

**Das Vorkommen der die Alterung auslösenden Precursoren
und der Einfluss von Mikroorganismen
auf die TDN-Bildung in Wein**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
Nurmiati Periadnadi
aus Padang, Indonesien

Frankfurt 2003

(D F 1)

vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe - Universität als
Dissertation angenommen.

Dekan : Prof. Dr. B. Streit

Gutachter : Prof. Dr. M. Brendel
Prof. Dr. W.-R. Sponholz

Datum der Disputation : 28.11.2003

Meiner Mutter und meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Anhangsverzeichnis	X
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Weinalterung und TDN in Wein	6
2.1. Weinalterung	6
2.2 TDN in Wein	8
III. Das Vorkommen	11
3.1 Das Vorkommen von TDN	11
3.2 Carotinoide als Precursor von TDN und Naphthalin	14
IV. TDN Bildung	21
4.1 TDN Bildung bei Wein, Pflanzenprodukten und die Einflussfaktoren	21
4.2 TDN-Bildung im Modellversuch	23
V. Carotinoide	29
5.1 Carotinoide und Carotinoidbegriffe	29
5.1.1 Die allgemeine Rolle von Carotinoiden	31
5.1.2 Carotinoide als Vitamin-A Precursor	32
5.1.3 Die Funktion bei den Pflanzen	34
5.1.4 Physiologie der Carotinoide bei Früchten	35
5.2 Struktur und Eigenschaften von Carotinoiden	36
5.2.1 Struktur	36
5.2.2 Eigenschaften	38
5.3 Die wichtigste Carotinoide	40
5.3.1 Carotine	40
5.3.2 Lutein	42
5.3.3 Zeaxanthin.	43
5.3.4 Apocarotinal	43
VI. Biosynthese von Carotinoiden	45
VII. Carotinoidabbau als Aromaprecursor	49
7.1 β -Carotin	50
7.2 Zeaxanthin	51
7.3 Lutein	51
7.4 Violaxanthin	53
7.5 Lycopin und andere Carotinoide	54
VIII. Einfluss von Mikroorganismen auf die Aromabildung des Weines	56
8.1 Aroma und Enzyme	56
8.2 β -Glucosidase	57
8.3 Glycoside und Glycosidase	59

8.4 Weintrauben β -Glucosidase	62
IX. Untersuchungsmethoden zum Nachweis des Aromastoffes TDN in Wein und in weinähnlichen Medien	64
9.1 Extraktion	65
9.1.1 Direkt Solvent Extraktion	65
9.1.2 Flüssig-flüssig Extraktion	65
9.2 Grundlage der Chromatographie	68
9.2.1 Gaschromatographische Bedingungen	68
9.2.2 Das Massenspektrometer	69
9.3 Auswertung und gaschromatographischen Analyse	70
9.3.1 Quantitative Bestimmung mittels internem Standard	70
9.3.2 Die Identifizierung und Quantifizierung von TDN	70
9.3.3 Bestimmung des potenziellen TDN	71
9.3.4 Bestimmung des Potenziellen TDN-d4	73
X. Untersuchungsmethoden zur Bestimmung von Carotinoiden in Trauben, Most, Wein und weinähnlichen Medien	74
10.1 Nachweis der Carotinoide	74
10.1.1 Bedingungen für die Probenaufbereitung	75
10.1.1.1 Extraktion	75
10.1.1.2 Saponifikation	77
10.1.2 Grundlage der HPLC	78
10.1.2.1 HPLC	78
10.1.2.2 HPLC-Trennungsverfahren	82
10.1.2.3 Entwicklung der Methode	83
10.1.3 Bestimmung von Carotinoiden	84
10.1.3.1 Bei den Traubenbeeren	85
10.1.3.2 Bei Mosten und Weinen	86
10.1.4 HPLC Bedingungen	87
10.1.4.1 HPLC Methode nach Danehower und Kelley (1990)	88
10.1.4.2 HPLC Methode nach Juhler und Cox (1990)	88
10.1.4.3 Eigenentwickelte HPLC Methode	89
10.1.4.4 HPLC Methode nach Gayle et al. (1986)	89
10.1.5 Auswertung der HPLC Analysen	90
10.1.5.1 Die quantitative Bestimmung mittels internem Standard	90
10.1.5.2 Identifizierung und Quantifizierung von Carotinoiden	90
10.2 Materialien, Chemikalien und Referenzsubstanzen	91
XI. Untersuchungsmethoden zum Nachweis der β -D-Glucosidaseaktivität	93
11.1 Grundlage der β -D-Glucosidaseaktivität	93
11.2 Probevorbereitung zum Nachweis der β -Glucosidaseaktivität	95
11.2.1 Material	95
11.2.1.1 Hefen	95
11.2.1.2 Gärung	95
11.2.2 Methoden	95
11.2.2.1 Bestimmung der β -Glucosidaseaktivität	95
11.2.2.2 Lebendzellzahlbestimmung.	96

11.2.2.3	Messung des Gärverlaufs	96
11.2.2.4	Farbstoffabbau	97
XII.	Alterung auslösende Precursoren (Carotinoide) und TDN	98
12.1	Carotinoide	98
12.1.1	Die Wirkung von Extraktion und Saponifikation auf die Carotinoidverteilung	99
12.1.1.1	Bei den Traubenbeeren	101
12.1.1.2	Bei den Mosten und Weinen	104
12.1.2	HPLC Trennung	105
12.1.2.1	HPLC-Trennung von Lutein und Zeaxanthin	105
12.1.2.2	Reinsubstanzen und Farbstoffe in Traubenbeeren	108
12.1.2.3	Traubenbeeren	110
12.1.2.4	Moste und Weine	111
12.1.3	Verhältnis zwischen β -Carotin und Lutein	122
12.2	TDN und potenzielles TDN	124
12.2.1	TDN	124
12.2.1.1	TDN-Gehalte bei verschiedene Klone der Sorte „Weißer Riesling“ und bei anderen weißen Sorten	124
12.2.1.2	TDN-Gehalt in Weinen verschiedener Jahrgänge	125
12.2.1.3	TDN-Gehalte in Weinen die mit verschiedenen Hefen vergoren wurden	126
12.2.1.4	TDN-Gehalte bei Modellversuchen	127
12.2.2	Potenzielles TDN	128
12.2.2.1	Wein-Modellversuch	128
12.2.2.2	Beerenextrakt –Modellversuch	129
12.2.2.3	Modellversuche mit Reinsubstanzen	130
12.2.2.4	Lagerungs-Modellversuch	132
12.2.2.5	D ₂ O und H ₂ O-Modellversuch	134
12.3	Glucosidaseaktivität	135
12.3.1	Gärintensität und gebundene β -Glucosidaseaktivität	136
12.3.2	Gärintensität und gebundene β -Glucosidaseaktivität verschiedener Hefestämme	137
12.3.3	Gebundene β -Glucosidaseaktivität und Populationen	138
12.4	Die Farbstoffveränderungen und die Glucosidaseaktivität	142
12.4.1	Moste	142
12.4.2	Medien mit Beerenextrakt	146
12.5	Die Farbstoffveränderungen und die TDN-Bildung	148
12.5.1	Nach der Gärung	148
12.5.1.1	Carotinoid-Abbau	151
12.5.1.2	TDN Entwicklung	153
12.5.2	Lagerungsversuch bei 30°C	155
12.5.2.1	Beerenextrakt	155
12.5.2.2	Reinsubstanzen	157
12.6	Carotinoide, TDN und weitere Einflussfaktoren	158
12.6.1	Lutein und die Bildung von TDN	158
12.6.1.1	Lutein im Most und Wein	158
12.6.1.2	TDN-Gehalt und Lutein im Most	160

12.6.1.3 TDN-Gehalt und Lutein im Jungwein	161
12.6.1.4 TDN und Lutein in Weinen verschiedener Jahrgänge	163
12.6.2 Der Einfluss von Luteinestern	164
12.6.3 Der Einfluss der Gesamtsäure und des pH-Wertes	165
12.6.3.1 Most und Jahrgangswein	165
12.6.3.2 Most und Jungwein	166
12.6.3.3 Beerenextrakt-Medium	166
12.6.4 Der Einfluss von Hefen	167
12.6.4.1 Lutein und TDN-Gehalt	167
12.6.4.2 Glucosidaseaktivität	169
Zusammenfassung	171
Summary	173
Literaturverzeichnis	175
Anhang	183

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: 1,1,6-Trimethyl-1,2-Dihydronaphthalin (TDN)	2
Abb. 2: Einflussfaktoren auf das Alterungsverhalten von Wein (Sponholz et al. 1997)	6
Abb. 3: TDN und die möglichen TDN-Precursoren	12
Abb. 4: Zwischenverbindungen des Carotinoidabbaus	13
Abb. 5: Die mögliche Spaltung von β -Carotin zu Sekundärenprodukten	17
Abb. 6: Glycoside von C ₁₃ -Norisoprenoid Strukturen als Precursor von TDN: 2,6,10,10-1-oxaspiro(4.5)-dec-6-ene-2,8-diol (1) und 3,4 dihydroxy-7,8-dihydro- β -Ionon (2)	17
Abb. 7: Die Struktur von 3-Hydroxy-1,1,6-Trimethyl-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin als natürlicher TDN-Precursor purpuroter Passionsfrüchte	19
Abb. 8: Vorgeschlagener Bildungsweg für die TDN (3) und Vitispiran (7) Bildung in Rieslingwein und die potenzielle Rolle des hypotetischen-Triols (1) als Zwischenprodukt bei der Vitispiran- und TDN-Entstehung (Waldmann und Winterhalter 1992)	20
Abb. 9: Die schematischen Reaktionsprozesse von β -Iononepoxid zu 1,2-Dihydro-1,1,6-Trimethylnaphthalin	24
Abb. 10: Die Bildung von Ionen durch thermalen β -Carotinabbau	24
Abb. 11: Mechanismus der thermalen Ionen-Bildung aus β -Carotin durch eine Reihenfolge von sigmatropischen Wasserstoffänderungen	25
Abb. 12: Strukturen von Ionen (I) und Dehydroionen (II) nach Liebich et al. (1970)	26
Abb. 13: Teil eines GC-SIM/MS Profils mit TDN (m/z = 157) und TDN-d ₄ (m/z = 161) Peaks.	26
Abb. 14: MS-Spektrum von TDN-d ₄	27
Abb. 15: Zerfallsvorschlag für das MS-Spektrum in Abb. 13	27
Abb. 16: Vorgeschlagener kinetischer Mechanismus für die TDN-Bildung aus den zwei möglichen Precursoren	28
Abb. 17: Die Strukturen von Carotinoiden	30
Abb. 18: Grundstrukturen einiger wichtiger Carotinoide der Früchte	33
Abb. 19: Spaltung von β -Carotin zu 2 Molekülen Vitamin-A.	34
Abb. 20: Die Strukturen von Carotinen	41
Abb. 21: Die Struktur von Lutein	42
Abb. 22: Die Struktur von Zeaxanthin	43
Abb. 23: Die Struktur von β - Apo-8'-Carotinal	44
Abb. 24: Synthese und Bauprinzipien für die verschiedenen Untergruppen der Isoprenoide K-S: Kopf-Schwanz, S-S: Schwanz-Schwanz	45
Abb. 25: Carotinoidbildung in der Biogenese der Isoprenoide	46
Abb. 26: Die postulierte Biosynthese der Pflanzenpigmente	47
Abb. 27: Der möglichen Reaktionsmechanismen beim Luteinabbau (Williams et al. 1992).	52
Abb. 28: Der mögliche Reaktionsmechanismus des Violaxanthinabbaus (Williams et al. 1992).	54
Abb. 29: Die Strukturen von Weintrauben Monoterpenyl β -D-Glucopyranosiden	58
Abb. 30: Schematische Darstellung des Nachweises von TDN	65

Abb. 31: Extraktionsapparatur zur Anreicherung der Aromastoffe (ohne Kühleraufsatz)	67
Abb. 32: Schematische Darstellung eines Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Systems	70
Abb. 33: TDN (1,1,6-Trimethyl-1,2-Dihydronaphthalin) Peak und Massenspektrum Reinsubstanz	71
Abb. 34: Schematische Darstellung eines HPLC-Systems (Unger, 1989)	79
Abb. 35: Schematische Darstellung der Traubenbeeren-Extraktion.	85
Abb. 36: Glycosidspaltung durch Glucosidase	94
Abb. 37: Relative Absorption pflanzlicher Farbstoffe in verschiedenen organischen Lösemitteln und deren gewählte Wellenlänge	100
Abb. 38: Gemessene Farbstoffgehalte von Riesling-Traubenbeeren bei verschiedenen Analysenvorbereitungen ($\mu\text{g/g}$ Beeren)	101
Abb. 39: Farbstoffgehalte von roten Traubenbeeren bei verschiedenen Analysenvorbereitungen ($\mu\text{g/g}$ Beeren)	102
Abb. 40: Farbstoffzusammensetzung von Riesling-Traubenbeeren Kl. 64-177 Gm (Jahrgang 1998)	103
Abb. 41: Die Trennung der Reinsubstanzen Zeaxanthin (2mg/l) und Lutein (10 mg/l) auf einer C18 Säule (250 mm x 4 mm ID) (links) und einer RP-18 Säule (120 mm x 4 mm ID) (rechts)	107
Abb. 42: HPLC-Chromatogramm (oben, links) und 3D-HPLC Chromatogramm (oben, rechts) von Standard-Mischungen der Farbstoffe und HPLC-Chromatogramm (unten, links) und 3D-HPLC Chromatogramm (unten, rechts) von Traubenbeeren der Sorte Riesling Kl. 198-16 Gm. Jahrgang 1997	109
Abb. 43: Farbstoffgehalte in Most nach verschiedenen Behandlungen ($\mu\text{g/l}$)	112
Abb. 44: Chromatogramme der Riesling Sorte Kl. 24-196 Gm. (Jahrgang 1998)	114
Abb. 45: Chromatogramme der Sorte Riesling Klon 110-18 Gm. Jahrgang 1998 (A1. Most, B1. Wein) und der Sorte Silvaner Jahrgang 1998 (A2. Most, B2. Wein)	117
Abb. 46: Farbstoff-Zustand von Versuchsjungweinen ($\mu\text{g/l}$)	119
Abb. 47: Carotinoidgehalte ($\mu\text{g/l}$) von klaren Jungweinen (Riesling Klon Ø 239 Gm., Jahrgang 1998) nach der Gärung mit verschiedenen Hefestämmen	120
Abb. 48: Carotinoidgehalte ($\mu\text{g/l}$) von trüben Jungweinen (Riesling Klonengemisch, Jahrgang 1998) nach der Gärung mit verschiedenen Hefestämmen	121
Abb. 49: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein von Beeren (A) und Mosten (B) des Jahrganges 1997	122
Abb. 50: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein von Beeren (A) und Mosten (B) des Jahrganges 1998	123
Abb. 51: TDN-Gehalte von Rieslingweinen (Kl. Ø 110 Gm.) verschiedener Jahrgänge	125
Abb. 52: Potenzieller TDN-Gehalt eines Rieslingweines (Jahrgang 1997) durch Erwärmung bei 50°C mit drei verschiedenen Säuren (A) und verschiedenen Hydrolysezeiten bei pH 1,0 mit H_2SO_4 (B)	128
Abb. 53: Potenzieller TDN-Gehalt vom saponifizierten Beerenextrakt im synthetischen Medium durch Erwärmung auf 50°C bei pH 1,0	130
Abb. 54: Potenzieller TDN-Gehalt der Reinsubstanzen Lutein (1mg) und β -Carotin (5mg) im Blankwein-Medium durch Erwärmung auf 50°C bei pH 1,0	131

Abb. 55: Potenzieller TDN-Gehalt von Weißwein (Riesling Eltville, 1998) nach Lagerung bei 30°C	132
Abb. 56: Potenzieller TDN-Gehalt verschiedener Weißweine des Jahrgangs 1996 (Rebenzüchtung, Geisenheim), Lagerung bei 30°C	133
Abb. 57: Potenzieller TDN-Gehalt verschiedener Weißweine des Jahrgangs 1997 (Rebenzüchtung, Geisenheim), Lagerung bei 30°C	133
Abb. 58: Gärintensität in Rieslingmosten während der Gärung bei 20°C und bei Kellertemperatur	136
Abb. 59: Gebundene β -Glucosidaseaktivitäten von verschiedenen Hefedosierungen während der Gärung bei 20°C und Kellertemperatur	137
Abb. 60: β -Glucosidaseaktivität und Gärintensität von Lalvin EC 1118 und CEG bei 20°C	138
Abb. 61: Gebundene β -Glucosidaseaktivitäten und Populationsentwicklungen von Siha Aktiv-7 und einer Spontangärung in Rieslingmost des Jahrgangs 1997 (Kellertemperatur)	139
Abb. 62: Gebundene β -Glucosidaseaktivitäten und Populationsentwicklungen von Siha Aktiv-7 und einer Spontangärung in Rieslingmost des Jahrgangs 1997 (Gärtemperatur, 20°C)	140
Abb. 63: Gärintensität in verschiedenen Rieslingklonen-Mosten 1998 bei 20°C	141
Abb. 64: Gärintensität in Mosten weißer Sorten 1998 bei 20°C	141
Abb. 65: Farbstoffzustand und β -Glucosidaseaktivität der Rieslingmoste während der Gärung bei 20°C	143
Abb. 66: Farbstoffveränderungen und β -Glucosidaseaktivität während der Gärung bei 20°C	144
Abb. 67: Farbstoffveränderungen und β -Glucosidaseaktivität bei der Vergärung bei Kellertemperatur	144
Abb. 68: Carotinoidveränderungen von saponifiziertem Beerenextrakt-Medium während der Gärung bei 20°C mit Siha Aktiv-7 (<i>S. cerevisiae</i>)	147
Abb. 69: Carotinoidveränderungen von saponifiziertem Beerenextrakt-Medium während der Gärung bei 20°C mit Lalvin EC 1118 (<i>S. bayanus</i>)	147
Abb. 70: Farbstoffveränderungen und TDN-Bildung in klarem Beerenextrakt-Jungwein 40–100 Tage nach der Gärungsende bei 20°C	148
Abb. 71: Der Einfluss der Hefedosierungen auf die Farbstoffveränderungen in saponifizierten Beerenextrakt-Jungweinen und den TDN-Gehalt nach der Gärung 20°C bis zu 100 Tagen	150
Abb. 72: Zeaxanthingehalte von Jungweinen bei drei verschiedenen Hefedosierungen während und nach der Gärung bei 20°C	151
Abb. 73: Luteingehalte von Jungweinen bei drei verschiedenen Hefedosierungen während und nach der Gärung bei 20°C	152
Abb. 74: β -Carotiningehalte von Jungweinen bei drei verschiedenen Hefedosierungen während und nach der Gärung bei 20°C	152
Abb. 75: TDN-Gehalte in Weinen bei drei verschiedenen Hefedosierungen nach der Gärung bei 20°C	154
Abb. 76: TDN-Gehalte in Weinen bei zwei unterschiedlichen Hefen nach der Gärung 20°C	155
Abb. 77: TDN-Bildung und Carotinoidabnahme während einer 60tägigen Lagerung (30°C) in einem aus Carotinoid freiem Moste gewonnenen Wein, dem nach der Gärung ein aus Trauben gewonnenen Carotinoidextrakt zugegeben wurde (Siha Aktiv-7; 8g/hl)	156

Abb. 78: TDN-Bildung und Carotinoidabnahme während einer 60tägigen Lagerung (30°C) in einem aus Carotinoid freiem Moste gewonnenen Wein, dem nach der Gärung ein aus Trauben gewonnenen Carotinoidextrakt zugegeben wurde (Lalv. EC 1118; 8g/hl)	156
Abb. 79: Abbau von β -Carotin (oben), Lutein (unten) und TDN-Entwicklung bei Lagerung bei 30°C	157
Abb. 80: Zusammenhang zwischen den Luteingehalten in Mosten und in den daraus gewonnenen Rieslingweinen des Jahrganges 1997 (Rz. Geisenheim)	159
Abb. 81: Die Abhängigkeit des Luteingehaltes in den klaren Jungweinen, die bei 20°C sowie bei Kellertemperatur vergoren wurden vom Luteingehalt in den trüben Ausgangmosten (Rz.1998)	159
Abb. 82: Zusammenhang zwischen dem Luteingehalt in den Mosten und den TDN-Gehalten in den daraus gewonnenen Jungweinen des Jahrganges 1998. Vergoren bei 20°C	160
Abb. 83: Abhängigkeit des TDN-Gehalts in den Jungweinen, vergoren mit Siha Aktiv 7 (10g/hl) und mit Spontangärung, vom Luteingehalt der Rieslingmoste des Jahrgangs 1997. Vergoren bei Kellertemperatur	161
Abb. 84: TDN-Gehalte von Jungweinen vergoren durch verschiedene Hefesorten bei Kellertemperatur und bei 20°C (Most: 1998er Riesling Klonengemisch 239 Gm. von Rz)	162
Abb. 85: Das Verhältnis zwischen dem TDN- und dem Lutein-Gehalt der Jungweine (Most: 1998er Riesling Klonengemisch 239 Gm. von Rz), vergoren mit verschiedenen Hefestämmen bei 20°C	162
Abb. 86: Die Abhängigkeit der TDN-Konzentration von der Luteinmenge in den 1998er Jungweinen (Riesling und andere weißen Sorten) von der Vergärung bei Kellertemperatur und bei 20°C	163
Abb. 87: TDN- und Lutein-Gehalt im Wein an der Rebenzüchtung 1997	164
Abb. 88: Wein TDN-Gehalt, Most- und Wein von pH-Wert (oben) und Most- und Wein-Gesamtsäure (unten) Jahrgang 1997 (Rebenzüchtung, Geisenheim)	165
Abb. 89: Korrelation zwischen dem TDN-Gehalt der Jungweine und der Gesamtsäure (A) und dem pH-Wert (B) der Ausgangmoste	166
Abb. 90: Potenzieller TDN-Gehalt von Beerenextrakt-Medien nach Wärmebehandlung (50°C; 4 Std) bei verschiedenen pH-Werten	167
Abb. 91: TDN- und Lutein-Gehalt in den trüben Jungweinen vergoren mit verschiedenen Hefestämmen	168
Abb. 92: Das Verhältnis von TDN- und der Menge umgesetzten Luteins in den trüben Jungweinen, die mit verschiedenen Hefestämmen hergestellt wurden	169
Abb. 93: Glucosidaseaktivität und Zellzahl an verschiedenen Hefestämmen in trüben Jungweinen (Kl. Ø 239 Rz. 1998)	170
Abb. 94: Glucosidaseaktivität verschiedener Hefeklonen, Lutein- und TDN-Gehalt von Trübjungwein (Kl. Ø 239 Rz. 1998)	170

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hauptabbauprodukte von Lutein und β -Carotin bei thermischem Abbau	23
Tabelle 2: Relative Löslichkeit und Absorption von Lutein und β -Carotin in organischen Lösungsmitteln (Craft und Soares 1992)	39
Tabelle 3: Thermale Abbauprodukte von β -Carotin	51
Tabelle 4: Massenspektren von TDN	71
Tabelle 5: Das Gradientensystem zur Trennung pflanzlicher Farbstoffe	88
Tabelle 6: Das Gradientensystem zur Trennung von Carotinoiden nach Juhler und Cox (1990)	88
Tabelle 7: Das Gradientensystem zur Trennung der Carotinoiden und Chlorophyllen in Traubenbeeren, Mosten, Weinen sowie syntethischen Medien	89
Tabelle 8: Das Gradientensystem zur Trennung der Lutein und Luteinester	90
Tabelle 9: Farbstoffgehalte von Riesling-Traubenbeeren und anderen weißen Traubenbeeren des Jahrgangs 1997 ($\mu\text{g/g}$ Beeren)	110
Tabelle 10: Farbstoffgehalte von Riesling-Traubenbeeren und anderen weißen Traubenbeeren des Jahrgangs 1998 ($\mu\text{g/g}$ Beeren)	111
Tabelle 11: Farbstoffgehalte von Mosten verschiedener Rieslingklonen und anderer „Weißer Sorten“ Jahrgang 1997 ($\mu\text{g/l}$)	115
Tabelle 12: Farbstoffgehalte von Mosten verschiedener Rieslingklonen und anderer „Weißer Sorten“ Jahrgang 1998 ($\mu\text{g/l}$)	115
Tabelle 13: Farbstoffgehalte der Jungweine (Jahrgang 1998 Rz. Geisenheim) nach Vergärung bei zwei verschiedenen Temperaturen ($\mu\text{g/l}$)	118
Tabelle 14: Carotinoidgehalte ($\mu\text{g/l}$) in Weinen des Jahrgangs 1997 des Fachgebietes Rebenzüchtung Geisenheim	122
Tabelle 15: TDN-Gehalte ($\mu\text{g/l}$) in Weinen aus verschiedenen Rieslingklonen und anderer weißer Sorten der Jahrgänge 1996 und 1997	124
Tabelle 16: TDN-Gehalte verschiedener Rieslingweine (Kl. Ø 110 Gm.) nach der Vergärung mit verschiedenen Hefen ($\mu\text{g/l}$)	126
Tabelle 17: TDN-Gehalte verschiedener Riesling-Jungweine (Kl. Ø 239 Gm. Jahrgang 1998) bei Vergärung mit verschiedenen Hefen und Temperaturen ($\mu\text{g/l}$)	126
Tabelle 18: TDN-Gehalt von Jungweinen bei zwei Teilen von klaren Jungweinen	127
Tabelle 19: Potenzieller TDN-Gehalt ($\mu\text{g/l}$) von saponifiziertem Beerenextrakt* bei Erwärmung auf 50°C bei unterschiedlichen pH-Werten und unterschiedlichen Medien	129
Tabelle 20: Potenzielles TDN aus Carotinoiden in D_2O bei zwei verschiedenen pH-Werten nach 5 stündiger Erwärmung auf 50°C ($\mu\text{g/l}$)	134
Tabelle 21: Potenzielles TDN von Carotinoiden in H_2O bei zwei verschiedenen pH-Werten nach 10 stündiger Erwärmung auf 50°C ($\mu\text{g/l}$)	135
Tabelle 22: Prozentualer- bzw. Gesamtverlust der Carotinoide nach der Gärung bei drei unterschiedlichen Hefedosierungen während der 60 tägigen Lagerung	153

Anhangsverzeichnis

Tabelle 1: Farbstoffgehalte von Mosten nach verschiedenen Behandlungen ($\mu\text{g/l}$)	183
Tabelle 2: Prozentualer Farbstoffverlust von Mosten nach verschiedenen Behandlungen	183
Tabelle 3: Farbstoffgehalte von klarem Rieslingmost (Klonengemisch 239 Gm., Jahrgang 1998) ($\mu\text{g/l}$)	183
Tabelle 4: Prozentuale Farbstoffveränderungen von klarem Rieslingmost (Klonengemisch 239 Gm., Jahrgang 1998) während der Gärung	183
Tabelle 5: Farbstoffgehalte von trüben Rieslingmost ($\mu\text{g/l}$)	183
Tabelle 6: Prozentualer Farbstoffveränderung von trüben Rieslingmost während der Gärung.	184
Tabelle 7: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein in den Beeren des Jahrganges 1997	184
Tabelle 8: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein in den Mosten des Jahrganges 1997	185
Tabelle 9: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein in den Beeren des Jahrganges 1998	185
Tabelle 10: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein in den Mosten des Jahrganges 1998	186
Tabelle 11: TDN-Gehalt von verschiedenen Weinen aus einem Entblätterungsversuch	186
Tabelle 12: Gesamtsäure (g/l) und pH-Werte von Weißmosten Jahrgang 1997 (Rebenzüchtung, Geisenheim)	187
Tabelle 13: Gesamtsäure (g/l) und pH-Werte von Weißmosten Jahrgang 1996 (Rebenzüchtung, Geisenheim)	187

I. Einleitung und Problemstellung

Beim Genuss eines Lebensmittels ist immer zuerst den Eindruck dominierend, der den stärksten und längsten Eindruck verleiht. Besonders bei Genussmitteln sind es meist die Aromastoffe, die durch ihre Geruchs- und Geschmacksnote die organoleptische Wirkung prägen.

Genussmittel sind lebensmittelähnliche Stoffe, bei denen der Nährwert ohne Bedeutung ist und deren Zufuhr zum Körper, sofort oder nach einiger Zeit ein angenehmes Empfinden infolge einer Beeinflussung der Nerventätigkeit hervorrufen. Zu diesen Genussmitteln zählen z. B. Kaffee, Tee, Betel, Cola, Mate, Tabak und ebenfalls alkoholische Getränke (Täufel et al. 1993).

Obwohl die Menge der in einem Lebensmittel als flüchtige Verbindungen vorkommenden Aromastoffe sehr gering ist, bestehen sie im allgemeinen aus einer Vielzahl von Komponenten, die oft eine große sensorische Wirkungen haben.

Der Wein, der zu den alkoholischen Getränken zählt, wird durch die Alterung als letztem Reifungsprozess geprägt. Die Alterung (Flaschenlagerung) des Weines kann die chemische Zusammensetzung beeinflussen oder verändern, die mit dem organoleptischen Eindruck verbunden ist. Sie spielt eine entscheidende Rolle für den Charakter und die Qualität des Weines.

Die Aromaveränderungen eines Weines während der Lagerungszeit geht mit der Bildung neuer flüchtiger Verbindungen als Abbauprodukte von Kohlenhydraten und Carotinoiden einher. Viele Komponenten, die aus gealtertem Wein als aromatische Kohlenwasserstoffe, u.a. C₁₃-Komponenten identifiziert wurden, entstehen aus den vorhandenen Carotinoidsubstanzen der Weinbeeren. Bei gealterten Rieslingweinen sind viele flüchtige Aromakomponenten, unter ihnen 5 C₁₃-Komponenten identifiziert worden (Simpson und Miller 1983).

Zu den C₁₃-Komponenten gehören 1,1,6-Trimethyl-1,2-Dihydronaphthalin (TDN) oder 3,8,8-Trimethyl-7,8-Dihydronaphthalin oder 3,8,8-Trimethyl-Dihydronaphthalin oder Dehydroionen (Liebich et al. 1970, Stoltz et al. 1970) oder 3,4-Dehydroionen (LaRoe und Shipley 1970, Stoltz et al. 1970), das aus den sich in den Traubenbeeren befindenden Carotinoiden gebildet wurde.

Ohloff (1972) und Simpson und Miller (1983) behaupteten, dass Carotinoide die Vorstufen von Aromastoffen, wie C_{13} -Norisoprenoiden sind. Die meisten Vorstufen von Aromen sind schon in den Früchten identifiziert worden (Ho et al. 1990, Stahl-Biskup et al. 1993). Insbesondere in den Traubenbeeren waren es glycosidische Monoterpene oder C_{13} -Norisoprenoide (Williams et al. 1982a, Strauss et al. 1988, Winterhalter et al. 1990b, Tominaga et al. 1998).

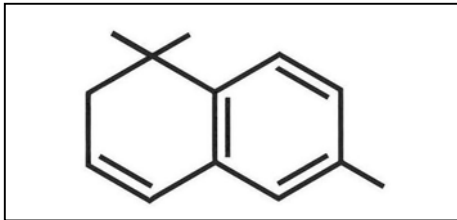


Abb. 1: 1,1,6-Trimethyl-1,2-Dihydronaphthalin (TDN)

C_{13} -Norisoprenoide zeigen interessante Geruchseigenschaften (Ohloff 1978a). Die glycosidische C_{13} -Norisoprenoide, die in den Traubenbeeren identifiziert wurden (Sefton et al. 1989, Baumes et al. 1994) sind wichtige Aromaquellen der Weine. Im allgemeinen betrachtet man die Carotinoide als Vorstufen von C_{13} -Norisoprenoiden (Isoe et al. 1972, Enzell 1985, Williams et al. 1992, Winterhalter 1993).

Die flüchtigen C_{13} -Norisoprenoide, zu denen TDN gehört, spielen eine wichtige Rolle in der Aromabildung während der Alterung von Rieslingweinen (Simpson et al. 1977, Simpson 1978, Simpson und Miller 1983, Rapp et al. 1985, Waldmann und Winterhalter 1992). TDN wird als wichtigste Komponente des Aromas reifer Riesling-Flaschenweine angesehen (Simpson 1979, Simpson und Miller 1983).

Wenn TDN in höheren Quantitäten vorkommt, hat es im allgemeinen eine negative Wirkung auf die Weinqualität (Marais 1992). Die Bildung dieser Verbindung führt zur Petrolnote oder zum Kerosinton (Rapp und Güntert 1986, Winterhalter 1991, Marais 1992, Sponholz et al. 1997). Im Weinaromarat der American Society of Enology and Viticulture wird der Petroleumton als Benzin oder Kerosin neben Diesel-, Plastik-, und einer Teernote beschrieben (Fischer 1998).

Der C_{13} -Kohlenwasserstoff TDN ist normalerweise in Beeren und Jungweinen nicht vorhanden. Er entwickelt sich während der Reifung und der Weinalterung. Hohe Konzentrationen von TDN wurde in Rieslingwein bis maximal 200 ppb analysiert (Simpson und Miller 1983, Strauss et al. 1987a, Winterhalter et al. 1990b). In solch hohen Konzentrationen, 5–10fach über der Geschmacksschwelle, die ungefähr 20 ppb in Wein ist,

produziert TDN einen Fehlton. Der Wein wird als Kerosin- oder dem Benzin ähnlich beschrieben (Simpson 1978).

Viele Faktoren können die Entwicklung des TDN während der Alterung beeinflussen. Eine von diesen ist die potenzielle TDN-Konzentration. Durch sie nimmt der TDN-Gehalt während der Reifung der weißer Rieslingweine zu (Strauss et al. 1987a). Nach Marais et al. (1992a) hängt diese Entwicklung in den Weinen von den Konzentrationen der Aromavorstufen in den Beeren bzw. in den Mosten ab. Für die Bildung von TDN in Rieslingwein wurde das Vorkommen mehrerer Precursoren offensichtlich. Einige TDN-Precursoren sind polare glycosidische Derivate sowie nicht glycosidische Verbindungen (Winterhalter et al. 1990b). Für Rieslingwein wird als Precursor von TDN, ein säurelabiles Glycoconjugat vermutet. Es wurde hauptsächlich im Most gefunden und es entwickelt sich zusammen mit der Zuckerakkumulation während der Reifung der Trauben (Strauss et al. 1987a). Auch wurde gefunden, dass die TDN-Precursor Konzentrationen bedeutend höher in dem vor der Sonne ungeschützten Trauben, als in beschatteten Rieslingtrauben waren (Marais et al. 1992a).

Pippen et al. (1969) wiesen darauf hin, dass manche aromatische Kohlenwasserstoffe wie Methylnaphthalin und Dimethylnaphthalin, die als „Naphthalin Aroma“ charakterisiert werden, aus Carotinoiden während des Kochens von Lebensmitteln produziert wurden. Stoltz et al. (1970) identifizierten neue Naphthalinderivate (TDN) in den flüchtigen Komponenten von Erdbeeren. TDN wurde auch in Pfirsichblättern und -früchten (Kemp et al. 1971), Passionsfrüchten (Murray et al. 1972) gefunden. Andere Studien zeigten das Vorkommen von TDN in Rum, Branntwein, Wein und im italienischen Rotweibukett (Liebich et al. 1970, Bertuccioli und Viani 1976, Schreier et al. 1976, Ohloff 1978b, Marais et al. 1992b).

Ohloff (1978a) schlug vor, dass TDN durch den Carotinoidabbau gebildet wird. Beim Abbau von Carotinoiden zu TDN sind einige Intermediate (Zwischenprodukte) von vielen Autoren vorgeschlagen worden (Steven et al. 1975, Davis et al. 1976, Enzell et al. 1977, Di Stefano, 1985, Strauss et al. 1986). In Tabak und anderen Pflanzen konnte TDN aus Carotinoiden über die entsprechenden Zwischenprodukten durch sequentielle Oxidation, Neuordnung, und Reduktion hergeleitet werden (Davis et al. 1976). Die mögliche Bildung dieser Verbindungen haben viele Autoren verfolgt. Edmunds und Johnstone (1965) und Schreier et al. (1979) identifizierten TDN, Ionen (1,1,6-Trimethyl-1,2,3,4-

Terahydronaphthalin Isomer), m-Xylen, Toluol als thermische Abbauprodukte von β -Carotin und entsprechenden Isoprenoiden. Weiterhin beschrieben Hohler et al. (1988), dass beim photothermischen Abbau von β -Carotin auch mehrere flüchtige Spaltprodukte gebildet wurden, u.a. C₁₃-Norisoprenoide, die wichtige C₁₃-Komponenten sind, wozu auch TDN gehört.

1970 identifizierten Liebich et al. vier Trimethyl-Tetrahydronaphthalin-Isomere in höheren Konzentrationen unter den Komponenten des Jamaika-Rums. Zwei von diesen Kohlenwasserstoffen waren 3,8,8-Trimethyl-Tetrahydronaphthalin (TTN). Ein 3,8,8-Trimethyl-Dihydronaphthalin (TDN) mit MW 172, sowie zwei weitere TTN-Isomere. In einem Versuch von F. Tiemann (zit. in Liebich et al. 1970) wurde Ionen durch eine Kondensationsreaktion aus α -Ionon gebildet. Durch Hydrierung wurde Dehydroionen (3,8,8-Trimethyl-Dihydronaphthalin) erzeugt. Das Massenspektrum und die Retenzionszeit des synthetischen Dehydroions ist mit dem von TDN gleich. Die synthetische Mischung von Ionen und Dehydroionen zeigte einen äußerst starken, dem Teerähnlichen Geruch.

Ein Oxidationsprodukt von β -Ionon ist Dihydroactinidiolid und 1,1,6-Trimethyl-1,2-Dihydronaphthalin (3,4-Dehydroionen). Auch dieses wurde als wahrscheinliches Abbauprodukt von β -Ionon oder β -Carotin identifiziert (LaRoe und Shipley 1970).

Die Carotinoide, die als TDN-Precursor vermutet werden, leiten sich von Isopren ab und gehören chemisch zu den Tetraterpenen (C₄₀). Es sind normalerweise weit verbreitete Farbstoffe in Pflanzengewebe, wie auch in Weinbeeren. In Weinbeeren sind ca. 30% der Carotinoide Kohlenwasserstoff-Carotinoide (Friedrich et al. 1986). Lutein (Blattxanthophyll) und β -Carotin gehören zu den in höheren Konzentrationen in Weinbeeren vorkommenden Carotinoiden (Friedrich et al. 1986, Razungles et al. 1987 und 1988, Marais et al. 1990). Die vorhandene relativ große Menge von β -Carotin und Lutein in Weintrauben (Razungles et al. 1987 und 1988, Marais et al. 1990) veranlasste die Untersuchung der Abbauprodukte dieser zwei Carotinoide. Aus Lutein und β -Carotin werden unter sauren Bedingungen spontan die C₁₃-Norisoprenoide gebildet Marais et al. (1991) und Marais (1992) behaupten, dass TDN nur aus Lutein entsteht. Die Alterung von Rieslingweinen, wird auf die Bildung von TDN aus Vorstufen wie β -Carotin und Lutein zurückgeführt. Diese Substanzen in Weinen werden als an Glucose in β -Stellung gebunden angesehen, während sie in der botanischen Literatur als an langkettige Fettsäuren gebunden

beschrieben werden (Gayle et al. 1986, Sponholz 1992). Beide Bindungsformen könnten durch die in Hefen bekannte β -Glucosidase oder durch Esterasen, sowie durch Acetyltransferasen, hydrolysiert werden. Folglich ist ein möglicher Beitrag des Hefestammes zur Bildung von TDN ebenfalls anzunehmen (Sponholz 1992, Sponholz und Hühn 1997).

Über das Vorkommen und die Bildungsprozesse der die Alterung auslösenden Precursoren und die Einflussfaktoren der TDN-Bildung und auch darüber ob TDN aus bestimmten Carotinoiden hergeleitet wird, wird von vielen Autoren unterschiedlich angesehen. Manche Autoren haben versucht, die TDN-Bildung in Modellversuchen mittels Reinsubstanzen von Carotinoiden mit verschiedenen Einflussfaktoren zu verfolgen. Über die TDN-Bildung aus den, in den Trauben vorkommenden Carotinoiden direkt während und nach der Gärung, sowie der Lagerung, wurde noch nicht berichtet.

Um diese Punkte klarzustellen wurde diese Arbeit mit folgender Zielsetzung durchgeführt:

1. Identifizieren und analysieren des möglichen Vorkommens Alterung auslösender Precursoren in Trauben, Mosten und Weinen mittels vorhandener und zu entwickelnder Methoden.
2. Identifizieren und analysieren des vorhandenen TDN in den Weinen.
3. Die mögliche Bildung und Entwicklung von TDN während und nach der Gärung im Zusammenhang mit den Carotinoidabbauprozessen zu verfolgen und zu beobachten
4. Die Untersuchung und Verfolgung der Faktoren, wie Traubensorten und -klone, Jahrgänge, Weinbau, eingesetzte Mikroorganismen (Hefen), Gärtemperaturen sowie pH-Wert möglicherweise den Carotinoidabbau und die TDN-Bildung beeinflussen können.

II. Weinalterung und TDN in Wein

2.1. Weinalterung

Die Aromabestandteile von Trauben und Weinen bestehen aus mehreren hundert einzelnen Substanzen aus verschiedenen Klassen (Rapp et al. 1978). Bei der Lagerung und Reifung guter Weine führen Veränderungen des Aromas dann zum Bukett und das Bukett kann je nach den Reifungsbedingungen z. B. durch oxidative Reaktionen geprägt sein (Belitz und Grosch 1987). Bei der Reifung bzw. Alterung des Weines (Flaschenlagerung) können durch vielfältige physikalische und chemische Prozesse die flüchtigen Inhaltsstoffe verändert und damit auch das Bukett des Weines beeinflusst werden (Rapp 1989).

Beim Alterungsverhalten der Weine berichteten Sponholz et al. (1997), dass Aromanoten der Weinen durch exogene Faktoren (Standort, Klima usw.) oder über die genetische Konstitution der Pflanzen induziert werden können (Abb.2).

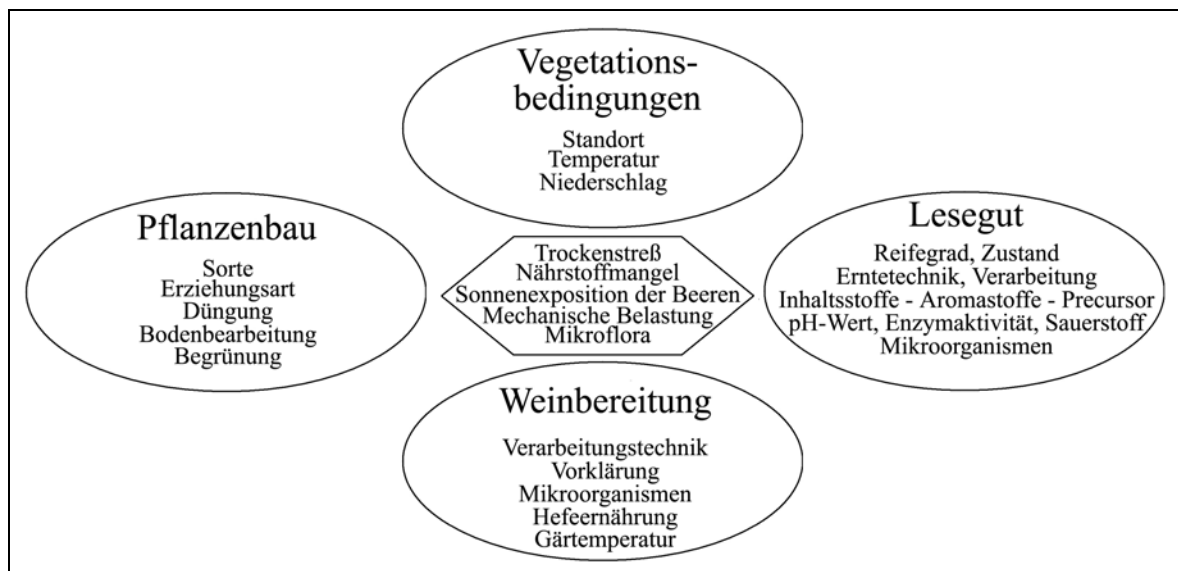


Abb. 2: Einflussfaktoren auf das Alterungsverhalten von Wein (Sponholz et al. 1997)

Riesling wird normalerweise in Flaschen gelagert, und die Untersuchung der Änderungen in der chemischen Zusammensetzung des Aromas während der Lagerung, führt zur Beschreibung eines Sorten-Buketts für Rieslingweine (Chisholm et al. 1995). Durch die Alterung erfolgen die Bildung und dadurch eine ständige Gehaltszunahme von Vitispiran und des TDN, während Damascenon in älteren Weinen auch durch Massenfragmentographie nicht mehr nachzuweisen war. Der Gehalt dieser Verbindung scheint während der Lagerung abzunehmen (Rapp et al. 1985). Mit der Lagerung nimmt die Farbe des Weines zu. Singleton (1976) hat sich auf andere Änderungen bezogen, die zunehmende Harmonie und

Komplexität, die abnehmende der Rauheit und die Entwicklung neuer Aromanuancen einschließen (Simpson 1979). In Abgrenzung zur normalen Alterung von Weinen wurde die auffallende Untypische Alterungsnote mit „Naphthalinton“ oder mit „mediterrane Note“ charakterisiert (Sponholz et al. 1997).

Weine verschiedener Sorten, mit genauem Hinweis auf die Flaschenalterung sind nicht alle „gut“ gealtert. Die Zeit zwischen dem Abfüllen und dem Erreichen des gewünschten Charakters kann von Wein zu Wein extrem unterschiedlich sein, auch dann wenn sie unter gleichen Bedingungen gelagert werden (Marais und Pool 1980 und dort zit. Literatur). Weine bestimmter Traubensorten (Riesling, Sauvignon Blanc und Semillon) profitieren wahrscheinlich mehr von der Flaschenalterung (Simpson 1979). Die chemischen Veränderungen und die Rate der chemischen Änderungen in Wein werden durch die Lagerungstemperatur während der Alterung drastisch beeinflusst (Marais und Pool 1980).

Verschiedene Techniken für die Beschleunigung der Flaschenalterung wurden von Singleton (1962) und Singleton et al. (1964) untersucht. Das Erwärmen des Weines in Abwesenheit von Sauerstoff wird als höchst erfolgreich angesehen (zit. in Simpson 1979). Die Bedingungen, die für eine Flaschenalterung als am geeignetesten angesehen werden, sind konstante kühle Temperaturen. Konstante Temperaturen sind wichtig, um die Wahrscheinlichkeit des Auslaufens zu reduzieren und einen minimalen Luftkontakt zu gewährleisten, der bei schwankenden Temperaturen ein Problem darstellt (Simpson 1979).

Während der Lagerung verändert sich die Aroma Zusammensetzung der Weine durch die Bildung anderer flüchtiger Verbindungen (Simpson und Miller 1983). Die Veränderungen im Gehalt einzelner Aromastoffe infolge der Alterung, lassen sich im wesentlichen in vier Aspekte unterteilen (Rapp et al. 1985, Rapp und Güntert 1986, Rapp 1989):

- Abnahme der Gehalte sämtlicher Essigsäureester (Acetate) sowie Konzentrationszunahmen von Bernsteinsäure-Monoethylester und der Diethylester einiger Dicarbonsäuren durch chemische Gleichgewichts-Einstellungen in wässrig-ethanolischer Lösung.
- Bildung von Substanzen aus dem Carotinoidabbau.
- Bildung von Substanzen aus dem Kohlenhydratabbau.
- Säurekatalysierte Reaktionen der Monoterpenverbindungen.

Trotz der großen Anzahl von Verbindungen, die in den gealterten Rieslingweinen identifiziert wurden, dem Vorkommen von Komponenten, die aus dem Kohlenhydrat und Carotinoidabbau hergeleitet werden und den Terpenoidneuordnungen sowie der

Konzentrationszunahme während der Lagerung in den Weinen, ist keine Korrelation zwischen Aromakomposition und Weinalter erkennbar (Simpson und Miller 1983).

Die wichtigen Verbindungen für das Aroma der Flaschenalterung von Rieslingweine sind flüchtige C₁₃-Norisoprenoide z. B. Vitispiran, TDN und β -Damascenon (Simpson 1978, Simpson und Miller 1983, Rapp et al. 1985). Simpson (1979) und Simpson und Miller (1983) berichteten, dass TDN als wichtige Komponenten des Aromas reifer Flaschenweine angesehen werde und TDN auch ein wichtiger Beitrag zum Aroma gealterter Rieslingweine ist. Der Begriff Petrol kommt als Alterungsbeschreibung häufiger vor. Von einer negativen Petrolnote wird aber nur bei sehr wenigen Weinen gesprochen (Sponholz et al. 1997).

Der Kohlenwasserstoff TDN, ist direkt mit dem Kerosin ähnlichen Geruch bzw. der Petrolnote assoziiert (Rapp 1989), was besonders in alten Rieslingweinen erkennbar ist (Strauss et al. 1987a). Bei sehr hohen Konzentrationen löst TDN den Kerosincharakter bei Rieslingweinen aus heißen Klimaten aus (Marais et al. 1992b). Die Bildung von TDN ist eindeutig mit der geschmacklichen Veränderung des Weines bei der Alterung korreliert. Die TDN-Konzentration nimmt während der Alterung deutlich zu (Rapp und Güntert 1986 Marais et al. 1992b). Wenn dieser Geschmack in hohen Intensitäten vorhanden ist, hat es eine schädliche Wirkung auf die Weinqualität (Marais 1992b).

2.2 TDN in Wein

Das TDN liefert einen wichtigen Beitrag zur typischen Flaschenalterung, dem Kerosin ähnlichen Charakter älterer Rieslingweine, in denen die höchsten Mengen dieser Verbindung gefunden wurde (Simpson 1978, Di Stefano 1985, Rapp et al. 1985, Marais et al. 1992b). Es ist auch verantwortlich für ein Kohlenwasserstoff Fehl aroma in jungen Weindestillaten (Versini et al. 1996).

Der Gehalt an TDN kann benutzt werden, um das Alterungspotential von Rieslingweinen abzuschätzen (Chisholm et al. 1995). TDN in sehr hohen Konzentrationen kann die Weinqualität schädigen (Versini et al. 1996). TDN mit dem niedrigen Geschmackschwellenwert (20 ppb in Wein) ist verantwortlich für den Kerosin Geschmack, der oft in alten Rieslingweinen vorkommt (Simpson und Miller 1983, Strauss et al. 1987a, Roscher und Winterhalter 1993). TDN gehört zu den Aromastoffen, die bei Flaschenlagerung gebildet werden. Nach längerer Lagerung überschreitet es die Aromaschwelle (ca. 20 μ g/l Wasser) und trägt mit einer kerosinartigen Aromanote zum Aromaprofil alter Weine bei (Belitz und Grosch 1987). Die in Rieslingweinen vorkommende Menge an TDN variiert von

0,001 bis 42 ppm. Die Konzentrationen des Kohlenwasserstoffes TDN in den Weinen können die Flavorschwelle dieser Verbindung (0,02 mg/l, Simpson 1978a) leicht übersteigen und damit das Flaschenalterungsbukett bewirken (Simpson 1979). Ältere Rieslingweine hatten höhere TDN-Konzentration im Vergleich zu jüngeren kommerziellen Weinen (Simpson und Miller 1983, Rapp und Güntert 1986, Marais et al. 1992b). In älteren Rieslingweinen wurde neben höheren TDN-Konzentrationen auch Furfural, Linalooloxid, Neroloxid und Ethylfuroat nachgewiesen (Simpson 1979).

Der Kohlenwasserstoff TDN, der für ein charakteristisches Kerosin Aroma in Rieslingweinen verantwortlich gemacht worden ist, ist auch in den flüchtigen Bestandteilen roter Weine gefunden worden (Bertuccioli und Viani 1976). TDN hat einen nur unwesentlichen Einfluss auf das Aroma des Chardonnay Weines (Simpson und Miller 1984). Weine vieler Traubensorten haben nur ein geringes Potential TDN während längerer Alterung zu bilden (Simpson und Miller 1984). Obwohl TDN auch in Weinen anderen Sorten anwesend ist, ist seine Konzentration in ihnen zu gering um organoleptisch wahrgenommen zu werden. Bei Weißem Riesling wird überall angenommen, dass der Kerosin ähnliche Charakter dann vorteilhaft für die Weinqualität ist, wenn er in geringen Intensitäten vorhanden ist. Aber er, wenn er in hohen Intensitäten vorhanden ist, wird unerwünscht (Marais et al. 1992b).

Bei der Bildung von TDN und Vitispiran in Mosten, hatte Emerald Riesling (Riesling x Muscadelle) den höchsten Vitispirangehalt. Rieslingsmost enthielt das meiste TDN (Simpson und Miller 1983). Chenin Blanc und Cape Riesling hatten relativ niedrige TDN-Konzentrationen. Im allgemeinen enthielt Kerner (Weißer Riesling x Trollinger) höhere TDN-Konzentration als Chenin Blanc und Cape Riesling (Marais et al. 1992b). Alle Sorten zeigten das Potential Vitispiran und TDN zu produzieren aber Riesling und nahverwandte Sorte sind möglicherweise die einzigen Sorten, die fähig sind, große TDN-Konzentration zu bilden die das Weinaroma beeinflussen zu können, sogar bei längerer Kellerlagerung der verschiedenen Sorten (Simpson und Miller 1983). Die Konzentrationsänderungen der Hauptaromakomponenten reichen mit Ausnahme des Kohlenwasserstoffes TDN nicht aus, um die sensorischen Schwellenwerte zu überschreiten (Simpson 1978). Weine der Sorten Riesling und Vidal Blanc werden oft konsumiert, wenn sie zwei Jahre alt sind, weil sie ihr charakteristisches fruchtiges Aroma schnell erwerben (Chisholm et al. 1995).

Die TDN-Konzentrationen von Weinen südafrikanischen Weißen Rieslings waren höher als die von Deutschland und Italien, und von anderen Sorten (Marais et al. 1992b). Dieser C₁₃-

Norisoprenoid kann sich in höheren Konzentrationen in Weinen von Weinanbaugebieten mit speziellen klimatischen Merkmalen entwickeln (Marais et al. 1992c, Versini et al.1996). Die TDN-Konzentrationen von Weißem Rieslingwein aus Italien waren niedriger als die der Weine aus der Pfalz. Im Vergleich zu den Weinen aus kühleren Gebieten, hatten die „Weißen Rieslingweine“ aus den wärmeren südafrikanischen Gebieten einen um 78% höheren TDN-Gehalt. Die TDN-Precursor Konzentrationen waren bedeutend höher in besonnten als in beschatteten „Weißen Riesling“ Weintrauben (Marais et al. 1992b).

Eine nahe Beziehung existiert zwischen der Qualität eines Jahrgangs, bestimmt durch Sinnes Einschätzung, der Temperatur und dem Niederschlag eines Jahres (Ribereau-Gayon 1978).

III. Das Vorkommen

3.1 Das Vorkommen von TDN

Unter dem Begriff Aromastoffe werden stets mehr oder weniger flüchtige Komponenten, die bereits in außerordentlich geringen Konzentrationen geruchlich wirksam sein können verstanden. Ihre Geruchsschwellenwerte, also die Konzentrationen, in denen man sie geruchlich wahrnehmen kann liegen im Bereich von ppm oder ppb manchmal sogar noch darunter (Baltes 1995). Zu den Aromastoffen des Weines, die bei Flaschenlagerung gebildet werden, gehört TDN. Unter TDN versteht man eine wichtige flüchtige Komponente der Aromastoffe, die zu den C₁₃-Kohlenwasserstoffen gehört.

Die Frage, ob eine flüchtige Komponente eines Weines positive oder negative Eigenschaften besitzt bzw. das Aroma eines Weines positiv oder negativ beeinflusst, hängt von verschiedenen Faktoren ab (Köhler et al. 1995). Insbesondere bei Weine spielt TDN als wichtige Komponenten des Aromas reifer Flaschenweine eine entscheidende Rolle (Simpson 1979) oder es verleiht einen wichtigen Beitrag zum Aroma von Flaschen gealterten Rieslingweine (Marais 1979, Simpson 1979, Simpson und Miller 1983) und trägt mit einer kerosinartigen Aromanote zum Aromaprofil alter Weine bei (Belitz und Grosch 1987).

Obwohl die meisten nachgewiesenen Kohlenwasserstoffe im Wein Artefakte sind, ist TDN als ein Beispiel unter den Kohlenwasserstoffen identifiziert worden, dass es eine echte Aromaverbindung ist (Nykänen und Soumalainen 1983). 1,2-Dihydro-1,1,6-Trimethylnaphthalin (3,4-Dehydroionen) wurden im Essentiellen-Öl von Erdbeerfrüchten und -blättern identifiziert (Stoltz et al. 1970). Im Pentanextrakt des Jamaika-Rums hatten Liebich et al. (1970) vier Trimethyl-Tetrahydronaphthalin (TTN)-Isomere sowie ein TDN (3,8,8-Trimethyl-Dihydronaphthalin) gefunden.

TDN wurde auch in Chardonnaywein (Simpson und Miller 1984), im Bukett „Italienischer Rotweine“ sowie auch in anderen Früchten und Ölen identifiziert (Bertuccioli und Viani 1976, Ohloff 1978b, Enzell 1985). Untersuchungen an wichtigen Lebensmittel Aromastoffen, z. B. Damascenon, TDN, einigen Benzolderivaten und gamma-Lacton deuten darauf hin, dass sie auch im Chardonnay Flavour wichtig waren (Sefton et al. 1993). TDN ist auch verantwortlich für ein Kohlenwasserstoff Fehleraroma in jungem Branntwein (Vidal et al. 1990 zit. in Versini et al. 1996).

Über das Vorkommen von TDN haben schon von viele Autoren berichtet. Nach Winterhalter et al. (1990b) wurde das Vorkommen mehrerer Precursoren in Rieslingweinen deutlich.

Obwohl der biosynthetische Ursprung zyklischer Verbindungen in Tabak und anderen Pflanzen unsicher ist, könnte sie aus Carotinoiden über die Zwischensubstanzen, α - und β -Ionon hergeleitet werden (Davis et al. 1976).

Stoltz et al. (1970) haben eine Kohlenwasserstoffverbindung mit einem Pinen Geruch, TDN aus α -Ionon (nach der Methode von Karrer und Oschner) synthetisiert. Die Biogenese von TDN (Ib), des Isomers des Vitispirans, Damascenon und Dihydroactinidiolid wird allgemein aus dem Carotin-Stoffwechsel abgeleitet. Stevens et al. (1975) und Davis et al. (1976) schlugen 5,6-epoxy- β -Ionon (I) und 3-keto- α -Ionon (Ia) als mögliche Precursor von TDN vor.

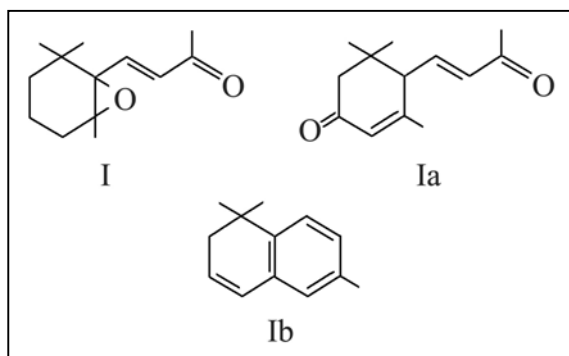


Abb. 3: TDN und die möglichen TDN-Precursoren
I. 5,6-epoxy- β -Ionon,
Ia. 3-keto- α -Ionon
Ib. TDN

Strauss et al. (1987a) und Marais et al. (1992a) haben festgestellt, dass die Konzentrationen von potenziell flüchtigem TDN (die TDN-Precursoren) während des Reifens von Trauben der Sorte „Weißer Riesling“ zunimmt. Die TDN-Precursor Konzentrationen waren auch in sonnenungeschützten Trauben bedeutend höher, als in beschatteten (Marais et al. 1992b). Außerdem wurden TDN-Precursor auch in Traubenmosten (Strauss et al. 1986), Rieslingblättern (Roscher und Winterhalter 1993), Passionsfrüchten, purpurrotem Passionsfruchtensaft (zit. in Winterhalter 1990), in roten Johannisbeeren und Quittenfrüchten (*Cydonia oblonga* Mill.) (Humpf et al. 1991, Güldner und Winterhalter 1991) gefunden. In anderen Früchten sind andere C_{13} -Norterpeneoide als TDN-Precursor von Stevens et al. (1975) und Di Stefano (1985) vorgeschlagen worden.

Bei Lebensmittel Aromastoffen haben Buttery et al. (1969), Stevens et al. (1967) und McFadden et al. (1965) über das Vorkommen mehrerer aromatischer Kohlenwasserstoffe, einschließlich Methylnaphthalin und Dimethylnaphthalin, berichtet. Methyl- und Dimethylnaphthalin werden während des Kochprozesses aus Carotinoiden produziert und ergeben ein „Naphthalin-Aroma“ (Pippen et al. 1969). McFadden et al. (1965) erhielten

massenspektrometrische Daten, die das Vorkommen drei anderer Naphthaline im Erdbeeraroma belegen, u.a. Naphthalin, 1- und 2-Methylnaphthalin.

Pfirsichfrucht-Aromen enthielten TDN. Blätter enthielten zusätzlich noch Ionen und zwei $C_{14}H_{22}$ -Kohlenwasserstoffe (Kemp et al. 1971). Die nicht Ester Bestandteile der purpurroten Passionsfrüchte (*Passiflora edulis* Sims) schließen neben anderen Verbindungen auch TDN und β -Ionon ein (Murray et al. 1972). Außerdem sind diese Verbindungen auch aus den flüchtigen Bestandteilen griechischen Tabaks isoliert worden (Stevens et al. 1975).

TDN, das zu den C_{13} -Komponenten gehört, wird aus den in Traubenbeeren vorhandenen Carotinoiden gebildet (Simpson und Miller 1983). Auf den Carotinoidabbau während der Alterung des Weines geht auch die Biogenese der Isomeren Vitispiran, TDN, Damascenon, und des Dihydroactinidiolids zurück (Ohloff 1978a, Rapp. 1989, Rapp und Güntert 1986). Außer TDN wurden weitere wichtige Substanzen und Zwischenverbindungen des Carotinoidabbaus bekannt. Williams et al. (1982a) schlug andere Precursor wie Glycoside als mögliche Precursor für Vitispiran und Damascenon in Wein und Weintrauben vor. 5,6-epoxy-3,4-dihydroxy- β -Ionon (I) ist ein Precursor des Vitispirans (Ia). Keton (II) ist eine wichtige Zwischenverbindung für die Bildung von Damascenon (IIa) während β -Ionon (III) in einer sekundären Reaktion aus Dihydroactinidiolid (IIIa) entsteht (zit. in Rapp und Güntert 1986).

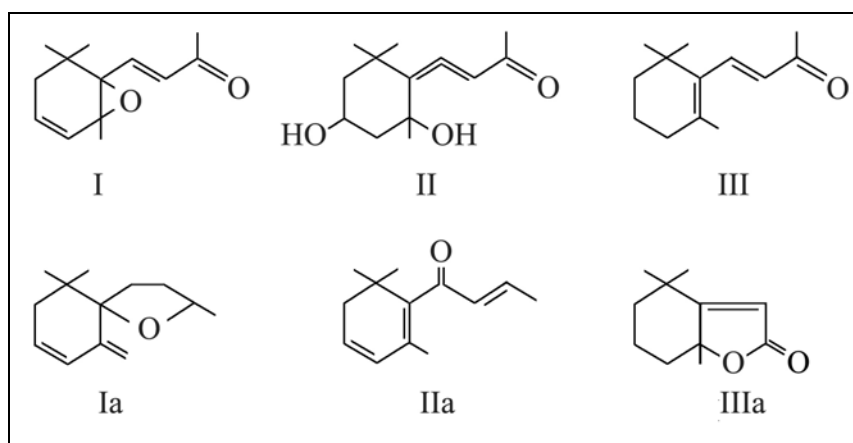


Abb. 4: Zwischenverbindungen des Carotinoidabbaus

I. 5,6-epoxy-3,4-dihydroxy- β -Ionon; Ia. Vitispiran; II. Keton; IIa. Damascenon III. β -Ionon, IIIa. Dihydroactinidiolid

Bei der Bildung der Aromastoffe im Pflanzengewebe spielen die C_{13} -Norisoprenoide eine große Rolle (Täufel et al. 1993). C_{13} -Norisoprenoide haben interessante Geruchseigenschaften. Diese Verbindungen sind Precursor wichtiger Aromen (Ohloff

1978a). Einige wichtige Norisoprenoid-Aromaverbindungen sind in Früchten und Gemüse anwesend (Winterhalter 1990, Ohloff 1978b). Die höchsten Konzentrationen findet man im Tee und Tabak (Ohloff 1978b). Mehrere dieser flüchtigen Verbindungen sind auch in Weintrauben, in Weinen (Marais 1983) und auch Branntwein identifiziert worden (Nykänen und Suomalainen 1983). Eine hohe Menge gebundener C₁₃-Norisoprenoiden wurde auch in den gebundenen Aromastoffen von Luloblättern (*Solanum quitoense* L.) gefunden (Osorio et al. 1999). Tsuneya et al. (1983) und Ishihara et al. (1986) hatten eine Anzahl von C₁₃-Norisoprenoid in Dampf destillierten Ölen von Quittenfrüchten identifiziert. In der polaren Fraktion, die durch flüssig chromatographische Extrakte auf Silica Gel erhalten wurden, zeigte sich das Vorkommen von C₁₃-Norisoprenoide in Quittenfrüchten mittels Kapillar-GC und -GC/MS (Winterhalter und Schreier 1986).

In Früchten gelten auch C₁₃-Norisoprenoide als wichtige Geschmackprecursor (Ho et al. 1990, Stahl-Biskup et al. 1993), insbesondere in Weintrauben (Williams et al. 1982b, Strauss et al. 1987a,1988, Winterhalter et al. 1990b) und im Weingeschmack (Williams et al. 1982a). Hydrolysate von Chardonnay weisen ein signifikantes Tearoma auf, dieses ist ein Zeichen dafür, dass Norisoprenoide zum Sortencharakter beitragen (Sefton et al. 1993). In Weinen stellen die in Weintrauben identifizierten glykokonjugierten C₁₃-Norisoprenoide eine wichtige Aromaqueelle dar (Sefton et al. 1989, Winterhalter et al. 1990b, Baumes et al. 1994, Bureau et al. 2000).

3.2 Carotinoide als Precursor von TDN und Naphthalin

Über die Bildung von TDN aus dem Carotinoideabbau haben viele Autoren berichtet. Edmunds und Johnstone (1965) identifizierten TDN und Ionen als thermale Abbauprodukte von β -Carotin und verwandten Isoprenoiden. Pippen et al. (1969) wiesen darauf hin, dass einige aromatische Kohlenwasserstoffe wie Methylnaphthalin und Dimethylnaphthalin, die als „Naphthalin Aroma“ charakterisiert werden, aus Carotinoiden während des Kochens produziert wurden.

Ohloff (1972) behauptete, dass Carotinoide die Vorstufe aromatischer Verbindungen wie C₁₃-Norisoprenoid ist. Gemeinsam mit dem Vitispiran, TDN, Damascenon, wie auch β -Ionon sind alle C₁₃-Verbindungen, die vermutlich aus dem Carotinoideabbau hergeleitet werden können (Ohloff 1978b, Simpson und Miller 1983).

Enzell (1981) behauptete, dass der Carotinoideabbau in der intakten Pflanze durch enzymatische Oxigenasesysteme, Photooxigenierung und andere nicht enzymatische

Oxidationen bewirkt wird (Winterhalter und Schreier 1986). In Tabak und anderen Pflanzen könnte TDN aus Carotinoiden über die entsprechenden Zwischenprodukte α -Ionon und β -Ionon durch sequentielle Oxidation, Neuordnung, und Reduktion hergeleitet werden (Davis et al. 1976). Auch die Bildung der Isomeren Vitispiran, des TDN, des Damascenons und des Dihydroactinidiolids geht auf den Carotinoidabbau während der Alterung des Weines zurück (Simpson 1979, Ohloff 1978b, Rapp und Güntert 1986, Rapp 1989). Die Konzentration von Substanzen aus dem Carotinoidabbau, insbesondere TDN, nimmt wesentlich während der Alterung zu (Rapp et al. 1985).

Beim Abbau von Carotinoiden zu TDN sind einige Zwischenprodukte von vielen Autoren vorgeschlagen worden. Als Zwischenprodukte des Carotinoidabbaus zu TDN sind: 5,6-epoxy- β -Ionon, 3,4-dihydro- β -Ionon, 3-keto- α -Ionon, 4-hydroxy-1,1,6-Trimethyl-Tetrahydronaphthalin, 4,4,7-Trimethyl-3,4-dihydro-2(1H)-Naphthalinon und Megastigma-4,7-dien-3,6,9-Triol vorgeschlagen worden (Steven et al. 1975, Davis et al. 1976, Enzell et al. 1977, Di Stefano 1985, Strauss et al. 1986). Die Abbau Produkte vom folgenden Carotinoiden sind erforscht worden: β -Carotin (Day und Erdman 1963, Mader 1964, LaRoe und Shipley 1970, Isoe et al. 1972, Schreier et al. 1979, Hohler et al. 1988, Kanasawud und Crouzet 1990a), Zeaxanthin (Isoe et al. 1972), Lycopin (Kanasawud und Crouzet 1990b) Canthaxanthin (Roshdy und Daun 1990) und Violaxanthin (Burden und Taylor 1970).

Zur möglichen Bildung der Verbindung TDN haben viele Autoren berichtet. Als thermische Abbauprodukte von β -Carotin und entsprechenden Isoprenoiden identifizierten Schreier et al. (1979) Ionen, m-Xylen, und Toluol. Unter sauren Bedingungen werden aus Lutein und β -Carotin spontan in die C_{13} -Norisoprenoide gebildet. Marais et al. 1991 und Marais 1992 behaupteten, dass TDN nur aus Lutein gebildet werden kann.

Die Rieslingweinalterung wird auf die Bildung von TDN aus Vorstufen wie β -Carotin und Lutein zurückgeführt. In Mosten und Weinen werden diese Vorstufen als an Glucose in β -Stellung, oder als an langkettigen Fettsäuren gebunden angesehen (Gayle et al. 1986, Sponholz 1992).

Ein allgemeiner Precursor, sowohl für den Kohlenwasserstoff TDN als auch für Vitispiran, wird über diese Bestandteile im Wein angedeutet (Simpson 1978). Bei einem Versuch von Marais (1992) wurden verschiedene Produkte aus Lutein und β -Carotin gebildet. TDN aber, das für den Kerosin ähnlichen Geruch und Geschmack von alten Weinen der Sorte „Weißer

Riesling“ verantwortlich ist, konnte nur aus Lutein hergeleitet werden. Eines der Hauptabbauprodukte von Lutein war 3-keto- α -Ionon. Diese Verbindung könnte das Zwischenprodukt bei der Bildung von TDN sein. Ein anderes Abbauprodukt von Lutein, 3.4-dehydro- β -Ionon, ist ebenfalls als Precursor von TDN vorgeschlagen worden. Angesichts dieser Resultate könnte Lutein in Weintrauben ein Precursor von TDN in Wein sein (Marais 1992).

Von Norisoprenoiden ist bekannt, dass sie aus Carotinoiden entstehen, ebenso wie die flüchtigen Verbindungen mit 13 Kohlenstoffatomen (Enzell 1985, Täufel et al. 1993). Sie stellen wesentliche Geschmackbestandteile von Tabak (Enzell et al. 1977) und Tee (Yamanishi 1981) dar. Bei anderen Pflanzen tragen Norisoprenoide zum gesamten Geschmackeindruck bei. Eine von diesen sind Quittenfrüchte (*Cydonia oblonga* Mill.) (Winterhalter und Schreier 1986).

Carotinoide werden allgemein als Vorstufe von C_{13} -Norisoprenoiden betrachtet (Isoe et al. 1972, Enzell 1985, Williams et al. 1992), obwohl die enzymatischen Systeme in höheren Pflanzen noch nicht entdeckt worden sind (Bureau et al. 2000). Razungles et al. (1993) berichteten vom Carotinoidniveau in Weintrauben, das mit zunehmender Reife verringert wurde, während Norisoprenoide vergrößert wurden. Der Vorschlag, dass konjugierte Norisoprenoide Produkte des hydrophilen Abbaus von Carotinoiden sind, geht bis in den Most zurück (zit. in Baumes et al. 1994). Die Gruppe von C_{13} -Verbindungen, die insbesondere in Weintrauben vorhanden sind, kommen normalerweise in Früchten nicht nur als freie flüchtige Verbindungen, sondern auch in ihrer glycosidisch gebundenen Form vor (Strauss et al. 1987a, Stahl-Biskup et al. 1993) und entstehen in Mosten und Weinen durch den hydrolytischen Abbau der Vorstufensubstanzen. In Weintrauben und Weinen, können die meisten von ihnen, als Endprodukte des Neoxanthinabbaus angesehen werden. Dieses Carotinoid wurde als ein Traubenprodukt identifiziert, dessen Konzentration während der Beerenreife abnimmt (zit. in Stahl-Biskup et al. 1993). Außerdem kommen Glycoside von C_{13} -Norisoprenoiden neben Monoterpenen als wichtigste Aromaprecursoren bei Weintrauben vor (Tominaga et al. 1998). Die Bildung von Norisoprenoidverbindungen wurden vom Abbau höher molekulare Terpene wie die Carotinoide der Pflanzengewebe hergeleitet (Enzell et al. 1977).

Sekundäre Produkte von Carotinoidabbau können besonders in Tabak- und Teearoma in vivo beobachtet werden. Die Spaltungen in der 8,9- oder 9,10-Position von β -Carotin ergeben

ungesättigte C₁₁ und C₁₃-Ketone und auch epoxy-Ketone nach (Abb. 5) (zit. in Rapp und Güntert 1986).

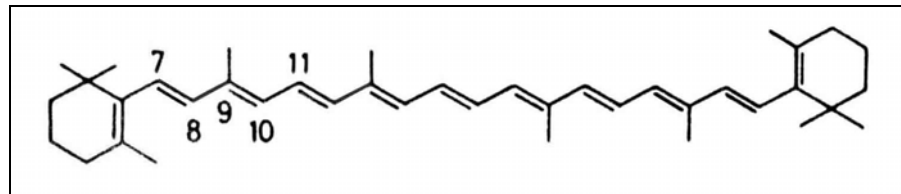


Abb. 5: Die mögliche Spaltung von β -Carotin zu Sekundärenprodukten

Die Entwicklung von TDN in Wein während der Alterung kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Eine von diesen ist die Konzentration von potenziell flüchtigen TDN-Precursoren, die während des Reifens von Trauben der Sorte „Weißer Riesling“ zugenommen hat (Strauss et al. 1987a, Marais et al. 1992a).

Für die Bildung von TDN in Rieslingwein wurde das Vorkommen mehrerer Precursoren erkennbar (Winterhalter et al. 1990b). Nach Versini et al. (1996) gibt es für die TDN-Bildung wenigstens zwei TDN-Vorstufen in Weintrauben. Als Precursoren für TDN werden verschiedene Glycoside angenommen (z. B. Mono- sowie Disaccharide) der C₁₃-Norisoprenoidstrukturen 2,6,10,10-1-oxaspiro(4.5)-dec-6-ene-2,8-diol (**1**) und 3,4-dihydroxy-7,8-dihydro- β -Ionon (**2**) zu (Roscher und Winterhalter 1993). Beide Verbindungen sind von Winterhalter (1991) als Rieslingweinbestandteile nach Glycosidasebehandlung in höheren Mengen identifiziert worden. Bei hydrolytischen Reaktionen in Wein/Most pH-Wert (u.a. 3,2) haben diese Aglycone gezeigt, dass TDN als ein bedeutendes Abbauprodukt erzeugt wurde (Roscher und Winterhalter 1993). Glycoside sind Naturstoffe, die aus einem Zuckerteil und einem Nichtzuckerteil, dem Aglycon bestehen (Schunk, 1999).

