und 16 °C fermentierten Weine eine höhere Fruchtigkeit sowie grüne und apfelartige Attribute aufwiesen. Auf der anderen Seite bedingen niedrige Gärtemperaturen auch eine deutliche Verlängerung der Gärdauer sowie die Gefahr, dass die Gärung bei zunehmendem Alkoholgehalt ins Stocken kommt und noch deutliche Mengen an Restzucker im resultierenden Wein enthalten sind. Dies wurde innerhalb der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nur bei der Fermentation bei 12 °C beobachtet.

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss von verschiedenen Hefestämmen auf TDN und Vitispiran. Dabei wurden neun verschiedene Hefestämme eingesetzt, was zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Präferenz des jeweiligen Hefestamms zur Ausbildung von gebundenem TDN bzw. Vitispiran führte. Innerhalb der einzelnen Jahrgänge wurde durch die Variation des Hefestamms die Konzentration an gebundenem TDN zwischen 20 und 50% reduziert; ähnliche Ergebnisse wurden auch für gebundenes Vitispiran und freie Aromastoffe festgestellt. Jedoch gab es eine ausgeprägte Fluktuation der einzelnen Hefestämme zwischen den Jahrgängen, so sprachen die Hefen auf unterschiedliche Bedingungen wie der variierenden Zusammensetzung des Mosts in unterschiedlicher Weise an. Während bei der Hälfte der Hefen kein Trend zu erkennen war, eigneten sich zwei der Hefen besser für die Reduzierung des gebundenen TDN in Most mit hohem Stickstoffgehalt; die Fermentationen durch drei weitere Hefestämme führte zu Weinen mit niedrigeren TDN-Gehalten in Jahrgängen mit nährstoffarmen Most.

Durch die Unterlassung der Filtration der Weine vor der Abfüllung waren nach neunmonatiger Lagerung deutlich höhere Gehalte an Esterverbindungen, 4-Vinylguaiacol, Linalool sowie an gebundenem und freiem TDN und Vitispiran zu beobachten. Vor allem letzteres könnte durch die partielle Entfernung glykosidisch gebundener Vorläufer verursacht worden sein, die an

Makromoleküle wie Polysaccharide angelagert sind, und mit der Filtration entfernt werden. Dieser Trend war ausgeprägter, je niedriger der pH-Wert der zugrunde liegenden Weine war. Zudem findet durch die Filtration eine leichte Entsäuerung durch die Entfernung ausgefallenen Tartrats statt, was durch den niedrigeren Säuregehalt vermutlich zu einer verzögerten Freisetzung von TDN und Vitispiran aus ihren Vorläufern geführt hat. Damit bietet die Filtration bei niedrigen pH-Werten den Vorteil, dass der Gehalt an potentiell TDN reduziert wird; bei höheren pH-Werten führt eine Filtration zwar nicht zur Reduzierung des TDN-Gehalts, ist aber zur Vermeidung mikrobiellen Verderbs sinnvoll.

Intensiver untersucht wurde auch die Lagerung der Weine im Hinblick auf die Temperatur, die Art des Flaschenverschlusses und die Flaschenorientierung. Mit der Lagertemperatur wurde der größte Einflussparameter auf die Freisetzung von TDN wie auch Vitispiran identifiziert. Die Auswirkungen der anderen untersuchten Lagerungsparameter bleiben stark dahinter zurück, wobei die Übersichtung der Weine mit einer Stickstoffschutzatmosphäre bei der Lagerungsdauer von fünf Monaten keinerlei Einfluss auf die Konzentration an gebildetem TDN hatte. Damit ist der Einfluss anwesenden Sauerstoffs auf die TDN-Bildung als minimal anzusehen. Als ebenfalls relevant für die Konzentration an TDN sowie der Hälfte der anderen untersuchten Aromastoffe haben sich sowohl die Wahl des Flaschenverschlusses wie auch die Flaschenorientierung, also die horizontale bzw. vertikale Lagerung, ergeben: Die Verwendung von Kork als Flaschenverschlussmaterial reduzierte den Gehalt an freiem TDN nach fünfmonatiger Lagerung um rund ein Drittel gegenüber dem üblichen BVS-Schraubverschluss. Die Konzentrationen an Vitispiran sowie  $\beta$ -Damascenon lagen für die Weine in Flaschen mit Schraubverschluss ebenfalls um 28% bzw. 19% höher, während für die anderen Aromastoffe nur geringe Veränderungen beobachtet wurden. In liegend gelagertem Wein wurden unter anderem geringere Gehalte an TDN, Vitispiran und Linalool nachgewiesen, allerdings nur bei der niedrigsten Lagertemperatur von 5 °C. Bei Erhöhung der Lagertemperatur auf 16 bzw. 25 °C drehte sich das Verhältnis um, sodass in bei 25 °C liegend gelagertem Wein rund 67% mehr TDN enthalten war als in Wein, der stehend gelagert wurde.

Die Anwendung von Adsorptions- und Filtrationsmaßnahmen im Kleinst- sowie Technikumsmaßstab vermochte die Gehalte an vorliegendem freiem TDN in Weinen um bis zu 80% zu reduzieren, während die Abreicherung der meisten anderen Aromastoffe dagegen deutlich geringer war. Der Einsatz der als vielversprechend identifizierten Polymere in handelsüblichen Gebindegrößen von 750 mL führte nur zu einer geringen Verminderung des im Wein enthaltenen freien TDN aufgrund des geringen Volumens der Sorptionsphase. Es ist denkbar, dass der invasive Eingriff der Filtration in den Wein umgangen werden kann, indem die Einsätze im Flaschenverschluss weiter optimiert werden und unter Umständen TDN noch



spezifischer entfernt werden kann. Hieraus ergibt sich für die Zukunft noch weiterer Forschungsbedarf.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit durch die Schwellenwertbestimmungen mit geschulten Prüfern und Verbrauchern die sensorische Relevanz des die Petrol-Fehlnote verursachenden TDN ermittelt. Zudem wurden weinbauliche und oenologische Maßnahmen identifiziert und evaluiert, die geeignet sind, sowohl das TDN-Potential wie auch die Freisetzung und Anwesenheit des sensorisch aktiven freien TDN zu verringern. Besondere Aufmerksamkeit verdienen dabei die jeweils mehrjährigen Versuchsreihen, die die saisonalen Schwankungen vor allem für die weinbaulichen Parameter, aber auch für die Mostzusammensetzung mit einbeziehen, sodass der bisherige Wissenstand zusätzlich um den Einflussfaktor des Jahrgangs ergänzt wurde. Damit leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag für die Weinwissenschaft und Weinwirtschaft zur Anpassung der Weinherstellung an den fortschreitenden Klimawandel.



---

## 9 Literaturverzeichnis

- (1) Statistisches Bundesamt, Pro-Kopf-Verbrauch von Wein weltweit nach Ländern im Jahr 2019. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/73965/umfrage/weinkonsum-pro-kopf-ausgewaehlter-laender-im-jahr-2007/> (abgerufen am 24.02.2020).
- (2) Sechrist, R., The origin, diffusion, and globalization of Riesling. In *The Geography of Wine*, Springer Science & Business Media, New York, **2012**, 195-206.
- (3) Deutsches Weininstitut GmbH, 2019 / 2020 Deutscher Wein Statistik; Mainz **2020**.
- (4) Wüst, M., Wein — Qualität entscheidet sich in Nanogramm: Zur Biochemie des sortentypischen Weinaromas. *Chemie in unserer Zeit* **2003**, 37, 8-17.
- (5) Polášková, P.; Herszage, J.; Ebeler, S. E., Wine flavor: chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews* **2008**, 37, 2478-2489.
- (6) Black, C. A.; Parker, M.; Siebert, T. E.; Capone, D. L.; Francis, I. L., Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2015**, 21, 582-600.
- (7) Simpson, R. F., 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene: an important contributor to the bottle aged bouquet of wine. *Chem. Ind.* **1978**, 1, 37.
- (8) Sacks, G. L.; Gates, M. J.; Ferry, F. X.; Lavin, E. H.; Kurtz, A. J.; Acree, T. E. Sensory Threshold of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and Concentrations in Young Riesling and Non-Riesling Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 2998-3004.
- (9) Marais, J.; Versini, G.; van Wyk, C. J.; Rapp, A. Effect of Region on Free and Bound Monoterpene and C<sub>13</sub>-Norisoprenoid Concentrations in Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, 13, 71-77.
- (10) Ross, C. F.; Zwick, A. C.; Castro, L.; Harrison, R., Odour detection threshold and consumer rejection of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene in 1-year-old Riesling wines. *Austr. Grape Wine Res.* **2014**, 20, 335-339.
- (11) Winterhalter, P.; Gök, R. TDN and  $\beta$ -Damascenone: Two important carotenoid metabolites in wine. In *Carotenoid Cleavage Products*; Winterhalter, P., Ebeler, S. E., Eds.; ACS Symposium Series 1134; American Chemical Society: Washington, DC, **2013**. 125-137, <https://doi.org/10.1021/bk-2013-1134.ch011>.
- (12) Winterhalter, P.; Sefton, M. A.; Williams, P. J. Volatile C<sub>13</sub>-Norisoprenoid Compounds in Riesling wine are Generated from Multiple Precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 41, 277-283.
- (13) Nisar, N.; Li, L.; Lu, S.; Khin, N. C.; Pogson, B. J., Carotenoid Metabolism in Plants. *Mol. plant* **2015**, 8, 68-82.
- (14) Winterhalter, P.; Ebeler, S. E., *Carotenoid cleavage products*. American Chemical Society, Washington, DC, **2013**.
- (15) Rudy, H.; Scholten, G., Petrolnote im Riesling entgegenwirken. *Der Deutsche Weinbau* **2007**, 18, 32-34.
- (16) Rapp, A., Aromastoffe des Weines. *Chemie in unserer Zeit* **1992**, 26, 273-284.
- (17) Bundessortenamt, Beschreibende Sortenliste Reben. Hannover, **2015**.
- (18) de Boubée, D. R.; Cumsille, A. M.; Pons, M.; Dubourdieu, D., Location of 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet Sauvignon Grape Bunches and its Extractability during Vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, 53, 1-5.
- (19) Moreno-Arribas, M. V.; Polo, M. C., *Wine chemistry and biochemistry*. Springer Science, New York **2009**.

- (20) Waterhouse, A. L.; Sacks, G. L.; Jefferey, D. W., *Understanding Wine Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, **2016**.
- (21) Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A., *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications*. Second Edition, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, **2006**.
- (22) Swiegers, J.H.; Bartowsky, E.J.; Henschke, P.A.; Pretorius, I.S., Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 139-173.
- (23) Styger, G.; Prior, B.; Bauer, F. F., Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 1145-1159.
- (24) Rankine, B.; Pocock, K.,  $\beta$ -Phenethanol and n-hexanol in wines: Influence of yeast strain, grape variety and other factors; and taste thresholds. *Vitis* **1969**, *8*, 23.
- (25) Bakker, J.; Clarke, R. J., *Wine: flavour chemistry*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, **2011**.
- (26) Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J.-N.; Lavigne, V., Synthesis of Volatile Phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in Wines. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *62*, 191-202.
- (27) Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J.-N.; Pons, M., The origin of Ethylphenols in Wines. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, *60*, 165-178.
- (28) Francis, I.; Newton, J., Determining wine aroma from compositional data. *Austr. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 114-126.
- (29) Benito, S.; Palomero, F.; Morata, A.; Uthurry, C.; Suárez-Lepe, J., Minimization of ethylphenol precursors in red wines via the formation of pyranoanthocyanins by selected yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *132*, 145-152.
- (30) Simpson, R. F., Aroma and compositional changes in wine with oxidation, storage and ageing. *Vitis* **1978**, *17*, 274-87.
- (31) Rapp, A.; Güntert, M.; Ullemeyer, H., Über Veränderungen der Aromastoffe während der Flaschenlagerung von Weißweinen der Rebsorte Riesling. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1985**, *180*, 109-116.
- (32) Khairallah, R.; Reynolds, A. G.; Bowen, A. J. Harvest date effects on aroma compounds in aged Riesling icewines. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 4398-4409.
- (33) Mateo, J. J.; Jiménez, M., Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chrom. A* **2000**, *881*, 557-567.
- (34) Breitmaier, E., *Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, **2006**.
- (35) Wanke, M.; Skorupinska-Tudek, K.; Swiezewska, E., Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. *Acta Biochim. Polon.* **2001**, *48*, 663-672.
- (36) Martin, D. M.; Chiang, A.; Lund, S. T.; Bohlmann, J., Biosynthesis of wine aroma: transcript profiles of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase, geranyl diphosphate synthase, and linalool/nerolidol synthase parallel monoterpene glycoside accumulation in Gewürztraminer grapes. *Planta* **2012**, *236*, 919-929.
- (37) Vasserot, Y.; Arnaud, A.; Galzy, P., Monoterpene Glycosides in Plants and their Biotechnological Transformation. *Acta biotechnol.* **1995**, *15*, 77-95.
- (38) Raguso, R. A.; Pichersky, E., New Perspectives in Pollination Biology: Floral Fragrances. A day in the life of a linalool molecule: Chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: Linalool biosynthesis in flowering plants. *Plant Spec. Biol.* **1999**, *14*, 95-120.

- 
- (39) Lawo, N. C.; Weingart, G. J.; Schuhmacher, R.; Forneck, A., The volatile metabolome of grapevine roots: first insights into the metabolic response upon phylloxera attack. *Plant Physiology and Biochemistry* **2011**, *49*, 1059-1063.
- (40) Shao, J.-H.; Chen, J.; Zhao, C.-C.; Shen, J.; Liu, W.-Y.; Gu, W.-Y.; Li, K.-H., Insecticidal and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of chemical constituents from *Viburnum fordiae* Hance. *Nat. prod. Res.* **2019**, *33*, 2662-2667.
- (41) Belitz, G., Schieberle, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6. vollst. überarb. Ausgabe, Springer, Berlin, Heidelberg, **2008**.
- (42) Fischer, C.; Swoboda, I., *Riesling: die ganze Vielfalt der edelsten Rebe der Welt*. Hallwag, Ostfildern, **2005**.
- (43) Haeger, J. W., *Riesling Rediscovered: Bold, Bright, and Dry*. Univ of California Press, Oakland, **2016**.
- (44) Linsenmeier, A. W.; Löhnertz, O., Changes in Noriosprenoid Levels with Long-term Nitrogen Fertilisation in Different Vintages of *Vitis vinifera* var. Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2007**, *28*, 17-24.
- (45) Bindon, K. A.; Dry, P. R.; Loveys, B. R., Influence of Plant Water Status on the Production of C<sub>13</sub>-Norisoprenoid Precursors in *Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Sauvignon Grape Berries. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4493-4500.
- (46) Gerdes, S. M.; Winterhalter, P.; Ebeler, S. E. Effect of Sunlight Exposure on Norisoprenoid Formation in White Riesling Grapes. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*; Winterhalter, P., Rouseff, R. L., Eds.; ACS Symposium Series 802, American Chemical Society: Washington, DC, **2001**; 262-272.
- (47) Simpson, R. F.; Miller, G. C., Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis* **1983**, *22*, 51-63.
- (48) Black, C.; Francis, L.; Henschke, P.; Capone, D.; Anderson, S.; Day, M.; Holt, H.; Pearson, W.; Herderich, M.; Johnson, D., Aged Riesling and the development of TDN. *Wine Vitic. J.* **2012**, *27*, 20-26.
- (49) Schultz, H. R., Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Austr. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 2-12.
- (50) Winterhalter, P.; Skouroumounis, G. K., Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation. In *Biotechnology of Aroma Compounds*, edited by Berger, R. G.; Babel, W.; Blanch, H. W.; Cooney, C. L.; Enfors, S. O.; Eriksson, K. E. L.; Fiechter, A.; Klibanov, A. M.; Mattiasson, B.; Primrose, S. B.; Rehm, H. J.; Rogers, P. L.; Sahm, H.; Schügerl, K.; Tsao, G. T.; Venkat, K.; Villadsen, J.; von Stockar, U.; Wandrey, C., Springer Berlin Heidelberg, **1997**, 73-105.
- (51) Hjelmeland, A. K.; Ebeler, S. E., Glycosidically Bound Volatile Aroma Compounds in Grapes and Wine: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2015**, *66*, 1-11.
- (52) Sarry, J.-E.; Günata, Z., Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem.* **2004**, *87*, 509-521.
- (53) Gunata, Y.; Bayonove, C.; Baumes, R.; Cordonnier, R., The aroma of grapes I. Extraction and Determination of Free and Glycosidically Bound Fractions of Some Grape Aroma Components. *J. Chrom. A* **1985**, *331*, 83-90.
- (54) Kinoshita, T.; Hirata, S.; Yang, Z.; Baldermann, S.; Kitayama, E.; Matsumoto, S.; Suzuki, M.; Fleischmann, P.; Winterhalter, P.; Watanabe, N., Formation of damascenone derived from glycosidically bound precursors in green tea infusions. *Food Chem.* **2010**, *123*, 601-606.
-

- (55) Stahl-Biskup, E.; Intert, F.; Holthuijzen, J.; Stengele, M.; Schulz, G., Glycosidically Bound Volatiles—A Review 1986–1991. *Flav. Fragr. J.* **1993**, 8, 61-80.
- (56) Winterhalter, P.; Sefton, M. A.; Williams, P. J., Two-dimensional GC-DCCC Analysis of the Glycoconjugates of Monoterpenes, Norisoprenoids, and Shikimate-Derived Metabolites from Riesling Wine. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 1041-1048.
- (57) Marinos, V. A. Application of Fast Atom Bombardement Mass Spectrometry to the Examination of Glycoconjugates in Grape Juice and Wine, PhD Thesis, University of Adelaide, Australia, **1992**.
- (58) Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I., Flavonol Profiles of *Vitis vinifera* Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 992-1002.
- (59) Maicas, S.; Mateo, J. J., Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 67, 322-335.
- (60) Jones, P.; Vogt, T., Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **2001**, 213, 164-174.
- (61) Bowles, D.; Lim, E.-K.; Poppenberger, B.; Vaistij, F. E., Glycosyltransferases of Lipophilic Small Molecules. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, 57, 567-597.
- (62) Burbulis, I. E.; Winkel-Shirley, B., Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc. Nation. Acad. Sci.* **1999**, 96, 12929-12934.
- (63) Berger, R.; Drawert, F., Glycosilation of Terpenols and Aromatic Alcohols by Cell Suspension Cultures of Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Z. Naturforsch. C* **1988**, 43, 485-490.
- (64) Wilson, B.; Strauss, C. R.; Williams, P. J., Changes in Free and Glycosidically Bound Monoterpenes in Developing Muscat Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, 32, 919-924.
- (65) Li, X.-Y.; Wen, Y.-Q.; Meng, N.; Qian, X.; Pan, Q.-H., Monoterpenyl Glycosyltransferases Differentially Contribute to Production of Monoterpenyl Glycosides in Two Aromatic *Vitis vinifera* Varieties. *Front. Plant Sci.* **2017**, 8, 1226.
- (66) Godshaw, J.; Hjelmeland, A. K.; Zweigenbaum, J.; Ebeler, S. E., Changes in glycosylation patterns of monoterpenes during grape berry maturation in six cultivars of *Vitis vinifera*. *Food Chem.* **2019**, 297, 124921.
- (67) Reynolds, A. G.; Heuvel, J. E. V., Influence of Grapevine Training Systems on Vine Growth and Fruit Composition: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2009**, 60, 251-268.
- (68) Meyers, J. M.; Sacks, G. L.; Heuvel, J. E. V., Glycosylated Aroma Compound Responses in 'Riesling' Wine Grapes to Cluster Exposure and Vine Yield. *HortTechnol.* **2013**, 23, 581-588.
- (69) Loscos, N.; Hernández-Orte, P. n.; Cacho, J.; Ferreira, V., Comparison of the Suitability of Different Hydrolytic Strategies to Predict Aroma Potential of Different Grape Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 2468-2480.
- (70) Günata, Z.; Blondeel, C.; Vallier, M.; Lepoutre, J.; Sapis, J.; Watanabe, N., An Endoglycosidase from Grape Berry Skin of Cv. M. Alexandria Hydrolyzing Potentially Aromatic Disaccharide Glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 2748-2753.
- (71) Aryan, A.; Wilson, B.; Strauss, C.; Williams, P., The Properties of Glycosidases of *Vitis vinifera* and a Comparison of Their  $\beta$ -Glucosidase Activity with that of Exogenous Enzymes. An Assessment of Possible Applications in Enology. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, 38, 182-188.
- (72) Agarwal, S.; Rao, A., Carotenoids and chronic diseases. *Drug Metab. Interact.* **2000**, 17, 189-210.