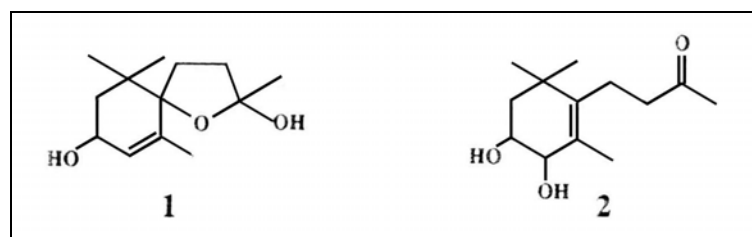


Abb. 6: Glycoside von C₁₃-Norisoprenoid Strukturen als Precursor von TDN: 2,6,10,10-1-oxaspiro(4.5)-dec-6-ene-2,8-diol (**1**) und 3,4-dihydroxy-7,8-dihydro- β -Ionon (**2**)

In Trauben sind viele flüchtige Aromastoffe glycosiliert und können unter bestimmten Bedingungen hydrolisiert werden, so dass sie als ein wichtiger Vorrat des Traubenaromas betrachtet werden können. Diese glycosilierten Vorstufen können in größerer Konzentration vorliegen, als die geruchsaktiven freien Aromastoffe (Baumes et al. 1994 und dort zit.

Literatur). Glycoside sind auch als Precursor für Vitispiran und Damascenon in Weinweitrauben möglich (Marais 1983).

Die Glycoside liegen normalerweise in Fruchtsäften oder Pflanzengewebe als sehr komplexe Mischungen mit polaren Substanzen vor. Diese in Wasser löslichen Substanzen sind schwierig zu isolieren und zu trennen (Strauss et al. 1987b).

Die bekanntesten Aglycone, die als glycosidische flüchtige Verbindungen vorkommen, sind u.a. aliphatische Alkohole, Phenylpropane, Monoterpene und Sesquiterpene. Es sind etwa 200 weitere Verbindungen bekannt, besonders C₁₃-Norisoprenoide (= verwandte Ionon-Verbindungen) neben anderen Verbindungen (Stahl-Biskup et al. 1993). Außer freien Aromabestandteilen wurden eine relativ große Menge glycosidisch gebundener Verbindungen und anderer Aromen von nicht flüchtigen Derivaten in Früchten, besonders in Weintrauben, gefunden. Die Entstehung dieser Aromaverbindungen kann als direkte Biosynthese während der Reifung der Früchte angesehen werden (Stahl-Biskup et al. 1993). Die Aglyconstrukturen, die in Trauben identifiziert wurden, sind zahlreich u.a. Norisoprenoide, Diole, Monoterpenoide, Benzylalkohol, 2-Phenylethanol, Citronellol, Geraniol, Linalol, Linaloloxide (furanoid), Linaloloxide (pyranoid), Nerol, α -Terpineol, 3,7-Diethyl-octa-2,6-dienol und 27 Schikimat-Derivate (Stahl-Biskup et al. 1993).

Die Aglycone wurden gebunden als β -D-Glucopyranoside, 6-O- α -L-Rhamnopyranosyl- β -D-Glucopyranoside (β -Rutinoside), 6-O- α -L-Arabinofuranosyl- β -D-Glucopyranoside und 6-O-(3-C-hydroxymethyl- β -D-Erythrofuransyl)- β -D-Glucopyranoside identifiziert (Baumes et al. 1994 und dort zit. Literatur).

Die β -D-Glucopyranoside von (3R,8E)-3-hydroxy- β -Damascone und (6R,7E,9R)-3-keto- α -Ionol wurden in einem glycosischen Rieslingweinextrakt charakterisiert. (R)-2-Phenyl Propion- und Racemic-Säure (E)-3-hydroxy- β -Damascone sind zwei Glucoside, die in den Weinen und Trauben andere Sorten von *Vitis vinifera* identifiziert worden sind (Baumes et al. 1994).

Unter den identifizierten Traubenbestandteilen waren (E)-6-hydroxy-2,6-dimethylocta-2,7-dien-1-yl-3-D-Glucopyranosid und dem entsprechenden 6-O- α -Arabinofuranosyl-d-D-Glucopyranosid, 1-methyl-1-*trans*-5'-Astilbin, Quercetin-3-O- β -Glucopyranuronosid und Rosenoxid (Strauss et al. 1987b).

Als natürlicher TDN-Precursor in roten Johannisbeeren bzw. Quitten-Früchten wurden auch 3,4-dihydroxy-7,8-dihydro- β -Ionon- β -D-Glucopyranosid und (R)-3-hydroxy- β -Ionon vorgeschlagen (Humpf et al. 1991, Güldner und Winterhalter 1991). In anderen Früchten wurden verschiedene C₁₃-Norterpene, einschließlich 5,6-epoxy β -Ionon (Stevens et al. 1975) und 4-hydroxy 1,1,6 Trimethyl-1,2,3,4 Tetrahydronaphthalin (Di Stefano 1985) als TDN-Precursor vorgeschlagen. Whitfield und Last (1986) weisen darauf hin, dass TDN in Passionsfrüchten ein Abbauprodukt des Isomeren Megastigma-4,6,8-trienes ist (Winterhalter 1990). Vom Alkohol 3-hydroxy-1,1,6-Trimethyl-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin (Abb. 7) oder einem hydroxylierten TDN ist bekannt, dass sie im sauren Medien TDN ergeben (Davis et al. 1976). Diese glycosidischen Verbindungen konnten enzymatisch aus isolierten Glycosiden purpurroter Passionsfrüchte und -säfte produziert werden. Sie gelten als die wahrscheinlichsten TDN-Precursor in purpurroten Passionsfrüchten (Winterhalter 1990, Versini et al. 1996).

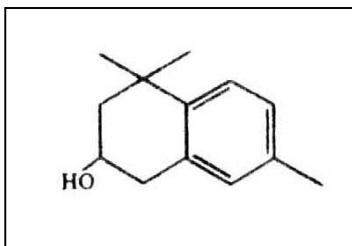


Abb. 7: Die Struktur von 3-hydroxy-1,1,6-Trimethyl-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin als natürlicher TDN-Precursor purpurroter Passionsfrüchte

Ein C₁₃-Norterpene Triol, wie Megastigma 5,7-diene,3,4,9-Triol, das aus dem Most isoliert wurde, ergab bei Wärmebehandlung (100°C) bei Saurekondition (pH 3,0) eine kleine Menge TDN (Strauss et al. 1984 in Versini et al. 1996). Winterhalter (1991) schlug 2,6,10,10-Tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-6-ene-2,8-diol als natürlichen TDN-Precursor in Rieslingwein vor, das nach enzymatischer Hydrolyse des Glycosids identifiziert wurde.

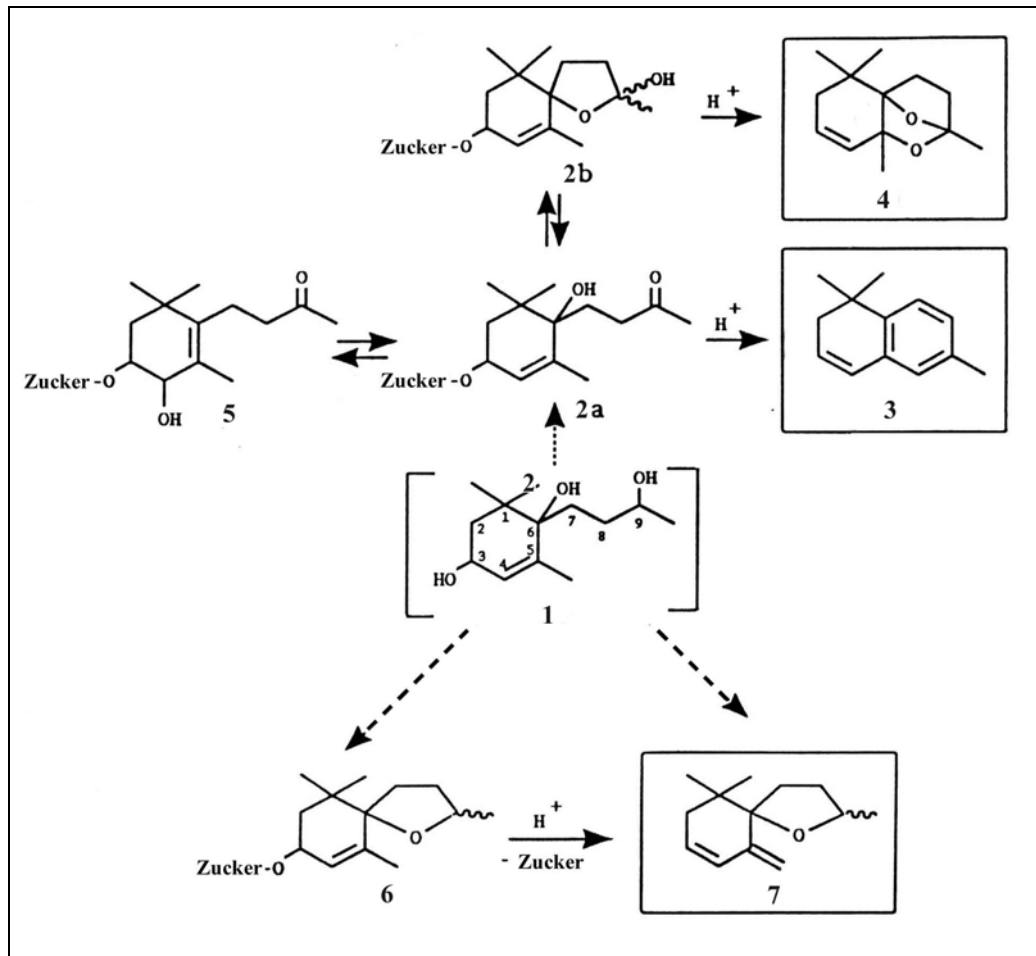


Abb. 8: Vorgeschlagener Bildungsweg für die TDN (3) und Vitispiran (7) Bildung in Rieslingwein und die potenzielle Rolle des hypothetischen Triols (1) als Zwischenprodukt bei der Vitispiran- und TDN-Entstehung (Waldmann und Winterhalter 1992)

Ein weiterer Hinweis auf das Vorkommen des hypothetischen Triols (1) in Wein wurde dadurch erhalten, dass in einer Studie der TDN-Bildung im selben Wein gebundene Formen der strukturell dazu gehörigen Norisoprenoide als natürliche Vorstufen für TDN (3), wie auch für sogenannte Riesling-Acetal (4) entdeckt wurden. Zusätzlich zur oxidierten Form des Triols (1) das sind die Isomere (2a,b), wurden konjugierte Formen der allylischen konjugierten Produktes (5) als weitere Vorstufe für TDN in Riesling gefunden (Winterhalter et al. 1991 zit. in Waldmann und Winterhalter 1992).

IV. TDN Bildung

4.1 TDN Bildung bei Wein, Pflanzenprodukten und die Einflussfaktoren

Die Bildung von TDN und die Konzentration dieser Verbindung hängt von potenziellen nicht flüchtigen oder gebundenen Verbindungen ab, die durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Die Einflussfaktoren können aus klimatischen und weinbaulichen Faktoren wie z.B. Gebiet und Klima, Traubensorte, mikrobiologischer Zustand, wie Hefe und insbesondere die Lagerung des Weines bedingt sein.

Wurde die diastereoisomere Mischung des synthetischen Megastigm-4-ene-3,6,9-Triols oder Megastigma-4,7-diene-3,6,9-Triols in wässriger Säure bei pH 3–3,5 erhitzt, ergab sich eine hohe Anzahl flüchtiger C₁₃-Norisoprenoidprodukte. Alle in dieser Reaktion gebildeten Verbindungen, einschließlich TDN, Vitispiran und Transactinidol sind in Weintraubenprodukten gefunden worden (Strauss et al. 1986). Megastigma-5,7-dien-3,4,9-Triol, das aus dem Most isoliert wurde, produzierte eine geringe Menge TDN nach Hitzebehandlung bei pH 3,0 (Strauss et al. 1984 in Versini et al. 1996). In „Weißem Riesling“ kommen eine Anzahl von TDN-Precursor als polar glycosidische Derivate sowie als nicht glycosidisch gebundene Komponenten vor (Winterhalter et al. 1990b). Zwei von den vorgeschlagenen natürlichen TDN-Precursoren, die in Weißem Rieslingwein bzw. roten Johannisbeeren identifiziert worden sind, sind als glycosidische Verbindungen von 2,6,10,10-Tetramethyl-1-oxaspiro [4,5] dec-6-ene-2~8-diol und 3,4-dihydroxy-7,8-dihydro-β-Ionon (Winterhalter 1991, Humpf et al. 1991).

Vorher wurde das Vorkommen der Traubenbestandteile mit 13 Kohlenstoffen offensichtlich gemacht. Unter diesen Kondition ergab der Isolat von Muscat-Weintrauben TDN, sowie Damascenon, Vitispiran, 4-(2,3,6-Trimethylphenyl)but-3-en-2-one, 4-(2,3,6-Trimethylphenyl) butan-2-one, 4-(2,3,6-Trimethylphenyl) butan-2-ol, isomere Megastigma-4,7,9-trien-3-one und Megastigma-4,6,8-trien-3-one zusammen mit mehreren anderen unidentifizierten C₁₃-Norisoprenoiden, wenn C₁₈-RP-Isolate von Mosten mit Säure hydrolysiert wurden (Williams et al. 1982a).

In Tabak und anderen Pflanzen konnte TDN aus Carotinoiden über die entsprechenden Zwischenprodukte α-Ionon: 4-(2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexen-1-yl) 3-buten-2-one und β-Ionon: 4-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one durch sequentielle Oxidation, Neuordnung, und Reduktion hergeleitet werden. In wässrigen organischen Säuren zyklisiert 5-keto-α-Ionon zu 4,4,7-Trimethyl-3,4-dihydro-2(1H)-Naphthalinon, das

bei Reduktion und Dehydration ein natürliches Produkt von Tabak, TDN ergab (Davis et al. 1976). Die mögliche TDN-Biogenese aus α -Ionon, wie in Tabak, erfolgt durch Oxidation und säurekatalysierte Neuordnung. Deshalb sind Carotinoide oder verwandte Materialien als wahrscheinliche Quellen von TDN und Vitispiran in Wein anzusehen (Davis et al. 1976). Winterhalter et al. (1990a) zeigten, dass die abgetrennte glycosidische Fraktion, die hauptsächlich von intermediärer Polarität war teilweise in der stationären Phase blieb, fähig war TDN zu erzeugen. Ein hydroxyliertes TDN (3-hydroxy-1,1,6-Trimethyl-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin) aus isolierten Glycosiden purpuroter Passionsfrüchte und -säfte betrachtete Winterhalter (1990) als Precursor von TDN.

Um das Precursor-Vorkommen des „off-flavor“ zu identifizieren, die durch die Verbindung TDN verursacht wird, trennten Roscher und Winterhalter (1993) isolierte glycosidische Fraktionen von Rieslingblättern durch angereichertes XAD-2 und eluierten mittels Multi Layer Coil Countercurrent Chromatography (MLCCC) mit Methanol. Rieslingblätter sind ein geeignetes Material für die Isolation von TDN erzeugenden Glycoconjugaten. 3,4-dihydroxy-7,8-dihydro- β -Ionon-3-O- β -D-Glucopyranoside wurde als ein bedeutender TDN-Precursor identifiziert.

Die Herstellung von potenziell flüchtigem TDN konnte durch mehrere Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, die verwandten Medien oder eine Kombination verschiedener Faktoren auf die TDN-Entwicklung aus seinem Precursor beeinflusst werden (Williams et al. 1982a, Marais 1992). Simpson und Miller (1983) stellten den Einfluss des pH-Wertes und der Wärmebehandlung auf die Bildung von TDN und Vitispiran bei Mosten der Sorte Riesling sowie bei Sultaninen fest. Höhere TDN-Konzentrationen konnten bei erhitzten Mosten mit niedrigerem pH-Wert produziert werden. Weiterhin stellten sie auch fest, dass die TDN-Konzentration in den Weinen auch von den Rebsorten und dem pH abhängig sind. Dies weist darauf hin, dass im Wein der Rebsorte Riesling bei langer Kellerlagerung am sichersten aromawirksame Mengen von TDN zu erwarten sind.

Relativ hohe Konzentrationen von TDN und Vitispiran im schnell-gealterten Wein zeigten, dass diese Verbindungen beim Erhitzen unter oxidativen und nicht-oxidativen Bedingungen gebildet wurden. Diese Verbindungen sind auch Hauptbestandteile flaschen-gealterter Rieslingweine (Simpson 1978a). Eine Korrelation zwischen Unterschieden in den Weinzusammensetzungen und dem Alter der Weine war möglich (Simpson und Miller 1983). TDN konnte sich in höheren Konzentrationen in Weinen aus Weinanbaugebiet mit

genauen klimatischen Merkmalen entwickeln (Marais et al. 1992c). Nach Bureau et al. (2000) wurden TDN-Precursor Niveaus, wie C₁₃-Norisoprenoid-Glycosid, in sonnenungeschützten in fast zweimal höher Konzentration als in beschatteten Weintrauben bei ähnlichen Bedingungen gefunden. Auf gleichem Wege verursachte Schattieren bei den Reben eine quantitative Inhaltabnahme der C₁₃-Norisoprenoidglycoside. Die Weintrauben-Umgebung (Mikroklima) beeinflusst die Beerenzusammensetzung mehr, als die Reben-Umgebung.

4.2 TDN-Bildung im Modellversuch

Wie viele Autoren berichteten, entsteht TDN unter normalen Bedingungen bei der Weinbereitung aus mehreren Precursoren. Einer davon ist ein Carotinoid, welches öfter als bedeutendster Precursor angesprochen wurde. Bei der TDN-Bildung aus Carotinoiden sind mehrere Zwischenprodukt der TDN-Bildung bekannt. Carotinoide sind instabile Verbindungen, sie werden zu einer Vielfalt von Produkten in Gegenwart von Sauerstoff und Licht sowie bei hohem Temperatur abgebaut (Marais 1992). Hohler et al. (1988) berichteten über die Bildung einer kleinen Menge von TDN aus β -Carotin in einer N,N-Dimethylformamide Lösung unter photooxidativem Zustand. Bei einem Versuch von Marais (1992) wurden verschiedene Produkte aus Lutein und β -Carotin in H₂SO₄ und Ethanol/Weinsäure Medien gebildet, aber TDN, das für den Kerosin ähnlichen Geschmack von alten Rieslingweinen verantwortlich ist, konnte nur aus Lutein hergeleitet werden. Diese Abbauprodukte wurden in der Tabelle 1 zusammengefasst (Marais 1992).

Tabelle 1: Hauptabbauprodukte von Lutein und β -Carotin bei thermischem Abbau

Nr.	Lutein	β -Carotin
1	1,1,6-Trimethyl-1,2-Dihydronaphthalin (TDN)	6-Methyl-2-Heptanon
2	2,3-Dehydro- α -Ionon (2 Isomere)	6-Methyl-5-Hepten-2-on
3	3,4-Dehydro- β -Ionon	β -Cyclocitral
4	3-keto- α -Ionon	β -Ionon
5	3-hydroxy- β -Ionon	5,6-epoxy- β -Ionon Dihydroactinidiolid 4-keto- β -Ionon

TDN gab es auch aus 1-(1,2,2-Trimethylcyclopent-1-yl)-2-penten-1,4-dion, 4-(5,5-dimethyl-2-acetyl-1-cyclopenten-1-yl)-2-butanon, 4-(1,3,3-Trimethyl-2-cyclohexanon-1-yl)-3-buten-2-one, 4-(2,3,6-Trimethylphenyl)-2-butanon und 6,6-dimethyl-2,5,10-undecatrien bei Neuordnung von β -Ionon-epoxid in wässriger Ameisensäure. Die Bildung von TDN aus β -Ionon-epoxide kann formell als eine Doppel-Dehydratation mit begleitender Zyklisierung betrachtet werden (Stevens et al. 1975).

Die schematischen Reaktionsprozesse von β -Ionon-epoxide zu TDN wurden von Stevens et al. (1975) wie in der Abb. 9 beschrieben.

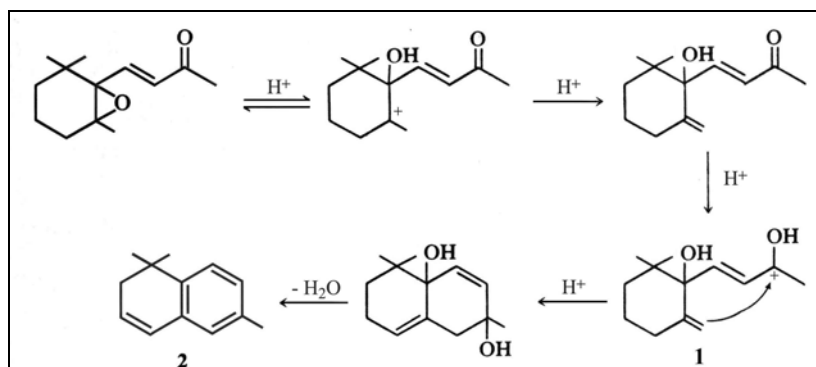


Abb. 9: Die schematischen Reaktionsprozesse von β -Ionon-epoxid zu 1,2-Dihydro-1,1,6-Trimethylnaphthalin

Die mögliche TDN-Biogenese von α -Ionon in Tabak durch Oxidation und säurekatalysierte Neuordnung ist von Davis et al. (1976) beschrieben worden. Durch Behandlung von α -Ionon mit N-Bromosuccinimid und folgender Dehydrobrominierung mit N,N-Diethylanilin wurde TDN von Stoltz et al. (1970) synthetisiert. Kemp et al. (1971) synthetisierten Ionen durch Behandlung von α -Ionon mit I_2 . Dabei wurde Ionen durch GLC gereinigt und die bedeutenden Massen GC-MS m/e-Peaks mit der richtigen Intensität für jede Masse nachgewiesen. Ionen konnte durch thermale Behandlung von β -Carotin wie Abb. 10 (Day und Erdmann 1963) und die mögliche Mechanismereaktion wie Abb. 11 gebildet werden (Ohloff 1972).

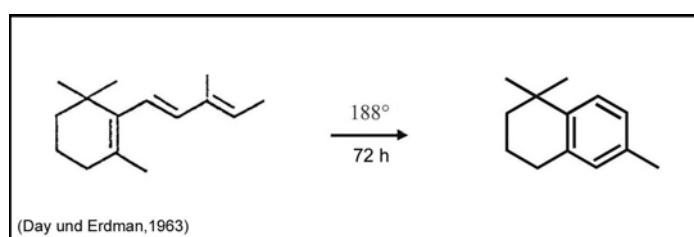


Abb. 10: Die Bildung von Ionen durch thermalen β -Carotinabbau

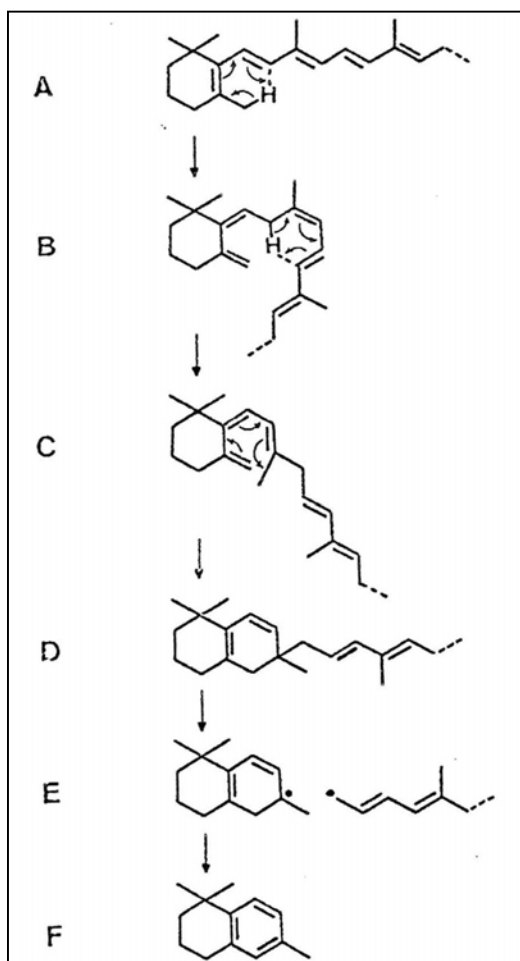


Abb. 11: Mechanismus der thermalen Ionen-Bildung aus β -Carotin durch eine Reihenfolge von sigmatropischen Wasserstoffänderungen ($A \rightarrow B \rightarrow C$), eine elektrozyklische-Neuordnung ($C \rightarrow D$) und homolytische Kern Reaktion ($E \rightarrow F$) (Ohloff 1972)

Di Stefano (1985) betrachtete 4-hydroxy-1,1,6-Trimethyl-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin, das er in alten Rieslingwein identifizierte, als Zwischenprodukt der TDN-Biosynthese oder als ein Hydroxylierungsprodukt von TDN. Während 3-hydroxy-1,1,6-Trimethyl-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin, das in Passionsfrüchten gefunden wurde, auch als Precursor von TDN betrachtet werden könnte (Winterhalter 1990).

Es wurde festgestellt, dass die Retenzionszeit von 3,8,8-Trimethyl-7,8-Dihydronaphthalin (Dehydroionen) dem Dehydrogenationsprodukt von Ionen kürzerer als war als die von den vier TTN (3,8,8-Trimethyl-Tetrahydronaphthalin) Isomeren der gesättigten Komponente (Liebich et al. 1970). Durch die Massenspektren konnten beide gut isoliert bestimmt werden (Simpson 1979). Unter den Aromakomponenten von Jamaika Rum sind vier TTN-Isomere mit den gleichen Massen-Spektren, außer kleinen Unterschieden in den Massenintensitäten. Zwei von diesen Kohlenwasserstoffen wurden als TTN identifiziert. Ein 3,8,8-Trimethyl-Dihydronaphthalin (TDN) mit MW 172, sowie zwei weitere TTN-Isomere wurden in der letzten Destillationsfraktion gefunden (Liebich et al. 1970).

Nach F. Tiemann (zit. in Liebich et al. 1970) wurde Ionen (I) durch eine Kondensationsreaktion von α -Ionen unter Verwendung von Wasserstoff-Iodid und amorphem Phosphor synthetisiert. Mit einer geringen Dehydrogenierung von Ionen zu Dehydroionen (II) (Abb. 12). Das synthetische Produkt enthielt um 10% der dehydrogenierten Substanz. Massenspektrum und Retentionszeit des synthetischen Dehydroionen sind gleich mit der von TDN.

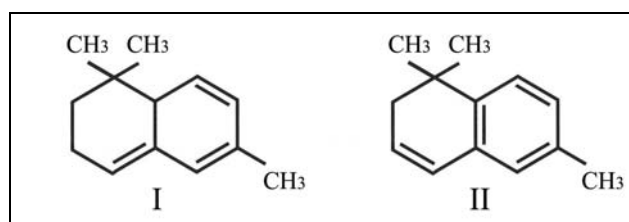
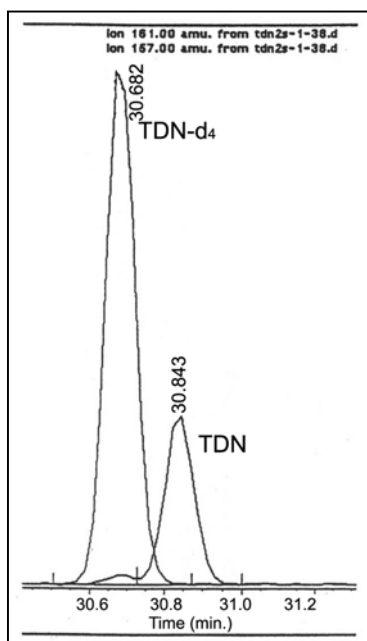


Abb. 12: Strukturen von Ionen (I) und Dehydroionen (II) nach Liebich et al. (1970)

Die Massenspektren-Fragmentation von TDN wird durch den Verlust von zwei Methylgruppen an Position 8 charakterisiert, (Peaks bei m/e 157 und m/e 142, metastabiler-Peak bei 129) (Liebich et al. 1970).

Ein Heterosid (Glycosid), das aus Rieslingtrauben durch Retention auf Amberlite XAD-2 Harz isoliert wurde, konnte durch Säurehydrolyse TDN produzieren. Es konnte mit NMR-spektroskopischem Verfahren identifiziert werden (Versini et al. 1996). Nach geeigneter Isolation, Reinigung und Fraktionierung des konjugierten Aroma-Precursors konnten



Versini et al. (1996) die chemische Struktur des glycosidischen TDN-Precursors in Rieslingtraubenprodukten charakterisieren. Dieser Precursor produzierte in D_2O bei verschiedenen sauren pH-Werten nur ein TDN- d_4 Isomer.

Abb. 13: Teil eines GC-SIM/MS Profils mit TDN ($m/z = 157$) und TDN- d_4 ($m/z = 161$) Peaks.

Auf der Basis des MS-Spektrums und der Fragmentation wird die 1,1-dimethyl-6-methyl- d_3 -1,2-dihydro-7-Deuteronaphthalin Struktur, wie in den Abb. 14 und 15 dargestellt (Versini et al. 1996).

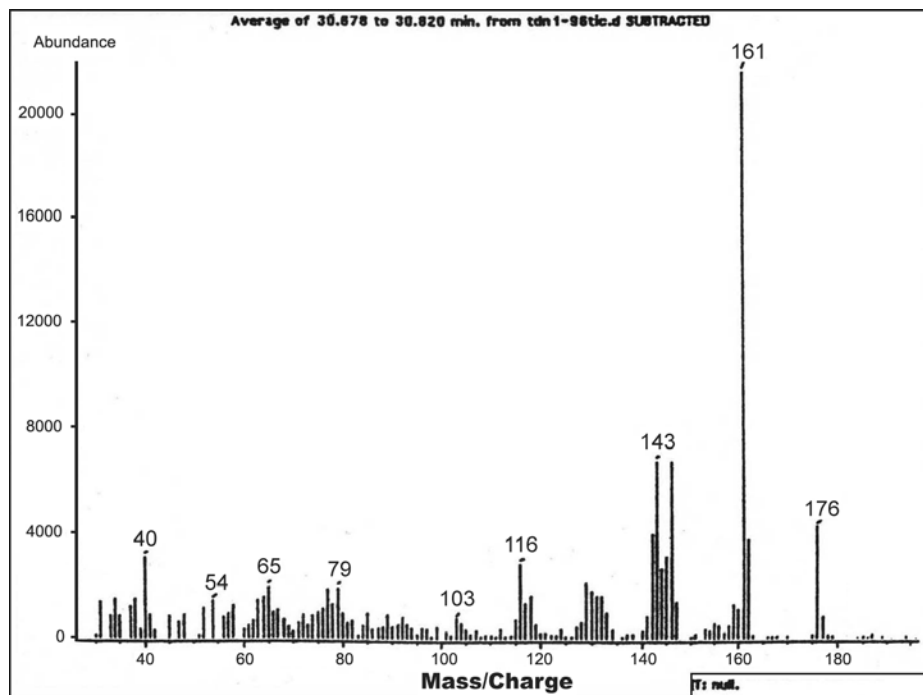


Abb. 14: MS-Spektrum von TDN- d_4

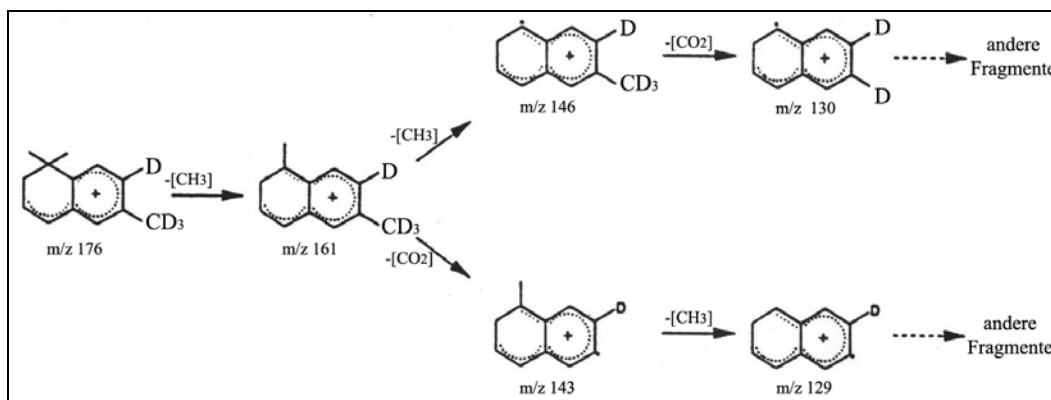


Abb. 15: Zerfallsvorschlag für das MS-Spektrum in Abb. 13

Die Kinetik der TDN und TDN- d_4 Bildung in D_2O (bei pH 2 und $50^\circ C$) aus rohen Heterosiden (Glycosiden) zweier verschieden alter Rieslingweine unterstützt die Existenzhypothese von wenigstens zwei TDN-Precursoren in Wein. Der Precursor, der vorgeschlagen wurde, produzierte TDN- d_4 , während der Precursor, der durch Winterhalter (1991) identifiziert wurde, wahrscheinlich nur TDN produzierte. Die kinetischen Mechanismen werden in Abb. 16 gezeigt (Versini et al. 1996 und dort zit. Literatur).

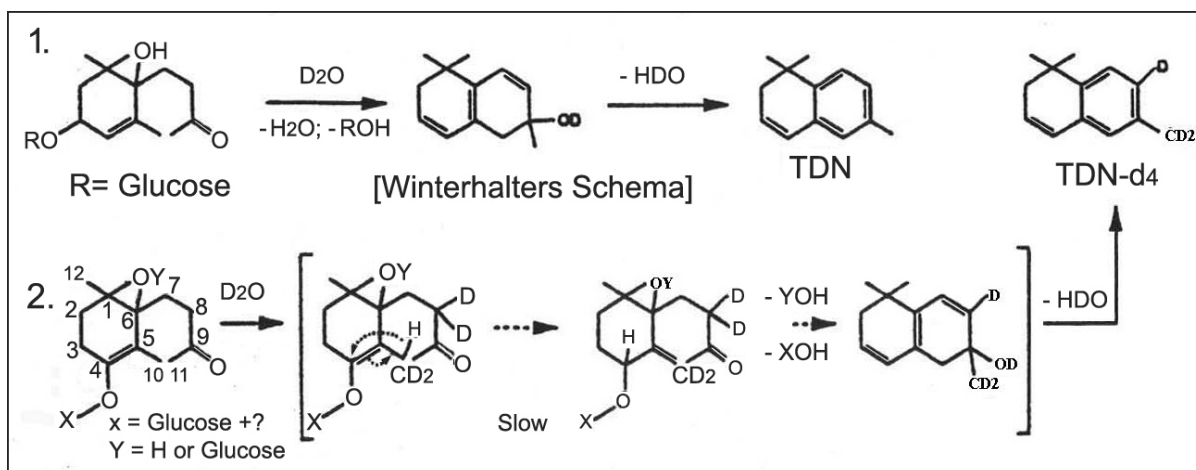


Abb. 16: Vorgeschlagener kinetischer Mechanismus für die TDN-Bildung aus den zwei möglichen Precursoren

V. Carotinoide

5.1 Carotinoide und Carotinoidbegriffe

Die Rolle von Carotinoiden ist seit langem bekannt. Nicht nur bei den Pflanzen und den Tieren, auch bei den Menschen, spielen sie eine wichtige Rolle. Sie kommen als Farbstoffe in den Pflanzen vor, sind wichtige Bestandteile der Nahrung, mit der sie als Precursor für wichtige Wirkstoffe in menschlichen und tierischen Körper aufgenommen werden. Bei der Aromabildung des Weines, insbesondere bei der Alterung, betrachteten viele Autoren Carotinoide als wichtige Ausgangsprodukte. Die dann daraus gebildeten Aromastoffe können als Abbauprodukte von Carotinoiden angesehen werden.

Carotinoide sind als gelbe, orangefarbene- und rote Pigmente anwesend. Viele essbare Früchte und Gemüse sind reich an Carotinoiden (Gebhardt et al. 1999, Oliver et al. 1998). Carotinoidextrakte von Früchten werden künstlich vielen verschiedenen Nahrungsmitteln als natürliche Farbstoffe zugesetzt (Philip 1975, Ibanez et al. 1998). Das Interesse für Carotinoide hat während des vergangenen Jahrzehntes stark zugenommen, obwohl das Studium dieser Pflanzenpigmente schon zu Anfang des 19ten Jahrhunderts begonnen wurde (Pelletier und Caventon 1817 zit. in Darko et al. 2000). Mittlerweile sind bei den Carotinoiden schon mehr als 600 Verbindungen identifiziert worden (Kleber und Schlee 1988, Dachtler et al. 1998, Gebhardt et al. 1999).

Carotinoide sind in grünen Pflanzen immer mit Chlorophyll assoziiert und verdeckt (Belitz und Grosch 1987). Zahlreiche Carotinoide sind als Nahrungsmittelfarbstoffe (Margarine, Butter, Käse, Fruchtsäfte) in der Kosmetik und als Futtermittelzusatz (EG-Nr. 160 a–f und 161 a–g) wegen ihrer physiologische Unbedenklichkeit im Gebrauch. Weiterhin können viele Riechstoffe als Abbauprodukt von Carotinoiden angesehen werden (Goodwin 1986, Falbe und Regitz 1995). Die Verwendung natürlicher Farbstoffe in formulierter Nahrung hat tendenziell zugenommen (Pesek und Warthesen 1988). Diese gelben bis orangefarbenen Pigmente u.a. β -Carotin und β -Apo-8'-Carotinal werden in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln häufig benutzt (Kläüi und Bauernfeind 1981).

Carotinoide sind eine der größten Gruppen natürlicher Pigmente, die in Pflanzen und Tieren weit verbreitet vorkommen. Wegen ihrer weiten Verbreitung im Pflanzenreich sind Carotinoide besonders intensiv erforscht worden (Mouilly et al. 1999). Die wichtigsten Quellen von Carotinoiden für Menschen sind Früchte und Gemüse (Oliver et al. 1998). In

Früchten sind Carotinoide weit verbreitet und tragen bei einer Reihe von Obstarten entscheidend zur Farbe bei (Belitz und Grosch 1987).

Obwohl Carotinoide in Mikroorganismen, Insekten, Vögeln, Fischen und anderen Tieren gefunden werden, sind Pflanzengewebe die ausgiebigste Quelle. Nur Pflanzen und Mikroorganismen können Carotinoide erzeugen (Murkovic et al. 2000). Carotinoide kommen in höheren Pflanzen nur mit ψ , β , ϵ und χ -Endgruppen in Laubblättern, Früchten, Sprossen, Wurzeln, Staubblättern, Pollen und Samen vor. Sie befinden sich dort in den Plastiden (Chloroplasten und Chromoplasten). In der Thylakoidmembran kommen nur β -Carotin, Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin vor. Ihre Farbe tritt im Herbstlaub hervor, wenn das Chlorophyll verschwindet, und die Chloroplasten in Chromoplasten umgewandelt werden. Ähnliches geschieht bei der Fruchtreife. Unreife, grüne Früchte besitzen dieselben Pigmente wie Laubblätter (Falbe und Regitz 1995).

Zusätzlich zu β -Carotin, Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin, die immer in grünen Blättern gefunden werden, kommen auch Phytofluen, Phytoen, α -Carotin, Cryptoxanthin, Zeaxanthin, Flavoxanthin, Antheraxanthin sowie Lycopin vor (Enzell et al. 1977).

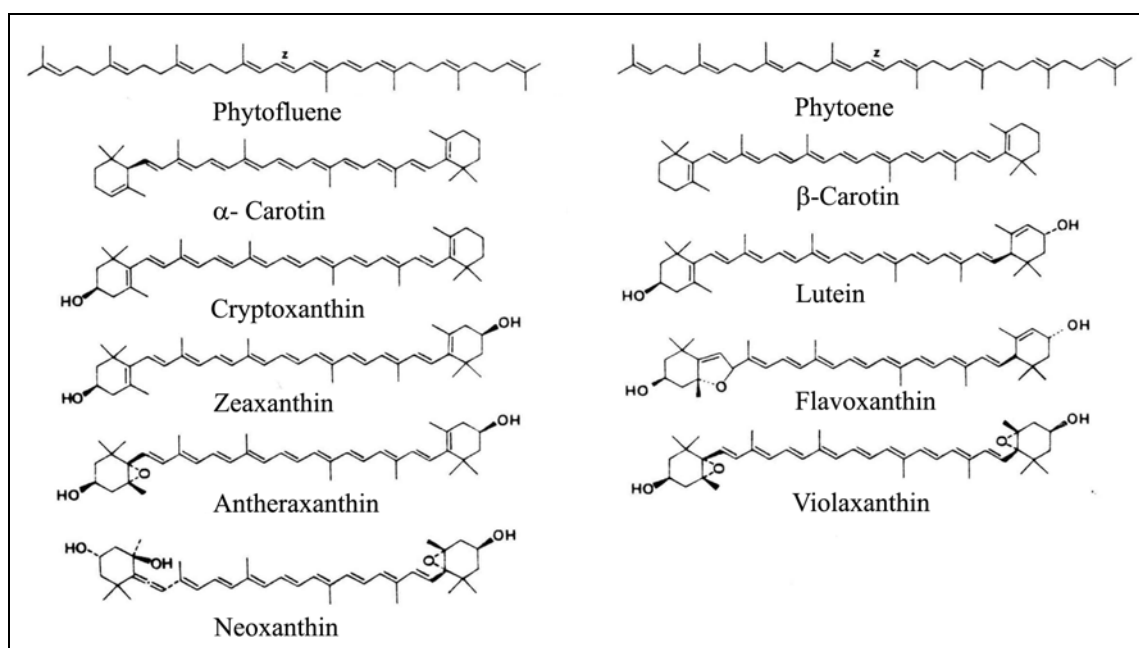


Abb. 17: Die Strukturen von Carotinoiden

Die Carotinoidgehalte der Früchte und Gemüse variieren sehr in der Menge, es hängt von den Arten, den Sorten, dem Jahrgang und dem Reifegrad ab. In Weintrauben verändern sie sich mit der Sorte und der Beerenreife (Oliver et al. 1998, Williams et al. 1992).

Der Carotingehalt in genussreifen Früchten schwankt und nimmt während der Fruchtentwicklung ab. Mit einem deutlichen Rückgang nach der Ernte. Er kann bezogen auf die Frischmasse unter 1 ppm aber auch über 35 ppm, liegen. Bei Weinbeeren sind es 1,8 ppm der Frischmasse (Friedrich et al. 1986, Williams et al. 1992). Der Gehalt an Carotinoiden ist bei Traubenbeeren aus Lutein, Zeaxanthin, neben Phytoen, Phytofluen, Lycopin, α - und β -Carotin, Violaxanthin und Luteoxanthin zusammengesetzt (Belitz und Grosch 1987).

Um die Rolle Carotinoide als Aromaprecursor und TDN als eine wichtige C_{13} -Aromaverbindungen aus dem Carotinoidabbau besser zu beobachten, ist es wichtig sich mit möglichen Abbauprodukten und das Thema der Biosynthese von Carotinoiden zu befassen.

5.1.1 Die allgemeine Rolle von Carotinoiden

Carotinoide als natürliche Pigmente sind nicht nur als Farbstoffe, sondern vor allem als Vitamin-A Precursor medizinisch von Bedeutung. Vor allem ist ihre antioxidative Wirkung von Bedeutung. Sie spielen aber auch andere wichtige Rollen für die Gesundheit des Menschen. Nach Berichten klinischer Studien sind Carotinoide wichtig in der Vorbeugung gegen mehrere Krankheiten, wie Verminderung der Herzkrankheiten (Craft und Soares 1992), Atherosklerosis (Gerster 1991), des Risikos von kardiovaskulärer Krankheit (Bell et al. 1997) und des Krebses (Kozuki et al. 2000, Gebhardt et al. 1999, Bell et al. 1997, Pesek und Warthesen 1988, Lambert et al. 1985). Carotinoide sollen besonders wirksam gegen Haut und Lungenkrebs sein (Wu et al. 1999). Auch soll es eine mögliche Verbindung von Carotinoiden mit dem Prozeß und dem Fortschritt der Karzinomentwicklung geben (Pesek und Warthesen 1988).

Eine Hypothesen behauptet, dass β -Carotin zusätzlich zu seiner Rolle in der Nahrung, auch an nicht Vitamin-A gebundenen Prozessen gegen Krebs beteiligt ist (Lambert et al. 1985). Weitere mögliche Rollen werden in der Behandlung menschlicher Krankheiten gesehen, wie als Geschwür-Schutzmittel. Sogar als Leber-Schutzmittel sind Carotinoide vorgeschlagen worden (Schmitz et al. 1994). Die Beschäftigung mit Carotinoiden schließt daher nicht nur die Lebensmittel- und Ernährungswissenschaft ein, sondern auch die Immunologie, die Epidemiologie, die allgemeine Gesundheit, die Strahlenbiologie und die Biochemie (Wu et al. 1999).

Während der vergangenen Jahre hat das Interesse an Carotinoiden, neben der Bedeutung als Nahrungsmittel Komponenten, hauptsächlich wegen ihrer antioxidativen Eigenschaften

stark zugenommen. Also wegen ihrer Eigenschaft als Antioxidantien und der Fähigkeit freie Radikale abzufangen (Wu et al. 1999). Diese Wirkung wird gegen bestimmte Krebserkrankungen genutzt (Falbe und Regitz 1995). Die biologische Effektivität insbesondere von Lutein und Zeaxanthin, die Bestandteile der Netzhaut sind, sind verantwortlich für Schärfe und detailliertes Sehvermögen. Als Antioxidantien können sie die Netzhaut vor Überbelichtung durch kurzwelliges Licht schützen. Die altersbedingte Macular-Degeneration in der Netzhaut wird durch die Konzentration dieser zwei Carotinoide entscheidend beeinflusst. Diese werden durch Aufnahme von Nahrung, die reich an bestimmten Carotinoiden ist, dem menschlichen Stoffwechsel zugeführt (Dachtler et al. 1998).

Eine andere Rolle der Carotinoide ist ihre Bedeutung als Vitamin-A Precursor. Wichtig ist ihre Funktion als Provitamin für den tierischen und menschlichen Organismus. So sind Carotinoide Vorstufen des Retinals und haben damit eine Bedeutung für den Sehprozess (Falbe und Regitz 1995, Careri et al. 1999). Die Bedeutung von Provitamin-A in der Vorbeugung von Xerophthalmia ist erkennbar (WHO, WHO/UNICEF/Hellen Keller Int. /IVAGG meeting, Techn. Report Serie 672, 1982 in Oliver et al. 1998). Eine mäßige tägliche Aufnahme grüner Blattgemüse würde zu einer totalen Ausrottung des Vorkommens von Hypovitaminosis-A, und seiner Begleiterscheinung Nährblindheit (Xerophthalmia) führen (Lambert et al. 1985).

5.1.2 Carotinoide als Vitamin-A Precursor

Provitamin-A wurde erstmals von Wackenroder 1826 aus Möhren isoliert. Willstätter ermittelte 1907 die Summenformel und Karrer um 1930 die Konstitutionsformel. Die Synthese wurde um 1950 von mehreren Forschern publiziert (Falbe und Regitz 1995).

Früchte und Gemüse sind die bedeutendsten Quellen von Provitamin-A Carotinoiden (Lambert et al. 1985). Alles Vitamin-A in Blut und Gewebe von Mensch und Tier wird direkt oder indirekt von eingenommenen Carotinoiden hergeleitet (Gebhardt et al. 1999). Ungefähr die Hälfte des vom Menschen eingenommenen Vitamins-A wird von roten, gelben und grünen Früchten und Gemüsen hergeleitet, die α -, β - und γ -Carotin enthalten (Hsieh und Karel 1983, Sander et al. 2000).

α - und β -Carotin sind die überwiegenden Vitamin-A Precursor (Bauernfeind 1972). In den meisten Gemüsen und Früchten, sind beide Carotinoide für bis zu 90% der Provitamin-A Aktivität verantwortlich z. B. in Zitrusfrüchten, in denen β -Cryptoxanthin der

vorherrschende Vitamin-A Precursor ist. γ -Carotin trägt nur zu einem geringen Prozentsatz zum gesamten Provitamin-A Gehalt bei (Lambert et al. 1985). Der Wert der Carotinoide kommt hauptsächlich vom Provitamin-A u.a. β -Carotin, β -Cryptoxanthin, α -Carotin, γ -Carotin. Im Körper können sie zu Retinol umgebaut werden (Isler 1971, Bauernfeind 1972, Gebhardt et al. 1999, Lambert et al. 1985). Lambert et al. (1985) berichteten von vier bedeutenden Carotinoiden, β -Carotin, α -Carotin, β -Cryptoxanthin, und γ -Carotin als Vitamin-A Precursor. Die Strukturen sind in Abb. 18 dargestellt.

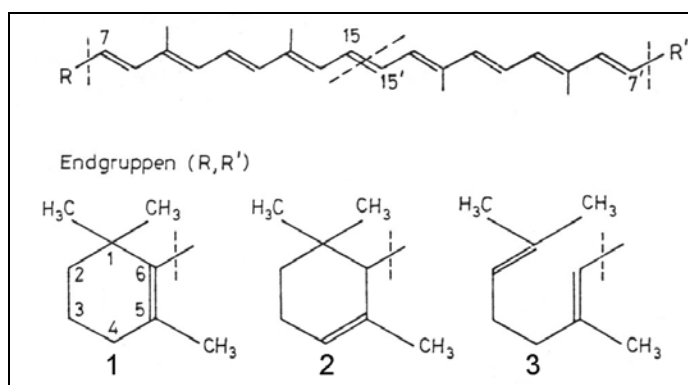


Abb. 18: Grundstrukturen einiger wichtiger Carotinoide der Früchte
1. β -Jononring, 2. α -Jononring, 3. Offene Polyenkette.

Die meisten Carotinoide bzw. Carotine, die in den Früchten und Gemüsen natürlich anwesend sind, kommen vorwiegend in der stabileren *all-trans* Form vor (Zechmeister 1962 zit. in Sander et al. 2000) obwohl *cis*-Isomere in Pflanzen entdeckt worden sind (Lambert et al. 1985). *Cis*-Isomere können während thermischer Verarbeitung entstehen. Retinol (Vitamin-A) wird im Stoffwechsel aus bestimmten Carotinoid-Isomeren gebildet (Sander et al. 2000). Die Effizienz dieser Umwandlung hängt von der Form des Carotinoids ab. Die Umwandlung in Provitamin-A von *cis*-Isomeren beträgt nur 50%, verglichen mit den *trans*-Isomeren (Zechmeister 1962 zit. in Sander et al. 2000).

Es gibt viele Carotinoide, aus denen kein Provitamin-A gebildet werden kann. Dazu gehören: Lycopin, Lutein, und Zeaxanthin. Die maximale Provitamin-A Aktivität zeigte β -Carotin, weil beide Seiten seines Moleküls zu Retinal umgebaut werden können (Lambert et al. 1985). In der Natur kommt überwiegend β -Carotin vor. Es ist das eigentliche Provitamin-A und das wichtigste Carotinisomere, da es im menschlichen und tierischen Organismus enzymatisch in zwei Moleküle Retinal (vgl. Vitamin-A) gespalten wird (Falbe und Regitz 1995). Durch die Aktivität des Enzyms 15,15'-Oxygenase wird β -Carotin in

zwei gleiche Fragmente, nämlich Vitamin-A, wie in der Abb. 19 dargestellt, gespalten (Ohloff 1972).

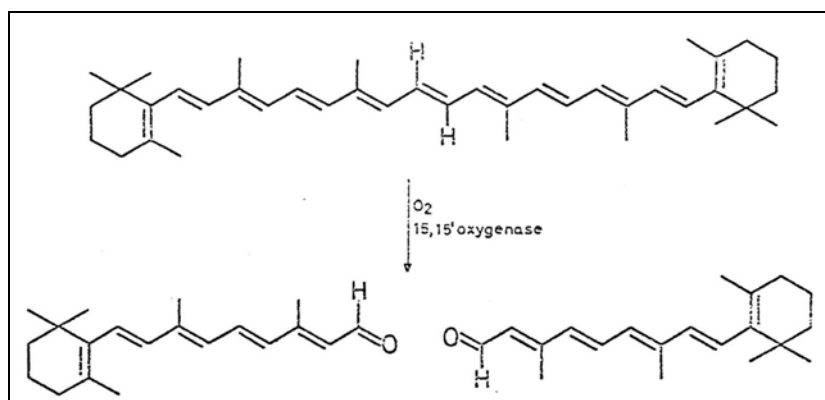


Abb. 19: Spaltung von β -Carotin zu 2 Molekülen Vitamin-A.

Nur die Carotinoide, die einen β -Iononring besitzen, sind als Provitamin-A wirksam. (Friedrich et al. 1986), wohingegen die Derivate ohne ein β -Ende, wie Lycopin, biologisch inaktiv sind (Zakaria und Simpson 1979, Lambert et al. 1985). Carotinoide, die nur ein β -Ende enthalten z. B. α -Carotin, ψ -Carotin und β -Cryptoxanthin besitzen auch nur 50% der theoretischen Provitamin-A Aktivität von β -Carotin (Lambert et al. 1985). Das β -Apo-8'-Carotinal (C_{30})(*trans*) sowie β -Apo-8'-Carotinsäure-(C_{30})-ethylester(*trans*), die auch den β -Iononring haben, sind ebenfalls Vitamin-A wirksam (Täufel et al. 1993).

5.1.3 Die Funktion bei den Pflanzen

Carotinoide sind eine der größten Gruppe natürlicher Pigmente und in den photosynthetische Geweben grüner Pflanzen sind weitverbreitet. Sie werden in den Plastiden in den Thylakoiden gefunden und sind Bestandteile der Chromoplasten. In Blütenblättern und Früchten dienen sie als Lockfarben für Tiere (Oliver et al. 1998, Bureau et al. 1998).

Im pflanzlichen Organismus sind Carotinoide außer als Lichtfilter auch an der Energieübertragung bei der Photosynthese beteiligt. Diese natürlichen Pigmente dienen beim Auffangen des Lichtes als ein Schutz gegen photooxidative Prozesse. Sie schützen gegen schädliche Strahlung und sind wahrscheinlich am Abfangen des Singulett-Sauerstoffs beteiligt (Lambert et al. 1985, Falbe und Regitz 1995, Oliver et al. 1998). Bei den höheren Pflanzen haben Carotinoide zwei Hauptfunktionen im Prozess der Photosynthese, Lichtschutz und Lichtsammlung (Bureau et al. 1998). Carotinoide schützen als photosynthetische Apparate die das Chlorophyll *in vivo* vor vorzeitiger Photooxidation

durch komplexe physikalische biochemische Reaktionen (Krinsky 1979, Büch und Berger 1998).

5.1.4 Physiologie der Carotinoide bei Früchten

Früchte enthalten Chlorophyllkomponenten a und b, sowie Carotinfarbstoffe in allen Gewebeschichten. Ihre Menge hängt von dem jeweiligen Entwicklungsstadium ab. Mit zunehmender Entwicklung und Reife vollzieht sich bei ihnen ein Farbumschlag. Die Ursachen hierfür liegen im Abbau der grünen Farbkomponenten und dem Hervortreten, sowie der Neubildung von gelben und roten Farbstoffen. An der Herausbildung des gelben Farbtones sind vor allem die Carotinoide beteiligt. Carotinoide, wie Chlorophylle sind nur in den Plastiden enthalten. Mit zunehmender Alterung der Gewebe wird in den grünen Chloroplasten das Chlorophyll abgebaut. Sie wandeln sich in die gelb bis rot gefärbten Chromoplasten um, bei denen nur noch die Carotinoide als farbgebende Komponenten enthalten sind. Bei Beginn des Chlorophyllabbaues erfolgt auch gleichzeitig eine Verringerung im Carotinoidgehalt. Im Unterschied zu den Blättern, sind die Früchte während der Fruchtreife und Alterung befähigt in den aus den Chloroplasten entstehenden Chromoplasten Carotine, insbesondere Xanthophylle, zu synthetisieren. Früchte, die am Baum reifen, bilden bedeutend geringere Mengen an Carotinoiden neu, als geerntete Früchte während des Nachreifeprozesses (Friedrich et al. 1986).

In Traubenbeeren, auch in grünen Beeren, sind reichlich β -Carotin und einige Xanthophylle u.a Lutein vorhanden. Die Menge nimmt während der Reifung ab. Da mit zunehmender Fruchtreife die Carotinoide in veresterter Form vorliegen, entsteht eine Vielzahl möglicher Carotinoide. Wichtigste Vertreter der Xanthophylle in den Früchten sind u.a. Lutein, Zeaxanthin (Diol), Violaxanthin (Diepoxid-Diol) Neoxanthin (Diepoxid-Triol) und Cryptoxanthin (Monol). Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Carotinoide ist in den Fruchtentwicklungsphasen nicht gleich. Vor allem die in den grünen Chloroplasten konzentriert vorkommenden Carotinoide, β -Carotin und Lutein, werden mit zunehmender Fruchtreife stärker abgebaut. In reifen Früchten setzen sich deshalb die Carotinoide vorwiegend aus Diolen und Polyolen zusammen. Beeren enthalten: Kohlenwasserstoff 8– 14%, Monole 1,5–4%, Diole und Polyole 84–87% (nach Galler und McKinne 1965, Green et al. 1971) und Weinbeeren enthalten bei Genußreife über 30% als Kohlenwasserstoff-Carotinoide. Sie sind reich an β -Carotin (Friedrich et al. 1986).

Mehrere Faktoren können den Carotinoidgehalt beeinflussen. Der absolute Gehalt an Carotin hängt ferner von der Fruchtgröße ab. Der Gehalt an Chlorophyll, das parallel mit der späteren Änderung der Carotinoide einhergeht ist entscheidend abhängig von den klimatischen Bedingungen, die im Zusammenhang mit der Assimilationsleistung und der Nährstoffaufnahme wirksam werden. Andere beeinflussende Faktoren sind auch Sonnenschein und Niederschlagsmengen, die auf die Stoffwechsel-Aktivität und den Reifeverlauf Einfluss nehmen (Friedrich et al. 1986).

Einen Einfluss hat auch das Blatt-Frucht Verhältnis. Nach Ausdünnen der Früchte bei übermäßigem Behang enthalten diese dann wesentlich mehr Chlorophylle und Carotinoide. Positiv wirken auch ein Sommerschnitt, zunehmendes Baumalter, erhöhtes Stickstoffangebot und eine zusätzliche Harnstoffspritzung im Sommer (Lenz und Grass 1979 zit. in Friedrich et al. 1986). Die α - und β -Carotin Konzentrationen von vielen frischen Früchten und Gemüsen sind auch von der Jahreszeit, den Sorten und der Lagerungszeit abhängig (Hsieh und Karel 1983).

Ist die Chlorophyllmenge in den Früchten auf ein bestimmtes, bei den einzelnen Sorten unterschiedliches Niveau herabgesunken, so erfolgt kurz vor oder mit Beginn des klimakterischen Atmungsanstieges eine Neusynthese an Carotinoiden. Ihre Zusammensetzung weicht vom Carotinoidenspektrum in den Chloroplasten ab (Friedrich et al. 1986).

5.2 Struktur und Eigenschaften von Carotinoiden

5.2.1 Struktur

Carotinoide sind in Wasser unlösliche Polyene-Verbindungen, die in vielen Formen im Pflanzenreich gefunden wurden. Wegen ihrer Löslichkeit in Fetten und Fettlösungsmitteln werden Carotinoide, wie Chlorophylle, als Lipochrome bezeichnet. Im Prinzip leiten sich Carotinoide vom Isopren ab und gehören chemisch zu den Tetraterpenen, die Verbindungen mit 40 Kohlenstoffatomen sind. Strukturell gehören Carotinoide, so wie viele andere Naturstoffe, zu den Isoprenoiden. Ihre Grundstruktur wird aus acht Isopren-Einheiten zusammengesetzt (Friedrich et al. 1986, Falbe und Regitz 1995, Bell et al. 1997, Mouilly et al. 1999).

Charakteristisch für die Stoffgruppe der Carotinoide sind zahlreiche konjugierte Doppelbindungen. Carotinoide enthalten geradkettige und zyklische Gruppen, Cyclohexane und Cyclopentane. Die Kombination dieser Endgruppen mit zusätzlichen sauerstoffhaltigen

funktionalen Gruppen und Veränderungen im Wasserstoffgehalt ermöglichen die Vielzahl der Carotinoidstrukturen (Friedrich et al. 1986, Careri et al. 1999, Oliver und Palou 2000). Ihre Farbigkeit (zumeist gelb, orange oder rot) beruht auf ihrer Polyen Struktur mit (meist) 11–12 konjugierten Doppelbindungen (Falbe und Regitz 1995). Je höher deren Zahl im Molekül ist, um so dunkelgelber ist die Eigenfarbe der Carotinoide. Sind diese in höheren Konzentrationen in den Früchten enthalten, nehmen sie eine rote Farbe an (Friedrich et al. 1986), wie Zeaxanthin oder β -Carotin verglichen mit α -Carotin und Lutein, die eine doppelte Bindung weniger haben (Mouilly et al. 1999).

Carotinoide können in zwei Klassen unterteilt werden (Mouilly et al. 1999, Careri et al. 1999, Cert et al. 2000, Oliver und Palou, 2000):

- Carotin oder Kohlenwasserstoff-Carotinoide, die nur aus Kohlenstoff und Wasserstoff zusammengesetzt sind, wie α - und β -Carotin. Wichtigste Vertreter in den Früchten sind Phytoen, Lycopin, α -, β - und ζ -Carotin.
- Xanthophylle oder Sauerstoff-haltige-Carotinoide, die folgende Funktionen auf ihrem Terminalring tragen können: Epoxy, Carbonyl, Hydroxyl, Ester oder Säure wie Cryptoxanthin.

Berzelius (1837) zit. in Falbe und Regitz (1995) nannte den gelben Farbstoff Xanthophyll [von Xanth(o)... und Phyll(o)...]. Heute wird der Name Xanthophylle nur noch als Gruppenname für oxigenierte Carotinoide (Epoxyde, Hydroxyle und einige Oxo-Verbindungen) verwendet. Enthalten sie am C3-Atom bzw. 3' eine (= Monole), zwei (= Diole) oder anstelle der Methylgruppen am C5 bzw. C5' eine oder zwei weitere Hydroxylgruppen werden sie als Xanthophylle bezeichnet. Ist anstelle der Doppelbindung in den Jononringen ein Sauerstoffatom epoxidartig gebunden, nennt man sie Epoxidmonole, Monoepoxid-Diole oder Diepoxid-Diole (Friedrich et al. 1986).

Bei reifen Früchten und Beerenobst setzen sich die Carotinoide aus 8–14% Kohlenwasserstoffen, 1,5–4% Monolen und 84–87% Diolen und Polyolen zusammen (Galler und McKinney 1965, Green 1971 zit. in Friedrich et al. 1986).

Lutein (β,ϵ -Carotin-3,3'-diol) und β -Carotin (β,β -Carotin) sind zwei der häufigsten zyklischen Carotinoide, die in menschlichem Serum und in der Nahrung anwesend sind (Bieri et al. 1985, Khachik et al. 1986, Craft und Soares 1992).

Für Pigmente, die ein breites Polaritätsspektrum haben, ist es nicht leicht Methoden zu entwickeln, die eine schnelle Elution mit der Trennung eng verwandter Verbindungen

kombiniert, wie die Trennung der strukturellen Isomere-Lutein und Zeaxanthin (Juhler und Cox 1990). Die gleichzeitige Bestimmung von Lutein und Zeaxanthin, mit UV-spektrometrischer Detektion bei 450 nm, wurde beschrieben (Juhler und Cox 1990, Dachtler et al. 1998).

Carotinoide machen stereoisomerismere Veränderungen bereits in Lösung durch. Stereoisomerie wird auch durch Licht und Hitze katalysiert und ist zeitabhängig. Das natürliche Vorkommen von Stereoisomeren ist in frischen Pflanzengewebe selten. Kleine Mengen natürlicher Stereoisomeren sind, von als Artefakte gebildeten Isomeren, schwierig zu unterscheiden (Philip und Chen 1988). Bei den nicht-polaren und polaren Carotinoiden existieren zusätzlich viele *cis*- und *trans*-Isomere der verschiedenen Carotinoide (Bell et al. 1997). Von dem C₄₀-Grundgerüst leiten sich nicht nur die durch Hydroxy- oder Oxo-Gruppen substituierten Carotinoide ab, auch die Apo-, Nor- oder Seco-Carotinoide (verkürzte Kette, Ringöffnung), bzw. die Retro-Carotinoide (Verschiebung der Doppelbindungen) (Falbe und Regitz 1995).

5.2.2 Eigenschaften

Carotinoide sind intensiv gefärbte Verbindungen. In Lösungen von 0,5 ppm-Konzentration sind mit dem bloßen Auge sichtbar. Sie absorbieren Licht im Bereich von 400–500 nm stark. Absorptions-Detektion bei diesen Wellenlängen ist in Hinsicht auf Selektivität und Sensibilität besonders günstig. Obwohl sie nicht fluoreszierend sind, sind Carotinoide elektrochemisch aktiv (Lambert et al. 1985).

Das Wellenlänge-Maximum für Lutein schwankte von 442 bis 460 nm. Nach Davies (1976) zit. in Craft und Soares (1992) ist das λ_{\max} von Lutein in Ethanol innerhalb 1 nm bei der Wellenlänge von 445 nm. Das Wellenlänge-Maximum für β -Carotin schwankte in den verschiedenen Lösungsmitteln von 448 bis 466 nm. Es könnte sein, dass in dem verwendeten Lutein ca. 6% Zeaxanthin vorkommen, das einen höheren λ_{\max} hat (Craft und Soares 1992).

Die Werte der molaren-Absorption für Lutein kann auch für die Schätzung der Konzentrationen von α -Cryptoxanthin und α -Carotin benutzt werden, bzw. β , β -Carotin für β -Cryptoxanthin und Zeaxanthin. Die Löslichkeit dieser Verbindungen in organischen Lösungsmitteln ist wichtig. Andere physikalische Informationen sind leider begrenzt. Der Mangel an Informationen über Carotinoid-Löslichkeiten und molare-Absorptionen in einer

Vielfalt organischer Lösungsmittel steigern die Schwierigkeit der Carotinoid-Forschung. Diese sind wichtig für die Auswahl von Lösungsmitteln bei der Verwendung zur Probenvorbereitung und als mobile Phasen bei der Liquid Chromatographie, ebenfalls für die Identifizierung und Quantifizierung von Carotinoiden in verschiedenartigem mobilen Phasen (Craft und Soares 1992).

Viele bestehende Extraktionstechniken trennen Carotinoide in Hexan oder Petroleumether von wässrigem-Alkohol oder Aceton. Die schwache Löslichkeit von Dihydroxy- und polaren Carotinoiden in Hexan kann zu Verlusten führen. Diethylether ist auch verwendet worden, um Carotinoide von wässrige/polaren organischen Mischungen zu trennen. Auf der Basis der Löslichkeiten wurde ein wirksameres Verfahren präsentiert. Ein möglicher Nachteil ist die Löslichkeit von Fettsäure-Seifen in Ether, die mit Wasser gründlich entfernt werden müssen (Craft und Soares 1992 und dort zit. Literatur). Die relativen Absorptionswerte von Lutein und β -Carotin in verschiedenen organischen Lösungsmitteln wird in Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2: Relative Löslichkeit und Absorption von Lutein und β -Carotin in organischen Lösungsmitteln (Craft und Soares 1992)

solvent	Lutein				β -Carotin			
	solubility, mg/L	λ_{\max} , ^a nm	absorptivity $E^{1\%}$, cm ⁻¹	molar absorptivity, ^a L mol ⁻¹ cm ⁻¹	solubility, mg/L	λ_{\max} , ^a nm	absorptivity $E^{1\%}$, cm ⁻¹	molar absorptivity, ^a L mol ⁻¹ cm ⁻¹
acetone	800	446	2540	144 500	200	452 (452)	2559	137 400
acetonitrile	100	446	2559	145 600	10	452	2540	136 400
benzene	600	456 (458)	2350	133 700 (127 200)	4000	462 (462)	2304	124 000 (125 500)
chloroform	6000	454 (458)	2369	134 800	2000	462 (461)	2330	125 100 (128 600)
cyclohexane	50	448	2520	143 400	2000	454 (457)	2508	134 700 (134 500)
cyclohexanone	4000	454	2359	134 200	2000	462	2359	126 700
dichloromethane	800	452	2320	132 000	6000	460	2369	127 200
DMF	1000	454	2390	136 000	200	460	2389	128 300
DMSO	1000	460	2369	134 800	30	466	2259	121 300
ethanol	300	444 (445)	2550	145 100 ^b	30	450 (449)	2529	135 800 (140 700)
ethyl acetate	800	446	2529	143 900	500	452	2520	135 300
ethyl ether	2000	444	2629	149 600	1000	448	2659	142 800
hexane	20	444 (445)	2589	147 300	600	448 (453, 450)	2592	139 200 ^c
2-propanol	400	444	2599	147 900	40	450	2508	134 700
methanol	200	442 (444)	2629	149 600	10	450	2540	136 400
MTBE	2000	444	2589	147 300	1000	450	2588	139 000
THF	8000	450	2469	140 500	10000	456	2399	128 800
toluene	500	456	2290	130 300	4000	462 (463)	2270	121 900

^a Calculated molar absorptivities and λ_{\max} in parentheses are taken from Davies (1976). ^b Reference absorptivity for lutein. ^c Reference absorptivity for β -carotene.

β -Carotin war in Methanol und Acetonitril am wenigsten löslich, während Lutein in Hexan am wenigsten löslich war. Der Abbau war am größten für beide Carotinoide in Cyclohexanon. THF hat die höchste Löslichkeit für beide Carotinoide. Obwohl THF einer Peroxid-Bildung unterliegt, hat es zunehmend für Carotinoidextrakte wegen der hohen Löslichkeit und dem breiten Polaritätsspektrum für die zu extrahierenden Carotinoide Verwendung gefunden (Bureau und Bushway 1986, Khachik et al. 1986, Craft und Soares

1992). Craft und Soares (1992) wiesen nach, dass die Abnahme in der Absorption und die Änderungen in Wellenlänge-Maximum (λ_{\max}) Anzeiger von Carotinoid-Abbau waren. Im allgemeinen war die Rate des Luteinabbaus langsamer als die des β -Carotinabbaus.

Carotinoide, sind instabile Verbindungen und werden im Gegenwart von Sauerstoff, Licht und hohen Temperaturen leicht abgebaut (Pesek und Warthesen 1987, Bureau et al. 1998). Verarbeitung und Lagerung können Carotinoid-Instabilität verursachen, die eine unerwünschte Änderungen in Farbe und Nährwert eines Produktes herbeiführt (Pesek und Warthesen 1987). Insbesondere die Hitze katalysierte *trans*- und *cis*-Umwandlung könnten zu Carotinoidveränderungen führen (zit. in Lambert et al. 1985). Das Hauptproblem beim Arbeiten ist durch das konjugierte Doppelbindungssystem bedingt. Besonders die Instabilität im Licht, in Gegenwart von Sauerstoff, Hitze und Säuren. Alkalische Bedingungen können für bestimmte Carotinoide ebenfalls schädlich sein (Oliver und Palou 2000). Technologisch wurde ein hoher Aufwand getrieben, um die Oxidation und die Veränderungen durch Hitze zu minimieren (Bauernfeind 1981). Carotine kommen in Obst und Gemüse natürlich vorwiegend in der *trans*-Form vor (Zechmeister 1962), während thermaler Verarbeitung werden *cis*-Isomere gebildet (zit. in Sander et al. 2000). Aus diesem Grund sind zur Aufbereitung carotinoidhaltiger Pflanzenteile mehrere Vorsichtsmaßnahmen notwendig. Die Verwendung von Antioxidantien, Überströmung mit Stickstoff oder Argon und Lagerung der Proben bei ca. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, um Oxidationen während der Probenbehandlung zu verhindern. Genauso wichtig ist dämmerige Beleuchtung, um einen möglichen Kontakt mit direktem Sonnenlicht zu vermeiden. Ethoxyquin, Pyrogallol, Ascorbinsäure und Natriumaskorbat sind Beispiele möglicher Antioxidantien, die benutzt wurden. Butyliertes-Hydroxy-Toluol (BHT) ist das am häufigsten gebrauchte Antioxidants. Normalerweise wird BHT mit 0,01% oder 0,1% in der Extraktionslösung benutzt (Oliver und Palou 2000 und dort zit. Literatur).

5.3 Die wichtigste Carotinoide

5.3.1 Carotine

Die Carotine ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$) haben eine Molekulargewicht von 536,85. Die Auftrennung des ursprünglich als einheitlich geltenden Naturstoffs in die drei Isomeren α -Carotin, β -Carotin und γ -Carotin gelang Kuhn und Lederer (1931). Alle drei besitzen das gleiche Grundgerüst mit 9 konjugierten Doppelbindungen, 8 Methyl-Verzweigungen (einschließlich der

möglichen Ringstrukturen) u. einer β -Ionon-Ringstruktur an einem Moleküllende, während sie sich in der Struktur des anderen Moleküllendes unterscheiden (Falbe und Regitz 1995).

Carotine sind weit verbreitete Polyenfarbstoffe, die in Natur in einem Gemisch der α -, β - und γ -Isomeren (Abb. 20) vorliegen und durch den β -Ionenring Vitamin-A Wirksamkeit haben (Täufel et al. 1993). Zum erstmalig konnte Wackenroder im Jahr 1831 Carotin aus Möhren isolieren (zit. in Bauernfeind et al. 1981).

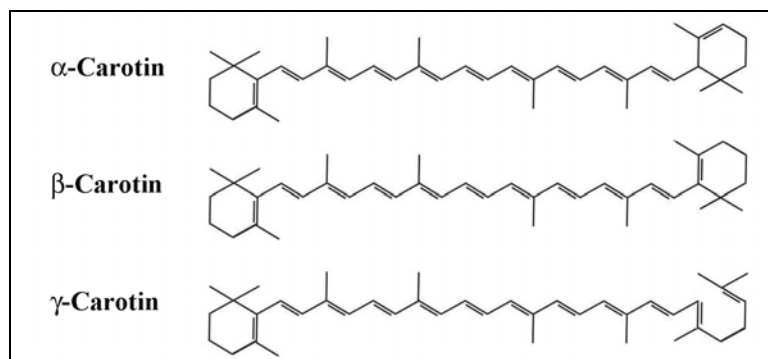


Abb. 20: Die Strukturen von Carotinen

Der natürliche organische Farbstoff Carotin besteht zumeist 85% β -Carotin, 15% α -Carotin und 0,1% ψ -Carotin. Das gewöhnlichste Carotin in allen grünen Blättern ist β -Carotin (Bauernfeind et al. 1981). Das wichtigste, bekannteste und meist erforschte Carotinoid ist β -Carotin ($C_{40}H_{56}$). Es hat zwei β -Iononringe die durch eine Isoprenoid Kette aus zehn konjugierten Kohlenstoff-Doppelbindungen verbunden sind (Abb. 20). Diese Konjugation trägt auch zur Stabilität und Farbe von Carotinoiden bei (Philip 1975).

β -Carotin (tiefrote Prismen, Schmp. 183°) ist das im Tier- und Pflanzenreich häufigste Carotinoid. β -Carotin ist, wie alle Carotine sind in Wasser nicht, in Alkohol kaum, in Chloroform u. Ölen gut löslich. Es ist ein wichtiges Antioxidant in medizinischen Präparaten und als Vitamin-A Vorstufe auch für Lebensmittel zugelassen. Als gelber Farbstoff ist β -Carotin, wie α - und γ -Carotin, mit der EG-Nr. E160a bezeichnet worden. Es ist z. B. für Margarine, Butter, Käse, in Fruchtsäften, als Kosmetikfarbstoff u. als Futtermittelzusatz zur Färbung zugelassen (Falbe und Regitz 1995). β -Carotin, das in der Natur überwiegend vorkommt, ist das eigentliche Provitamin-A, da es im tierischen Organismus enzymatisch in zwei Moleküle Retinal (vgl. Vitamin-A) (Falbe und Regitz 1995) durch die Aktivität des Enzyms 15,15'-oxigenase gespalten werden kann (Ohloff 1972). Weitere Carotine sind δ -Carotin, das einen α -Iononring an einem Moleküllende trägt,

das andere Ende ist offenkettig und das offenkettige ζ -Carotin. Beim ε -Carotin befindet sich an beiden Moleküleenden ein α -Iononring (Falbe und Regitz 1995).