- 
- (73) Maiani, G.; Periago Castón, M. J.; Catasta, G.; Toti, E.; Cambrodón, I. G.; Bysted, A.; Granado-Lorencio, F.; Olmedilla-Alonso, B.; Knuthsen, P.; Valoti, M., Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, S194-S218.
- (74) Alemzadeh, R.; Feehan, T., Variable effects of beta-carotene therapy in a child with erythropoietic protoporphyria. *Eur. J pediatr.* **2004**, *163*, 547-549.
- (75) Stahl, W.; Sies, H., Carotenoids and Protection against Solar UV Radiation. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2002**, *15*, 291-296.
- (76) Young, A.; Britton, G., *Carotenoids in photosynthesis*. Springer Science & Business Media, New York, **2012**.
- (77) Arathi, B. P.; Sowmya, P. R.-R.; Vijay, K.; Baskaran, V.; Lakshminarayana, R., Metabolomics of carotenoids: The challenges and prospects—A review. *Trend. Food. Sci. Technol.* **2015**, *45*, 105-117.
- (78) Fraser, P. D.; Bramley, P. M., The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progr. Lip. Res.* **2004**, *43*, 228-265.
- (79) Watzl, B.; Bub, A., Carotenoids. *Ernährungs-Umschau* **2001**, *48*, 71-74.
- (80) Schwartz, S. H.; Qin, X.; Zeevaart, J. A., Elucidation of the Indirect Pathway of Absciscic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant physiol.* **2003**, *131*, 1591-1601.
- (81) Floss, D. S.; Walter, M. H., Role of carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1) in apocarotenoid biogenesis revisited. *Plant Signal. Behav* **2009**, *4*, 172-175.
- (82) Merchant, S.; Sawaya, M. R., The Light Reactions: A Guide to Recent Acquisitions for the Picture Gallery. *Plant Cell* **2005**, *17*, 648-663.
- (83) Bergantino, E.; Segalla, A.; Brunetta, A.; Teardo, E.; Rigoni, F.; Giacometti, G. M.; Szabò, I., Light-and pH-dependent structural changes in the PsbS subunit of photosystem II. *Proc. Nation. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 15265-15270.
- (84) Breitenbach, J.; Sandmann, G.,  $\zeta$ -Carotene cis isomers as products and substrates in the plant poly-cis carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta* **2005**, *220*, 785-793.
- (85) Thompson, A. J.; Jackson, A. C.; Parker, R. A.; Morpeth, D. R.; Burbidge, A.; Taylor, I. B., Absciscic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and absciscic acid. *Plant Mol. Biol.* **2000**, *42*, 833-845.
- (86) Just, B.; Santos, C.; Fonseca, M.; Boiteux, L.; Oloizia, B.; Simon, P., Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theor. Appl. Genet.* **2007**, *114*, 693-704.
- (87) Nau, H.; Stahl, W., Vitamin A und Carotinoide. In *Vitamine und Spurenelemente: Bedarf, Mangel, Hypervitaminosen und Nahrungsergänzung*, edited by Dunkelberg, H.; Gebel, T.; Hartwig, A., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, 1-26.
- (88) Schopfer, P.; Brennicke, A., *Pflanzenphysiologie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2016**.
- (89) Mangels, A. R.; Holden, J. M.; Beecher, G. R.; Forman, M. R.; Lanza, E., Carotenoid Content of Fruits and Vegetables: An Evaluation of Analytic Data. *J. Am. Diet. Assoc.* **1993**, *93*, 284-296.
- (90) Rodriguez-Amaya, D. B., *A guide to carotenoid analysis in foods*. ILSI press, Washington, **2001**.
-

- (91) Baumes, R.; Wirth, J.; Bureau, S.; Gunata, Y.; Razungles, A., Biogenesis of C<sub>13</sub> norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 3-14.
- (92) Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., *Carotenoids, vol. 4: natural functions*. Springer Science & Business Media, New York, **2008**.
- (93) Guedes de Pinho, P.; Martins, R.; Vivier, M.; Young, P.; Oliveira, C.; Silva Ferreira, A., Monitoring Carotenoids and Derived Compounds in Grapes and Port Wines: Impact on Quality. In *Carotenoid Cleavage Products*; Winterhalter, P., Ebeler, S. E., Eds.; ACS Symposium Series 1134; American Chemical Society: Washington, DC, **2013**. 125-137, <https://doi.org/10.1021/bk-2013-1134.ch011>.
- (94) Hager, A., Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin→ Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung. *Planta* **1969**, *89*, 224-243.
- (95) Yamamoto, H. Y., Biochemistry of the Violaxanthin Cycle in Higher Plants. *Pure Appl. Chem.* **1979**, *51*, 639-648.
- (96) Niyogi, K. K.; Truong, T. B., Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2013**, *16*, 307-314.
- (97) Li, X.-P.; Björkman, O.; Shih, C.; Grossman, A. R.; Rosenquist, M.; Jansson, S.; Niyogi, K. K., A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **2000**, *403*, 391-395.
- (98) Eskling, M.; Arvidsson, P. O.; Åkerlund, H. E., The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plant.* **1997**, *100*, 806-816.
- (99) Demmig-Adams, B.; Adams, W. W., The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* **1996**, *1*, 21-26.
- (100) Jahns, P.; Holzwarth, A. R., The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2012**, *1817*, 182-193.
- (101) Adams, W. W.; Demmig-Adams, B., Operation of the xanthophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. *Planta* **1992**, *186*, 390-398.
- (102) Ortoidze, T.; Düring, H., Light utilisation and thermal dissipation in light-and shade-adapted leaves of *Vitis* genotypes. *Vitis* **2015**, *40*, 131.
- (103) von Lintig, J.; Vogt, K., Filling the Gap in Vitamin A Research - Molecular Identification of an Enzyme Cleaving  $\beta$ -Carotene to Retinal. *J. Biolog. Chem.* **2000**, *275*, 11915-11920.
- (104) Huang, F.-C.; Horváth, G.; Molnár, P.; Turcsi, E.; Deli, J.; Schrader, J.; Sandmann, G.; Schmidt, H.; Schwab, W., Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*. *Phytochem.* **2009**, *70*, 457-464.
- (105) Simkin, A. J.; Schwartz, S. H.; Auldrige, M.; Taylor, M. G.; Klee, H. J., The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles  $\beta$ -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J.* **2004**, *40*, 882-892.
- (106) Tan, B. C.; Joseph, L. M.; Deng, W. T.; Liu, L.; Li, Q. B.; Cline, K.; McCarty, D. R., Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* **2003**, *35*, 44-56.
- (107) Huang, F.-C.; Molnár, P.; Schwab, W., Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes. *J. Experim. Bot.* **2009**, *60*, 3011-3022.

- 
- (108) Walter, M. H.; Floss, D. S.; Strack, D., Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta* **2010**, 232, 1-17.
- (109) Young, P. R.; Lashbrooke, J. G.; Alexandersson, E.; Jacobson, D.; Moser, C.; Velasco, R.; Vivier, M. A., The genes and enzymes of the carotenoid metabolic pathway in *Vitis vinifera* L. *BMC Genom.* **2012**, 13, 243.
- (110) Mathieu, S.; Terrier, N.; Procureur, J.; Bigey, F.; Günata, Z., A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C<sub>13</sub>-norisoprenoid accumulation. *J. Experim. Bot.* **2005**, 56, 2721-2731.
- (111) Kwasniewski, M. T.; Vanden Heuvel, J. E.; Pan, B. S.; Sacks, G. L., Timing of Cluster Light Environment Manipulation during Grape Development affects C<sub>13</sub> Norisoprenoid and Carotenoid Concentrations in Riesling. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 6841-6849.
- (112) Pfündel, E.; Bilger, W., Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photos. Res.* **1994**, 42, 89-109.
- (113) During, H.; Davtyan, A., Developmental changes of primary processes of photosynthesis in sun-and shade-adapted berries of two grapevine cultivars. *Vitis* **2002**, 41, 63-68.
- (114) Marais, J.; Van Wyk, C.; Rapp, A., Carotenoid Levels in Maturing Grapes as Affected by Climatic Regions, Sunlight and Shade. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1991**, 12, 64-69.
- (115) Mendes-Pinto, M. M., Carotenoid breakdown products the-norisoprenoids-in wine aroma. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, 483, 236-245.
- (116) Werkhoff, P.; Bretschneider, W.; Güntert, M.; Hopp, R.; Surburg, H., Chirospecific analysis in flavor and essential oil chemistry Part B. Direct enantiomer resolution of *trans*- $\alpha$ -ionone and *trans*- $\alpha$ -damascone by inclusion gas chromatography. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991**, 192, 111-115.
- (117) Raina, B. L.; Agarwal, S. G.; Bhatia, A. K.; Gaur, G. S., Changes in Pigments and Volatiles of Saffron (*Crocus sativus* L) During Processing and Storage. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, 71, 27-32.
- (118) Gong, X.; Han, Y.; Zhu, J.; Hong, L.; Zhu, D.; Liu, J.; Zhang, X.; Niu, Y.; Xiao, Z., Identification of the aroma-active compounds in Longjing tea characterized by odor activity value, gas chromatography-olfactometry, and aroma recombination. *Int. J. Food Prop.* **2017**, 20, S1107-S1121.
- (119) Winterhalter, P.; Rouseff, R. L., *Carotenoid-derived aroma compounds*. Winterhalter, P., Rouseff, R. L., Eds.; ACS Symposium Series 802, American Chemical Society: Washington, DC, **2001**.
- (120) Skouroumounis, G. K.; Sefton, M. A., The formation of  $\beta$ -damascenone in wine. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*; Winterhalter, P., Rouseff, R. L., Eds.; ACS Symposium Series 802, American Chemical Society: Washington, DC, **2001**; 241-254.
- (121) Fleischmann, P.; Studer, K.; Winterhalter, P., Partial Purification and Kinetic Characterization of a Carotenoid Cleavage Enzyme from Quince Fruit (*Cydonia oblonga*). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 1677-1680.
- (122) MacTavish, H.; Davies, N. W.; Menary, R. C., Bound volatiles in brown Boronia flowers (*Boronia megastigma*). In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*; Winterhalter, P., Rouseff, R. L., Eds.; ACS Symposium Series 802, American Chemical Society: Washington, DC, **2001**, 183-193.
- (123) Suzuki, M.; Matsumoto, S.; Fleischmann, H.-P.; Shimada, H.; Yamano, Y.; Ito, M.; Watanabe, N., Identification of  $\beta$ -damascenone progenitors and their biogenesis in rose
-

- flowers (*Rosa damascena* Mill.). In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*; Winterhalter, P., Rouseff, R. L., Eds.; ACS Symposium Series 802, American Chemical Society: Washington, DC, **2001**, 189-101.
- (124) Sefton, M.; Skouroumounis, G. K.; Massywestropp, R. A.; Williams, P., Norisoprenoids in *Vitis vinifera* White Wine Grapes and the Identification of a Precursor of Damascenone in These Fruits. *Austr. J. Chem.* **1989**, *42*, 2071-2084.
- (125) Versini, G.; Rapp, A.; Marais, J.; Mattivi, F.; Spraul, M., A new 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) precursor isolated from Riesling grape products: partial structure elucidation and possible reaction mechanism. *Vitis* **1996**, *35*, 15-21.
- (126) Sefton, M. A.; Winterhalter, P.; Williams, P. J., Free and Bound 6, 9-Dihydroxymegastigm-7-en-3-one in *Vitis vinifera* Grapes and Wine. *Phytochem.* **1992**, *31*, 1813-1815.
- (127) Roscher, R.; Winterhalter, P., Application of Multilayer Coil Countercurrent Chromatography for the Study of *Vitis vinifera* cv. Riesling Leaf Glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1452-7.
- (128) Baumes, R. L.; Aubert, C. C.; Günata, Z. Y.; De Moor, W.; Bayonove, C. L.; Tapiero, C., Structures of Two C<sub>13</sub>-Norisoprenoid Glucosidic Precursors of Wine Flavor. *J. Ess. Oil Res.* **1994**, *6*, 587-599.
- (129) Full, G.; Winterhalter, P., Application of online coupled mass spectrometric techniques for the study of isomeric vitispiranes and their precursors of grapevine cv. Riesling. *Vitis* **1994**, *33*, 241-244.
- (130) Skouroumounis, G. K.; Winterhalter, P., Glycosidically Bound Norisoprenoids from *Vitis vinifera* cv. Riesling Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1068-1072.
- (131) Winterhalter, P.; Baderschneider, B.; Bonnländer, B., Analysis, Structure, and Reactivity of Labile Terpenoid Aroma Precursors in Riesling Wine. In *Chemistry of Wine Flavor Vol. 714*, American Chemical Society, Washington, **1998**, 1-12.
- (132) Schreier, P.; Drawert, F.; Kerényi, Z.; Junker, A., Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe des Weines VI. Aromastoffe in Tokajer Trockenbeerenauslese (Aszu)-Weinen a) Neutralstoffe. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1976**, *161*, 249-258.
- (133) Bertuccioli, M.; Viani, R., Red wine aroma: Identification of Headspace Constituents. *J. Sci. Food Agric.* **1976**, *27*, 1035-1038.
- (134) Stevens, S. S.; Galanter, E. H., Ratio Scales and Category Scales for a Dozen Perceptual Continua. *J. Experim. Psychol.* **1957**, *54*, 377.
- (135) Stevens, S. S., The Surprising Simplicity of Sensory Metrics. *Am. Psychol.* **1962**, *17*, 29.
- (136) Lawless, H. T.; Heymann, H., *Sensory evaluation of food: principles and practices*. Springer Science & Business Media, New York, **2010**.
- (137) Ferreira, A. C. S.; Guedes de Pinho, P., Analytical Method for Determination of Some Aroma Compounds on White Wines by Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 2817-2820.
- (138) Schuettler, A.; Friedel, M.; Jung, R.; Rauhut, D.; Darriet, P., Characterizing aromatic typicality of Riesling wines: merging volatile compositional and sensory aspects. *Food Res. Int.* **2015**, *69*, 26-37.
- (139) Marais, J.; Van Wyk, C. J.; Rapp, A., Effect of Storage Time, Temperature and Region on the Levels of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene and Other Volatiles, and on Quality of Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 33-44.
-

- 
- (140) Gueldner, A.; Winterhalter, P., Structures of Two New Ionone Glycosides from Quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 2142-2146.
- (141) Humpf, H. U.; Winterhalter, P.; Schreier, P., 3,4-Dihydroxy-7,8-dihydro- $\beta$ -ionone  $\beta$ -D-glucopyranoside: Natural Precursor of 2,2,6,8-Tetramethyl-7,11-dioxatricyclo[6.2.1.0<sup>1,6</sup>]undec-4-ene (Riesling Acetal) and 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene in Red Currant (*Ribes rubrum* L.) Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 1833-1835.
- (142) Winterhalter, P., 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) formation in wine. 1. Studies on the Hydrolysis of 2,6,10,10-Tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-6-ene-2,8-diol Rationalizing the Origin of TDN and Related C<sub>13</sub> Norisoprenoids in Riesling Wine. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 1825-1829.
- (143) Di Stefano, R., Presence of favorable organoleptic characteristics in long-aged white wines. Studies on volatile components and some chemical and physical parameters of Riesling wines produced in Germany. *Riv. Vitic. Enol.* **1985**, 38, 228-241.
- (144) Loscos, N.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V., Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine aging. *Food Chem.* **2010**, 120, 205-216.
- (145) Pedroza, M. A.; Zalacain, A.; Lara, J. F.; Salinas, M. R., Global grape aroma potential and its individual analysis by SBSE–GC–MS. *Food Res. Int.* **2010**, 43, 1003-1008.
- (146) Rudy, H., Petrol note in wine: origin and reduction. *Der Deutsche Weinbau* **2015**, 21, 32-35.
- (147) Friedel, M.; Sorrentino, V.; Blank, M.; Schuettler, A., Influence of berry diameter and colour on some determinants of wine composition of *Vitis vinifera* L. cv. Riesling. *Austr. Grape Wine Res.* **2016**, 22, 215-225.
- (148) Yuan, F.; Qian, M. C., Development of C<sub>13</sub>-norisoprenoids, carotenoids and other volatile compounds in *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot noir grapes. *Food Chem.* **2016**, 192, 633-641.
- (149) Grebneva, Y.; Bellon, J. R.; Herderich, M. J.; Rauhut, D.; Stoll, M.; Hixson, J. L., Understanding Yeast Impact on 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene Formation in Riesling Wine through a Formation-Pathway-Informed Hydrolytic Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, 67, 13487-13495.
- (150) Daniel, M. A.; Capone, D. L.; Sefton, M. A.; Elsey, G. M., Riesling acetal is a precursor to 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) in wine. *Austr. Grape Wine Res.* **2009**, 15, 93-96.
- (151) Winterhalter, P., Bound Terpenoids in the Juice of the Purple Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims). *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 452-455.
- (152) Simpson, R. F., Strauss, C.R., Williams, P.J., Vitispirane: a C<sub>13</sub>-spiro-ether in the aroma volatiles of grape juice, wines and distilled grape spirits. *Chem. Ind.* **1977**, 15, 663-664.
- (153) Schulte-Elte, K. H.; Gautschi, F.; Renold, W.; Hauser, A.; Fankhauser, P.; Limacher, J.; Ohloff, G., Vitispiranes, Important Constituents of Vanilla Aroma. *Helv. Chim. Acta* **1978**, 61, 1124-32.
- (154) Waldmann, D.; Winterhalter, P., Identification of a novel vitispirane precursor in Riesling wine. *Vitis* **1992**, 31, 169-74.
- (155) Eggers, N. J.; Bohna, K.; Dooley, B., Determination of Vitispirane in Wines by Stable Isotope Dilution Assay. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, 57, 226-232.
-



- (156) Pineau, B.; Barbe, J.-C.; Van Leeuwen, C.; Dubourdieu, D., Which Impact for  $\beta$ -Damascenone on Red Wines Aroma? *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4103-4108.
- (157) Sakan, T.; Isoe, S.; Hyeon, S. B., The Structure of Actinidiolide, Dihydroactinidiolide and Actinidol. *Tetrahedr. Lett.* **1967**, *8*, 1623-1627.
- (158) Dimitriadis, E.; Strauss, C. R.; Wilson, B.; Williams, P. J., The Actinidols: Nor-isoprenoid Compounds in Grapes, Wines and Spirits. *Phytochem.* **1985**, *24*, 767-770.
- (159) Strauss, C. R.; Dimitriadis, E.; Wilson, B.; Williams, P. J., Studies on the Hydrolysis of Two Megastigma-3,6,9-triols Rationalizing the Origins of Some Volatile C<sub>13</sub> Norisoprenoids of *Vitis vinifera* Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 145-149.
- (160) Marais, J., 1, 1, 6-Trimethyl-1, 2-dihydronaphthalene (TDN): A possible Degradation product of Lutein and beta-Carotene. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 52-55.
- (161) Selhorst, P. Minimierungsstrategie für 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin (TDN) - Verursacher der Petrol-Fehlnote in Wein und Sekt. PhD Thesis, Technische Universität Braunschweig, Verlag Dr. Hut, München, **2019**.
- (162) Gök, R. Einfluss von Hefen auf die glykosidisch gebundenen Aromavorstufen und Untersuchungen zur Vermeidung der TDN-Fehlnote in Riesling, PhD Thesis, Technische Universität Braunschweig, Verlag Dr. Hut, München, **2015**.
- (163) Rychlik, M.; Asam, S., Stable Isotope Dilution Assays for the Quantification of Organic Trace Components in the Analysis of Food. *Umweltwiss. Schadst. Forsch.* **2009**, *21*, 470-482.
- (164) Sweeley, C. C.; Elliott, W.; Fries, I.; Ryhage, R., Mass Spectrometric Determination of Unresolved Components in Gas Chromatographic Effluents. *Anal. Chem.* **1966**, *38*, 1549-1553.
- (165) Horwitz, W.; Kamps, L. V. R.; Boyer, K. W., Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents. *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists* **1980**, *63*, 1344-1354.
- (166) Milo, C.; Blank, I., Quantification of Impact Odorants in Food by Isotope Dilution Assay: Strength and Limitations. In *Flavor Analysis Vol. 705*; Mussinan, C. J.; Morello, M. J.; Eds., American Chemical Society ACS, Washington, **1998**, 250-259
- (167) Römpf Chemielexikon, <https://roempf.thieme.de> (abgerufen am 20.06.2020).
- (168) Bartell, L.; Higginbotham, H., Electron Diffraction Study of the Structures of Ethane and Deuteroethane. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 851-856.
- (169) Schmarr, H.-G.; Slabizki, P.; Müntnich, S.; Metzger, C.; Gracia-Moreno, E., Ionic liquids as novel stationary phases in gas liquid chromatography: Inverse or normal isotope effect? *J. Chrom. A* **2012**, *1270*, 310-317.
- (170) Ullrich, S.; Neef, S. K.; Schmarr, H. G., Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis of low-molecular-weight sulfur volatiles with pulsed flame photometric detection and quantification by a stable isotope dilution assay. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41*, 899-909.
- (171) Arthur, C. L.; Pawliszyn, J., Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145-2148.
- (172) Yang, X.; Peppard, T., Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1925-1930.
- (173) Souza-Silva, É. A.; Gionfriddo, E.; Pawliszyn, J., A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. *Trends Anal. Chem.* **2015**, *71*, 236-248.



- 
- (174) Ahmed, I.; Fayyaz, F.; Nasir, M.; Niaz, Z.; Furnari, M.; Perry, L., Extending landscape of volatile metabolites as novel diagnostic biomarkers of inflammatory bowel disease - A review. *Scand. J. Gastroent.* **2015**, *51*, 1-8.
- (175) Pawliszyn, J., *Handbook of solid phase microextraction*. Elsevier, Oxford, **2012**.
- (176) Pawliszyn, J., 2 - Theory of Solid-Phase Microextraction. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*, Elsevier: Oxford, **2012**, 13-59.
- (177) Vitenberg, A. G.; Kalacheva, N. I., Quantitative Headspace Analysis under Non-Equilibrium Conditions. *J. Chrom.* **1986**, *368*, 21-9.
- (178) Martinez-Urunuela, A.; Gonzalez-Saiz, J. M.; Pizarro, C., Multiple solid-phase microextraction in a non-equilibrium situation. Application in quantitative analysis of chlorophenols and chloroanisoles related to cork taint in wine. *J. Chrom. A* **2005**, *1089*, 31-38.
- (179) Carrillo, J. D.; Tena, M. T., Determination of volatile oak compounds in aged wines by multiple headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry (MHS-SPME-GC-MS). *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 937-943.
- (180) Kolb, B., Multiple Headspace Extraction - A Procedure for Eliminating the Influence of the Sample Matrix in Quantitative Headspace Gas Chromatography. *Chromatographia* **1982**, *15*, 587-94.
- (181) De la Calle Garcia, D.; Magnaghi, S.; Reichenbaecher, M.; Danzer, K., Systematic Optimization of the Analysis of Wine Bouquet Components by Solid-Phase Microextraction. *J. High Res. Chrom.* **1996**, *19*, 257-262.
- (182) Darrouzes, J.; Bueno, M.; Pecheyran, C.; Holeman, M.; Potin-Gautier, M., New approach of solid-phase microextraction improving the extraction yield of butyl and phenyltin compounds by combining the effects of pressure and type of agitation. *J. Chrom. A* **2005**, *1072*, 19-27.
- (183) Iland, P. D.; Dry, P.; Proffitt, T.; Tyerman, S., *The Grapevine: From the Science to the Practice of Growing Vines for Wine*. Patrick Iland Wine Promotions Pty Ltd: Adelaide, Australia, **2011**.
- (184) Tello, J.; Ibáñez, J., What do we know about grapevine bunch compactness? A state-of-the-art review. *Austr. Grape Wine Res.* **2018**, *24*, 6-23.
- (185) Andrew, G. R.; Douglas, A. W., Rootstocks Impact Vine Performance and Fruit Composition of Grapes in British Columbia. *HortTechnol.* **2001**, *11*, 419-427.
- (186) Jones, T. H.; Cullis, B. R.; Clingeffer, P. R.; Rühl, E. H., Effects of novel hybrid and traditional rootstocks on vigour and yield components of Shiraz grapevines. *Austr. Grape Wine Res.* **2009**, *15*, 284-292.
- (187) Stevens, R. M.; Pech, J. M.; Gibberd, M. R.; Walker, R. R.; Nicholas, P. R., Reduced irrigation and rootstock effects on vegetative growth, yield and its components, and leaf physiological responses of Shiraz. *Austr. Grape Wine Res.* **2010**, *16*, 413-425.
- (188) Wooldridge, J.; Louw, P.; Conradie, W., Effects of Rootstock on Grapevine Performance, Petiole and Must Composition, and Overall Wine Score of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay and Pinot Noir. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2010**, *31*, 45-48.
- (189) Berdeja, M.; Nicolas, P.; Kappel, C.; Dai Zhan, W.; Hilbert, G.; Peccoux, A.; Ollat, N.; Gomes, E.; Delrot, S.; Lafontaine, M., Water limitation and rootstock genotype interact to alter grape berry metabolism through transcriptome reprogramming. *Hortic. Res.* **2015**, *2*, 15012.
-

- (190) Zhang, L.; Marguerit, E.; Rossdeutsch, L.; Ollat, N.; Gambetta, G. A., The influence of grapevine rootstocks on scion growth and drought resistance. *Theor. Experim. Plant Physiol.* **2016**, *28*, 143-157.
- (191) Habran, A.; Helwi, P.; Hilbert, G.; Ollat, N.; Gomes, E.; van Leeuwen, C.; Delrot, S.; Commisso, M.; Negri, S.; Guzzo, F., Rootstocks/Scion/Nitrogen Interactions Affect Secondary Metabolism in the Grape Berry. *Front Plant Sci.* **2016**, *7*, 1134.
- (192) da Silva, M. J. R.; Vedoato, B. T. F.; Lima, G. P. P.; Moura, M. F.; Coser, G. M. A. G.; Watanabe, C. Y.; Tecchio, M. A., Phenolic compounds and antioxidant activity of red and white grapes on different rootstocks. *Afr. J. Biotechnol.* **2017**, *16*, 664-671.
- (193) Cheng, J.; Wei, L.; Mei, J.; Wu, J., Effect of rootstock on phenolic compounds and antioxidant properties in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. 'Red Alexandria'. *Sci. Hort.* **2017**, *217*, 137-144.
- (194) Wang, Y.; Chen, W.-K.; Gao, X.-T.; He, L.; Yang, X.-H.; He, F.; Duan, C.-Q.; Wang, J., Rootstock-Mediated Effects on Cabernet Sauvignon Performance: Vine Growth, Berry Ripening, Flavonoids, and Aromatic Profiles. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*.
- (195) Spayd, S. E.; Wample, R. L.; Evans, R. G.; Stevens, R. G.; Seymour, B. J.; Nagel, C. W., Nitrogen Fertilization of White Riesling Grapes in Washington. Must and Wine Composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, *45*, 34-42.
- (196) Koundouras, S.; Marinos, V.; Gkoulioti, A.; Kotseridis, Y.; van Leeuwen, C., Influence of Vineyard Location and Vine Water Status on Fruit Maturation of Nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on Wine Phenolic and Aroma Components. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5077-5086.
- (197) Schüttler, A. Influencing factors on aromatic typicality of wines from *Vitis vinifera* L. cv. Riesling - sensory, chemical and viticultural insights, PhD thesis, University of Bordeaux, **2013**.
- (198) Van Leeuwen, C.; Roby, J.-P.; Alonso-Villaverde, V.; Gindro, K., Impact of Clonal Variability in *Vitis vinifera* Cabernet franc on Grape Composition, Wine Quality, Leaf Blade Stilbene Content, and Downy Mildew Resistance. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 19-24.
- (199) Mehofer, M.; Schmuckenschlager, B.; Hanak, K.; Vitovec, N.; Braha, M.; Christner, F.; Prinz, M., Evaluation of grape quality, yield, pruning wood weight, phenological development and wine quality with the Riesling clones 239-12, 237-20, 239-20, 198-30 and 110-11 over a period of 14 years. *Mitt. Klosterneuburg* **2015**, *65*, 204-220.
- (200) Hed, B.; Ngugi, H. K.; Travis, J. W., Relationship Between Cluster Compactness and Bunch Rot in Vignoles Grapes. *Plant Disease* **2009**, *93*, 1195-1201.
- (201) Sponholz, W. R.; Hühn, T., Factors influencing the ageing of Riesling wines - Clonal material and used yeast strain. *Vitic. Enol. Sci.* **1997**, *52*, 103-108.
- (202) Marais, J.; Rapp, A., The Selection of Aroma-Rich Clones of *Vitis vinifera* L. cv. Gewürztraminer and Weißer Riesling by Means of Terpene Analyses. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1991**, *12*, 51-56.
- (203) Kotseridis, Y.; Beloqui, A. A.; Bertrand, A.; Doazan, J., An Analytical Method for Studying the Volatile Compounds of Merlot noir Clone Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 44-48.
- (204) Šuklje, K.; Antalick, G.; Buica, A.; Langlois, J.; Coetzee, Z. A.; Gouot, J.; Schmidtke, L. M.; Deloire, A. Clonal differences and impact of defoliation on Sauvignon blanc (*Vitis vinifera* L.) wines: a chemical and sensory investigation. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 915-926.

- 
- (205) Holt, H. E.; Francis, I. L.; Field, J.; Herderich, M. J.; Iland, P. G., Relationships between berry size, berry phenolic composition and wine quality scores for Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) from different pruning treatments and different vintages. *Austr. Grape Wine Res.* **2008**, *14*, 191-202.
- (206) Xie, S.; Tang, Y.; Wang, P.; Song, C.; Duan, B.; Zhang, Z.; Meng, J., Influence of natural variation in berry size on the volatile profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Merlot and Cabernet Gernischt grapes. *PloS one* **2018**, *13*, e0201374-e0201374.
- (207) Clingeleffer, P. R., Response of Riesling clones to mechanical hedging and minimal pruning of cordon trained vines (MPCT)-implications for clonal selection. *Vitis* **1988**, *27*, 87-93.
- (208) Bowed, P. A., Kliewer, W.M., Influence of Clonal Variation, Pruning Severity, and Cane Structure on Yield Component Development in 'Cabernet Sauvignon' Grapevines. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1990**, *115*, 530-534.
- (209) McCarthy, M. G.; Ciriaco, R. M., Minimal pruning effects on the performance of selections of four *Vitis vinifera* cultivars. *Vitis* **1990**, *29*, 85-96.
- (210) Reynolds, A. G.; Wardle, D. A., Evaluation of Minimal Pruning upon Vine Performance and Berry Composition of Chancellor. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 45-48.
- (211) Schultz, H. R., Grape canopy structure, light microclimate and photosynthesis. I. A two-dimensional model of the spatial distribution of surface area densities and leaf ages in two canopy systems. *Vitis* **1995**, *34*, 211-216.
- (212) Kalua, C. M.; Boss, P. K., Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) from fruitset to harvest. *Austr. Grape Wine Res.* **2010**, *16*, 337-348.
- (213) Moreno, J. J.; Cerpa-Calderón, F.; Cohen, S. D.; Fang, Y.; Qian, M.; Kennedy, J. A., Effect of postharvest dehydration on the composition of pinot noir grapes (*Vitis vinifera* L.) and wine. *Food Chem.* **2008**, *109*, 755-762.
- (214) Boss, P. K.; Böttcher, C.; Davies, C., Various Influences of Harvest Date and Fruit Sugar Content on Different Wine Flavor and Aroma Compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* **2014**, *65*, 341-353.
- (215) Morena Luna, L. H.; Reynolds, A. G.; di Profio, F. A.; Zhang, L.; Kotsaki, E., Crop Level and Harvest Date Impact on Four Ontario Wine Grape Cultivars. II. Wine Aroma Compounds and Sensory Analysis. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2018**, *39*, 246-270.
- (216) Poni, S.; Casalini, L.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Intrieri, C., Effects of Early Defoliation on Shoot Photosynthesis, Yield Components, and Grape Composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 397-407.
- (217) Tardaguila, J.; Diago, M. P.; de Toda, F. M.; Poni, S.; Vilanova, M., Effects of Timing of Leaf Removal on Yield, Berry Maturity, Wine Composition and Sensory Properties of cv. Grenache Grown under Non Irrigated Conditions. *OENO One* **2008**, *42*, 221-229.
- (218) Percival, D. C.; Fisher, K. H.; Sullivan, J. A., Use of Fruit Zone Leaf Removal With *Vitis vinifera* L. cv. Riesling Grapevines. II. Effect on Fruit Composition, Yield, and Occurrence of Bunch Rot *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.). *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, *45*, 133.
- (219) Ferrari, V.; Disegna, E.; Dellacassa, E.; Coniberti, A., Influence of timing and intensity of fruit zone leaf removal and kaolin applications on bunch rot control and quality improvement of Sauvignon blanc grapes, and wines, in a temperate humid climate. *Sci. Hortic.* **2017**, *223*, 62-71.
-

- (220) Schüttler, A.; Guthier, C.; Stoll, M.; Darriet, P.; Rauhut, D. Impact of grape cluster defoliation, grape must clarification and yeast strain on TDN potential in cool climates wines. *Wine Vitic. J.* **2016**, *31*, 51-54.
- (221) Marais, J.; Van Wyk, C. J.; Rapp, A. Effect of Sunlight and Shade on Norisoprenoid Levels in Maturing Weisser Riesling and Chenin blanc Grapes and Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1992**, *13*, 23-32.
- (222) Brandt, M.; Scheidweiler, M.; Rauhut, D.; Patz, C.-D.; Will, F.; Zorn, H.; Stoll, M. The influence of temperature and solar radiation on phenols in berry skin and maturity parameters of *Vitis vinifera* L. cv. Riesling. *OENO One* **2019**, *2*, 287-302.
- (223) Gunata, Y. Z.; Bayonove, C. L.; Baumes, R. L.; Cordonnier, R. E., The aroma of grapes. Localisation and Evolution of Free and Bound Fractions of Some Grape Aroma Components c.v. Muscat During first Development and Maturation. *J. Sci. Food Agric.* **1985**, *36*, 857-862.
- (224) Ough, C. S., Substances Extracted during Skin Contact with White Musts. I. General Wine Composition and Quality Changes with Contact Time. *Am. J. Enol. Vitic.* **1969**, *20*, 93-100.
- (225) Cabaroglu, T.; Canbas, A.; Baumes, R.; Bayonove, C.; Lepoutre, J.P.; Günata, Z., Aroma Composition of a White Wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir as Affected by Skin Contact. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 680-683.
- (226) Esti, M.; Tamborra, P., Influence of winemaking techniques on aroma precursors. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 173-179.
- (227) Palomo, E. S.; Pérez-Coello, M.; Díaz-Maroto, M.; Viñas, M. G.; Cabezudo, M., Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat “a petit grains” wines and effect of skin contact. *Food Chem.* **2006**, *95*, 279-289.
- (228) Hall, H.; Zhou, Q.; Qian, M. C.; Osborne, J. P., Impact of Yeasts Present during Prefermentation Cold Maceration of Pinot noir Grapes on Wine Volatile Aromas. *Am. J. Enol. Vitic.* **2017**, *68*, 81-90.
- (229) Yokotsuka, K., Effect of Press Design and Pressing Pressures on Grape Juice Components. *J. Ferm. Bioengin.* **1990**, *70*, 15-21.
- (230) Darias-Martín, J.; Díaz-González, D.; Díaz-Romero, C., Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production. *J. Food Eng.* **2004**, *63*, 335-340.
- (231) Sokolowsky, M.; Rosenberger, A.; Fischer, U., Sensory impact of skin contact on white wines characterized by descriptive analysis, time–intensity analysis and temporal dominance of sensations analysis. *Food Qual. Pref.* **2015**, *39*, 285-297.
- (232) Jégou, S.; Hoang, D. A.; Salmon, T.; Williams, P.; Oluwa, S.; Vrigneau, C.; Doco, T.; Marchal, R., Effect of grape juice press fractioning on polysaccharide and oligosaccharide compositions of Pinot meunier and Chardonnay Champagne base wines. *Food Chem.* **2017**, *232*, 49-59.
- (233) Zoecklein, B. W.; Hackney, C. H.; Duncan, S. E.; Marcy, J. E., Effect of fermentation, aging and thermal storage on total glycosides, phenol-free glycosides and volatile compounds of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *22*, 100-107.
- (234) Berger, S.; Schober, V.; Korntheuer, K.; Fardossi, A., Influence of assimilable nitrogen on the fermentation of musts of the grape cultivars Gruener Veltliner, Rhine Riesling, Italian Riesling and Neuburger. *Mitt. Klosterneuburg* **1999**, *49*, 117-123.

- 
- (235) Bell, S. J.; Henschke, P. A., Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 242-295.
- (236) Fernández-González, M.; Di Stefano, R., Fractionation of glycoside aroma precursors in neutral grapes. Hydrolysis and conversion by *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT--Food Sci. Technol.* **2004**, *37*, 467-473.
- (237) Zoecklein, B. W.; Marcy, J. E.; Williams, J. M.; Jasinski, Y., Effect of Native Yeasts and Selected Strains of *Saccharomyces cerevisiae* on Glycosyl Glucose, Potential Volatile Terpenes, and Selected Aglycones of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) Wines. *J. Food Compos. Anal.* **1997**, *10*, 55-65.
- (238) Killian, E.; Ough, C., Fermentation esters - formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* **1979**, *30*, 301-305.
- (239) Torija, M. J.; Beltran, G.; Novo, M.; Poblet, M.; Guillamón, J. M.; Mas, A.; Rozes, N., Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *85*, 127-136.
- (240) Heard, G. M.; Fleet, G. H., The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* **1988**, *65*, 23-28.
- (241) Charoenchai, C.; Fleet, G. H.; Henschke, P. A., Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 283-288.
- (242) Amerine, M. A.; Ough, C. S., Studies on Controlled Fermentations III. *Am. J. Enol. Vitic.* **1957**, *8*, 18-30.
- (243) Miller, A. C.; Wolff, S. R.; Bisson, L. F.; Ebeler, S. E., Yeast Strain and Nitrogen Supplementation: Dynamics of Volatile Ester Production in Chardonnay Juice Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58*, 470-483.
- (244) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D., *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine-Stabilization and Treatments*. Second Edition, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, **2006**.
- (245) Flores, J. H.; Heatherbell, D. A.; McDaniel, M. R., Ultrafiltration of Wine: Effect of Ultrafiltration on White Riesling and Gewürztraminer Wine Composition and Stability. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 207-214.
- (246) Peri, C.; Riva, M.; Decio, P., Crossflow Membrane Filtration of Wines: Comparison of Performance of Ultrafiltration, Microfiltration, and Intermediate Cut-Off Membranes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1988**, *39*, 162-168.
- (247) Flores, J.; Heatherbell, D.; Henderson, L.; McDaniel, M., Ultrafiltration of wine: Effect of Ultrafiltration on the Aroma and Flavor Characteristics of White Riesling and Gewürztraminer Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 91-96.
- (248) Gergely, S.; Bekassy-Molnar, E.; Vatai, G., The use of multiobjective optimization to improve wine filtration. *Journal of Food Engineering* **2003**, *58*, 311-316.
- (249) Arriagada-Carrazana, J. P.; Sáez-Navarrete, C.; Bordeu, E., Membrane filtration effects on aromatic and phenolic quality of Cabernet Sauvignon wines. *J. Food Eng.* **2005**, *68*, 363-368.
- (250) Leroy, M.; Charpentier, M.; Duteurtre, B.; Feuillat, M.; Charpentier, C., Yeast Autolysis During Champagne Aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 21-28.
- (251) Charpentier, C.; Feuillat, M., Yeast autolysis. *Wine Microbiol. Biotechnol.* **1993**, 225-242.
-



- (252) Chassagne, D.; Guilloux-Benatier, M.; Alexandre, H.; Voilley, A., Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chem.* **2005**, *91*, 39-44.
- (253) Troton, D.; Charpentier, M.; Robillard, B.; Calvayrac, R.; Duteurtre, B., Evolution of the Lipid Contents of Champagne Wine During the Second Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*, 175-182.
- (254) Gallart, M.; López-Tamames, E.; Suberbiola, G.; Buxaderas, S., Influence of Fatty Acids on Wine Foaming. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7042-7045.
- (255) Moio, L.; Ugliano, M.; Gambuti, A.; Genovese, A.; Piombino, P., Influence of Clarification Treatment on Concentrations of Selected Free Varietal Aroma Compounds and Glycoconjugates in Falanghina (*Vitis vinifera* L.) Must and Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55*, 7-12.
- (256) Loscos, N.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V., Fate of Grape Flavor Precursors during Storage on Yeast Lees. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5468-5479.
- (257) Versini, G.; Carlin, S.; Dalla Serra, A.; Nicolini, G.; Rapp, A., Formation of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene and Other Norisoprenoids in Wine: Considerations on the Kinetics. *ACS Symposium Series* **2002**, *802*, 285-299.
- (258) Silva Ferreira, A. C.; Guedes de Pinho, P., Nor-isoprenoids profile during port wine ageing - influence of some technological parameters. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 169-176.
- (259) Robinson, A. L.; Mueller, M.; Heymann, H.; Ebeler, S. E.; Boss, P. K.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D., Effect of Simulated Shipping Conditions on Sensory Attributes and Volatile Composition of Commercial White and Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, *61*, 337-347.
- (260) Ramey, D. D.; Ough, C. S., Volatile Ester Hydrolysis or Formation During Storage of Model Solutions and Wines. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 928-934.
- (261) Ferreira, V.; Escudero, A.; Fernández, P.; Cacho, J. F., Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. A* **1997**, *205*, 392-396.
- (262) Vanbeneden, N.; Saison, D.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R., Decrease of 4-Vinylguaiaicol during Beer Aging and Formation of Apocynol and Vanillin in Beer. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11983-11988.
- (263) Lopes, P.; Saucier, C.; Teissedre, P.-L.; Glories, Y., Impact of Storage Position on Oxygen Ingress through Different Closures into Wine Bottles. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6741-6746.
- (264) Skouroumounis, G. K.; Kwiatkowski, M. J.; Francis, I. L.; Oakey, H.; Capone, D. L.; Duncan, B.; Sefton, M. A.; Waters, E. J., The impact of closure type and storage conditions on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 369-384.
- (265) Capone, D.; Sefton, M.; Pretorius, I.; Høj, P., Flavour 'scalping' by wine bottle closures - the 'winemaking' continues post vineyard and winery. *Austr. New Zeal. Wine Ind. J.* **2003**, *18*, 16-20.
- (266) Ling, M.-Q.; Xie, H.; Hua, Y.-B.; Cai, J.; Li, S.-Y.; Lan, Y.-B.; Li, R.-N.; Duan, C.-Q.; Shi, Y., Flavor Profile Evolution of Bottle Aged Rosé and White Wines Sealed with Different Closures. *Molecules* **2019**, *24*, 836.
- (267) Silva, M. A.; Jourdes, M.; Darriet, P.; Teissedre, P.-L., Scalping of Light Volatile Sulfur Compounds by Wine Closures. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10952-10956.