Im allgemeinen sind Carotine im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet, z.B. im Blutserum und als häufiger Begleiter des Chlorophylls. Das α -Carotin in geringer Menge als Begleiter des β -Carotin und das γ -Carotin nur in Spuren besonders in Pilzen u. Bakterien (Falbe und Regitz 1995). 1950 konnten Karrer und Eugster, Inhoffen et al. und Milas et al. β -Carotin synthetisieren (zit. in Bauernfeind et al. 1981) und seit 1954 wird β -Carotin im kommerziellen Rahmen synthetisiert (Falbe und Regitz 1995). Wegen der vermuteten anticancerogenen Wirkung hat der Verbrauch von pflanzlichem β -Carotin in letzter Zeit zugenommen (Pesek und Warthesen 1988).

5.3.2 Lutein

Eines der wichtigsten Carotinoide ist Lutein [$C_{40}H_{56}O_2$, (3R,3'R,6'R)- β , ε -Carotin-3,3'-diol] mit Molekulargewicht 568,85, Schmelzpunkt 96°C . Es gehört neben Carotin und Chlorophyll zu den in grünen Pflanzen verbreitetsten Blattfarbstoffen der Laubfärbung, die besonders im Herbst in Erscheinung tritt. Charakteristisch für Lutein ist die gelbe, metallisch glänzende oder granatrote Farbe. Es kristallisiert in Prismen oder Täfelchen, ist unlöslich in Wasser, löslich in Fettlösungsmitteln und Fetten (Falbe und Regitz 1995).

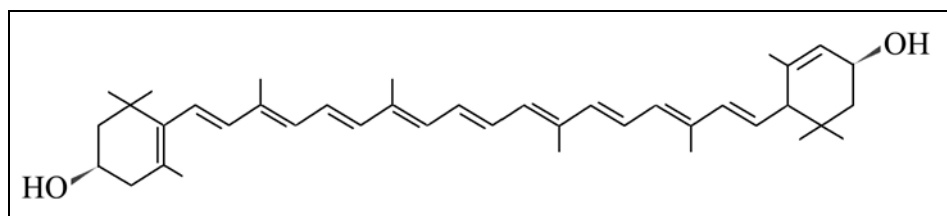


Abb. 21: Die Struktur von Lutein

Berzelius (1837) nannte den Farbstoff Xanthophyll [von Xanth(o)... und Phyll(o)...]. Dieser erwies sich später als identisch mit dem von Willstätter und Escher (1912) aus Eidotter isolierten Lutein [von Lute(o)], dessen Konstitution im Jahr 1930 P. Karrer aufklärte (zit. in Falbe und Regitz 1995).

Lutein kommt u.a. in Alfalfagrass, in Brennnesselblättern, in Algen, in Luzerne, in Palmöl und im Eidotter vor. Außer in den grünen Pflanzenteilen ist Lutein auch in zahlreichen gelben Blütenblättern und -pollen, in Früchten und vielen niederen Pflanzen enthalten (Falbe und Regitz 1995). Der gelbe Farbstoff des Eidotters enthält zu 2/3 Lutein neben 1/3 isomerem

Zeaxanthin. Die Dihydroxy-Carotinoide, Lutein wie auch Zeaxanthin, können frei aber auch esterifiziert als Monoester oder Diester von Fettsäuren vorkommen (Oliver und Palou 2000). Die Struktur von Lutein wurde als das *cis/trans* Isomer identifiziert (Dachtler et al. 1998). Trotz der nahen Verwandtschaft zum β -Carotin zeigt Lutein keine Provitamin-A Aktivität. Lutein ist jedoch in der Netzhaut des Auges zu finden, wo es die Hell-Dunkel-Adaptation fördert. Lutein ist in der Carotinoidgruppe als EU-Farbstoff E161.b für Lebensmittel zugelassen (Falbe und Regitz 1995).

5.3.3 Zeaxanthin.

Ein anderes wichtiges Carotinoid ist Zeaxanthin [$C_{40}H_{56}O_2$, (3R,3'R)-b,b-Carotin-3,3'-diol] (Abb. 22) mit Molekulargewicht 568,89. Im Xanthophyll-Zyklus ist Zeaxanthin aus β -Carotin hergeleitet. Zeaxanthin bildet orangegelbe Kristalle von stahlblauem metallischem Glanz. Der Schmelzpunkt ist $215^{\circ}C$, andere Angabe ist $207^{\circ}C$ (Falbe und Regitz 1995)..

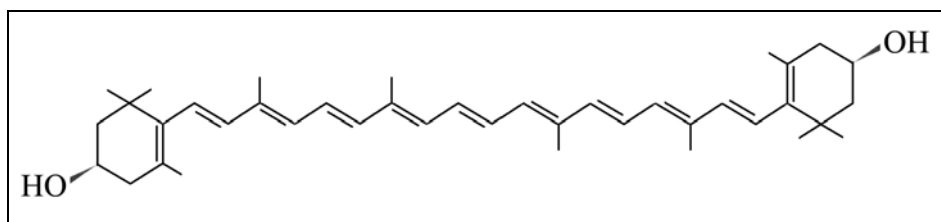


Abb. 22: Die Struktur von Zeaxanthin

Das gelb-orange Pigment Zeaxanthin kommt neben Chlorophyll in grünen Blättern, Blüten, Früchten, Wurzeln, vor allem im Mais, auch in Safran, Hagebutten, Pfirsichen, Getreidekeimölen und Pilzen vor (Täufel et al. 1993) sowie in Gerste, Paprika, Orangen, Eidotter, Krustentieren, Fischen, Vögeln, Bakterien. Dieses Pigment wurde erstmals 1939 aus Mais (*Zea mays*, Gramineae) von P. Karrer isoliert. Zeaxanthin wird auch als Lebensmittelfarbstoff verwendet. Zeaxanthin ist löslich in Petrolether, Methanol, Essigester, Chloroform, und unlöslich in Wasser. Durch photochemische Oxidation entstehen aus Zeaxanthin u.a. Violaxanthin, Xanthoxin, Capsorubin (Falbe und Regitz 1995).

5.3.4 Apocarotinal

Apocarotinal ist die Kurzbezeichnung für 8'-Apo- β -Carotin-8'-al mit dem chemischen Namen β -Apo-2'- ψ -Carotinal, L- β -Apo-8'-Carotinal, 8'-apo- β , ψ -Carotin-8'-al (Bauernfeind 1981). Der chemische Formel ist $C_{30}H_{40}O$ mit Molekulargewicht 416,65. Der Strukturformel des β -Apo-8'-Carotinal ist in Abb. 23 wiedergegeben. Wie die Carotine, die

den β -Iononring besitzen, ist β -Apo-8'-Carotinal (C30)(*trans*) sowie β -Apo-8'-Carotinsäure (C30)ethylester (*trans*) auch Vitamin-A wirksam (Täufel et al. 1993).

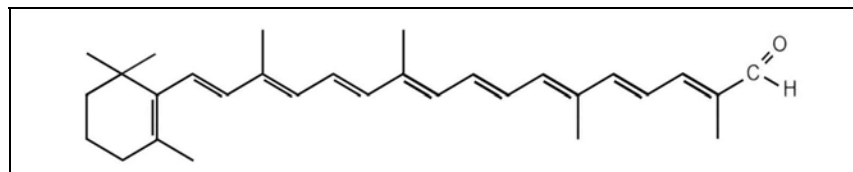


Abb. 23: Die Struktur von β -Apo-8'-Carotinal

1958–1959 konnten Isler et al. sowie Rüegg et al. β -Apo-8'-Carotinal synthetisieren (Bauernfeind et al. 1981). Der auch synthetisch zugängliche rote Naturfarbstoff ist ebenso wie der Ethylester der zugehörigen Karbonsäure (Apocarotinester) als Lebensmittel-Farbstoff (E160e bzw. E160f) zugelassen (Falbe und Regitz 1995).

Mit guter Reproduzierbarkeit kann β -Apo-8'-Carotinal als Interner Standard bei der HPLC verwendet werden. Dies gilt für geprüfte Proben, die diese Verbindung nicht enthalten.

VI. Biosynthese von Carotinoiden

Alle Carotinoide werden durch Variationen des C₄₀ Skeletts produziert (Oliver und Palou 2000). Die Struktur aller Carotinoide wird vom Lycopin hergeleitet (Mouilly et al. 1999). Carotinoide können strukturell als an den Enden offene Polyenkette vorliegen oder die Endgruppen sind zu einem oder zwei zyklischen Jononringen ausgebildet. Je nachdem, ob im Jononring die Doppelbindung zwischen C₅=C₆ oder C₄=C₅ angeordnet ist, werden sie als β- oder α-Jononring bezeichnet (Friedrich et al. 1986).

Bauprinzipien für die verschiedenen Untergruppen der Isoprenoide u.a. Tetraterpen Carotinoide und die Verwendung von Isopentenyl-diphosphat können wie in Abb. 24 dargestellt werden (Kindl 1991).

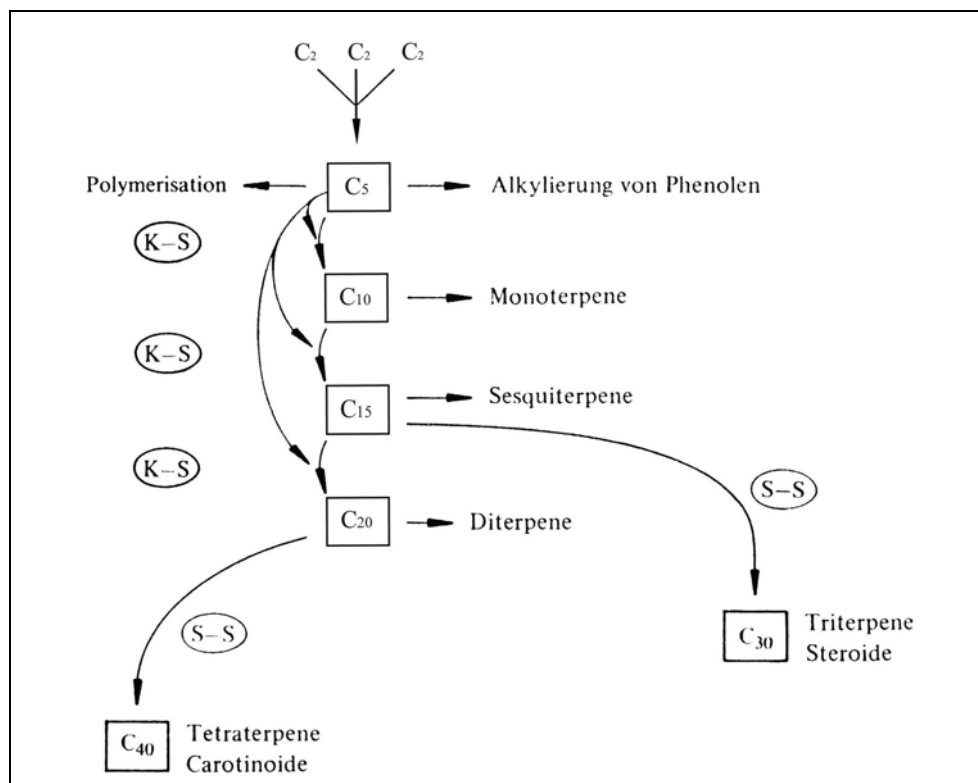


Abb. 24: Synthese und Bauprinzipien für die verschiedenen Untergruppen der Isoprenoide K-S: Kopf-Schwanz, S-S: Schwanz-Schwanz

Strukturell sind die Carotinoide Polyisoprenoid-Komponenten. Bei den natürlich vorkommenden Isoprenoiden liegt die Möglichkeit zu einer Schwanz-Schwanz-Verknüpfung vor, wenn z.B. zwei C₂₀ Geranyl-geranyl Moleküle zu einer C₄₀-Verbindung zusammengefügt werden. Die Bezeichnung geht dabei von einem C₁₀-Körper als Baustein aus (Kindl 1991, Oliver und Palou 2000).

Anschließende Zyklisierungs-Reaktionen ermöglichen die Bildung anderer Carotinoide, die ihrerseits Ausgangsverbindungen für eine Vielzahl von Carotinoiden sind. Aus zwei C₂₀-Isoprenoiden können die Carotinoide derart zusammengesetzt werden, dass die beiden mittleren Methyl-Gruppen in 1,6-Stellung zueinander stehen, die beiden Molekül-Hälften gehorchen jeweils der Isopren Regel (Falbe und Regitz 1995).

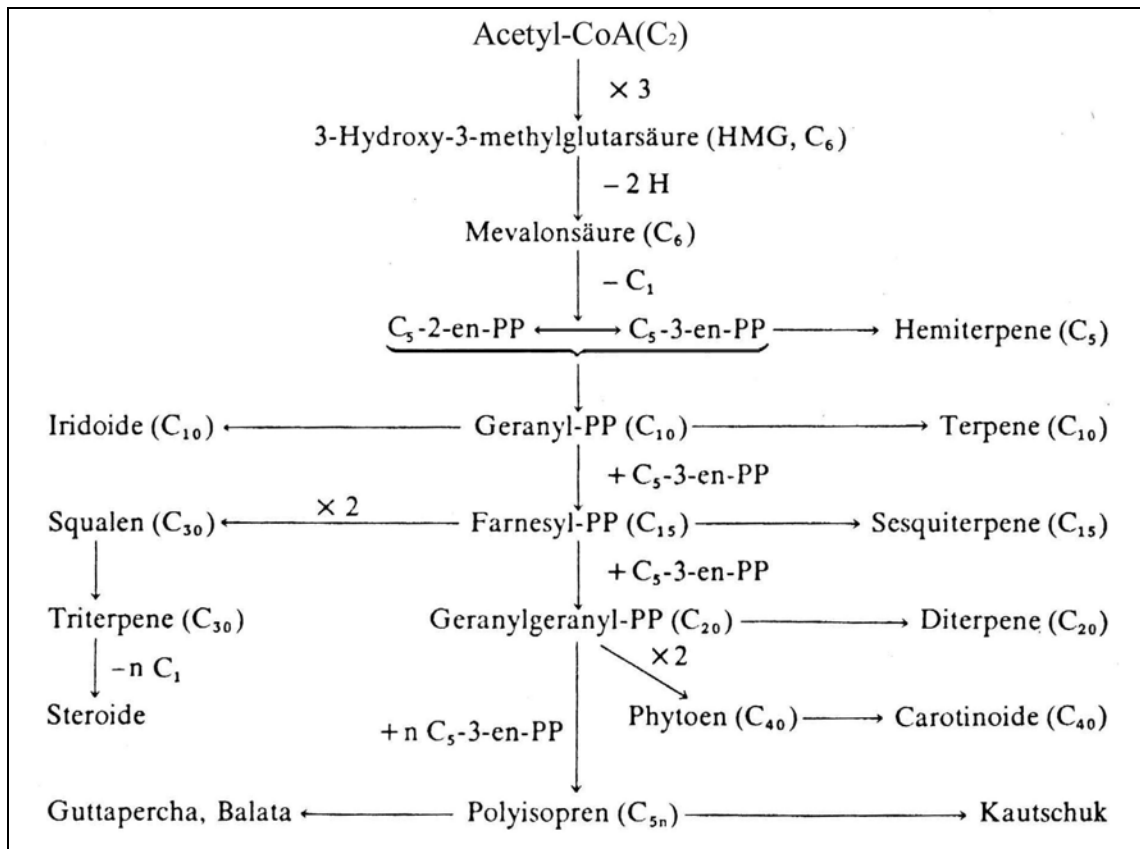


Abb. 25: Carotinoidbildung in der Biogenese der Isoprenoide
CoA=Coenzym A, C₅-2-en-PP = Dimethylallyldiphosphat, C₅-3-en-PP = Isopentenylidiphosphat, PP=Diphosphatrest (Pyrophosphat)

Der Biosyntheseweg der Carotinoiden verläuft analog zu den anderen Isoprenoiden über Isopentenylpyrophosphat. Über Geranylpyrophosphat und Farnesylpyrophosphat bildet sich Geranylgeranylpyrophosphat. Die Bildung der Carotinoide stellt sich vereinfacht durch die Biogenese der Isoprenoide wie in der Abb. 25 dar (Falbe und Regitz 1995).

Aus zwei Molekülen Geranylgeranylpyrophosphat wird das noch farblose 15-*cis*-Phytoen (C₄₀) gebildet, das durch stufenweise Dehydrierung und Isomerisierung der 15-*cis*-Doppelbindung zunächst in all-*trans*- ζ -Carotin (farbig), weiter in all-*trans*-Neurosporin und schließlich in all-*trans*-Lycopin umgewandelt wird (Falbe und Regitz 1995).

Die ausführliche Biosynthese der Pflanzenpigmente von Acetyl-CoA bis zum Lutein 5,6-Epoxid auf der einen Seite, bis zum Violaxanthin anderer Seite, wurde von Olson (zit. in Bauernfeind 1981) wie in der Abb. 26 dargestellt.

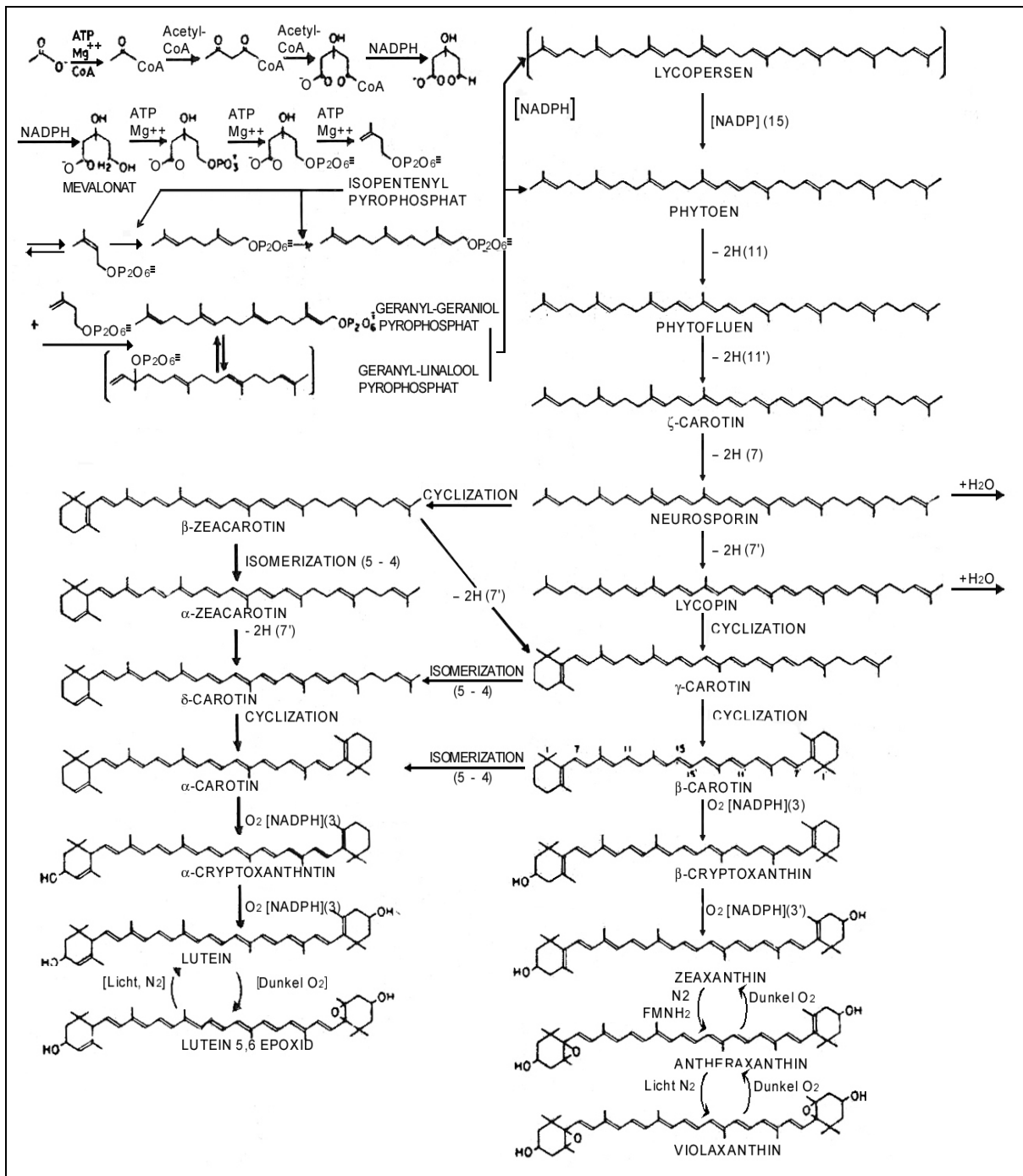


Abb. 26: Die postulierte Biosynthese der Pflanzenpigmente

Im allgemeinen lässt sich die Biosynthese der Carotinoide in mehrere Etappen aufgliedern (Heß 1988):

1. Die Bildung des 40-C-Grundgerüsts. Durch Schwanz-Schwanz-Addition zweier Einheiten Geranyl-geranyl-pyrophosphat entsteht das 40-C-Grundgerüst der Carotinoide. Der resultierende 40-C-Körper trägt deshalb in der Mitte seines Moleküls eine Doppelbindung. Dieser erste 40-C-Körper ist das vielfach nachgewiesene Phytoen.
2. Dehydrierungen. An der Schlüsselsubstanz Phytoen setzt eine Folge von Dehydrierungen an, die über Phytofluen, ζ -Carotin und Neurosporin schließlich Lycopin entstehen lässt. ζ -Carotin ist wie schon erwähnt das erste farbige Carotin in dieser Kette. Das Lycopin weist von den beiden Kettenenden abgesehen eine durchgehende Sequenz konjugierter Doppelbindungen auf.
3. Zyklisierung. Das Lycopin und alle in der Biosynthese vor ihm liegenden Carotine sind offenkettig. Über vom Lycopin ausgehenden Zyklisierungen entstehen die α - und β -Iononringe von α -Carotin einerseits und von γ - und β -Carotin andererseits.
4. Oxidationen. Durch Einfügung von Sauerstoff-Funktionen entstehen daraus die Xanthophylle. Diese Oxidationen finden erst nach der Zyklisierung statt.

Xanthophyll-Bildung:

Während in den sich entwickelnden Chloroplasten zum größten Teil nur β -Carotin, Lutein und in wesentlich geringeren Konzentrationen Violaxanthin und Neoxanthin sowie andere Carotinoide vorkommen, werden in den Chromoplasten reifender Früchte stets zahlreiche Xanthophylle gebildet (Friedrich et al. 1986). Carotinoide mit den Cyclohexan-Ringen an beiden Enden des Moleküls erfahren weitere Modifikationen und ergeben dann die Sauerstoff enthaltenden Xanthophylle. Die Einführung von zwei Hydroxyl-Gruppen lässt von α -Carotin zum Lutein und vom β -Carotin zum Zeaxanthin gelangen. Vom Mechanismus her muss man von einer Monooxygenase-Reaktion ausgehen (Kindl 1991).

Die Funktion des Xanthophyll-Zyklus, durch Oxidation von α - bzw. β -Carotin, könnte in einer noch nicht verstandenen Art der Adaption liegen oder mit dem Schutz vor Photooxidation zusammenhängen. Die Xanthophyll-Zusammensetzung der Plastiden-Hülle ändert sich bei Belichtung (Kindl 1991). Licht veranlaßt Änderungen in Zeaxanthin-Niveau über gegenseitige Umwandlung mit Violaxanthin und Antheraxanthin im Xanthophyll Kreis (Yamamoto 1979).

Parallel mit der Änderung der Carotinoide, die man auch beim Übergang Chloroplast zu Chromoplast antrifft, ändert sich auch die Permeabilität der Hüllenmembran. Das Chromoplasten-Membransystem leitet sich von der Hüllenmembran ab. An der Hüllenmembran sind Phytoen-Synthase und -Dehydrogenase lokalisiert und Phytoen liegt angehäuft bereits im Dunkeln vor. Licht induziert die Phytoen-Dehydrogenierung, und verstärkt aber auch die Phytoen-Bildung um den Faktor 10 (Kindl 1991).

VII. Carotinoidabbau als Aromaprecursor

Viele Riechstoffe können als Abbauprodukte von Carotinoide angesehen werden (Falbe und Regitz 1995). Die Konzentrationen von Carotinoiden in Weintrauben sind von den Sorten und der Beerenreife abhängig (Razungles et al. 1987, 1988). Carotinoide werden als Precursor von C₁₃-Norisoprenoiden betrachtet, obwohl die enzymatischen Bildungssysteme in höherem Pflanzen noch nicht bekannt sind. Die C₁₃-Norisoprenoid-Abkömmling, die in Weintrauben identifiziert wurden, stellen eine wichtige Aromaquelle für Weine dar (Bureau et al. 1998). Bei Chardonnay Precursorhydrolysaten wurden nur zwei Norisoprenoids identifiziert (Williams et al. 1992), die Mehrheit könnte von den vier bedeutenden Xanthophyllen, Lutein, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin hergeleitet werden (Gross 1987). Die flüchtigen Verbindungen werden durch mehrere sekundäre Stoffwechsel-Zyklen gebildet (Sefton et al. 1993).

Nach Williams et al. (1992) gibt es drei Punkte, der Annahme der Hypothese folgend, dass Carotinoide die Quelle der flüchtigen Norisoprenoide sind:

1. Der Mengen an 13- Kohlenstoffkomponenten unter den Weintraubennorisoprenoiden zeigt, dass Stellungspezifischer enzymatischer (site-specific enzymic) Katabolismus der Carotinoide die Quelle der Produkte ist, mehr als der nicht-Stellung-spezifische (non-site-specific) chemische Typ der oxidativen Degradation. Der letzte Mechanismus würde erwartet werden, Moleküle mit Kohlenstoff-Skeletten zu ergeben, die mehr, oder weniger Kohlenstoff-Atome enthalten als das überwiegenden C₁₃- Produkt.
2. Die strukturelle Komplexität der flüchtigen Produkte, die als Ergebnis sequentieller Oxidationen und Verkleinerungen gebildet wurden, beweist, dass die meisten dieser Weintraubenorisoprenoide echte Metabolite der Früchte sind. Wenn die verschiedenen Produkte nur durch einfache Dehydrierungen und säurekatalysierte Neuordnungen entstanden wären, dann könnte ihre Entstehung rein chemisch gewesen sein.
3. Die Mehrheit der Norisoprenoidverbindungen werden in den Früchten als Glycoside angetroffen. Vermutlich wurden diese flüchtigen Verbindungen vor der Glycosylierung produziert und transformiert. Folgerichtig ist dann, dass die Glycosylierung eine Endstufe eines biosynthetischen Weges ist. Es weist weiter darauf hin, dass Glycoside Transport-Derivate für die C₁₃-Metaboliten sein könnten. Es ermöglicht diese Verbindungen aus einer lipophilen carotinoidreichen Umgebung in den Vacuolensaft übergehen zu lassen.

Außerdem zeigten Marais et al. (1991 und 1992c) die wichtige Wirkung von Faktoren wie Gebiet, Temperatur, Sonnenlicht und Schattierung auf Lutein und β-Carotin Gehalt in Weintrauben der Sorte „Weißer Riesling“ und Chenin Blanc. Späterer auch auf die chemische Komposition und den Einfluss auf Charakter der produzierten Weine (Bureau et al. 1998).

Viele Autoren berichteten über Carotinoide als natürliche potenzielle Aromaprecursor. Die gebildeten Aromaverbindungen in Pflanzenprodukten werden durch Versuche mit verschiedenen physikalischen, chemischen sowie biochemischen Abbauprozessen verfolgt.

7.1 β -Carotin

In Pflanzen ist β -Carotin der Precursor von Neo-, Viola-, und Luteoxanthin, wohingegen Lutein, ein α -Carotinoid-Abkömmling, der Precursor von 5,6 Epoxylutein und Flavoxanthin ist (Bureau et al. 1998 und dort zit. Literatur).

β -Ionon ist eine wohlriechende Verbindung und wurde hauptsächlich in der Parfüm- und kosmetischen Industrie als Riechstoff verwendet (Ohloff 1978a). Über das Vorkommen dieser Verbindung in Pflanzen, Früchten und Blüten, die reich an Carotinoiden sind, wurde von vielen Autoren berichtet. β -Ionon ist tatsächlich ein sekundärer Metabolit, der aus β -Carotin durch thermischen Abbau oder durch Photooxidation erzeugt wird (Isoe et al. 1969, Kanasawud und Crouzet 1990a, Marais 1992, Kotseridis et al. 1999). Ayers et al. (1964) haben festgestellt, dass einige Verbindungen von Ionon-ähnlichen Strukturen für ein den Veilchen ähnliches Aroma von unter Sauerstoff gelagerten dehydrierten Karotten verantwortlich sind. Die Oxidation von β -Carotin und β -Ionon unter ähnlichen Bedingungen hat β -Ionon-5,6-epoxid gebildet. Andererseits könnte α -Ionon aus den in Karotten vorkommendem α -Carotin gebildet werden. Isoe et al. (1972) stellten fest, dass Photooxidation von β -Carotin u.a. β -Ionon, Dihydroactinidiolid, 2-hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon, 3 Komponenten von Geraniumsäure Desoxyxanthoxin bildeten.

Day und Erdman (1963) identifizierten drei Kohlenwasserstoffe thermisch induzierter β -Carotin-Abbauprodukte, die immer erhalten wurden. Es waren u.a. Toluol, m-Xylen, und 2,6-Dimethylnaphthalin. Diese drei Verbindungen werden sehr wahrscheinlich durch Zyklisierung der Polyene-Kette gebildet. Als weitere Hauptbestandteile war eine $C_{13} H_{18}$ Verbindung, die mittels ultravioletter, infraroter und Kern magnetischer Resonanz als Ionen identifiziert wurde. Es wird festgestellt, dass Ionen ein thermisches Abbauprodukt von β -Carotin ist, und es ist der quantitativ bedeutendste Bestandteil. Die Mengen dieser vier Abbauprodukte von β -Carotin werden in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Thermale Abbauprodukte von β -Carotin

Nr.	Komponente	Ertrag (%)
1	Toluen	0,3
2	m-Xylen	0,4
3	2,6-Dimethylnaphthalin	1,3
4	Ionen	5,0

7.2 Zeaxanthin

Zeaxanthin wird aus β -Carotin über β -Cryptoxanthin in der Carotinoid-Biosynthese hergeleitet (Olson zit. in Bauernfeind et al. 1981, Falbe und Regitz 1995). Eine weitere Herkunft könnte aus der Astaxanthin-Biosynthese (Margalith 1999) erfolgen. Obwohl es in vielen Früchten gefunden wird, gibt es in der Literatur nur sehr wenige Hinweise.

Im Xanthophyll-Zyklus wird Zeaxanthin aus β -Carotin abgeleitet. Durch photochemische Oxidation entstehen aus Zeaxanthin u.a. Violaxanthin, Xanthoxin, Capsorubin (Falbe und Regitz 1995). Anthera- und Violaxanthin, die in reifen Früchten von Bedeutung sind, entstehen durch Oxidation von Zeaxanthin in der Carotinoid-Biosynthese (Olson zit. in Bauernfeind et al. 1981).

Bei Photooxidation wurden 5,6-epoxy- β -Ionon, Dihydroactinidiolid, Ioliolide, Iso-ioliolide, 3-hydroxy- β -Cyclocitral, Vomifoliol, Hydroxygeraniumsäure, Abscisic Säure, 2,4-dihydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon und Xanthoxin, gefunden (Isoe et al. 1972).

7.3 Lutein

Lutein ist eines der vier bedeutenden Xanthophyllen, welche flüchtige Verbindungen bilden können. Wie in der Abb. 27 dargestellt, entstehen aus Lutein über 3-hydroxy- β -Ionon (7), und 3-hydroxy- α -Ionon (1). Letzteres wurde in Weintraubenglycosid-Hydrolysenprodukten nicht gefunden. Von beiden Ketonen können neun andere Substanzen in Chardonnaywein hergeleitet werden. Darunter die drei dominanten flüchtigen Verbindungen, 3-keto- α -Ionol (3), sein 4,5-dihydro Derivat (5) und die zwei geometrischen Isomere des 9-hydroxymegastigma-4,6-dien-3-one (13) (Williams et al. 1992). Die letzten beiden sind die logischen Precursor zweier bekannter Produkte mit Aroma-Bedeutung in Tabak, z. B., Megastigmatrienon (14) als „das Herz des Tabak-Aromas“ (Enzell, 1985) und Oxoedulans (15) welche dem Tabak einen orientalischen Geschmack verleihen (zit. in Williams et al. 1992).

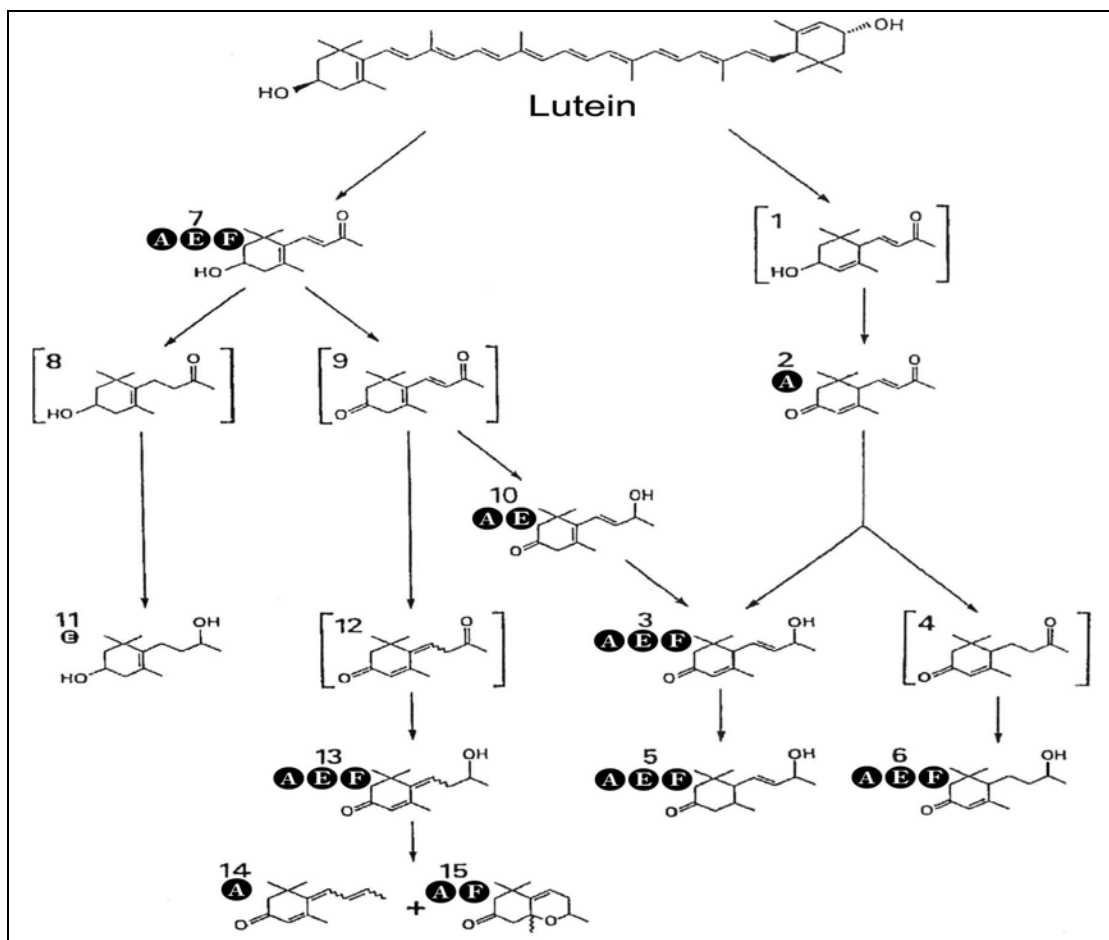


Abb. 27: Der möglichen Reaktionsmechanismen beim Luteinabbau (Williams et al. 1992).
 Flüchtige Norisoprenoid-Verbindungen identifiziert in Säurehydrolysaten (A) und glycosidase-Hydrolysaten (E) aus einem glycosidischen Precursor-Abbau von Chardonnay Weintrauben sowie in freier-Form (F) im Traubenmost

Aus den oben abgebildeten Reaktionsmechanismen ist zu erkennen, dass TDN bei diesem Abbauweg nicht vorkommt. Marais (1992) präsentierte die ersten Beweise das Lutein originaler Precursor von TDN sein könnte. Er betrachtete TDN als ein Spaltprodukt von Lutein neben 3-keto- α -Ionon, 2,3-dehydro- α -Ionon, 3,4-dehydro- β -Ionon und 3-hydroxy- β -Ionon. Die Ableitungen sind leider nicht geschrieben worden. 3-keto- α -Ionon ist eines der Hauptabbauprodukte von Lutein. Diese Verbindung könnte das Zwischenprodukt bei der Bildung von TDN sein. Nach Enzell et al. (1977) ist auch 3,4-dehydro- β -Ionon als Precursor für TDN vorgeschlagen worden

Bei Oxidation von α -Ionon ist 5-keto- α -Ionon ein im Tabak gefundenes Oxidationsprodukt. In wässrigen organischen Säuren zyklisiert 5-keto- α -Ionon zu 4,4,7-Trimethyl-3,4-dihydro-2(1H)-Naphthalinon, das durch Reduktion und Dehydratisierung TDN ergab (Davis et al. 1976).

7.4 Violaxanthin

Dieses Carotinoid kann als Vorstufe für das Vorkommen der größten Anzahl der Norisoprenoide des Chardonnay angesehen werden (Abb. 28) (Williams et al. 1992). Die Reduktion des Seitenketten-Carbonyls des Ketons (16) öffnet den Epoxidring zusammen mit der Doppelbindung der Seitenkette und führt zum 3 Sauerstoffatome enthaltenden Dihydroactinidol Verbindungen (18) und (19). Oxidative Spaltung der Seitenkette dieser Moleküle würde die C₁₁ Lactone (20) und (21) produzieren.

Eine Oxidation der 3-Hydroxyl Gruppe gibt das theoretische Zwischenprodukt (22). Eine Epoxid Öffnung in anderen Form über Dehydrovomifoliol (23) führt zu einer Anzahl hydroxylierter Produkten in Position 6 (Abb. 28). Unter diesen befinden sich die dominierenden Chardonnay Norisoprenoide, Vomifoliol (24) und 4,5-Dihydrovomifoliol (25) (Williams et al. 1992).

Die Reduktion der 3-keto-Funktion des Vomifoliols (24) führt zum Actinidol (27) (Strauss et al. 1986), dem nicht Megastigma-Keton (28) und 1,1,6-Trimethyl-1,2-Dihydronaphthalin (TDN) (29) (Williams et al. 1992). Eine Reduzierung der Seitenkette der Doppelbindung im C-6-hydroxylierten Zwischenprodukt Dehydrovomifoliol (23), erlaubt die Bildung über die Zwischenprodukte (31) und (32), von TDN (29), der Vitispiran (36) und von Rieslingacetal (37) (Strauss et al. 1986, Winterhalter 1991 zit. in Williams et al. 1992).

Der mögliche Reaktionsmechanismus des Violaxanthinabbau wird in der folgenden Abbildung gezeigt (Williams et al. 1992).

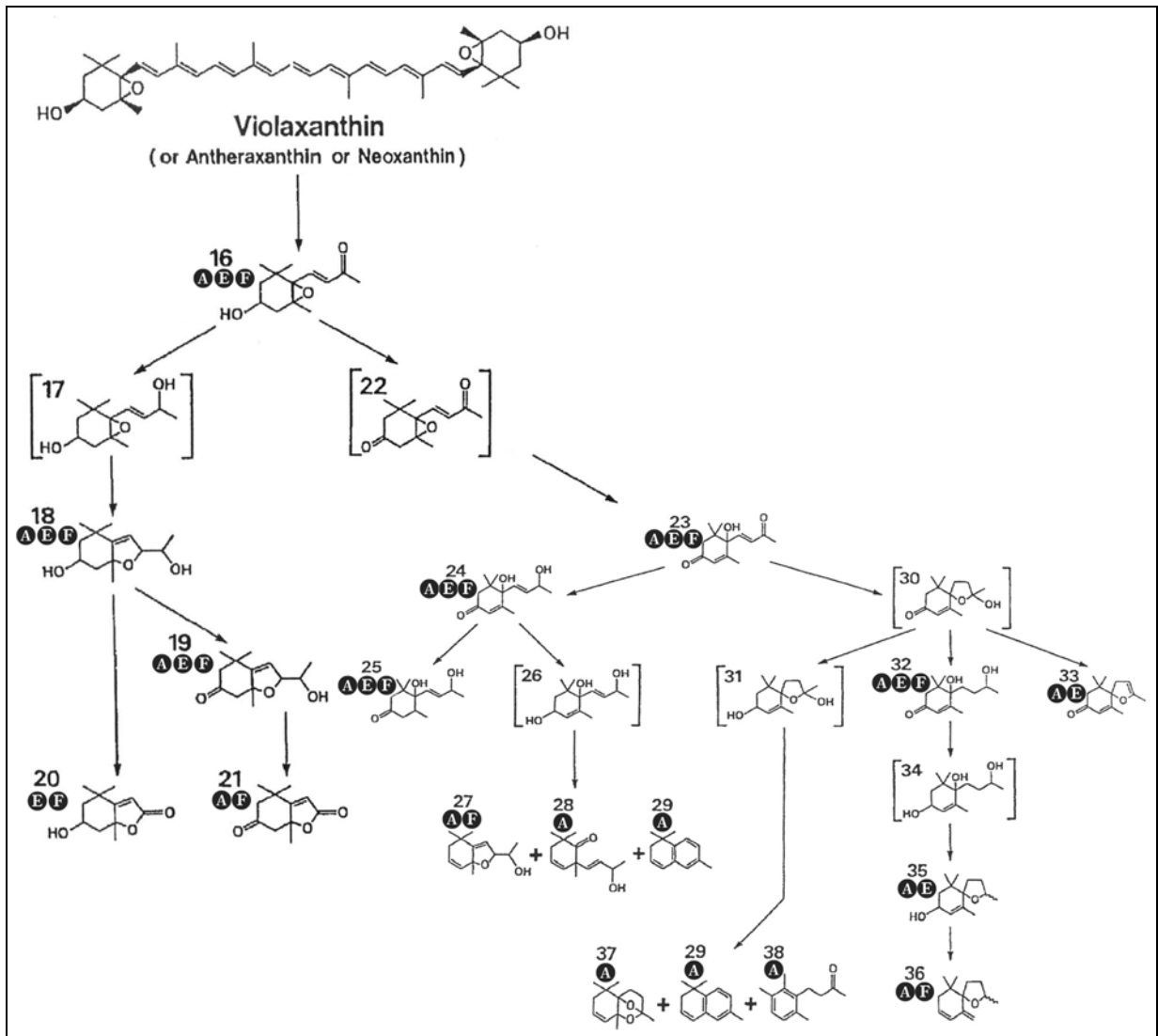


Abb. 28: Der mögliche Reaktionsmechanismus des Violaxanthinabbaus (Williams et al. 1992). Flüchtige Norisoprenoid-Verbindungen identifiziert in sauren Hydrolysaten (A) und Glycosidase-Hydrolysaten (E) aus glycosidischen Precursoren von Chardonnay Weintrauben und in freier Form (F) im Weintraubenmost. Die theoretischen Zwischenverbindungen, für den Abbau von Violaxanthin, Antheraxanthin oder Neoxanthin werden in eckigen Klammern dargestellt.

7.5 Lycopin und andere Carotinoide

Der Abbau von Lycopin ist weniger dokumentiert als der anderer Carotinoide. Nakagawa et al. (1971) zeigten, dass eine Zersetzung von Lycopin in organischen Lösungsmitteln oder in wässrigen Emulsionen erfolgt. Lycopin war in den untersuchten Lösungsmitteln weniger stabil als β -Carotin (zit. in Kanasawud und Crouzet 1990b).

Außer Carotinoiden wurden andere Precursor vorgeschlagen, aus denen flüchtige Verbindungen als Spaltprodukte hergeleitet werden können. Williams et al. (1992) identifizierten Norisoprenoid-Verbindungen in Precursorhydrolysaten von Trauben der

Sorte Chardonnay. Die flüchtigen Norisoprenoide, die im Precursorhydrolysaten von Weintrauben gefunden wurden, könnten aus Lutein, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin über 3-hydroxy- α -Ionon, 3-hydroxy- β -Ionon, 5,6-epoxy-3-hydroxy-Megastigma-7-en-9-one, und 3,5-dihydroxy-Megastigma-6,7-dien-9-one hergeleitet werden.

Die enzymatisch katalysierte oxidative-Spaltung von den 9,10 und 9',10' Doppelbindung des Carotinoids führt zu vier Ketonen als primäre Metaboliten. Von diesen ist nur 3-hydroxy- α -Ionon als Hydrolyseprodukt von Weintraubenglycosiden nicht gefunden worden. Die anderen Produkte sind von diesen Ketonen durch eine Folge von Oxidationen, Dehydratisierungen, Reduktionen oder Eliminationen ableitbar (Enzell 1985, Williams et al. 1992 und dort zit. Literatur).

VIII. Einfluss von Mikroorganismen auf die Aromabildung des Weines

8.1 Aroma und Enzyme

Aromastoffe sind zum einen bereits phyto-genetisch im Rohstoff des Getränkes bzw. des Lebensmittels enthalten, andererseits werden zum Teil sehr wichtige Aromasubstanzen erst während der weiteren Verarbeitung des Rohmaterials auf enzymatischen und nicht enzymatischen Wege gebildet. Insbesondere resultiert das Weinaroma von Weintraubenbestandteilen und alle denen, die während des Verarbeitens, der Gärung und der Alterung produziert werden.

Aromastoffe werden über eine Vielzahl von Reaktionen gebildet, die im Rahmen des normalen Stoffwechsels eines Organismus ablaufen. Darüber hinaus sind für die Aromabildung enzymatische Reaktionen von Bedeutung, die erst nach Zerstörung des Gewebeverbandes eintreten, so z. B. beim Zermahlen der Trauben. Enzyme können weiterhin indirekt an der Aromabildung beteiligt sein, indem sie die Precursor bereitstellen, aus denen dann die Aromastoffe entstehen. Bei den Weintrauben sind Aromaverbindungen als freie flüchtige Verbindungen anwesend, die zum Geruch direkt beitragen können (Aromasorten) oder gebundenen an Zucker, hauptsächlich als Glycoside von denen einige beständige Aromaprecursor sind (Zoecklein et al. 1997).

In vergorenen Getränken (Wein, Obstwein, Bier) hängt das Vorkommen vieler Aromastoffe auch von der Aktivität der Hefe und anderer Mikroorganismen (z. B. Milchsäurebakterien) ab. Mikroorganismen- bzw. Hefeenzyme spielen bei der Weinherstellung eine wichtige Rolle. Durch den Abbau von Aroma Precursoren können sie die spätere Qualität mitbestimmen. Weiterhin ist die enzymatische Hydrolyse deshalb hoch interessant, weil durch sie mehr „natural Flavour“ im Wein produziert wird (Gunata et al. 1985a, Mateo und Jiménez 2000).

Enzyme oder Fermente sind biologische Katalysatoren, die Stoffwechselprozesse aller Art in Lebewesen erst ermöglichen. Beispiele stellen die Wachstums- und Reifeprozesse der Rebe, der Aufschluss der Maische, die Gärung, der Säureabbau oder die Weinentwicklung im Faß und auf der Flasche dar. Im Weinbereich werden industriell aus Pilzkulturen (*Aspergillus niger*) gewonnene Enzymprodukte hauptsächlich zur Beschleunigung der Klärwirkung und Verbesserung der Filtrationsleistung eingesetzt. In der Verordnung (EWG) Nr. 822/87 ist der Zusatz pektolytischer Enzyme zum Most geregelt (Binder 1999).

Die wichtigste Aufgabe pektolytischer Enzyme besteht darin, die hochmolekularen Ketten der Pektinstoffe abzubauen und damit die Freisetzung wichtiger Zellinhaltsstoffe zu gewährleisten. Die traubeneigenen Enzymgruppen beginnen mit dieser Aktivität schon vor der Lese. Wenn die traubeneigene Aktivität unzureichend ist, eine Denaturierung durch Erwärmung, Bentonitzusatz stattgefunden hat oder eine Aktivitätsverstärkung der natürlichen Enzyme erwünscht ist, bietet für solche Fälle die Industrie eine Reihe von Enzympräparaten an, um einige Arbeitsstufen zu erleichtern. Der Zusatz von „Aroma freisetzenden Enzyme“ wird nicht geregelt und auch keine Voraussetzungen vorgegeben. Trotzdem gibt es in letzter Zeit zunehmend sogenannte „Aromaenzyme“ im Handel. Unter den Begleitaktivitäten, die verschiedene Pektinasen aufweisen, ist die β -Glucosidase Aktivität die interessanteste, denn eine Anzahl von Inhaltsstoffen sind in den Beeren glycosidisch gebunden und werden Verlauf der Beerenreifung oder beim Verarbeitungsprozess von den traubeneigenen β -Glucosidasen abgespalten (Binder 1999).

8.2 β -Glucosidase

β -D-Glucoside-Glucohydrolase, β -D-Glucosidase oder β -D-Glucopyranosidase gehört zu den Glycosidasen oder Glycosidhydrolasen, die eine der Cellulase-Enzymklassen in der Hydrolase-Gruppe ist.

β -Glucosidase hydrolysiert die terminalen nichtreduzierenden β -glucosidischen Verbindungen oder β -Glucoside unter Freisetzung von β -D-Glucose (Int. Union of Biochem. Nomenclature Comm. 1984 zit. in Stellmach et al. 1988, Beyer und Walter 1984). Die Wirkung von β -D-Glucosidase ermöglicht die Freisetzung von Monoterpenolen aus den Weintrauben-Monoterpenyl β -D-Glucosiden (Gunata et al. 1990a). Die Hydrolyseeffizienz von Monoterpenyl β -D-Glucopyranosiden (wie Abb. 29) verschiedener Pflanzen (u. a. Weintraube) und Pilze hängt von der Struktur des Aglycons (nicht Zucker-Teil) und dem Ursprung des Enzyms ab (Gunata et al. 1990a). Pflanzen β -Glucosidasen hydrolisieren nur β -D-Glucoside primärer Alkohole wie Geraniol, Nerol, und Citronellol.

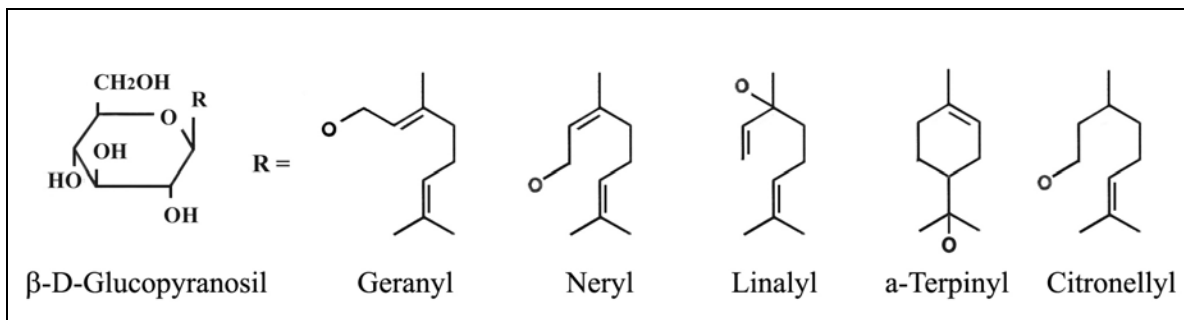


Abb. 29: Die Strukturen von Weintrauben Monoterpenyl β -D-Glucopyranosiden

Bruchmann (1976) unterteilt die β -Glucosidase (*E. C. 3.2.1.21*) in den β -(1,4) Glucodimerasentyp mit hoher Affinität zu Alkyl- β -Glucosiden wie z. B. Cellobiose und einen Aryl- β -Glucosidasentyp, der bevorzugt 2 Glucoside von aromatischen Verbindungen abspaltet.

β -Glucosidase findet sich in der Natur in vielen Pflanzensamen. Das Enzym wurde als „Emulsin“ in süßen Mandeln entdeckt und auch heute wird es noch hauptsächlich aus Mandeln gewonnen. Später allerdings stellte sich heraus, dass es sich bei „Emulsin“ um ein Gemisch verschiedener Enzyme handelt. β -Glucosidase kommt außerdem noch in einigen Hefen, *Aspergillus*- und *Trichoderma*-Arten sowie in Bakterien, vor (Stellmach et al. 1988).

Das Cellulase-System von cellulolytischen Schimmelpilzen enthält nur kleine Mengen gewöhnlicher β -Glucosidase (Leclerc et al. 1986). MacKenzie und Patel (1986) berichteten, dass Bakterien auch eine β -Glucosidase produzieren können, um Glucose und Cellobiose gleichzeitig anaerob zu vergären und Ethanol zu produzieren.

Viele Hefegattungen und Arten, einschließlich die traditionelle Weinhefe *Saccharomyces sp.*, besitzen Glucosidaseaktivitäten. *S. cerevisiae* produzierte β -Glucosidase, während Schimmelpilze kleine Menge ins flüssige Medien verbrachten (Zoecklein et al. 1997 und dort zit. Literatur). *S. cerevisiae* trägt bei der Gärung mit β -Glucosidaseaktivität bei. Die β -Glucosidaseaktivität wurde in der Zelle und außerhalb der Zelle gefunden (Sandhu et al. 1984, Anonymus 1980).

Laffort et al. (1989) wiesen darauf hin, dass diese Hefestämme das Weinaroma als ein Resultat der Hydrolyse konjugierter Aromaprecursor beeinflussen können. Die Zusammensetzung des Weines veränderte sich als Resultat enzymatischer Hydrolyse zellulärer Bestandteile (zit. in Zoecklein et al. 1997). Die meisten Untersuchungen der

β -Glucosidaseaktivität von *S. cerevisiae* richteten sich auf ihre Einsatzmöglichkeiten zur Verwertung von Cellobiose zu Alkohol (Sandhu et al. 1984, Mateo und Jiménez 2000). Mateo und Di Stefano (1997) haben die β -Glucosidaseaktivität in anderen Stämmen von *Saccharomyces* auf Grund der hydrolytischen Aktivität auf para-Nitrophenyl- β -D-Glucoside (p-NPG) getestet. Bei Enzymen von Mikroorganismen unterscheidet man zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Vorkommen. Die Funktion der intrazellulären Enzyms ist noch unklar, sie spielt wahrscheinlich eine Rolle beim Abbau bestimmter Oligosaccharide und bei der Glycoproteinsynthese. Das extrazelluläre Enzym ermöglicht es der Hefe, β -D-Glucoside als Energiequelle zu nutzen (Woodward und Wiseman 1982).

β -Glucosidase wird hauptsächlich bei der Herstellung von Getränken verwendet. Das Enzym baut β -Glucane ab, so dass Filtrationsschwierigkeiten vermieden werden (Stellmach et al. 1988). Die geeignetsten enzymatischen Präparate, die während des Weinherstellungsprozesses benutzt werden sollten, sind solche, die β -D-Glucopyranosidase, α -L-Arabinofuranosidase, α -L-Rhaffinopyranosidase und β -D-Apiofuranosidase Aktivitäten besitzen (Mateo und Jiménez 2000). Die optimalen Reaktionsbedingungen von β -Glucosidasen sind sehr von der Herkunft des Enzyms und dem Substrat abhängig. Der optimale pH-Bereich reicht von pH 4,5 – 8,8. Schwermetalle haben eine reversible inaktivierende Wirkung Oxidantien wie z. B. Ozon, bewirken eine vollständige Inaktivierung des Enzyms (Stellmach et al. 1988). Es gibt β -Glucosidasen, die auch bei niedrigem pH-Wert (optimaler pH-Wert 3,5) funktionieren, sie ist sehr stabil und hatten Aktivität in Gegenwart von Ethanol und Vasserot et al. (1991) isolierten die extrazelluläre β -Glucosidase aus *Candida molischiana* 35, die bei niedrigem pH-Wert aktiv ist (Janbon et al. 1995).

Die mögliche Verwendung der Glycosidasen für die Erweiterung des Aroma von Weintraubenmost und der hergeleiteten Getränken wird betont. Weiterhin kann die Verbesserung des Geschmacks von Most und Wein durch die Anwendung von Enzymen ermöglicht werden (Gunata et al. 1988 und 1990a).

8.3 Glycoside und Glycosidase

Die aromatischen Bestandteile einiger Traubensorten sind in den Beeren in freier Form oder gebunden an Zucker im Form von Glycosiden vorhanden (zit. in Williams et al. 1982b). Die aromagebenden Glucoside in den Weinbeeren sind hauptsächlich Monoterpenverbindungen

(Bayonove et al. 1984, Gunata 1984 zit. in Rapp 1989). Im allgemeinen ist die Menge glycosidgebundener-Formen höher als die der freien Terpene (Gueguen et al. 1996).

Die natürlichen glycosidischen Precursoren bilden ein wichtiges Aromapotenzial in Mosten und Weinen, weil sie während des Gärungsprozesses sehr leicht hydrolysiert werden (Gunata et al. 1988 und 1990a).

Ein bedeutender Anteil der Monoterpenverbindungen in Weintrauben ist in Form von Diglycosiden anwesend. Sie bestehen aus 6-O- α -L-Rhamnopyranosyl- β -D-Glucopyranosiden und 6-O- α -L-Arabinofuranosyl- β -D-Glucopyranosiden (Gunata et al. 1990a), wie auch aus 3-(hydroxymethyl)-D-Erythrofuranosiden (Williams et al. 1982b, Zoecklein et al. 1997).

Der Mechanismus der Glycosid-Hydrolyse wurde von Gunata et al. (1988) durch die Aktivität von α -L-Arabinofuranosidase, α -L-Rhamnopyranosidase und β -D-Glucopyranosidase auf p-Nitrophenyl und Weintrauben Monoterpenyl-disaccharidglycosiden beschrieben. Die (1 \rightarrow 6) Bindung wird entweder durch α -L-Arabinofuranosidase oder α -L-Rhamnosidase gespalten. Arabinose, Rhamnose und die entsprechenden Monoterpenyl β -D-Glucosiden werden freigesetzt. Die Freisetzung der Monoterpenole erfolgt dann durch eine β -D-Glucosidase.

Die enzymatische Hydrolyse von Glycosiden wird mit verschiedenen Enzymen durchgeführt, die in regelmäßiger Folge in zwei Schritten ablaufen (Chassagne et al. 1999, Mateo und Jiménez 2000):

- zuerst, spalten α -L-Rhamnosidase, α -L-Arabinosidase oder β -D-Apiosidase die entsprechenden Zucker von den Diglucosiden ab. Rhamnose, Arabinose oder Apiose werden freigesetzt. Die β -D-Glucoside werden freigesetzt.
- Nachfolgend werden die Monoterpenole durch die Aktivität der β -D-Glucosidase, unter Abspaltung von Glucose, freigesetzt. Dabei entstehen nicht nur Terpene, sondern auch C₁₃-Norisoprenoide, wie 3-keto- α -Ionol und 3-hydroxy- β -Damascenon aus ihren Glycosiden.

Die geruchlosen Monoterpenyl-Glycosiden (wie Monoterpenyl β -D-Glucosiden) können durch Säuren oder Enzyme hydrolysiert werden, um flüchtige aromatische Verbindungen zu erhalten. Gunata et al. (1990a) beschreiben, dass die Hydrolyseeffizienz von Monoterpenyl β -D-Glucosiden von Weintrauben durch β -Glucosidasen aus süßen Mandeln und Pilzen (*Aspergillus niger*) von der Struktur des Aglycons und dem Ursprung des Enzyms abhängig ist.

Aglycon und Glucose werden durch die Aktivität einer β -D-Glucosidase befreit (Chassagne et al. 1999). Die Aglyconbestandteile von Disaccharid-Glycosiden sind Terpenkomponenten (Williams et al. 1982b, Bayonove et al. 1984 zit. in Rapp 1989). Diese Aktivitäten wurden mit spektrometrischen Messungen von p-Nitrophenol (pNP) bestimmt, welches durch Hydrolyse des korrespondierenden pNP-Glycoside freigesetzt wurde (Gunata et al. 1988, Chassagne et al. 1999).

Eine nicht flüchtige gebundene Fraktion wurde aus Disaccharid-Glycosiden gebildet, nämlich α -L-Arabinofuranosyl- oder α -L-Rhamnofuranosyl- β -D-Glucopyranosiden mit ihren Aglyconen (nicht Zuckern), die Aglycone waren α -Terpenol, α -Terpene-diol, 2-Phenylethanol und Benzyl-Alkohol. Der glycosidische Teil enthält Glucose, Rhamnose und Arabinose. Die Identität des Aglycons wurde nach Analyse von Pentanextrakten durch (GC—MS) bestimmt (Wilson et al. 1984, Williams et al. 1982a, 1982c, Gunata et al. 1985b). Diese Disaccharid-Glycoside nehmen im Most in ihrer Konzentration mit der Beerenentwicklung zu (Aryan et al. 1987).

Seit dem ersten Bericht über das Auftreten von Terpenglycosiden (an Zucker gebundene Aromastoffe) in Pflanzen finden gebundene Formen von Aromastoffen ein steigendes Interesse (Matheis 1989). Das aromatische Potential steigt während der Fruchtreifung durch die Aktivität der endogenen Weintrauben-Glycosidasen α -Arabinosidase, α -Rhamnosidase, β -Glucosidase (Gunata 1984 zit. in Gueguen et al. 1996) und möglicherweise β -Apiosidase (Zoecklein et al. 1997) an. Die Freisetzung der gebundenen Aromastoffe durch β -Glucosidase ist wirksamer und genauer als die durch Säurehydrolyse. Solche Aromaprecursor werden auch in anderen Früchten gefunden (Mango, Passionsfrüchte usw.) und sind an Glucose gebunden (Janbon et al. 1995).

In unreifen Beeren waren alle Glycosidaseaktivitäten schwach. Mit der Fruchtreifung nahm sie zu (Aryan et al. 1987). Die β -Glycosidase war fähig p-Nitrophenyl-Glycoside (p-NPG) sowohl von Glucose als auch von Galactose zu hydrolysieren (Heyworth und Walker 1962 zit. Aryan et al. 1987). Glycosidasen, die in den Beerenhäuten enthalten sind, haben einen anderen Wirkungsmechanismus gegen gebundene Terpene als das pektolytische Enzym Pectinase C, das im Handel erhältlich ist (Di Stefano 1989). Bei der Untersuchung von Traubenbeeren zeigte sich, dass die β -Glycosidase in der Beerenhaut gegenüber den p-NPG eine hohe Aktivität besitzen. Die Aktivität von β -Glycosidasen liegt zwischen pH-

Werten von 3.2 bis 5.5 (Di Stefano 1989). Über freie β -Glycosidase Enzyme berichtete Aryan et al. (1988). Der optimale pH-Wert liegt bei 5—5,5. Eine sehr kleine Menge von C6-Alkoholen in den Methanol-Extrakten hemmt die enzymatische Aktivität (Glycosidase) total (zit. in Di Stefano 1989).

Anfang der achtziger Jahre wiesen verschiedene Arbeitsgruppen solche Precursor in Wein, Most und Teeblättern nach (Fischer et al. 1987) aus einem Pflanzenmaterial-extrakt, der keine flüchtigen Verbindungen enthielt, wurden durch Behandlung mit Glycosidasen flüchtigen Aromastoffe freisetzen (Matheis 1989).

Die Möglichkeit einer schnellen Freisetzung des Aromas von Terpenen in einem kontinuierlichen Prozess könnte deshalb von großem Interesse in der Weinbereitung und in der Fruchtsaft-Industrie sein (Gueguen et al. 1996). Diese Terpenverbindungen gehören zu den sekundären Pflanzenbestandteilen, bei denen die Biosynthese mit Acetyl-coenzyme A (CoA) beginnt (Manitto, 1981). Terpene spielen eine bedeutungsvolle Rolle im Varietal-Flavour von Weinen. In den Beeren kommen sie in der Haut vor und sind an Zucker gebunden (Di Stefano 1989, Mateo und Jiménez 2000).

Viele wichtige Terpene sind auch nach der Gärung zum Teil noch glycosidisch gebunden und dadurch geruchlich und geschmacklich nicht wahrnehmbar. Enzympräparate mit β -Glucosidase-Begleitaktivität können zur Freisetzung glycosidisch gebundener Terpenen beitragen und damit den Sortentyp und -charakter betonen (Binder 1999). Terpenmuster unterscheiden sich abhängig von den Sorten (zit. in Di Stefano 1989). Bei der Klassifikation mehrerer Traubensorten, die auf dem Monoterpeninhalt basiert, gehören Riesling, Sylvaner, Müller-Thurgau und Schonbürger zu den nicht-Muscat Aroma Sorten, während Chardonnay, Ruländer, usw. als neutrale Sorte bezeichnet werden. Eine enzymatische Hydrolyse von glycosidischen Extrakten von Riesling, Chardonnay, Muscat und anderen Sorten haben nicht nur die Befreiung von Terpenen, sondern auch von C₁₃-Norisoprenoiden, wie 3-keto- α -Ionol und 3-hydroxy- β -Damascenon angeregt (Gunata et al. 1990 zit. in Mateo und Jimenez 2000).

8.4 Weintrauben β -Glucosidase

β -D-Glucosidase ist nicht nur bei den Hefen, sondern bei den Früchten selbst, besonders in Weintrauben natürlich vorhanden. Weintrauben haben β -Glucosidase Aktivität aber nur

niedrige α -Rhamnosidase, α -Arabinosidase oder β -Apiosidase Aktivitäten (Mateo und Jiménez 2000 und dort zit. Literatur).

Die β -Glucosidasen der Beeren und Blättern haben ihren optimalen beim pH-Wert um 5,0. Sie werden durch das Vorkommen von Glucose gehemmt. Sie bestehen aus zwei trennbaren Proteinen, von denen jedes fähig war p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid zu hydrolysieren. Diese Hemmung durch Glucose und der geringe natürliche pH-Wert (3,0 bis 4,0) im Most genügen, die natürliche β -Glucosidase zu inaktivieren. Denn β -Glucosidasen, die im Traubenmost gefunden wurden, haben ihre optimale Aktivität bei pH-Wert 5,0. Sie waren relativ tolerant gegenüber 10% Ethanol, wurden jedoch durch Glucose gehemmt. Die mit der Beerenreife zunehmende β -Glucosidase im hatte in Gegenwart von Glucose keine Aktivität (Aryan et al. 1987, Gunata et al. 1989).

Außer *Botrytis cinerea*, den hauptsächlichen Schimmelpilz auf Trauben, entwickeln sich viele Spezies wie *Penicillium* und *Aspergillus* auf Weintrauben. Von *Aspergillus* wurde berichtet α -Arabinosidase und α -Rhamnosidase zu produzieren. Dies möglicherweise wegen der Gluconsäure, die durch *Botrytis* und die andere Schimmelpilze produziert wurde. Sie und Gluconolacton sind eine sehr starke Hemmsubstanz gegen Schimmelpilze, Bakterien und Pflanzen. Gluconolacton hemmte bei 5 g/l die Weintrauben β -Glucosidaseaktivität total (Gunata et al. 1989 und dort zit. Literatur).

IX. Untersuchungsmethoden zum Nachweis des Aromastoffes TDN in Wein und in weinähnlichen Medien

Der Wein enthält mehrere hundert flüchtige Aromastoffe, die durch ihre Mengenabstufung in einem weiten Konzentrationsbereich (ng – mg/l) entscheidend zum Aroma beitragen (Schreier und Drawert 1974). In den Aromaextrakten der Weine konnten jeweils ca. 60 verschiedene flüchtige Komponenten in einem Konzentrationsbereich zwischen über 50 mg/l bis zu 0,01 mg/l nachgewiesen werden. Weine enthalten noch weitere, mehr als hundert Komponenten, im Spurenbereich (unter 0,01 mg/l), die ebenfalls das Weinaroma deutlich prägen können (Köhler et al. 1995).

Der totale Gehalt aromatischer Substanzen in Wein erreicht bis zu 0,8–1,2 g/l (ca. 1% vom Ethanolgehalt). Die während der Gärung gebildeten Substanzen, nämlich, 2-Methylpropanol-1, 3-Methylbutanol-1, 2-Methylbutanol-1 und 2-Phenylethanol waren etwa 50% von der Gesamtsumme. Der Rest wurde unter 400–600 aromatischen Substanzen verteilt. Dies bedeutet, dass diese Konzentrationen zwischen 10^{-4} und 10^{-9} g/l je Substanz betragen (Rapp et al. 1978). Das flüchtige Weinaroma enthält vergleichsweise sehr viele unpolare Verbindungen wie z. B. Kohlenwasserstoffe und Ester (Schreier und Drawert 1974).

Bei solch geringen Mengen sind die Grenzen der organoleptischen Untersuchung des Weines durch den Menschen weit überschritten. Die meisten Aromakomponenten des Weines liegen weit unter dem erkennbaren Schwellenwert für den Menschen. Eine Weinbeurteilung wird in der Regel an Hand des gesamten oder um mit Teilausschnitten der Aromakomposition getroffen. Zur analytischen Bestimmung der im Wein vorkommenden Einzelkomponenten bedarf es eines Verfahrens, welches das Vielstoffgemenge Weinaroma in seine einzelnen Aromakomponenten auftrennt (Rapp 1989).

Um die Prozesse der TDN-Bildung sowie dessen Entwicklung in Wein zu verdeutlichen, wurden die Beobachtungen auch auf die vorkommenden Einzelkomponenten sowie auf Carotinoid-Traubenextrakte in weinähnlichen Medien ausgedehnt. Gleichzeitig konnten auch die Verhältnisse des Carotinoidabbau während und nach der Gärung beobachtet werden.

Zum Nachweis der Verbindung TDN wird die Gaschromatographie-Massenspektrometrie nach Probeaufbereitung durch flüssig-flüssig Extraktion mit geeigneten Lösungsmittel eingesetzt und die Gerätebedingungen waren wie in folgender Abbildung beschrieben.

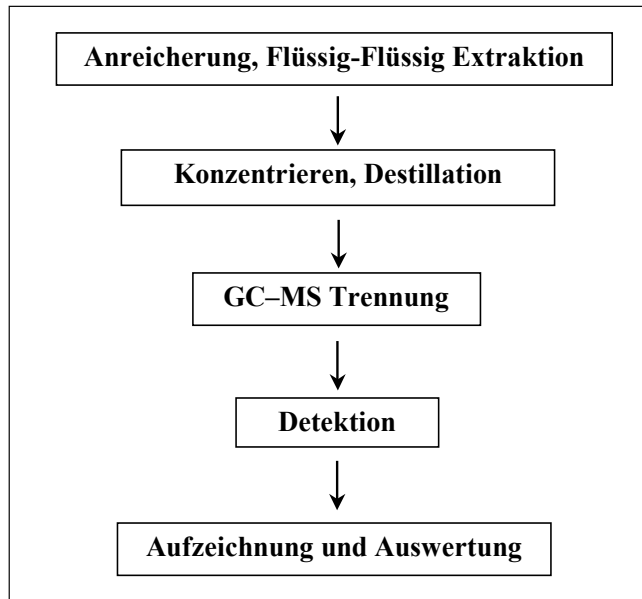


Abb. 30: Schematische Darstellung des Nachweises von TDN

9.1 Extraktion

Der Nachweis von Stoffen in komplexen natürlichen Gemischen erfordert meist eine intensive Probeaufarbeitung, damit eine anschließende Analyse mittels Gaschromatographie und Detektor erfolgreich durchgeführt werden kann. Um diese Aromabestandteile zu verfolgen und zu analysieren, ist ein Konzentrationsschritt notwendig. Das Konzentrationsverfahren für die Anreicherung von Aromasubstanzen muss so vorsichtig durchgeführt werden, dass Artefakte vermieden werden, da sonst die Beurteilung der Entwicklung der authentischen Aroma-Zusammenstellung unmöglich ist.

Eine Anreicherung von Weinaromen kann durch verschiedene Methoden u.a. Destillation, Aussalzen, Ausfrieren und Extraktion erreicht werden (Rapp et al. 1978).

9.1.1 Direkt Solvent Extraktion

Lösemittel-Extraktion ist die normale Methode für die Untersuchung wässriger Extrakte. Die Verwendung von Dichlormethan ist dabei weit verbreitet. Diese Technik besteht im Grunde aus mehreren manuellen Extraktionen, der mit Natrium-Sulfat oder Natrium-Chlorid gesättigten Proben in Schütteltrichtern (Alberola und Izquierdo 1978).

9.1.2 Flüssig-flüssig Extraktion

Die Extraktion kann auch durch eine kontinuierliche Extraktion in einem Flüssig-flüssig Extraktor erfolgen. Dabei wird das Emulsionsproblem, das beim Ausschütteln der Proben oft auftritt, vermieden (Alberola und Izquierdo 1978).

Ein geeignetes Lösungsmittel muss einen niedrigen Siedepunkt haben, es muss in höherer Reinheit erhältlich sein und eine effektive Extraktion der Aromabestandteile erlauben (Rapp et al. 1978). Hierzu eignen sich verschiedene Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische (wie Dichlormethan, Freon, Cyclohexan u.a.). Besondere Anforderungen, die an diese Lösungsmittel gestellt werden sind:

1. ein hoher Reinheitsgrad,
2. eine geringe Löslichkeit für Ethanol (besonders in der „ethanolischen Matrix“ Wein)
3. ein niedriger Siedepunkt (zit. in Rapp et al. 1976, Alberola und Izquierdo 1978).

Die verwendeten Extraktionsmittel sollten gut mit den Aromastoffen mischbar sein und mit dem Träger dieser Substanzen, dem Wein, eine gute Phasentrennung ausbilden. Zur Extraktion TDNhaltiger Proben wird ein Flüssig-flüssig Extraktor eingesetzt. Nach dem schonenden verdampfen des Lösungsmittels wurde der Extrakt im Gaschromatograph mit Massenspektrometrie direkt analysiert.

Ein für diesen Prozess geeignetes Extraktionsmittel stellt Dichlormethan dar. Dichlormethan (CH_2Cl_2), ein nicht brennbares Lösungsmittel. Es ist wie alle chlorierten Kohlenwasserstoffe toxisch (X_n). Der MAK-Wert wird von der BG-Chemie mit 360 mg/m^3 oder 100 ml/m^3 Luft angegeben (Römpp Lexikon 1995). Zur Durchführung der Extraktion diente eine spezielle Extraktionsapparatur „Freonextraktor“ wie Abb. 31 (Rapp et al. 1976) mit folgenden Bedingungen:

Wasserbad Temperatur	: 55°C .
Kühlertemperatur	: $0-5^\circ\text{C}$
Probenmenge	: 100 ml
Extraktionsmittelmenge	: 75 ml

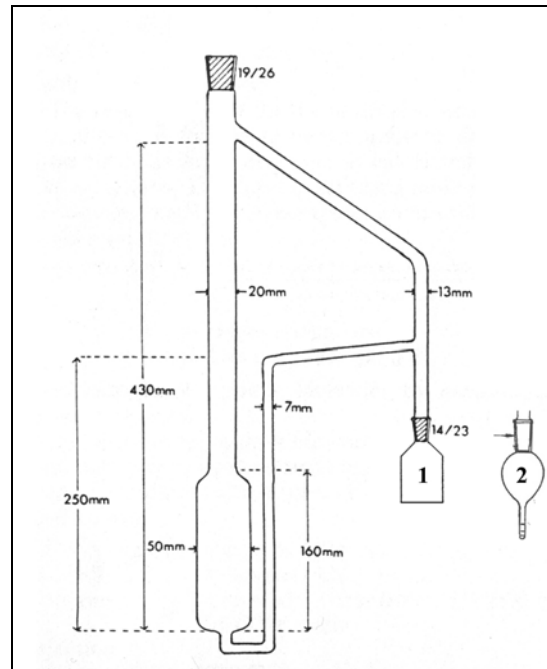


Abb. 31: Extraktionsapparatur zur Anreicherung der Aromastoffe (ohne Kühleraufsatz)

Ausführung:

Zu Beginn wird eine Steilbrustflasche (1) am Freonextraktor befestigt, und mit einer Klammer gesichert. Danach werden in den Freonextraktor vorsichtig 75 ml Dichlormethan eingegossen, anschließend 100 ml Probe. Zwischen Probe und Lösungsmittel findet keine Vermischung statt, sondern die Phasen bleiben klar getrennt. In die Steilbrustflasche darf nur Lösungsmittel aber keine Probe gelangen. Der derartig vorbereitete Freonextraktor wird so an einem Dimrotkühler befestigt, dass die Steilbrustflasche bis zum oberen Rand in ein auf 55°C eingestelltes automatisches Wasserbad taucht.