- 
- (268) Rauhut, D., Removal of 2, 4, 6-trichloroanisole (TCA) and 2, 4, 6-tribromoanisole (TBA) from wine. *Mitt. Klosterneuburg* **2008**, 2, 58-67.
- (269) Eder, R.; Nauer, S. In Determination and elimination of rotten grape aroma by filter layers with selective adsorbers, In *39<sup>th</sup> World Congress of Vine and Wine*, BIO Web of Conferences, **2016**, 7, 02018.
- (270) Behr, M.; Cocco, E.; Lenouvel, A.; Guignard, C.; Evers, D., Earthy and Fresh Mushroom Off-Flavors in Wine: Optimized Remedial Treatments. *Am. J. Enol. Vitic.* **2013**, 64, 545-549.
- (271) Gil, M.; Louazil, P.; Iturmendi, N.; Moine, V.; Cheynier, V.; Saucier, C., Effect of polyvinylpyrrolidone treatment on rosés wines during fermentation: Impact on color, polyphenols and thiol aromas. *Food Chem.* **2019**, 295, 493-498.
- (272) Corcho-Corral, B.; Olivares-Marín, M.; Valdes-Sánchez, E.; Fernández-González, C.; Macías-García, A.; Gómez-Serrano, V., Development of Activated Carbon Using Vine Shoots (*Vitis vinifera*) and Its Use for Wine Treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 644-650.
- (273) Zoecklein, B.; Fugelsang, K. C.; Gump, B. H.; Nury, F. S., *Wine analysis and production*. Springer Science & Business Media, New York, **2013**.
- (274) Würdig, G.; Woller, R.; Breitbach, K., *Wine chemistry*. Eugen Ulmer, Stuttgart, **1989**.
- (275) Var, I.; Kabak, B.; Erginkaya, Z., Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. *Food Contr.* **2008**, 19, 592-598.
- (276) Singleton, V.; Trousdale, E.; Zaya, J., Oxidation of Wines. I. Young White Wines Periodically Exposed to Air. *Am. J. Enol. Vitic.* **1979**, 30, 49-54.
- (277) Ebnesajjad, S., *Expanded PTFE applications handbook: Technology, manufacturing and applications*. Elsevier Ltd., Oxford, **2016**.
- (278) Mosbach, K.; Ramström, O., The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Bio/Technol.* **1996**, 14, 163-170.
- (279) Whitcombe, M. J.; Rodriguez, M. E.; Villar, P.; Vulfson, E. N., A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7105-7111.
- (280) Gök, R.; Bechtloff, P.; Ziegler, M.; Schmarr, H.-G.; Fischer, U.; Winterhalter, P., Synthesis of Deuterium-Labeled 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and Quantitative Determination of TDN and Isomeric Vitispiranes in Riesling Wines by a Stable Isotope Dilution Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, 67, 6414-6422.
-



## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die Herkunft verschiedener Aromastoffklassen, modifiziert nach Moreno-Arribas und Polo <sup>19</sup> .....	7
Abbildung 2: Biosynthese der Terpene, modifiziert nach Breitmaier <sup>34</sup> und Wanke et al. <sup>35</sup> .....	11
Abbildung 3: Strukturen verschiedener Aromastoffe des Rieslings: <b>1</b> TDN, <b>2</b> Vitispiran, <b>3</b> $\beta$ -Ionon, <b>4</b> $\beta$ -Damascenon, <b>5</b> Rieslingacetal, <b>6</b> Geraniol, <b>7</b> Nerol, <b>8</b> $\alpha$ -Terpineol, <b>9</b> Linalool, <b>10</b> n-Hexanol, <b>11</b> Isoamylalkohol, <b>12</b> Phenylethylacetat, <b>13</b> Vinylguaicol, <b>14</b> Ethylbutanoat, <b>15</b> Ethylhexanoat, <b>16</b> Ethyloctanoat, <b>17</b> Isoamylacetat.....	12
Abbildung 4: Struktur einiger Glykoside von Aromastoffen, modifiziert nach Maicas und Mateo <sup>59</sup> .....	14
Abbildung 5: Vereinfachtes Schema der Enzyme und Hauptprodukte in der Carotinoidbiosynthese, modifiziert nach Just et al. <sup>86</sup> .....	18
Abbildung 6: Schutzmechanismus der Carotinoide im photosynthetischen System nach Britton et al. <sup>92</sup> .....	20
Abbildung 7: Xanthophyllzyklus und Umwandlung von Violaxanthin in Neoxanthin, modifiziert nach Baumes et al. <sup>91</sup> .....	21
Abbildung 8: Abbau von Carotinoiden durch Carotenoid Cleavage Dioxygenases (CCDs) in Vitis vinifera, modifiziert nach Walter et al. <sup>108</sup> und Young et al. <sup>109</sup> .....	22
Abbildung 9: Abbauprodukte von Carotinoiden, modifiziert nach Winterhalter und Rouseff <sup>119</sup> .....	24
Abbildung 10: Bildungsweg von $\beta$ -Ionon und $\beta$ -Damascenon aus Carotinoiden, modifiziert nach Skouroumounis und Sefton <sup>120</sup> .....	24
Abbildung 11: Postulierter TDN-Bildungsweg <sup>142</sup> , modifiziert nach Winterhalter und Gök <sup>11</sup> ....	28
Abbildung 12: Weitere bestätigte und potentielle TDN-Vorläufer .....	30
Abbildung 13: Bildungswege von Rieslingacetal, TDN und Vitispiran aus den glykosidischen Vorstufen, modifiziert nach Winterhalter & Gök <sup>11</sup> .....	31
Abbildung 14: Schema der Standardisotopenverdünnungsanalyse, nach Rychlik und Asam <sup>163</sup> .....	33
Abbildung 15: Prinzip der Headspace solid phase micro extraction (HS-SPME), modifiziert nach Ahmed et al. <sup>174</sup> und Pawliszyn <sup>175</sup> .....	34
Abbildung 16: Chemische Struktur einiger Fasermaterialien und Eignung im Hinblick auf die chemischen Eigenschaften des Analyten, nach Pawliszyn <sup>175</sup> .....	35
Abbildung 17: Zielsetzung der Arbeit .....	43
Abbildung 18: Einfluss des Behältermaterials auf die Aromastoffkonzentration in Modellwein nach dreitägiger Lagerung, n = 2 .....	154
Abbildung 19: Adsorption von Aromastoffen an Materialien in Modellwein nach mehrtägiger Lagerung, n = 3 .....	155

Abbildung 20: Adsorption von Aromastoffen in aromatisiertem Modellwein nach 15-minütiger Behandlung mit drei verschiedenen Adsorbentien und einer Kontrolle ohne Adsorbenszugabe im Vergleich zu Modellwein vor der Behandlung, n = 2 .....	156
Abbildung 21: Abnahme von TDN nach Filtration durch Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 µm) aus verschiedenen Filtermaterialien. PAM = Polyamid, PES = Polyethersulfon, PET = Polyethylenterephthalat, PTFE = Polytetrafluorethylen, PVDF = Polyvinylidendifluorid, RC = Regenerierte Cellulose, CA = Celluloseacetat, n = 2 .....	156
Abbildung 22: Abnahme von Aromastoffen in Riesling nach Filtration durch PES-Kerzenfilter, n = 3 .....	157
Abbildung 23: Abnahme von Aromastoffen durch Adsorption von an Schraubverschlüsse applizierte Filtermaterialien, n = 2 .....	158
Abbildung 24: Gehalt an Aromastoffen in den Filtermaterialien, die in Schraubverschlüsse appliziert wurden, extrahiert mit Ethanol, im Vergleich mit der originären Weinkonzentration, n = 2 .....	158
Abbildung 25: Chemische Strukturen der eingesetzten polymeren Filterschichten. PAM = Polyamid, PTFE = Polytetrafluorethylen, PVDF = Polyvinylidendifluorid, PES = Polyethersulfon, PET = Polyethylenterephthalat, RC = Regenerierte Cellulose, CA = Celluloseacetat.....	159
Abbildung 26: Fragebogen zur Bestimmung der Wahrnehmungsschwelle von Verbrauchern .....	203
Abbildung 27: Chromatographische Trennung von TDN und TDN-d6 .....	208
Abbildung 28: Reinheitskontrolle des eingesetzten isotopologen d6-TDN Standards .....	208
Abbildung 29: Reinheitskontrolle des eingesetzten isotopologen TDN Standards .....	209
Abbildung 30: Chromatogramm eines Versuchsweins im Full-Scan-Modus, vor Hydrolyse	209
Abbildung 31: Abbildung 30: Chromatogramm eines Versuchsweins im Full-Scan-Modus, nach Hydrolyse und Zusatz von d6-TDN.....	210
Abbildung 32: In Modellwein verbliebene Aromastoffe nach Behandlung mit SPE-Kartuschen, n = 2 .....	218
Abbildung 33: In Modellwein enthaltene Aromastoffe nach Behandlung mit Spritzenvorsatzfiltern, n = 2 .....	218
Abbildung 34: Aromastoffe in Rieslingwein nach Behandlung mit Spritzenvorsatzfiltern,n = 2 .....	219

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Glykosidisch gebundene C <sub>13</sub> -Norisoprenoide aus verschiedenen Quellen von Vitis vinifera cv. Riesling.....	25
Tabelle 2: Quantitative Ergebnisse des Weinwettbewerbs Best of Riesling 2015 .....	193
Tabelle 3: Quantitative Ergebnisse des Wettbewerbs Mundus Vini 2016 Frühjahrsverkostung.....	195
Tabelle 4: Quantitative Ergebnisse des Weinwettbewerbs Mundus Vini 2016 Sommerverkostung .....	199
Tabelle 5: Ergebnisse der Bestimmung der Wahrnehmungsschwelle von Verbrauchern....	204
Tabelle 6: Validierungsdaten der HS-SPME-GC-MS für TDN und Vitispiran .....	208





## 12 Anhang

## 12.1 Quantitative Daten der Wettbewerbsweine

Tabelle 2: Quantitative Ergebnisse des Weinwettbewerbs Best of Riesling 2015

Produkt- nummer	Land	Anbaugebiet	Jahrgang	Säure [g/L]	Geschmacks- richtung	Bewertung Förne	Freies TDN		Freies Vitispiran	
							µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]
10010	Deutschland	Baden	2015	6,8	trocken	1,0	0,87	3,98	4,44	0,78
10052	Deutschland	Mosel	2013	7,9	feinherb	4,5	0,46	2,99	6,77	0,20
10070	Deutschland	Mosel	2015	8,4	feinherb	1,0	0,49	2,02	5,21	0,19
10073	Deutschland	Nahe	2014	7,9	trocken	3,0	0,23	11,11	3,73	1,48
10080	Deutschland	Nahe	2015	7,0	feinherb	1,5	0,17	3,49	4,32	0,14
10081	Österreich	Niederösterreich	2015	6,7	trocken	3,0	0,41	11,38	1,87	2,52
10082	Österreich	Niederösterreich	2015	7,5	trocken	0,75	0,31	15,41	4,79	0,98
10087	Deutschland	Pfalz	2013	8,3	feinherb	5,25	0,22	11,46	1,16	3,50
10197	Deutschland	Rheingau	2014	7,6	feinherb	6,75	0,28	14,22	5,03	1,70
10231	Deutschland	Rheinhessen	2015	7,7	feinherb	1,0	0,71	2,55	3,33	0,55
10240	Deutschland	Rheinhessen	2015	7,2	feinherb	1,5	0,82	6,31	5,37	0,97
20008	Deutschland	Rheinhessen	2015	9,0	trocken	2,0	1,90	3,00	7,82	1,16
20013	Deutschland	Franken	2015	7,9	trocken	0,75	1,69	5,38	0,91	6,25
20018	Deutschland	Mosel	2015	8,8	trocken	3,0	0,73	1,83	3,77	0,49
20141	Deutschland	Rheingau	2013	7,6	trocken	3,0	1,68	1,10	19,97	0,24
20142	Deutschland	Rheingau	2011	6,8	trocken	3,75	13,51	0,35	39,30	0,03
20206	Deutschland	Württemberg	2015	7,7	trocken	1,0	0,58	6,34	7,31	0,50
20227	Deutschland	Pfalz	2015	7,0	trocken	3,0	1,22	6,87	4,64	1,80
20232	Deutschland	Pfalz	2014	7,2	trocken	3,75	4,78	0,39	1,09	2,81
20259	Deutschland	Franken	2014	6,9	trocken	4,0	0,30	10,16	6,00	0,31
20266	Deutschland	Hessische Bergstrasse	2013	8,3	trocken	3,0	4,38	0,06	0,90	13,21
20284	Deutschland	Mittelrhein	2014	9,7	trocken	6,0	1,51	7,85	6,12	2,95
20286	Deutschland	Nahe	2015	8,1	trocken	0,75	0,82	6,24	0,47	11,02
20289	Deutschland	Nahe	2015	7,5	trocken	2,0	0,36	13,00	5,21	0,05
20294	Deutschland	Nahe	2014	7,9	trocken	2,0	0,68	4,17	6,28	0,45
20298	Deutschland	Rheingau	2014	7,9	trocken	4,5	2,23	7,93	12,18	1,45
20306	Deutschland	Baden	2013	5,6	trocken	2,0	0,76	4,01	9,21	0,72
30008	Deutschland	Hessische Bergstrasse	2015	7,6	trocken	0,6	0,24	11,25	5,58	1,36
30014	Deutschland	Pfalz	2008	8,4	trocken	6,0	19,45	0,39	2,46	6,36

Fortsetzung Tabelle 2

Produkt- nummer	Land	Anbaugebiet	Jahrgang	Säure [g/L]	Geschmacks- richtung	Bewertung Förne	Freies TDN		Freies Vitispiran	
							µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]
30015	Deutschland	Rheingau	2008	6,6	trocken	5,4	13,00	1,35	21,77	0,80
30028	Deutschland	Württemberg	2015	7,4	süß	2,25	2,50	1,37	9,63	0,22
30031	Deutschland	Mittelrhein	2015	10,8	süß	1,5	2,33	0,22	1,15	15,30
30101	Deutschland	Pfalz	2007	7,2	trocken	3,75	1,56	9,27	16,37	0,73
30102	Deutschland	Rheingau	2007	7,8	trocken	6,0	4,37	2,95	18,62	0,03
30105	Deutschland	Pfalz	2007	7,3	trocken	5,25	24,54	0,48	3,49	1,40
30107	Deutschland	Franken	2005	7,3	trocken	7,0	25,62	0,08	4,95	9,87
30111	Deutschland	Rheinhessen	2004	7,4	trocken	4,0	24,69	0,56	43,95	0,47
30113	Deutschland	Nahe	2003	6,4	trocken	4,2	21,80	0,13	43,30	0,34
30114	Deutschland	Pfalz	2002	7,9	trocken	5,4	16,46	0,30	34,67	0,54
30127	Deutschland	Rheingau	2015	8,9	lieblich	1,2	0,96	8,98	5,12	0,53
30143	Deutschland	Mosel	2015	10,0	lieblich	5,25	1,07	8,26	3,96	0,71
30164	Deutschland	Mosel	2014	8,1	edelsüß	7,5	1,46	1,97	9,65	0,30
30165	Deutschland	Mosel	2014	9,9	edelsüß	6,0	4,39	3,96	11,86	1,09
30204	Deutschland	Mosel	2015	8,2	trocken	1,2	0,31	5,05	2,17	1,57
30230	Deutschland	Rheinhessen	2015	10,1	süß	0,6	6,60	2,30	28,43	0,52
30241	Deutschland	Württemberg	2015	8,5	süß	0,75	2,49	1,13	10,75	0,17
30242	Deutschland	Hessische Bergstrasse	2015	7,7	süß	0,75	0,50	9,48	3,00	0,52
30246	Deutschland	Mosel	2014	8,3	süß	4,5	4,59	4,54	15,34	0,99
30257	Deutschland	Rheinhessen	2012	10,7	süß	4,5	1,97	0,94	7,81	1,85
30273	Deutschland	Mosel	2014	7,1	trocken	1,5	3,15	9,11	12,42	1,09
30276	Deutschland	Nahe	2014	7,7	trocken	1,8	6,72	2,22	14,69	1,96
30277	Deutschland	Nahe	2014	7,6	trocken	1,2	5,54	2,45	12,62	1,10

Tabelle 3: Quantitative Ergebnisse des Wettbewerbs Mundus Vini 2016 Frühjahrsverkostung

Produkt- nummer	Land	Anbaugebiet	Jahrgang	Säure [g/L]	Geschmacks- richtung	Bewertung Firme	TDN				Vitispiran			
							frei		gebunden		frei		gebunden	
							µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]
1162	Deutschland	Franken	2014	8,3	trocken	3,0	1,0	2,0	147,9	3,3	6,2	1,6	222,6	0,7
1163	Deutschland	Pfalz	2015	7,8	trocken	0,75	0,3	1,9	144,5	3,3	2,2	4,5	127,3	3,7
1165	Deutschland	Pfalz	2014	7,6	trocken	0,75	2,5	2,3	109,0	0,3	10,6	3,3	128,1	1,4
1166	Deutschland	Pfalz	2014	8,1	trocken	2,5	3,7	1,4	175,9	1,1	14,1	0,9	195,1	0,8
1167	Deutschland	Pfalz	2014	7,4	trocken	1,0	1,2	3,9	184,9	1,5	7,6	4,4	204,7	0,3
1168	Deutschland	Pfalz	2014	6,9	trocken	1,5	0,3	0,2	162,9	2,6	2,6	0,4	135,9	0,6
1169	Deutschland	Pfalz	2014	7,6	trocken	1,2	1,0	0,1	131,2	2,3	5,5	3,1	125,1	4,4
1170	Deutschland	Rheingau	2014	7,3	trocken	1,0	0,6	0,4	116,9	3,7	4,1	2,3	125,4	3,7
1314	Deutschland	Deutschland	2015	6,8	trocken	0	1,4	1,0	57,1	0,4	6,7	3,5	60,8	2,8
3076	Deutschland	Mosel	2014	8,1	lieblich	3,0	1,1	3,0	89,6	1,4	5,6	2,3	83,1	5,0
4152	Deutschland	Rheingau	2014	8,4	trocken	1,5	0,6	2,7	71,9	0,4	5,7	2,7	74,5	3,7
4163	Deutschland	Württemberg	2014	6,3	feinherb	1,0	1,6	1,4	121,5	4,6	9,6	2,2	133,6	3,0
5146	Deutschland	Rheingau	2015	7,9	trocken	0,5	0,3	1,4	93,5	3,2	2,7	0,0	98,2	0,6
5147	Deutschland	Rheingau	2015	7,9	trocken	0,5	0,3	0,7	118,3	3,2	2,9	0,7	130,4	2,4
5148	Deutschland	Rheingau	2015	7,4	trocken	0,5	0,2	3,4	76,1	2,4	1,7	3,1	87,0	1,2
5153	Deutschland	Rheingau	2014	7,9	trocken	1,5	3,4	5,0	75,6	1,7	12,7	4,3	70,1	3,2
5154	Deutschland	Rheingau	2014	7,4	trocken	1,5	0,6	4,7	84,4	3,1	4,4	0,2	109,0	4,9
5155	Deutschland	Rheingau	2014	7,2	trocken	1,0	0,8	1,6	88,4	2,5	4,5	0,1	93,4	1,8
5159	Deutschland	Rheingau	2014	7,3	trocken	0,5	0,5	4,4	83,6	3,4	4,5	1,8	116,9	0,8
5160	Deutschland	Rheingau	2014	7,5	trocken	0,75	0,3	1,6	87,3	3,5	2,1	4,9	100,8	1,0
7053	Österreich	Niederösterreich	2013	6,4	halbtrocken	3,0	0,6	4,2	74,7	0,1	5,1	0,9	126,3	4,9
7341	Deutschland	Mosel	2014	6,4	trocken	0	0,4	4,5	119,8	1,8	3,5	4,8	148,0	0,2
7342	Deutschland	Mosel	2014	6,5	trocken	3,0	1,1	4,0	205,7	0,1	8,7	2,7	261,6	1,3
7343	Frankreich	Alsace	2014	6,5	trocken	2,5	1,7	2,0	82,3	0,1	8,2	4,9	93,0	3,5
7344	Italien	Lombardie	2015	6,3	trocken	0,5	0,3	3,1	40,0	2,0	3,2	2,1	43,3	2,0
7345	Luxemburg	Moselle-Luxembourg	2014	7,1	trocken	0	0,7	3,5	108,7	1,1	5,0	2,7	113,1	0,3
7346	Luxemburg	Moselle-Luxembourg	2014	7,5	trocken	2,0	1,6	2,3	108,7	0,5	4,0	1,5	94,1	3,6