Da das Extraktionsmittel Dichlormethan einen relativ niedrigen Siedepunkt (48°C) hat, verdampft es bei einer Wasserbadtemperatur von 55°C in der Steilbrustflasche und steigt in der Glasapparatur bis in den Dimrotkühler hoch. Durch eine Kühltemperatur von 2-5°C kondensiert Dichlormethan dort, so dass es zu keinen Verlusten des Lösemittels kommt. Hat sich genügt Dichlormethan auf der Oberfläche der zu extrahierenden Lösung angesammelt, fällt der Extraktionsmitteltropfen aufgrund des Dichteunterschieds und der Schwerkraft durch die zu extrahierende Lösung nach unten. Während des Falls lösen sich in der Probe enthaltene Aromasubstanzen im Extraktionsmittel und sammeln sich mit diesem im Bodenraum der Glasapparatur an. Je nach Höhe des Flüssigkeitsspiegels innerhalb der Glasapparatur fließt dann das Lösungsmittel mit den darin gelösten Aromasubstanzen über die Rückflussleitung in die Steilbrustflasche zurück. Hier beginnt der Kreislauf dann von

Neuem. Die Extraktion erfolgt über eine Zeitspanne von 24 Stunden. Der Extrakt wird mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und in einen ausgezogen 100 ml Spitzkolben (2) überführt. Unter Verwendung einer 30 cm Vigreux-Kolonne wird bei einer Temperatur von 50°C auf ein Volumen von ca. 0,5 ml eingengt. Diese Extrakte werden in geeigneten Fläschchen bei -18°C zur Analyse gelagert.

9.2 Grundlage der Chromatographie

9.2.1 Gaschromatographische Bedingungen

Spezifikation der Trennsäule

Zur gaschromatographische Untersuchung diente ein Gas Chromatograph Hewlett Packard Series II 5890.

Die Anreicherung der Aromastoffe führt zu Aromakonzentraten, die aus vielen hundert Einzelkomponenten bestehen. Aroma-Konzentrate sind komplexe Mischungen von Verbindungen verschiedenartiger Polarität (Alkohole, Ester, Kohlenwasserstoffe, Säuren und weitere) mit unterschiedlichem Siedepunkte (50–350°C) und einem über mehrere Zehnerpotenzen schwankenden Konzentrationsbereichs (10^{-2} bis 10^{-10} g/l). Die Trennung in diesem weiten Konzentrationsbereich ist sehr schwierig und erfordert Trennsäulen mit hoher Trennleistung (Rapp et al. 1978). Dies wurde erst durch die Anwendung der Kapillarchromatographie und hier insbesondere durch Verwendung geeigneter Glas- und Quarzkapillarsäulen ermöglicht (Rapp et al. 1978, Jennings 1980, Rapp 1981, Marais 1986).

Die Trennung der TDN-haltigen Komponenten wurde auf Kapillartrennsäule HP 20M (mit der Trennphase Carbowax 20 M) 50 m Länge, 0,32 mm i.D und 0,3 µm Schichtdicke von Fa. Hewlet Packard und auf Supelcowax 10; 60 m x 0,32 mm x 0,5 µm Schichtdicke von Fa. Supelco vorgenommen. Das Injektionssystem wurde durch das Kaltaufgabesystem Modell 504 der Fa. Gerstel kontrolliert, das mit einer Haltezeit von 10 s bei 36°C, einer Aufheizrate von 12°C/s auf 240°C und einer Haltezeit von 300 s sowie einer splittlose Zeit von 40 s betrieben wurde.

Geräteeinstellung:

1. Der Gaschromatograph:

Typ	: HP 5890 Series II
Detektor	: Massenspektrometer
Split	: 20 s
Anfangtemperatur	: 40°C
Injektortemperatur	: 190°C

Temperaturprogramm	: 40-230°C
Steigungsrate	: 4°C/min
Trennsäule	: mod. Carbowax
Innendurchmesser	: 0,25 mm
Trägergas	: Helium (4.6) mit einem Trägergasfluß von 2 ml/min und einer linearen Trägergasgeschwindigkeit von 50 cm/s bei 60°C.
Probemenge	: 1 µl

2. Das Massenspektrometer:

Typ	: Varian Mat S44
Scanzeit	: 1 s
Selektive Massen	: 102, 128, 142, 157, 172, m/e
Schwellenwert	: 1,0
Multiplier	: 2000 V

9.2.2 Das Massenspektrometer

Das Prinzip eines Massenspektrometers wird auf der Tatsache gegründet dass geladene Teilchen (Ionen) zu einer bestimmten kinetischen Energie in einem elektrischen Feld beschleunigt wurden, sie wurden in einem nachfolgenden magnetischen Feld-Pfad, der sich nach ihrem Massen Verhältnis unterscheidet. Die Vorteile von computerisierten GC/MS Systems sind, dass der GC Ausfluss massenspektrometrisch in kurzen Intervallen gemessen wird. Das stellt dem Ermittler die vollständigen MS Informationen der Analysen zur Verfügung; auf Anfrage kann das Computer-System das totale Ionen-Chromatogramm reproduzieren, jedes einzelnes Massenspektrum bei jeder Retentionszeit von Interesse und dem Massenfragmentogram für irgendeinen gewählten m/e-Wert (De Brauw 1981).

Massenfragmentographie ist eine sehr wichtige Technik, die dem Ermittler ermöglicht, jede gewählte Masseneigenschaft der Verbindungen zu lokalisieren, deswegen ist es auch eine große Hilfe für die Spektroskopisten bei der Einschätzung nicht-separierter GC-Peaks. Um festzustellen ob ein GC-Peak mehr als eine Verbindung enthält, ist es notwendig, mehr Spektren von jedem GC-Peak aufzunehmen und dann ihre Änderungen in Fragment-Muster zu studieren. Es ist Tatsache, dass die Einschätzung von Hunderten von Massenspektren, die aus ein komplexen GC/MS Analysen resultieren, nur mit einem computerisierten GC/MS System hinreichend geleistet werden kann. Die Einzelkomponenten des Stoffgemisches verlassen gemäß ihrer Retentionszeit die Kapillarsäule des Gaschromatographen und gelangen direkt in die Hochvakuumionisationskammer des Massenspektrometers (De Brauw 1981).

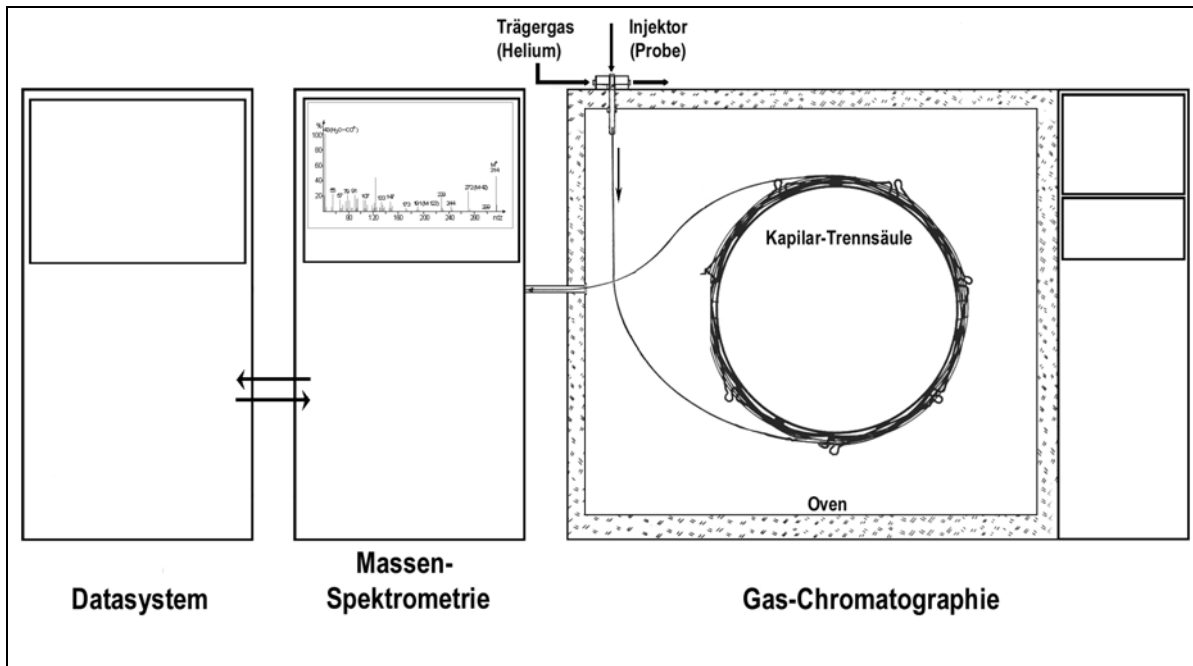


Abb. 32: Schematische Darstellung eines Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Systems

9.3 Auswertung und gaschromatographischen Analyse

9.3.1 Quantitative Bestimmung mittels internem Standard

Die Zugabe des „Internem Standard“ dient der Eliminierung der Fehler bei der Aufarbeitung, Anreicherung und Auftrennung der Probe. Als Interner Standard wurden 100 µl Standard (50 mg/l Naphthalin in Ethanol p.A.) zugegeben, was jeweils einer Zugabe von 50 µg/l Wein entspricht.

Die Feineinengung auf ca. 500 µl erfolgte unmittelbar vor der Analyse durch leichtes Überströmen der Probe mit Stickstoff-Gas.

9.3.2 Die Identifizierung und Quantifizierung von TDN

Die Identifizierung und Quantifizierung von TDN erfolgte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie mit Naphthalin als internem Standard, als Vergleich diente das Massenspektrum des reinen TDN (Sponholz und Hühn 1997). Massenspektren von TDN sind in der Tabelle 4 dargestellt:

Tabelle 4: Massenspektren von TDN

Massenspektren (m/z %)	Referenz
157(100), 142(66), 141(45), 128(35), 115(51), 77(36), 51(26), 43(47), 37(67), 27(74)	Stevens et al. (1975)
172(21), 158(7), 157(100), 143(3), 142(50), 141(24), 129(4), 128(7), 115(11), 77(6), 76(2), 51(3), 39(2)	Marais (1992)
172(25), 158(13), 157(100), 143(5), 142(55), 141(28), 129(7), 128(12), 127(3), 115(17), 77(13), 76(4), 71(3), 63(5), 51(4), 39(4)	Simpson (1978a)
172, 157, 142, 128, 102 als Meßionen	Sponholz (1997) nach mündlicher Information)

Die Identifikation des TDN erfolgte durch den Vergleich der Chromatogramme und der Massenspektren (Abb. 33) der synthetisierten Reinsubstanz TDN (Sponholz und Hühn 1997) und den hergestellten Probeextrakten.

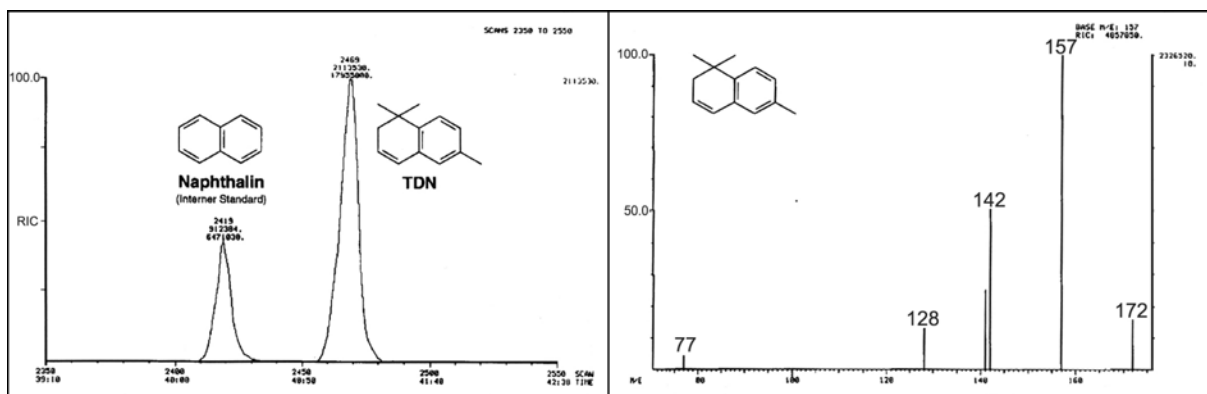


Abb. 33: TDN (1,1,6-Trimethyl-1,2-Dihydronaphthalin) Peak und Massenspektrum Reinsubstanz

Zur weiteren Bestätigung der Identifikation wurde die Retentionszeitdifferenz zwischen dem „Internen Standard“ Naphthalin und TDN herangezogen.

Die gaschromatographisch-massenspektrometrisch ermittelten Werte der Alterungssubstanz TDN wurden anhand des Peakhöhenvergleichs der Hauptmasse von Naphthalin m: 102 und der Hauptmasse von TDN m: 142 quantifiziert. Die Bestimmung erfolgt nach dem Hauptmassenvergleich zwischen TDN und Naphthalin. Unter der Berücksichtigung der Zugabe von 50 µg/l Naphthalin als „Internem Standard“ zur Probe vor der Extraktion ergibt sich die Quantifizierung des TDN.

9.3.3 Bestimmung des potenziellen TDN

Eine Kombination von Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, und verwendete Medien können wahrscheinlich die Entwicklung von TDN aus seinen Precursoren beeinflussen. Bei einem

Versuch von Marais (1992), um mögliche Degradationsprodukte von Lutein und von β -Carotin zu verfolgen, wurden die Reinsubstanzen Lutein und β -Carotin bei pH 1 und 3 über 4 Stunden bei 50°C in H₂SO₄- bzw. in Weinsäure-Lösung hydrolysiert. Aus der Reinsubstanz Lutein wurde eine relativ große Quantität von TDN produziert.

Um eine mögliche Bildung von TDN (potenzielles TDN) in Wein oder weinähnlichen Medien festzustellen, wurde eine künstliche Alterung durchgeführt. Die künstliche Alterung wurde durch Säurehydrolyse von 100 ml Probe mit Weinsäure, Äpfelsäure sowie H₂SO₄ bei pH Wert 1 bis 3 unter Wärmebehandlung durchgeführt. Zur künstlichen Alterung wurden Proben in Steilbrustflasche umgefüllt. Nach der Übersichtung mit N₂ wurden die Flaschen mit einer Kappe versehen und mit Parafilm abgedichtet. Die Proben kamen für 4 Stunden in ein 50°C warmes Wasserbad. Nach der Wärmebehandlung wurden die Proben gekühlt und dann nach dem Zusatz von 100 μ l Standard (50 mg/l Naphthalin in Ethanol p.A.) extrahiert.

Für Bestimmung des potenziellen TDN-Gehaltes nach Säurehydrolyse wurden die Reinsubstanzen Lutein, β -Carotin, und Zeaxanthin sowie saponifizierter Carotinoideextrakt in einem simulierten weinähnlichen Medium hydrolysiert. Die Komposition und Konzentration der Substanzen wurden vorher mit „Internem Standard“, wie bei den anderen Probe durch HPLC bestimmt.

Der saponifizierte Extrakt von Traubenbeeren nach Periadnadi (1997 unveröffentlicht), der nur aus Carotinoiden besteht, wurde mehrmals mit Aceton:Methanol (1:1) gereinigt und bei niedriger Temperatur unter Vakuum getrocknet. Dieses Verfahren ist sehr wichtig, um den Extrakt von Fetten und ähnlichen Stoffen zu befreien, die bei der ersten THF (Tetrahydrofuran)-Extraktion mitgelöst werden. Reinsubstanzen, wie auch der gereinigte saponifizierte Carotinoideextrakt wurden mit kleinen Menge THF gelöst. Danach wurden sie in 100 ml simuliertes Wein-Medium gebracht, das vorher auf einem pH-Wert 1 bzw. 3 mit H₂SO₄ bzw. einer anderen Säure eingestellt war. Zum Schutz vor Oxidation wurde mit N₂-Gas überschichtet und mit einer Kappe gesichert. Nach vierstündiger Wärmebehandlung bei 50°C in einem Wasserbad und nach einer kurzen Abkühlzeit wurden die Proben mit Standard versetzt, anschließend im Extraktor mit Dichlormethan extrahiert.

Sowohl der pH-Wert, wie die erhöhte Temperatur der Proben konnten als eine künstliche Alterung zur Simulation einer Weinlagerung angesehen werden, um die TDN-Entwicklung zu beschleunigen zu beobachten. Die optimalen Bedingungen der Hydrolyse wurden

anhand des maximal erzeugten TDN-Gehaltes aus den Reinsubstanz-Precursoren sowie aus den gereinigten saponifizierten Carotinoide in diesem weinähnlichem Medium bestimmt.

9.3.4 Bestimmung des Potenziellen TDN-d₄

Bei einem Versuch TDN aus Heterosiden zu produzieren, hydrolysierten Versini et al. (1996) Heteroside aus Extrakten unterschiedlicher Rieslingweine während 1 bis 10 h bei einer Temperatur von 50°C und pH-Werten von 1,0 und 2,5 in D₂O. Die Hydrolyse isolierter Precursoren in D₂O bei pH 1,0 und 2,5 bei 80°C produzierte nur ein Isomer von TDN-d₄. Andererseits wurde eine TDN und TDN-d₄ Mischung produziert, wenn rohe Heteroside bei 50°C bei pH 2,5 in D₂O hydrolysiert wurde.

Zur Bestätigung von TDN-Vorkommen aus Carotinoiden (Lutein, β -Carotin und Zeaxanthin) wurde ein potenzieller TDN-Modellversuch von Reinsubstanz-Carotinoiden durch D₂O (²H₂O) und H₂O als Vergleich durchgeführt. Bei der Bestimmung des Potenziellen TDN-d₄ wurden in dieser Arbeit die Reinsubstanzen Lutein, β -Carotin, Zeaxanthin sowie gereinigter saponifizierter Carotinoideextrakt aus Wein als TDN-Precursor verwendet. Zur Bildung des TDN-d₄ Isomers wurde jede Probe (Reinsubstanzen und Carotinoideextrakt) gut in THF gelöst. 1 ml gelöste Extrakt-Probe wurde in 5 ml D₂O bei den pH-Werten von 1,0 bzw. 2,38 (pH-Wert D₂O) eingesetzt. D₂O mit einem pH-Wert 1,0 wurden durch Einstellung mit konzentrierter H₂SO₄ erreicht. Als Vergleich diente H₂O mit den gleichen pH-Werten.

Bei einer Temperatur von 50°C wurde die Probe 5 und 10 Stunden in dunklen Zustand erhitzt. Nach der Abkühlung wurde der Extrakt dann mit 10 ml Dichlormethan versetzt. Die Lösungsmittelschicht wurde nach 5 minutigen Schütteln herausgenommen und mit dem Internen-Standard Naphthalin versehen. Der Extrakt wurde nochmals mit 10 ml Lösungsmittel (Diethylether) abgezogen dann mit Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Der Extrakt wurde danach bei 50°C bis auf ca. 1 ml durch Destillation eingedampft. Die Feineinengung auf ca. 500 μ l erfolgte unmittelbar vor der Analyse durch leichtes Überströmen der Probe mit Stickstoff-Gas.

X. Untersuchungsmethoden zur Bestimmung von Carotinoiden in Trauben, Most, Wein und weinähnlichen Medien

Zur Beobachtung der TDN-Entwicklung während der Weinherstellung, ist es wichtig die Carotinoide in den Traubenbeeren, Mosten, Weinen und weinähnlichen Medien zu bestimmen, da die Carotinoide als die wichtigen Precursoren angesehen werden.

10.1 Nachweis der Carotinoide

Die Analyse von Carotinoiden ist wegen der Vielfalt der unterschiedlichsten Substanzen und wegen des Vorkommens isomerer-Formen kompliziert. Die Komplexität der Carotinoidmischungen bei verschiedenen Pflanzen, sowie die unterschiedliche Polarität ihrer Verbindungen macht es schwierig die Trennung der Carotinoide in einem einzelnen Lauf zu erhalten (Cert et al. 2000). Aus den gleichen Gründen gibt es auch kein Standardextraktionsverfahren für Carotinoide (Oliver und Palou 2000).

Klassische Methoden der Carotinoidanalyse schließen die Extraktion aus den Pflanzengewebe mit Lösungsmitteln, eine Saponifikation des Extrakts, eine chromatographische Trennung der Carotinoide und die Quantifizierung ein. Das Verfahren wie es vom AOAC (Association of Analytical Communités) vorgeschlagen wird, ist kompliziert und führt zu unbefriedigenden Ergebnissen. Das AOAC Verfahren unterscheidet nicht zwischen einzelnen Carotinoiden, sondern liefert einen Summenparameter. Carotenoidester werden dabei hydrolysiert. Eine schnelle Analyse von Carotinoiden ist erforderlich, um die Bildung von Abbauprodukten, Artefakten und Isomeren während der Aufarbeitung zu minimieren (Philip und Chen 1988).

Die Analyse von Pflanzen-Pigmenten erfolgt mittels Säulen-Flüssigchromatographie. Die Trennung und Analyse von Chlorophyllen, Carotinoiden, Xanthophyllen und verwandten Pigmenten hat in der letzten Zeit eine wesentliche Verfeinerung erfahren (Danehower und Kelley 1990). Heute existieren zahlreiche Methoden für die Analyse von Pflanzen-Pigmenten. Prinzipielle Kriterien für moderne Methoden von Pflanzenpigmentanalyse sind, dass sie schnell sind, einen Abbau der Pigmente vermeidet, und zugänglich automatisierbar sind (Danehower und Kelley 1990). HPLC ist eine sehr empfindliche Analysen-Methode, daher wird nur eine geringe Menge Probe (1 g oder weniger) für die Analysen benötigt (Hsieh und Karel 1983).

10.1.1 Bedingungen für die Probenaufbereitung

Die HPLC Analyse von Carotinoid-Verbindungen erfordert normalerweise eine Probenvorbereitung, meist sind es langwierige Extraktionsmethoden mit zahlreichen Schritten (Ibanez et al. 1998).

Normalerweise besteht eine solche Vorbereitung aus der Herstellung eines rohen Lipoidextraktes. Durch die Extraktion mit Aceton oder THF, anschließend meist gefolgt von einer Saponifikation und Reextraktion mit einem anderen organischen Lösungsmittel, wie Diethylether. Das Auslassen der Saponifikation vereinfacht die Probenvorbereitung (Lambert et al. 1985).

Probleme ergeben sich auch aus den vielen konjugierten Doppelbindungssystemen der Carotinoide. Eine hohe Instabilität besteht besonders zu Licht, Sauerstoff und Hitze, sauren und alkalischen Zuständen. Diese können auf bestimmte Carotinoiden zerstörend wirken. Einige dieser Faktoren können den Abbau oder die Umwandlung von Carotinoiden bewirken und dadurch eine Veränderung der Carotinoidkomposition der Probe bewirken (Oliver und Palou 2000).

Bei der Vorbereitung von Carotinoidproben gelten als allgemeine Voraussetzungen zum Erreichen des gewünschten Zieles:

1. Der Versuch sollte bei dämmeriger Beleuchtung ausgeführt werden, um den Kontakt mit direktem Sonnenlicht zu vermeiden.
2. Die Konzentrierung sollte durch Rotationsverdampfung unter vermindertem Druck erfolgen.
3. Die Proben sollten im Dunkeln, unter Stickstoff oder Argon bei ca. -20°C gelagert werden (Oliver und Palou 2000).

10.1.1.1 Extraktion

Mehrere für Carotinoide geeignete Extraktionsverfahren werden in Literatur beschrieben. Nach Philip und Chen (1988) wird die Probe zuerst mit Magnesiumcarbonat zugesetzt, um die Pflanzensäuren zu neutralisieren und dann mit einem geeigneten Lösungsmittel zu extrahieren.

Die Isolation von Pigmenten von Pflanzengewebe bedarf normalerweise einer Mazeration des Gewebes, das durch wiederholte Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Methanol, Ethanol, Dimethylsulfoxid oder wässrigen-Lösungen durchgeführt wird (Daneshmandi und Kelley 1990). Die Extraktionsverfahren für Lebensmittel-Produkte

beginnen meist mit einem Extraktionsmittel wie Methanol oder einer Mischung von Methanol und anderen mehr apolaren Lösungsmitteln, z. B. Methanol-Tetrahydrofuran (THF) (1:1, v/v) Gemisch. Carotinoid-Analysen einer breiten Vielfalt von sowohl rohen als auch gekochten Gemüsen und Früchten wurden damit durchgeführt. Berichtet wird auch über den Gebrauch von Gemischen aus Methanol/Diethylether, Methanol/Chloroform, Hexan/Methanol und Aceton/Hexan. Andere Gruppen ziehen die Verwendung von Aceton allein vor oder in Kombination mit leichtem Petroleum. In ihrer Carotinoid-Analyse gebrauchen Chen et al. (1991 und 1994) eine komplexe Extraktionslösung, eine Mischung aus Hexane-Aceton-Methanol-Toluol (10:7:6:7, v/v) (zit. in Oliver und Palou 2000).

Das Vorkommen großer Mengen Glucose und Fructose, zusammen mit anderen freien Zuckern im Most, machte die Trennung kleiner Mengen von Glycosiden äußerst schwierig. Andererseits wurde die Isolation dieser Verbindungen in Weinen, in denen die meisten der Zucker durch Gärung entfernt worden sind, auch durch das Vorkommen von Glycerin und der isomeren Butan-2.3-diol erschwert (Williams et al. 1982a).

Obwohl viel über Analysen von Carotinoiden im Pflanzenmaterial berichtet wurde, handelt es sich nur selten um solche Carotinoide, die in Pflanzenmaterialien, wie Früchten, die reichlich Wasser, Zucker und Fruchtsäure enthalten, vorkommen. Außerdem wurden nur wenig über Lösemittel geschrieben, die für die Extraktionen von Xanthophyll z. B. Lutein, Carotin und auch für andere enthaltene Farbstoffe besonders gut geeignet sind. Bei der Extraktion ist es wichtig nicht nur das Erhalten der Carotinoide zu beachten, sondern auch den Verlust von Carotinoiden während der Extraktion zu verhindern.

Bei der Auswahl der Lösungsmittel für die Extraktionen von Carotinoiden aus Pflanzenmaterial mit einem hohen Wasser- und Zuckergehalt wird von Periadnadi (1997 unveröffentlicht) berichtet. Die zerkleinerte Rohmaterialien (Beeren) wurden mit dem Lösemittel THF zusammengemischt und eingestellt. Dabei ergab ein Verhältnis von 1:1 mit dem Lösemittel THF für die Carotinoidextraktion die besten Ergebnisse. Flüssige Proben wie Weine und Moste wurden vor der Extraktion durch Gefriertrockner konzentriert. Die gefriergetrockneten Extrakte der Moste und Weine wurden in 5 ml bidestiliertem Wasser homogenisiert. Die Proben wurden dann mit Lösemittel extrahiert. Dabei stellte sich heraus, dass bei Mosten ein Verhältnis von 50% und bei Weinen von 70% Lösungsmittel in Wasser die besten Resultate zeigten. Als Lösemittel erwies sich THF besser geeignet als Aceton und andere Lösemittel. THF bildet sich mit den extrahierenden Medien eine Emulsion. Um

diese zu trennen wird Petroleumbenzin (Sp. 40-60°C) zugesetzt, wodurch geschüttelt. Zwei Phasen bilden sich aus. Die wässrigen Phase wurden nochmals mit Petroleumbenzin extrahiert. Die organischen Phase wurden vereinigt und zweimal mit Puffer (7,7) gewaschen und zur Weiterverarbeitung bei -18°C gelagert.

Wegen der hohen Löslichkeit von Lutein (Xanthophyll), β -Carotin (Carotin) und anderen pflanzlichen Farbstoffen in THF, wurde in dieser Arbeit THF als Lösemittel für die Extraktion der Carotinoiden von Traubenmaterial verwendet. Die Ergebnisse und mit Acetonextrakten verglichen. Auch Magnesium Carbonat ($MgCO_3$) wurde zugesetzt. Die Extraktion ohne Zugabe von $MgCO_3$ aus Pflanzenmaterial wurde nur durchgeführt, um das natürliche Verhalten der Pigmente zu beobachten.

10.1.1.2 Saponifikation

Die alkalische Saponifikation bei der Carotinoidbestimmung ist traditionell der zweite Schritt nach der Proben-Extraktion. Die Saponifikation wurde durchgeführt, um die Trennung für die quantitative Carotinoidanalyse zu vereinfachen (Oliver et al. 1998, Oliver und Palou 2000). Die Saponifikation entfernt Triglyceride und Chlorophylle aber sie ist eine auch eine strenge Behandlung für labile Carotinoide. Die Sensibilität von Carotinoiden bei der Saponifikation ist unterschiedlich. Violaxanthin und andere sind empfindlich gegenüber alkalischen und sauren Konditionen aber Lutein ist gegenüber Alkali stabil (Philip und Chen 1988). Es ist daher wichtig zu wissen, ob eine Saponifikation die Quantifizierung der einzelnen Carotinoide beeinflusst (Oliver et al. 1998).

Die Saponifikation wird normalerweise mit einer KOH Lösung in einer wässrigen, ethanolischen oder methanolischen Lösung durchgeführt. Dabei kann die Konzentration kann von 10 bis 60% (w/v) variieren (Goodwin 1976). Die Saponifikation wird übernacht bei Zimmertemperatur ausgeführt oder durch Erwärmung beschleunigt (Oliver und Palou 2000). Die Carotinoidextrakte können 2 bis 16 Stunden bei einer Temperatur von 60°C mit 5-10% methanolischem Kaliumhydroxid saponifiziert werden. Nach der Saponifikation wurden die Proben dann mit Diethylether oder Hexan ausgeschüttelt, der Extrakt wird mehrmals mit Wasser gewaschen bis alle KOH entfernt war (Oliver und Palou 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Saponifikation nur für natürliche Produkt durchgeführt, die große Mengen Pigmente enthalten, z. B. Beerenfrüchte, um die Peaks von Xanthophyll und β -Carotin deutlicher erkennen zu können und die Saponifikation erfolgte nach

Razungles et al. (1987). Der getrocknete Extrakt wird mit einer KOH ethanolischen Lösung (5 ml KOH 60% in Wasser + 50 ml Ethanol) bei 4°C im Dunkel saponifiziert. Danach werden die Carotinoide in Diethylether (100 ml) extrahiert.

10.1.2 Grundlage der HPLC

10.1.2.1 HPLC

HPLC (Abkürzung für High Performance Liquid Chromatography = Hochleistungsflüssig Chromatographie) ist die ideale Technik für die Bestimmung von Substanzgemischen, die eine ausreichende Löslichkeit im Fließmittel besitzen. Dabei sollte das Lösemittel mischbar mit dem Fließmittel und die getrennten Substanzen durch Auswahl eines geeigneten Detektors detektierbar sein.

HPLC ist ideal für die Bestimmung von Carotinoiden, wie auch Chlorophyllen in Pflanzen und photosynthetisierenden Mikroorganismen (Juhler und Cox 1990). Normal- und Umkehrphasen und eine Vielfalt von zusammengesetzten mobilen Phasen aus zwei oder drei Lösemitteln sind für Carotinoidtrennungen geeignet (Phillip und Chen 1988). HPLC mit einer nicht wässriger Umkehrphase und gradienten Elution ist ein erfolgreiches Instrument zur Untersuchung der Carotinoidzusammensetzung natürlicher Proben (Zonta et al. 1987) und für die quantitative chromatographische Analyse von Pflanzenpigmenten (Schwartz und Elbe 1982, Danehower und Kelley 1990).

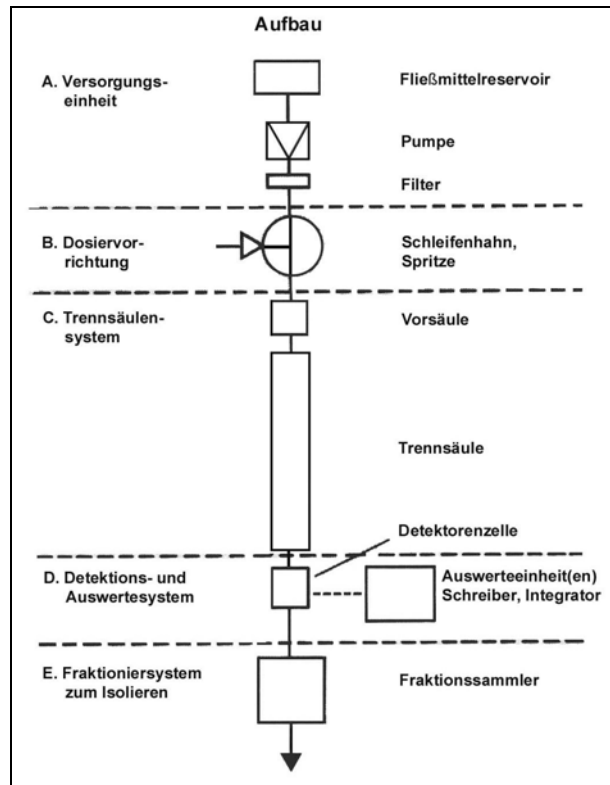


Abb. 34: Schematische Darstellung eines HPLC-Systems (Unger, 1989)

HPLC ist die Methode der Wahl für Carotinoidanalysen und ersetzte schnell die Methode mit offenen Säulen und die Dünnschichtchromatographie (Phillip und Chen 1988). Die typische Analysezeit beträgt ungefähr 30 min, einschließlich der Zeit, die für die erneute Einstellung des Phasengleichgewichtes (Danehower und Kelley 1990).

Die allgemeinen Schwierigkeiten bei der Auswahl von HPLC-Methoden liegt an der breiten Polarität der Pigmente, deshalb ist nicht leicht eine Methode auszuwählen (Juhler und Cox 1990) und den Trennungen von Carotinoiden in einem einzelnen Lauf (Cert et al. 2000) nur einige konnten Carotinoid-Isomere von Chlorophyllen im gleichen Lauf trennen (Darko et al. 2000). Daher gibt es kein übliches Extraktionsverfahren für Carotinoide (Oliver und Palou 2000).

Wegen der breiten Polarität erfordern Carotinoide eine Vielfalt von mobile Phasen bei der RPLC-Analyse. Mittels HPLC konnte die Carotinoidanalyse viel Analysezeiten und im einzelmem Lauf ersparen. Die Kompliziertheit der Pigment-Mischungen bei Carotinoidprobe ist auch schwierig für den Einsatz eines Internen-Standards. Außerdem ist vor dem Einsatz zur HPLC-Analyse von Trauben, Mosten und Jungweinen die Wahl der passenden und stabilen Laufmittel sehr bedeutend, um nicht nur größte Reproduzierbarkeit sondern auch

bessere Trennung bei der HPLC-Analyse zu erhalten. Die Schwierigkeiten lagen an der Kompliziertheit von Laufmittelmischungen als mobiler Phase. Manchmal traten die Probleme durch die gepufferten wässrigen Mischungen auf, die immer im genau gleichen Zustand und frisch erforderlich waren.

Die quantitative HPLC-Analyse der Farbstoffe werden über die Absorptionsmaxima der eluierten Peaks bei einzelnen oder mehreren Wellenlängen durchgeführt. Das Absorptions-Maximum von Carotinoiden variiert je nach Solvent und der chemischen Struktur (Philip und Chen 1988). Für jeden einzelnen Farbstoff wurden bestimmte Wellenlängen verwendet, die für die Absorption und die Peaktrennung am geeignetsten sind. Carotinoide absorbieren Licht im Wellenlängenbereich von 400–500 nm. Die Detektion bei diesen Wellenlängen ist besonders günstig in Hinsicht auf Selektivität und Sensibilität. Die modernen Scanning-Detektoren und besonders Photodioden Array-Detektoren sind geeignete analytische Werkzeuge zur Identifikation von Carotinoiden (Lambert et al. 1985).

Die Wellenlänge-Maxima und Absorptivität von Carotinoiden ändert sich mit dem Charakter der Lösungsmittel. Beispielsweise hat das sichtbare Spektrum von β -Carotin in Ethanol wenige feine Strukturen mit Absorptions-Maxima bei 453 und 480 nm, während es in Kohlenstoff-disulfide noch feinere bei 484 und 512 nm zeigt (Davies 1976 zit. in Craft und Soares 1992). Leider sind physikalische Informationen über diese Verbindungen in organischen Lösungsmitteln nur begrenzt erhältlich. Solche praktischen Informationen sind wichtig für die Auswahl der Lösungsmittel für die Verwendung bei der Probevorbereitung. Bei verschiedenen mobilen Phasen zur Flüssigchromatographie (LC) und auch für die Identifikation und Quantifizierung von Carotinoiden in verschiedenartigem LC mobilen Phasen (Craft und Soares 1992), wären diese Daten sehr hilfreich.

Der Mangel an Informationen über die Löslichkeit von Carotinoiden und deren molare Absorptionskoeffizienten in einer Vielzahl organischer Lösungsmittel, steigern die Schwierigkeiten bei der Entwicklung analytischer Methoden für die Carotenoidforschung. Solche praktischen Informationen sind wichtig für die Auswahl von Lösungsmitteln zur Verwendung bei der Probevorbereitung und der Flüssigchromatographie (Craft und Soares 1992).

Für Umkehr-Phasen Flüssigchromatographie sind verschiedene mobile Phasen verwendet worden. Hauptsächlich Methanol oder Acetonitril, die mit Dichlormethan, Chloroform, THF, Methyl-tertiärbutyl-Ether oder Ethylacetat modifiziert wurden. Im allgemeinen

scheinen Methanol-basierte mobile Phasen, Acetonitril basierten vorgezogen zu werden. Wichtig ist, dass die Wiedergewinnung von Carotinoiden aus Methanol-basierten Systemen besser ist (Bell et al. 1997).

Tetrahydrofuran (THF) sowie Dichlormethan, und Methyl-tertiärbutyl-Ether scheinen die besten Lösung zur Optimierung von Selektivitäten sowie zur Reduzierung von Analysezeiten zu sein. Dichlormethan, ist oft mit Spuren von HCl verunreinigt und führt zu Artefakten (zit. in Bell et al. 1997). Das Verfahren unter Verwendung eines Gradienten von THF in Wasser war besser als der im allgemeinen verwendete Gradient von Ethylacetat oder anderer nicht-polarer Lösungsmitteln in Acetonitril (zit. in Juhler und Cox 1990).

Mittels modernem Dioden Array Detektor, der ein starkes analytisches Werkzeug für die Identifikation ist, konnten mehreren Wellenlängen gleichzeitig, die am optimalsten für die einzelnen Peaks sind, im gleichen Lauf eingesetzt werden. Bei der entwickelten HPLC-Methode wurden Wellenlänge-Maxima bei Lutein $450(\pm 4)$ nm, bei Zeaxanthin, β -Apo-8'-Carotinal, β -Carotin und Chlorophyll-b $460(\pm 6)$ nm und bei Chlorophyll-a $440(\pm 4)$ nm, gewählt. Außerdem werden auch typische Wellenlänge von $473(\pm 6)$ nm für β -Apo-8'-Carotinal und $662(\pm 4)$ nm für Chlorophyll-a eingesetzt.

Für „Externer- und Interner-Standard“ können reine Carotinoide mit guter Reproduzierbarkeit benutzt werden. Die Verwendung eines „Internen-Standards“ ist die vorzuziehende Methode bei quantitativen Analysen, da analytische Schritte, oft schwierig zu reproduzieren sind und somit Fehler mit sich bringen können. Die Verwendung „Externer Standards“ für die diesen Carotinoidanalysen ist begrenzt, da der „Interne Standard“ sich in die Trennung ohne Beeinträchtigung der zu analysierenden Substanzen in das Chromatogramm einfügt (Philip und Chen 1988). Als Interner Standard wurde die Reinsubstanz β -Apo-8'-Carotinal (Fluka) verwendet und für Chromatogrammvergleiche wurden außerdem Reinsubstanzen von Zeaxanthin (Roth, Karlsruhe), Lutein (Extrasynthese, France), Chlorophyll-a und -b und β -Carotin (Fluka) eingesetzt.

Zur Analyse eines möglichen Vorkommens von Luteinestern in Trauben und Mosten sowohl der Sorte Riesling als auch von anderen „Weißen Sorten“ wurde eine HPLC Analyse nach der Methode von Gregory et al. (1986) durchgeführt. Als Vergleichsmaterial wurden Petalen von gelben, orangen und orange-braunen *Tagetes* verwendet. Gregory et al.

(1986) identifizierten Luteindipalmitat, Luteindimyristat und Lutein palmitat-stearat in den Petalen von *Tagetes*.

10.1.2.2 HPLC-Trennungsvorfahren

Basislinien Trennungen von Plastidenpigmenten der höheren Pflanzen in einer einfachen, reproduzierbaren Ein-Schritt-Methode wurden von Gilmore und Yamamoto (1991) beschrieben. Schwierigkeiten entstehen durch die unterschiedlichen Polaritäten und der hohen Anzahl der Pigmente sowie der begrenzenden Selektivität der Säulen (Gilmore und Yamamoto 1991).

Weiterhin machen Carotinoide bereits in Lösung stereoisomere Veränderungen durch. Diese Veränderungen der Stereoisomerie wird durch Licht und Wärme katalysiert und ist zeitabhängig. Ein natürliches Vorkommen von Stereoisomeren ist in frischen Pflanzengewebe selten. Wenn dann kommen sie meist nur in sehr kleinen Mengen natürlich vor. Diese sind von den induzierten Isomeren kaum zu unterscheiden (Phillip und Chen 1988). Um diese Trennungen zu optimieren sind von vielen Autoren viele Variablen erforscht worden, einschließlich der chromatographischen Abläufe, der Säulenart, der mobilen Phasen und der Temperatur (Bell et al. 1997). Nach Dachtler et al. (1998) wird allgemein der Gebrauch von RP C18 HPLC-Säulen für Carotinoidtrennung angeraten.

Die Einführung der Adsorption-Chromatographie für die Blattpigmentanalyse ermöglichte Tswett (1906) zit. in Darko et al. (2000) die Trennung von β -Carotin, und Chlorophyll a und b von Xanthophyllen. Diese Technik ist ununterbrochen verbessert worden. Heutzutage ist RPLC die Auswahl-Methode für die Analyse von Chloroplastenpigmenten. Über mehrere Methoden zur Trennung von Chlorophyllen, Carotinoiden oder beiden gemeinsam ist berichtet worden, aber nur wenige können Carotinoid-Isomere von Chlorophyllen im gleichen Lauf trennen.

Die Trennung struktureller Isomere wie Lutein von Zeaxanthin ist bei den meisten RP-HPLC Verfahren normalerweise unvollständig (Gilmore und Yamamoto 1991, Darko et al. 2000). Dihydroxy-Carotinoide, wie Lutein und Zeaxanthin, können frei vorkommen oder verestert als Monoester oder als Diester mit Fettsäuren (Gayle et al. 1986). Daher kann die Trennung dieser Peaks in der HPLC von den Carotinoidestern schwierig sein (zit. in Oliver und Palou 2000).

Gute Trennung dieser zwei Verbindungen kann mit Standardmischung erhalten werden aber in der entwickelten Methode zur Bestimmung der Hauptpigmente der Photosynthese überschneiden sich beide Peaks oder sind sehr eng assoziiert. Dieser Trennung ist besonders kritisch in der Untersuchung der Rolle von Zeaxanthin, wenn es zusammen mit einem großen Überschuss von Lutein gemessen werden muss (zit. in Juhler und Cox 1990, Gilmore und Yamamoto 1991).

Festwellenlängen UV-VIS und UV-VIS Photodioden-Array Detektoren werden gewöhnlich zur Detektion in der HPLC eingesetzt. Diese Verfahren können aber für die eindeutige Identifikation von Carotinoide in der Nahrung und biologischem Matrix wegen des Risikos spektraler Vermischungen unbefriedigend sein (Careri et al. 1999).

Dioden-Array-Detektoren wurden allgemein für die Identifikation vieler Carotinoide wegen der genauen Spektraldaten benutzt (Mouilly et al. 1999 und dort zit. Literatur). Photodioden Array Detektion, die die Spektren und chromatographischen Profile gleichzeitig aufnimmt, hat die routinemäßige Analyse von Carotinoiden von biologischem Probe enorm vereinfacht (Bramley 1992) und Photodiode Array Detektion ermöglicht Spektren von jedem einzelnen Peak des Chromatogrammen aufzunehmen. Diese Eigenschaften könnten Carotinoidtrennungen auch ohne vorhergehende der Saponifikation Probe ermöglichen (Oliver et al. 1998).

10.1.2.3 Entwicklung der Methode

Nur wenige polare und nicht-polar Umkehrphasen trennen Lutein von Zeaxanthin bis zur Basislinie. Thayer und Björkman erhielten eine Basislinien-Trennung von Lutein und Zeaxanthin mit einer non-encapped Zorbax-ODS Säule. Leider wird dieses gepackte Material nicht mehr hergestellt (Gilmore und Yamamoto 1991). Außerdem liegen die Schwierigkeiten dieser Methode auch an den komplizierten gepufferten wässrigen Mischungen.

Eine schnelle und reproduzierbare HPLC Methode mit Spherisorb ODS-1, ein nicht-encapped, leicht Kohlenstoff beladenes Säulen-Material für die Trennung von Pigmenten höherer Pflanzen wurde von Gilmore und Yamamoto (1991) beschrieben. Die Methode trennte Lutein und Zeaxanthin sowie andere Pigmente nahezu bis zur Basislinie mit einem zwei Solvent Programm. Beide Programme benutzen anfänglich eine gepufferte wässrige Mischung, die kritisch für die Anwendung für ODS-1 erschien.

Die Trennung von Lutein und Zeaxanthin-Stereoisomeren in der Rinder-Netzhaut bei 450 nm wurde von Dachtler et al. (1998) durch Verwendung konventioneller C18-Umkehrphasen HPLC beschrieben. Eine ähnliche Methode ist auch von Danehower und Kelley (1990) vorgeschlagen worden. Carotinoide sowie Chlorophylle und der Interne Standard β -Apo-8'-Carotinal wurden auf seiner C18 Säule mit einem linearen Gradienten von 70% Methanol (Lösung A) zu 40:60 Mischung von Lösung A und Ethyl Acetat (Lösung B) getrennt und bei 440 nm detektiert. Bei dieser Methode wurde der Zeaxanthin-Peak nicht gefunden.

Die Quantifizierung von Zeaxanthin mit der Bestimmung von Chlorophyllen und anderen Carotinoide in Chloroplastenextrakt wurde von Juhler und Cox (1990) gut kombiniert. Die Trennung erfolgte innerhalb von 20 min mit einem Gradienten von THF und Wasser. Eine Trennung von Lutein und Zeaxanthin sowie anderer Carotinoide wurde auch von Hart und Scott mit einer mobiler Phase aus Aceton und einer starken Boratpuffer erreicht (Sander et al. 2000).

Eine andere Methode, die beide Carotinoide und Chlorophylle trennten und bei Wellenlängen 410 und 430 nm detektierbar machten, haben Minguez-Mosquera et al. (1992) durch Fest-Phase-Extraktion auf einer C18 stationäre Phase-Säule und nachfolgender Trennung durch Ionenpaar-Umkehrphase HPLC durchgeführt. Von den oben berichteten ausgewählten Methoden, die für Trennung von Lutein und Zeaxanthin und Chlorophylle eingesetzt wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein HPLC-Programm entwickelt. Die Methode sollte die Trennung von Lutein und Zeaxanthin andere Carotinoide sowie Chlorophylle optimieren. Die Verwendung eines Internen Standards war auch zu berücksichtigen.

10.1.3 Bestimmung von Carotinoiden

Die Probenaufbereitung zur Bestimmung von Carotinoiden- sowie auch Chlorophyllen in Trauben, Most und Wein wurden nach der Eigenschaft des Probematerial, durchgeführt und anschließend mit der gleichen HPLC-Methode getrennt und identifiziert. Weiterhin wurde wegen der höchsten Löslichkeit von Lutein (Xanthophyll), β -Carotin (Carotin) und auch anderer pflanzlicher Farbstoffe, wie Chlorophylle THF als Extraktionsmittel gewählt. Außerdem wurde THF als mobile Phase eingesetzt.

Die HPLC-Methode wurde nach der Methode von Juhler und Cox, (1990) entwickelt. Als Interner Standard wurde β -Apo-8'-Carotinal verwendet. β -Apo-8'-Carotinal kommt in

Traubenbeeren nicht vor. β -Apo-8'-Carotinal wird chromatographisch gut von den anderen Peaks gut getrennt.

Vor der Extraktion wurde den Traubenbeeren der interne Standard zugesetzt, mit N_2 überschichtet. Die Extraktion erfolgte bei Zimmertemperatur durch stehen gelassen über Nacht. Um die optimalen Ergebnisse zu erhalten, wurde der Zusatz verschiedener Konzentrationen von Magnesium Carbonat ($MgCO_3$) (w/w) verglichen. Außerdem wurden die Einflüsse von pH-Werten bei dem Extraktionsverfahren beobachtet.

Moste und Weine wurden vor der Extraktion mittels Gefriertrocknung entwässert. Dabei sollte die Probe, insbesondere bei Weinen bis sich die ersten Eiskristalle zeigen vorsichtig geschüttelt werden, um einen Siedeverzug des Alkohols auszuschließen.

Die Saponifikation erfolgte nach Razungles et al (1987). Anschließend wurden die Proben mit HPLC getrennt, identifiziert und quantifiziert.

10.1.3.1 Bei den Traubenbeeren

Die Bestimmung der Carotinoide sowie der Chlorophylle in Traubenbeeren wurde wie in der Abb. 35 von Periadnadi (1997, unveröffentlicht) beschrieben.

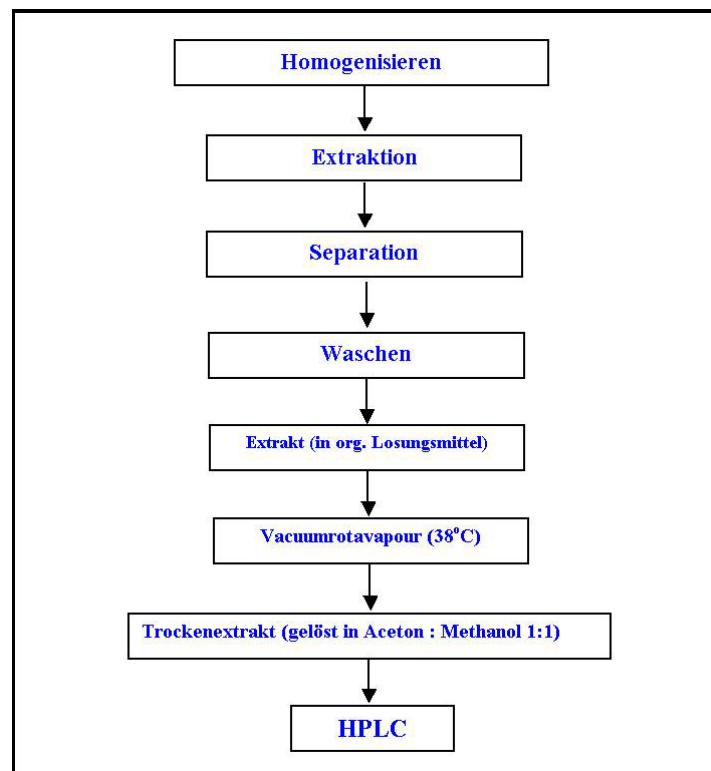


Abb. 35: Schematische Darstellung der Traubenbeeren-Extraktion

Bei der Verarbeitung wurden 100 g Traubenbeeren (ohne Kerne) unter Zugabe von 1% MgCO_3 (w/w) sowie 100 μg β -Apo-8'-Carotinal als internem Standard homogenisiert. Das entspricht einer Zugabe von 1 g/kg bzw. 1 $\mu\text{g/g}$ Beeren des Internen Standards. Die Proben wurden danach in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml THF bzw. Aceton versetzt. Um den Abbau durch Oxidation zu verhindern, wurde der Extrakt mit Stickstoff übersichtet und im Dunklen bei Zimmertemperatur über Nacht stehen lassen und ausschließlich über Glaswolle filtriert.

Die Extraktion wurde solange wiederholt bis alle Pigmente gelöst waren. Danach wurde der Extrakt auf 100 ml eingengt. Die Pigmente in THF wurden mit Petroleumbenzin (Sp. 40–60°C) bzw. in Aceton/Diethylether gelöst. Der Rest wurde nochmals sorgfältig und mit Petroleumbenzin bzw. Diethylether langsam geschüttelt und getrennt. Danach wurde der Extrakt mehrmals mit bidestiliertem Wasser, für die Proben ohne MgCO_3 Zusatz, bzw. mit Puffer pH 7,7 für die Proben mit MgCO_3 Behandlung, gewaschen. Anschließend wurde der gesamte Extrakt mit Na_2SO_4 entwässert, filtriert und mit dem Vacuumrotavapor bei 38°C getrocknet. Der getrocknete Extrakt kann für die Saponifikation verwendet werden und wurde getrocknet mit N_2 -Übersichtung und aufbewahrt.

Der Extrakt wurde in 1 ml Aceton:Methanol (1:1 v/v) gelöst, in luftdicht verschlossenem Fläschchen umgefüllt und zur HPLC Analyse eingesetzt. Zur Saponifikation wurde der getrocknete Extrakt mit 5 ml 60% KOH/Wasser und 50 ml Ethanol saponifiziert. Der saponifizierte Extrakt wurde mit Stickstoff überschichtet. Um die beste Saponifikationszeit zu finden, wurden die Proben mit unterschiedlichen Hydrolysezeiten saponifiziert. Nach der Saponifikation bei 4°C wurde der Extrakt zweimal mit 20 ml Diethylether ausgeschüttelt und mit Puffer 7,7 gewaschen. Die Ether-Schicht wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der getrocknete Extrakt wurde in gleicher Art, wie oben genannt, weiterverarbeitet.

10.1.3.2 Bei Mosten und Weinen

Wegen des hohen Wassergehaltes von Mosten und Weinen wurden die Proben gefriergetrocknet. Dieser Schritt ersetzte die bei Beeren notwendig Mazeration. Ansonsten wurde nach dem Schema Abb. 35 verfahren.

Nach 24stündiger Gefriertrocknung wurde der trockene Extrakt mit 5 ml bidest. Wasser versetzt und homogenisiert. Dadurch erreicht man einen optimalen Kontakt zwischen Probe und Extraktionsmittel. Die Extraktion erfolgte daher nach folgender Prozedur:

Fünzig (50) ml Most wurden mit 2 µg β-Apo-8'-Carotinal (Interner-Standard), was einer Zugabe von 40 µg/l Most entspricht, versetzt. Die Moste wurden dann mittels Gefriertrockner getrocknet. Der getrocknete Extrakt wurde mit 5 ml bidestiliertem Wasser homogenisiert. Weiterhin wurde wegen der Säuren im Pflanzenmaterial, der Extrakt mit MgCO₃ (1% w/w) neutralisiert, was die Peakform deutlich verbesserte. Die Emulsion wurde dann mit 20 ml 50% wässrigem THF extrahiert. Der Extrakt, der Zucker- und MgCO₃-Kristalle enthält, wurde über Glaswolle gefiltert. Die obere, oder gelbe Schicht, in der sich die Pigmente (Carotine, Xanthophylle und Chlorophylle) befinden, wurde abgezogen, die untere Schicht noch einmal mit 10 ml 100% THF extrahiert und zusammen vereinigt.

Der THF-Extrakt wurde zuerst mit 20 ml danach mit 10 ml Petroleumbenzin (40-60°C) geschüttelt und getrennt, anschließend mit Puffer pH 7,7 gewaschen. Anschließend wurde der Extrakt mit dem Vacuumrotavapor bei 38°C getrocknet. Der getrocknete Extrakt wurde mit Aceton:Methanol (1:1) gelöst und aufbewahrt. Bei den Weinen wurden 200 ml Wein mit 2 µg β-Apo-8'-Carotinal versetzt, was jeweils einer Zugabe von 10 µg/l Wein entspricht. Nach der Entwässerung wurde er mit 5 ml bidestiliertem Wasser gelöst und weiter mit 70% THF extrahiert und ebenfalls auf gleiche Art wie bei den Traubenbeeren weiterverarbeitet.

10.1.4 HPLC Bedingungen

Die Farbstoff-Analyse wurde auf zwei verschiedenen HPLC-Geräten durchgeführt.

1. SpectraPhysic, bestehend aus:
 - SP 8800 Ternary HPLC-Pump,
 - SP 200 Programm Wellenlänge Detektor,
 - SP 8500 Dynamic Mixer,
 - SP 4290 Integrator bzw. Integrator D-2500 von Merck-Hitachi.
2. Hewlett Packard 1100 Series, besteht aus :
 - G 1311A Quaternary Pumpe,
 - G 1322A Degasser,
 - G 1313 Auto Load Sampler,
 - G 1316A Column Compressor
 - G 1315A Diode Array Detector

10.1.4.1 HPLC Methode nach Danehower und Kelley (1990)

Die HPLC Methode nach Danehower und Kelley (1990) wurde mit dem SpectraPhysics HPLC System durchgeführt. Die Säule war eine 150 mm (5 µm) Säule RP18, sowie eine 250 mm (5 µm) Säule LiChrosper 60-RP Select B mit einer Vorsäule (Vorsäulenkartusche) LiChrosper 100 RP18, 5 µm, LichroCart 4-4, der Fa. Merck. Die Messungen erfolgten bei 440 nm Wellenlänge. Als Interner Standard wurde β -Apo-8'-Carotinal verwendet. Chromatographische Trennung folgte durch das Gradientensystem wie in der Tabelle 5.

Tabelle 5: Das Gradientensystem zur Trennung pflanzlicher Farbstoffe

Nr.	Zeit (min)	Mobile Phase		Durchflussrate (ml/min)
		70% Methanol	Ethylacetat	
1	0	100	0	1,0
2	4	40	60	1,0
3	30	40	60	1,0
4	32	100	0	1,0
5	36	100	0	1,0

10.1.4.2 HPLC Methode nach Juhler und Cox (1990)

Als Vergleich wurde die HPLC Analyse nach Juhler und Cox (1990) bei 450 nm durchgeführt. Die Säule war eine 250 mm (5 µm) LiChosper 100 RP18 sowie 250x4,6 mm (5 µm) Säule Hypelcosil. Der Säulen-Temperatur lag bei 30°C beibehalten. Die Lösungsmittel bidestiliertes Wasser und THF in HPLC-Qualität wurden durch Ultraschall entlüftet.

Die Trennung der Pigmente wurde in einem Gradienten aus THF und Wasser erreicht. Das Fließ-Tempo war 1 ml/min bei 21 Minuten totaler Analysezeit mit folgendem Gradienten:

Tabelle 6: Das Gradientensystem zur Trennung von Carotinoiden nach Juhler und Cox (1990)

Nr.	Zeit (min)	Mobile Phase		Durchflussrate (ml/min)
		Tetrahydrofuran	Bidest. Wasser	
1	0	51	49	1,0
2	5	51	49	1,0
3	13	90	10	1,0
4	18	51	49	1,0
5	21	51	49	1,0

10.1.4.3 Eigenentwickelte HPLC Methode

Eine Methode zur Farbstoffbestimmung der wichtigsten Traubencarotinoide, wie Lutein und β -Carotin in einem Lauf, bei gleichzeitiger Trennung von Zeaxanthin und dem Einsatz des internen Standards, wurde schon vorher beschrieben (Periadnadi 1998, unveröffentlicht). Diese entwickelte Methode wurde aus den HPLC Methoden nach Juhler und Cox (1990) und Danehower und Kelley (1990) modifiziert und mit β -Apo-8'-Carotinal als internem Standard eingesetzt. Diese Methode wurde auf dem HPLC System von Hewlett-Packard 1100 Series durchgeführt. Die Säule war eine LiChroCART 250-4 HPLC Cartridge LiChrospher 100 RP18 (5 μ m), RP18 125-4 M LiChroCART von Merck, sowie eine Säule 250x4,6 mm (5 μ m) Hypersil Elite C18. Die Säulentemperatur lag bei 28°C (+2°C). Ein Dioden-Array-Detektoren diente als Detektor. Verschiedene Detektor-Wellenlänge wurden zur Messung der einzelnen Carotinoide eingesetzt. Lutein wurde bei 450(\pm 4) nm bestimmt, während Zeaxanthin, β -Apo-8'-Carotinal, β -Carotin und Chlorophyll-b bei 460(\pm 6) nm und Chlorophyll-a bei 440(\pm 4) nm, gemessen wurden. Außerdem wurden auch typische Wellenlängen wie 473 (\pm 6) nm für β -Apo-8'-Carotinal und 662(\pm 4) nm für Chlorophyll-a eingesetzt. Die Probe wurde in einer Mischung von Aceton:Methanol 1:1 aufgelöst. Es wurden 40 μ l injiziert.

Die Trennung der Pigmente erfolgte mit einem Gradienten aus THF und Wasser. Zu Beginn der Trennung bestand das Fließmittel aus einer Mischung von THF:Wasser 51:49. Der Gradient kann in der folgenden Tabelle entnommen werden:

Tabelle 7: Das Gradientensystem zur Trennung der Carotinoiden und Chlorophyllen in Traubenbeeren, Mosten, Weinen sowie syntethischen Medien

Nr.	Zeit (min)	Mobile Phase		Durchflussrate (ml/min)
		Tetrahydrofuran	Bidest. Wasser	
1	0	51	49	1,0
2	5	90	10	1,0
3	18	90	10	1,0
4	21	51	49	1,0
5	25	51	49	1,0

10.1.4.4 HPLC Methode nach Gayle et al. (1986)

Bei der Bestimmung und Identifizierung von möglichen weiteren TDN-Precursoren wie die Esterformen, wurden HPLC-Analyse nach der Methode von Gayle et al. (1986)

durchgeführt. Durch Chromatogramm-Vergleich mit Luteinestern aus den Petalen von *Tagetes*, die Lutein dimyristat, Lutein myristat-palmitat, Lutein dipalmitat, Lutein palmitat stearat enthalten, wurden die Anwesenheit der Esterformen des Lutein in Traubenbeeren, Mosten sowie Weine identifiziert und bestimmt.

Die HPLC-Analyse wurden mittels Dioden-Array-Detektoren bei 440(\pm 6), 450(\pm 4), 460(\pm 6), 473(\pm 7) und 662(\pm 16) detektiert. Die Säule war eine 250x4,6 mm (5 μ m) Hypersil Elite C18. Das Gradientensystem wird wie in der Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Das Gradientensystem zur Trennung der Lutein und Luteinester

Nr.	Zeit (min)	Mobile Phase		Durchflussrate (ml/min)
		Methanol	Ethyl Acetat	
1	0	60	40	3
2	20	40	60	3
3	25	60	40	3
4	30	60	40	3

10.1.5 Auswertung der HPLC Analysen

10.1.5.1 Die quantitative Bestimmung mittels internem Standard

Zur quantitativen Bestimmung der Proben wurde β -Apo-8'-Carotinal als interner Standard eingesetzt. Ein Standard-Chromatogram der Reinsubstanzen Chlorophyll-a, Chlorophyll-b, β -Carotin, Lutein, und β -Apo-8'-Carotinal diente zur Kalibration für die Quantifizierung.

Alle Reinsubstanzen wurden in THF p. A. gelöst und eine ideale Mischung in proportionaler Konzentration von Carotinoid und Chlorophyll (a und b) hergestellt.

10.1.5.2 Identifizierung und Quantifizierung von Carotinoiden

Die Carotinoide, die in Traubenmaterialien (Beeren, Moste und Weine) vorhanden waren, wurden durch den Vergleich ihrer Retentionszeiten mit den Retentionszeiten der Reinsubstanzen in den UV –VIS Spektren identifiziert. Die Konzentration der Carotinoide (sowie Chlorophylle) jeder Probe wurde durch die Verwendung des Responsfaktors der Reinsubstanz β -Apo-8'-Carotinal als interner Standard bestimmt und wurde als Prozentsatz des totalen Peaks ausgedrückt, der für die quantitative Bestimmung berücksichtigt wurde.

10.2 Materialien, Chemikalien und Referenzsubstanzen

Die zur Durchführung der Analysen notwendigen Materialien, Chemikalien und Referenzsubstanzen werden mit ihren Bezugsquellen folgend aufgelistet.

Materialien :

- Die Materialien (Trauben, Moste, und Weine verschiedener Jahrgänge) wurden vom Fachgebiet Rebenzüchtung und Rebenveredelung der Forschungsanstalt Geisenheim bezogen.

- Untersuchte Traubensorten:

1. Riesling (Lese 1997 und 1998):

Klon 24-196 Gm.
Klon 64-177 Gm.
Klon 94-02 Gm.
Klon 110-06 Gm.
Klon 110-18 Gm.
Klon 110-30 Gm.
Klon 198-16 Gm.
Klon 198-25 Gm.
Klon 239-20 Gm.
Klon 239-25 Gm.

2. Andere Weiße Sorten (Lese 1997 und 1998):

Weißburgunder
Chardonnay
Silvaner
Ruländer

- Zehn Rieslingklone und Weiße Sorten von Jahrgangweinen (Lese 1996 und 1997)
- Rieslingweine Kl. 110 Gm. (Jahrgang 1990, 1991, 1995, 1996)
- Versuchsweine aus dem Fachgebiet Weinbau der Forschungsanstalt Geisenheim
- 9 Trockenhefepräparate verschiedener Hersteller (Stämme: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*), sowie frische Spontangärungshefen

Chemikalien :

- Die kommerziellen Standards, die für die Bestimmung der Retentionszeiten und Spektralkurven benutzt wurden, wurden als authentische Standards aus den folgenden Quellen erhalten:

Reinsubstanzen:

- Lutein 5 mg (TLC) (Extrasynthese, Genay-France)
- β -Carotin (C₄₀H₅₆), >97% (UV), (Fluka, Buchs)
- β -Apo-8'-carotenal (trans) [8'- Apo- β , ψ -caroten-8'-al](C₃₀H₄₀O), (Fluka, Switzerland)
- Chlorophyll-a (C₅₅H₇₂MgN₄O₅); 98% (HPLC) 1mg ; (Fluka, Switzerland)
- Chlorophyll-b (C₅₅H₇₀MgN₄O₆) 1mg; (Fluka, Switzerland)
- Zeaxanthin (C₄₀H₅₆O₂) 1 mg; M=568,85; (Roth, Karlsruhe)
- Naphthalin (C₁₀H₈); Fp 80-82°; Kp.218 °; d 0,997; FG 128,17; (EGA-Chemie)

Sonstige Chemikalien:

- Xanthophyll pastös (Roth)
- Deuterium oxide; 99,9 atom % D; F.W. 20,03; bp. 101,4°; 25 g; (Aldrich)
- Magnesium Carbonat basisch extra leicht, (MgCO₃)₄ Mg(OH)₂ 5H₂O; (Roth)
- 4-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (C₁₂H₁₅NO₈), M=301,26 g/mol, >97%; (Merck)
- DL-Äpfelsäure (C₄H₆O₅); M=134,09 g/mol; (Merck)
- L(+)-Weinsäure; natürliche Weinsäure (HO₂CCH(OH)-CH(OH)CO₂H; m.p. 171-174°(dec); (EGA-Chemie)
- Natriumcarbonat wasserfrei (Na₂CO₃) p. A., >99,5%(T); (Fluka, Switzerland)
- Natriumsulfat (H₂SO₄) ,wasserfrei, M=142,04; (Merck)
- KH₂PO₄ p.A. , M=136,09 g/mol; (Merck)
- Na₂HPO₄ 2H₂O p.A. , M=77,99 g/mol; (Merck)
- KOH p.A. ; (Acros Organics)
- H₂SO₄ ; (Merck)

Lösungsmitteln:

Alle benutzten Lösungsmitteln waren:

- Tetrahydrofuran (C₄H₈O), >99,5%, p.A, stabilisiert mit BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol); (Roth-Rotipuran) als Extraktionsmittel
- Tetrahydrofuran (C₄H₈O), LiChrosolv, (Reinheit GC) >99,8%, p.A, M=72,11 g/mol; (Merck) für Chromatographie
- Petroleumbenzin; Sp. 40-60°C; (Merck)
- Dichlormethan p. A. ; (Merck)
- Diethylether (C₄H₁₀O), stabilisiert mit ca. 7 ppm 2,6-Di-ter-butyl-p-kresol; (Roth-Rotipuran)
- Methanol p. A. ; M=32,04 g/mol; (Roth-Rotipuran)
- Ethanol p. A. und technisch; (Roth-Rotipuran)
- Aceton p. A. ; (Roth-Rotipuran)
- Ethyl Acetat p. A. ; (Merck)
- Wasser, entmineralisiert, MILLI-Q Water System Millipore (auch für den Ansatz von HPLC Modell-Lösungen)

Andere Materialien:

- Glaswolle; (Merck)
- Faltenfilter Ø 125mm; 595 ½; (S&S)
- Schönungsmitteln Polyclar; (Erbsloch)

XI. Untersuchungsmethoden zum Nachweis der β -D-Glucosidaseaktivität

11.1 Grundlage der β -D-Glucosidaseaktivität

Die aromatischen Bestandteile von Traubenbeeren kommen zu einem Teil als freie flüchtige Verbindungen vor und zum anderen Teil glycosidisch mit Zucker in Form von Glycosiden gebunden (Rapp 1989, Gunata et al. 1985b, Zoecklein et al. 1997). Die als Glycosid gebundenen Formen kommen meist in höheren Quantitäten vor als die Freien (Gueguen et al. 1996).

Die nicht flüchtige gebundene Fraktion wird aus Disaccharid-Glycosiden gebildet, nämlich aus α -L-Arabino- oder α -L-Rhamnofuranosyl- β -D-Glucopyranosiden mit ihre Aglyconen. Der glycosidische Teil enthält Glucose, Rhamnose und Arabinose (Aryan et al. 1987). Diese glycosidischen Precursoren bilden ein wichtiges potential Aroma in Mosten sowie in Weinen, weil sie während des Gärungsprozesses sehr leicht hydrolysierbar sind (Gunata et al. 1988 und 1990a).

Beim Wein hängt das Vorkommen von Aromen sehr von der Aktivität der Hefen ab. Mikroorganismen- bzw. Hefeenzyme spielen bei der Weinherstellung eine wichtige Rolle durch den Abbau von Precursor zur Aromabildung (Gunata et al. 1985b, Mateo und Jiménez 2000). β -Glucosidase hydrolysiert die Terminal nicht reduzierende β -glucosidische Bindung unter Freisetzung von β -D-Glucose (Int. Union of Biochem. Nomenclature Commision 1984 zit. in Stellmach et al. 1988). Die traditionelle Weinhefe *Saccharomyces sp.* produziert eine β -Glucosidase. β -Glucosidaseaktivität wurde inner- und außerhalb der Zelle gefunden (Zoecklein et al. 1997 und dort zit. Literatur, Sandhu et al. 1984, Anonymus 1980). Wenzel (1989) hat festgestellt, dass das an die Hefezellwand gebundene Enzym eine 4–20fach hohe β -Glucosidaseaktivität als die extrazelluläre β -Glucosidase hat.

Der Hydrolysemechanismus von Glycosiden wurde von Gunata et al. (1988) durch die Wirkung von α -L-Arabinofurano- und α -L-Rhamnopyrano- sowie β -D-Glucopyranosidase auf die entsprechenden p-Nitrophenylglycoside bzw. auf Weintrauben Monoterpenyl-disaccharid-glycoside getestet. Die (1 \rightarrow 6) Verbindung wird entweder durch α -L-Arabinofuranosidase oder α -L-Rhamnosidase gespalten und Arabinose, Rhamnose und der entsprechende Monoterpenyl β -D-Glucosiden werden freigesetzt (Gunata et al. (1988).

Bei der Behandlung mit β -D-Glucosidase konnten nicht nur Terpenverbindungen (Monoterpenol), 3-keto- α -Ionol und 3-hydroxy- β -Damascenon freigesetzt werden, sondern auch C₁₃-Norisoprenoide zu denen auch TDN gehört (Mateo und Jiménez 2000). Die Bildung von TDN bei der Alterung von Rieslingweinen wird aus Vorstufen wie β -Carotin und Lutein angesehen, die in Weinen als an Glucose in β -Stellung gebunden vorhanden sind. Durch die in Hefen vorkommende β -Glucosidase könnten auch diese hydrolysiert werden (Sponholz und Hühn 1997).

Der mögliche Mechanismus der β -Glucosidase (β -D-Glucopyranosidase), um flüchtige Norisoprenoid-Verbindungen bzw. synthetisches Glycosid p-Nitrophenol freizusetzen, konnte in Abb. 36 zusammengefasst werden.

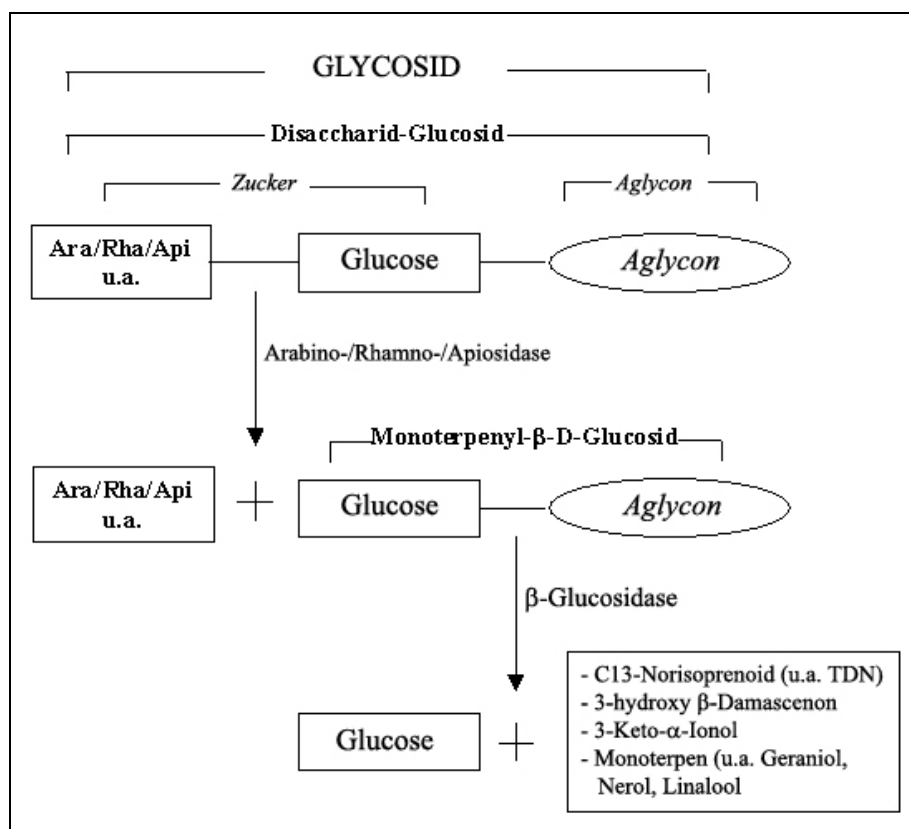


Abb. 36: Glycosidspaltung durch Glucosidase

Die optimalen Reaktionsbedingungen von β -Glucosidasen wird durch die Herkunft des Enzyms, dem Substrat und der Art des Puffers beeinflusst. Der optimale pH-Bereich reicht von pH-Wert 4,5 bis 8,8. β -Glucosidase hat auch bei niedrigem pH-Wert (optimaler pH-Wert 3,5) Aktivität. Sie ist sehr stabil und sie wird in ihrer Aktivität durch das Vorkommen

von Ethanol verbessert (Janbon et al. 1995). Eine vollständige Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch Oxidantien wie z. B. Ozon. Schwermetalle haben eine reversible inaktivierende Wirkung (Stellmach et al. 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit wird die β -D-Glucosidaseaktivität der Hefen und ihr Verhältnisse zu den Aromastoffen in Wein oder weinähnlichen Medien beim Carotinoidabbau untersucht.

11.2 Probevorbereitung zum Nachweis der β -Glucosidaseaktivität

11.2.1 Material

11.2.1.1 Hefen

Für die Untersuchungen wurden 9 Trockenhefepräparate verschiedener Hersteller eingesetzt. 8 diese Stämme waren als *S. cerevisiae*, gekennzeichnet.

11.2.1.2 Gärung

Vor dem Einsatz der Hefen zur Vergärung, wurden 2 g/l Trockenhefe in 1:1 mit verdünntem frischen Most bei 20°C für 24 h vorkultiviert. Die Vergärung des Mostes erfolgte durch Zugabe von 1 ml zu 1000 ml Most bei 20°C und bei Kellertemperatur in 2facher Wiederholung. Ein Ansatz diente zur Messung der Gärintensität, gelöstem Farbstoffgehalt (Carotinoid) bzw. TDN in Jungwein. Für die Messungen der Enzymaktivitäten, Zellzahlen und trübe Farbstoffen (Carotinoid) Messungen stand für jeden Messpunkt ein gleicher neuer Ansatz zur Verfügung. Die Analysen wurden im Most vor und nach Zugabe der Starterkulturen durchgeführt.

11.2.2 Methoden

11.2.2.1 Bestimmung der β -Glucosidaseaktivität

NPG wird durch β -Glucosidase in p-Nitrophenol und einen Glucoserest gespalten. Im Photometer wird die Extinktion des p-Nitrophenols gemessen. Da das ungespaltene p-NPG bei 320 nm im selben Bereich Strahlung absorbiert, ist bei dieser Wellenlänge eine Unterscheidung zwischen Substrat und Produkt photometrisch nicht möglich. Im Gegensatz zu p-NPG dissoziiert p-Nitrophenol bei Alkalisierung. Das p-Nitrophenolat-Ion absorbiert bei 405 nm bei dieser Wellenlänge wird die Konzentration des freigesetzten p-Nitrophenols gemessen.

Lösungen:

-. Na-Acetat-Puffer (0,1 M; pH 5,0)

- NPG-Lösung (4 mmol/l p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid in Na-Acetat-Puffer; pH 5,0)
- Na_2CO_3 Lösung (0,2 M)

Probeentnahme:

Nach dem Mischen wurden aus jedem Gäransatz 2 x 20 ml entnommen. Diese 20 ml wurden 30 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde zur Messung der hefegebundenen β -Glucosidase Aktivität verwendet.

- Zur Lebendzellzahlbestimmung wurde jeweils 1 ml entnommen und durch Plattengussverfahren ausgezählt.
- Bestimmung der β -Glucosidaseaktivität für das Zellwand-gebundene Enzym:

Zur Bestimmung der β -Glucosidaseaktivität der verschiedenen Hefestämme wurden vom Versuchsmost täglich Proben zur Analyse entnommen. Die hefegebundene β -Glucosidase wurde nach der Methode von Wenzel (1989) bestimmt.

40 ml gärender Most wurde abzentrifugiert und die Suspension wurde zweifach mit 25 ml Na-Acetat-Puffer (0,1 M; pH 5,0) gewaschen, die Hefe wird dann in 10 ml Puffer suspendiert. Zwei (2) ml dieser Suspension wurden mit 1 ml NPG-Lösung (4 mmol/l p-Nitrophenyl- β -D-Glucosid in Na-Acetat-Puffer pH 5,0) 2 Stunden bei 30°C inkubiert.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 ml Na_2CO_3 Lösung (0,2 M) gestoppt. Nachdem die Hefe abzentrifugiert ist, wird die Extinktion bei 405 nm gemessen. Für die Kontrolle wird nacheinander 3 ml Na_2CO_3 Lösung, 2 ml Hefesuspension und 1 ml NPG-Lösung in dieser Reihenfolge gemischt. Die Extinktionsdifferenz (Δ_E) dient als Maß für die Enzymaktivität.

11.2.2.2 Lebendzellzahlbestimmung.

Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte vor und nach dem Anstellen des Gäransatzes zur Gärung alle 24 Stunden parallel zur Aktivitätsbestimmung.

Die Lebenkeimzahlbestimmung wurde auf Agarplatten durch Verdünnungsreihen von 10^{-3} – 10^{-7} durchgeführt. Die Agarplatten wurden bei 28°C im Brutschrank bebrütet.

11.2.2.3 Messung des Gärverlaufs

Zur Messung des Gärverlaufs wurden alle Hefeversuche einschließlich der Spontangärung beobachtet. Die Messung des Gärverlaufs wurde alle 24 Stunden parallel zur Aktivitätsbestimmung und dem Farbstoffgehalt durchgeführt. Dies erfolgte durch Messung der Gewichtsabnahme, die durch den CO_2 -Verlust verursacht wurde. Der CO_2 -Verlust ist

proportional zum Zuckerverbrauch und der Alkoholbildung durch die Hefen. Gemessen wurde das Gewicht des Gäransatzes (Flasche+Most+Hefen) ab den Tag der Anstellung zur Gärung bis Ende der Gärung.

Der Gesamtgärverlauf ergab sich aus dem Verlust von Gramm CO_2 pro Liter Most. Die Gärintensität wurde als Verlust von g CO_2 / l Most in 24 Stunden berechnet.

11.2.2.4 Farbstoffabbau

Zur Bestimmung des Farbstoffabbaus (Carotinoide und Chlorophyll a und b) wurden je 50 ml von 200 ml gut homogenisiertem Versuchmost alle 24 Stunden für die HPLC-Analyse entnommen. Die Proben wurden in einen 1l Rundkolben für die Gefriertrocknung gefüllt. Nach dem Zusatz des internen Standards wurden die Proben direkt gefriergetrocknet. Die weitere Verarbeitung für die Vorbereitung der Probe für die HPLC-Analyse erfolgte nach 24 Stunden Gefriertrocknung.

XII. Alterung auslösende Precursoren (Carotinoide) und TDN

Die Bildung der Aromasubstanzen durch Carotinoidabbau ist eine von vielen Veränderungen während der Flaschenlagerung der Weine. Diese im Wein vorkommenden Precursoren von Aromastoffen können die Alterungsprozesse auslösen. Nach Rapp (1989) entstehen viele Komponenten, die aus gealtertem Wein als aromatische Kohlenwasserstoffe C₁₃-Komponenten, u.a TDN, identifiziert wurden, aus den Carotinoidsubstanzen der Weinbeeren .

TDN, das natürlich in Pflanzenprodukten vorhanden ist, liefert einen wichtigen Beitrag zum typischen Kerosin-ähnlichen Charakter in Flaschen gealterter Rieslingweine, in denen die höchsten Mengen dieser Verbindung gefunden wurden. TDN wurde auch in jungen Weindestillaten und in Rotwein identifiziert (Simpson 1978, Di Stefano 1985, Rapp et al. 1985, Marais et al. 1992b, Versini et al. 1996, Bertuccioli und Viani 1976) von einer negativen Petrolnote wird in Deutschland aber nur bei sehr wenigen Weinen gesprochen (Sponholz et al. 1997).

Die Entwicklung von TDN in Wein ist von der Konzentration seiner Precursoren in den Weintrauben abhängig (Strauss et al. 1987a, Marais et al. 1992a). Die unerwünschten Aromastoffe werden immer dann relevant, wenn die Precursoren vorhanden sind, und/oder diese durch angenehme Aromen nicht überdeckt werden (Sponholz et al. 1997).

12.1 Carotinoide

Carotinoide als TDN-Hauptprecursor im Wein kommen natürlich in den Traubenbeeren vor.

Carotinoide präsentieren sich in geraden Ketten und in zyklischen Gruppen. Die zwei wichtigsten zyklischen Carotinoide sind Lutein (β,ϵ -Carotin-3,3'-diol) und β -Carotin (β,β -Carotin). Sie sind die bekanntesten und weitverbreitetsten in Pflanzen und bekannt als α -Carotinoide (β,ϵ) und als β -Carotinoide (β,β) (Khachik et al. 1986, Craft und Soares 1992).

Lutein und β -Carotin sind die meist erforschten Hauptcarotinoide durch normale Carotinoidanalysen mittels HPLC. Die beiden Carotinoide sind die Hauptcarotinoid-Komponenten in Traubenbeeren und daher auch oft als TDN-Precursoren vorgeschlagen worden. Dass beide Carotinoide Precursor von TDN sind, wurde zuerst nur durch Modellversuche mittels Reinsubstanzen ermittelt. Über diese Vorkommenstheorie gab es auch Unstimmigkeiten. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, die Beziehungen zwischen

den in Trauben vorkommenden Carotinoiden, insbesondere Lutein und β -Carotin und dem TDN-Vorkommen in den Weinen zu untersuchen.

12.1.1 Die Wirkung von Extraktion und Saponifikation auf die Carotinoidverteilung

Die Extraktion ist eine der bedeutendsten Phasen der Probenvorbereitung und die verwendeten Extraktionsmittel sind sehr wichtig für die Analyse natürlich vorkommender Carotinoide. Die Auswahl der Extraktionsmethode ist wichtig um nähere Information über die natürlichen Farbstoffe zu erhalten. Sie hängt von den Materialien und Kondition der untersuchenden Materialien ab.

Der wichtigste Schritt bei der Extraktion ist die Auswahl der Extraktionsmittel, die wirksam, stabil und für das verwendete Material geeignet sind. Eines der Extraktionsmittel ist Tetrahydrofuran (THF), das mit Butyliertem-Hydroxy-Toluen (BHT) stabilisiert wurde. Dieses Lösungsmittel löst nicht nur bereitwillig die Carotinoide und Chlorophylle, sondern verhindert auch die Bildung von Emulsionen durch das Denaturieren des Komplexproteins der Carotinoide (Khachik et al. 1986).

Über die Auswahl von Extraktionsmitteln für Proben, die unter verschiedenen Bedingungen und unterschiedlichem Wassergehalt insbesondere bei frischem und getrocknetem Material angepasst werden, sowie über ihre Stabilität, wurde von Periadnadi (1996, unveröffentlicht) berichtet. Bei der spektrophotometrischen Analyse wurden die üblich verwendeten Maximum-Wellenlängen, von denen verschiedene Autoren berichtet haben, verglichen. Außerdem werden bei dieser Arbeit auch die Leistung von einzelnen Lösungsmitteln gezeigt. Die Ergebnissen werden in Abb. 37 beschrieben.

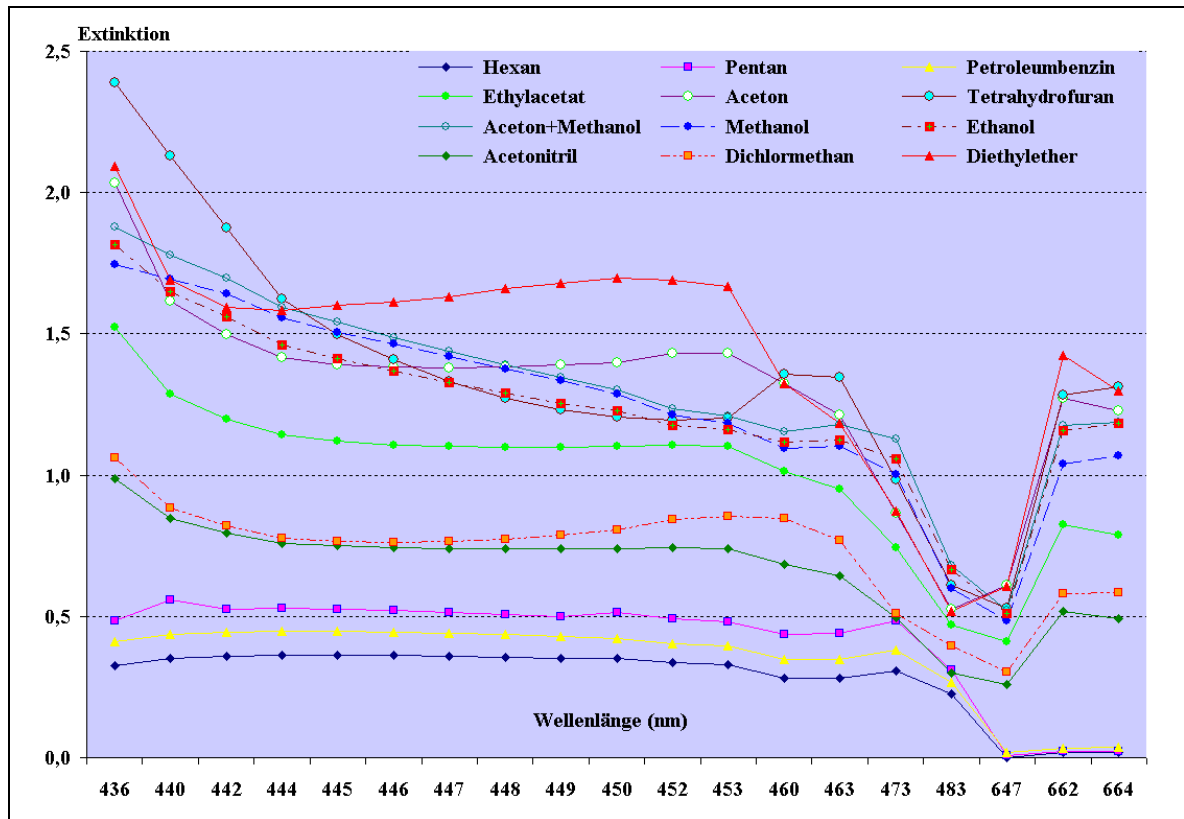


Abb. 37: Relative Absorption pflanzlicher Farbstoffe in verschiedenen organischen Lösungsmitteln und deren gewählte Wellenlänge

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass THF das wirksamste Lösungsmittel für frisches Material bei direkter Extraktion war. Obwohl Diethylether zu den wirksamsten Extraktionsmitteln gehört ist aber eine Stabilität der Farbstoffe in diesem Lösungsmittel nicht gewährleistet und gleiche Ergebnisse galten auch bei trockenem Probematerial. Die Stabilität von Lösungsmittel konnte nur bei THF, Aceton:Methanol (1:1), Ethanol, Methanol, Aceton und Acetonitril gefunden werden.

THF war nicht nur das beste Lösungsmittel für pflanzliche Farbstoffen bei spektrophotometrischer Detektion sondern ergab auch eine Stabilität der Peaks bei der HPLC-Analyse. Die relative Absorption für die Reinsubstanzen Lutein und β -Carotin in THF war nach Craft und Soares (1992) am Höchsten von allen Lösungsmitteln (*siehe Tabelle 2; Absch. 5.2.2*).

Im Zusammenhang mit Stabilität, Löslichkeit und optimaler Trennung von pflanzlichen Farbstoffen sowie Reinsubstanzen wurden die Wellenlänge-Maxima $450(\pm 4)$ nm für Lutein, $460(\pm 6)$ nm für Zeaxanthin, β -Apo-8'-Carotinal, Chlorophyll-b und β -Carotin und $440(\pm 4)$ nm für Chlorophyll-a in der HPLC-Analyse gewählt.

Bei der Auswahl der Extraktionsmittel bei der Extraktion von Traubenmaterial war THF insbesondere für die Carotinoide (Zeaxanthin, Lutein, β -Carotin, β -Apo-8'-Carotinal) und Chlorophyll (a und b) noch viel besser als die anderen üblichen Extraktionsmittel Aceton (Periadnadi 1997, unveröffentlicht).

Aus diesen Gründen wurde THF als Extraktionsmittel bei den Früchten wie Traubenbeeren, mit hohem Wasser- und Zuckergehalt und folglich als ein alternatives Laufmittel bei der HPLC gewählt.

12.1.1.1 Bei den Traubenbeeren

Mittels β -Apo-8'-Carotinal als internem Standard konnten die Farbstoffgehalte von Traubenbeeren quantifiziert werden. Aus diese Ergebnissen konnte auch der Einfluss mehrerer Faktoren bei der Analysenvorbereitung von Traubenbeeren beobachtet werden. Diese einflussnehmenden Faktoren sind der Zusatz von $MgCO_3$, die Verwendung von Puffer (pH 7,7) die Mischungsverhältnisse zwischen Probe und Extraktionsmittel. Dieses Ergebnisse werden in Abbildung 38 und 39 dargestellt.

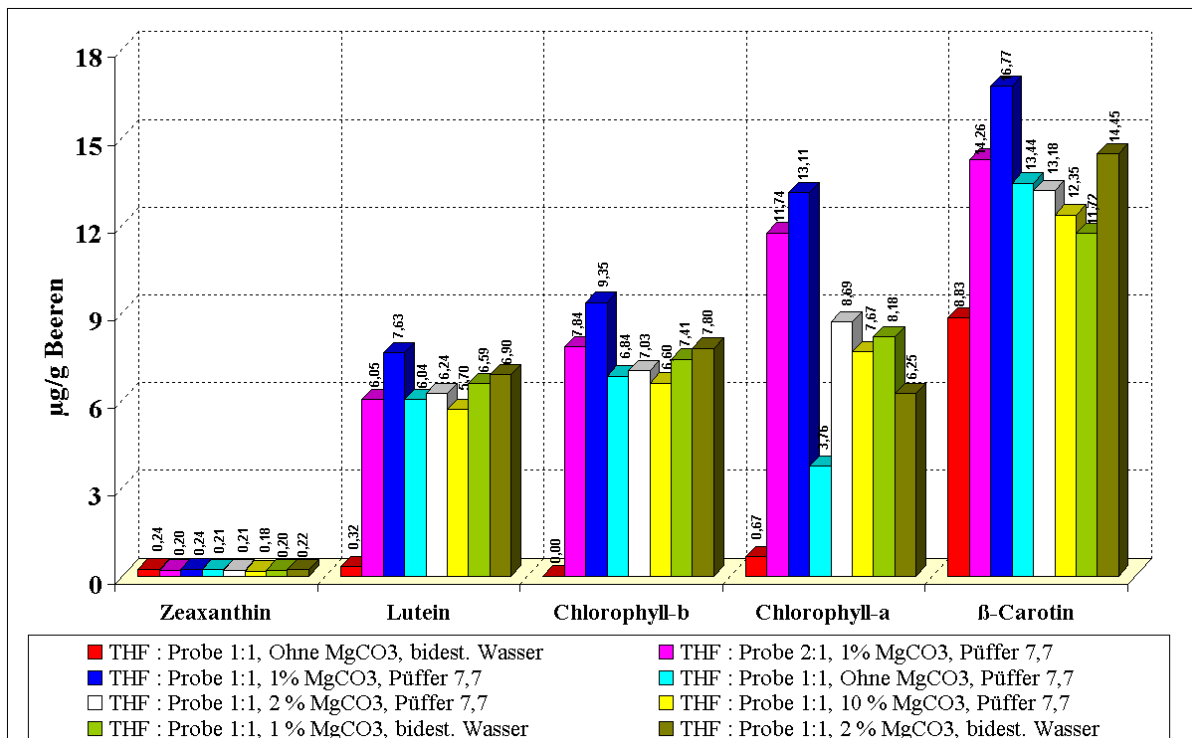


Abb. 38: Gemessene Farbstoffgehalte von Riesling-Traubenbeeren bei verschiedenen Analysenvorbereitungen ($\mu\text{g/g}$ Beeren)

Im Verlauf der Traubenextraktion war die Mischung von 1:1 zwischen Proben und dem Extraktionsmitteln THF besser als 2:1.

Der Zusatz von MgCO_3 sowie die Waschung mit neutralen Puffer pH 7,7 bei der Extraktion der Proben war wirksam, um die Stabilität der Farbstoffe sowie des β -Apo-8'-Carotinals zu erhalten.

Wurde 1% MgCO_3 den Proben zugesetzt und danach mit Puffer pH 7,7 gewaschen, ergeben sich im Bezug der Peakgrößen die besten Ergebnisse. Höhere Konzentrationen, wie etwa 10%, die danach mit Puffer pH 7,7 gewaschen wurden, zeigten schlechtere Ergebnisse. Das gleiche gilt für Proben, die keinen MgCO_3 Zusatz erhalten haben und danach mit bidest. Wasser gewaschen wurden.

Bei weiteren Versuchen mit roten Traubenbeeren sowie Riesling-Traubenbeeren zeigte der Zusatz von 1% bzw. 2% MgCO_3 , der dann mit Puffer 7,7 gewaschen wurde, noch bessere Ergebnisse. Weiterhin gab es bei der Waschung bei niedrigem pH-Werten 1,0; 3,0 und 5,0 eine sehr negative Wirkung auf die Stabilität fast aller Farbstoffe insbesondere von Zeaxanthin, Lutein, Chlorophyll-a und -b. Bei diesem Versuch konnte auch beobachtet werden, dass THF als Lösemittel für Farbstoffen besser war als Aceton.

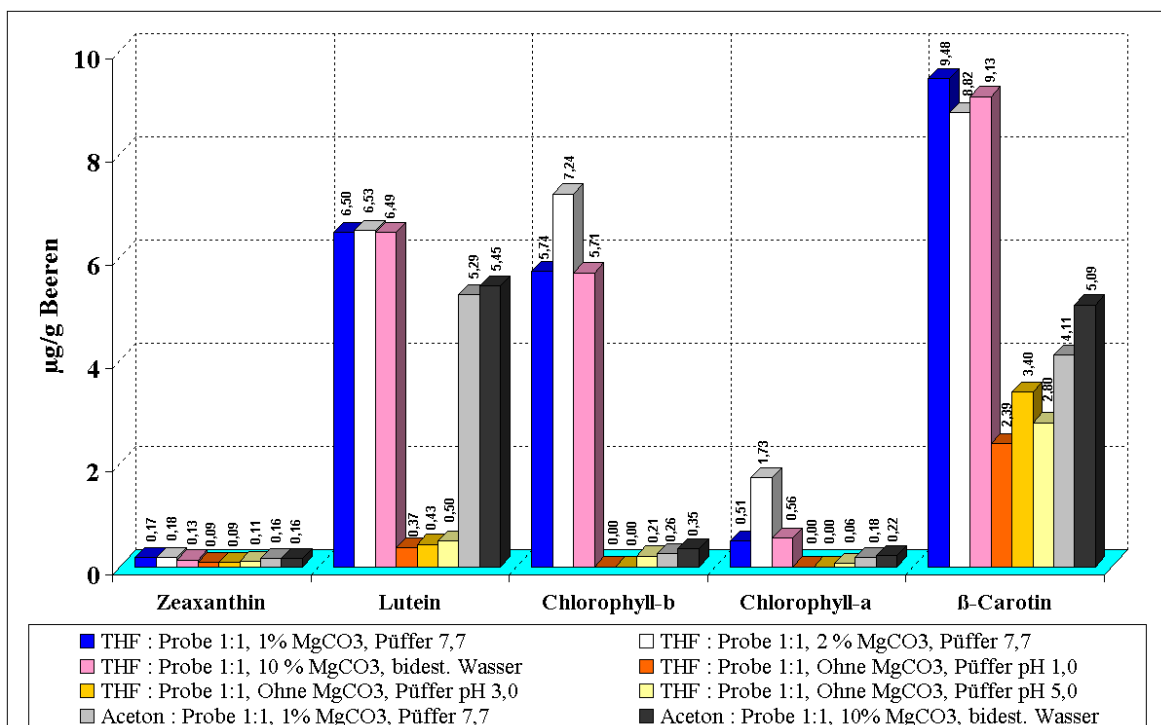


Abb. 39: Farbstoffgehalte von roten Traubenbeeren bei verschiedenen Analysenvorbereitungen ($\mu\text{g/g}$ Beeren)

Der Einfluss der Saponifikation bei den Traubenbeeren konnte in den folgenden Chromatogrammen (Abb. 40) beobachtet werden.

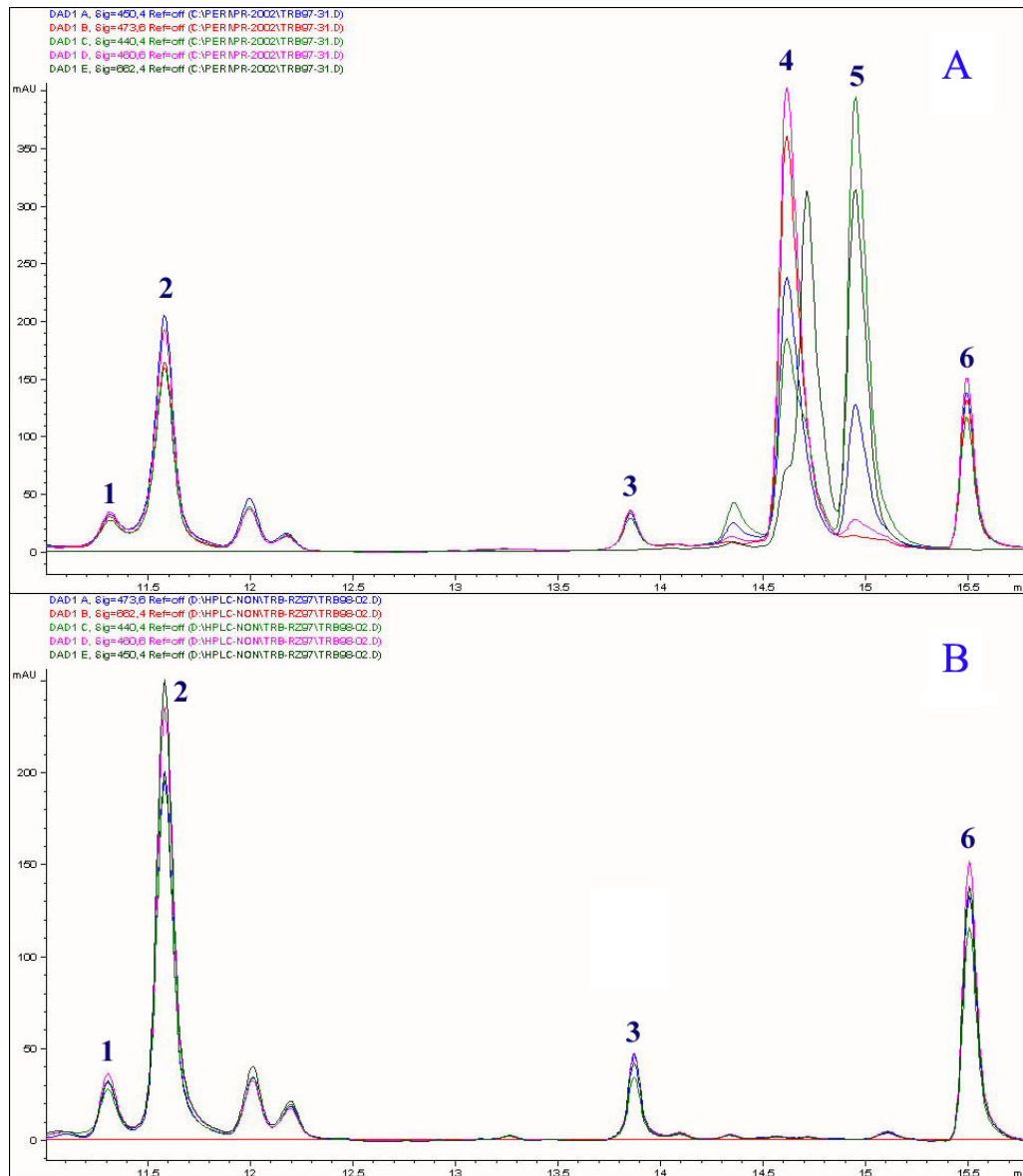


Abb. 40: Farbstoffzusammensetzung von Riesling-Traubenbeeren Kl. 64-177 Gm (Jahrgang 1998). Vor (A) und nach der Saponifikation (B): 1. Zeaxanthin, 2. Lutein, 3. β -Apo-8'-Carotinal (interner Standard), 4. Chlorophyll-b, 5. Chlorophyll-a, 6. β -Carotin.

Die Saponifikation hatte einen großen Einfluss auf die Verteilung und die Anwesenheit von Trauben-Farbstoffkomponenten. Mittels sanfter Saponifikation wurden Chlorophylle und ihre Derivate beseitigt, die sensitiv auf leicht basische Situationen reagieren, sodass die Carotinoid-Farbstoffkomponenten deutlicher gezeigt werden konnten. Da die Peaks der Traubenfarbstoffe auf den Chromatogrammen gut getrennt waren, wurde die Saponifikation in dieser Arbeit nicht als wichtig angesehen und daher darauf verzichtet.

12.1.1.2 Bei den Mosten und Weinen

Die Hauptprobleme bei der Most-Extraktion sowie beim Wein waren der hohe Zucker- und Wassergehalt in den Proben. Die flüssig-Extraktionsmethode, die im Allgemeinen für Farbstoffanalysen verwendet wird, ist die Extraktion durch Absorption an ein Trägermittel in einer offenen Glassäule, wobei die Farbstoffe danach mit Lösemittel extrahiert werden. Diese Art der Extraktion ist nur für lösliche Farbstoffe in wässrigen Phasen effektiv, aber nicht für normale frische Moste, in denen noch Trubpartikel enthalten sind. Normalerweise ist ein Teil der Farbstoffe in den frischen Mosten noch an diese Trubpartikel gebunden. Dieser Zustand könnte sich während und nach der Gärung durch Enzyme, Säuren und Alkohol verändern, wodurch diese Partikel zerstört und dann ihre Inhaltstoffe gelöst würden.

Bevor die Extraktion beim Most und Wein durchgeführt wurde, wurden mehrere Extraktionsversuche ausprobiert (Periadnadi 1999, unveröffentlicht). Wegen der allgemeinen Empfindlichkeit natürlicher Farbstoffe auf die Temperatur, wurde die Entwässerung der Proben nur bei 36 bis 38°C durch Vacuumverdampfung bis zur Trockene durchgeführt. Die Entwässerung mittels Gefriertrockner war noch effektiver und schonender für die Farbstoffe. Diese Methode wurde in dieser Arbeit weiterhin eingesetzt.

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Carotinoide in den Mosten sowie den Weinen ist es wichtig die gleichen Konditionen bei allen flüssigen Proben einzuhalten. Um die gleichen Kondition zu erreichen wurden alle Proben mittels Gefriertrockner getrocknet und danach unter den gleichen Konditionen mit Extraktionsmitteln extrahiert.

Ein optimales Verhältnis zwischen dem Wassergehalt der Proben und dem Extraktionsmittel THF ist sehr bedeutend. 50% THF in Wasser bei der Extraktion von Mosten ergab eine größere Reproduzierbarkeit als 70% THF. Dagegen erzielten bei den Weinen 70% THF in Wasser eine größere Reproduktivität als 50% THF. Zur Neutralisierung bei den Extraktionen von Mosten und Weinen sowie Beeren, ergab der Zusatz von 1% MgCO_3 und die Waschung mit Puffer pH 7,7 eine bessere Wirkung für alle Peaks.

Bei weiteren Extraktionsverfahren wurde von Khachik et al. (1986) Petroleumbenzin (Sp. 40-60°C) als Auszugphase des THF-Extrakts vorgeschlagen. Ein ähnlicher Vorschlag galt auch für den Aceton-Extrakt. Wenn die Extraktion in Methanol durchgeführt wurde, dann wurde Diethylether als Auszugmittel verwendet. Als Auszugmittel von THF- sowie des

Aceton-Extrakt ergab Petroleumbenzin (Sp. 40-60°C) eine gute Trennung zur oberen Schicht, nach der Zugabe von Wasser bei der Extraktion.

Die Saponifikation bei der Extraktion von Carotinoiden in den Pflanzen wurden oft vorgeschlagen. Es ist als ein wirksamer Reinigungsschritt für die Entfernung von Chlorophyllen und Lipoiden (Khachik et al. 1986 und dort zit. Literatur). Die Funktion der Saponifikation ist nach Razungles et al (1987) gut geeignet für Rohmaterialien, insbesondere für Proben mit vielen vorhandenen natürlichen Peaks. Diese Peaks sind schwer auf Chromatogrammen zu trennen.

12.1.2 HPLC Trennung

Zur Bestimmung von Carotinoiden bzw. Chlorophyllen in Traubenmaterial wurden mehrere HPLC-Systeme eingesetzt und verglichen. Die Verwendung eines Internen-Standards ist die bevorzugte Methode bei quantitativen Analysen. Jedoch ist es auch erforderlich, dass der interne Standard die Trennung nicht stört (Philip und Chen 1988). Da es nicht natürlich in Trauben vorkommt und in den Lösungsmitteln stabil ist, wurde es β -Apo-8'-Carotinal als interner Standard bei den HPLC-Analysen eingesetzt.

Mittels der entwickelten HPLC-Methode unter Verwendung des Dioden Array Detektors eines internen Standards konnten Farbstoffe in Traubenmaterial (Beeren, Mosten und Weinen) bestimmt werden.

Bei der HPLC-Analyse nach Gregory et al. (1986) von Trauben, Mosten und Weinen und nach dem Vergleich mit den HPLC-Chromatogrammen von gelben, orangen und orange-braunen *Tagetes* mit der gleichen Methode zeigte sich, dass in den Beeren, Mosten und Weinen von Rieslingklonen sowie von anderen „Weißen Sorten“ keine Esterformen von Lutein nachzuweisen sind, sodass nur freies Lutein in Beeren, Mosten und Weinen vorkommt.

12.1.2.1 HPLC-Trennung von Lutein und Zeaxanthin

Bei HPLC-Analyse nach Danehower und Kelley (1990) wurden die Pigmenten (Carotinoide sowie Chlorophylle) mit dem internen Standard β -Apo-8'-Carotinal gut kombiniert und getrennt, aber zwischen Lutein und Zeaxanthin konnte bei dieser Methode nicht getrennt werden.

Mehrere Methoden für die Trennung von Chlorophyllen und Carotinoiden sind bekannt, aber die Trennung von strukturellen Isomeren wie Lutein von Zeaxanthin ist bei den meisten RP-(HPLC) Verfahren normalerweise unvollständig (Gilmore und Yamamoto 1991, Darko et al. 2000).

Dihydroxy-Carotinoide, wie Lutein und Zeaxanthin, können frei vorkommen oder durch einen (Monoester) oder zwei (Diester) Fettsäuren esterifiziert werden. Daher kann die Identifikation der Peaks dieser Carotinoid-Ester bei der HPLC schwierig sein (Oliver und Palou 2000). Gute Trennungen dieser zwei Verbindungen können mit Mischungen von Standards erhalten. In den Methoden überlappen sich die zwei Peaks oder sind eng beieinander. Dieser Zustand ist besonders kritisch in Studien über die Rolle von Zeaxanthin im Xanthophyll-Zyklus, wenn es bei einem Vorkommen von Lutein in einem großen Überschuss gemessen werden muss (Juhler und Cox 1990, Gilmore und Yamamoto 1991).

Juhler und Cox (1990) trennten Reinsubstanzen von Zeaxanthin und Lutein mit anderen Carotinoiden und Chlorophyllen auf einer C18 Säule (120 mm x 4 mm ID) in 20 Min. Bei der entwickelten Methode wurde diese HPLC- Methode gewählt und leicht modifiziert. Für die gute Quantifizierung der eluierten Peaks wurde bei dieser Arbeit ein interner Standard eingesetzt. Zur bessere Trennungen von Carotinoiden und Chlorophyllen wurde die Analyse auf einer längeren Säule (250 mm x 4 mm ID) durchgeführt.

Zum Vergleich wurde die Trennung der Reinsubstanzen Zeaxanthin und Lutein auf einer C18 Säule (250 mm x 4 mm ID) mit der Trennung auf einer RP-18 Säule (120 mm x 4 mm ID) verglichen und in Abb. 41 abgebildet.

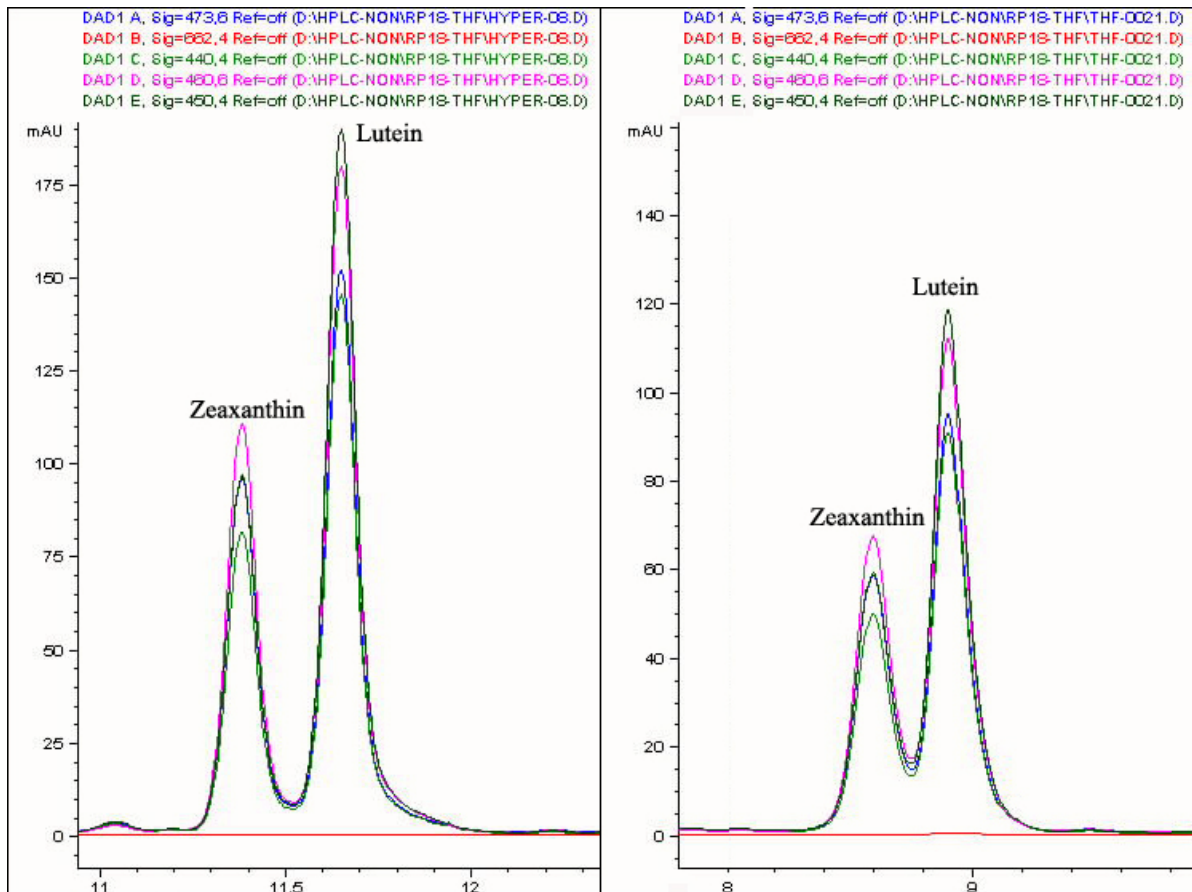


Abb. 41: Die Trennung der Reinsubstanzen Zeaxanthin (2 mg/l) und Lutein (10 mg/l) auf einer C18 Säule (250 mm x 4 mm ID) (links) und einer RP-18 Säule (120 mm x 4 mm ID) (rechts)

Eine Vielfalt mobiler Phasen könnte für RPLC von Carotinoiden eingesetzt werden. THF gehört zu den Besten alternativen mobilen Phasen um die Selektivität zu optimieren und die Analysezeiten zu verkürzen (Bell et al. 1997). Die Verwendung von Gradienten von THF in Wasser ist besser als der im allgemeinen verwendete Gradient von Ethylacetat oder anderen nicht-polaren Lösungsmitteln in Acetonitril (Juhler und Cox 1990).

Das Lösungsmittel für das Auflösen der Reinsubstanzen sowie des Extrakts sollte beachtet werden. Diese Chemikalien könnten auch die Löslichkeit der Farbstoffen und die Stabilität von Peaks auf dem Chromatogramm mitbestimmen. Die Anwendung von Aceton:Methanol (1:1) gab die beste Stabilität und Löslichkeit von Carotinoiden sowie Chlorophyllen. Der Vorteil dieser Mischung könnte auch sein, dass die Reste von Fett und Protein bei der normalen Carotinoideextraktion nicht mitgezogen werden. Diese Reste könnten eine Verstopfung von Vorsäule und Hauptsäule mit sich bringen.

12.1.2.2 Reinsubstanzen und Farbstoffe in Traubenbeeren

Mit β -Apo-8'-Carotinal als internem Standard wurde die Konzentration der Peaks quantifiziert. Sie erfolgte von den Farbstoffen Zeaxanthin, Lutein, Chlorophyll-a und -b, und β -Carotin bei verschiedenen Wellenlängen-Maxima. Von den Chromatogrammen konnten die Wellenlänge-Maxima jeder Reinsubstanz, sowie ein Beispiel-Chromatogramm von Trauben gezeigt werden, diese können mittels 3D-Chromatogramm noch verdeutlicht werden (Abb. 42).

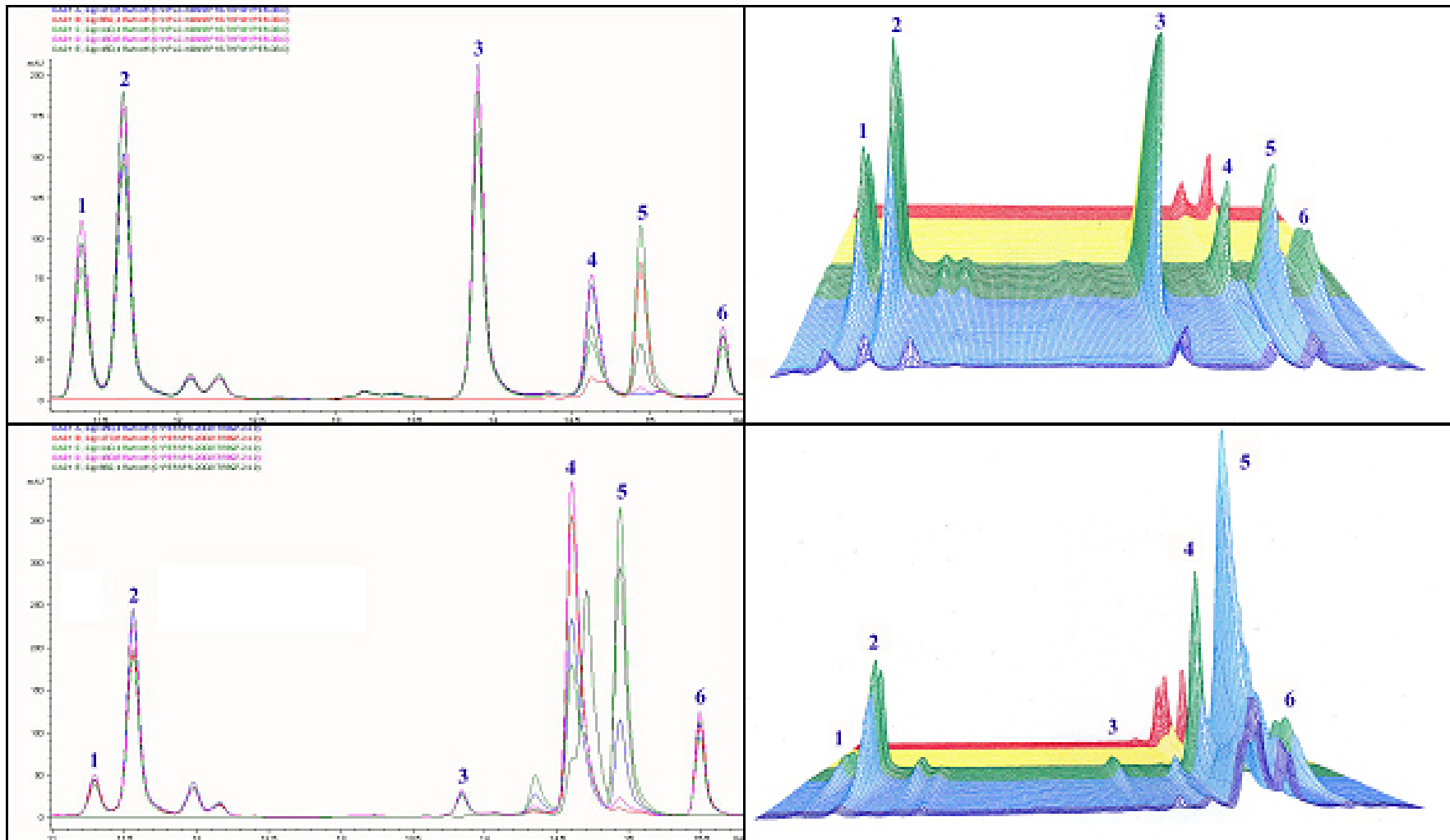


Abb. 42: HPLC-Chromatogramm (oben, links) und 3D-HPLC Chromatogramm (oben, rechts) von Standard-Mischungen der Farbstoffe und HPLC-Chromatogramm (unten, links) und 3D- HPLC Chromatogramm (unten, rechts) von Traubenbeeren der Sorte Riesling Kl. 198-16 Gm. Jahrgang 1997
 1. Zeaxanthin, 2. Lutein, 3. β -Apo-8'-Carotinal (interner-Standard), 4. Chlorophyll-b, 5. Chlorophyll-a, 6. β -Carotin.

12.1.2.3 Traubenbeeren

Alle Rieslingklone, wie ebenfalls die anderen weißen Sorten, besitzen die gleichen Farbstoffkomponenten. Die Menge in jeder Beere variiert nach den Eigenschaften jedes Klons oder Sorte. Die Konzentrationen der Carotinoide in Traubenbeeren ohne Kerne variierten zwischen 0,22 bis 35,18 µg/g frischer Beeren. Diese Konzentrationen waren, bedingt durch die in dieser Arbeit entwickelte Extraktionsmethode, bis zu 15fachen höher als nach der Aceton-Extraktionsmethode von Razungles et al. (1987). Dieses Ergebnis kann deshalb als richtig angenommen werden, da nach Craft und Soares (1992) die Löslichkeit von β-Carotin in THF bis zu 10 g/l und von Lutein bis 8 g/l beträgt. Damit ist die Löslichkeit in THF 50fach bzw. 8fach besser als in Aceton.

β-Carotin war das dominanteste Carotinoid in Traubenbeeren, gefolgt von Lutein. Zeaxanthin kam in Traubenbeeren in geringeren Mengen vor. Ausführliche Ergebnisse werden in den Tabelle (9) und (10) gezeigt.

Tabelle 9: Farbstoffgehalte von Riesling-Traubenbeeren und anderen weißen Traubenbeeren des Jahrgangs 1997 (µg /g Beeren)

Nr.	Traubensorte bzw. klone	Zeaxanthin	Lutein	Chlorophyll-b	Chlorophyll-a	β-Carotin
1	Riesling Kl. 24 - 196	0,62	11,10	16,93	22,13	26,91
2	Riesling Kl. 64 - 177	0,27	9,99	11,38	3,21	17,06
3	Riesling Kl. 94 - 02	0,40	10,17	12,74	7,21	26,18
4	Riesling Kl. 110 - 06	0,45	10,31	15,02	19,78	25,48
5	Riesling Kl. 110 - 18	0,69	12,62	15,47	16,11	26,71
6	Riesling Kl. 110 - 30	0,39	11,27	15,03	14,01	28,11
7	Riesling Kl. 198 - 16	0,75	11,39	13,20	15,71	24,16
8	Riesling Kl. 198 - 25	0,60	12,01	15,51	19,81	26,15
9	Riesling Kl. 239 - 20	0,41	11,67	16,45	23,58	23,04
10	Riesling Kl. 239 - 25	0,64	11,59	14,28	14,28	19,37
11	Weißburgunder	0,27	6,67	4,92	1,70	18,54
12	Ruländer	0,42	12,25	15,60	18,00	33,14
13	Chardonnay	0,33	8,63	9,29	15,57	24,45
14	Silvaner	0,51	9,03	11,76	9,73	21,48

Tabelle 10: Farbstoffgehalte von Riesling-Traubenbeeren und anderen weißen Traubenbeeren des Jahrgangs 1998 ($\mu\text{g} / \text{g}$ Beeren)

Nr.	Traubensorte bzw. klone	Zeaxanthin	Lutein	Chlorophyll-b	Chlorophyll-a	β -Carotin
1	Riesling Kl. 24 - 196	0,43	9,11	11,26	23,02	23,02
2	Riesling Kl. 64 - 177	0,47	8,37	11,68	14,80	25,50
3	Riesling Kl. 94 - 02	0,22	11,37	14,36	27,58	25,68
4	Riesling Kl. 110 - 06	0,35	10,08	12,59	18,70	28,77
5	Riesling Kl. 110 - 18	0,49	12,60	14,08	16,75	28,06
6	Riesling Kl. 110 - 30	0,29	9,65	10,94	8,67	26,48
7	Riesling Kl. 198 - 16	0,37	9,91	12,85	22,22	24,22
8	Riesling Kl. 198 - 25	0,44	9,46	14,00	23,32	26,64
9	Riesling Kl. 239 - 20	0,33	9,45	12,60	23,30	26,01
10	Riesling Kl. 239 - 25	0,34	9,62	14,64	24,67	29,96
11	Weißburgunder	0,69	10,54	10,41	15,70	30,14
12	Ruländer	0,45	10,04	13,65	18,70	35,18
13	Chardonnay	0,59	9,31	10,24	13,17	34,23
14	Silvaner	0,54	8,98	12,10	17,60	29,70

Die Traubenbeeren der zehn verschiedenen Rieslingklonen aus den beiden Jahrgängen enthielten fast die gleichen Farbstoffkonzentrationen, insbesondere bei Lutein. Chlorophyll-b und β -Carotin aber auch Chlorophyll-a variierten je nach Klon.

Im Allgemein scheint die unterschiedliche Farbstoffzusammensetzung der Traubenbeeren in der Konzentration von Chlorophyll-a zu liegen. Dieses könnten möglicherweise Eigenschaften jeder Sorte sein. Der Farbstoffzustand und der Reifegrad der Trauben waren ebenfalls von der Bedeutung.

12.1.2.4 Moste und Weine

Farbstoffanalysen der Moste und Weine wurde mittels der modifizierten Extraktionsmethode und HPLC-Methode durchgeführt. Die Entwässerung durch Gefriertrocknung als Probevorbereitung in der Extraktion zeigte größere Reproduzierbarkeit für alle Farbstoffe, besonders für Carotinoide und Chlorophyll, als die Einengung mit dem Vacuumrotavapor bei 38°C.

Bei der Extraktion von Mosten und Weinen spielen die optimale Verhältnisse von THF zu bidestiliertem Wasser als Extraktionsmittel eine große Rolle. 50% THF in bidestiliertem Wasser trug zur optimalen Ausbeute bei der Mostextraktion bei, während bei den Weinen 70% THF und der Zusatz von 1% MgCO_3 , sowie die Waschung mit Puffer von pH 7,7, optimal waren.

a. Moste

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Behandlungen der Moste auf den Zustand und den Gehalt an Farbstoffen im Most einwirken. Diese unterschiedlichen Behandlungen wurden weiter verwendet, um die Auswirkungen auf den Farbstoffgehalt bei dem Gärung zu beobachten. Frischer trüber Most enthält höhere Farbstoffgehalte als solche nach Mostbehandlung, wie in der Abb. 43 und *Tabelle 1 im Anhang* dargestellt.

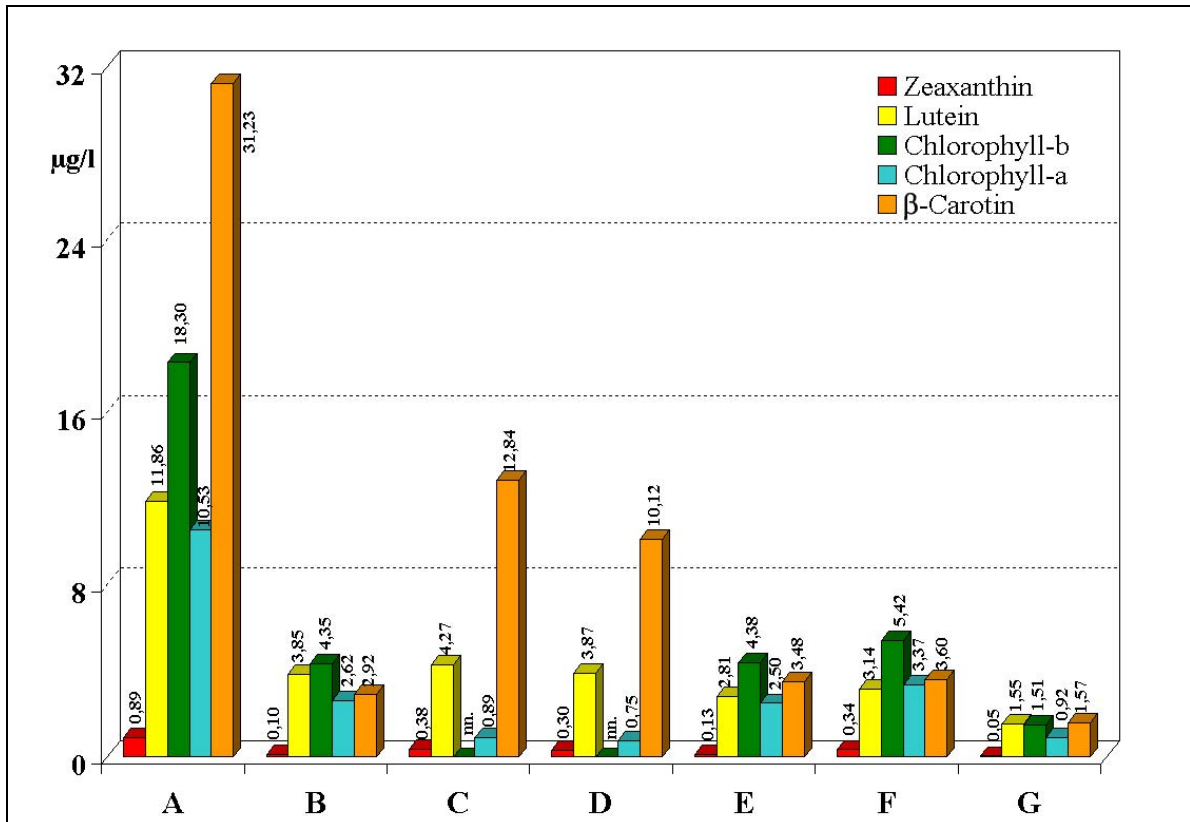


Abb. 43: Farbstoffgehalte in Most nach verschiedenen Behandlungen (μg/l)

- A. Trübe Most;
- B. Klarer Most (nach 24 Std. absetzen lassen);
- C. Klarer Most, Erhitzung 100°C, 30 Minuten;
- D. Klarer Most, Erwärmung 80°C, 15 Minuten;
- E. Schönung mit Polyclar 40 g/hl, nach 24 Stunden, Oberschicht;
- F. Schönung mit Polyclar 15 g/hl, nach 24 Stunden, Oberschicht;
- G. Klärung durch Zentrifuge, 4000 rpm, 15 Minuten.

Alle Arten der Mostbehandlung zeigten eine Abnahme der Farbstoffgehalte. Die Wärmebehandlungen (C und D) wirkten negativ bei Chlorophyll-a und -b, während Carotinoide gegenüber dem Absetzen lassen nur leicht vermindert wurden. Die viel höheren Farbstoffgehalte (Carotinoide und Chlorophylle) bei frischem trüben Most und die

sehr stark verminderten Werte beim zentrifugierten Most zeigen, dass die Farbpartikel in den frischen Mosten gebunden sind. Diese Partikel können durch den Angriff von Enzymen, Säuren und Alkohol zersetzt werden. Eine zu intensive Vorklärung der Moste und die damit verbundene Entfernung der Trubpartikel vermindert damit auch die intensivere Färbung der Weine.

Wenn der in den behandelten Mosten verbleibende Farbstoffgehalt mit dem Farbstoffgehalt des Kontrollmostes verglichen wird, können die prozentualen Farbstoffverluste nach den verschiedenen Behandlungen wie *Tabelle 2 im Anhang* dargestellt werden. In folgendem Beispiel-Chromatogramm (Abb. 44) konnte auch gezeigt werden, dass die Farbstoffzusammensetzung sich selbst nach der Mostgewinnung schon stark verändert hat, die sich durch die Anwesenheit anderer Peaks in dem Most-Chromatogramm darstellt und mit einer gleichzeitigen Gehaltsabnahme der Hauptfarbstoffe verbunden ist. Diese Veränderungen wurden auch bei anderen Mostsorten gefunden.

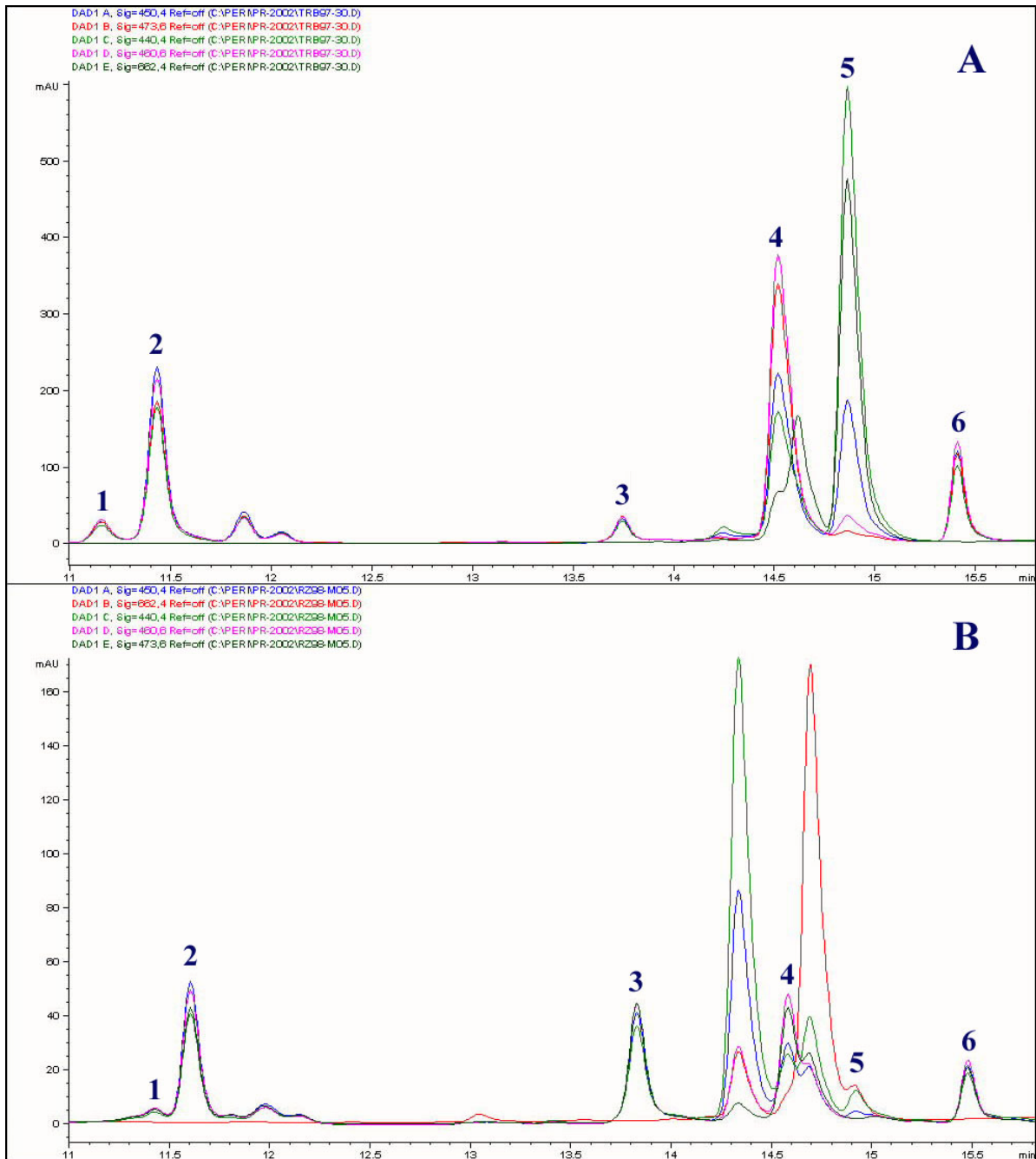


Abb. 44: Chromatogramme der Riesling Sorte Kl. 24-196 Gm. (Jahrgang 1998)

A. Beeren und **B.** Most. 1. Zeaxanthin, 2. Lutein, 3. β -Apo-8'-Carotinal (Interner Standard), 4. Chlorophyll-b, 5. Chlorophyll-a, 6. β -Carotin.

HPLC-Analyse von Farbstoffen der Moste der Jahrgänge 1997 und 1998, die durch normale Pressung für die Weinherstellung gewonnen wurden, sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 11: Farbstoffgehalte von Mosten verschiedener Rieslingklonen und anderer „Weißer Sorten“ Jahrgang 1997 (µg/l)

Nr.	Traubensorte bzw. klone	Zeaxanthin	Lutein	Chlorophyll-b	Chlorophyll-a	β-Carotin
1	Riesling Kl. 24 - 196	0,26	21,99	29,00	n.n.	19,86
2	Riesling Kl. 64 - 177	0,64	9,71	16,34	n.n.	15,92
3	Riesling Kl. 94 - 02	0,64	13,22	34,46	11,19	17,46
4	Riesling Kl. 110 - 06	0,80	39,37	69,10	n.n.	28,23
5	Riesling Kl. 110 - 18	0,81	24,98	58,16	2,38	31,83
6	Riesling Kl. 110 - 30	0,96	26,52	54,68	6,12	27,01
7	Riesling Kl. 198 - 16	0,44	13,29	23,37	n.n.	18,29
8	Riesling Kl. 198 - 25	0,28	22,52	39,66	9,16	14,94
9	Riesling Kl. 239 - 20	0,40	11,39	9,27	n.n.	10,81
10	Riesling Kl. 239 - 25	0,15	29,88	42,94	17,22	19,19
11	Weißburgunder	0,64	38,40	61,32	24,08	38,28
12	Chardonnay	1,14	45,26	46,09	17,21	88,37

Tabelle 12: Farbstoffgehalte von Mosten verschiedener Rieslingklonen und anderer „Weißer Sorten“ Jahrgang 1998 (µg/l)

Nr.	Traubensorte bzw. klone	Zeaxanthin	Lutein	Chlorophyll-b	Chlorophyll-a	β-Carotin
1	Riesling Kl. 24 - 196	2,95	73,63	47,60	17,87	137,37
2	Riesling Kl. 64 - 177	3,64	87,08	84,99	31,55	163,59
3	Riesling Kl. 94 - 02	0,32	7,45	3,46	1,83	26,95
4	Riesling Kl. 110 - 06	4,94	107,00	118,85	33,66	216,25
5	Riesling Kl. 110 - 18	6,87	158,45	166,81	34,56	296,22
6	Riesling Kl. 110 - 30	1,34	42,28	46,80	6,81	74,90
7	Riesling Kl. 198 - 16	0,64	14,22	8,47	3,74	37,16
8	Riesling Kl. 239 - 20	3,25	44,15	51,28	21,14	172,97
9	Riesling Kl. 239 - 25	0,06	1,88	2,38	0,59	17,42
10	Weißburgunder	1,88	37,51	41,14	31,90	78,86
11	Chardonnay	0,06	1,88	2,38	0,59	17,42
12	Silvaner	2,46	80,61	83,45	5,95	117,28
13	Ruländer	0,08	3,78	3,63	0,35	9,99

Die Moste aller Rieslingklone, sowie anderer weiße Sorten beider Jahrgänge besitzen alle Carotinoide sowie die Chlorophylle (a und b) mit variierenden Konzentrationen. Jeder Rieslingklon, sowie andere weiße Sorten scheinen einen eigenen Farbstoffcharakter zu besitzen, der sich durch bestimmte Farbstoffverhältnisse darstellt (*siehe Abschnitt. 12.1.3*).

Moste des Jahrgangs 1997, die mit normaler Ganztraubenpressung gewonnen und über Nacht stehen gelassen wurden, zeigten geringere Konzentration von Pigmenten als die des Jahrgangs 1998. Die Moste des Jahrgangs 1997 enthielt mehr Chlorophyll-b als die des

Jahrgangs 1998. Das ist ein Zeichen dafür, dass die 1997er Moste aus Beeren gewonnen wurden, die weniger Reife hatten als die 1998er. Nach Friedrich et al. (1986) verringert sich der Chlorophyllgehalt im Verlauf der Fruchtreife zunächst im Fruchtfleisch stärker als in der Schale. Relativ langsam erfolgt der vollständige Abbau in den subkutanen Zellschichten. In diesen kann Chlorophyll selbst dann noch nachgewiesen werden, wenn es in der Schale nicht mehr enthalten ist.

Die Konzentrationen der Farbstoffe der 97er Rieslingmoste variierten von 0,15 bis 69,1 µg/l. Die Konzentration von β-Carotin lag zwischen 10,81 und 31,83 µg/l, gefolgt von Lutein 9,71–39,37 µg/l. Die geringste Konzentration bei den Carotinoiden zeigte Zeaxanthin mit 0,15–0,96 µg/l. Bei diesen Mosten wurde Chlorophyll-b 9,27–69,1 µg/l und Chlorophyll-a 2,38–17,22 µg/l gefunden.

Die Moste des Jahrgangs 1998 waren trübe Most, die aus normaler Ganztraubenpressung gewonnen wurden, um noch besser die Farbstoffveränderungen während des Gärversuche zu beobachten. Bei den 98er Rieslingmosten variierten die Farbstoffkonzentrationen von 0,32 bis 296,22 µg/l. Die geringste Konzentration der Carotinoide zeigte wiederum Zeaxanthin mit 0,32–6,87 µg/l, während die höchsten Konzentrationen bei β-Carotin zwischen 26,95 und 296,22 µg/l betragen, gefolgt von Lutein zwischen 7,45–158,45 µg/l. Die Konzentration von Chlorophyll-b betrug 3,46–166,81 µg/l, die von Chlorophyll-a 1,83–34,56 µg/l.

Andere Most-Sorten (Weißburgunder, Chardonnay, Ruländer und Silvaner) des Jahrgangs 1997 sowie 1998 (Weißburgunder, Chardonnay) waren ebenfalls unterschiedlich in den totalen Konzentrationen der Farbstoffkomponenten (Tabelle 11 und 12). Es gab keine Unterschied in der qualitativen Zusammensetzung der Farbstoffkomponenten zwischen Mosten der Sorte Riesling und anderen Mostsorten. Die quantitative Komposition der Farbstoffe ist, durch die Sorte bedingt, sehr unterschiedlich.

b. Weine

Mittels HPLC-Analyse und spezieller Weinextraktion konnten die Farbstoffkomponenten in verschiedenen klaren, sowie trüben Jungweinen (Rieslingklonen und andere weiße Sorten) festgestellt werden.

Einen Vergleich der Farbstoffgehalte des Mostes und des daraus durch Gärung erhaltenen Jungweines der Sorte Riesling Klon 110-18 Gm und der Sorte Silvaner zeigt Abbildung 45.

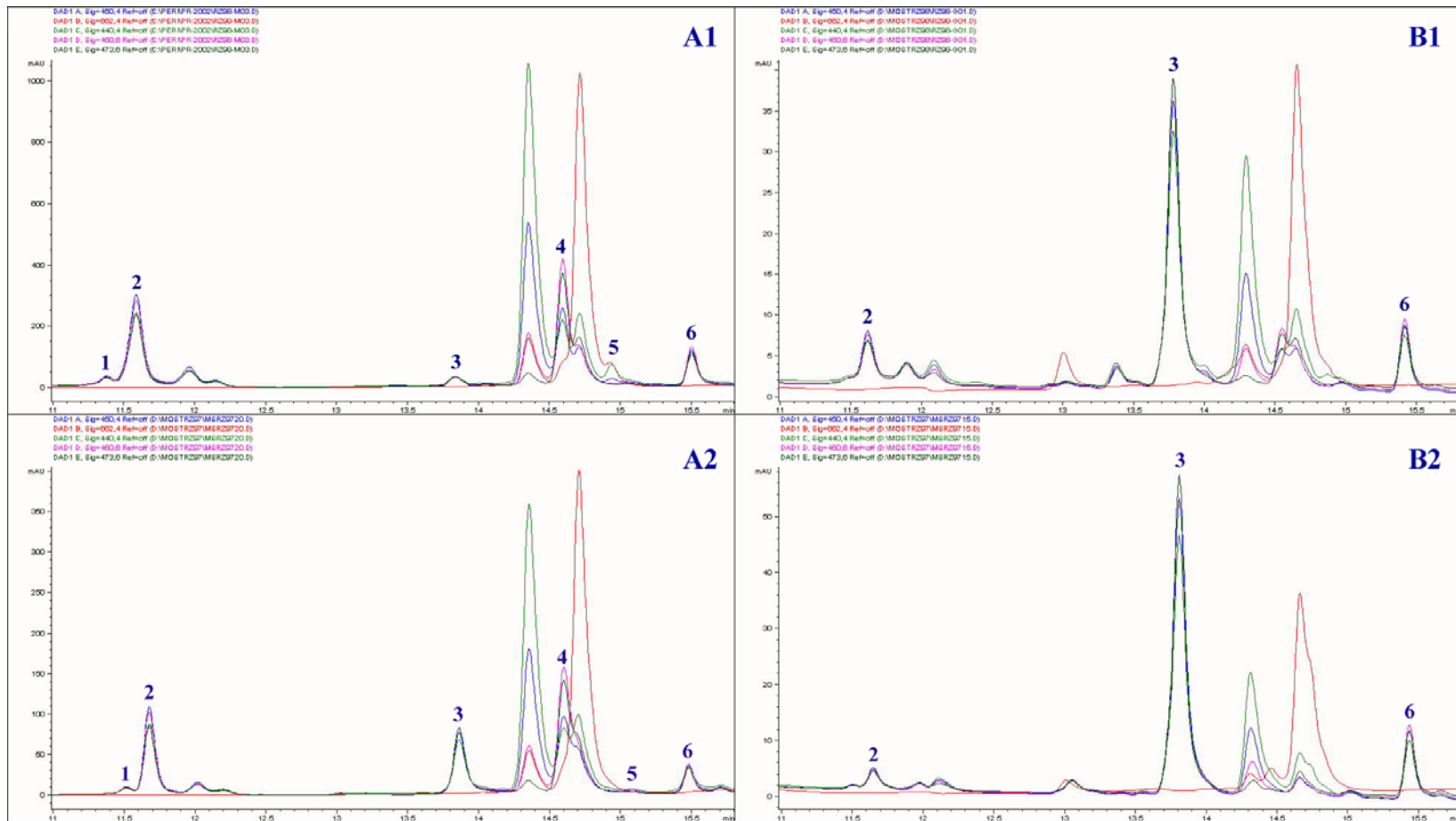


Abb. 45: Chromatogramme der Sorte Riesling Klone 110-18 Gm. Jahrgang 1998 (A1. Most, B1. Wein) und der Sorte Silvaner Jahrgang 1998 (A2. Most, B2. Wein)
 1. Zeaxanthin, 2. Lutein, 3. β -Apo-8'-Carotinal (Interner Standard), 4. Chlorophyll-b, 5. Chlorophyll-a, 6. β -Carotin

Bei den klaren Jungweinen verschiedener Gärversuche konnten noch einige Farbstoffkomponenten gefunden werden, obwohl die Konzentrationen sehr gering waren. Im allgemeinen wurden die Carotinoide (wie Lutein, β -Carotin) in Konzentrationen 0,1–10 $\mu\text{g/l}$ bei klaren Jungweinen gefunden, während Zeaxanthin nur noch im Spuren und Chlorophyll (b und a) gar nicht mehr zu finden waren. Der Farbstoffgehalt in den klaren Jungweinen könnte von verschiedenen Faktoren, wie Gärtemperaturen und Hefeklon, beeinflusst werden.

Tabelle 13: Farbstoffgehalte der Jungweine (Jahrgang 1998 Rz. Geisenheim) nach Vergärung bei zwei verschiedenen Temperaturen ($\mu\text{g/l}$)

Nr.	Traubensorte bzw. Klone	20°C		Kellertemperatur	
		Lutein	β -Carotin	Lutein	β -Carotin
1	Riesling Kl. 24 - 196	1,70	0,50	1,30	1,10
2	Riesling Kl. 64 - 177	1,49	0,45	0,67	2,46
3	Riesling Kl. 94 - 02	1,68	2,13	n.n.	n.n.
4	Riesling Kl. 110 - 06	3,68	n.n.	1,35	1,25
5	Riesling Kl. 110 - 18	0,62	0,87	1,64	7,88
6	Riesling Kl. 110 - 30	2,13	7,40	0,90	2,91
7	Riesling Kl. 198 - 16	1,15	4,90	n.n.	n.n.
8	Riesling Kl. 239 - 20	0,31	1,08	0,75	9,59
9	Riesling Kl. 239 - 25	1,85	2,92	0,86	4,06
10	Ruländer	1,95	8,36	0,82	8,63
11	Weißburgunder	3,75	12,12	1,33	11,35
12	Silvaner	1,75	11,62	1,67	14,57
13	Chardonnay	2,48	2,16	1,49	2,93

Höhere Gärtemperaturen erhöhen die Löslichkeit von Farbstoffkomponenten wie Lutein (wie Tabelle 13). Obwohl die Konzentrationen von β -Carotin in den Mosten viel größer als die von Lutein waren, war aber der prozentuale Gehalt an Lutein in den Weinen im Vergleich zu Lutein in den Mosten viel größer als der von β -Carotin. Dieses ist auf die unterschiedliche Löslichkeit beide Farbstoffe in der wässrig alkoholischen Lösung zurückzuführen.

Andererseits könnte die viel geringere Konzentration auch von physikalischen Faktoren wie dem Gewicht von Trübparkeln verursacht werden, in denen die Farbstoffkomponenten enthalten sind, und die sedimentieren. Dieser könnte durch die Verringerung der Dichte durch die Alkoholbildung gefördert worden sein.

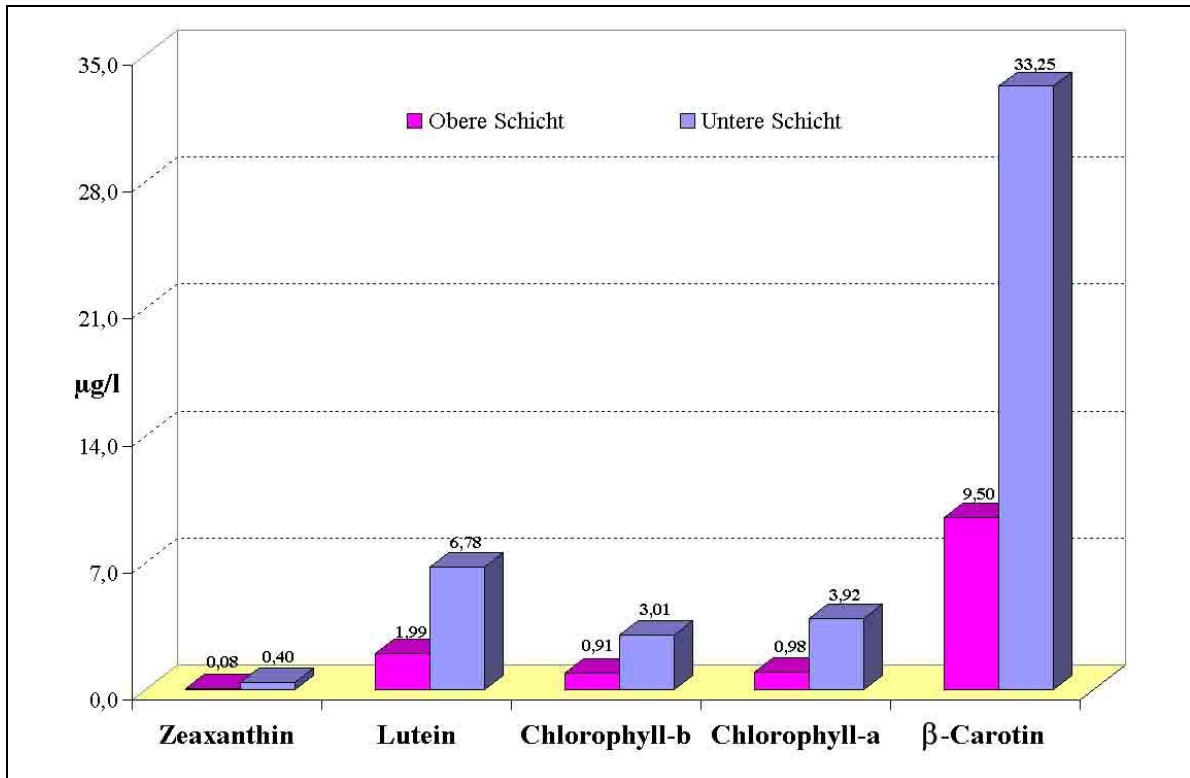


Abb. 46: Farbstoff-Zustand von Versuchsjungweinen (µg/l)

Beim Vergleich beider Schichten waren die Konzentration aller Farbstoffe in der unteren Teil fast dreimal höher als in der oberen Schicht. Diese Konzentrationen waren gelöste Konzentrationen Farbstoffe in den klaren Jungweinen. Die TDN-Konzentrationen beider Schichten werden in *Tabelle 18* dargestellt.