Fortsetzung Tabelle 3

Produkt- nummer	Land	Anbaugebiet	Jahrgang	Säure [g/L]	Geschmacks- richtung	Bewertung Firne	TDN				Vitispiran			
							frei	gebunden		frei	gebunden		frei	gebunden
								µg/L	Stabw. [%]		µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]
7347	Mazedonien	Mazedonien	2014	5,4	trocken	0	0,1	3,9	16,5	1,7	0,5	4,7	24,6	0,3
7348	Österreich	Niederösterreich	2014	7,3	trocken	1,5	0,7	2,8	171,1	1,4	4,7	1,8	202,5	2,5
7349	Österreich	Niederösterreich	2015	5,2	trocken	1,2	0,1	2,2	75,3	3,6	0,7	0,6	120,9	0,2
7350	Österreich	Niederösterreich	2015	9,1	trocken	0	0,1	0,1	119,8	2,8	1,0	4,8	132,8	3,1
7351	Österreich	Niederösterreich	2015	7,0	trocken	0	0,1	3,6	133,3	4,4	0,9	1,7	135,3	1,9
7352	Österreich	Niederösterreich	2015	6,2	trocken	0	0,1	2,9	96,4	1,3	1,0	1,5	99,4	2,9
7353	Österreich	Niederösterreich	2015	7,0	trocken	0	0,1	4,6	132,4	3,2	0,8	2,6	153,1	2,4
7354	Russland	Krasnodar	2014	7,0	trocken	3,0	2,1	2,4	116,7	3,2	7,2	4,7	93,8	0,8
7355	Slowakei	Kleine Karpaten	2015	6,7	trocken	0	0,1	2,4	89,1	3,6	1,2	0,5	98,4	4,0
7356	Ungarn	Ungarn	2013	6,0	trocken	1,2	0,3	0,6	62,7	1,5	2,4	5,0	52,2	3,8
8263	Deutschland	Pfalz	2014	8,0	trocken	0	1,5	4,6	102,1	0,1	8,1	4,4	110,6	4,8
8264	Deutschland	Pfalz	2014	7,7	trocken	0	0,9	1,1	144,9	1,2	5,4	0,0	136,7	1,6
8265	Deutschland	Pfalz	2014	7,5	trocken	0	1,4	3,1	128,1	1,5	8,9	4,3	144,0	2,9
8266	Deutschland	Pfalz	2014	7,7	trocken	1,8	2,7	3,6	138,6	3,5	8,6	0,8	137,4	1,5
8267	Deutschland	Pfalz	2014	7,6	trocken	1,8	3,7	3,7	131,0	4,8	11,8	3,0	134,9	4,2
8268	Deutschland	Pfalz	2014	7,6	trocken	2,4	1,6	4,1	87,5	4,0	6,4	3,4	103,8	2,7
8269	Deutschland	Pfalz	2014	8,1	trocken	2,25	4,8	0,0	151,0	1,2	14,5	0,7	164,1	1,5
8270	Deutschland	Pfalz	2014	6,8	trocken	2,4	1,1	2,9	56,2	0,9	6,7	1,3	78,9	1,4
8271	Deutschland	Pfalz	2014	8,2	trocken	1,8	4,2	2,2	81,6	4,3	16,6	4,2	100,0	4,3
8272	Deutschland	Pfalz	2014	7,7	trocken	1,5	1,0	0,1	79,4	4,3	5,4	1,6	67,9	1,9
8273	Deutschland	Pfalz	2014	7,1	trocken	1,2	0,9	0,4	104,7	2,4	5,4	0,6	110,3	3,9
8274	Deutschland	Pfalz	2014	7,9	trocken	1,8	1,7	4,7	101,2	0,6	6,7	0,8	106,2	2,9
8275	Deutschland	Pfalz	2014	8,1	trocken	1,5	1,0	3,0	80,7	1,5	5,2	3,7	83,3	1,1
8276	Deutschland	Pfalz	2014	7,9	trocken	1,5	1,0	0,7	84,7	1,1	4,7	4,7	83,9	4,3
8277	Deutschland	Pfalz	2014	7,5	trocken	1,2	1,1	2,4	102,3	4,1	5,0	2,1	101,7	1,2
8278	Deutschland	Pfalz	2014	7,0	trocken	1,8	0,6	4,1	155,4	3,0	3,8	2,0	139,5	4,8
8298	Deutschland	Mosel	2015	5,6	trocken	0,6	0,2	3,2	124,0	0,4	1,7	2,6	152,4	3,7

Fortsetzung Tabelle 3

Produkt- nummer	Land	Anbaugebiet	Jahrgang	Säure [g/L]	Geschmacks- richtung	Bewertung Firma	TDN						Vitispiran					
							frei			gebunden			frei			gebunden		
							µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]
8299	Deutschland	Mosel	2015	7,4	trocken	0	0,2	4,3	116,6	0,7	1,8	1,4	162,0	4,8				
8300	Deutschland	Nahe	2015	7,5	trocken	0	0,2	4,7	138,3	4,5	2,1	0,8	156,7	2,4				
8301	Deutschland	Pfalz	2015	7,3	trocken	0	0,2	0,3	108,9	3,7	1,9	1,6	120,8	1,7				
8302	Deutschland	Pfalz	2015	8,1	trocken	0	0,7	4,9	185,4	4,2	5,1	0,6	165,8	4,5				
8303	Deutschland	Pfalz	2015	7,7	trocken	0	0,2	4,3	185,0	1,1	2,4	2,8	175,2	1,5				
8304	Deutschland	Pfalz	2015	7,0	trocken	0	0,3	2,2	156,0	4,6	1,5	3,0	180,5	0,3				
8306	Deutschland	Pfalz	2015	8,3	trocken	0	0,3	4,1	111,1	5,0	2,7	2,5	127,6	2,5				
8307	Deutschland	Rheinhausen	2015	6,9	trocken	0	0,2	4,1	114,0	1,6	1,6	0,7	135,2	5,0				
8308	Deutschland	Rheinhausen	2015	7,2	trocken	0	0,2	3,6	61,5	3,0	2,1	4,4	80,0	1,7				
8309	Deutschland	Rheinhausen	2015	8,8	trocken	0	0,2	4,4	148,9	4,9	2,5	4,3	148,4	2,0				
8310	Deutschland	Rheinhausen	2015	7,1	trocken	0	0,1	0,2	84,9	3,1	1,0	0,5	105,3	1,2				
8311	Deutschland	Württemberg	2015	8,1	trocken	0,6	0,2	2,6	128,4	1,5	2,8	1,7	133,1	4,5				
11075	Deutschland	Deutschland	2014	6,3	halbtrocken	1,8	1,7	1,8	121,9	0,6	10,6	0,6	157,7	1,6				
11076	Deutschland	Mosel	2015	6,7	halbtrocken	1	0,2	1,1	92,9	2,8	1,6	2,0	146,8	1,9				
11078	Deutschland	Pfalz	2015	7,2	halbtrocken	1	0,6	1,2	101,6	4,0	4,1	1,8	107,0	2,5				
11079	Deutschland	Württemberg	2015	7,6	halbtrocken	1,2	0,3	0,3	141,2	4,3	2,4	0,4	179,2	3,5				
11080	Rumänien	Codru	2014	6,3	halbtrocken	2,4	1,2	3,0	166,3	4,4	6,3	3,3	124,2	2,7				
11083	Deutschland	Mosel	2014	7,1	feinherb	1,8	1,5	0,2	74,1	2,6	7,1	4,5	78,7	2,1				
11084	Deutschland	Pfalz	2015	7,8	feinherb	1,2	0,2	4,9	101,2	1,7	2,0	4,9	93,4	4,6				
11085	Deutschland	Pfalz	2015	7,6	feinherb	1,8	0,4	3,6	172,6	1,3	3,6	1,0	171,0	4,1				
11086	Deutschland	Pfalz	2014	8,9	feinherb	2,4	3,3	3,2	50,3	4,9	13,0	2,6	55,6	3,9				
11087	Deutschland	Pfalz	2014	6,8	feinherb	1,2	1,6	1,1	118,2	2,7	7,3	4,1	127,0	4,8				
11088	Deutschland	Baden	2014	8,0	lieblich	3,0	0,6	2,1	201,3	1,6	4,7	4,4	157,1	0,6				
11089	Deutschland	Mosel	2015	7,4	lieblich	0,6	0,1	1,0	73,9	4,9	0,9	0,1	88,8	2,0				
11091	Deutschland	Rheingau	2015	7,2	lieblich	2,4	0,6	3,8	101,3	4,5	6,7	1,5	96,6	4,4				
12032	Deutschland	Mosel	2001	9,1	süß	4,2	11,6	3,8	44,1	0,2	52,2	2,5	98,4	2,4				
12034	Deutschland	Pfalz	2012	8,1	süß	3,0	0,3	1,3	84,2	3,7	4,5	2,3	138,7	3,9				

Fortsetzung Tabelle 3

Produkt- nummer	Land	Anbaugebiet	Jahrgang	Säure [g/L]	Geschmacks- richtung	Bewertung Firne	TDN				Vitispiran			
							frei		gebunden		frei		gebunden	
							µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]
12035	Deutschland	Württemberg	2015	7,5	süß	1,2	0,6	2,1	95,4	3,7	4,4	0,5	103,5	4,8
12036	Deutschland	Württemberg	2015	7,5	süß	0,6	0,7	4,2	125,2	0,6	5,5	0,9	134,5	0,4
12039	Deutschland	Rheinhausen	2015	8,2	edelsüß	0,75	0,1	0,2	148,1	3,5	3,3	0,7	206,0	4,7
12040	Deutschland	Rheinhausen	2014	8,4	edelsüß	4,2	2,7	4,5	129,6	0,4	12,0	1,0	142,2	2,3
12222	Moldawien	Moldawien	2014	6,5	süß	2,25	0,6	0,8	190,1	0,8	3,1	3,6	146,5	4,7
12031,3	Deutschland	Mosel	2015	7,1	süß	0	0,2	3,5	177,6	3,6	2,1	2,6	294,1	0,7
12031,4	Deutschland	Mosel	2015	8,1	süß	0	0,3	2,2	76,8	0,4	3,1	2,4	100,0	0,4
12031,5	Deutschland	Mosel	2006	8,3	lieblich	6	5,8	0,4	157,7	0,5	48,1	0,6	151,5	4,5
12032,5	Deutschland	Pfalz	2015	5,3	süß	0	0,2	3,5	84,8	0,1	1,9	4,1	120,4	4,6
4160,5	Deutschland	Mosel	2014	7,7	feinherb	1,0	0,5	2,7	80,7	2,0	3,2	2,5	93,0	4,2
4161,5	Deutschland	Nähe	2014	7,7	feinherb	1,0	0,5	4,0	91,5	1,7	3,1	4,0	90,1	0,7
7340,5	Deutschland	Mosel	2015	7,9	trocken	1,0	0,1	4,5	122,3	2,1	0,9	4,5	146,9	4,8
7340,6	Deutschland	Mosel	2014	6,9	trocken	1,5	0,7	4,8	103,1	4,0	4,9	4,0	136,3	4,9
7341,5	Deutschland	Mosel	2014	7,6	trocken	1,0	0,4	0,5	148,1	0,9	4,1	0,4	139,0	1,1
7343,5	Frankreich	Alsace	2015	6,4	trocken	0,5	0,2	3,0	159,1	0,5	1,5	2,2	163,4	3,4
8273,5	Deutschland	Pfalz	2014	7,0	trocken	1,2	0,8	4,3	99,5	5,0	5,6	0,9	124,5	3,3



Tabelle 4: Quantitative Ergebnisse des Weinwettbewerbs Mundus Vini 2016 Sommercuvstung

Produkt- nummer	Land	Anbaugebiet	Jahrgang	Säure [g/L]	Geschmacks- richtung	Bewertung Firme	TDN				Vitispiran			
							frei	gebunden	Stabw. [%]	µg/L	frei	gebunden	Stabw. [%]	µg/L
11	Frankreich	Alsace	2014	6,75	trocken	3,0	13,7	1,6	142,5	2,6	41,5	2,2	199,1	5,4
50	Deutschland	Pfalz	2015	7,5	trocken	2,25	9,8	8,9	158,0	1,1	33,4	9,5	214,0	4,3
51	Deutschland	Rheinhausen	2015	6,9	trocken	1,0	5,8	2,5	108,1	9,0	28,5	2,9	101,1	1,4
60	Deutschland	Pfalz	2015	8,7	trocken	1,2	5,9	1,1	65,7	1,0	27,2	9,8	90,0	1,5
157	Deutschland	Pfalz	2015	7,3	trocken	0	1,9	1,0	64,7	1,4	11,2	1,6	146,5	1,1
185	Serbien	Suma dila- Gross- Morava	2015	6,4	trocken	2,4	11,3	3,3	114,8	7,7	27,7	1,6	110,7	1,1
196	Deutschland	Rheingau	2015	7,6	trocken	2,25	10,4	1,9	113,3	8,1	33,9	2,2	127,8	3,0
203	Deutschland	Mosel	2015	8,1	feinherb	0,5	2,8	1,5	59,5	2,3	15,9	1,8	61,8	1,3
206	Tschechische Republik	Morava/ Südmähren	2015	6,9	halbtrocken	1,2	6,2	3,3	94,4	0,9	21,6	2,2	134,8	0,6
288	Deutschland	Pfalz	2015	7,7	süß	2,0	9,7	2,1	108,1	9,0	23,4	4,4	101,1	1,4
289	Deutschland	Rheingau	2015	8,6	trocken	3,0	13,8	1,6	156,5	1,7	39,3	2,5	151,3	0,1
348	Deutschland	Rheingau	2015	11,1	edelsüß	2,5	12,9	4,8	119,5	1,2	37,8	2,2	180,9	1,7
538	Deutschland	Pfalz	2015	7,6	trocken	1,2	6,8	2,5	118,8	1,1	17,4	2,3	107,6	3,5
555	Luxemburg	Moselle-Luxembourg	2015	8,5	trocken	0,6	4,6	1,2	126,4	3,8	18,9	2,3	122,2	1,2
596	Deutschland	Mosel	2013	8	halbtrocken	2,4	10,8	7,3	141,4	3,9	29,1	5,0	170,2	3,6
621	Deutschland	Rheingau	2014	7,3	trocken	3,6	14,4	5,7	146,7	1,6	39,1	1,9	113,1	4,1
623	Deutschland	Rheingau	2015	7,4	trocken	2,25	10,0	2,0	104,8	7,0	19,4	3,4	78,5	7,1
629	Deutschland	Mittelrhein	2015	8,5	halbtrocken	0,5	2,7	11,8	74,0	1,4	10,1	12,6	97,9	3,6
629	Deutschland	Mosel	2015	8,2	süß	0	2,3	11,6	81,9	1,5	5,6	11,3	136,7	6,7
884	Deutschland	Baden	2015	8,9	süß	2,5	13,0	9,2	114,2	3,8	48,4	1,2	130,5	9,0
887	Österreich	Niederösterreich	2015	6,6	trocken	1,2	7,1	1,4	213,3	1,9	23,5	2,2	203,6	2,1
889	Deutschland	Pfalz	2015	8,7	trocken	1,2	7,3	1,9	94,8	1,7	29,3	1,3	112,7	2,1
895	Frankreich	Alsace	2014	6,89	halbtrocken	1,0	5,3	2,6	108,6	7,9	25,3	1,8	81,8	4,5
901	Deutschland	Rheingau	2014	8,2	trocken	1,8	8,1	3,2	93,6	2,4	29,2	3,5	176,7	2,0
901	Deutschland	Pfalz	2015	6,7	trocken	1,2	6,1	2,8	100,9	4,4	26,6	3,0	103,6	5,2
916	Deutschland	Rheinhausen	2015	8,2	feinherb	0,6	4,3	1,9	74,1	1,6	16,1	2,5	65,4	6,9
923	Luxemburg	Moselle-Luxembourg	2015	7,8	halbtrocken	0,5	3,0	1,1	120,8	3,0	8,6	1,2	179,9	2,3
928	Deutschland	Mittelrhein	2015	8,1	feinherb	4,5	15,2	1,5	118,9	7,3	51,2	4,7	159,0	6,4
938	Deutschland	Pfalz	2015	7,9	trocken	1,5	8,0	1,4	72,1	2,4	30,8	8,2	83,3	2,9
976	Deutschland	Rheingau	2015	8	trocken	1,2	6,5	8,7	178,9	1,5	31,9	1,7	168,8	1,3

Fortsetzung Tabelle 4

Produkt- nummer	Land	Anbaugebiet	Jahrgang	Säure [g/L]	Geschmacks- richtung	Bewertung Firne	TDN				Vitispiran			
							frei	gebunden		frei	gebunden		frei	gebunden
								µg/L	Stabw. [%]		µg/L	Stabw. [%]	µg/L	Stabw. [%]
979	Deutschland	Mosel	2015	7,7	trocken	2,4	11,0	1,3	77,1	5,1	40,2	1,3	122,8	0,6
979	Deutschland	Pfalz	2015	8	trocken	1,2	6,7	1,4	104,3	7,8	27,3	9,5	95,3	1,2
994	Deutschland	Rheinhausen	2015	8,2	edelsüß	1,0	5,6	7,8	104,3	3,6	23,1	1,1	101,4	8,4
1049	Deutschland	Württemberg	2015	6,7	lieblich	0	1,5	1,0	59,4	1,0	8,5	1,7	206,1	1,1
1245	Deutschland	Baden	2015	6,6	feinherb	0	0,8	4,7	67,2	4,7	7,0	5,6	82,0	0,9
1315	Deutschland	Württemberg	2015	7,2	trocken	2,4	10,7	0,8	110,5	1,8	41,0	8,3	147,9	1,0
1622	Deutschland	Mosel	2015	7,7	lieblich	1,2	6,1	1,3	160,0	5,7	27,4	1,6	124,4	4,4
1636	Deutschland	Baden	2015	7	trocken	1,2	6,8	2,5	99,2	0,0	26,5	2,3	83,6	1,7
1895	Deutschland	Franken	2015	7,9	trocken	2,25	9,9	1,5	80,8	5,9	26,8	4,4	132,3	4,7
1900	Slowenien	Podravje (Drautal)	2015	6,6	trocken	1,8	8,7	3,9	120,9	1,7	25,6	4,0	150,1	0,9
1900	Deutschland	Mosel	2015	7,2	trocken	1,2	6,1	1,0	137,8	1,3	18,5	9,3	173,8	0,8
1902	Deutschland	Rheinhausen	2014	6,1	trocken	2,4	12,2	7,8	64,0	4,4	47,2	0,4	58,3	5,5
1910	Frankreich	Alsace	2015	4,12	trocken	0	1,7	2,3	90,7	3,6	10,6	8,5	136,2	1,0
1953	Deutschland	Pfalz	2014	7,8	trocken	1,8	9,3	8,4	71,8	2,5	24,1	9,6	86,0	1,5
2063	Deutschland	Pfalz	2015	7,4	trocken	3,0	13,2	1,2	183,1	4,2	66,4	5,4	201,0	2,3
2145	Deutschland	Pfalz	2015	8,4	trocken	1,8	8,5	1,2	113,5	1,1	27,7	7,5	116,6	0,8
2149	Deutschland	Pfalz	2015	8,7	edelsüß	1,5	7,5	2,2	68,0	1,7	21,8	3,0	68,6	7,8
2191	Spanien		2015	5,7	trocken	0,75	5,0	6,5	128,9	8,1	25,4	6,8	135,2	8,6
2193	Deutschland	Pfalz	2015	7,4	trocken	0,5	2,8	1,8	128,5	9,3	18,5	2,8	124,3	2,1
2272	Deutschland	Württemberg	2015	7,8	trocken	1,5	8,0	2,7	127,3	1,6	26,5	1,1	112,7	1,8
2282	Deutschland	Rheingau	2015	8,9	trocken	4,8	20,4	0,4	119,8	2,5	30,3	0,9	129,0	0,9
2282	Deutschland	Württemberg	2014	8,3	trocken	4,8	16,3	0,8	39,2	2,3	22,5	0,2	13,1	5,8
2301	Deutschland	Rheingau	2015	7,6	trocken	1,8	9,4	1,1	163,2	1,2	26,5	3,0	168,2	9,2
2467	Deutschland	Pfalz	2015	6,9	trocken	1,2	7,0	7,7	96,7	2,6	17,5	2,9	66,9	0,1
2593	Deutschland	Baden	2015	7	trocken	1,5	7,7	2,2	142,2	2,0	23,4	2,3	144,4	2,5
2614	Tschechische Republik	Morava/ Südmähren	2015	6,8	halbtrocken	1,2	6,3	1,8	45,4	6,8	23,3	2,3	14,3	5,1
2616	Deutschland	Baden	2015	6,9	süß	1,5	7,8	1,7	80,8	3,3	23,8	2,1	131,4	1,4
2669	Deutschland	Sachsen	2014	8	trocken	4,8	19,1	2,9	141,7	3,0	57,2	1,6	163,0	4,3
2749	Deutschland	Sachsen	2013	9,5	trocken	4,8	19,3	2,7	142,7	1,2	33,0	2,2	102,6	3,3
2774	Deutschland	Rheingau	2015	7,8	trocken	1,2	6,2	4,0	112,5	8,8	30,0	8,6	134,7	3,1