Versuche mit Jungweinen wurde deshalb durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Hefen auf mögliche Farbstoffveränderungen nach der Gärung feststellen zu können. Die Ergebnisse werden in *Abb. 47* dargestellt.

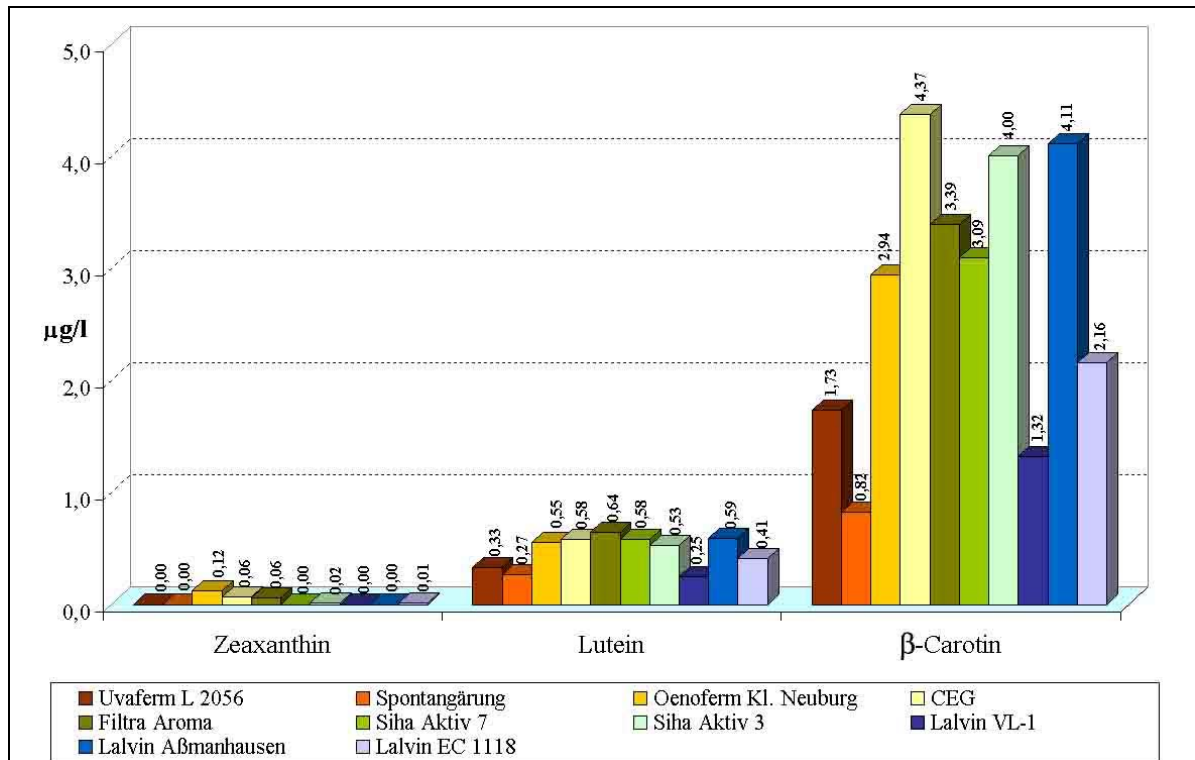


Abb. 47: Carotinoidgehalte ($\mu\text{g/l}$) von klaren Jungweinen (Riesling Kl. Ø 239 Gm., Jahrgang 1998) nach der Gärung mit verschiedenen Hefestämmen

Klare Jungweine aus normaler Ganztraubenpressung, die mit verschiedenen Hefeklonen vergoren wurden, zeigten in den Chromatogrammen noch Carotinoide aber keine Chlorophylle mehr. Wie aus den unterschiedlichen Carotinoidgehalten zu erkennen ist, können Hefen ihn durch ihre Aktivität während der Gärung beeinflussen.

Wegen der Struktur des Luteins, das eine OH-Gruppe enthält, könnte aus Lutein mit großer Wahrscheinlichkeit der erste Precursor hergeleitet werden. Aus dieser Vermutung heraus, könnte auch der Luteinabbau, als ein Zeichen der Aktivität der Hefen während der Gärung, einen Einfluss auf die Ausprägung des Petroltons haben. Der höchste Luteinabbau wurde bei Siha 3, Uvaferm L-2056 und Lalvin EC 1118, und der niedrigste wurde bei CEG, Filtra Aroma und Siha Aktiv-7 gefunden.

Beim Vergleich der in Jungweinen verbleibenden Farbstoffgehalte mit den Farbstoffgehalten des Kontrollmostes, können die prozentualen Farbstoffveränderungen durch die Gärung wie in den *Tabellen 3 und 4 (Anhang)* dargestellt werden.

Ähnlich wie bei den klaren Jungweinen, wurden nach der Gärung bei den trüben Jungweinen, die aus ganz trübem Most gegoren wurden, im allgemeinen keine Chlorophylle mehr (insb. Chlorophyll-b) gefunden.

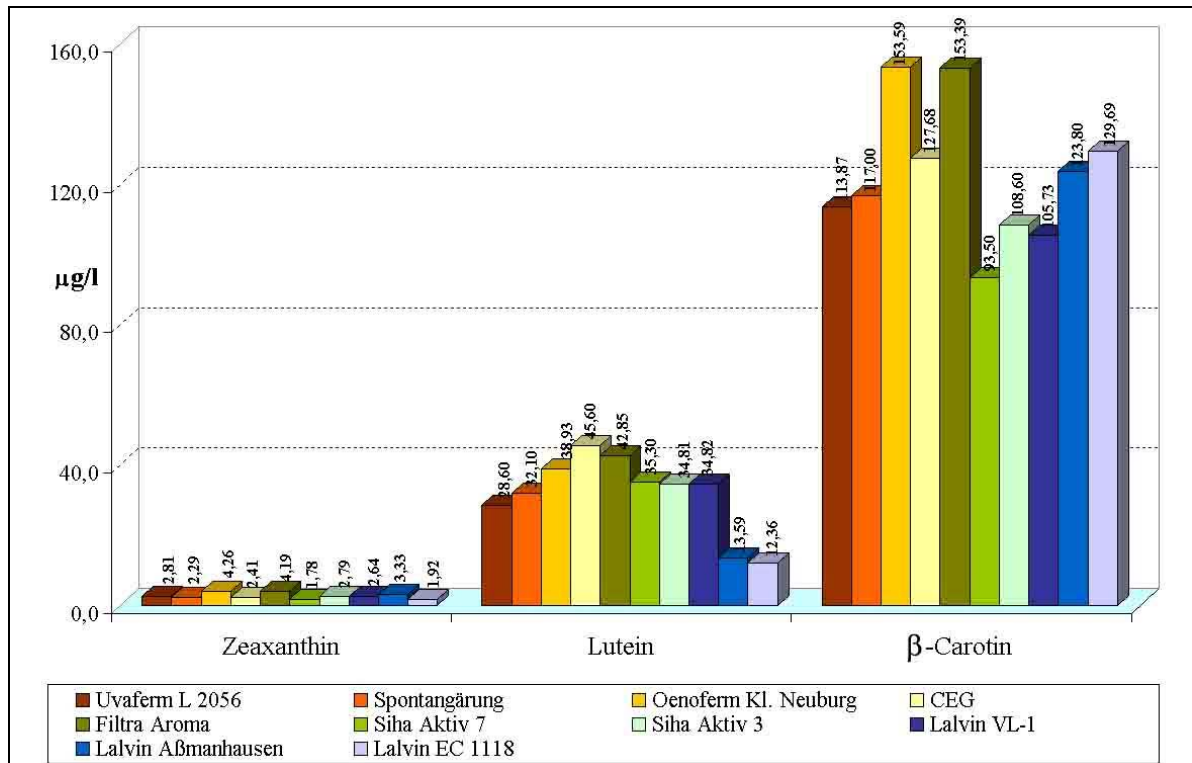


Abb. 48: Carotinoidgehalte (µg/l) von trüben Jungweinen (Riesling Klonengemisch, Jahrgang 1998) nach der Gärung mit verschiedenen Hefestämmen

Wenn die in den Jungweinen verbleibenden Farbstoffgehalte mit dem Farbstoffgehalt des Kontrollmostes verglichen wurden, können die prozentualen Farbstoffveränderungen nach der Gärung wie in den *Tabellen 5 und 6 (Anhang)* dargestellt werden.

Zum Vergleich wurden auch fertige Weine des Jahrgangs 1997 des Fachgebietes Rebenzüchtung auf ihre Carotinoidgehalte analysiert. In den zweijährigen Weinen konnten nur noch ganz geringe Menge von Carotinoiden festgestellt werden. Die Konzentrationen der Carotinoide (Lutein, β-Carotin) betragen nur noch weniger als 0,5 µg/l. Die Ergebnisse werden in der Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Carotinidgehalte ($\mu\text{g/l}$) in Weinen des Jahrgangs 1997 des Fachgebietes Rebenzüchtung Geisenheim

Nr.	Traubensorte bzw. Klone	Lutein	β -Carotin
1	Riesling Kl. 24 - 196	0,28	0,20
2	Riesling Kl. 64 - 177	0,32	n.n.
3	Riesling Kl. 94 - 02	0,19	0,34
4	Riesling Kl. 110 - 06	0,47	n.n.
5	Riesling Kl. 110 - 18	0,45	n.n.
6	Riesling Kl. 110 - 30	0,19	0,14
7	Riesling Kl. 198 - 16	0,62	n.n.
8	Riesling Kl. 198 - 25	0,49	n.n.
9	Riesling Kl. 239 - 20	0,12	0,11
10	Ruländer	0,30	n.n.
11	Weißburgunder	0,17	0,30
12	Chardonnay	0,45	n.n.
13	Silvaner	0,45	n.n.

12.1.3 Verhältnis zwischen β -Carotin und Lutein

β -Carotin und Lutein sind die Carotinoide, die β - und α -Ringe in ihrem Molekül tragen. Die Verhältnisse zwischen β -Carotin zu Lutein in Traubenbeeren werden in Abb. 49 und Abb. 50 sowie in den *Tabellen 7, 8, 9, 10 im Anhang* dargestellt.

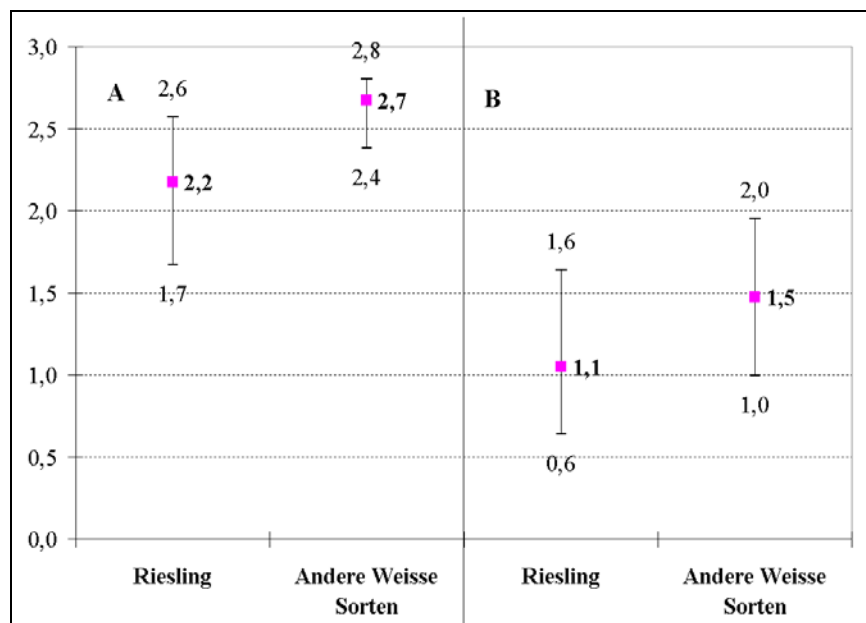


Abb. 49: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein von Beeren (A) und Mosten (B) des Jahrganges 1997

Beim Vergleich der proportionalen Werte von β -Carotin zu Lutein in den Trauben sowie Mosten zeigten bei Rieslingklonen des Jahrgangs 1997 niedrigere Werte als bei anderen

„Weißen Sorten“. Es deutet darauf hin, dass Lutein im Vergleich zu β -Carotin prozentual berechnet in Rieslingklonen mehr als bei anderen weißen Sorten vorkommt.

Die Konzentrationen von β -Carotin waren bei den Beeren den 97er Rieslingklonen 1,7–2,6fach so hoch wie Lutein. Andere „Weiße Sorten“ lagen im Bereich des 2,4–2,8fachen. Bei den Mosten zeigten 97er Rieslingklone die Verhältnisse 0,6–1,6fach und bei anderen „Weiße Sorten“ lagen sie im Bereich des 1–2fachen. Aus diesen Verhältnissen konnte festgestellt werden, dass Rieslingsorten bei den Beeren sowie den Mosten niedrigere β -Carotin : Lutein Verhältnisse als die anderen „Weißen Sorten“ haben. Ähnliche Ergebnisse konnte auch bei den Beeren und Mosten des Jahrgangs 1998 festgestellt werden diese werden in der Abb. 50 dargestellt.

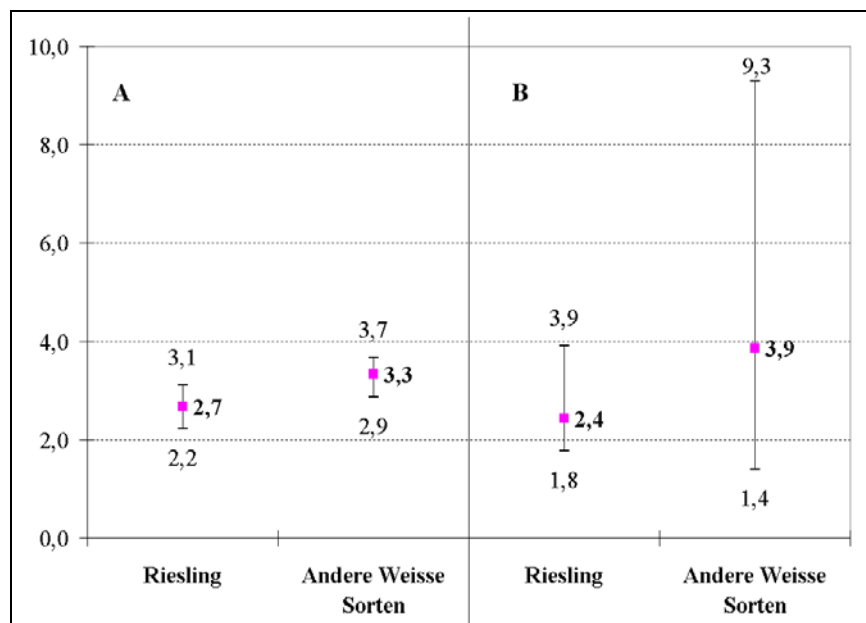


Abb. 50: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein von Beeren (A) und Mosten (B) des Jahrganges 1998

Im Jahrgang 1998 zeigten Rieslingklone Verhältnisse von β -Carotin zu Lutein im Bereich des 2,2–3,1fachen bei den Beeren, während andere „Weiße Sorten“ ein solches von 2,9–3,7fachen aufwiesen. Bei den Mosten des Jahrgangs 1998 zeigten Rieslingklone die Verhältnisse 1,8–3,9fach während bei anderen „Weißen Sorten“ ein solches von 1,4–9,3fachen gemessen wurde. Die Werte zeigten, dass die Verhältnisse von β -Carotin zu Lutein zwischen Rieslingsorten und anderen Sorten bei den Trauben und den Mosten unterschiedlich sind. Aus den Verhältnissen konnte festgestellt werden, dass Rieslingsorten im Verhältnis mehr Lutein als andere weißen Sorten enthalten.

12.2 TDN und potenzielles TDN

12.2.1 TDN

So, wie die TDN-Entwicklung bei der Lagerung des Weines, ist auch die TDN-Bildung beim Weinherstellungsprozess von Bedeutung. Außer dem Carotinoid-Vorkommen in den Beeren bzw. Mosten können bei der TDN-Bildung viele weitere Faktoren, wie Traubensorten und -klone, die verwendeten Hefen, wie auch der Jahrgang eine bedeutende Rolle spielen. Aus diesem Grunde ist es wichtig, alle möglichen auslösenden Aspekte zur TDN-Bildung zu beobachten.

Neben der Beobachtung des TDN-Bildungsprozesses während der Weinherstellung und dem damit verbundenem Carotinoid-Abbauprozess wurden auch einige Modellversuche an Beerenextrakten und Reinsubstanzen durchgeführt.

12.2.1.1 TDN-Gehalte bei verschiedene Klone der Sorte „Weißer Riesling“ und bei anderen weißen Sorten

Bei der Bestimmung von TDN mittels GC/MS mit Naphthalin als Internem Standard, wurde der TDN-Gehalt bei verschiedenen Rieslingklonen und anderen Weißweinsorten der Jahrgänge 1996 und 1997 gemessen.

Tabelle 15: TDN-Gehalte ($\mu\text{g/l}$) in Weinen aus verschiedenen Rieslingklonen und anderer weißer Sorten der Jahrgänge 1996 und 1997

Nr.	Rieslingklone und Sorten	Jahrgang	
		1996	1997
1	Kl. 24-196	17,9	25,3
2	Kl. 64-177	19,0	15,7
3	Kl. 94-02	21,5	17,6
4	Kl. 110-06	29,7	14,7
5	Kl. 110-18	13,6	9,9
6	Kl. 110-30	13,1	10,2
7	Kl. 198-16	17,6	13,9
8	Kl. 198-25	16,2	8,4
9	Kl. 239-20	20,0	20,4
10	Kl. 239-25	9,8	14,6
11	Weißburgunder	6,7	4,2
12	Ruländer	6,4	2,3
13	Chardonnay	8,0	2,8
14	Silvaner	5,2	1,9

Die TDN-Konzentrationen der Weine der Rieslingklone des 96er Jahrgangs lagen zwischen 9,8–29,7 $\mu\text{g/l}$. Bei den anderen weißen Sorten wurden zwischen 5,2–8,0 $\mu\text{g/l}$ gefunden. Beim Jahrgang 97 betrug die TDN-Konzentration nach der Abfüllung der Weine bei den Rieslingklonen zwischen 8,4–25,3 $\mu\text{g/l}$ und bei den vier anderen weißen Sorten 1,9–4,2 $\mu\text{g/l}$. Die TDN-Gehalte lagen bei allen Rieslingklonen in beiden Jahren deutlich höher als bei den nicht Rieslingweinen. Man findet bei allen Sorten jahrgangsbedingte Unterschiede.

Der Vergleich von TDN zu dem im Most vorkommenden Lutein als Carotinoid-Vorkommen bei der 1998er Most wird in *Absch. 12.6.1.2* diskutiert.

12.2.1.2 TDN-Gehalt in Weinen verschiedener Jahrgänge

Deutliche Unterschiede in den TDN-Konzentrationen von Weinen verschiedener Jahrgänge der Sorte „Weißer Riesling“ Klon Ø 110 Gm. sind in Abbildung 51 dargestellt.

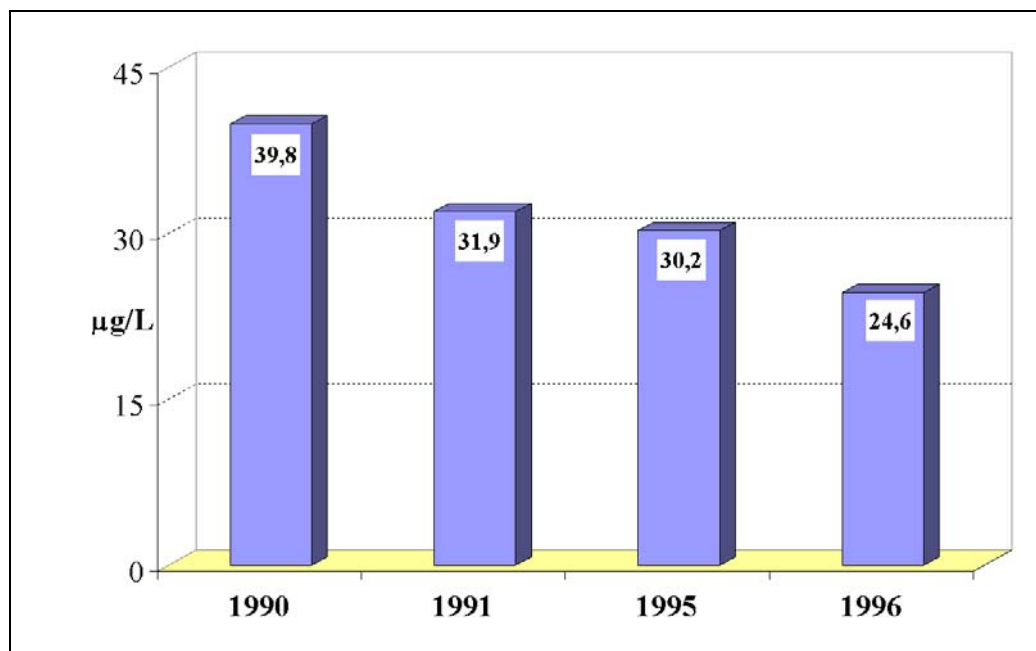


Abb. 51: TDN-Gehalte von Rieslingweinen (Kl. Ø 110 Gm.) verschiedener Jahrgänge

Bei zeitgleicher Analyse von Riesling-Weinen (Kl. Ø 110 Gm.) verschiedener Jahrgänge zeigten sich steigende Konzentrationen in Abhängigkeit von der Lagerzeit. Nach Simpson und Miller (1983), Rapp und Güntert (1986) und Marais et al. (1992b) enthalten ältere Rieslingweine höhere TDN-Konzentration im Vergleich zu jüngeren Weinen.

12.2.1.3 TDN-Gehalte in Weinen die mit verschiedenen Hefen vergoren wurden

Außer dem Carotinoidgehalt verschiedener Sorten, als Hauptprecursor der TDN-Bildung, kann auch die verwendete Gärhefe einen Einfluss auf die TDN-Freisetzung ausüben.

Tabelle 16: TDN-Gehalte verschiedener Rieslingweine (Kl. Ø 110 Gm.) nach der Vergärung mit verschiedenen Hefen ($\mu\text{g/l}$)

Nr.	Hefe	Jahrgang	
		1994	1993
1	Lalvin Assmanshausen	3,6	4,3
2	CEG	2,6	3,0
3	Lalvin EC 1118	2,7	2,7
4	Lalvin V	1,5	3,0
5	VL-1	1,2	4,7
6	Siha Aktiv-7	0,8	3,7
7	Spontangärung	0,7	3,7

Die Gehalte an TDN sind in den hier untersuchten 1993er und 1994er Weinen sehr gering. Ein deutlicher Unterschied des TDN-Gehaltes abhängig von den verwendeten Reinzuchthefen kann nur für den 1994er Jahrgang bestätigt werden. Im 1993er sind die vorhandenen TDN-Mengen weitgehend gleich. Wobei ein Unterschied zwischen den beiden Jahrgängen in soweit vorhanden ist, dass es sich bei dem 1993er um einen reifen, beim 1994er um einen nicht ganz ausgereiften Jahrgang handelte. Ein möglicher Beitrag des vergärenden Hefestammes auf die Bildung von TDN ist ebenfalls, wie von Sponholz und Hühn (1997) bereits dargestellt wurde, anzunehmen. Es muss aber insoweit relativiert werden, dass der Jahrgang und damit die vorhandenen Precursor, einen bedeutenden Einfluss auf die TDN-Bildung haben.

Tabelle 17: TDN-Gehalte verschiedener Riesling-Jungweine (Kl. Ø 239 Gm. Jahrgang 1998) bei Vergärung mit verschiedenen Hefen und Temperaturen ($\mu\text{g/l}$)

Nr.	Hefe	TDN-Gehalt	
		20°C	Kellertemperatur
1	Uvaferm L 2056	5,92	4,80
2	Lalvin Aßmanhausen	4,94	4,12
3	Filtra Aroma	3,38	2,97
4	Spontangärung	5,18	4,50
5	Siha Aktiv-7	4,05	3,65
6	Lalvin EC 1118	7,79	9,74
7	VL-1	6,88	6,15
8	Oenoferm Kl. Neuburg	4,12	2,96
9	CEG	5,60	4,17
10	Siha 3	5,10	5,07

Sowie in den Jahrgangswainen konnte auch in Jungweinen der Unterschied der TDN-Bildung durch Hefen gezeigt werden. In mehreren Versuchen zeigten sie ein unterschiedliches TDN-Bildungsvermögen. Besonders die Hefen Lalvin EC 1118 sowie VL-1 zeigten deutlichere Neigungen zu höheren TDN-Konzentrationen als die weiteren verwendeten Hefestämme. Im allgemeinen produzierten die meisten Hefen leicht höhere TDN-Gehalt bei einer Vergärung bei 20°C, als bei Kellertemperatur. Die Bildung dieser geringen TDN-Mengen läuft bereits während der Gärung ab.

12.2.1.4 TDN-Gehalte bei Modellversuchen

Bei der TDN-Analyse beider Schichten der klaren Jungweine wurden auch unterschiedliche Konzentrationen beobachtet. Wie bei den gelösten Farbstoffgehalten (Abb. 46) wurden auch bei den TDN-Konzentrationen in der unteren Schicht des Weines bis zu dreifach höhere Konzentrationen als in der oberen klaren Schicht gefunden.

Tabelle 18: TDN-Gehalt von Jungweinen bei zwei Teilen von klaren Jungweinen

Nr.	Schichtung	Konzentration (µg/l)
1	Obere Schicht	5,65
2	Untere Schicht	18,71

Der höhere TDN-Gehalt, sowie Farbstoffgehalt, befindet sich in der unteren Schicht des Weines, der in der unteren Schicht auch eine intensivere Farbe als in der oberen Schicht aufweist. Der unterschiedliche TDN-Gehalt der Weine könnte von dieser unterschiedlichen Pigmentierung hergeleitet werden. Die Vermutung der Carotinoide als TDN-Precursoren werden dadurch verstärkt.

In Modellversuchen mit verschiedenen Entblätterungen von Rieslingreben konnte beobachtet werden, dass die TDN-Konzentrationen in den Weinen, die aus Beeren von entblätterten Stöcken gewonnen wurden, mindestens zweifach höher lagen als die aus den nicht entblätterten Stöcken (*siehe Tabelle 11 in Anhang*). Diese Ergebnisse stimmen mit Marais et al. (1992a) und Bureau et al. (2000) überein, dass die TDN-Precursor Konzentrationen wie das C₁₃-Norisoprenoid-Glycosid, in sonnenungeschützten Beeren in fast zweimal höheren Konzentration, wie das in beschatteten Weintrauben, gefunden wurden. Es kann gesagt werden, dass die TDN-Konzentration in den Weinen auch von der Art und der Konzentration der Beerenpigmente (Carotinoid) als Precursor abhängt, deren Konzentration auch von den Pflanzen aufgenommenen Lichtmengen abhängig ist.

12.2.2 Potenzielles TDN

12.2.2.1 Wein-Modellversuch

Die Messung des potenziellen TDN ist eine schnelle Art der künstlichen Alterung in kurzer Zeit durch Säurehydrolyse, um die mögliche totale TDN-Konzentration oder ein TDN-Maximum bei einer Probe nachzuweisen. Nach Marais (1992) wurde zur Bestimmung der potenziellen TDN-Gehalte eine Säurehydrolyse bei pH 1,0 über 4 Stunden bei 50°C durchgeführt.

Nachdem ein TDN-Maximum erreicht wurde, führt unter den beschriebenen Bedingungen eine längerfristige Wärmebehandlung zu einem starken Rückgang der TDN-Gehalte durch einen weiteren Abbau zu Folgeprodukten.

Zur künstlichen Alterung bei Jungweinen wurden zeitgleich vier verschiedene Säurehydrolysen mit Malat und Tartarat bei pH 2,0 und mit Schwefelsäure bei pH 1,0 und 2,0 bei 50°C unter Stickstoff durchgeführt. Dieses Ergebnis stimmt mit Marais (1992) überein. H₂SO₄ bei pH 1,0 gab eine wesentlich höhere Konzentrationen der maximalen TDN Konzentration (Abb. 52A).

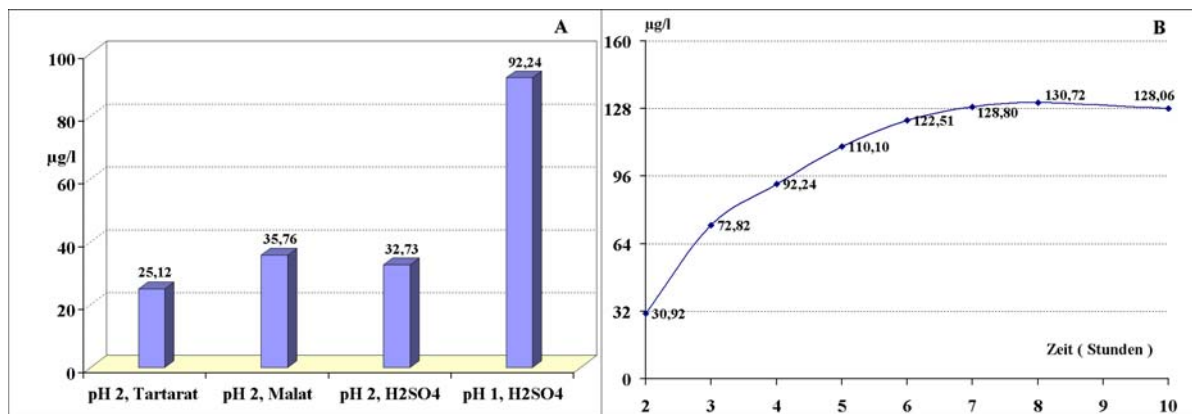


Abb. 52: Potenzieller TDN-Gehalt eines Rieslingweines (Jahrgang 1997) durch Erwärmung bei 50°C mit drei verschiedenen Säuren (A) und verschiedenen Hydrolysezeiten bei pH 1,0 mit H₂SO₄ (B)

Um die maximale-Konzentration zu erreichen war eine Hydrolysezeit von 8 Stunden notwendig, wie Abb. 52B zeigt. Bei einem Rieslingwein des Jahrgangs 1997 konnte ein TDN-Gehalt bis zu 130,7 µg/l erreicht werden.

Die mögliche Verhältnisse der TDN-Bildung, sowie die Carotinoideabbauprozesse von Carotinoiden (Lutein und β -Carotin) als Precursoren, wurden mittels Reinsubstanzen und saponifiziertem Beerenextrakt, sowie durch die Messung des potenziellen TDN, untersucht.

12.2.2.2 Beerenextrakt –Modellversuch

Unter den oben genannten Bedingungen wurden einige Versuche mit saponifiziertem Beerenextrakt, sowie mit den Reinsubstanzen (Lutein, β -Carotin), in einem weinähnlichen Medium durchgeführt. Das synthetische Medium, das aus 15% Ethanol, Äpfelsäure 2,6 g und Tartarat 1,6 g pro Liter besteht, wurde danach mit H_2SO_4 auf pH 1,0 gebracht.

Um optimale Abbauprozesse bei dem Beerenextrakt zu betrachten, wurde die künstliche Alterung bei verschiedenen pH-Werten in zwei verschiedenen Medien bei 8stündiger Hydrolysezeit, wie in der Tabelle 19, durchgeführt.

Tabelle 19: Potenzieller TDN-Gehalt ($\mu\text{g/l}$) von saponifiziertem Beerenextrakt* bei Erwärmung auf 50°C bei unterschiedlichen pH-Werten und unterschiedlichen Medien

Nr.	Medium	pH 1	pH 2	pH 3,09
1	Blankwein**	10,43	10,03	3,99
2	Synthetisches Medium	6,78	6,57	3,32

* 10g Beerenextrakt ohne Kerne pro Liter Medium **Wein aus Blankmost (enthält kein Farbstoff mehr) hergestellt

Der saponifizierte Beerenextrakt, der nach den vorherigen Analysen nur aus Lutein, β -Carotin und Zeaxanthin besteht, erwies sich, bei verschiedenen pH-Werten als Precursor-Vorkommen zur Bildung potenzielle TDN.

In Tabelle 19 kann zusammengefasst werden, dass bei Hydrolyse bei pH 1,0 mehr TDN als bei den höheren pH-Werten gebildet wurde. Der Versuch mit einem aus 10 Gramm saponifizierten Beerenextrakt erreichte maximale TDN-Werte bis zu $10,43 \mu\text{g/l}$ TDN im Blankwein-Medium.

Diese Ergebnisse wurden für synthetisches Medium verwendet, um den günstigsten Zeitpunkt für die maximale Bildung von TDN herauszufinden.

Wegen Vorhandensein von Lutein, β -Carotin, und Zeaxanthin als Hauptfarbstoffe in Traubenbeeren, wurde die potenzielle Bildung von TDN aus saponifiziertem Beerenextrakt im weinähnlichen Medium beobachtet. Die Ergebnisse wird in der Abbildung 53 dargestellt.

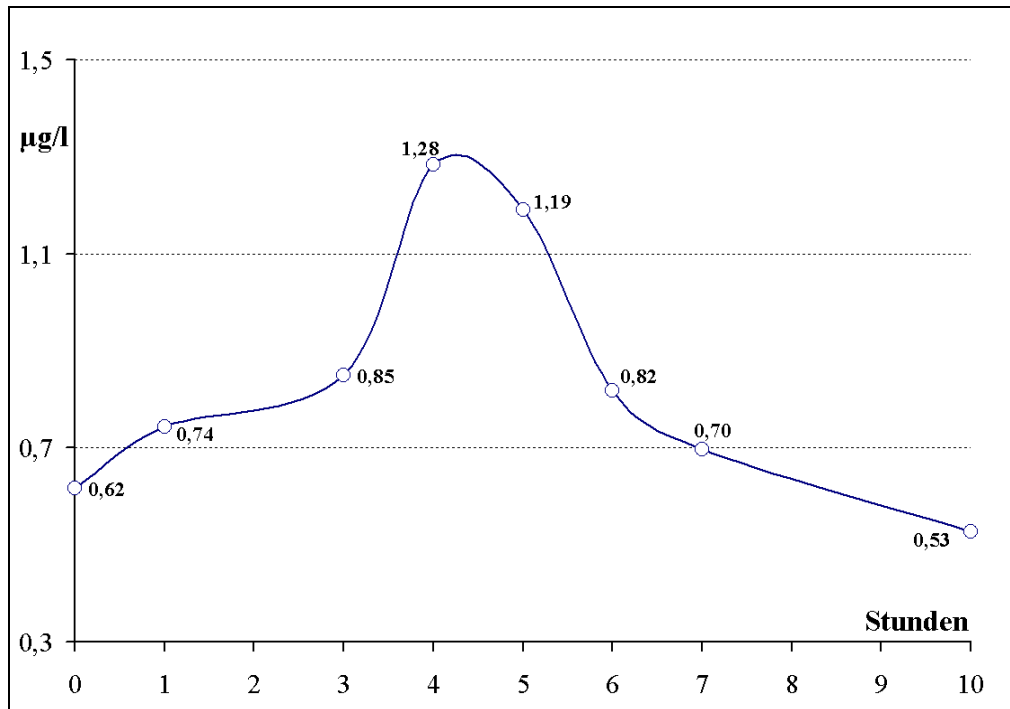


Abb. 53: Potenzieller TDN-Gehalt vom saponifizierten Beerenextrakt im synthetischen Medium durch Erwärmung auf 50°C bei pH 1,0

Bei dem Medium, das mit saponifiziertem Beerenextrakt angereichert wurde, wurde TDN gebildet. Da diesem Medium keine andere Farbstoff enthält, könnte produzierte TDN nur aus Lutein, β -Carotin, und Zeaxanthin vorkommen.

12.2.2.3 Modellversuche mit Reinsubstanzen

Zur Untersuchung von Carotinoiden als mögliche Precursor von TDN wurde die potenziellen TDN-Konzentrationen aus Reinsubstanzen von Lutein und β -Carotin in Blankwein-Medium durch Erwärmung auf 50°C bei pH 1,0 analysiert.

Der verwendete Blankwein wurde aus einem Most gewonnen, in dem der Analyse noch keine Farbstoffe mehr nachgewiesen werden konnten.

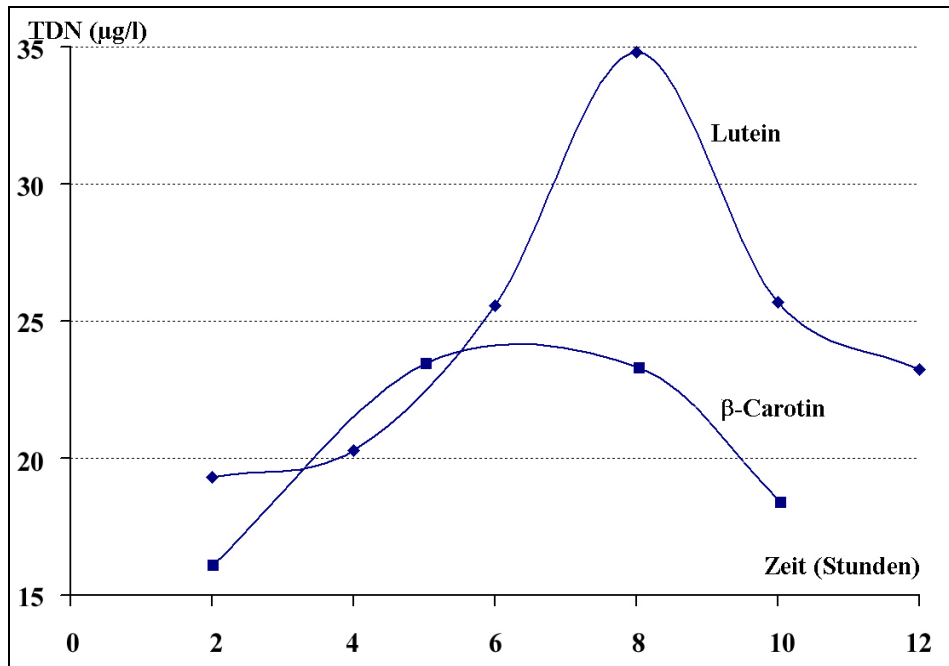


Abb. 54: Potenzieller TDN-Gehalt der Reinsubstanzen Lutein (1 mg) und β -Carotin (5 mg) im Blankwein-Medium durch Erwärmung auf 50°C bei pH 1,0

Wie die Abbildung 54 zeigt, werden durch die Hydrolyse bei pH 1 aus beiden Substanzen potenzielles TDN gebildet. Welcher nach Überschreiten eines Maximums wiedergebaut wurde. Unterschiedlich waren nur die maximalen erreichten Werten. Bei der Verwendung der Reinsubstanz Lutein konnten TDN bis 34,82 $\mu\text{g/l}$, bei β -Carotin nur im Maximumwert von 23,42 $\mu\text{g/l}$ erreicht werden.

12.2.2.4 Lagerungs-Modellversuch

Die Lagerung bei höherer Temperatur (30°C) war eine weitere alternative der forcierten künstlichen Alterung, um potenzielle TDN-Precursor und die mögliche Bildung eines Maximums der TDN-Konzentration in einem Wein zu erkennen.

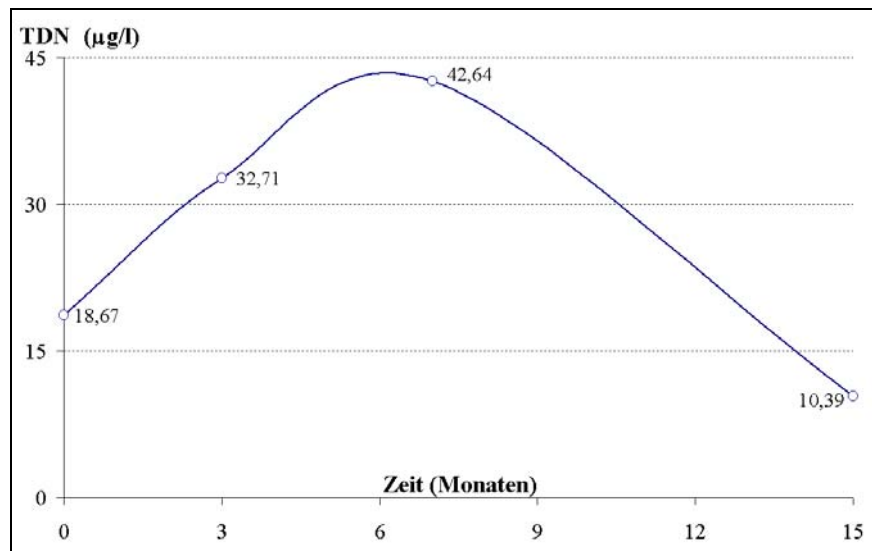


Abb. 55: Potenzieller TDN-Gehalt von Weißwein (Riesling Eltville, 1998) nach Lagerung bei 30°C

Bei dieser künstlichen Alterung zeigte der Weißwein eine TDN-Entwicklung mit einem deutlichen Maximum, wie es auch bei der forcierten Alterung aufgetreten ist. Nach 6 monatiger Lagerung erreichte der Weißwein seine maximale TDN-Konzentration von 42,6 µg/l, die danach wieder deutlich abnahm.

Die potenziellen TDN-Konzentrationen bei zeitgleichen Analysen von Rieslingweinen der Jahrgänge 1996 und 1997, die bei 30°C gelagert wurden, werden in den Abb. 56 und Abb. 57 dargestellt.

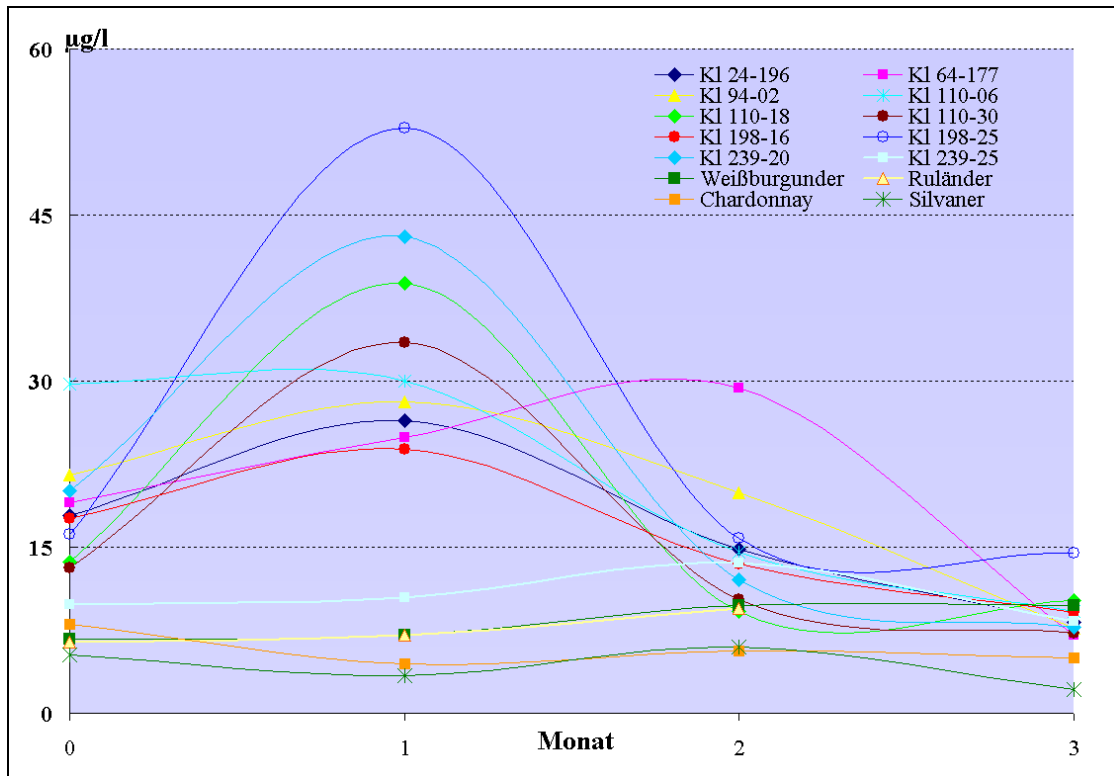


Abb. 56: Potenzieller TDN-Gehalt verschiedener Weißweine des Jahrgangs 1996 (Rebenzüchtung, Geisenheim), Lagerung bei 30°C

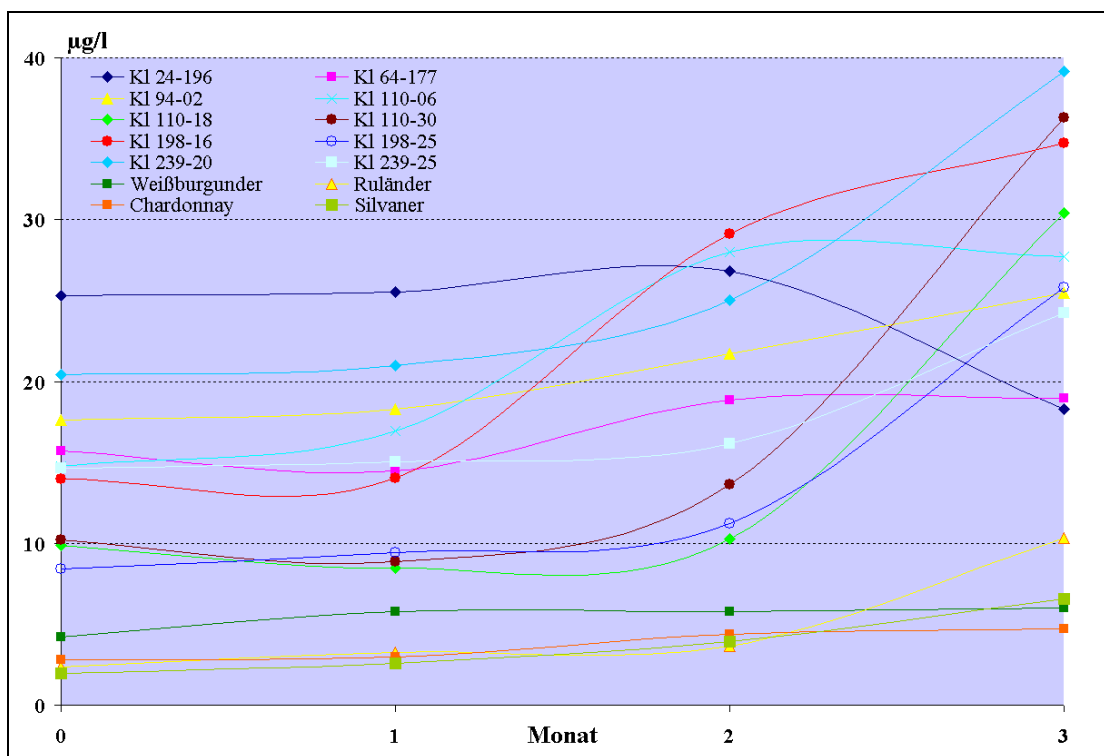


Abb. 57: Potenzieller TDN-Gehalt verschiedener Weißweine des Jahrgangs 1997 (Rebenzüchtung, Geisenheim), Lagerung bei 30°C

Bei zeitgleicher Analyse wurden die Maximum-Werte der TDN-Bildung bei Rieslingweinen des Jahrgangs 1996 nach einer einmonatigen Lagerung gefunden, während die Werte bei 1997er Weine auch nach drei monatiger Lagerung noch weiter angestiegen sind. Nach einem Monat Lagerung bei 30°C erreichten zehn Rieslingklone Jahrgang 1996 die Werte von 23,82 µg/l bis 52,88 µg/l. Die 1996er Weine zeigten alle bereits kurz nach Erreichen des Maximums eine ausgeprägte TDN Abnahme. Diese Weine haben vorher bereits eine einjährige natürliche Alterung erfunden.

Die anderen Weißweinsorten der Jahrgänge 1996, sowie 1997, zeigten interessanterweise ganz anders als die Rieslingweine, äußerst geringere TDN-Konzentration und um ganz geringe Änderungen in den potenziellen TDN-Werten.

12.2.2.5 D₂O und H₂O-Modellversuch

Zur Bestätigung der TDN-Bildung aus Precursoren, wie die Carotinoide (Lutein, β-Carotin und Zeaxanthin), wurde ein TDN-Modellversuch zur Bildung potenziellen TDN aus den Reinsubstanzen durch Säurebehandlung in D₂O (²H₂O) und H₂O als Vergleich durchgeführt.

Der Versuch wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten u.a. D₂O normaler pH-Wert (2,38) und pH 1,0 und bei zwei unterschiedlichen Hydrolysezeiten (50°C-Erwärmung) durchgeführt. Die Auswahl des Lösemittels für die Reinsubstanz ist bei diesem Versuch ebenfalls von Bedeutung. Die Reinsubstanzen wurden in Tetrahydrofuran (C₄H₈O), das die höchste Löslichkeit für die Reinsubstanzen wie Lutein und β-Carotin aufweist, gelöst. Die gleiche Prozedur wurde auch bei den anderen Farbstoffen (Chlorophyll-a, Chlorophyll-b sowie saponifiziertem Beerenextrakt) eingehalten. Die Ergebnisse der Versuche werden in den Tabellen 20 und 21 dargestellt.

Tabelle 20: Potenzielles TDN aus Carotinoiden in D₂O bei zwei verschiedenen pH-Werten nach 5stündiger Erwärmung auf 50°C (µg/l)

Nr.	Probe	TDN		TDN +4		TDN +2	
		pH 1	pH 2.38	pH 1	pH 2.38	pH 1	pH 2.38
1	Lutein 0,1 mg	1,47	1,40	1,58	1,85	0,19	n.n.
2	β-Carotin 5mg/l	0,30	0,34	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3	Zeaxanthin 0,1 mg	5,72	4,77	1,18	1,34	0,46	0,72
4	Sap. Beerenextrakt I*	0,93	0,80	n.n.	n.n.	0,14	0,12
5	Sap. Beerenextrakt II*	1,40	1,01	n.n.	n.n.	0,21	0,20

* Extrakt aus 10 g Traubenbeeren, ohne Kern; n.n.= nicht nachweisbar.

Beim Versuch mit dem Isotop des Wassers, Deuteriumoxid ($^2\text{H}_2\text{O}$), wurde die Bildung von TDN verfolgt. In D_2O wurde normales TDN, TDN+4 und TDN+2 aus Lutein gebildet. β -Carotin bildeten nur wenig TDN, weder TDN+4 noch TDN+2. wurden alle möglichen TDN-Derivate quantifiziert. In D_2O wurde aus Zeaxanthin sogar mehr TDN gebildet, als aus Lutein. Bei den saponifizierten Beerenextrakten sind TDN und TDN+2 in D_2O zu identifizieren.

Tabelle 21: Potenzielles TDN von Carotinoiden in H_2O bei zwei verschiedenen pH-Werten nach 10stündiger Erwärmung auf 50°C ($\mu\text{g/l}$)

Nr	Probe	pH	
		1,0	2,38
1	0,1 mg Lutein	21,30	5,32
2	Sap. Beerenextrakt I *	1,07	0,78
3	Sap. Beerenextrakt II *	1,40	1,10

* Extrakt aus 10 g Traubenbeeren, ohne Kern

In der Tabelle 21 wird dargestellt, dass aus $100 \mu\text{g/l}$ Reinsubstanz Lutein nach 10stündiger Hydrolyse in H_2O bei pH 1,0 bei 50°C bis $21,30 \mu\text{g}$ TDN produziert wurden. Dagegen wurde bei gleichen Kondition in D_2O bei normalem pH-Wert (pH 2,38) nur $5,32 \mu\text{g/l}$ TDN produziert. Da keine weiteren Precursoren im H_2O bzw. D_2O vorhanden waren, ist anzunehmen, dass Lutein ein Precursor von TDN ist.

12.3 Glucosidaseaktivität

Die Alterung von Rieslingweinen wird auf die TDN-Bildung aus Carotinoid-Precursoren wie β -Carotin und dem davon abgeleiteten Lutein zurückgeführt (Williams et al. 1992, Marais et al. 1991 und 1992b, Marais 1992). Diese Vorstufen werden in Mosten sowie Weinen hauptsächlich in β -Stellung, gebunden an Glucose, nachgewiesen (Sponholz und Hühn 1997). Folglich ist ein möglicher Beitrag von Hefe-Stämmen zur Bildung von TDN in Wein angenommen worden (Sponholz und Hühn 1995). Die β -glucosidischen Bindungen können durch die unterschiedlich hohen β -Glucosidaseaktivitäten verschiedener Stämme von *S. cerevisiae* hydrolysiert werden (Aryan et al. 1987, Wenzel 1989, Sponholz 1992).

Da ein Zusammenhang zwischen Hefezellzahl und Enzymaktivität durchaus möglich wäre, wurden bei den zehn untersuchten Hefen einschließlich der Spontangärung, zeitgleich mit

der Gärintensität und der β -Glucosidaseaktivität die Gesamtzellzahl und mittels Plattenguss-Verfahren die Lebendkeimzahl, bestimmt.

12.3.1 Gärintensität und gebundene β -Glucosidaseaktivität

Zur Beobachtung der Hefeaktivitäten, als Gärintensität, wurde der Gewichtverlust der gärenden Moste im Gärverlauf gemessen. Diese Intensität wurde bei verschiedene Hefedosierungen bei zwei unterschieden Gärungstemperaturen beobachtet (Abb. 58).

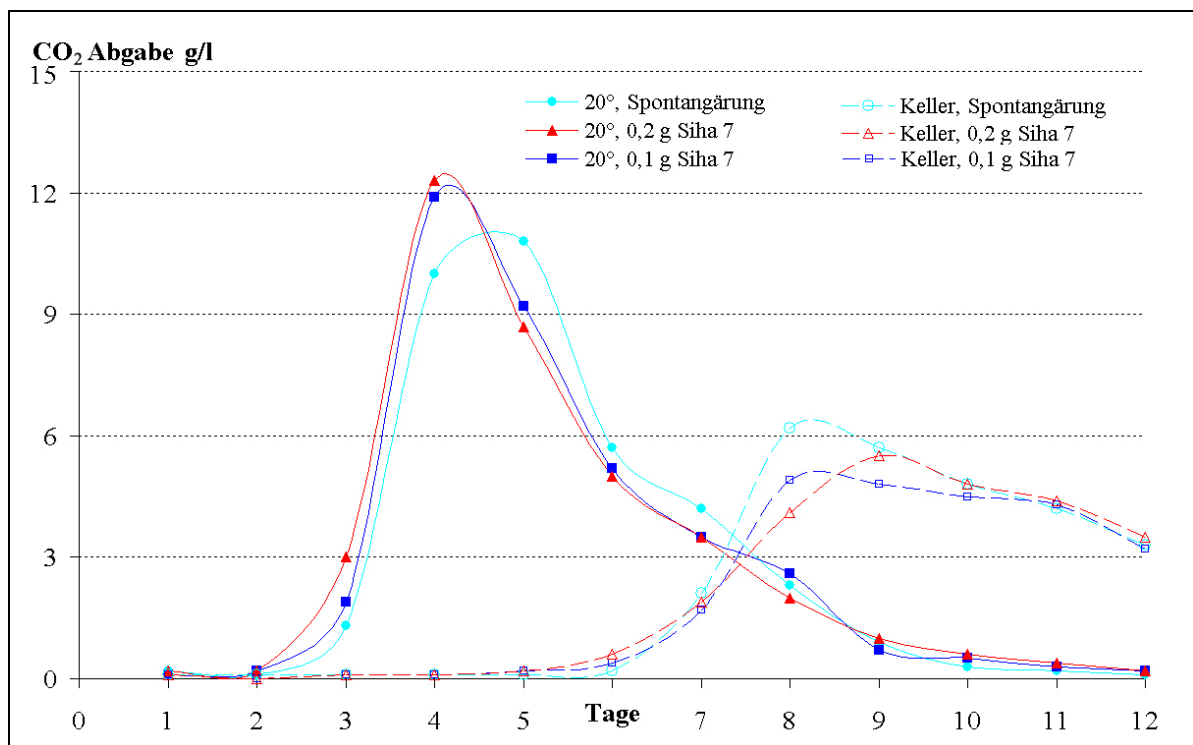


Abb. 58: Gärintensität in Rieslingmosten während der Gärung bei 20°C und bei Kellertemperatur

Nach den Gewichtsverlust-Bestimmungen in Rieslingmosten war die Gärintensität bei 20°C höher als bei Kellertemperatur. Bei der 20°C Gärung erreichten die Hefen in verschiedene Dosierungen das Maximum der Gärintensität nach 4 Tagen, während bei Kellertemperatur erst nach 8 Tagen ein geringeres Maximum erreicht wurde und die Gärung sich schleppend dahinzog. Die zugegebenen unterschiedlichen Hefekonzentrationen zeigten keinen Einfluss auf den Gärverlauf.

Zeitgleich wurde auch die gebundene β -Glucosidaseaktivität während der Gärung analysiert.

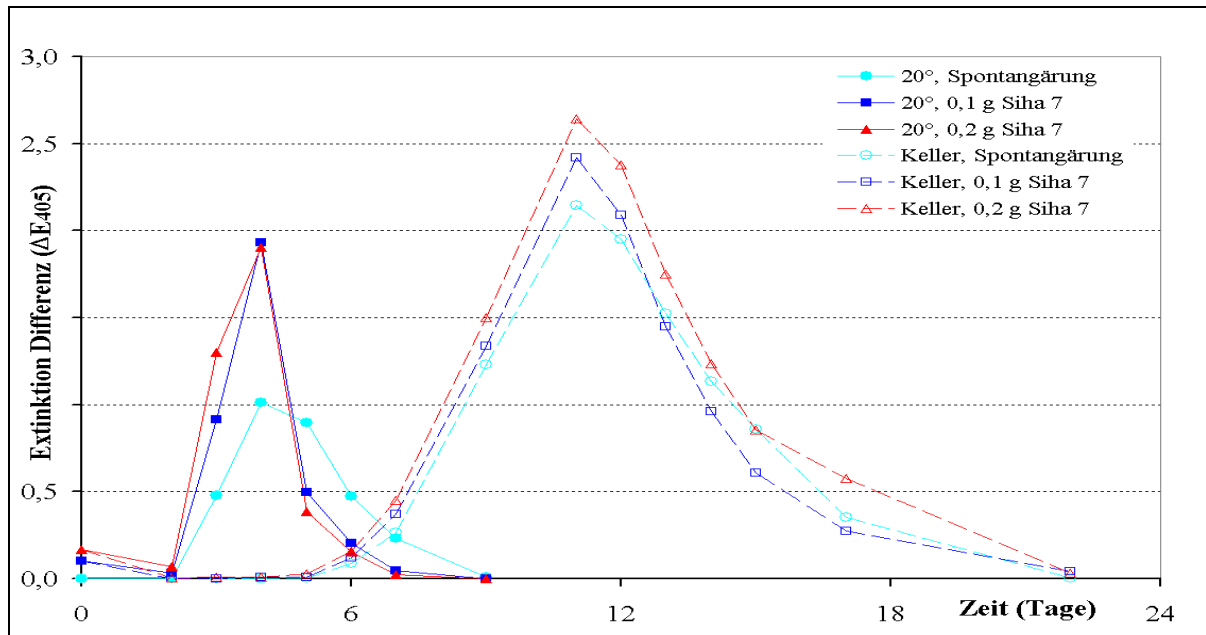


Abb. 59: Gebundene β -Glucosidaseaktivitäten von verschiedenen Hefedosierungen während der Gärung bei 20°C und Kellertemperatur

Die gebundene β -Glucosidaseaktivität hängt stark mit der Gärintensität der Hefen zusammen. Bei 20°C ist das Integral unter der Fläche wesentlich geringer als bei Kellertemperatur. Die Hefen bleiben bei Kellertemperatur wesentlich länger aktiv und damit auch ihre gebundene β -Glucosidaseaktivität. Damit ist eine längere Einwirkzeit auf β -Glucoside gegeben. Bei 20°C zeigten die Hefen das Maximum ihrer Enzymaktivität nach ca. 4tägiger Gärung, während bei Kellertemperatur das Maximum bei ca. 11 Tagen lag.

Die Gärintensität ist bei der Spontangärung bei 20°C am geringsten. Ein Einfluss der Hefekonzentration ist hier nicht feststellbar. Dieser macht sich erst bei einer Vergärung bei Kellertemperatur bemerkbar, bei der mit steigender Zellzahl auch die β -Glucosidaseaktivität zunimmt.

12.3.2 Gärintensität und gebundene β -Glucosidaseaktivität verschiedener Hefestämme

Die Veränderungen der gebundenen β -Glucosidaseaktivität während der Gärung und der Gärintensität werden in den folgenden Abbildungen dargestellt.

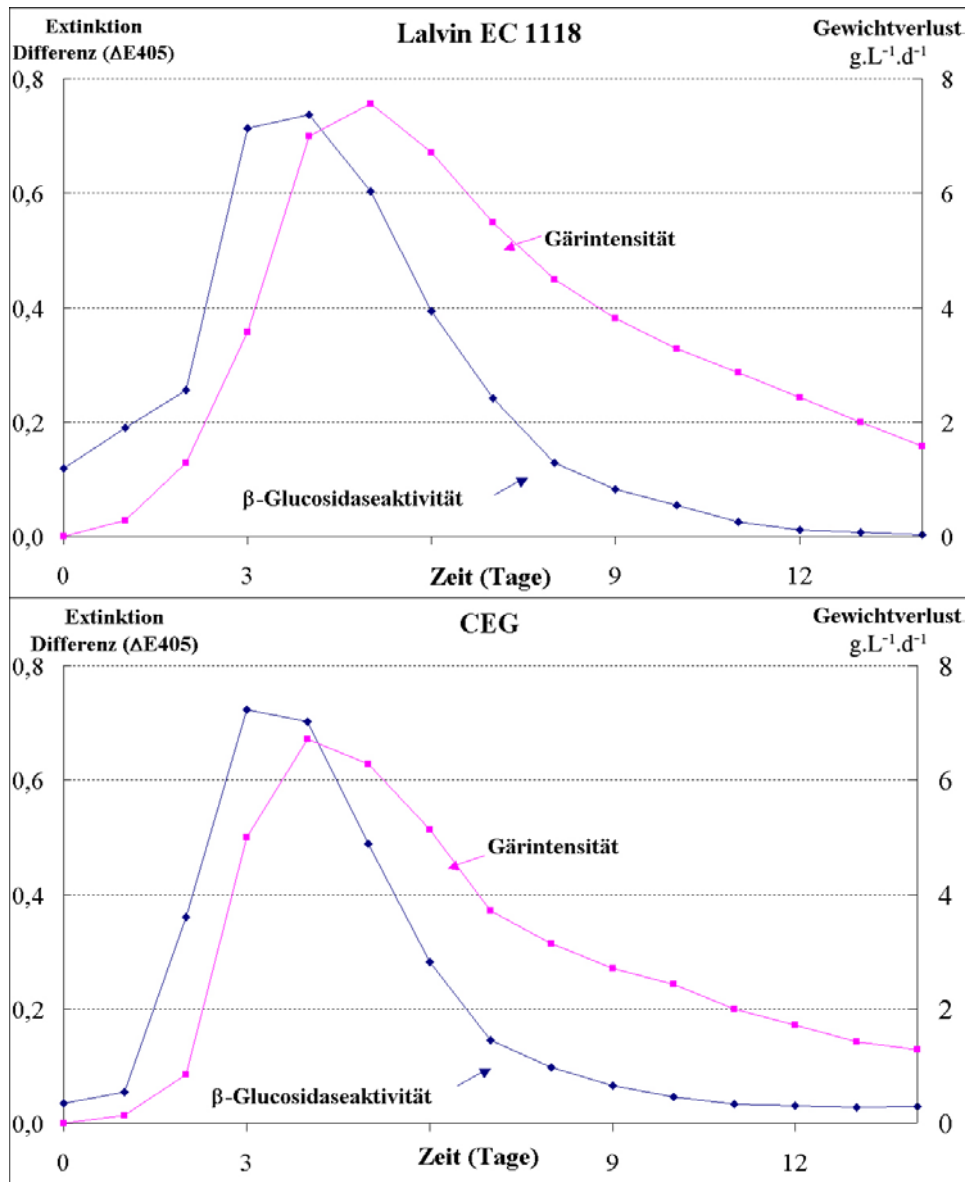


Abb. 60: β -Glucosidaseaktivität und Gärintensität von Lalvin EC 1118 und CEG bei 20°C

Im Allgemeinen zeigten die Hefen bei 20°C die höchste β -Glucosidaseaktivität am 2.–3. Tag und die höchste Gärintensität am 3.–4. Tag der Gärung. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Wenzel (1989) überein. Die maximale β -Glucosidaseaktivität liegt kurz vor oder kurz nach dem Maximum der Gärintensität. Bei den beiden untersuchten Hefen wurden ähnliche Kurvenverläufe festgestellt.

12.3.3 Gebundene β -Glucosidaseaktivität und Populationen

Es wurde versucht, das Verhältnis zwischen gebundener β -Glucosidaseaktivität und der Entwicklung der Hefepopulation während der Kellergärung deutlicher darzustellen. Die Ergebnisse werden in Abb. 61 dargestellt.

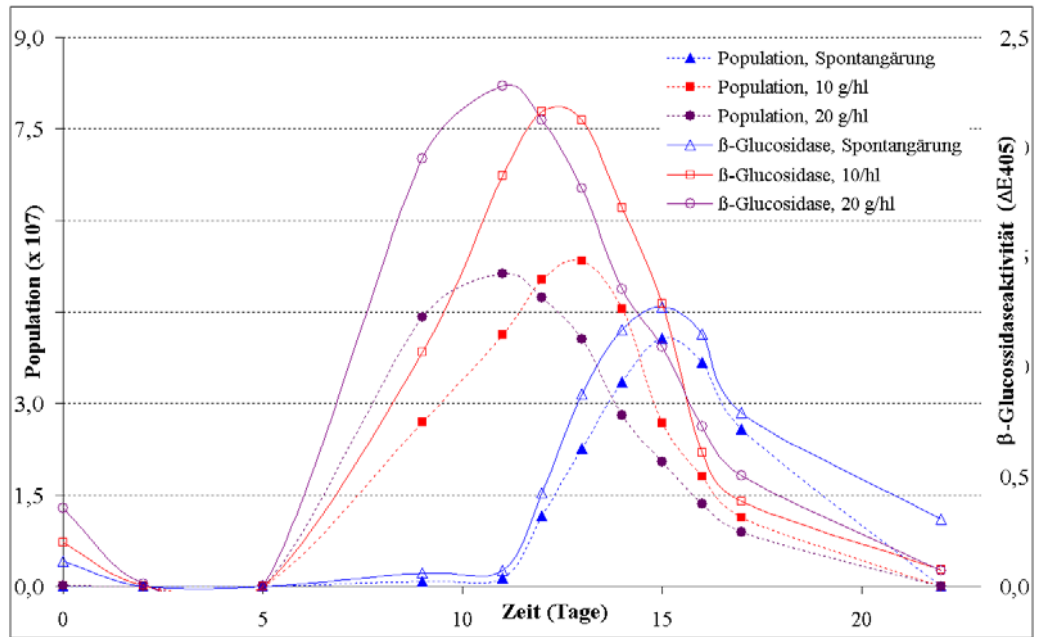


Abb. 61: Gebundene β -Glucosidaseaktivitäten und Populationsentwicklungen von Siha Aktiv-7 und einer Spontangärung in Rieslingmost des Jahrgangs 1997 (Kellertemperatur)

Die maximale β -Glucosidaseaktivität wurde ungefähr gleichzeitig mit dem Erreichen der maximalen-Population festgestellt. Dieses Verhalten wurde auch stets in weiteren Untersuchungen festgestellt. Durch die höhere Anfangskonzentration bei Zugabe der doppelten Hefemenge, wird die maximale Population einen Tag früher erreicht als bei einfacher Hefedosage. Die Anzahl der lebenden Zellen bei beiden Fermentationen unterscheidet sich jedoch nur geringfügig. Bei der Spontangärung entwickeln sich die Hefen nur langsam und erreichen die Zellzahlen der beimpften Kulturen nie. Die β -Glucosidaseaktivität der Hefen hängt scheinbar wesentlich von der Zahl der Zellen im Medium abzuhängen.

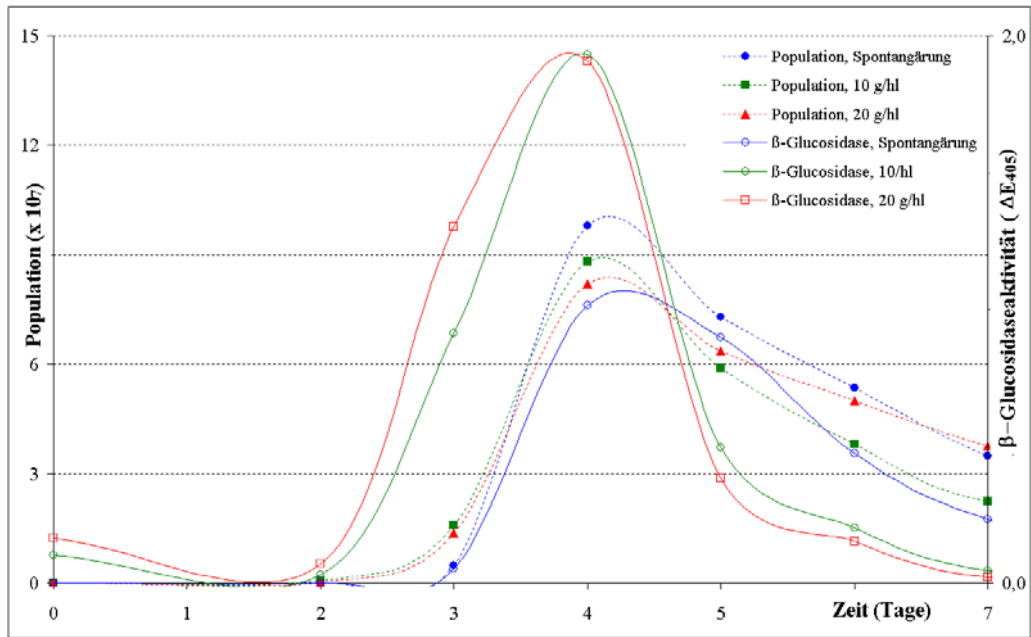


Abb. 62: Gebundene β -Glucosidaseaktivitäten und Populationentwicklungen von Siha Aktiv-7 und einer Spontangärung in Rieslingmost des Jahrgangs 1997 (Gärtemperatur, 20°C)

Bei 20°C wird das Maximum der Population und das der β -Glucosidaseaktivität früher und zu gleicher Zeit erreicht, unabhängig von der Animpfmenge der Reinhefekultur. Die maximalen Zellkonzentrationen sind gleich, wie auch die erreichte β -Glucosidaseaktivität. Bei der Spontangärung wird die maximale Zellzahl zu ungefähr gleicher Zeit auf einem niedrigerem Niveau erreicht. Die β -Glucosidaseaktivität in allen Proben bleibt hingegen gleich.

12.3.4 Gärintensität von verschiedene Rieslingklonen- und anderen „Weißen Sorten“-Mosten

Die Gärintensität von *S. cerevisiae* (20 g/hl Siha Aktiv-7) in 10 verschiedenen Rieslingmosten, sowie anderen weißen Sorten (Weißburgunder, Chardonnay, Silvaner und Ruländer), wird in Abb. 63 und 64 dargestellt.

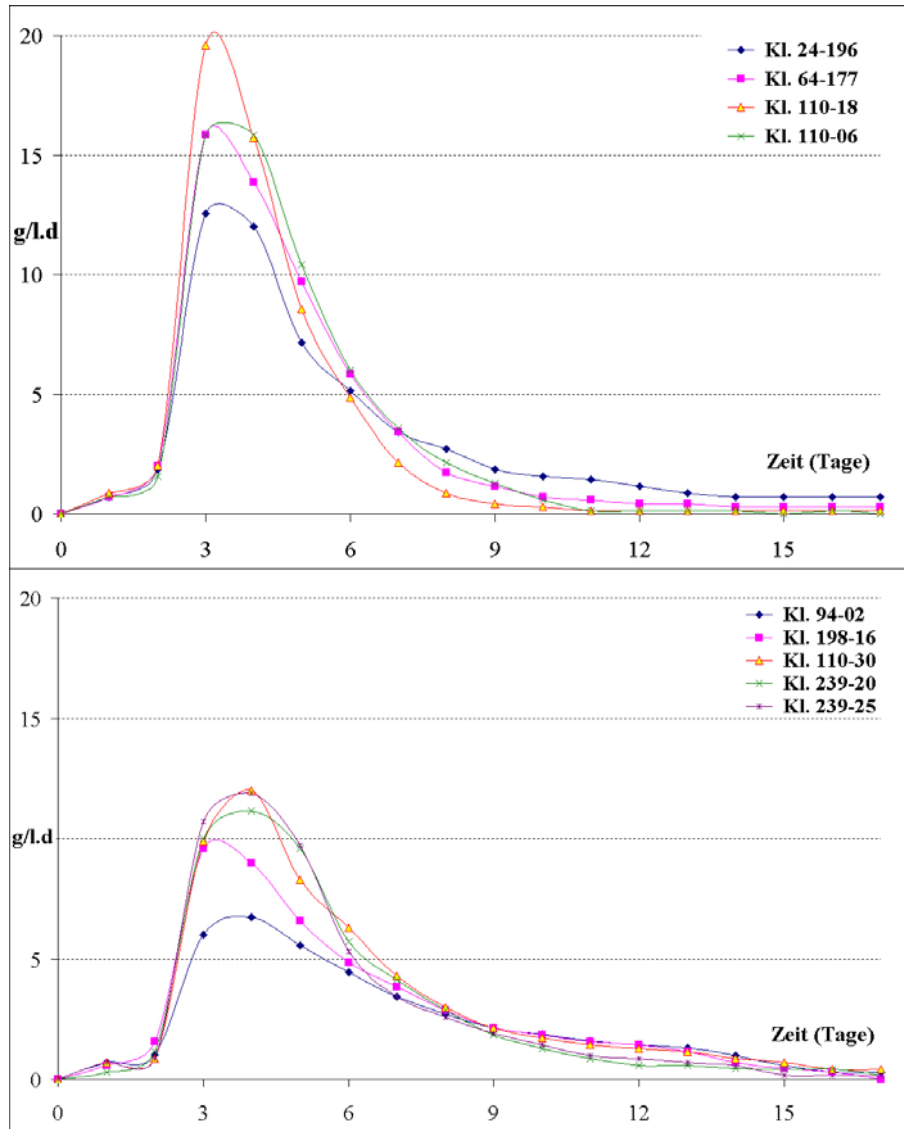


Abb. 63: Gärintensität in verschiedenen Rieslingklonen-Mosten 1998 bei 20°C

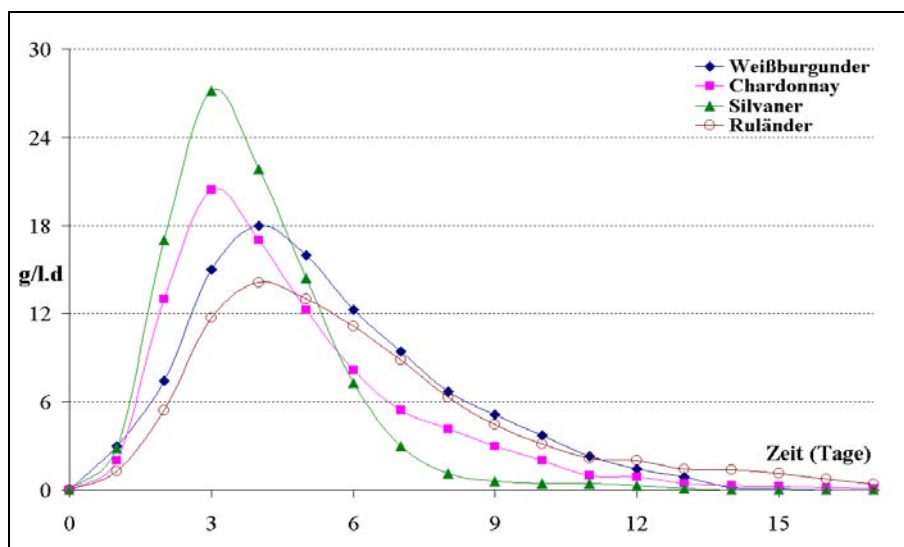


Abb. 64: Gärintensität in Mosten weißer Sorten 1998 bei 20°C

Die Gärintensität bei alle Klonen des Riesling sowie bei den anderen weißen Sorten sind sehr unterschiedlich. Die maximale Intensität variierten zwischen 6,71–19,57 g CO₂ g/l.d bei den Riesling und zwischen 14,14–27,14 g/l.d bei anderen weißen Sorten.