Fortsetzung Tabelle 4

Produkt- nummer	Land	Anbaugebiet	Jahrgang	Säure [g/L]	Geschmacks- richtung	Bewertung Firne	TDN				Vitispiran			
							frei	gebunden		frei	gebunden		Stabw. [%]	Stabw. [%]
								µg/L	Stabw. [%]		µg/L	Stabw. [%]		
2775	Slowakei	Juznoslovenská vinohradnícka oblasť /Südliche Slowakei	2015	7,25	trocken	1,2	6,1	1,2	114,4	3,8	22,5	6,8	173,0	4,3
2783	Deutschland	Rheingau	2015	7,1	trocken	2,4	10,9	1,1	183,2	1,5	46,9	1,1	125,2	2,2
2872	Deutschland	Mosel	2014	7,8	trocken	1,8	8,2	2,9	188,1	2,1	27,6	2,3	185,0	3,2
2873	Deutschland	Rheingau	2015	7,5	trocken	0,6	4,5	2,9	77,8	0,7	18,8	2,8	99,1	7,2
2886	Luxemburg	Moselle-Luxembourg	2015	7,4	trocken	1,8	8,0	2,9	87,6	8,7	31,3	2,0	107,6	6,7
2892	Deutschland	Pfalz	2015	8,3	süß	1,0	5,3	0,1	196,0	1,1	26,1	7,5	188,8	7,4
2893	Deutschland	Württemberg	2015	7,3	trocken	0,6	4,5	1,6	86,0	3,2	19,5	2,5	76,2	8,8
2897	Deutschland	Pfalz	2015	8,1	trocken	1,8	8,5	12,5	119,9	3,7	19,5	12,3	130,6	3,1
2897	Deutschland	Pfalz	2015	8,6	trocken	1,0	5,6	11,7	125,1	2,4	12,6	9,8	150,0	1,0
2898	Deutschland	Baden	2015	7,4	trocken	1,8	9,0	1,6	72,9	0,1	28,6	1,8	98,0	1,5
2899	Deutschland	Franken	2015	7,7	lieblich	0,6	3,2	6,5	99,1	4,1	13,6	2,8	135,3	9,4
2930	Deutschland	Mosel	2015	8,8	edelsüß	1,0	5,3	4,4	149,9	2,5	30,4	9,4	107,6	3,3
2931	Deutschland	Pfalz	2015	7,1	trocken	3,0	13,3	4,2	173,7	5,9	52,6	8,4	116,3	1,3
3032	Deutschland	Rheinhausen	2015	7,8	trocken	0	1,7	6,7	84,0	0,3	7,0	1,4	93,2	1,7
3062	Deutschland	Rheingau	2015	7,7	trocken	1,2	6,9	0,6	109,3	4,6	32,1	7,8	131,2	3,6
3087	Deutschland	Baden	2015	6,4	trocken	1,8	8,4	1,2	171,1	2,5	32,2	1,1	157,1	4,3
3090	Deutschland	Rheingau	2015	6,8	trocken	1,8	9,0	2,3	177,7	1,4	21,0	2,3	210,4	2,4
3164	Deutschland	Pfalz	2015	7,3	trocken	0,6	4,3	3,2	145,3	6,6	20,1	9,4	141,5	1,6
3174	Tschechische Republik	Morava/ Südmähren	2015	7,7	lieblich	1,0	5,8	1,2	59,7	2,4	17,6	2,9	54,5	3,1
3206	Österreich	Niederösterreich	2015	5,8	trocken	0	2,1	1,8	64,6	1,1	7,6	2,1	58,9	5,5
3441	Luxemburg	Moselle-Luxembourg	2015	8,5	trocken	0	0,6	2,1	39,8	8,9	3,5	2,8	34,9	10,1
3442	Deutschland	Rheingau	2015	8,4	edelsüß	0,6	4,7	1,7	96,5	3,5	17,2	2,7	100,1	6,5
3443	Deutschland	Mosel	2015	8,2	süß	0,6	4,9	2,2	163,3	4,1	19,8	1,8	193,4	7,1
3606	Deutschland	Pfalz	2015	8,6	süß	1,5	7,4	2,2	85,8	1,1	24,6	2,0	77,9	7,2
3634	Tschechische Republik	Morava/ Südmähren	2015	6,6	edelsüß	0,5	3,0	5,7	116,7	1,8	18,4	9,7	172,8	8,2
3727	Deutschland	Pfalz	2015	7,4	trocken	0	0,6	1,5	32,2	2,0	1,1	2,9	22,1	0,8
3747	Deutschland	Pfalz	2015	7,7	trocken	2,25	10,5	4,5	75,4	0,1	27,6	1,1	68,8	10,0
3809	Deutschland	Rheingau	2015	7,9	feinherb	1,2	7,2	1,4	120,8	2,8	36,4	3,8	126,4	3,1
3811	Deutschland	Pfalz	2015	4,7	trocken	0,75	5,2	2,6	83,7	5,6	21,9	2,2	71,3	1,6

Fortsetzung Tabelle 4

Produkt- nummer	Land	Anbaugebiet	Jahrgang	Säure [g/L]	Geschmacks- richtung	Bewertung Firne	TDN				Vitispiran			
							frei	gebunden		frei	gebunden		frei	gebunden
								µg/L	Stabw. [%]		µg/L	Stabw. [%]		
3812	Deutschland	Mosel	2015	8,2	feinherb	1,0		5,6	3,4		18,7	2,4		87,0
3821	Deutschland	Mosel	2015	8,6	süß	2,0		9,6	2,7		25,8	2,4		78,6
3831	Deutschland	Baden	2015	7,4	trocken	1,8		9,0	2,3		21,0	4,1		72,3
3895	Deutschland	Rheinessen	2015	8,8	feinherb	1,2		7,2	1,1		23,5	2,1		108,7
3947	Tschechische Republik	Morava/ Südmähren	2015	9	edelsüß	1,8		8,1	1,4		25,0	2,5		98,0
3955	Deutschland	Mosel	2015	7,3	halbtrocken	1,5		7,7	3,1		19,3	1,9		79,8
3985	Luxemburg	Moselle-Luxembourg	2015	8,2	trocken	0,6		4,7	1,7		15,4	2,7		95,6
4168	Deutschland	Rheingau	2015	8,5	trocken	3,6		14,9	3,8		44,2	1,9		88,8
4361	Frankreich	Alsace	2015	4,38	trocken	0		1,6	12,3		7,5	11,8		96,5
4363	Deutschland	Rheingau	2015	9	edelsüß	1,0		5,7	1,7		17,3	1,0		73,6
4396	Österreich	Niederösterreich	2015	6,5	trocken	0		2,6	2,2		13,1	3,0		88,7
4962	Deutschland	Baden	2015	7,1	trocken	0		1,4	0,5		9,0	0,3		95,8
5042	Luxemburg	Moselle-Luxembourg	2015	7,5	trocken	0,6		3,7	6,5		13,1	2,6		92,5
5096	Deutschland	Württemberg	2015	6,4	trocken	1,2		7,1	1,2		31,6	1,2		53,3
5491	Deutschland	Mosel	2015	7,6	edelsüß	0		0,6	6,0		3,3	3,0		90,9
5525	Deutschland	Mosel	2015	6,8	feinherb	1,5		7,4	5,3		25,1	3,1		266,6
5526	Deutschland	Mosel	2015	8,3	trocken	1,8		8,5	2,2		32,1	1,8		96,0
5539	Deutschland	Sachsen	2015	9,4	lieblich	0		2,0	1,4		9,2	2,2		115,4
5543	Österreich	Niederösterreich	2015	6,5	trocken	0		2,3	1,6		12,4	1,9		101,5
5615	Luxemburg	Moselle-Luxembourg	2015	7,15	trocken	0		0,9	5,2		5,0	3,8		94,8
5658	Deutschland	Rheingau	2013	7,4	trocken	6,0		21,1	8,7		78,1	3,7		114,1
7353	Deutschland	Pfalz	2015	7,9	trocken	1,0		5,2	7,6		19,9	6,0		129,2
10063	Deutschland	Mosel	2015	10	süß	2,25		9,8	3,2		42,4	5,3		141,9
















## 12.2 Bestimmung der TDN-Wahrnehmungsschwelle von Verbrauchern

Tablett A

### Schwellenwertbestimmung:

Bitte kreuzen Sie nach **geruchlicher Beurteilung** in jeder Zeile die Glasnummer an, die I Meinung nach die **abweichende Probe (Petrolnote)** in der jeweiligen Dreiergruppe darstellt

**Verkosten Sie bitte von in jeder Reihe von links nach rechts und unten nach oben.**

5.	 792	 843	 629
4.	 542	 137	 411
3.	 748	 625	 881
2.	 471	 194	 346
1.	 953	 435	 756

Wenn Sie möchten, können Sie uns mithilfe einiger persönlicher Daten weiterhelfen (Angaben freiwillig):

Geschlecht: ☐ weiblich ☐ männlich

Alter: ☐ < 25 ☐ 25-35 ☐ 35-45 ☐ 45-55 ☐ 55-65 ☐ > 65

**Vielen Dank für Ihre Mitarbeit!**

Abbildung 26: Fragebogen zur Bestimmung der Wahrnehmungsschwelle von Verbrauchern

Tabelle 5: Ergebnisse der Bestimmung der Wahrnehmungsschwelle von Verbrauchern

Teilnehmer	TDN-Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]							BET [ $\mu\text{g/L}$ ]	Geschlecht	Alter
	0,3 <sup>a</sup>	1	3	10	30	100	300 <sup>a</sup>			
1	0	0	1	1	1	1	1	1,73	m	45-54
2	0	0	0	0	1	1	1	17,32	m	>64
3	0	0	0	0	0	1	1	54,77	m	45-54
4	0	1	0	0	1	1	1	17,32	m	<25
5	0	0	0	0	1	1	1	17,32	w	55-64
6	0	1	1	1	0	1	1	54,77	m	25-34
7	0	1	1	0	1	1	1	17,32	m	45-54
8	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	45-54
9	0	0	1	1	1	1	1	1,73	m	45-54
10	0	1	0	1	0	1	1	54,77	w	35-44
11	0	0	0	1	1	0	1	173,21	m	<25
12	0	0	0	0	0	1	1	54,77	m	25-34
13	0	0	0	0	1	1	1	17,32	w	55-64
14	0	0	1	0	1	1	1	17,32	m	55-64
15	0	0	1	1	1	1	1	1,73	m	<25
16	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	35-44
17	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	25-34
18	0	0	1	1	1	1	1	1,73	m	45-54
19	0	0	0	1	0	1	1	54,77	m	<25
20	0	0	0	1	0	1	1	54,77	w	35-44
21	0	0	0	0	0	1	1	54,77	m	45-54
22	0	0	1	1	0	1	1	54,77	w	35-44
23	0	1	0	1	1	1	1	5,48	w	>64
24	0	1	1	0	0	1	1	54,77	w	55-64
25	0	1	1	1	1	1	1	0,55	m	<25
26	0	0	0	0	1	1	1	17,32	m	45-54
27	0	0	1	1	1	1	1	1,73	w	45-54
28	0	1	0	1	1	1	1	5,48	m	>64
29	0	1	1	1	1	1	1	0,55	m	45-54
30	0	0	0	1	1	1	1	5,48	m	55-64
31	0	0	0	1	1	1	1	5,48	m	<25
32	0	0	1	0	1	0	1	173,21	m	<25
33	0	0	0	1	1	1	1	5,48	m	55-64
34	0	0	1	0	1	1	1	17,32	w	35-44
35	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	35-44
36	0	0	0	1	1	1	1	5,48	m	>64
37	0	0	0	1	1	0	1	173,21	m	35-44
38	0	0	0	0	1	1	1	17,32	m	45-54
39	0	0	1	0	1	1	1	17,32	m	25-34
40	0	0	0	1	1	1	1	5,48	m	>64
41	0	1	0	1	1	1	1	5,48	m	25-34
42	0	0	0	1	1	1	1	5,48	m	>64
43	0	0	1	1	0	1	1	54,77	m	45-54



44	0	1	1	1	1	1	1	0,55	m	55-64
45	0	0	0	0	1	1	1	17,32	m	55-64
46	0	1	0	0	0	0	1	173,21	m	55-64
47	0	0	0	0	1	1	1	17,32	w	<25
48	0	0	1	0	1	1	1	17,32	m	45-54
49	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	45-54
50	0	1	1	1	1	1	1	0,55	w	25-34
51	0	0	0	1	0	1	1	54,77	m	25-34
52	0	1	1	1	1	1	1	0,55	m	45-54
53	0	1	0	1	1	1	1	5,48	w	35-44
54	0	1	0	1	0	1	1	54,77	m	<25
55	0	1	1	0	1	1	1	17,32	m	<25
56	0	0	1	1	1	1	1	1,73	w	25-34
57	0	0	1	0	0	1	1	54,77	m	>64
58	0	0	0	0	0	1	1	54,77	w	35-44
59	0	0	0	0	1	1	1	17,32	m	35-44
60	0	0	0	1	1	0	1	173,21	m	55-64
61	0	1	0	1	0	1	1	54,77	w	25-34
62	0	0	1	1	1	1	1	1,73	w	35-44
63	0	0	1	0	1	1	1	17,32	m	45-54
64	0	0	1	0	1	1	1	17,32	w	55-64
65	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	45-54
66	0	0	0	1	1	1	1	5,48	m	45-54
67	0	0	1	1	1	1	1	1,73	w	45-54
68	0	0	1	1	1	1	1	1,73	m	45-54
69	0	0	0	0	0	1	1	54,77	w	25-34
70	0	0	1	1	1	1	1	1,73	w	35-44
71	0	1	1	0	1	1	1	17,32	m	35-44
72	0	1	1	1	0	1	1	54,77	w	25-34
73	0	0	0	0	1	1	1	17,32	m	55-64
74	0	0	0	0	1	0	1	173,21	m	45-54
75	0	0	0	0	0	0	1	173,21	m	55-64
76	0	1	1	1	1	1	1	0,55	w	25-34
77	0	1	0	1	0	0	1	173,21	w	45-54
78	0	0	1	0	1	1	1	17,32	m	45-54
79	0	0	1	1	0	0	1	173,21	w	55-64
80	0	0	1	1	1	1	1	1,73	m	25-34
81	0	1	0	1	1	1	1	5,48	m	35-44
82	0	1	1	1	1	1	1	0,55	m	45-54
83	0	0	1	1	1	1	1	1,73	w	45-54
84	0	0	0	0	0	1	1	54,77	m	55-64
85	0	0	0	0	0	0	1	173,21	m	25-34
86	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	45-54
87	0	0	0	0	1	1	1	17,32	w	55-64
88	0	0	1	0	1	1	1	17,32	w	45-54
89	0	0	1	1	1	1	1	1,73	w	55-64
90	0	1	0	0	0	1	1	54,77	w	55-64
91	0	0	0	1	0	0	1	173,21	w	45-54

92	0	0	1	1	1	1	1	1,73	m	<25
93	0	1	0	1	1	1	1	5,48	m	35-44
94	0	0	1	1	1	1	1	1,73	w	45-54
95	0	0	1	0	1	1	1	17,32	w	>64
96	0	1	0	0	0	0	1	173,21	m	45-54
97	0	1	0	0	1	1	1	17,32	w	45-54
98	0	0	0	0	0	1	1	54,77	m	<25
99	0	0	0	0	1	1	1	17,32	w	<25
100	0	0	0	0	1	1	1	17,32	m	>64
101	0	0	1	1	1	1	1	1,73	w	25-34
102	0	0	0	1	1	1	1	5,48	m	25-34
103	0	1	1	1	1	1	1	0,55	m	25-34
104	0	1	0	1	0	0	1	173,21	w	25-34
105	0	0	0	1	0	1	1	54,77	w	25-34
106	0	0	0	1	1	0	1	173,21	w	25-34
107	0	1	0	0	1	1	1	17,32	w	25-34
108	0	0	1	1	1	1	1	1,73	m	25-34
109	0	1	0	1	1	1	1	5,48	m	25-34
110	0	0	0	1	1	1	1	5,48	m	25-34
111	0	1	0	1	1	0	1	173,21	m	55-64
112	0	0	0	0	1	1	1	17,32	m	35-44
113	0	1	1	1	1	1	1	0,55	w	25-34
114	0	1	1	0	0	1	1	54,77	m	45-54
115	0	1	1	1	0	1	1	54,77	m	<25
116	0	1	1	0	0	1	1	54,77	m	55-64
117	0	1	1	1	1	1	1	0,55	w	>64
118	0	1	0	1	1	1	1	5,48	w	55-64
119	0	0	0	0	1	0	1	173,21	m	55-64
120	0	1	0	1	1	0	1	173,21	w	>64
121	0	1	0	0	0	1	1	54,77	m	55-64
122	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	<25
123	0	0	1	1	1	1	1	1,73	m	45-54
124	0	1	0	1	1	1	1	5,48	w	25-34
125	0	0	1	1	0	0	1	173,21	w	25-34
126	0	1	1	1	1	0	1	173,21	w	45-54
127	0	0	1	1	1	1	1	1,73	m	<25
128	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	45-54
129	0	0	0	0	0	1	1	54,77	w	45-54
130	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	45-54
131	0	0	0	1	0	0	1	173,21	m	45-54
132	0	0	1	1	1	1	1	1,73	w	55-64
133	0	1	0	0	1	1	1	17,32	m	25-34
134	0	1	1	0	1	1	1	17,32	w	45-54
135	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	25-34
136	0	1	1	1	0	1	1	54,77	w	<25
137	0	0	0	0	1	1	1	17,32	w	<25
138	0	1	1	1	1	1	1	0,55	m	55-64
139	0	1	1	0	0	0	1	173,21	w	<25

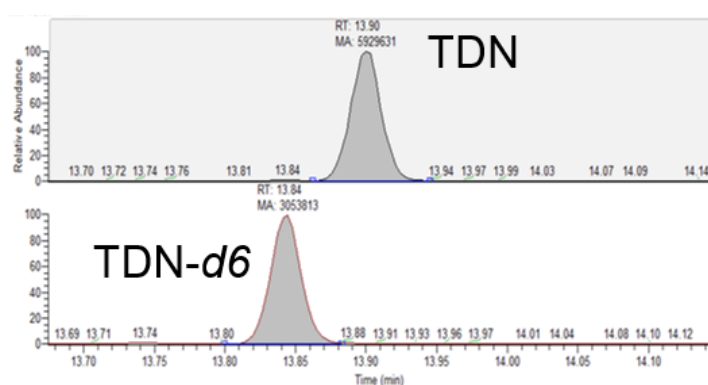
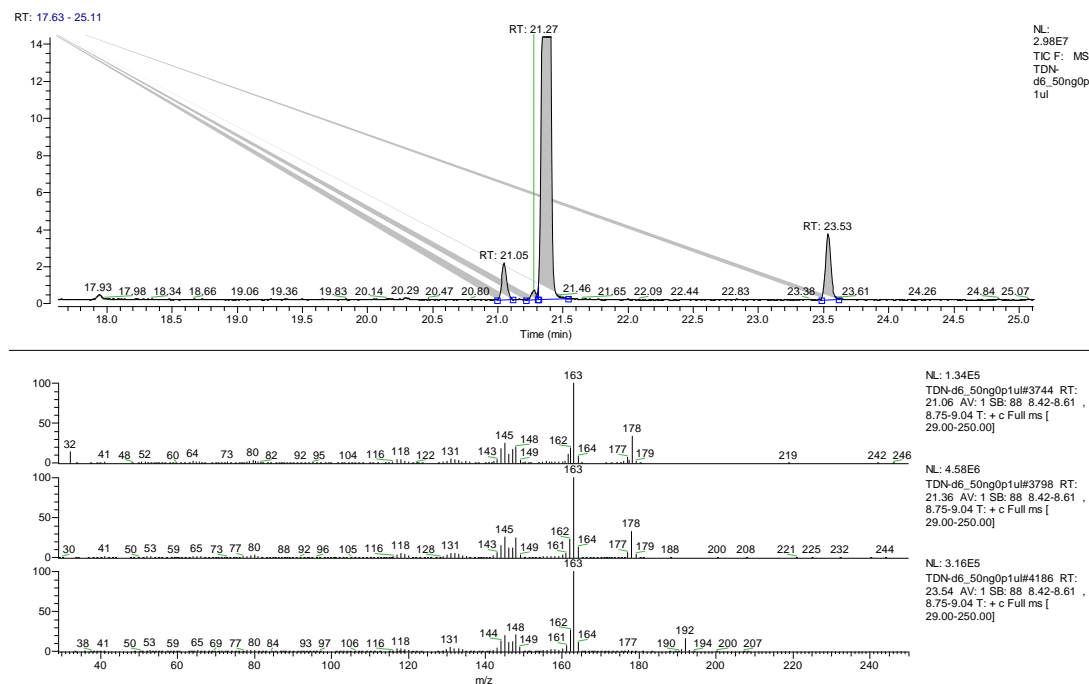
140	0	0	1	1	1	1	1	1,73	m	45-54
141	0	1	0	0	1	1	1	17,32	m	<25
142	0	1	0	1	1	1	1	5,48	m	<25
143	0	1	0	1	1	1	1	5,48	m	<25
144	0	0	0	1	1	1	1	5,48	m	45-54
145	0	0	0	1	0	1	1	54,77	w	45-54
146	0	1	0	1	1	1	1	5,48	w	45-54
147	0	0	0	0	0	1	1	54,77	m	25-34
148	0	1	1	1	1	1	1	0,55	m	45-54
149	0	0	0	0	0	1	1	54,77	w	45-54
150	0	1	0	1	1	1	1	5,48	m	55-64
151	0	0	0	0	1	1	1	17,32	m	45-54
152	0	0	0	1	1	1	1	5,48	w	55-64
153	0	1	0	1	1	1	1	5,48	m	55-64
154	0	1	1	1	1	1	1	0,55	w	55-64
155	0	0	1	1	1	1	1	1,73	w	45-54
156	0	0	0	0	1	1	1	17,32	w	55-64
Anteil richtiger Antworten	0	0,36	0,4	0,63	0,74	0,865	1			
In Konzentration		0,00	1,10	2,30	3,40	4,61				
<b>DT graphische Methode</b>	<b>µg/L</b>							<b>14,74</b>		
<b>Mittelwert BET (DT E679)</b>	<b>µg/L</b>							<b>12,24</b>		
<b>DT E1432</b>	<b>µg/L</b>							<b>17,21</b>		

<sup>a</sup> hypothetische Konzentrationen, dienen lediglich der Berechnung

### 12.3 Ergänzende Daten zu: Comparison of Solid-Phase Microextraction Using Classical Fibers Versus Mini-Arrows Applying Multiple Headspace Extraction and Various Agitation Techniques

Tabelle 6: Validierungsdaten der HS-SPME-GC-MS für TDN und Vitispiran

		TDN		Vitispiran	
		frei	gebunden	frei	gebunden
Arbeitsbereich	[µg/L]	0,05 – 20,1	5 – 201,0	0,2 – 20,9	20 – 209,4
Bestimmtheitsmaß R <sup>2</sup>		0,998	0,947	0,957	0,929
LOD	[µg/L]	0,014	5,36	0,046	4,58
LOQ	[µg/L]	0,042	4,21	0,134	13,49
Wiederfindung	[%]	104,3 ± 6,7		105,1 ± 12,3	
Methodenpräzision V <sub>k</sub>	[%]	0,67	4,85	1,87	6,55