Die größte Gärintensität von Siha Aktiv-7 wurde in Riesling Kl. 110-18 mit 19,57 g/l.d Gewichtverlust erreicht, und die geringste in Riesling Kl. 94-02 mit 6,71 g/l.d. Bei den anderen Sorten war die Gärintensität von Siha Aktiv-7 in Silvaner mit 27,14 g/l.d am Größten und in Ruländer mit 14,14 g/l.d am Geringsten.

Im allgemeinen zeigten die anderen weißen Sorten höhere Gärintensitäten als die Rieslingklonen. Es könnte von inneren Faktoren der Moste wie pH-Wert und Nährstoffgehalt beeinflusst sein. Rieslingklone besitzen niedrigere pH-Werte sowie eine höhere Gesamtsäure als andere die weißen Sorten (*siehe Tabelle 12 und 13 am Anhang*).

12.4 Die Farbstoffveränderungen und die Glucosidaseaktivität

Bei den Messungen zur Veränderungen von Farbstoffen (Carotinoide und Chlorophylle) wurde zwei verschiedene Arten der Probeentnahme durchgeführt. Um der Zustand der Farbstoffen im Most mit dem eines normalen Weines während der Gärung zu beobachten, wurde die Probe von der klaren Oberfläche unter den gleichen Bedingungen entnommen. Für die Veränderungen der Farbstoffe im gärenden Most wurde die ganze Probe entnommen. Für diesen Zweck wurden so viele Proben vorbereitet dass für jede Probeentnahme eine ganze Probe bereit stand.

Für Gäransätze, die im Laufe der Gärung von Most zu Wein wurden, gleichzeitig zwei Serien flüssig Extraktion mit 50% und 70% THF in Wasser durchgeführt. Diese Extraktionsmethoden konnten im Allgemeinen für die Probleme bei der Extraktion flüssiger Proben verschiedener Dichte, wie gärende Moste, eingesetzt werden.

12.4.1 Moste

Durch mehrere Versuche mittels dieser Extraktionen konnten genaue Farbstoffveränderungen vom normalen Most zum fertigen Wein während der Gärung beobachtet werden. Die Veränderungen der Farbstoffen vom Most zum normalen Wein während der Gärung sind in der Abb. 65 dargestellt.

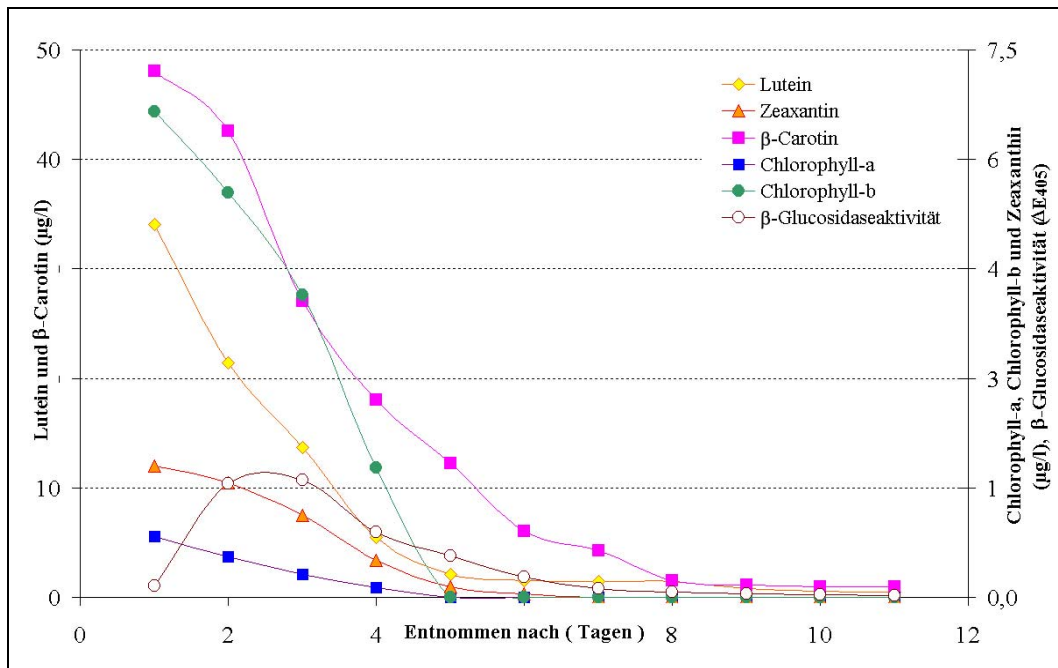


Abb. 65: Farbstoffzustand und β -Glucosidaseaktivität der Rieslingmoste während der Gärung bei 20°C

Alle sich im Most befindenden Carotinoide nehmen während der Gärung ab. Die Farbstoffe, die noch im klaren Weinen gefunden werden, sind nur als gelöste Carotinoid-Farbstoff zu finden. Beim Vergleich des Kontrollmosts mit dem klaren Jungwein nach der Gärung wurden fast gleich große Verluste (bis 98,5%) bei allen drei Carotinoiden gefunden.

Viele Faktoren können diesen Zustand beeinflussen. Gravitation könnte die Trübpartikel, die im Most noch Carotinoide enthalten können, sedimentieren. Mit steigende Fluidität während der Gärung könnten diese Prozesse beschleunigt werden.

Zur Beobachtung der deutlicheren Veränderungen des Farbstoffgehaltes und der gebundenen β -Glucosidaseaktivität während der Gärung wurde der Versuch durch Verwendung von ganzen Trübmosten bei zwei verschiedenen Gärungstemperaturen durchgeführt. Diese Veränderungen werden in den folgenden Abbildungen dargestellt.

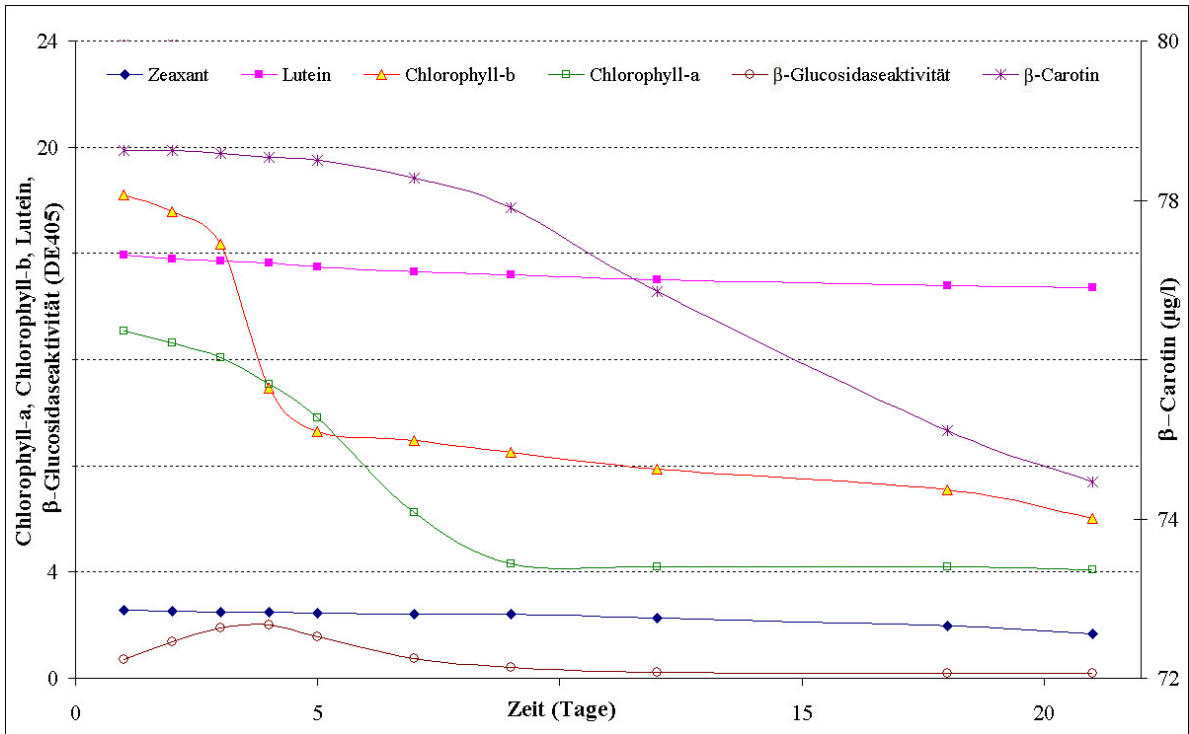


Abb. 66: Farbstoffveränderungen und β-Glucosidaseaktivität während der Gärung bei 20°C

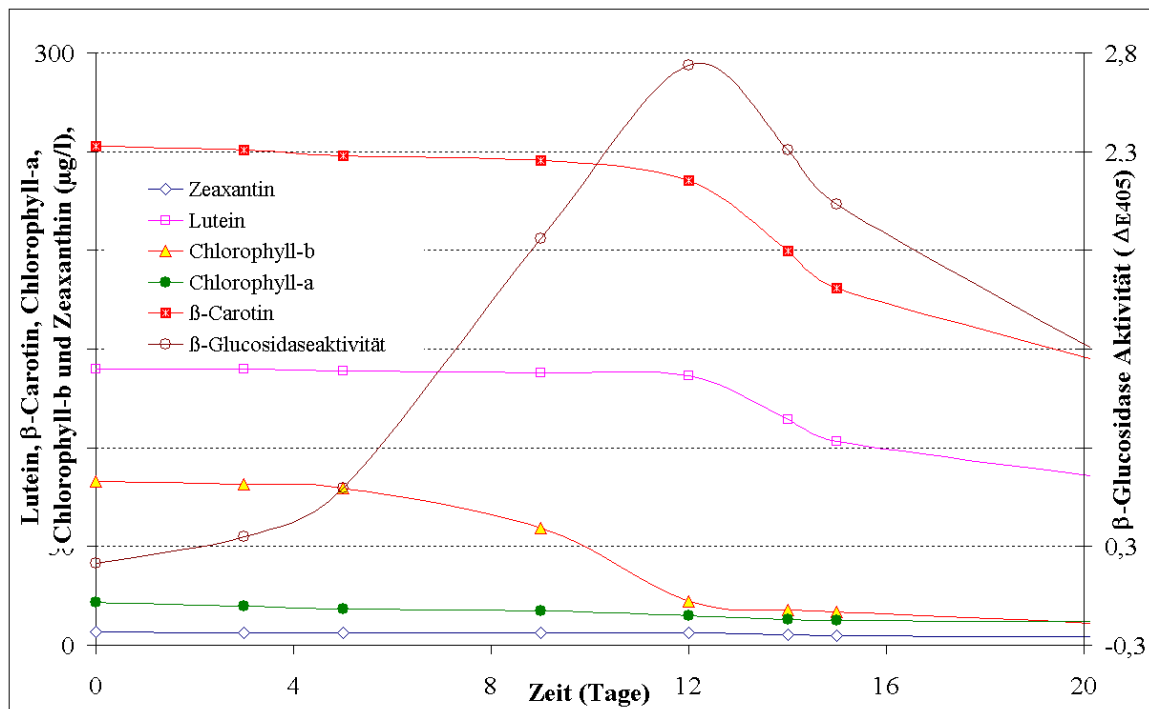


Abb. 67: Farbstoffveränderungen und β-Glucosidaseaktivität bei der Vergärung bei Kellertemperatur

In den trüben Jungweinen ist bei beiden Versuchen festzustellen, dass die Mengen aller Carotinoide und Chlorophylle sich während der Gärung vermindern. Im Allgemeinen waren die Veränderungen bei den Carotinoiden langsamer als bei den Chlorophyllen.

Die Menge an Chlorophyll-b verändert sich bei der Gärung bei 20°C drastisch seit Anfang der Gärung bis zum 7. Tag. Bei Chlorophyll-a fand die Abnahme bis zum 12. Tag der Gärung statt. Bei der Kellergärung nahm die Konzentration bei Chlorophyll-b erst ab dem 5. Tag drastisch bis zum 12. Tag der Gärung ab, während bei Chlorophyll-a die Abnahme regelmäßig bis am Ende der Gärung verlief.

Im Allgemein verändert sich die Konzentration der Carotinoide besonders bei Lutein und β -Carotin während der Gärung bei 20°C nur gering und die Veränderungen werden erst bemerkbar nachdem die maximale β -Glucosidaseaktivität erreicht wurde. Die Veränderungen fanden regelmäßig seit Anfang der Gärung statt. Bei β -Carotin nahm die Konzentration erst ab dem 9. Tag der Gärung ab. Am Ende der Gärung hat β -Carotin um 4,17 $\mu\text{g/l}$ (5,3%) der Anfangskonzentration abgenommen. Lutein verlor 1,22 $\mu\text{g/l}$ (7,6%) der Konzentration, dagegen verlor Zeaxanthin bis zu 0,89 $\mu\text{g/l}$ (35%) der Konzentration bis zum Ende der Gärung. Andererseits verändert sich die Menge der Chlorophylle während der 20°C Gärung stark. Die Konzentrationen der Chlorophylle nahm bis Ende der Gärung um 67–69% ab.

Bei Kellertemperatur waren die Veränderungen der Carotinoidmengen erst nach dem 13. Tag der Gärung deutlich zu bemerken, gleichzeitig mit dem Erreichen der maximalen β -Glucosidaseaktivität der Hefen. Insgesamt nahmen die Konzentrationen der Carotinoide und Chlorophylle während der Gärung bei Kellertemperatur um 40–45% ab, insb. bei Chlorophyll-b sank die Konzentration bis zu 89%.

Bei den beiden unterschiedlichen Gärungskonditionen konnte festgestellt werden, dass die bedeutenden Veränderungen der Carotinoid-Inhaltstoffe nach dem Erreichen der Maximum-Werte gebundener β -Glucosidaseaktivität der Hefen stattfanden. Die Konzentrationen von Carotinoiden sanken weiter bis zum Ende der Gärung gleichmäßig. Die Abnahme der Konzentration der Carotinoide könnte mit der β -Glucosidaseaktivität zusammenhängen. Anders war es bei den anderen Farbstoffen (Chlorophylle). Die Konzentration ist seit Anfang der Gärung gesunken, so dass es kein Verhältnis zwischen β -Glucosidaseaktivität und Chlorophyll-Abbau während der Gärung gab.

Beim Vergleich der β -Glucosidaseaktivitäten bei zwei Gärungstemperaturen, die mit der Wachstumskurve im Zusammenhang stehen (*siehe Absch. 12.3.3*), war festzustellen, dass die Hefen bei Kellergärung eine höhere β -Glucosidaseaktivität als bei 20°C aufwiesen.

Die Aktivität der Hefen war bei 20°C intensiver als bei 15°C. Wobei die Spontangärung bei 20°C im Vergleich zu den Gärungen mit Reinzuchtheferzusatz verzögert war. Bei 15°C war die Spontangärung vorausseilend, was möglicherweise auf den Einfluss von *Kloeckera apiculata* zurückzuführen sein könnte. Im Gegensatz zu den Zuckervergärung, die bei 20°C intensiver sind als bei Kellertemperatur, sind die β -Glucosidaseaktivitäten bei Kellertemperatur im Maximum höher und länger anhaltend. Durch die dadurch bewirkte längere Einwirkzeit der β -Glucosidase können die Precursor verstärkt abgebaut werden.

Die große gebundene von der Populationzahl abhängige Enzymaktivität bedingte somit stärkere Verminderung des Carotinoidgehaltes bei Kellertemperatur

12.4.2 Medien mit Beerenextrakt

Zur Vertiefung der Kenntnisse über die mengenmäßigen Carotinoid-Veränderungen wurde außer mit normalem Most auch mit Beerenextrakten, die aus nicht saponifizierten und saponifizierten Farbstoffen gewonnen wurden, durchgeführt. Der verwendete saponifizierte Beerenextrakt enthielt nur die Carotinoidkomponenten (Lutein, β -Carotin und Zeaxanthin). Die Chlorophylle waren nicht mehr vorhanden.

Bei dem Blankmost-Medium, das keine Farbstoffe mehr enthielt, wurde mit bestimmte Mengen Beerenextrakt zugesetzt, mit Hefen vergoren und jede Probe nach bestimmter Zeit entnommen. Die Entnahme-Prozedur wurde bei den trüben Jungweinen während der Gärung und bei den klaren Versuchsjungweinen nach der Gärung durchgeführt.

Die verschiedenen Farbstoffabnahmen können bei einigen trüben Jungweinen während der Gärung als Beispiele in den folgenden Abbildungen dargestellt werden.

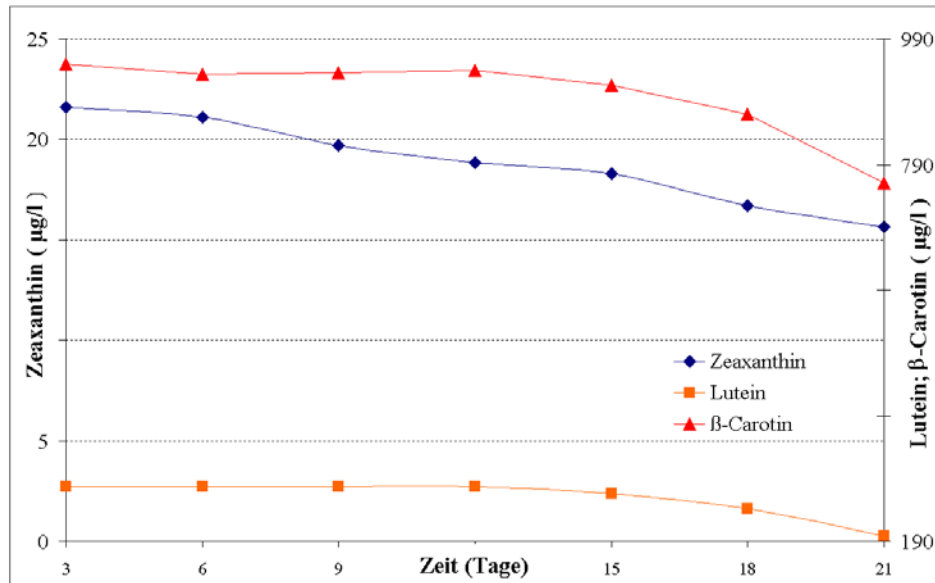


Abb. 68: Carotinoidveränderungen von saponifiziertem Beerenextrakt-Medium während der Gärung bei 20°C mit Siha Aktiv-7 (*S. cerevisiae*)

Der Versuch mit *S. cerevisiae* Siha Aktiv-7 zeigte deutlich den Anfang des Carotinoidabbaus. Die bedeutende Veränderungen fanden erst in der Mitte der Gärung statt. Nach 21 Tagen Gärung hat Lutein 28,4% (78,82 µg/l) der ursprünglichen Konzentration verloren, gefolgt von Zeaxanthin mit 27,5% (5,94 µg/l) und β-Carotin mit 19,9% (188,83 µg/l).

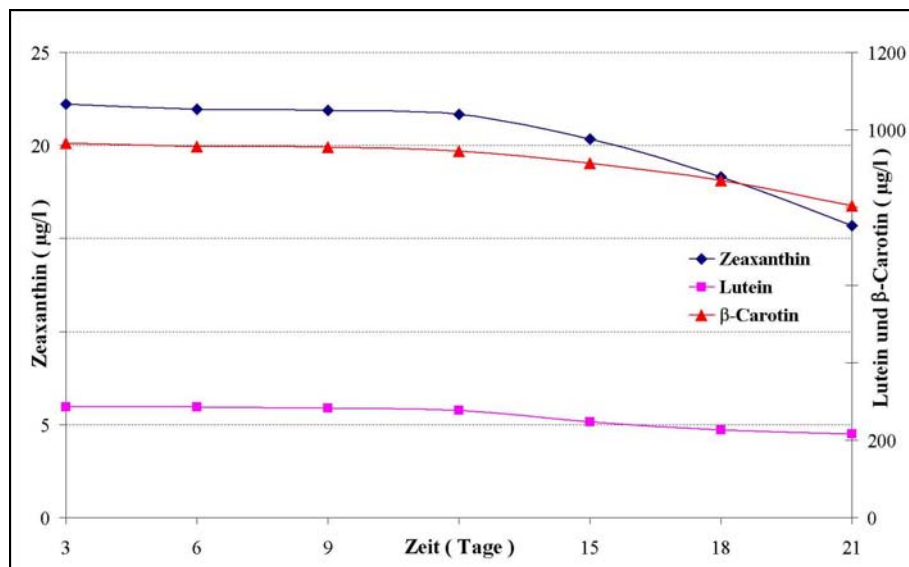


Abb. 69: Carotinoidveränderungen von saponifiziertem Beerenextrakt-Medium während der Gärung bei 20°C mit Lalvin EC 1118 (*S. bayanus*)

Ähnlich wie bei Siha Aktiv 7 fand die bedeutenden Veränderungen bei dem Versuch mit *S. bayanus* Lalvin EC 1118 auch nach 12 Tagen der Gärung statt. Zeaxanthin verlor 6,54 µg/l

bzw. 29,4% der ursprünglichen Konzentration, gefolgt von Lutein 24,5% (70,03 µg/l) und β -Carotin mit 160,54 µg/l bzw. 16,7% nach 21 Tagen der Gärung.

Bei den Abbauprozessen konnte auch die Verhältnisse zwischen im Most vorhandenen Precursoren (Carotinoide) und ihres Abbauproduktes TDN, sowie der Einfluss von Hefen und ihrer gebundenen β -Glucosidaseaktivität beobachtet werden (*Abschnitt 12.5* und *Abschnitt 12.6.4*).

12.5 Die Farbstoffveränderungen und die TDN-Bildung

12.5.1 Nach der Gärung

Um die Farbstoffveränderungen und die TDN-Entwicklung gleichzeitig zu beobachten, wurde weißer Traubenmost, der keine Farbstoffe mehr enthielt, als Medium eingesetzt. Vor der Gärung bei 20°C wurden die Moste dann mit Farbstoffen aus Beerenextrakt (Extrakt von 100 g Beeren ohne Kern pro Liter Medium) zugesetzt. Die klaren Proben wurden 40 Tage nach der Gärung entnommen.

Der klare Jungwein, der aus dem oberen klaren Teil des Gärgewinns entnommen wurde, wurde dann bei 20°C gelagert und 100 Tage beobachtet. Die Veränderungen der Farbstoffe im Wein sowie die TDN-Bildung nach der Ende Gärung (Lagerung) wurden beobachtet. Die Farbstoffveränderungen und die TDN-Entwicklung werden in Abb. 70 dargestellt.

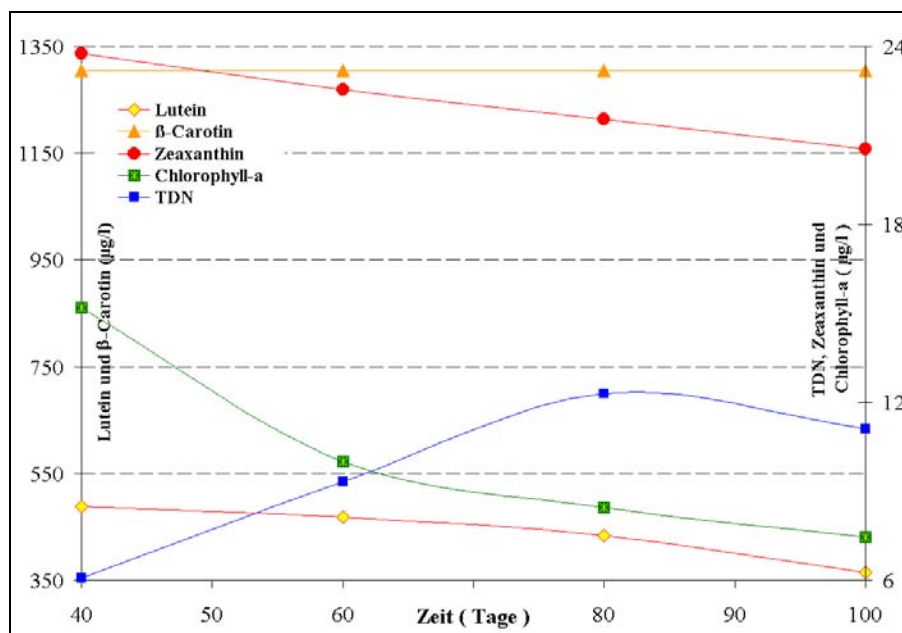


Abb. 70: Farbstoffveränderungen und TDN-Bildung in klarem Beerenextrakt-Jungwein 40–100 Tage nach der Gärungsende bei 20°C

In 60tägiger Lagerung nach 40tägiger Gärung wurden die Carotinoide weiterhin abgenommen. Die grössten prozentualen Verluste wurden bei Lutein mit 25,3% der anfänglichen Lagerungswerte (123,29 µg/l) gefunden, gefolgt Zeaxanthin mit 13,5% (3,20 µg/l) und der niedrigste bei β-Carotin 0,01% (0,18 µg/l). Chlorophyll-a verlor immerhin 50,9% (7,73 µg/l) der anfänglichen Werte. Der Abbau der Farbstoffe der Carotinoide verlief zusammen mit der TDN-Bildung.

Die Carotinoidveränderungen und die TDN-Bildung und der Einfluss der Hefedosierung werden in Abb. 71 dargestellt.

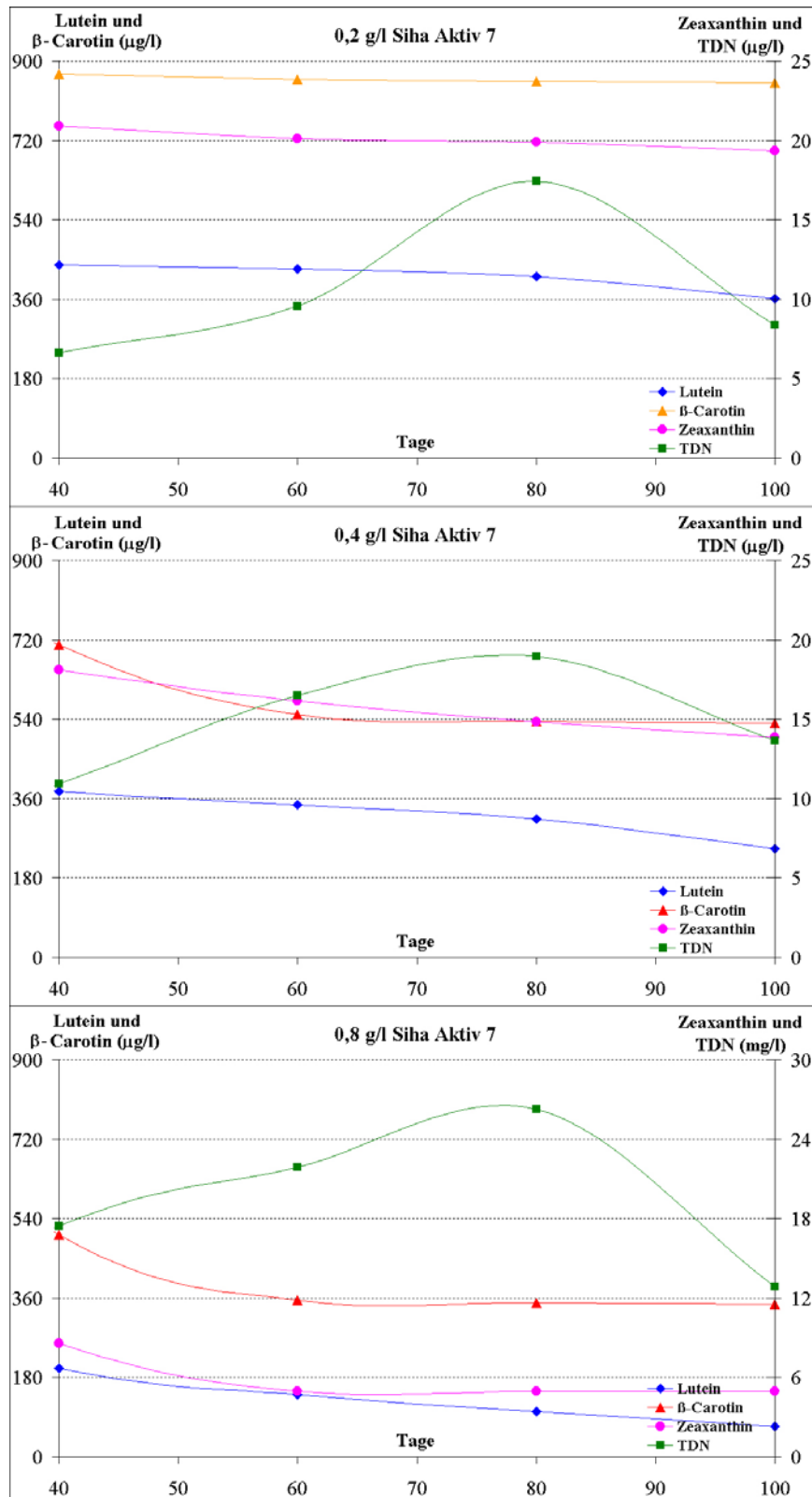


Abb. 71: Der Einfluss der Hefedosierungen auf die Farbstoffveränderungen in saponifizierten Beerenextrakt–Jungweinen und den TDN-Gehalt nach der Gärung 20°C bis zu 100 Tagen

Die unterschiedlichen Hefedosierungen zeigten, dass die angeimpfte Hefemenge einen deutlichen Einfluss auf den Farbstoffabbau und die TDN-Bildung hat. Höhere Dosierungen zeigten einen größeren Einfluss als normale Dosierung (0,2 g/l).

So wie beim Versuch mit normalem Beerenextrakt zeigten saponifizierte Beerenextrakt-Jungweine, die nur noch Carotinoide enthalten, die gleichen Tendenzen beim Carotinoidabbau. Bei den drei verschiedenen Hefedosierungen konnten eine mit der zugegebenen Hefemenge steigende Tendenz der totalen TDN-Entwicklung beobachtet werden. Je höher die Hefedosierungen waren, desto mehr TDN wurde gebildet.

12.5.1.1 Carotinoid-Abbau

Zur besseren Beobachtung des Verhaltens einzelner Carotinoide bei den Abbauprozessen während der Gärung bei 20°C wurden Beerenextraktmedien verschiedene Hefedosierungen zugegeben. Die Einflüsse der Hefedosierungen auf den Abbau einzelner Carotinoide werden in den Abb. 72, 73 und 74 dargestellt.

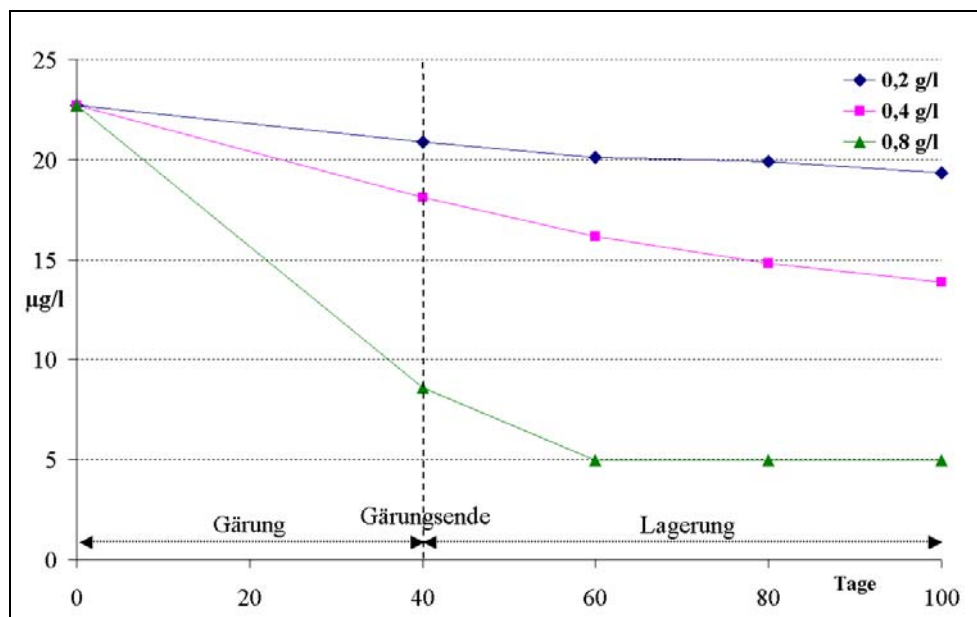


Abb. 72: Zeaxanthingehalte von Jungweinen bei drei verschiedenen Hefedosierungen während und nach der Gärung bei 20°C

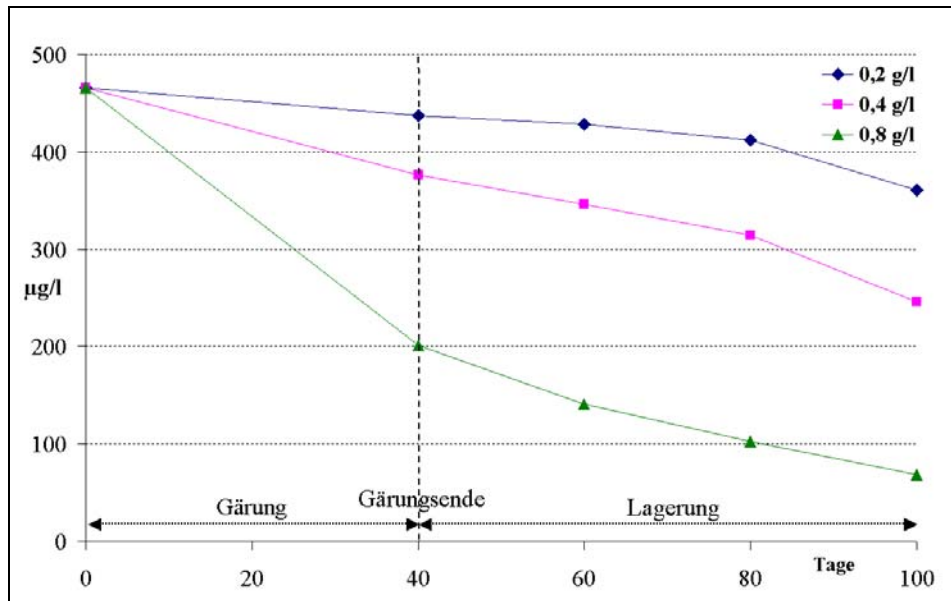


Abb. 73: Luteingehalte von Jungweinen bei drei verschiedenen Hefedosierungen während und nach der Gärung bei 20°C

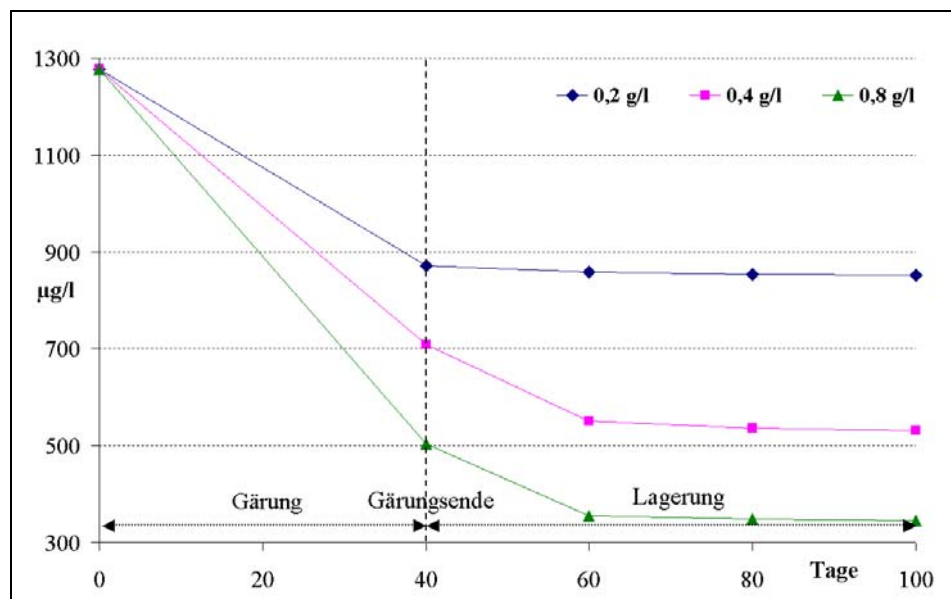


Abb. 74: β -Carotingehalte von Jungweinen bei drei verschiedenen Hefedosierungen während und nach der Gärung bei 20°C

Der grösste Verlust von Carotinoiden fand bei allen Hefedosierungen bis zum Ende der 40tägigen Gärung statt. Der Abbau von Carotinoiden läuft nach 40tägigen Gärung weiter. Nach der Gärung veränderte sich der Carotinoide-Gehalt nur noch langsam. Die Konzentration der Carotinoide nach 40tägigen Gärversuch war die Menge gelösten Carotinoide in den Weinen. Die totalen Farbstoffverluste bei drei unterschiedlichen Hefedosierungen wurden in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Prozentualer- bzw. Gesamtverlust der Carotinoide nach der Gärung bei drei unterschiedlichen Hefedosierungen während der 60 tägigen Lagerung

Nr.	Carotinoide	Hefedosierung (g/l)	Verlust ($\mu\text{g/l}$)	Prozent
1	Zeaxanthin	0,2	1,56	7,5
		0,4	4,27	23,5
		0,8	3,63	42,3
2	Lutein	0,2	76,60	17,5
		0,4	130,65	34,5
		0,8	132,9	66,1
3	β -Carotin	0,2	20,11	2,3
		0,4	177,51	25,1
		0,8	156,74	31,2

Die grössten prozentualen Verluste nach 60tägiger Lagerung (20°C) nach 40tägiger Gärung wurde bei allen Hefedosierungen wurde bei Lutein gefunden, gefolgt von Zeaxanthin. Der niedrigste fand bei β -Carotin statt.

Die Verluste von Lutein waren größer als die der anderen Carotinoide, dies könnte durch die Struktur des Luteins ermöglicht werden, sodass Lutein leichter als andere Carotinoide abgebaut wurde und es dadurch zur TDN-Bildung kam. Der Zusammenhang von Carotinoidabbau und TDN-Entwicklung wird in *Absch. 12.5.2* beschrieben.

12.5.1.2 TDN Entwicklung

Die Carotinoid-Veränderungen oder der Carotinoidabbau wurde zeitgleich mit der TDN-Bildung und der TDN-Entwicklung bei zwei verschiedenen Hefen mit drei verschiedenen Dosierungen beobachtet. Die Einflüsse der verschiedenen Hefedosierungen auf die TDN-Konzentration wird in *Abb. 75* dargestellt.

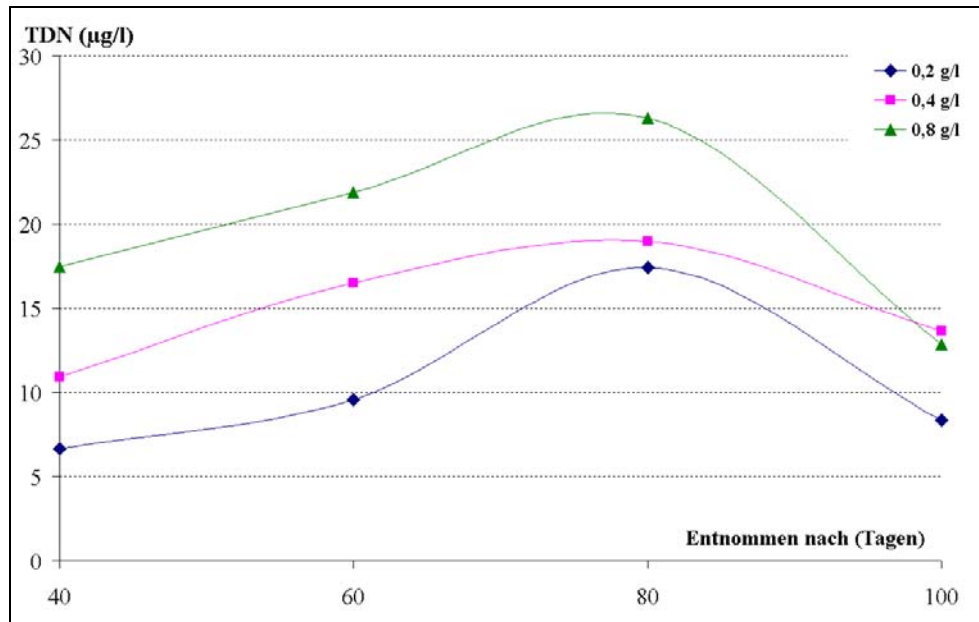


Abb. 75: TDN-Gehalte in Weinen bei drei verschiedenen Hefedosierungen nach der Gärung bei 20°C

Bei diesem Versuch zeigten die Hefen bei verschiedenen Dosierungen unterschiedliche Einflüsse auf die TDN-Entwicklung. Je größer die Hefedosierung war, desto höher war der Gehalt von TDN. Diese Entwicklung ist allerdings auch im Wein gelösten Precursorgehalt abhängig. Die höchste Konzentration von TDN nach der Gärung in einem saponifizierten Beerenextrakt-Medium wurde mit 26,3 µg/l erreicht. Eine lange Behandlung unter 20°C führte zu einem starken Rückgang der TDN-Gehalte, TDN wurde wieder abgebaut.

Um den Unterschied der Hefe-Aktivität bei der TDN-Entwicklung nach 40 Tagen Gärdauer zu beobachten, wurde zwei unterschiedliche Hefen, *S. cerevisiae* Siha Aktiv-7 und *S. bayanus* Lalvin EC 1118 0,2 g/l, verwendet.

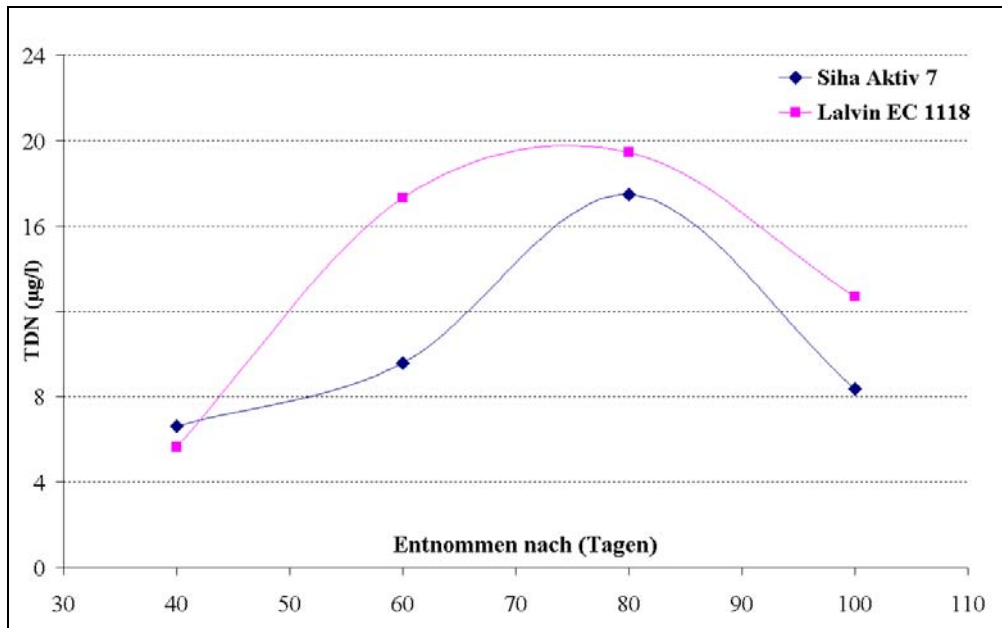


Abb. 76: TDN-Gehalte in Weinen bei zwei unterschiedlichen Hefen nach der Gärung 20°C

Beide Hefen zeigten einen unterschiedlichen Verlauf der TDN-Entwicklung. Nach 80tägiger Lagerung bei 20°C zeigten beide Versuche eine Abnahme der TDN-Konzentration.

12.5.2 Lagerungsversuch bei 30°C

12.5.2.1 Beerenextrakt

Bei diesem Versuch wurde Blankwein, der keine Farbstoffe und TDN enthielt, als Medium verwendet und dem Medium nach der Gärung der Extrakt von 10 g Beeren pro Liter zugesetzt. Die Weine wurden dann bei 30°C gelagert.

Der Carotinoidabbau und die zeitgleiche TDN-Entwicklung während der Lagerung bei 30°C wird in den Abbildungen 77 und 78 dargestellt.

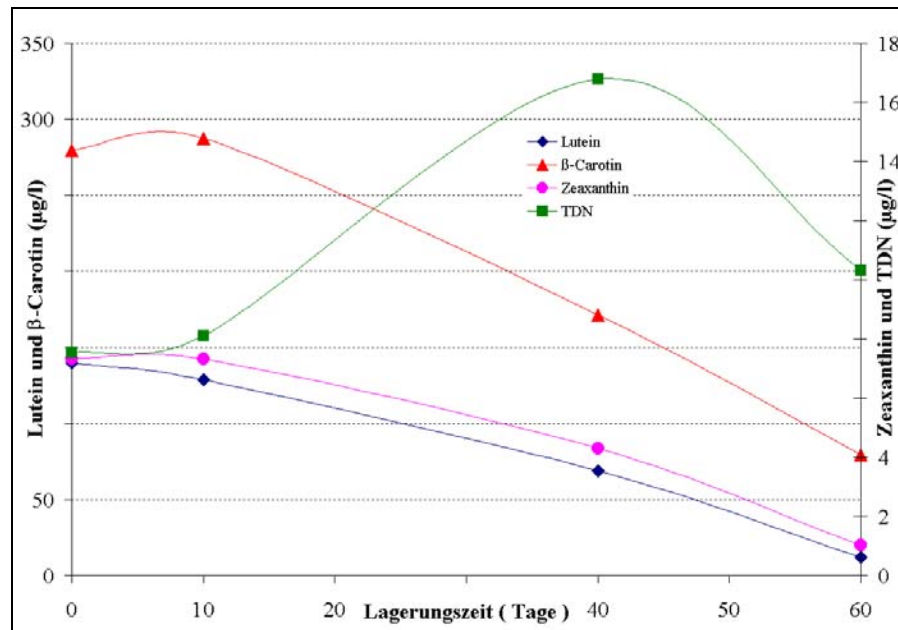


Abb. 77: TDN-Bildung und Carotinoidabnahme während einer 60tägigen Lagerung (30°C) in einem aus Carotinoid freiem Moste gewonnenen Wein, dem nach der Gärung ein aus Trauben gewonnenen Carotinoidextrakt zugegeben wurde (Siha Aktiv-7; 8g/hl)

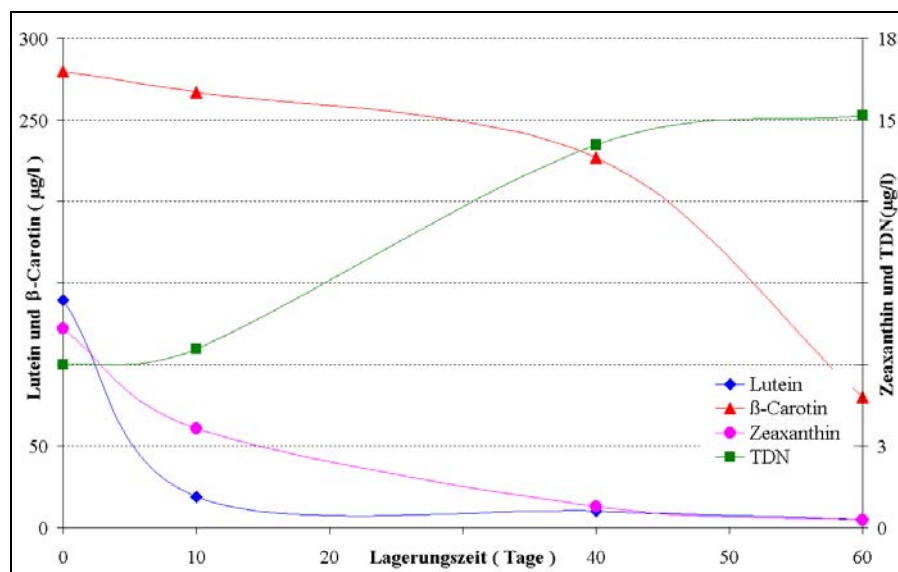


Abb. 78: TDN-Bildung und Carotinoidabnahme während einer 60tägigen Lagerung (30°C) in einem aus Carotinoid freiem Moste gewonnenen Wein, dem nach der Gärung ein aus Trauben gewonnenen Carotinoidextrakt zugegeben wurde (Lalv. EC 1118; 8g/hl)

Beim Vergleich des Abbaus der Carotinoide zeigte sich Lalvin EC 1118 (*S. bayanus*) aktiver als Siha Aktiv-7 (*S. cerevisiae*) ebenso bei der TDN-Entwicklung. Bei einer 60tägigen Lagerung (30°C) nach der Gärung hat Zeaxanthin bei Lalvin EC 1118 7,04 µg/l bzw. 96,3% der ursprünglichen Konzentration verloren, gefolgt von Lutein mit 134,33 µg/l (96,2%) und β-Carotin von 199,59 µg/l (71,4%). Während bei Siha Aktiv-7 hat Lutein

mit 127,5 $\mu\text{g/l}$ bzw. 91,3% der ursprünglichen Konzentration verloren, gefolgt von Zeaxanthin 6,29 $\mu\text{g/l}$ bzw. 85,9% und β -Carotin 200,12 $\mu\text{g/l}$ bzw. 71%.

Nach 40 Tagen Lagerung zeigte Siha Aktiv-7 die Neigung zur Konzentrationsabnahme von TDN, während Lalvin EC 1118 noch eine steigende Tendenz am Ende dieses Lagerungsversuches zeigte. Obwohl viele andere Faktoren mitverantwortlich waren, schien zu diesem Zeitpunkt die Anwesenheit von Enzymaktivität nicht auszuschließen zu sein.

12.5.2.2 Reinsubstanzen

Im Zusammenhang zwischen TDN-Bildung mit den einzelnen Carotinoiden in den Beeren, wurden Carotinoid-Reinsubstanzen (Lutein, β -Carotin) als einzelne mögliche TDN-Precursor im Blankwein bei 30°C Lagerung zugesetzt. Die Ergebnisse werden in Abb. 79 und dargestellt.

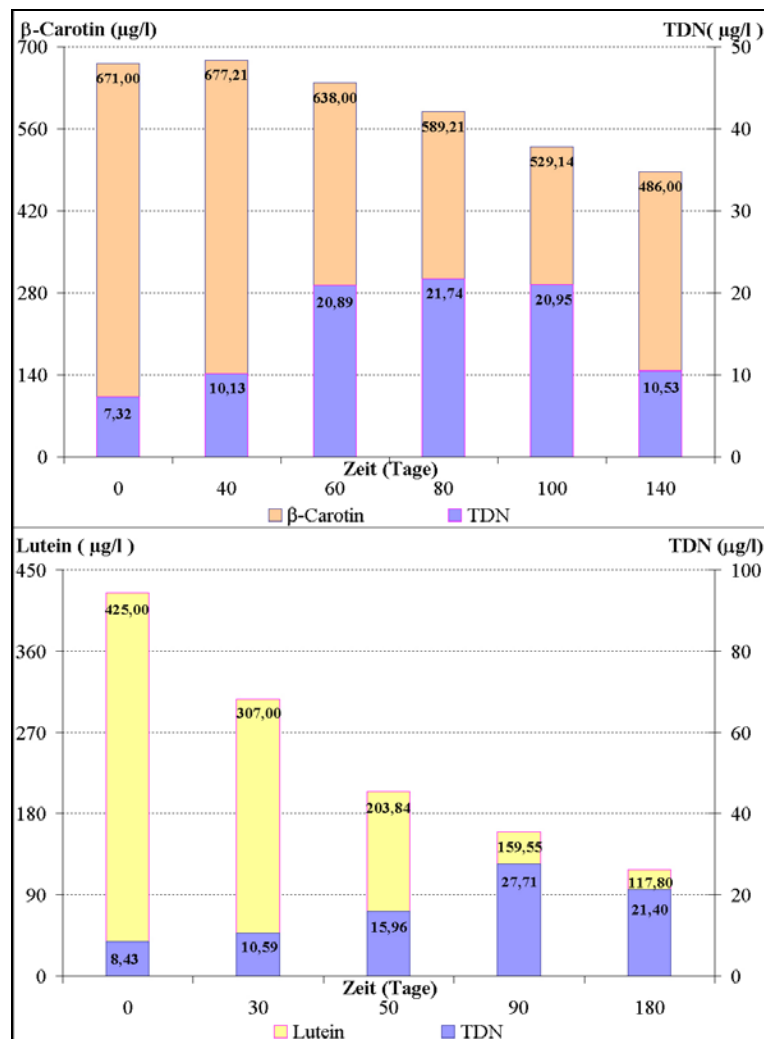


Abb. 79: Abbau von β -Carotin (oben), Lutein (unten) und TDN-Entwicklung bei Lagerung bei 30°C

Die Lagerung bei 30°C war eine bessere und schnelle Alternative für eine künstliche Alterung um die TDN-Bildung aus den Reinsubstanzen Lutein und β -Carotin zu beobachten. Da der im Versuch verwendete Blankwein nach vorheriger Untersuchung keine mehr Farbstoffe enthielt, kommen nur beide Carotinoide als Hauptprecursor für die TDN-Bildung in Frage.

Lutein sowie β -Carotin zeigten Neigungen zur Konzentrationsabnahme und gleichzeitiger Zunahme des TDN-Gehalts. Die maximum TDN-Produktionen aus dem Abbau der einzelnen Carotinoide während 90tägiger Lagerung betragen 19,28 $\mu\text{g/l}$ aus Lutein TDN, und 14,42 $\mu\text{g/l}$ aus β -Carotin.

12.6 Carotinoide, TDN und weitere Einflussfaktoren

Bei der Betrachtung des Verhaltens der Precursoren mit den Produkten wurden verschiedene, mögliche Abhängigkeiten der Carotinoide im Most und der daraus abgeleitete TDN-Gehalt im resultierenden Wein verglichen. Im Zusammenhang mit den verschiedenen Einflussfaktoren (pH-Wert, Gesamtsäure, Temperatur) wurden die Verhältnisse durch Regression analysiert. Als Materialien wurden alle Moste und Weine aus dem Fachgebiet Rebenzüchtung der Forschungsanstalt Geisenheim des Jahrgangs 1997, 1998, sowie weinähnliches saponifiziertes Beerenextrakt-Medium verwendet. Als Vergleiche dienten einige selbst bereitete Jungweine.

Wegen des hohen TDN-Vorkommens im Rieslingwein, wurden Rieslingsorten als Grundlagen bei diesen Analysen eingesetzt. Andere Sorten dienten als Vergleich in Beziehung mit anderen Faktoren, die möglicherweise auch für den TDN-Gehalt mitverantwortlich sind.

12.6.1 Lutein und die Bildung von TDN

12.6.1.1 Lutein im Most und Wein

Um den Zusammenhang zwischen dem Carotinoidabbau und der Bildung von TDN zu beobachten, wurde das Carotinoid Lutein als Precursor ausgewählt. Lutein wurde deshalb ausgewählt, weil Lutein eines der Hauptcarotinoide in Traubenbeeren ist, der als TDN-Precursor in Frage kommt. Außerdem wurde Lutein während der Gärung, sehr stark vermindert oder abgebaut.

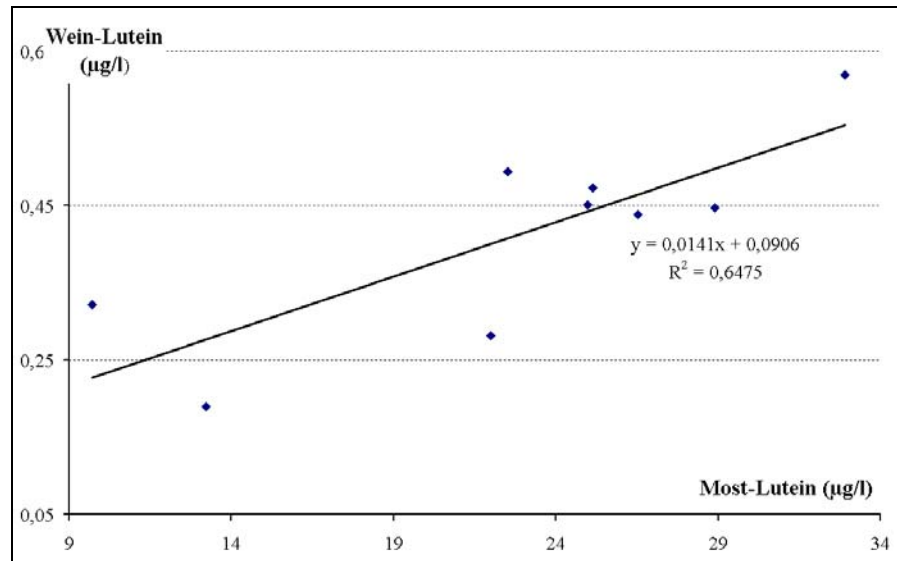


Abb. 80: Zusammenhang zwischen den Luteingehalten in Mosten und in den daraus gewonnenen Rieslingweinen des Jahrganges 1997 (Rz. Geisenheim)

Die Abb. 80 zeigt, dass die Luteinkonzentration in den Weinen von der Luteinkonzentration in den Mosten abhängt. Je höher die Luteinkonzentration in den Mosten ist, desto höher ist sie auch in den Weinen. In den Weinen bleiben jedoch nur sehr geringe Konzentrationen erhalten.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei weiteren Riesling-Jungweinen sowie bei anderen weißen Sorten gefunden.

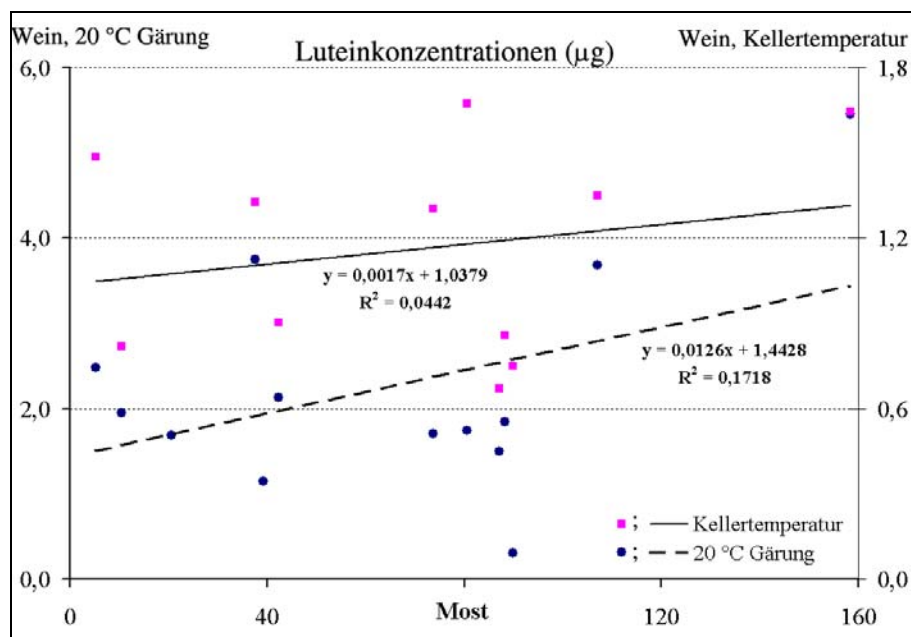


Abb. 81: Die Abhängigkeit des Luteingehaltes in den klaren Jungweinen, die bei 20°C sowie bei Kellertemperatur vergoren wurden vom Luteingehalt in den trüben Ausgangmosten (Rz.1998)

12.6.1.2 TDN-Gehalt und Lutein im Most

Aufgrund der engen Beziehungen zwischen dem Luteingehalt und den TDN-Konzentrationen, wurde das Verhältnis zwischen dem TDN-Gehalt in den Jungweinen und dem Luteingehalt in den ursprünglichen Mosten verglichen und analysiert.

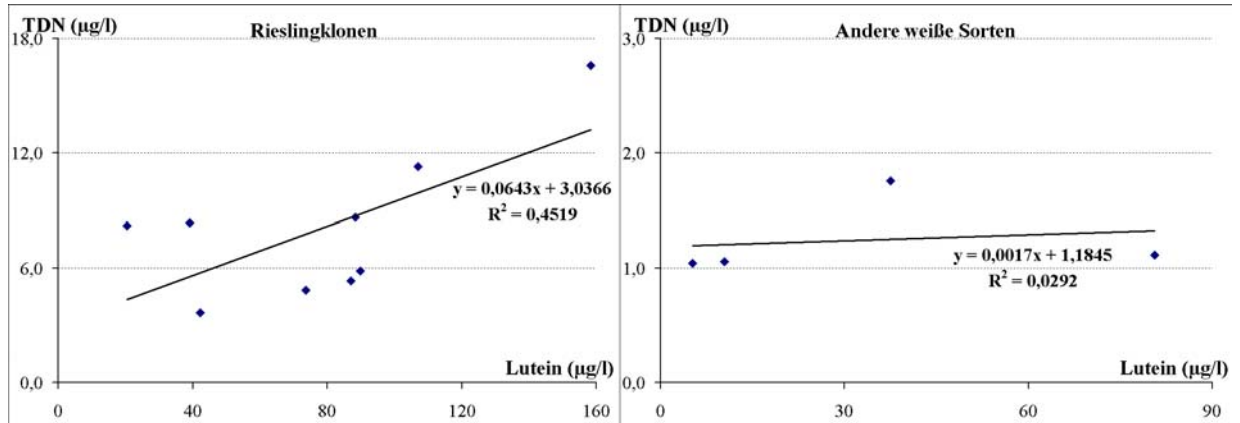


Abb. 82: Zusammenhang zwischen dem Luteingehalt in den Mosten und den TDN-Gehalten in den daraus gewonnenen Jungweinen des Jahrganges 1998. Vergoren bei 20°C

In Abb. 82 wurde das Verhältnis zwischen TDN-Gehalt in Jungweinen und den Luteingehalt in Mosten der Sorte Riesling und anderer „Weißen Sorten“ dargestellt. Die ansteigende Gerade zeigt, je höher der Lutein-Gehalt im Most war, desto höher war der TDN-Gehalt im Wein. Daraus ergibt sich, dass Lutein als ein Precursor von TDN angesehen werden muß.

Tendenziell gibt es keinen Unterschied zwischen der Sorte Riesling und den anderen „Weißen Sorten“, aber bei den Rieslingklonen wurde mehr TDN festgestellt als bei den anderen „Weißen Sorten“ und der Zusammenhang zwischen den Lutein in Mosten und TDN-Konzentrationen in den Weinen bei den Rieslingklonen ist deutlicher als bei den anderen „Weißen Sorten“. Dieses könnte auch u.a. von den pH-Werten sowie der Gesamtsäure der Moste beeinflusst werden. Über die unterschiedlichen pH-Werte und dem Einfluss des pH-Wertes und der Gesamtsäure wird in *Abschnitt 12.6.3* diskutiert.

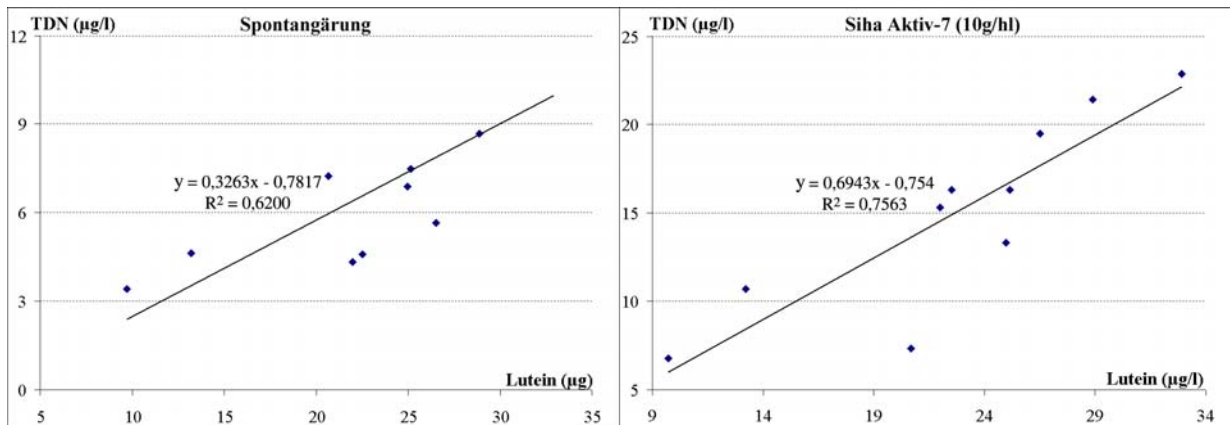


Abb. 83: Abhängigkeit des TDN-Gehalts in den Jungweinen, vergoren mit Siha Aktiv 7 (10 g/hl) und mit Spontangärung, vom Luteingehalt der Rieslingmoste des Jahrgangs 1997. Vergoren bei Kellertemperatur

Sowohl bei den spontan vergorenen, wie bei den mit der Hefe Siha Aktiv-7 gewonnenen Jungweinen zeigte sich eine enge Korrelation zwischen dem Luteingehalt der Moste und dem TDN-Gehalt der Jungweine. Es zeigte sich, dass die Art der Vergärung keinen wesentlichen Einfluss auf die Genese von TDN und den vorausgehenden Luteinabbau hat. Lediglich die Konzentration des Precursors Lutein ist für die TDN-Konzentration im Wein ausschlaggebend.

12.6.1.3 TDN-Gehalt und Lutein im Jungwein

Die TDN-Gehalte in Jungweinen, die bei den unterschiedlichen Temperaturen hergestellt wurden, zeigt die Abbildung 84.

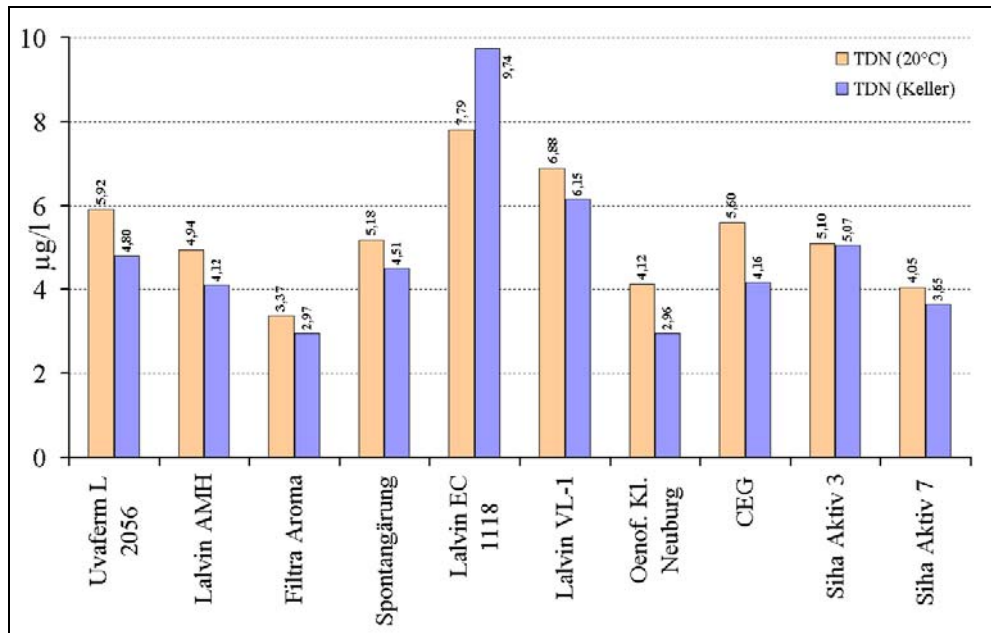


Abb. 84: TDN-Gehalte von Jungweinen, vergoren durch verschiedene Hefesorten bei Kellertemperatur und bei 20°C (Most: 1998er Riesling Klonengemisch 239 Gm. von Rz.)

Mit der Ausnahme der Hefe Lalvin EC 1118 bildeten alle Hefen bei 20°C höhere Mengen TDN als bei der niedrigeren Kellertemperatur. Ebenso traten deutliche Unterschiede in den TDN-Konzentrationen auf, die in den durch verschiedenen Hefestämme vergorenen Weinen gefunden wurden. Der Hefestamm wie auch die Gärungstemperatur haben daher einen wesentlichen Einfluss auf die Bildung von TDN.

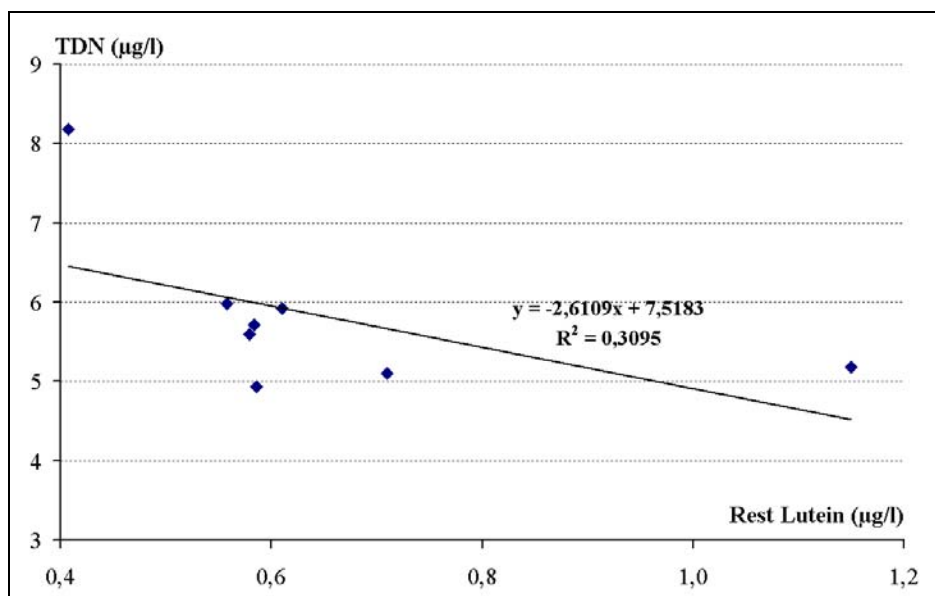


Abb. 85: Das Verhältnis zwischen dem TDN- und dem Lutein-Gehalt der Jungweine (Most: 1998er Riesling Klonengemisch 239 Gm. von Rz.), vergoren mit verschiedenen Hefestämmen bei 20°C

Es ist anzunehmen, dass TDN-Gehalt im Wein nicht allein von Lutein als Precursor abhängt. Jedoch zeigt die Darstellung in Abb. 85 einen umgekehrt proportionalen Gehalt von TDN und Lutein, da je höher TDN, umso geringer die vorhandenen Luteinreste. Es ist auch festzustellen, dass TDN bei Jungweinen schon während der Gärung gebildet wurde.

Sowohl Jungweine hergestellt mit verschiedenen Hefen, wie auch solche aus unterschiedlichen aus Traubensorten, die bei unterschiedlichen Temperaturen hergestellt wurden, zeigten ein ähnliches Verhalten. Diese lineare Abhängigkeit der TDN-Konzentrationen von der Luteinmenge, die im Wein verbleibt wird in Abb. 86 dargestellt. Je höher die Lutein-Restkonzentration ist, desto geringer ist die TDN-Konzentrationen.

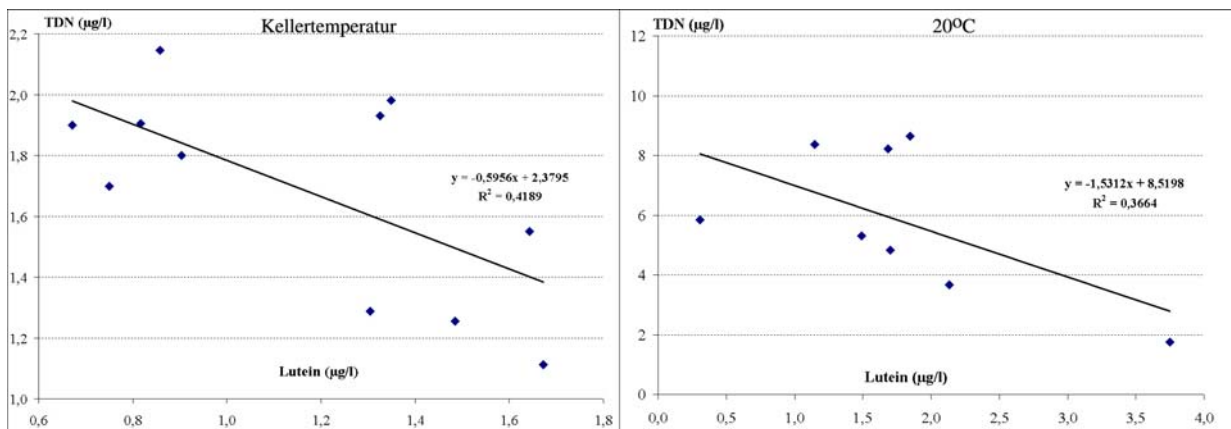


Abb. 86: Die Abhängigkeit der TDN-Konzentration von der Luteinmenge in den 1998er Jungweinen (Riesling und andere weißen Sorten) von der Vergärung bei Kellertemperatur und bei 20°C

12.6.1.4 TDN und Lutein in Weinen verschiedener Jahrgänge

Diese Beziehung zwischen dem TDN-Gehalt und dem geringen Lutein Restgehalt konnte auch in Weinen aus der Praxis festgestellt werden. Dazu wurden Versuchsweine der Rebenzüchtung des Jahrgangs 1997 untersucht und graphisch dargestellt (Abb. 87).

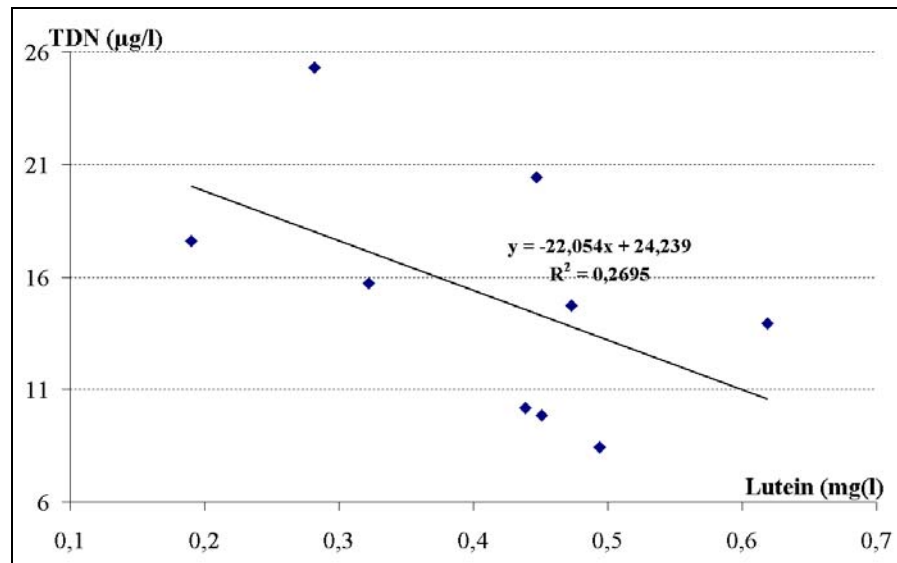


Abb. 87: TDN- und Lutein-Gehalt im Wein an der Rebenzüchtung 1997

Auch in diesen Proben ergab sich das gleiche Ergebnis. Je höher die Konzentration von TDN war, desto geringer war der Restluteingehalt in den Weinen. Auch dieses deutet darauf hin, dass Lutein im Wein ein TDN-Precursor ist.