Abbildung 27: Chromatographische Trennung von TDN und TDN-*d*6Abbildung 28: Reinheitskontrolle des eingesetzten isotopologen *d*6-TDN Standards

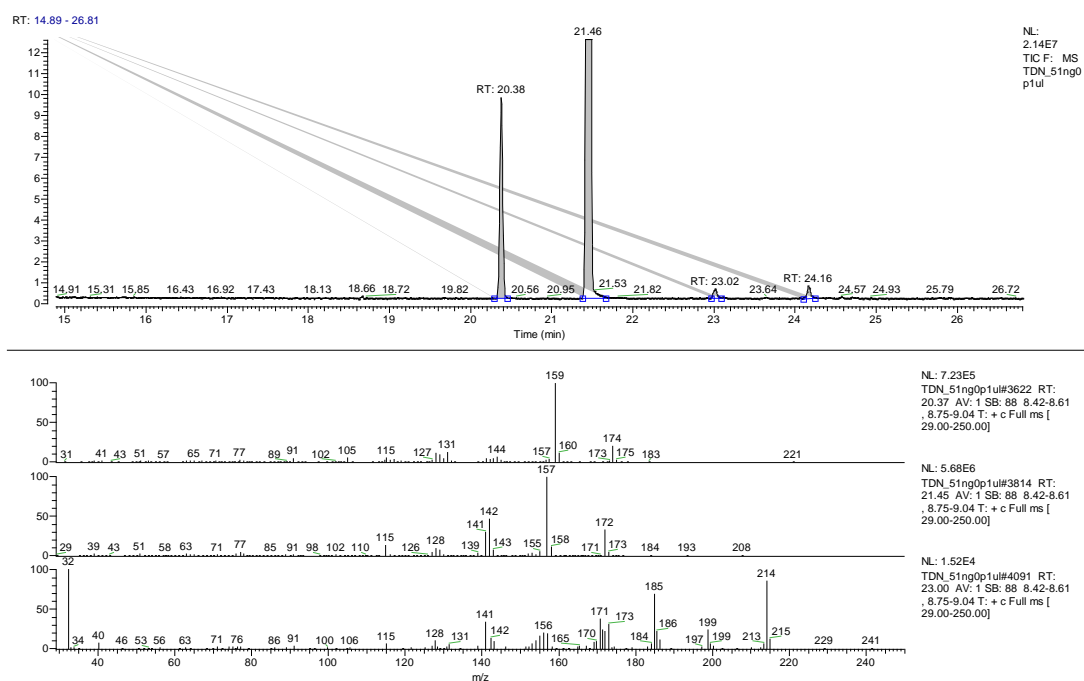


Abbildung 29: Reinheitskontrolle des eingesetzten isotopologen TDN Standards

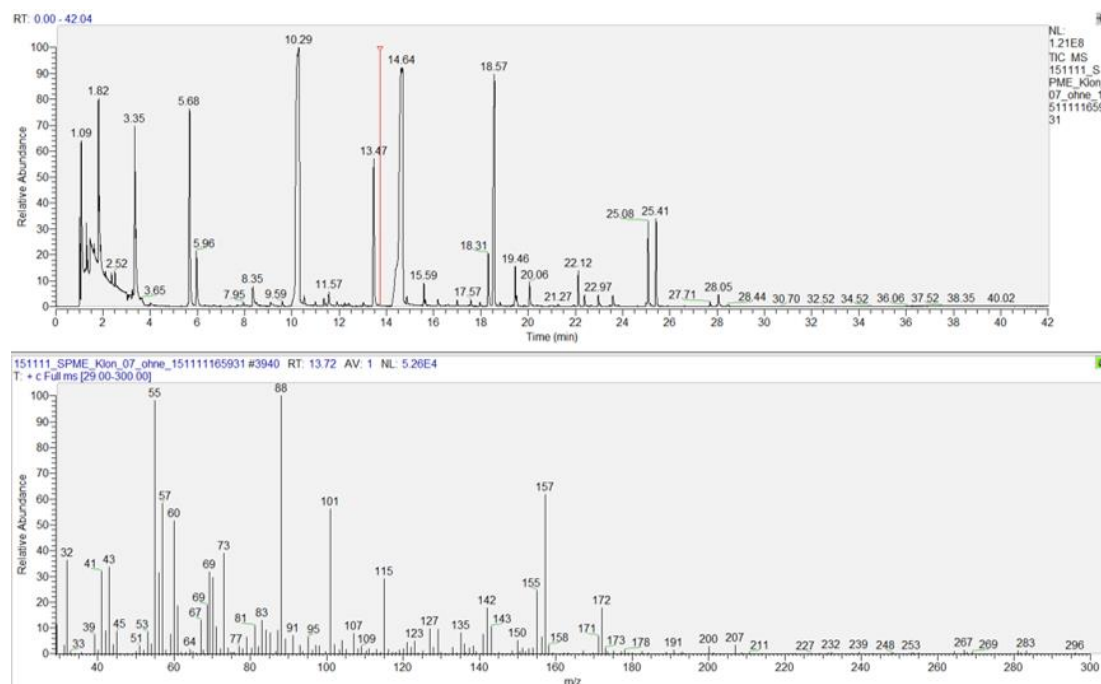


Abbildung 30: Chromatogramm eines Versuchsweins im Full-Scan-Modus, vor Hydrolyse

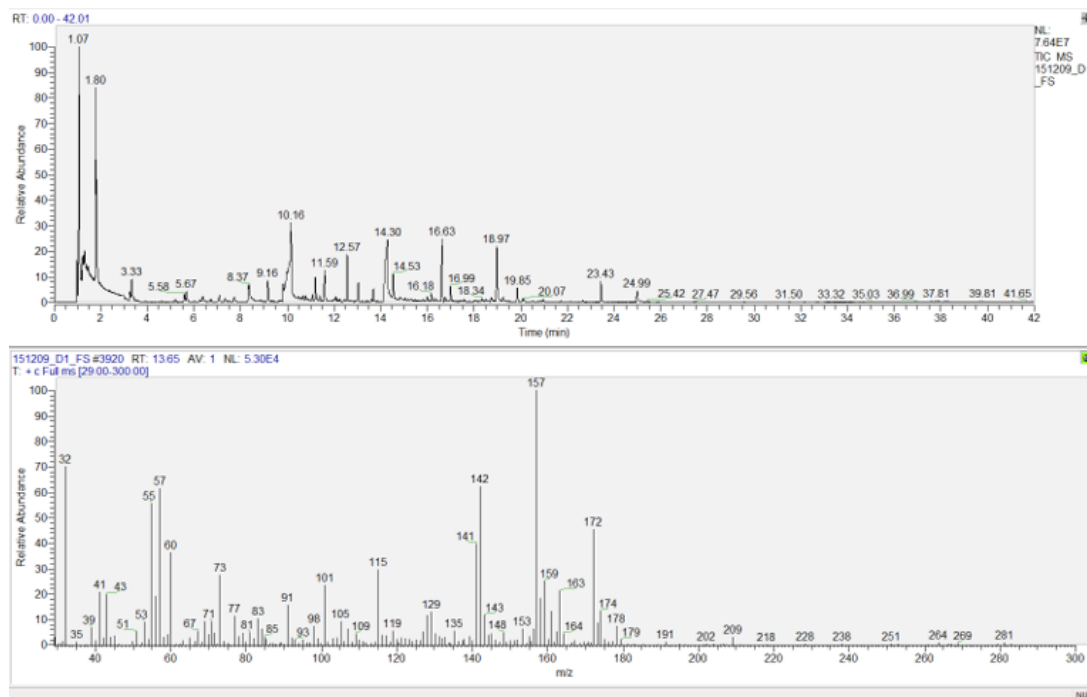


Abbildung 31: Abbildung 30: Chromatogramm eines Versuchsweins im Full-Scan-Modus, nach Hydrolyse und Zusatz von d6-TDN



## 12.4 Supporting information zu: Impact of Rootstock, Clonal Selection, and Berry Size of *Vitis vinifera* sp. Riesling on the Formation of TDN, Vitispiranes, and Other Volatile Compounds

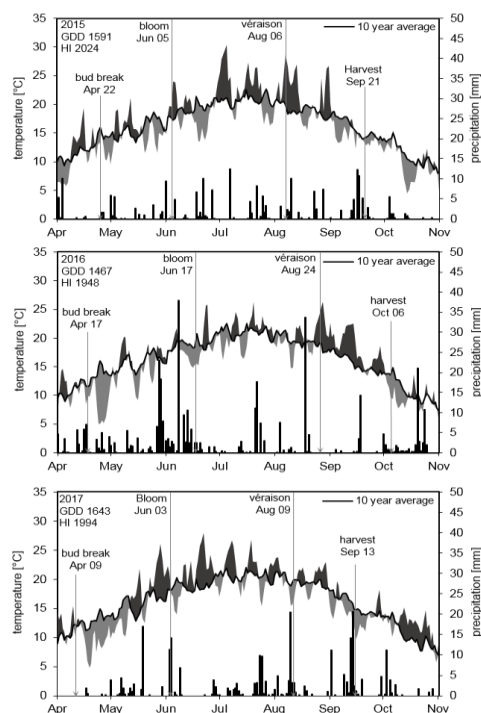


Figure S1: Climate data (temperature and precipitation) of vintages 2015-2017, including growing degree days (GDD) and Hugin index (HI) and time points of bud break, véraison and harvest.

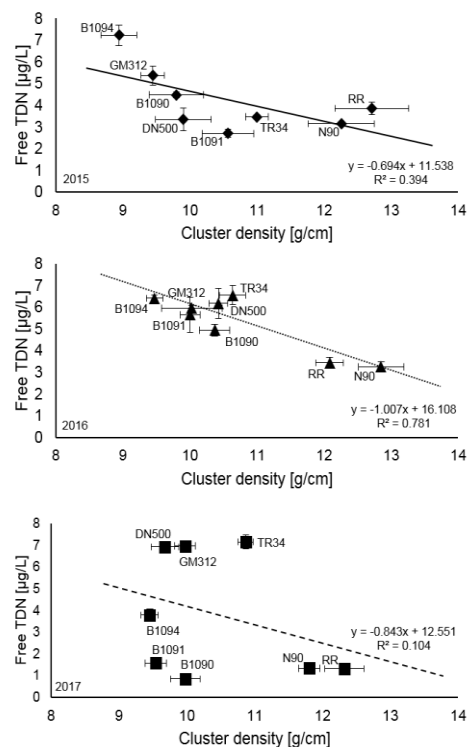


Figure S2: Correlation between cluster density (g/cm) and free TDN (µg/L) in wine obtained from eight different clones and three vintages (top, 2015; middle, 2016; bottom, 2017). Data represent mean values of  $n = 3$  for determination of cluster density and  $n = 2$  for chemical analysis.

Table S1: Phenological Data of Clones from Vintages 2015 to 2017<sup>a</sup>

clone	vintage	grape weight (g)	bunch length (cm)	cluster density (g/cm)
N90	2015	174.5 ± 18.6	14.2 ± 0.6	12.3 ± 0.5
B1090		126.4 ± 7.8	12.9 ± 1.0	9.8 ± 0.4
B1091		156.3 ± 5.5	14.8 ± 1.1	10.6 ± 0.4
B1094		134.4 ± 2.5	15.0 ± 0.7	8.9 ± 0.3
Red Riesling		191.1 ± 14.7	15.0 ± 1.1	12.7 ± 0.6
GM312		153.7 ± 5.1	16.3 ± 1.0	9.5 ± 0.2
TR34		176.3 ± 12.6	16.0 ± 1.0	11.0 ± 0.2
DN500		160.5 ± 10.4	16.2 ± 0.9	9.9 ± 0.4
N90	2016	191.8 ± 11.3	14.9 ± 0.1	12.9 ± 0.3
B1090		135.9 ± 18.4	13.1 ± 1.2	10.4 ± 0.2
B1091		135.5 ± 12.3	13.6 ± 0.8	10.0 ± 0.2
B1094		121.8 ± 2.3	12.7 ± 0.1	9.5 ± 0.1
Red Riesling		190.4 ± 3.2	15.8 ± 0.3	12.1 ± 0.2
GM312		145.8 ± 10.3	14.5 ± 0.4	10.0 ± 0.5
TR34		151.9 ± 3.9	14.3 ± 0.3	10.6 ± 0.2
DN500		162.4 ± 4.6	15.6 ± 0.3	10.4 ± 0.1
N90	2017	179.5 ± 3.3	15.2 ± 0.2	11.8 ± 0.2
B1090		136.3 ± 6.7	13.7 ± 0.5	10.0 ± 0.2
B1091		131.6 ± 6.4	13.8 ± 0.5	9.5 ± 0.2
B1094		132.9 ± 4.4	14.1 ± 0.2	9.5 ± 0.1
Red Riesling		186.5 ± 5.8	15.1 ± 0.7	12.3 ± 0.3
GM312		149.3 ± 4.7	15.0 ± 0.3	10.0 ± 0.2
TR34		165.4 ± 3.4	15.2 ± 0.3	10.9 ± 0.1
DN500		143.5 ± 9.6	14.8 ± 0.5	9.7 ± 0.2
significance	clone	***	**	***
	vintage	ns	ns	ns

<sup>a</sup>Data represent mean values including standard deviation with n (2015) = 4x5 and n (2016, 2017) = 3x10. Significance is indicated with ns (not significant), \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) and \*\*\* (p<0.001).

Table S2: Sensory Data of Wines obtained from Eight Different Clones of Vintages 2015 – 2017<sup>a</sup>

clone	vintage	color	citrus	petrol	peach/ passion fruit	floral	smoky	sweet	sour	body	bitter
N90	2015	3.9	4.4	3.5 d	3.3	3.6	3.0 bc	3.0	6.0	4.0	2.9
B1090		3.7	4.1	4.5 c	3.6	3.8	3.5 ab	3.2	6.1	3.9	3.3
B1091		4.2	4.6	5.6 a	3.1	3.8	3.6 ab	2.8	6.5	4.3	3.1
B1094		4.3	3.7	5.6 a	3.6	4.1	4.4 a	2.9	6.2	4.8	3.0
Red Riesling		4.0	4.9	3.5 d	3.2	3.5	2.5 c	2.7	6.2	4.0	3.5
GM312		4.3	4.0	4.5 c	3.5	3.6	2.9 bc	3.4	5.9	5.0	4.0
TR34		3.9	3.9	4.1 cd	3.3	3.6	3.3 bc	2.5	6.6	4.8	3.7
DN500		4.1	3.8	4.7 bc	3.3	3.8	3.7 ab	2.6	6.0	4.5	3.5
N90	2016	2.1 e	4.7	3.9 b	3.9 a	3.0 c	3.9 ab	5.2 a	5.7 bc	3.8 c	4.2
B1090		4.7 ab	4.7	3.3 d	3.5 ab	3.5 b	3.6 bc	3.4 c	5.4 c	5.0 ab	4.3
B1091		2.4 de	4.9	3.7 bc	3.0 b	4.2 a	3.7 bc	4.0 b	6.4 a	5.0 ab	4.4
B1094		3.4 c	5.0	3.6 bc	4.1 a	3.8 ab	4.3 a	3.4 c	6.0 ab	4.6 b	4.4
Red Riesling		3.1 de	5.6	3.5 c	4.0 a	3.9 ab	3.6 bc	3.3 c	6.3 a	5.5 a	3.5
GM312		3.2 cd	5.2	4.2 ab	4.0 a	4.2 a	3.3 c	3.5 c	5.7 bc	5.0 ab	4.1
TR34		5.2 a	5.4	4.2 ab	4.1 a	3.8 ab	4.0 ab	3.2 c	6.0 ab	5.1 ab	4.8
DN500		3.6 bc	4.9	4.4 a	3.9 a	4.1 a	3.7 bc	3.2 c	6.3 a	5.4 a	3.9
N90	2017	2.5 bc	3.6 b	2.3 c	2.8 ab	3.2 ab	2.1 b	5.5 a	4.7 bc	3.9 c	5.7 a
B1090		2.7 b	3.8 ab	2.2 c	2.7 ab	3.7 ab	2.1 b	5.6 a	4.0 c	3.5 c	5.6 a
B1091		1.9 c	4.3 ab	2.9 ab	2.3 b	2.8 b	2.3 b	3.6 b	5.5 ab	5.6 a	4.8 c
B1094		2.3 bc	4.5 ab	3.0 ab	2.7 ab	3.9 a	2.1 b	4.1 b	5.8 a	5.3 ab	5.0 bc
Red Riesling		2.7 b	4.7 a	2.2 c	3.4 a	3.9 a	2.0 b	3.5 b	5.4 ab	5.1 ab	5.3 ab
GM312		4.4 a	3.8 ab	3.0 ab	2.9 ab	3.5 ab	2.9 a	3.4 b	5.6 ab	5.6 a	4.9 bc
TR34		4.6 a	4.3 ab	3.3 a	3.5 a	3.8 ab	2.1 b	4.0 b	5.5 ab	4.9 b	4.9 bc
DN500		4.7 a	3.9 ab	2.7 b	3.3 a	3.5 ab	2.0 b	4.0 b	5.6 ab	5.1 ab	5.0 bc
ANOVA	df										
clones	7	F / p	11.92 / ***	1.27 / ns	4.31 / **	1.28 / ns	3.24 / ns	7.20 / ***	2.42 / *	1.50 / ns	1.92 / ns
vintage	2	F / p	13.59 / ***	0.30 / ns	45.82 / ***	2.47 / ns	22.91 / ***	36.69 / ***	16.98 / ***	11.92 / ***	1.92 / ns
judges	14	F / p	13.54 / ***	9.19 / ***	8.62 / ***	15.97 / ***	12.88 / ***	18.19 / ***	22.08 / ***	9.66 / ***	10.49 / ***
replications	1	F / p	0.82 / ns	5.00 / *	2.25 / ns	4.68 / *	3.24 / ns	0.97 / ns	0.74 / ns	0.66 / ns	0.48 / ns

<sup>a</sup>Data represent mean values of tastings with n (replication) = 2 and n (judge) = 15 (2015), 15 (2016) and 21 (2017) on a scale from 0 (not detectable) to 10 (very strong). Letters indicate significant differences among variants of individual vintages. Significance is indicated with ns (not significant), \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) and \*\*\* (p<0.001).

## 12.5 Supporting info zu: Impact of Defoliation on the Formation of TDN, Vitispiranes and Other Volatiles of *Vitis vinifera* sp. Riesling

Table S1: Sensory Data of Wines Obtained from Defoliation Experiments of Vintages 2015 – 2017.<sup>a</sup>

variant	vintage	citrus	petrol	floral	peach	green apple	honey	smoky	fruity	sweet	sour	body	mouthfeel	bitter
C 0/0	2015	3.3 cd	3.3 bc	4.6 ab	4.2	3.7	4.1	3.0	5.1	3.2	5.4	3.9	4.9 bcd	3.3
B 0/75		4.6 ab	3.6 bc	4.6 a	4.3	3.6	3.8	3.3	4.7	3.1	5.4	4.4	5.2 abcd	3.7
pB 0/75		4.4 ab	3.9 ab	4.5 ab	4.3	4.1	4.3	4.0	4.5	2.9	5.5	3.9	5.4 abc	3.7
V 0/75		5.1 a	2.8 c	3.7 abc	4.4	3.8	3.9	3.1	4.8	2.9	5.8	4.3	5.1 abcd	3.0
V 75/75		5.2 a	3.2 bc	3.6 c	4.0	3.8	4.2	3.7	4.9	3.0	4.8	3.7	4.5 d	3.4
V 100/100		3.8 bcd	3.3 bc	3.7 bc	3.6	3.7	3.7	4.0	5.0	3.4	5.3	4.5	4.7 cd	2.9
C 0/0	2016	3.0	3.4 bc	2.6	2.9 c	3.5	2.4	2.0	3.4	2.4	6.0	4.4	4.8	3.5
B 0/75		2.9	3.2 c	2.6	3.1 c	3.0	2.5	2.1	3.2	2.6	5.6	4.7	5.1	4.0
pB 0/75		3.6	4.0 ab	2.6	3.6 a	3.6	2.4	2.3	3.7	2.3	5.6	4.8	4.5	3.6
V 0/75		3.3	3.6 bc	3.2	3.3 ab	3.4	2.7	2.8	3.3	2.7	5.9	4.4	4.7	4.3
V 75/75		3.6	4.1 ab	3.3	3.6 a	3.3	3.1	3.2	4.0	2.8	5.8	4.8	4.7	3.8
V 100/100		2.9	4.4 a	3.3	3.1 ab	4.1	3.1	2.9	4.0	3.0	5.8	4.8	4.9	3.9
C 0/0	2017	3.6	3.1 ab	2.4 d	2.6 bc	3.0 bc	2.9 bc	2.1 c	3.9 c	3.0 e	5.9 a	4.6 c	5.9 a	3.1 a
B 0/75		3.3	2.4 bc	2.6 cd	2.3 c	2.5 c	2.3 c	4.1 a	4.2 c	3.9 d	4.5 bc	4.7 c	5.1 b	3.3 a
pB 0/75		4.4	3.5 a	3.4 bc	3.3 ab	4.2 a	3.8 a	2.9 bc	5.0 b	4.5 c	4.0 cd	5.1 bc	4.4 b	3.1 a
V 0/75		3.9	2.7 bc	4.3 a	4.1 a	3.7 ab	4.3 a	3.3 ab	6.2 a	7.2 a	2.4 e	6.0 a	2.1 d	1.7 b
V 75/75		4.0	2.1 c	4.0 ab	3.6 a	3.6 ab	3.5 ab	3.1 b	6.0 a	6.0 b	3.3 d	5.7 ab	3.0 c	2.1 b
V 100/100		3.8	3.2 ab	2.7 cd	2.7 bc	2.7 c	2.1 c	3.0 b	4.5 bc	4.2 cd	4.9 b	5.1 bc	5.0 b	3.0 a
ANOVA	df													
vintage	2	F / p	2.24 / ns	0.15 / ns	0.90 / ns	0.81 / ns	0.49 / ns	2.74 / ns	4.90 / **	45.80 / ***	28.01 / ***	16.09 / ***	1.22 / ns	17.10 / ns
judges	18	F / p	5.33 / ***	7.24 / ***	6.82 / ***	7.53 / ***	5.11 / ***	6.34 / ***	7.22 / ***	10.53 / ***	8.98 / ***	7.73 / ***	4.32 / ***	4.50 / ***
replications	1	F / p	0.04 / ns	0.63 / ns	0.54 / ns	1.85 / ns	1.64 / ns	0.98 / ns	0.41 / ns	0.60 / ns	0.13 / ns	0.01 / ns	0.14 / ns	1.22 / ns
time point	3	F / p	0.82 / ns	0.35 / ns	0.29 / ns	0.69 / ns	2.12 / ns	1.04 / ns	1.72 / ns	2.71 / *	8.00 / ***	5.86 / **	0.35 / ns	8.91 / ***
intensity	2	F / p	2.77 / ns	1.39 / ns	0.71 / ns	1.58 / ns	0.75 / ns	0.70 / ns	0.81 / ns	1.78 / ns	4.64 / ns	2.57 / ns	0.49 / ns	7.20 / ***

<sup>a</sup> Data represent mean values of tastings with n (replication) = 2 and n (judge) = 19 (2015), 25 (2016) and 22 (2017) on a scale from 0 (not detectable) to 10 (very strong). Letters indicate significant differences among variants of individual vintages. Significance is indicated with ns (not significant), \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) and \*\*\* (p<0.001).

## 12.6 Supporting information zu: Impact of Oenological Practices on Formation of Free and Bound TDN and Other Volatiles of *Vitis vinifera* sp. Riesling

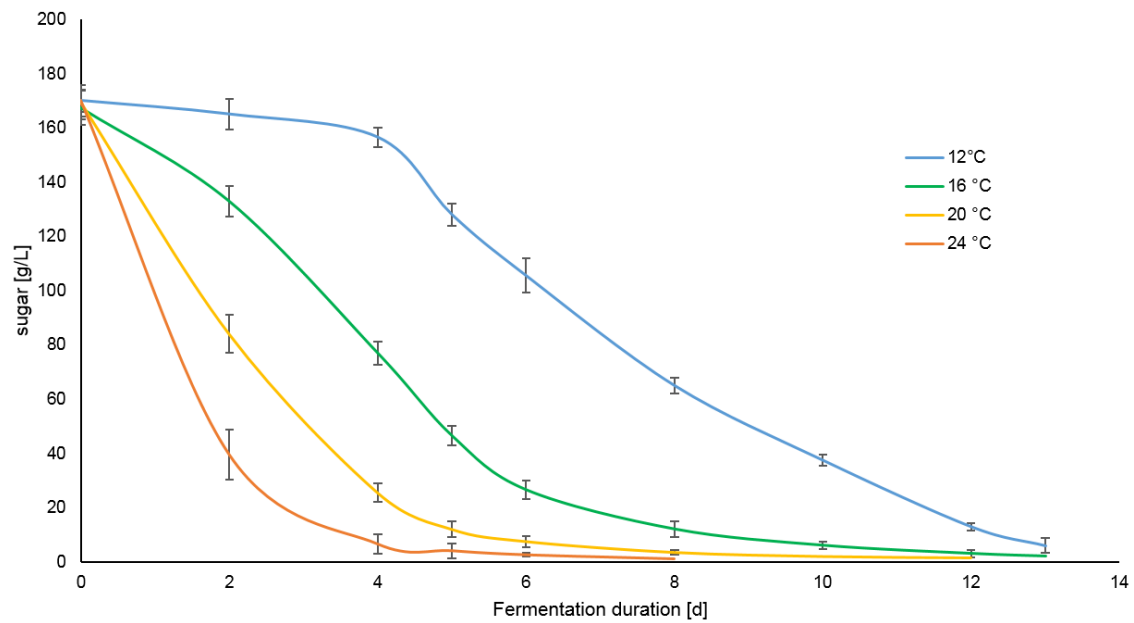


Figure S1: Fermentation course of wines fermented at different temperatures. Error bars represent standard deviation across two replications in two vintages.

Table S1: Total Acidity, Volatiles and Bound TDNVS of Riesling Wines Made from Different Press Fractions after 9 Months of Bottle Aging. Letters Indicate Significant Differences among the Experiments within the Individual Vintage. Data Represent Mean Values with  $n = 2$ . Significance is Indicated with ns (not significant), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

Vintage	2016				2017				Significance		Odor threshold	Interaction Variant * Vintage	
	Free run (PF1)	0.4 bar (PF2)	1.0 bar (PF3)	1.5 bar (PF4)	Free run (PF1)	0.4 bar (PF2)	1.0 bar (PF3)	1.5 bar (PF4)	Variant	Vintage		Variant	Vintage
TDN bound	[µg/L]	113.0 b	116.8 b	147.9 a	165.1 a	70.2 d	127.6 c	141.5 b	159.1 a	***	***	***	***
VS bound	[µg/L]	74.2 b	90.1 b	151.2 a	144.1 a	78.3 d	95.4 c	170.7 b	203.7 a	***	***	***	***
TDN free	[µg/L]	19.4 a	20.4 a	10.0 c	14.5 b	24.0 a	18.3 a	3.3 b	4.6 b	***	2 <sup>1</sup>	***	***
VS free	[µg/L]	28.1 ab	29.6 b	29.9 b	39.9 a	49.1 a	44.3 b	18.3 c	24 bc	***	101 <sup>1</sup>	***	***
β-Dama	[µg/L]	1.5 b	1.9 ab	1.5 b	2.2 a	2.6 bc	1.7 c	3.6 ab	4.1 a	***	0.05 <sup>2</sup>	***	***
VinG	[µg/L]	32.4 d	37.4 c	60.6 b	85.3 a	19.7 c	16.0 c	85.2 b	138.2 a	***	40 <sup>2</sup>	***	***
LinOH	[µg/L]	23.2 d	36.8 c	129.1 b	193.1 a	23.9 d	64.9 c	178.4 b	312.1 a	***	25 <sup>2</sup>	***	***
2-PhEtOH	[mg/L]	40.4 a	38.8 a	25.7 b	24.6 b	14.0 a	10.2 b	6.3 d	7.4 c	***	14 <sup>2</sup>	***	***
3-MeBuOH	[mg/L]	118.9 a	123.7 a	82.0 b	80.2 b	208.2 a	191 ab	127.1 b	185.9 ab	***	30 <sup>2</sup>	***	*
HexOH	[mg/L]	2.4 ab	2.6 a	2.3 b	2.3 b	1.9 c	2.1 c	3.3 b	6.4 a	***	8 <sup>2</sup>	***	***
EtAc	[mg/L]	35.7 b	31.7 b	44.7 a	49.2 a	87.8 a	88.0 a	60.6 ab	72.3 b	***	12 <sup>2</sup>	ns	***
EtBu	[µg/L]	166.8	161.5	193.8	205.6	291.0 b	321.2 ab	341.8 a	304.8 ab	*	20 <sup>2</sup>	***	ns
EtHex	[mg/L]	0.7 b	0.7 c	1.2 a	1.2 a	1.6 ab	1.8 a	1.7 ab	1.5 b	***	0.014 <sup>2</sup>	***	***
EtOct	[mg/L]	1.0 b	1.0 b	1.8 a	1.9 a	1.2 b	1.4 b	2.2 a	1.9 a	***	0.005 <sup>2</sup>	***	ns
HexAc	[µg/L]	45.5 c	66.4 c	349.3 b	606.7 a	67.9 c	136.8 c	354.1 b	673.9 a	***	1800 <sup>2</sup>	***	ns
3-MeBuAc	[mg/L]	0.9 c	1.1 c	3.0 b	4.2 a	1.6 d	2.6 c	3.2 b	5.7 a	***	0.16 <sup>2</sup>	***	***
2-MeBuAc	[µg/L]	86.8 c	96.9 c	160.2 b	207.7 a	81.0 c	123.8 b	162 b	288 a	***	1600 <sup>2</sup>	***	***
2-PhEtAc	[mg/L]	5.6 d	13.5 c	39.5 b	65.7 a	4.8 d	15.4 c	30.3 b	40.3 a	***	2400 <sup>2</sup>	***	***

<sup>1</sup> Ziegler et al. (2019) <sup>2</sup> Waterhouse et al. (2016)



Table S2: Free volatiles of Wines Bottle Aged for 9 Months, with or without Filtration prior to Bottling. Letters Indicate Significant Differences among the Experiments within the Individual Vintage. Data Represent Mean Values with n = 2. Significance is Indicated with ns (not significant), \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) and \*\*\* (p<0.001).

		2017				Odor threshold	Significance	
		pH 2.8	pH 3.0	pH 3.2	pH 3.4		pH	Filtration
TDN free	[µg/L]	F	10.7 a	9.3 b	4.9 c	2.4 d	2 <sup>1</sup>	***
		NF	14.5	12.3	7.4	2.7		
VS free	[µg/L]	F	18.5 a	18.0 a	12.3 b	7.9 c	101 <sup>1</sup>	ns
		NF	24.7	18.7	15.1	8.6		
β-Dama	[µg/L]	F	0.7 c	1.4 b	2.7 a	2.9 a	0.05 <sup>2</sup>	***
		NF	0.9	1.6	3.1	3.3		
VinG	[µg/L]	F	25.4 a	19.0 b	18.9 b	19.3 b	40 <sup>2</sup>	***
		NF	31	31	40	50		
LinOH	[µg/L]	F	23.6 d	42.6 c	61.4 b	82.5 a	25 <sup>2</sup>	***
		NF	25.9	47.2	69.4	88.5		
2-PhEtOH	[mg/L]	F	7.9 c	10.4 b	13.2 a	12.7 a	14 <sup>2</sup>	***
		NF	8.5	10.3	11.3	12.0		
3-MeBuOH	[mg/L]	F	27.6 c	36.1 b	39.8 ab	42.0 a	30 <sup>2</sup>	***
		NF	31.2	31.4	39.8	41.6		
HexOH	[mg/L]	F	1.1 a	1.1 a	1.1 a	0.9 b	8 <sup>2</sup>	**
		NF	1.2	1.2	1.1	0.9		
EtAc	[mg/L]	F	60.8 a	52.6 b	37.0 c	33.5 c	12 <sup>2</sup>	***
		NF	76.0	56.0	36.4	31.2		
EtBu	[µg/L]	F	102.6 c	126.1 b	130.5 ab	149.3 a	20 <sup>2</sup>	***
		NF	127.6	134.6	143.8	161.9		
EtHex	[µg/L]	F	372.3 d	477.4 c	501.6 b	549.5 a	14 <sup>2</sup>	**
		NF	561.9	598.8	601.9	617.0		
EtOct	[mg/L]	F	0.9	1.3	1.5	1.6	0.005 <sup>2</sup>	ns
		NF	1.5	1.6	1.7	1.5		
HexAc	[µg/L]	F	32.6 d	55.1 c	86.9 b	114.9 a	1800 <sup>2</sup>	***
		NF	56.6	88.3	119.6	164.0		
3-MeBuAc	[µg/L]	F	519.8 d	889.9 c	1418.2 b	1991.8 a	160 <sup>2</sup>	***
		NF	615.3	1048.3	1544.1	2425.3		
2-MeBuAc	[µg/L]	F	28.0 d	42.8 c	69.3 b	98.1 a	1600 <sup>2</sup>	***
		NF	33.6	55.0	80.6	108.6		

<sup>1</sup> Ziegler et al. (2019) <sup>2</sup> Waterhouse, Sacks & Jefferey (2016)

## 12.7 Ergänzende Daten zu: TDN-Entfernung

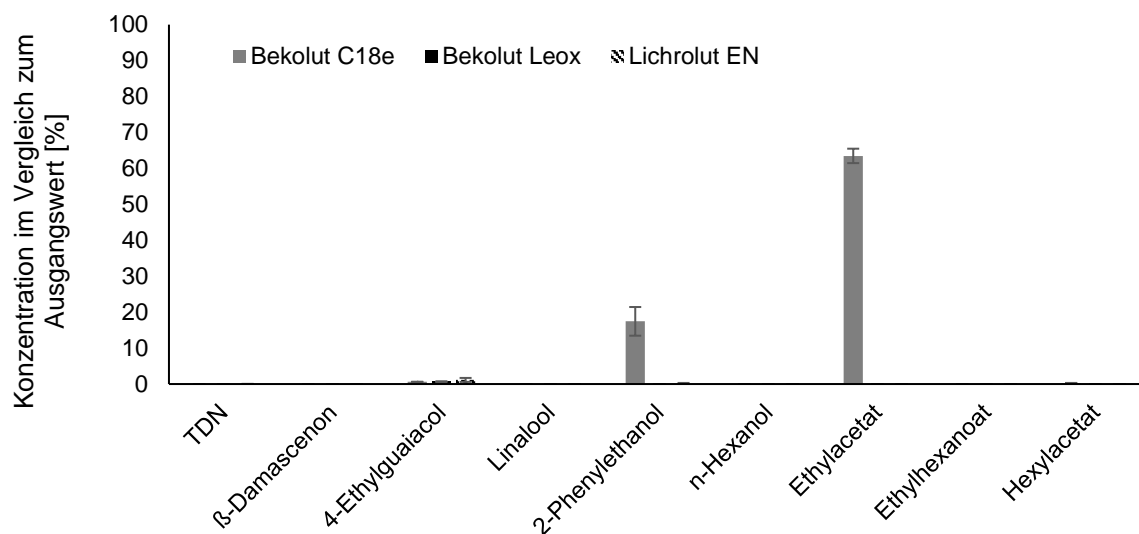


Abbildung 32: In Modellwein verbliebene Aromastoffe nach Behandlung mit SPE-Kartuschen, n = 2.

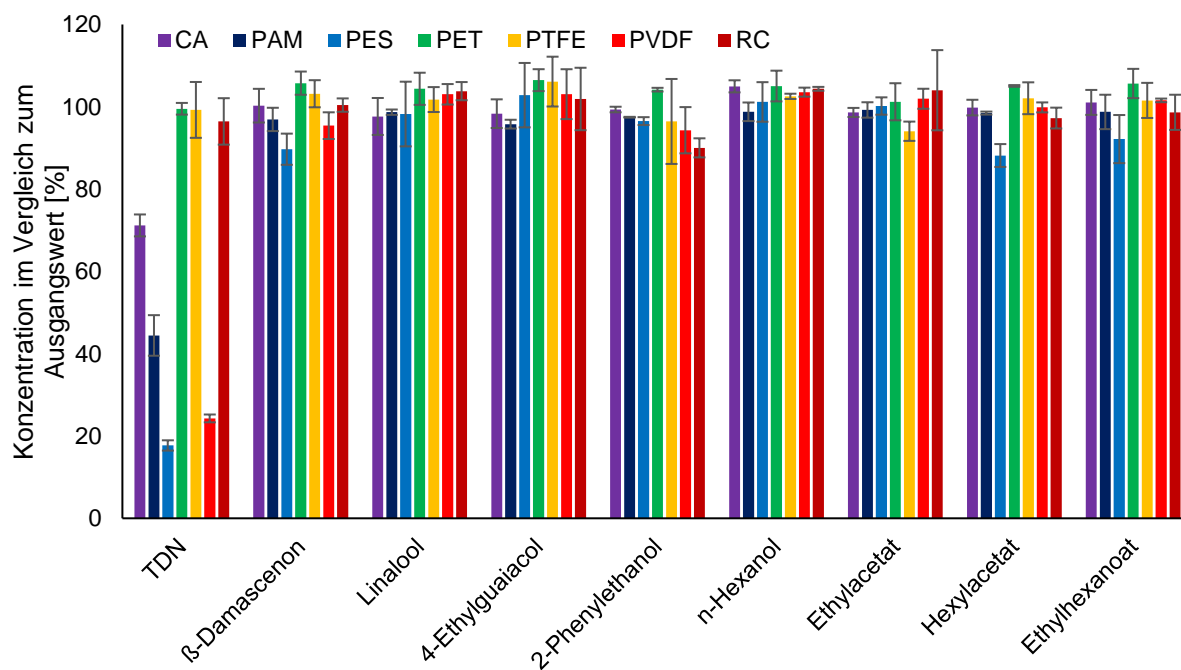


Abbildung 33: In Modellwein enthaltene Aromastoffe nach Behandlung mit Spritzenvorsatzfiltern, n = 2.

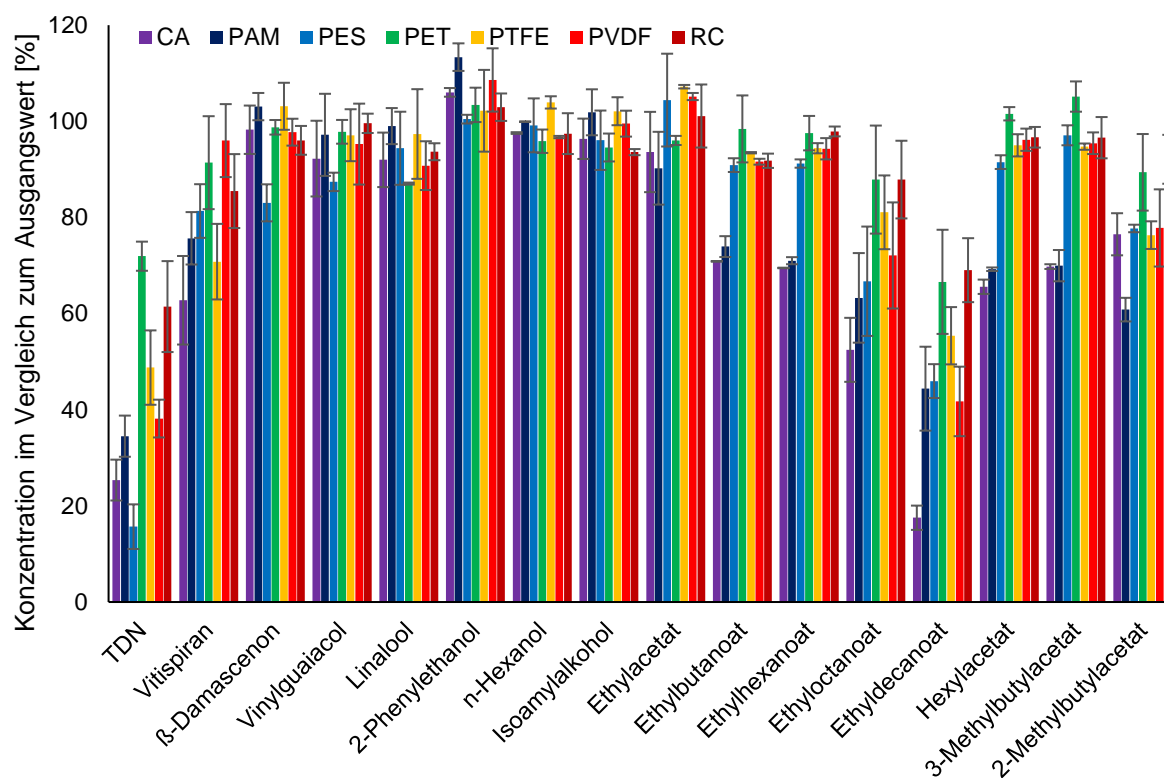


Abbildung 34: Aromastoffe in Rieslingwein nach Behandlung mit Spritzenvorsatzfiltern, n = 2.



## Lebenslauf

Name	Michael Ziegler
Nationalität	Deutsch
Geburtsort	Augsburg

## Berufliche Laufbahn

03/2020 – heute	Chemiker, US Army, Landstuhl
09/2015 – 03/2019	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, DLR Rheinpfalz, Neustadt a.d. Weinstraße
06/2011 – 08/2015	Qualitäts- und Gefahrstoffmanager, HSE24, Ismaning

## Ausbildung

Seit 09/2015	Promotion „1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin (TDN) in Riesling – Sensorische Relevanz und Minimierungsstrategie“, Technische Universität Kaiserslautern/Institut für Weinbau und Oenologie, DLR Rheinpfalz, Neustadt a.d. Weinstraße
10/2010 – 05/2011	Berufspraktische Ausbildung für Lebensmittelchemiker, LGL Bayern, Erlangen Abschluss: 2. Staatsexamen
11/2009 – 09/2010	Studiengang Diplom-Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin Thema der Diplomarbeit: Einfluss von Trocknungsverfahren auf wertgebende Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse Abschluss: Diplom
03/2008 – 10/2009:	Berufspraktikum und Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft, Fraunhofer IVV, Freising
10/2001 – 10/2007	Studiengang Lebensmittelchemie, Technische Universität München Abschluss: 1. Staatsexamen

## Schule

09/1991 – 06/2000	Gymnasium bei St. Stephan (Augsburg)
-------------------	--------------------------------------