Außer den vorkommenden Precursoren und den vergärenden Hefestämme können auch noch andere Faktoren auf die TDN-Bildung im Weinbereitungsprozess Einfluss nehmen.

12.6.2 Der Einfluss von Luteinestern

Um das Vorkommen anderer Luteinformen in der Beeren, Weinen sowie Mosten zu bestimmen, wurden die Proben der verschiedenen Rieslingklone sowie der anderen „Weißen Sorten“ mit der HPLC Analyse Methode nach Gregory et al. (1986) analysiert.

Nach der chromatographischen Analyse ist festzustellen, dass in den Beeren, Mosten und Weinen von Rieslingklonen sowie von anderen „Weißen Sorten“ keine Esterformen des Lutein nachzuweisen sind, sodass nur die freien Formen von Lutein in den Beeren, Mosten und Weinen von *Vitis vinifera* vorkommen.

Da Luteinester, wie sie in vielen Blütenblättern gefunden werden, in Beeren, Mosten und Weinen nicht nachgewiesen werden konnten, bleibt nur freies Lutein als Precursor für TDN übrig.

12.6.3 Der Einfluss der Gesamtsäure und des pH-Wertes

12.6.3.1 Most und Jahrgangswein

Für die Betrachtung des Einflusses beider Faktoren auf die TDN-Bildung wurde zwischen Mosten und Jahrgangswijnen verglichen.

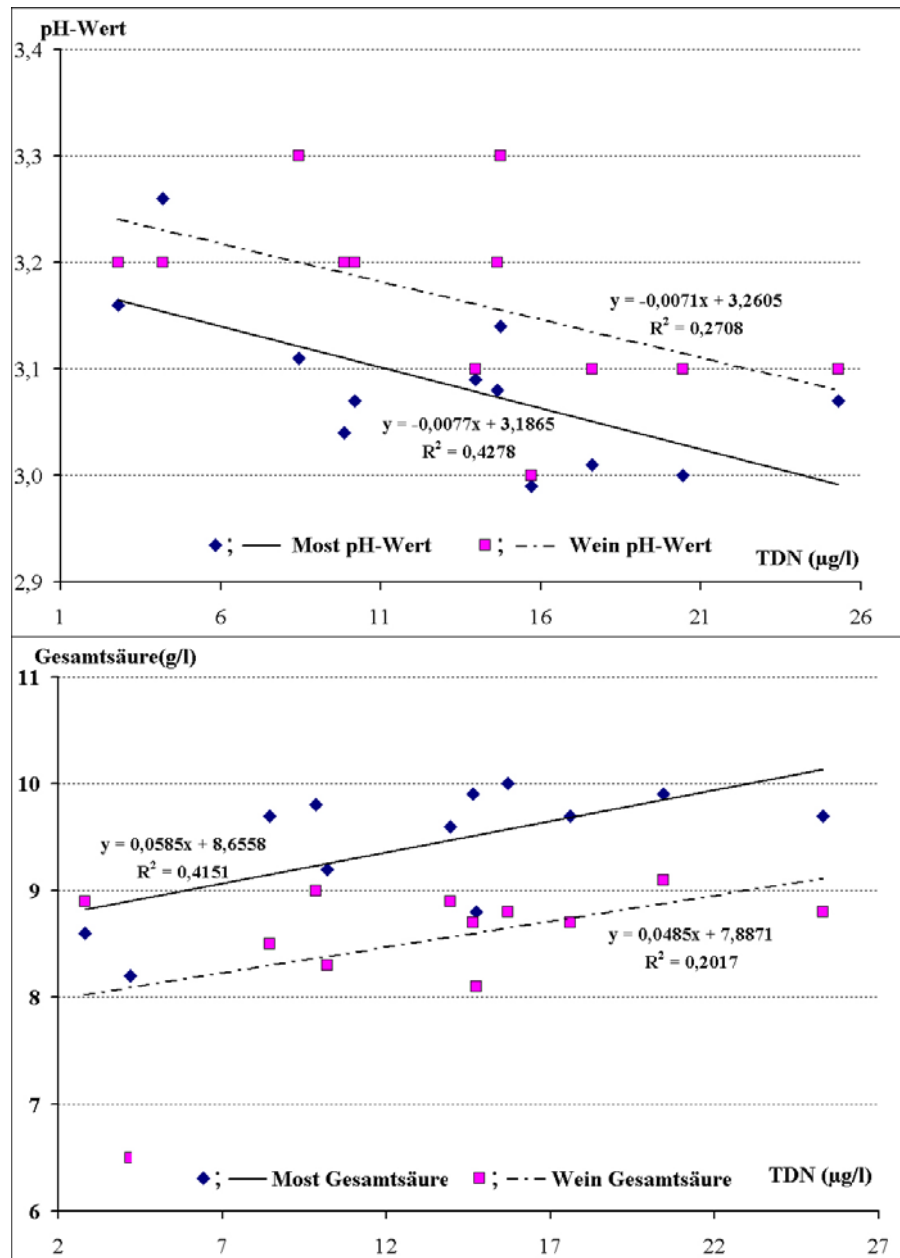


Abb. 88: Wein TDN-Gehalt, Most- und Wein von pH-Wert (oben) und Most- und Wein-Gesamtsäure (unten) Jahrgang 1997 (Rebenzüchtung, Geisenheim)

Aus Abb. 88 ist deutlich zu erkennen, dass Weine, die aus Mosten mit niedrigen pH-Werten gewonnen wurden, höhere TDN-Gehalte aufweisen als solche aus Mosten mit höherem pH. Dies könnte die höheren TDN-Konzentration in Rieslingweinen teilweise erklären, da diese meist deutlich niedrigere pH-Werte als Weine anderer Rebsorten aufweisen.

Die Korrelation zur Gesamtsäure ist damit eigentlich zwangsläufig, da pH-Wert und Säuregehalt im Most und im Wein korreliert sind. Das heißt mit steigendem Säuregehalt nimmt die Menge von TDN zu. Eine Erklärung wäre auch darin zu sehen, dass bei niedrigerem pH die Hydrolyse der Precursor schneller vonstatten geht als bei höherem pH.

12.6.3.2 Most und Jungwein

So wie bei den Jahrgangsweinen wurden die Untersuchungen auch mit Jungweinen, die bei 20°C vergoren worden waren, durchgeführt.

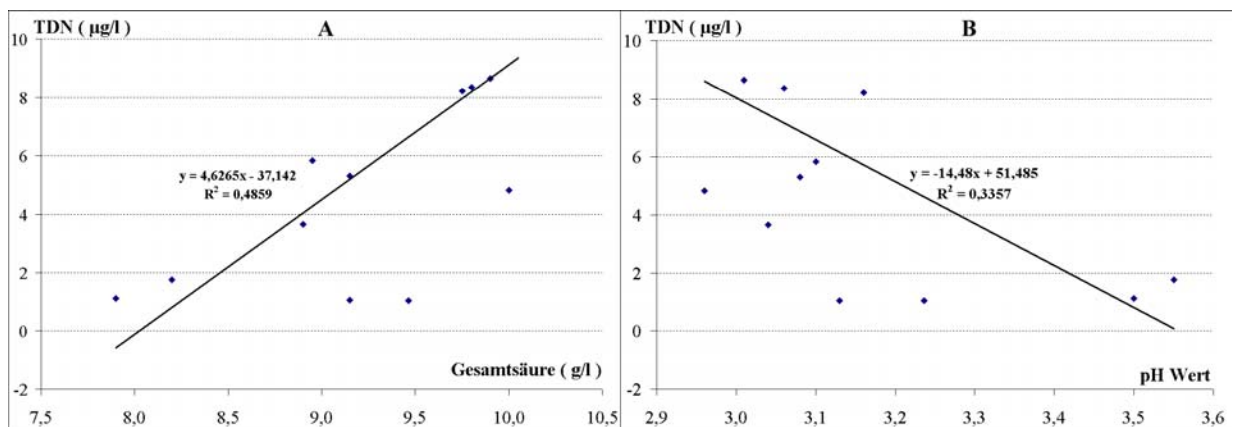


Abb. 89: Korrelation zwischen dem TDN-Gehalt der Jungweine und der Gesamtsäure (A) und dem pH-Wert (B) der Ausgangsmoste

Nicht nur bei Jahrgangsweinen, auch bei Jungweinen zeigten Gesamtsäure sowie pH-Wert ähnliche Korrelationen zum TDN-Gehalt, einem deutlichen Anstieg mit steigender Gesamtsäure und einen Abfall mit steigendem pH-Wert. Weine aus sauren Mosten weisen deutlich höhere TDN-Konzentrationen auf.

12.6.3.3 Beerenextrakt-Medium

Eine weitere Überprüfung der Entstehung des TDN-Gehaltes aus möglichen Carotinoid-Vorkommen im Most wurde mittels weinähnlichem Medium unter Zusatz von saponifiziertem Beerenextrakt durchgeführt. Der verwendete saponifizierte Beerenextrakt,

der aus Beerenextrakt nach dem Saponifikationsschritt gewonnen wurde, enthielt nur die Carotinoide Lutein und β -Carotin.

Zwei verschiedene weinähnlichen Medien wurde saponifizierter Beerenextrakt zugesetzt. Das synthetische Medium besteht aus 15% Ethanol, 2,6 g/l Äpfelsäure und 1,6 g/l Weinsäure, gelöst in bidestiliertem Wasser, während der Blankwein aus vergorenem behandeltem klaren Traubenmost besteht, der keine Farbstoffe mehr enthielt und daraufhin überprüft war. Die pH-Werte der Medien wurden auf pH 1,0; 2,0; 3,0 mit H_2SO_4 eingestellt.

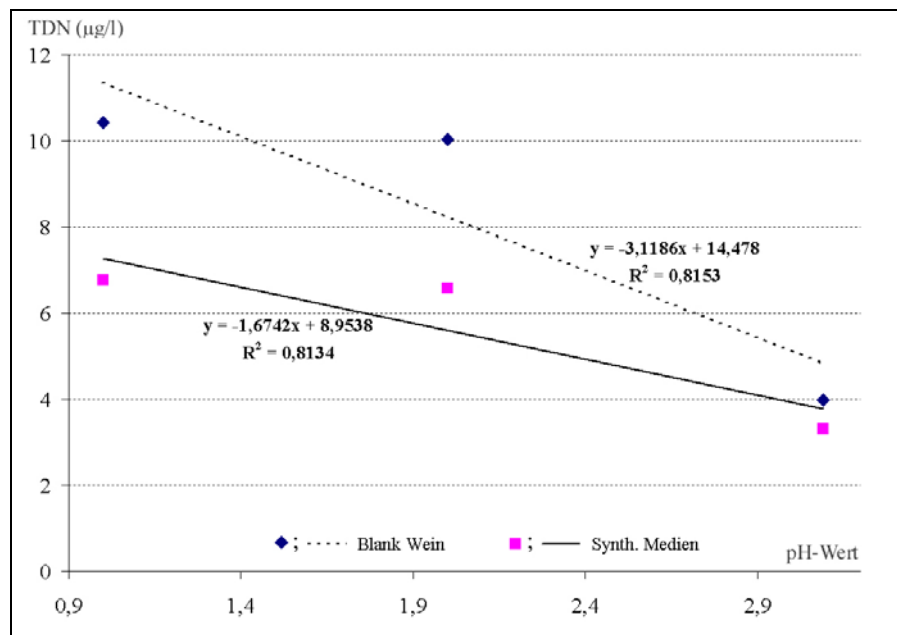


Abb. 90: Potenzieller TDN-Gehalt von Beerenextrakt-Medien nach Wärmebehandlung (50°C; 4 Std) bei verschiedenen pH-Werten

Die Ergebnisse zeigen wiederum, dass je niedrigerer die pH-Werte waren, desto mehr TDN wurde aus der TDN-Vorstufen freigesetzt. Dieses steht auch mit den Ergebnissen aus der Hydrolyseversuchen im Einklang.

12.6.4 Der Einfluss von Hefen

12.6.4.1 Lutein und TDN-Gehalt

Der Einfluss der Hefestämme auf den Luteingehalt und die Bildung von TDN bei der Vergärung eines Mostes wird in Abb. 91 dargestellt. Nach der Beobachtung der Carotinoid-Veränderungen, insbesondere von Lutein, bei der Gärung und den gemessenen unterschiedlichen β -Glucosidaseaktivität der Hefen, wurden verschiedene Hefestämme

untersucht. In noch trüben Jungweinen wurden nach der Gärung bei 20°C zeitgleich mit dem gebildeten TDN-Gehalt auch der Luteinrestgehalt ermittelt.

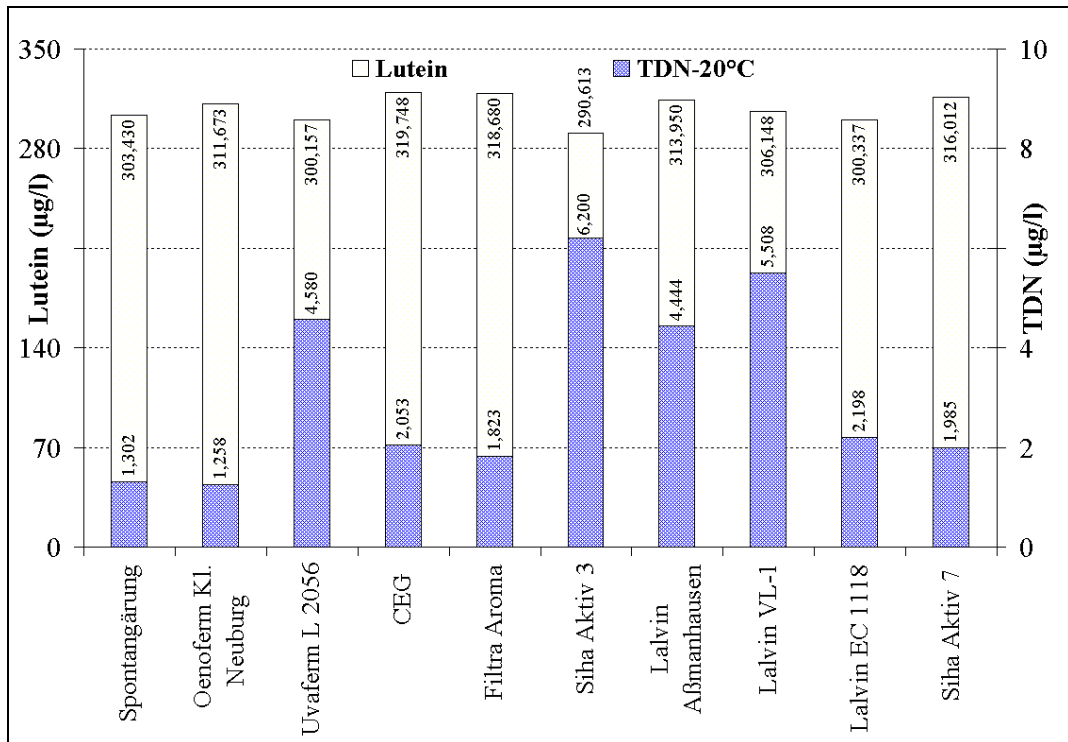


Abb. 91: TDN- und Lutein-Gehalt in den trüben Jungweinen vergoren mit verschiedenen Hefestämmen

Bei den Untersuchungen trüber Jungweine zeigte jeder Hefestamm einen unterschiedlichen Einfluss auf den Lutein- und TDN-Gehalt. Es ist zu sehen, dass je niedriger der Luteinrest in den Weinen war, desto größer waren die TDN-Gehalte in den Weinen. Die Verhältnisse zwischen dem Gehalt abgebauten Luteins und den TDN-Gehalten der Jungweine werden mit der Korrelation in der Abb. 92 dargestellt.

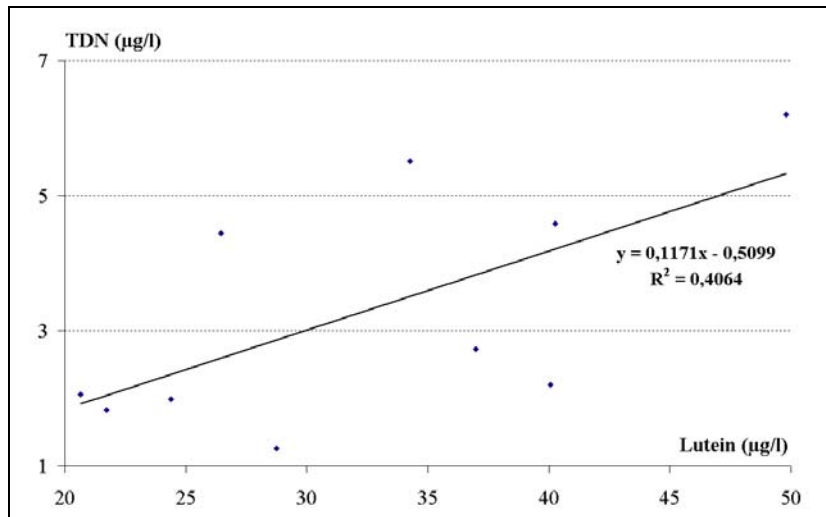


Abb. 92: Das Verhältnis von TDN- und der Menge umgesetzten Luteins in den trüben Jungweinen, die mit verschiedenen Hefestämmen hergestellt wurden

Graphisch dargestellt zeigt sich, dass sich in den untersuchten Weinen eine Abhängigkeit des TDN-Gehaltes von der Menge des abgebauten Lutein ergibt. Mit $R^2 = 0,4064$ für die lineare Darstellung ist eine deutliche Korrelation gegeben (Abb. 92). Betrachtet man die Abhängigkeit des TDN-Gehaltes vom Lutein, so kann festgestellt werden, dass bei allen Proben eine gute Korrelation zu Lutein gegeben ist, und damit die These, dass Lutein eine Vorstufe von TDN ist, unterstützt wird.

12.6.4.2 Glucosidaseaktivität

Die Enzymaktivität der Hefen, insbesondere die Glucosidaseaktivität ist einer der Faktoren, der die TDN-Bildung aus Lutein als Precursor bei der Weinherstellung beeinflussen könnte.

Bei diesen Untersuchungen wurden die Beziehungen Glucosidaseaktivität, Populationsverlauf, dem Lutein- und dem TDN-Gehalt betrachtet, wie auch zeitgleich die Verhältnisse zwischen dem Precursor und den Produkten.

Bei den verwendeten Hefen konnte eine positive Beziehung zwischen der Hefepopulation und deren zellgebundenen Glucosidaseaktivität gefunden werden.

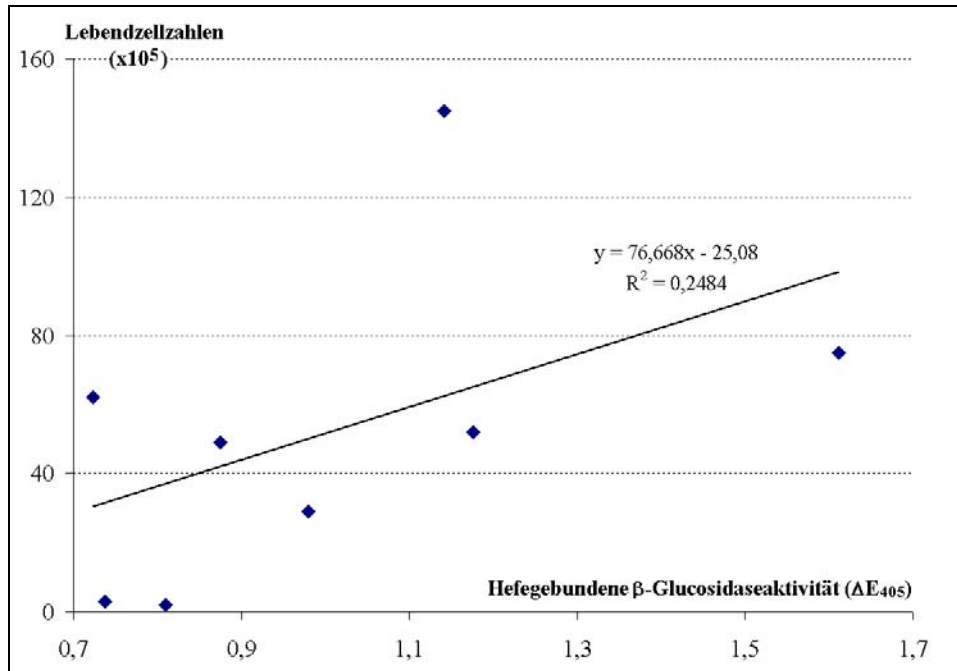


Abb. 93: Glucosidaseaktivität und Zellzahl an verschiedenen Hefestämmen in trüben Jungweinen (Kl. Ø 239 Rz. 1998)

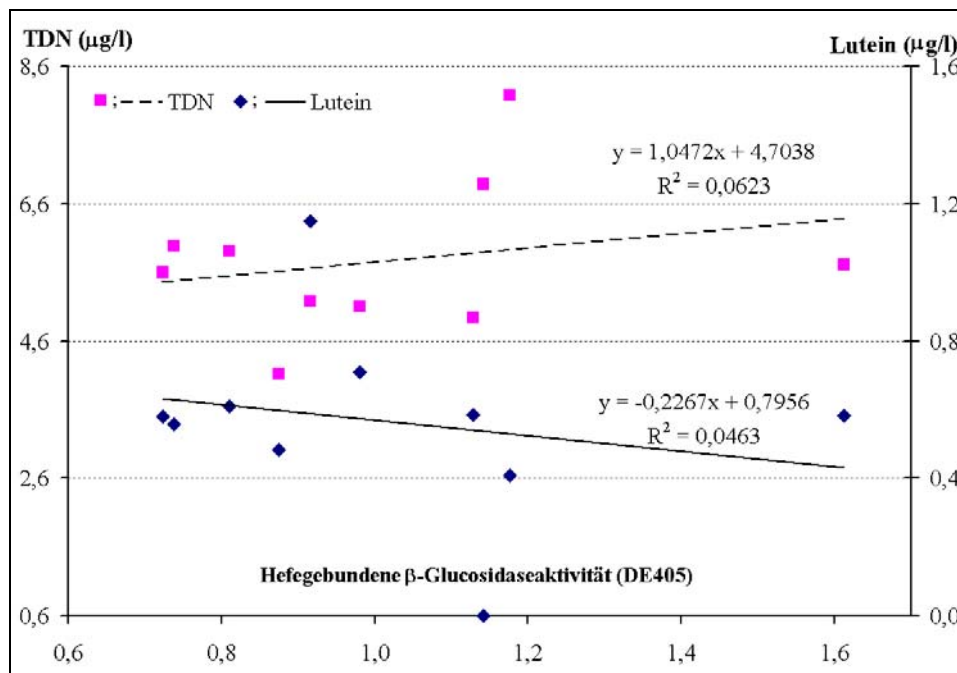


Abb. 94: Glucosidaseaktivität verschiedener Hefeklonen, Lutein- und TDN-Gehalt von Trüb Jungwein (Kl. Ø 239 Rz. 1998)

Es ist weiterhin zu beobachten, dass der Lutein sowie der TDN-Gehalt in trüben Jungweinen von der Glucosidaseaktivität der verwendeten Hefen beeinflusst werden. Tendenziell ist zu sehen, dass je größer die Glucosidaseaktivitäten waren, desto mehr Lutein abgebaut und gleichzeitig TDN gebildet wurde.

Zusammenfassung

Die Neubildung von Aromasubstanzen durch Carotinoidabbau ist eine der vielen Veränderungen der Weine während der Flaschenlagerung. In gealterten Weinen entstehen aromawirksame Kohlenwasserstoffe, C₁₃-Komponenten, u.a. TDN aus den Carotinoidsubstanzen der Weinbeeren. TDN, das natürlich in Pflanzenprodukten vorhanden ist, liefert einen wichtigen Beitrag zum typischen Kerosin-ähnlichen Charakter in Flaschen gealterter Rieslingweine. Als TDN-Precursoren sind oft die Carotinoide Lutein und β -Carotin vorgeschlagen worden.

Die TDN-Bildung wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Außer vom Carotinoidgehalt in den Beeren bzw. Mosten, auch von den Traubensorten und -klonen, den verwendeten Hefen und auch durch die Jahrgänge. Andere Aspekte, wie das Vorhandensein von Luteinestern, die Verhältnisse der Carotinoide untereinander, weinbauliche Maßnahmen, wie Entblätterungen, sowie die Gesamtsäure bzw. die pH-Werte der Traubenmaischen, die die TDN-Bildung beeinflussen könnten, wurden ebenfalls mit einbezogen.

Die TDN-Bildung während des Weinherstellungsprozesses sowie die TDN-Entwicklung bei der Alterung und dem damit verbundenen Carotinoid-Abbauprozess wurde in dieser Arbeit durch Modellversuche zu klären versucht. Während der Studien wurden Traubenbeeren, Moste und Jahrgangsweine der Sorte Riesling und anderer weißer Sorten verwendet. Der Einfluss von Mikroorganismen auf den TDN-Gehalt wurde durch Verwendung von 9 Hefestämmen (*Saccharomyces spp.*) und auch bei Spontangärung untersucht.

Die Extraktionen der Carotinoide aus Trauben, Mosten und Weinen wurden unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Eine neue Methode musste wegen des hohen Wasser-, Zucker- und Säuregehalt des Mostes und Weines sowie der gärenden Moste verschiedener Dichten entwickelt werden. Für die Analysen der Carotinoide sowie die deren Luteinestern wurden verschiedene HPLC-Verfahren eingesetzt. Als stationäre Phase dienten Säulen LiChroCART 250-4 HPLC Cartridge LiChrospher 100 RP18 (5 μ m), RP18 125-4 M LiChroCART, sowie eine 250x4,6 mm (5 μ m) Hypersil Elite C18. Die Säulentemperatur lag bei 28°C. Die Trennungen wurden mit verschiedenen mobilen Phasen durchgeführt. Mit dem Einsatz des Dioden-Array-Detektor wurden verschiedene Wellenlänge zur Messung der einzelnen Carotinoide verwendet. Lutein wurde bei 450(\pm 4) nm bestimmt, während Zeaxanthin, β -Apo-8'-Carotinal, β -Carotin und Chlorophyll-b bei 460(\pm 6) nm und Chlorophyll-a bei 440(\pm 4) nm, gemessen wurden. Außerdem wurden auch typische Wellenlängen wie 473(\pm 6) nm für β -Apo-8'-Carotinal und 662(\pm 4) nm für Chlorophyll-a

eingesetzt. Die TDN-Konzentrationen der Proben wurden durch Gaschromatographie/Massenspektrometrie analysiert.

Die mögliche TDN-Bildung unter Berücksichtigung des Carotinoidabbaus wurde außer in Jungweinen auch in Blankweinen nach Zugabe von Reinsubstanzen bzw. Beerenextrakten beobachtet. In den trüben Jungweinen veränderten sich die Mengen aller Farbstoffe während der Gärung. Die bedeutendsten Veränderungen der Carotinoid-Inhaltstoffe fanden nach dem Erreichen der Maximum-Werte der gebundenen β -Glucosidaseaktivität der Hefen statt. Die größere Aktivität bei Kellertemperatur, die ebenfalls von der Populationszahl abhängt, verursachte auch die größeren Veränderungen des Carotinoidgehaltes. Es wird festgestellt, dass nach der Gärung nur noch die Hälfte der Konzentrationen der Carotinoide und Chlorophylle übrig geblieben ist und die Bildung von TDN bereits während der Gärung stattgefunden hat. Es wurde gezeigt, dass der Lutein- bzw. der TDN-Gehalt in Jungweinen mit der Glucosidaseaktivität der verwendeten Hefen korreliert werden kann. Dass der Zusammenhang zwischen dem Lutein in Mosten und den TDN-Konzentrationen in den Weinen bei den Rieslingklonen deutlicher ist als bei den anderen Sorten, zeigt dass Lutein ein TDN-Precursor ist. Die Verhältnisse von Lutein zu β -Carotin ist in den Rieslingtraubenbeeren größer als in den Beeren der anderen „Weißen-Sorten“. Die TDN-Bildung in Weinen, die aus den Mosten mit niedrigeren pH-Werten gewonnen wurden, war höher als solche aus Mosten mit höherem pH-Wert. Bei den Weinen aus Trauben der entblätterter Rebstocke zeigten höhere TDN-Gehalt, weil solche weinbauliche Maßnahmen die Konzentrationen der gelöster Carotinoide in den Trauben und folgend auch in den Jungweinen erhöht.

Lutein, β -Carotin und Zeaxanthin sind die Carotinoid-Hauptprecursor bei der TDN-Bildung. Beim prozentualen Vergleich deren Verluste während der Gärung und Lagerung ist der bei Lutein bzw. Zeaxanthin grösser als der bei β -Carotin. Dabei sind die mengenmäßigen Verluste von β -Carotin höher als bei Lutein und Zeaxanthin. Als TDN-Precursor sind die Carotinoide Lutein bzw. Zeaxanthin labiler als β -Carotin. Zeaxanthin wurde nur in sehr geringen Mengen in der Traubenbeeren gefunden.

Die Reinsubstanzen Lutein bzw. β -Carotin zeigten auch deutlich ihren Precursor-Charakter in Hinblick auf die potentielle TDN-Bildung. Durch Säurehydrolyse der Reinsubstanzen bei 50°C zeigte es sich, dass normales TDN, TDN+2 und TDN+4 in D₂O (²H₂O) aus Lutein gebildet wurde. Aus β -Carotin wurde nur wenig TDN erzeugt.

Summary

The formation of new aroma substances by carotenoid degradation is one of many changes in wines during bottle storage. In aged wines, many components originate from the carotenoid substances of the grapes. They were identified as hydrocarbons, C₁₃ compounds i.e. TDN. The carotenoids lutein and β -carotene have often been proposed as TDN-precursors. TDN, naturally existing in plant products, gives an important contribution to the typical kerosene-like character of bottle-aged Riesling wine, in which the highest quantities of this compound were detected.

The formation of TDN can be influenced by several factors. Besides the carotenoid content in the berries as well as in the must, grape varieties and clones, yeasts to be used for fermentation, as well as vintage may pose important influence. All other possible causing aspects to TDN formation as the existence of lutein esters, the correlation of the carotenoids among each other, wine growing practices as "defoliation", and the total acidity and pH value of the grapes were considered.

The TDN formation during the wine making process as well as the TDN formation and TDN development during ageing, and the related carotenoid degradation process, was investigated by model experiments. During these studies grape-berries, grape musts, vintage wines of different Riesling clones and other wine varieties as well as self-prepared wines were used. The influence of the yeast on the TDN-content was observed by the application of 9 different yeast clones (*Saccharomyces spp.*) as well as in spontaneous fermentation.

Grape, must and wine carotenoids were extracted under different conditions. A new method was developed because of the high water content, sugar and acidity of the musts and wines as well as fermenting musts of different densities. The carotenoids as well as the lutein ester were analyzed by different HPLC-methods. As stationary phases served columns like LiChroCART 250-4 HPLC Cartridge LiChrosphers 100 RP18 (5 μ m), RP18 125-4 M LiChroCARTs, as well as a 250x4,6 mm (5 μ m) Hypersil elite C18. The column-temperature was within 28°C. The separations were enforced by different mobile phases. With the use of a Diode-Array-Detector, different wavelenghts could be used for measurement of single carotenoids. Lutein was detected at 450(\pm 4) nm, zeaxanthin, β -apo-8'-carotenal, β -carotene and chlorophyll-b at 460(\pm 6) nm and chlorophyll-a at 440(\pm 4) nm. Furthermore, the typical wavelenghts 473 (\pm 6) nm for β -Apo-8'-carotenal and 662(\pm 4) nm for chlorophyll-a were used. The TDN concentrations the samples were determined by Gas chromatography/Mass spectrometry.

The possible TDN formation with respect to carotenoid degradation was observed in young wines and also in blank wines after adding of pure-substances as well as berry extract. In the cloudy young-wines, all the quantities of pigments changed during the fermentation. The most important changes of the carotenoid content were found at maximal values of yeast-bound β -glucosidase activity. The higher activity at cellar temperature, influencing also yeast cell contents, caused also the largest changes of the carotenoid content. It was determined that only half of the concentrations of the carotenoids and chlorophylls remained after fermentation. The formation of TDN has already taken place during fermentation. It was shown that lutein as well as TDN content in young wines correlate with glucosidase activity of the used yeasts. The relationship between lutein in the musts and TDN content in the wines in the Riesling clones was clearer than in other varieties, and shows that lutein is a TDN-precursor. The ratio of β -carotene to lutein in Riesling is higher than in the other „white varieties“ berries. The TDN formation in wines that were prepared from musts with lower pH were higher than such from higher pH. Wines derived from berries of defoliated vines showed highest TDN content because such vine treatment yields higher concentrations of carotenoids in the grapes and can be detected also in young-wines.

Lutein, β -carotene and zeaxanthin are major carotenoid precursors for TDN formation. On percentage comparison of the losses during fermentation and storage on TDN formation, lutein as well as zeaxanthin have higher potency than β -carotene, although the amount of degraded β -carotene was found even higher than that of lutein as well as zeaxanthin. As TDN-precursor, the carotenoids lutein as well as zeaxanthin are more labile than β -carotene. Zeaxanthin only was found in very low quantities in grape berries.

The pure substances, lutein as well as β -carotene, showed clearly their precursor character on the potentially TDN formation. Through acid hydrolysis of the pure substances at 50°C, we could show the formation of normal TDN, TDN+2 and TDN+4 in D₂O (2H₂O) from lutein. Little TDN was generated from β -carotene.

Literaturverzeichnis

- Alberola, J., L.J. Izquierdo. 1978. The volatile fraction of orange juice. Methods for extraction and study of composition. In: Charalambous G. (Ed.). Flavor of foods and beverages, chemistry and technology: 283-303. Academic Press. New York
- Anonymus. 1980. Bestimmung der β -Glucosidase-Aktivität. Firmenschrift der Fa. Böhringer Mannheim Nr. 5156
- Aryan, A.P., B. Wilson, C.R. Strauss, P.J. Willams. 1987. The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their β -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible applications in enology. Am. J. Enol. Vitic. **38**: 182-188
- Ayers, J.E., M.J. Fishwick, D.G. Land, T. Swain. 1964. Off-flavour of dehydrated carrot stored in oxygen. Nature **203**: 81
- Baltes, W. 1995. Lebensmittelchemie. 4 Aufl. Springer-Verlag. Berlin
- Bauernfeind, J.C., C.R. Adams, W.L. Marusich. 1981. Carotenes and other vitamin-A precursors in animal feed. In Bauernfeind, J.C. (Ed.). Carotenoids as colorants and vitamin-A precursors. Academic Press. New York
- Bauernfeind, J.C. 1972. Carotenoid vitamin-A precursors and analogs in foods and feeds. J. Agric. Food Chem. **20**: 456-473
- Bauernfeind, J.C. 1981. Carotenoids as colorants and vitamin-A precursors. Academic Press. New York.
- Baumes, R.L., C.C. Aubert, Z.Y. Gunata, W. De Moor, C.L. Bayonove, C. Tapiero. 1994. Structures of two C13-norisoprenoid glucosidic precursors of wine flavor. Journal of Essential Oil Research **6**: 587-599
- Belitz, H.-D., W. Grosch. 1987. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Dritte überarbeitete Aufl. Springer-Verlag. Berlin. New York
- Bell, C.M., L.C. Sander, S.A. Wise. 1997. Temperature dependence of carotenoids on C18, C30 and C34 bonded stationary phases. Journal of Chromatography A **757**: 29-39
- Bertuccioli, M., R. Viani, 1976. Red wine aroma: Identification of headspace constituents. J. Sci. Fd Agric. **27**: 1035-1038
- Bieri, J.G., E.D. Brown, J.C. Smith Jr. 1985. Determination of individual carotenoids in human plasma by high performance liquid chromatography. Journal of Liquid Chromatography **8**: 473-484
- Binder, G. 1999. Enzyme im Test. Das Deutsche Weinmagazin **20**: 18-23
- Bramley, P.M. 1992. Analysis of carotenoids by HPLC and diode-array detection. Phytochemical Analysis **3**: 97-104
- Bruchmann, E.E. 1976. Angewandte Biochemie. Ulmer. Stuttgart
- Burden, R.S., H.F. Taylor. 1970. The structure and chemical transformations of xanthoxin. Tetrahedron Letters **47**: 4071-4074
- Bureau, J.L., R.J. Bushway. 1986. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the united states. Journal of Food Science **52**: 128-130
- Bureau, S.M., A.J. Razungles, R.L. Baumes, C.L. Bayonove. 1998. Effect of vine or bunch shading the carotenoid composition in *Vitis Vinifera* L. berries: I. Syrah grapes. Einfluß der Beschattung von Reben oder Trauben auf die Carotenoid-Zusammensetzung in Beeren von *Vitis vinifera* L. Viticultural and Enological Sciences/Die Weinwissenschaft **53**: 64-71
- Bureau, S.M., R.L. Baumes, A.J. Razungles. 2000. Effects of vine or bunch shading on the glycosylated flavor precursors in grapes of *Vitis vinifera* L. Cv. syrah. J. Agric. Food Chem. **48**: 1290-1297
- Büch, G.W., R.G. Berger. 1998. Degradation of chlorophyll in model preparations. Deutsche Lebensmittel Rundschau **94**: 109-112
- Buttery, R.G., R.M. Seifert, D.G. Gundagni, L.C. Ling. 1969. Characterization of some volatile constituent of bell peppers. J. Agric. Food Chem. **17**: 1322-1327

- Careri, M., L. Elviri, A. Mangia. 1999. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of β -carotene and xanthophylls validation of the analytical method. *Journal of Chromatography A* **854**: 233-244
- Cert, A., W. Moreda, M.C. Perez-Camino. 2000. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *Journal of Chromatography A* **881**: 131-148
- Chassagne, D., R. Boulanger, J. Crouzet. 1999. Enzymatic hydrolysis of edible *Passiflora* fruit glycosides. *Food Chemistry* **66**: 281-288
- Chisholm, M.G., L.A. Guiher, S.M. Zackiewicz. 1995. Aroma characteristics of aged vidal blanc wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**: 56-62
- Craft, N.E., J.H. Soares Jr. 1992. Relative solubility, stability and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 431-434
- Dachtler, M., K. Kohler, K. Albert. 1998. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic identification of lutein and zeaxanthin stereoisomers in bovine retina using a C30 bonded phase. *Journal of Chromatography B* **720**: 211-216
- Danehower, D.A., W.T. Kelley. 1990. Rapid extraction and high speed liquid chromatography of *Nicotiana tabacum* leaf pigments. *Journal of Chromatography* **502**: 431-436
- Darko, E., B. Schoefs, Y. Lemoine. 2000. Improved liquid chromatographic method for the analysis of photosynthetic pigments of higher plants. *Journal of Chromatography A* **876**: 111-116
- Davis, D. L., K. L. Stevens, L. Jurd. 1976. Chemistry of tobacco constituents. Oxidation of α -ionone and the acid-catalyzed rearrangement of 5-keto- α -ionone. *J. Agric. Food Chem.* **24**: 187-189
- Day, W.C., J.G. Erdman, 1963. Ionene: A thermal degradation product of β -carotene. *Science* **141**: 808
- De Brauw M.C.N. 1981. The horizons of identification and analysis with mass spectrometry. 3rd Weurman Symposium. In *Flavour* 81 (253). Peter Schreier (Ed.). Walter de Gruyter. Berlin
- Di Stefano, R. 1985. Presenza di caratteri organolettici favorevoli in vini bianchi lungamente invecchiati. *dagine sui composti olattili e su alcuni parametri chimichi e fisici di riesling prodotti in germania.* *Riv. Vitic. Enol. Conegliano* **4**: 228-241
- Di Stefano, R. 1989. The glycoside nature of terpenes of Muscat grape skins. The β -glycosidase activity of grape skins. *Viticultural and Enological Sciences/Die Weinwissenschaft* **44**: 158-161
- Edmunds, F.S., R.A.W. Johnstone. 1965. Constituents of cigarette smoke part IX. The Pyrolysis of polyenes and the formation of aromatic hydrocarbons. *Journal of Chemical Society London*: 2892-2897
- Enzell, C.R., I. Wahlberg, A.J. Aasen, 1977. 1. Isoprenoids and alkaloids of tobacco. In: Herz, W., H. Grisebach, G.W. Kirby (Eds.). *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* **34**: 2-22. Springer Verlag. Wien. New York
- Enzell, C. 1985. Biodegradation of carotenoids an important route to aroma compounds. *Pure & Appl. Chem.* **57**: 693-700
- Falbe und Regitz. 1995. *Römpp Chemie Lexikon*. Version 1.0. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. New York
- Fischer, U. 1998. *Zum Gebrauch des Weinaroma-Rades*. Bund deutscher oenologen E.V. Begerow
- Fischer, U., D. Roth, M. Christmann. 1999. The impact of geographic origin, vintage and wine estate on sensory properties of *Vitis vinifera* cv. riesling wines. *Food Quality and Preference* **10**: 281-288
- Friedrich, G., D. Neumann, M. Vogl. 1986. *Physiologie der Obstgehölze*. Springer Verl. Berlin. New York
- Gayle, K.G., T. Chen, T. Philip. 1986. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science* **51**: 1093-1094
- Gebhardt, S., D. Haytowitz und S. Schakel. 1999. Carotenoid content of U.S. foods: An update of the database. *Journal of Food Composition and Analysis* **12**: 169-196
- Gerster, H. 1991. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **61**: 277
- Gilmore, A.M. und H.Y. Yamamoto. 1991. Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-encapped, lightly carbon-loaded C18 high-performance liquid chromatographic column. *Journal of Chromatography.* **543**: 137-145

- Goodwin, T.W. (Ed.). 1976. Chemistry and biochemistry of plant pigment. Academic Press. New York
- Goodwin, T.W. 1986. Metabolism, nutrition and function of carotenoids. Annual Review Nutrition **6**: 273-297
- Gregory, G.K., T.S. Chen, T. Philip. 1986. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by HPLC. Journal of Food Science **51**: 1093-1094.
- Gross, J. 1987. Pigments in fruits, Food Science and Technology. 87-186. Academic Press. London
- Gueguen, Y., P. Chemardin, G. Janbon, A. Arnaud, P. Gaizy. 1996. A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. J. Agric. Food Chem. **44**: 2336-2340.
- Güldner, A., P. Winterhalter. 1991. Structures of two new ionone glycosides from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.). J. Agric. Food Chem. **39**: 2142-2146
- Gunata, Y.Z., C.L. Bayonove, R.L. Baumes, R.E. Cordonnier. 1985a. The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat during first development and maturation. J. Sci. Food Agric. **36**: 857-862
- Gunata, Y.Z., C.L. Bayonove, R.L. Baumes, R.E. Cordonnier. 1985b. The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. Journal of Chromatography **331**: 83-90
- Gunata, Z., S. Bitteur, J.M. Brillouet, C.L. Bayonove, R. Cordonnier. 1988. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. Carbohydrate Research **184**: 139-149
- Gunata, Y.Z., C. Biron, J.C. Sapis, C.L. Bayonove. 1989. Glycosidase activities in sound and rotten grapes in relation to hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides. Vitis **28**: 191-197
- Gunata, Y.Z., C.L. Bayonove, C. Tapiero, R.E. Cordonnier. 1990a. Hydrolysis of Grape Monoterpenyl β -D-Glucosides by Various β -Glucosidases. J. Agric. Food Chem. **38**: 1232-1336
- Heß, D. 1988. Pflanzenphysiologie, 8 Aufl. Uni-Taschenbücher 15, Eugen Ulmer Verlag. Stuttgart
- Ho, Ch.T, L.Y. Sheen, P. Wu, M-Ch Kuo, T.G. Hartman, R.T. Rosen. 1990. Glycosidically bound aroma compounds in pineapple and peach. Science and Technology: 77-80. John Wiley and Sons. New York
- Hohler, S. Nitz, F. Drawert. 1988. Über die Bildung und die sensorischen Eigenschaften flüchtiger Nor-Carotinoide. I. Photooxidation von β -Carotin in N,N-Dimethylformamid. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. **11**: 115-126
- Hsieh Y-P. C., M. Karel. 1983. Rapid extraction and determination of α - and β -carotenes in foods. Journal of Chromatography **259**: 515-518.
- Humpf, H.U., P. Winterhalter, P. Schreier. 1991. 3,4-Dihydroxy-7,8-dihydro- β -ionone β -D-Glucopyranoside: Natural precursor of riesling acetal and 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene in red currant (*Ribes rubrum* L.) leaves. J. Agric. Food Chem. **39**: 1833-1835
- Ibanez, E., S. Lopez-Sebastian, J. Tabera, G. Reglero. 1998. Separation of carotenoids by subcritical fluid chromatography with coated, packed capillary columns and neat carbon dioxide. Journal of Chromatography A **823**: 313-319
- Isler, O. (Ed.). 1971. Carotenoids. Birkhäuser Verlag. Stuttgart
- Isoe, S., S.B. Hyeon, T. Sakan. 1969. Photo-oxygenation of carotenoids: I. The formation of Dihydroactinidiolide and β -ionone from carotene. Tetrahedron Letters **4**: 279-281
- Isoe, S., S.B. Hyeon, S. Katsumura und T. Sakan. 1972. Photo-oxygenation of carotenoids.; II. The absolute configuration of loliolide and dihydroactinidiolide. Tetrahedron Letters **25**: 2517-2520
- Janbon, G., J. Derancourt, P. Chemardin, A. Arnaud, P. Galzy. 1995. A very stable β -glucosidase from a *Candida molischiana* mutant strain: Enzymatic. properties, sequencing and homology with other yeast β -glucosidases. Biosci. Biotech. Biochem. **59**: 1320-1322
- Jennings, W.G. 1980. Gas Chromatography with glass capillary columns. Academic Press. New York
- Kanasawud, P., J.C. Crouzet. 1990a. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. β -Carotene degradation. J. Agric. Food Chem. **38**: 237-243

- Kanasawud, P., J.C. Crouzet. 1990b. Mechanism of Formation of Volatile Compounds by Thermal Degradation of Carotenoids in Aqueous Medium. 2. Lycopene degradation. *J. Agric. Food Chem.* **38**: 1238-1242
- Kemp, T.R., L.P. Stoltz, L.V. Packett. 1971. Rosaceae: Aromatic hydrocarbon: Examination of peach fruit And foliage volatiles. *Phytochemistry* **10**: 478 -479
- Khachik, F., G.R. Beecher, N.F. Whittaker. 1986. Separation, identification und quantification of the major carotenoids and chlorophyll constituents in extract of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 603-616
- Kindl, H., 1991. *Biochemie der Pflanzen*. 3. Auflage. Springer-Verlag. Berlin.
- Klaüi, H., J.C. Bauernfeind. 1981. Carotenoids as food color. In: Bauernfeind, J.C. (Ed.). *Carotenoids as colorants and vitamin-A precursors*. Academic Press. New York
- Köhler, H.J., N. Christoph, M. Geßner, C. Bauer-Christoph. 1995. Die „Untypische Alterungsnote im Wein“. Teil III: Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der „Untypischen Alterungsnote“ und dem Reifestadium der Trauben (Lesetermin). *Rebe und Wein* **12**: 424-430
- Kotseridis, Y., R. Baumes, M. Bertrand, G.K. Skouroumounis. 1999. Quantitative determination of β -ionone in red wines and grapes of bordeaux using a stable isotope dilution assay. *Journal of Chromatography A* **848**: 317-325
- Kozuki, Y., Y. Miura, K.Yagasaki. 2000. Inhibitory effects of carotenoids on the invasion of rat ascites hepatoma cells in culture. *Cancer Letters* **151**: 111-115
- Krinsky, N.I. 1979. Carotenoid protection against oxidation. *Pure & Appl. Chem.* **51**: 649-660
- Lambert, W.E., H.J. Nelis, M.G.M. De Ruyter, A.P. De Leenheer. 1985. Vitamin-A: Retinol, carotenoids and related compounds. In: De Leenheer, A.P., W.E Lambert, M.G.M. De Ruyter (Eds.). *Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*. Chromatographic Science Series **30**, Dekker. New York
- LaRoe, L.G., P.A. Shipley. 1970. Whiskey composition: Formation of alpha- and beta-ionone by the thermal decomposition of beta-carotene. *J. Agric. Food Chem.* **18**: 174-175
- Leclerc, M., P. Chemardin, A. Arnaud, R. Ratomahenina, P. Galzy, C. Gerbaud, A. Raynal. 1986. Biosynthesis regulation of the β -glucosidase produced by a yeast strain transformed by genetic engineering. *Archives of Microbiology* **146**: 115-117
- Liebich, H.M., W.A. Koenig, E. Bayer. 1970. Analysis of the flavor of rum by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **8**: 527-533
- MacKenzie C.R., G.B. Patel. 1986. Cellodextrin utilization and β -glucosidase production by *Bacteroides polypragmatus*. *Archives of Microbiology* **145**: 91-96
- Mader, I. 1964. Beta-Carotene: Thermal degradation. *Science* **144**: 533-534
- Manitto, P. 1981. *Biosynthesis of natural products*. Ellis Horwood Ltd Publisher. Chichester. England
- Marais, J. 1979. *Vitis* **18**: 254-260
- Marais, J. 1983. Terpenes in the aroma of grapes and wines: *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **4**: 49-58
- Marais, J. 1986. A Reproducible capillary gas chromatographic technique for the determination of specific terpenes in grape juice and wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **7**: 21-26
- Marais, J. 1992. 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN): A possible degradation product of lutein and beta-carotene. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **13**: 52-55
- Marais, J., H.J. Pool. 1980. Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis* **19**: 151-164
- Marais, J., C.J. van Wyk, A. Rapp. 1990. Carotenoids in grapes: In Charalambous G. (Ed.), *Proc 6th. Int. Flavor Conf.* 5-7 July 1989, Rethymnon, Crete, Greece: 71-85
- Marais, J., C.J. van Wyk, A. Rapp. 1991. Carotenoid levels in maturing grapes as affected by climatic regions, sunlight and shade. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **12**: 64-69
- Marais, J., C.J. van Wyk, A. Rapp. 1992a. 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.* **13**: 23-32

- Marais, J., C.J. van Wyk, A. Rapp. 1992b. 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. **13**: 33-44
- Marais, J., G. Versini, C.J. van Wyk, A. Rapp. 1992c. Effect of region on free and bound monoterpene and C13 norisoprenoid concentrations in weisser riesling wines. S. Afr. J. Enol. Vitic. **3**:71-77
- Mateo, J.J., R. Di Stefano. 1997. Food microbiology **14**: 583-591
- Mateo, J.J., M. Jiménez. 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. Journal of Chromatography A **881**: 557-567
- Matheis, G. 1989. Die Anwendung von Enzymen in der Aromenindustrie. Dragoco Bericht **4**
- McFadden, W.H., R. Teranishi, J. Corse, D.R. Black, T.R. Mon. 1965. Volatiles from strawberries. II: Combined mass spectrometry and gas chromatography on complex mixtures. Journal of Chromatography **18**: 10-19
- Minguez-Mosquera, M.I., B.Gandul-Rojas, M.L.Gallardo-Guerrero. 1992. J. Agric. Food Chem.**40**: 60-63
- Mouilly, P.P., E.M. Gaydou und J. Corsetti. 1999. Determination of the geographical origin of valencia orange juice using carotenoid liquid chromatographic profiles. Journal of Chromatography A, **844**: 149-159
- Murkovic, M., K. Gains, S. Draxi, W. Pfannhauser. 2000. Development of an Austrian carotenoid database (Original Research). Journal of Food Composition and Analysis **13**: 435-440
- Murray, K.E., J. Shipton, F.B. Whitfield. 1972. The Chemistry of food flavour. I. Volatile constituents of Passionfruit, *Passiflora edulis*. Austr. J. Chem. **25**: 1921-1933
- Nykänen, L., H. Soumalainen. 1983. Aroma of beer, wine and distilled beverages. Akademie Verl. Berlin
- Ohloff, G. 1972. Classification and genesis of food flavours. The Flavour Industry **3**: 501-508
- Ohloff, G. 1978a. Importance of minor components in flavors and fragrances. Perfumer Flavorist **3**:11-22
- Ohloff, G. 1978b. Recent developments in the field of naturally-occurring aroma components. In: Herz, W., H. Grisebach, G.W. Kirby (Eds.). Progress in the chemistry of organic natural products **35**: 431-527. Springer Verl. New York
- Oliver, J.A. Palou, A. Pons. 1998. Semi-quantification of carotenoids by high-performance liquid chromatography: saponification-induced losses in fatty foods. Journal of Chromatography A **829**: 393-399
- Oliver, J., A. Palou. 2000. Chromatographic determination of carotenoids in foods. Journal of Chromatography A **881**: 543-555
- Osorio, C., C. Duque, Y. Fujimoto. 1999. C13-norisoprenoid glucoconjugates from lulo (*Solanum quitoense* L.) leaves. J. Agric. Food Chem. **47**: 1641-1645
- Periadnadi, N. 1996, Die Löslichkeit und Stabilität der Farbstoffe in frischem und getrocknetem pflanzlichen Materialien in verschiedenen Extraktionsmitteln (unveröffentlicht).
- Periadnadi, N. 1997. Extraktion und Saponifikation bei der Carotinoidbestimmung in Traubenbeeren mittels HPLC (unveröffentlicht).
- Periadnadi, N. 1998. Versuche zur Bestimmung der Wellenlänge-Maxima von Carotinoiden und Chlorophyllen mittels Diode Array Detektion (unveröffentlicht).
- Periadnadi, N. 1999. HPLC-Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle in den Mosten und Weinen mittels Diode Array Detektion (unveröffentlicht).
- Pesek, C.A., J.J. Warthesen. 1987. Photodegradation of carotenoids in a vegetable juice system. Journal of Food Science **52**: 744-746
- Pesek C.A., J.J. Warthesen. 1988. Characterization of the photodegradation of β -carotene in aqueous model systems. Journal of Food Science **53**: 1517-1520
- Philip, T. 1975. Carotenoid esters in plant products. Symposium: Utilization of plant pigments. Food Technology: 50-54

- Philip, T., T.S. Chen. 1988. Separation and quantitative analysis of some carotenoid fatty acid esters of fruits by liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **435**: 113-126
- Pippen, E.L., E.P. Mecchi, M. Nonaka. 1969. Origin and nature of aroma in fat of cooked poultry. *Journal of Food Science* **34**: 436-442
- Rapp, A., H. Hastrich, L. Engel. 1976. Gaschromatographische Untersuchungen über die Aromastoffe von Weinbeeren. 1. Anreicherung und kapillarchromatographische Auftrennung vor. *Vitis* **15**: 29-36
- Rapp, A., H. Hastrich, L. Engel, W. Knipser. 1978. Possibilities of characterizing wine quality and vine varieties by means of capillary chromatography. In: Charalambous G. (Ed.) *Flavor of foods and beverages, chemistry and technology*: 391-417. Academic Press. New York
- Rapp, A. 1981. Analysis of grapes, wines and brandies. In Jennings W.G.(Ed.). *Application of Glass Capillary Gas Chromatography*. Marcel Dekker. New York
- Rapp, A., M. Guntert, H. Ullemeyer. 1985. Über Veränderungen der Aromastoffe während der Flaschenlagerung von Weißweinen der Rebsorte Riesling. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **180**: 109-116
- Rapp, A., M. Guntert. 1986. Changes in aroma substances during the storage of white wines in bottles. In Charalambous G. (Ed.), *The shelf life of foods and beverages, Proceedings of the 4th Flavour Conference, Rhodes, Greece 23-26 July 1985*. Elsevier Science Publ. Amsterdam
- Rapp, A. 1989. Aromastoffe, Zusammensetzung und Beurteilung der Weine. In: Würdig und Woller (Eds.). *Chemie des Weines: Handbuch der Lebensmitteltechnologie*. Ulmer. Stuttgart
- Razungles, A., C.L. Bayonove, R.E. Cordonnier, R.L. Baumes. 1987. Etude des caroténoïdes du raisin à maturité. *Vitis* **25**: 183-191
- Razungles, A., C.L. Bayonove, R.E. Cordonnier, J.C, Sapis. 1988. Grape carotenoids: Changes during the maturation period and localization in mature berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**: 44-48
- Ribereau-Gayon, P. 1978. Wine flavor. In: Charalambous G. (Ed.). *Flavor of foods and beverages, chemistry and technology*: 355-380. Academic Press. New York
- Roscher, R., P. Winterhalter. 1993. Application of multilayer coil countercurrent chromatography for the study of *Vitis vinifera* Cv. riesling leaf glycosidest. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 1452-1457
- Sander, L.C., K.E. Sharpless, M. Purse. 2000. Review: C30 Stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **880**: 189-202
- Sanderson, G.W., H. Co, J.G. Gonzalez. 1971. Biochemistry of Tea Fermentation: The Role of carotenes in black tea aroma fermentation. *Journal of Food Science* **36**: 231-236
- Sandhu, D.K., D. Mondal, M.S. Sidhu. 1984. Utilization of cellobiose and production of β -glucosidase by nine yeast species. *Acta Biotechnol.* **4**: 163-170
- Schmitz H.H., S.J. Schwartz, G.L. Catignani. 1994. Resolution and Quantitation of the Predominant Geometric β -carotene isomers present in human serum using normal phase-HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **42**: 2746-2750
- Schreier, P., F. Drawert. 1974. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe des Weines. 1. Unpolare Verbindungen des Weinaromas. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **154**: 273-278
- Schreier, P., F. Drawert, A. Junker. 1976. Identification of volatile constituents from grapes. *J. Agric. Food Chem.* **24**: 331-336
- Schreier, P., F. Drawert, S. Bhiwapurkar. 1979. Volatile compounds formed by thermal degradation of β -carotene. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **6**: 90-91
- Schunk, 1999. *Heilkraft aus Heilpflanzen*. Kaulfuss Verlag, Abtswiend
- Schwartz, S.J., J. H. von Elbe. 1982. *Journal Liquid Chromatography* **5**: 1-43
- Schwartz S.J., M. Patroni-Killam. 1985. Detection of *cis-trans* carotene isomers by two-dimensional thin. layer and high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **33**: 1160-1163

- Sefton, M.A., G.K. Skouroumounis, Ralph A. Massy-Wesfrop, P.J. Williams. 1989. Norisoprenoids in *Vitis vinifera* white wine grapes and the identification of a precursor of damascenone in these fruits. *Austr. J. Chem.* **42**: 2071-2084
- Sefton, M.A., I.L. Francis, P.J. Williams. 1993. The volatile composition of chardonnay juices: A study by flavor precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**: 359-370
- Simpson, R.F., C.R., Strauss, P.J. Williams. 1977. Vitispirane: a C13 spiro ether in the aroma volatiles of grape juice, wines and distilled grape spirits. *Chemistry and Industry*: 663-664
- Simpson, R.F. 1978. Aroma and compositional changes in wine with oxidation, storage and ageing. *Vitis* **17**: 274-287
- Simpson, R.F. 1979. Aroma composition of bottle aged white wine. *Vitis* **18**: 148-154
- Simpson, R.F. G.C. Miller, 1983. Aroma composition of aged riesling wine. *Vitis* **22**: 51-63
- Simpson, R.F. G.C. Miller, 1984. Aroma composition of chardonnay wine. *Vitis* **23**:143-158
- Sponholz, W.R. 1992. Die β -Glucosidaseaktivität von Hefen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* und ihr Einfluß auf das Aroma und die Farbe von Wein. Symp. Lallemand "Sensory Contribution of Yeasts to Wine". Weissenkirchen/Wachau (Austria) May 21-24
- Sponholz, W.R., T. Hühn. 1995. Einfluss von Mikroorganismen das Alterungsverhalten von Wein. 100 Jahre Hefereinzucht in Geisenheim. Eigenverlag Forschungsanstalt Geisenheim. Fg. Mikrobiologie und Biochemie : 23-26
- Sponholz, W.R., T. Hühn, A. Engelmann, A. Siben. 1997. Mögliche Einflüsse weinbaulicher Parameter auf die Ausbildung des „Untypischen Alterungstons“ bei Rieslingweinen. *Viticultural and Enological Sciences/Die Weinwissenschaft* **52**: 41-50
- Sponholz, W.R., T. Hühn. 1997. Einflußfaktoren von Klonmaterial und verwendetem Hefestamm auf die Alterung von Riesling Weinen. *Viticultural and Enological Sciences/Die Weinwissenschaft* **52**: 103-108
- Stahl-Biskup, E., F. Intert, J. Holthuijzen, M. Stengele und G. Schulz. 1993. Glycosidically bound volatiles-A Review 1986-1991. *Flavour and Fragrance Journal* **6**: 61-80
- Stevens, K.L., J.L. Bomben, W.H. Mc Fadden. 1967. Volatiles from Grape. *Vitis vinifera* (Linn.) cultivar grenache. *J. Agric. Food Chem.* **15**: 378- 380
- Stevens, K.L., R. Lundin, D.L. Davis. 1975. Acid catalyzed rearrangement of β -Ionone-epoxide. *Tetrahedron* **31**: 2749-2753
- Stellmach, B., W. Gottschick, F. Battermann, K. Zabel. 1988. β -D-Glucoside glucohydrolase: In Bestimmungsmethoden Enzym. Steinkopff Verlag. Darmstadt
- Stoltz, L.P., T.R. Kemp, W.O. Smith Jr., W.T. Smith Jr., C.E. Chaplin. 1970. Short Communication: 1,2-Dihydro-1,1,6-trimethylnaphtalene from strawberry oil. *Phytochemistry* **9**: 1157-1158
- Strauss, C.R., E. Dimitriadis, B. Wilson, P.J. Williams. 1986. Studies on the hydrolysis of two megastigma-3,6,9-triols rationalizing the origins of some volatile C13 norisoprenoids of *Vitis vinifera* Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 145-149
- Strauss, C.R., B. Wilson, R. Anderson, P.J. Williams. 1987a. Development of precursors of C13 nor-isoprenoid flavorants in riesling grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**: No.1
- Strauss, C.R., P.R. Gooley, B. Wilson, P.J. Williams. 1987b. Application of droplet countercurrent chromatography to the analysis of conjugated forms of terpenoids, phenols and other constituents of grape juice. *J. Agric. Food Chem.* **35**: 519-524
- Strauss, C.R., B. Wilson, P.J. Williams. 1988. Novel monoterpene diols and diol glycosides in *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.* **36**: 569-573
- Täufel, Ternes, Tunger, Zobel. 1993. Lebensmittel-Lexikon. Behr's Verlag. Hamburg
- Tominaga, T., C.P. des Gachons, D. Dubourdieu. 1998. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc: S-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 5215-5219
- Unger, K.K. 1989. Handbuch der HPLC. Teil 1-Leitfaden für Anfänger und Praktiker. GITVerl. Darmstadt

- Versini, G., A. Rapp, P., J. Marais, E. Mattivi, M. Spraul. 1996. A new 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) precursor isolated from riesling grape products: Partial structure elucidation and possible reaction mechanism. *Vitis* **35**: 15-21
- Waldmann, D., F. Winterhalter. 1992. Identification of a novel vitispirane precursor in riesling wine. *Vitis* **31**: 169-174
- Wenzel, K. 1989. Die Selektion einer Hefemutante zur Verminderung der Farbstoffverluste während der Rotweingärung. *Vitis* **28**: 112-120
- Williams, P.J., C.R. Strauss, B. Wilson, R.A. Massy-Westropp. 1982a. Use of C18 reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycoside and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines. *Journal of Chromatography* **235**: 471-480
- Williams, P.J., C.R. Strauss, B. Wilson, R.A. Massy-Westropp. 1982b. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis Vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* **21**: 2013-2020
- Williams, P.J., C.R. Strauss, B. Wilson, R.A. Massy-Westropp. 1982c. Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene β -D-Glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J. Agric. Food Chem.* **30**: 1219-1223
- Williams, P.J., M.A. Sefton, I.L. Francis. 1992. Glycosidic precursor of varietal grape and wine flavor. In: Teranishi, R., G. Takeoka, M. Güntert (Eds.). Thermal and enzymatic conversions of precursor to flavor compounds ACS Symposium Series **490**: 74-86
- Wilson, B., C.R. Strauss, P.J. Williams. 1984. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing Muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.* **32**: 919-924
- Winterhalter, P., P. Schreier. 1986. Free and bound C13-norisoprenoids in quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Fruit. *J. Agric. Food Chem.* **36**: 1251-1256
- Winterhalter, P. 1990. Bound terpenoids in the juice of the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *J. Agric. Food Chem.* **38**: 452-455
- Winterhalter, P., M.A. Sefton, P.J. Williams. 1990a. Two-dimensional GC-DCCC analysis of the glycoconjugates of monoterpenes, norisoprenoids and shikimate-derived metabolites from riesling wine. *J. Agric. Food Chem.* **38**: 1041-1048
- Winterhalter, P., M.A. Sefton, P.J. Williams. 1990b. Volatile C13 norisoprenoid compounds in riesling wine are generated from multiple precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**: 277-283
- Winterhalter, P. 1991. 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) Formation in wine. I. 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.* **39**: 1825-1829
- Winterhalter, P. 1993. The generation of C13 norisoprenoid volatiles in riesling wine. In: connaissance aromatiques des cepages et qualite des Vins, ACS Symp. International Montpellier. In: Cruzet J., C. Flanzy, J.C. Martin, J.C. Sapis (Eds.). Revue Francaise d'oenologie, Lattes, France: 65-73
- Woodward, J., A. Wiseman. 1982. Fungal and other β -D-glucosidases their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.* **4**: 73-79
- Wu, Z., D.S. Robinson, R.K. Hughes, R. Casey, D. Hardy, S.L. West. 1999. Co-oxidation of β -carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenases. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4899-4906
- Yamamoto, H.Y. 1979. *Pure & Appl. Chem.* **51**: 639-648, Pergamon Press Ltd, Great Britain
- Yamanishi, T. 1981. Tea, coffee, cocoa and other beverages. In: Teranishi, R., R.A. Flath, H. Sugisawa (Eds.). Flavor Research, Recent Advances. 231-267. Marcel Dekker. New York
- Zakaria, M., K. Simpson. 1979. Use of RP-HPLC analysis for the determination of provitamin-A carotenes in tomatoes. *Journal of Chromatography* **176**: 109-117
- Zoecklein, B.W., J.E. Marcy, Y. Jasinski. 1997. Effect of fermentation, storage sure lie or post-fermentation thermal processing on white riesling (*Vitis vinifera* L.) glycoconjugates. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**: 397-402
- Zonta, F., B. Stancher, G.P. Marletta. 1987. Simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of free carotinoids and carotinoid esters. *Journal of Chromatography* **19**: 207-215

AnhangTabelle 1: Farbstoffgehalte von Mosten nach verschiedenen Behandlungen ($\mu\text{g/l}$)

Nr.	Versuche	Zea-xanthin	Lutein	Chloro-phyll-b	Chloro-phyll-a	β -Ca-rotin
A	Trüber Most als Kontrolle	0,89	11,86	18,30	10,53	31,23
B	Klarer Most (nach 24 Std. stehen lassen)	0,10	3,85	4,35	2,62	2,92
C	Klarer Most, Erhitzung 100°C, 30 Minuten	0,38	4,27	n.n.	0,89	12,84
D	Klarer Most, Erwärmung 80°C, 15 Minuten	0,30	3,87	n.n.	0,75	10,12
E	Schönung mit Polyclar 40g/hl, nach 24 Stunden, obere Schicht	0,13	2,81	4,38	2,50	3,48
F	Schönung mit Polyclar 15 g/hl, nach 24 Stunden, obere Schicht	0,34	3,14	5,42	3,37	3,60
G	Klärung durch Zentrifuge, 4000 rpm, 15 Minuten	0,05	1,55	1,51	0,92	1,57

Tabelle 2: Prozentualer Farbstoffverlust von Mosten nach verschiedenen Behandlungen

Nr.	Versuche	Zea-xanthin	Lutein	Chloro-phyll-b	Chloro-phyll-a	β -Ca-rotin
B	Klarer Most (nach 24 Std. stehenlassen)	88	68	76	75	91
C	Klarer Most, Erhitzung 100°C, 30 Minuten	57	64	n.n	92	59
D	Klarer Most, Erwärmung 80°C, 15 Minuten	66	67	n.n	93	68
E	Schönung mit Polyclar 40 g/hl, nach 24 Stunden, obere Schicht	86	76	76	76	89
F	Schönung mit Polyclar 15 g/hl, nach 24 Stunden, obere Schicht	62	74	70	68	89
G	Klärung durch Zentrifuge, 4000 rpm, 15 Minuten	95	87	92	91	95

Tabelle 3: Farbstoffgehalte von klarem Rieslingmost (Klonengemisch 239 Gm., Jahrgang 1998) ($\mu\text{g/l}$)

Nr.	Kontrollmost	Zeaxanthin	Lutein	β -Carotin
1	Riesling Klon Ø 239	0,17	1,70	8,05

Tabelle 4: Prozentuale Farbstoffveränderungen von klarem Rieslingmost (Klonengemisch 239 Gm., Jahrgang 1998) während der Gärung

Nr.	Hefen	Zeaxanthin	Lutein	β -Carotin
1	Uvaferm L 2056	100	81	78
2	Lalvin Assmanhausen	100	66	49
3	Filtra Aroma	64	62	58
4	Spontangärung	100	84	90
5	Siha Aktiv 7	100	66	62
6	Lalvin EC 1118	93	76	73
7	Lalvin VL-1	100	85	84
8	Oenoferm Kl. Neuburg	30	67	64
9	CEG	62	66	46
10	Siha Aktiv 3	91	69	50

Tabelle 5: Farbstoffgehalte von trüben Rieslingmost ($\mu\text{g/l}$)

Nr.	Kontrollmost	Zeaxanthin	Lutein	β -Carotin
1	Rieslingmost	4,73	49,36	162,19

Tabelle 6: Prozentualer Farbstoffveränderung von trüben Rieslingmost während der Gärung.

Nr.	Hefen	Zeaxanthin	Lutein	β -Carotin
1	Uvaferm L 2056	52	35	28
2	Lalvin Assmanhausen	10	21	5
3	Filtra Aroma	41	42	30
4	Spontangärung	49	8	21
5	Siha Aktiv 7	11	13	5
6	Lalvin EC 1118	41	29	33
7	Lalvin VL-1	30	72	24
8	Oenoferm Kl. Neuburg	44	29	35
9	CEG	59	75	20
10	Siha Aktiv 3	62	28	42

Tabelle 7: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein in den Beeren des Jahrganges 1997

Nr.	Traubensorte bzw. Klone	Lutein ($\mu\text{g/l}$)	β -Carotin ($\mu\text{g/l}$)	Verhältnis
Rieslingklone				
1	Riesling Kl. 24 - 196	11,10	26,91	2,4
2	Riesling Kl. 64 - 177	9,99	17,06	1,7
3	Riesling Kl. 94 - 02	10,17	26,18	2,6
4	Riesling Kl. 110 - 06	10,31	25,48	2,5
5	Riesling Kl. 110 - 18	12,62	26,71	2,1
6	Riesling Kl. 110 - 30	11,27	28,11	2,5
7	Riesling Kl. 198 - 16	11,39	24,16	2,1
8	Riesling Kl. 198 -25	12,01	26,15	2,2
9	Riesling Kl. 239 - 20	11,67	23,04	2,0
10	Riesling Kl. 239 - 25	11,59	19,37	1,7
Andere weiße Sorte				
1	Weißburgunder	6,67	18,54	2,8
2	Chardonnay	8,63	24,45	2,8
3	Silvaner	9,03	21,48	2,4
4	Ruländer	12,25	33,14	2,7

Tabelle 8: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein in den Mosten des Jahrganges 1997

Nr.	Traubensorte bzw. Klone	Lutein ($\mu\text{g/l}$)	β -Carotin ($\mu\text{g/l}$)	Verhältnis
Rieslingklone				
1	Riesling Kl. 24 - 196	21,99	19,86	0,9
2	Riesling Kl. 64 - 177	9,71	15,92	1,6
3	Riesling Kl. 94 - 02	13,22	17,46	1,3
4	Riesling Kl. 110 - 06	39,37	28,23	0,7
5	Riesling Kl. 110 - 18	24,98	31,83	1,3
6	Riesling Kl. 110 - 30	26,52	27,01	1,0
7	Riesling Kl. 198 - 16	13,29	18,29	1,4
8	Riesling Kl. 198 -25	22,52	14,94	0,7
9	Riesling Kl. 239 - 20	11,39	10,81	0,9
10	Riesling Kl. 239 - 25	29,88	19,19	0,6
Andere weiße Sorte				
1	Weißburgunder	38,40	38,28	1,0
2	Chardonnay	45,26	88,37	2,0

Tabelle 9: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein in den Beeren des Jahrganges 1998

Nr.	Traubensorte bzw. Klone	Lutein ($\mu\text{g/l}$)	β -Carotin ($\mu\text{g/l}$)	Verhältnis
Rieslingklone				
1	Riesling Kl. 24 - 196	9,11	23,02	2,5
2	Riesling Kl. 64 - 177	8,37	25,50	3,0
3	Riesling Kl. 94 - 02	11,37	25,68	2,3
4	Riesling Kl. 110 - 06	10,08	28,77	2,9
5	Riesling Kl. 110 - 18	12,60	28,06	2,2
6	Riesling Kl. 110 - 30	9,65	26,48	2,7
7	Riesling Kl. 198 - 16	9,91	24,22	2,4
8	Riesling Kl. 198 -25	9,46	26,64	2,8
9	Riesling Kl. 239 - 20	9,45	26,01	2,8
10	Riesling Kl. 239 - 25	9,62	29,96	3,1
Andere weiße Sorte				
1	Weißburgunder	10,54	30,14	2,9
2	Chardonnay	9,31	34,23	3,7
3	Silvaner	8,98	29,70	3,3
4	Ruländer	10,04	35,18	3,5

Tabelle 10: Verhältnisse zwischen β -Carotin und Lutein in den Mosten des Jahrganges 1998

Nr.	Traubensorte bzw. Klone	Lutein ($\mu\text{g/l}$)	β -Carotin ($\mu\text{g/l}$)	Verhältnis
Rieslingklone				
1	Riesling Kl. 24 - 196	73,63	137,37	1,9
2	Riesling Kl. 64 - 177	87,08	163,59	1,9
3	Riesling Kl. 94 - 02	7,45	26,95	3,6
4	Riesling Kl. 110 - 06	107,00	216,25	2,0
5	Riesling Kl. 110 - 18	158,45	296,22	1,9
6	Riesling Kl. 110 - 30	42,28	74,90	1,8
7	Riesling Kl. 198 - 16	14,22	37,16	2,6
8	Riesling Kl. 239 - 20	44,15	172,97	2,3
9	Riesling Kl. 239 - 25	1,88	17,42	3,9
Andere weiße Sorte				
1	Weißburgunder	37,51	78,86	2,1
2	Chardonnay	1,876	17,422	9,3
3	Silvaner	80,61	117,28	1,5
4	Ruländer	3,784	9,992	2,6

Tabelle 11: TDN-Gehalt von verschiedenen Weinen aus einem Entblätterungsversuch (Versuchsweine aus Fachgebiet Weinbau, Forschungsanstalt Geisenheim)

Nr.	Versuchs	TDN ($\mu\text{g/l}$)
1	Kontrolle, Mit Netz direkt nach der Blüte	22,2
2	Riesling, früh, 28 Woche, einseitig, Entblättert	28,4
3	Riesling, früh, 28 Woche, zweiseitig, Entblättert	29,0
4	Riesling, mittel., 32. Woche, einseitig, Entblättert	40,7
5	Riesling, mittel, 32. Woche, zweiseitig, Entblättert	56,4
6	Riesling, spät, 34. Woche, einseitig, Entblättert	31,2
7	Riesling, spät, 34. Woche, zweiseitig, Entblättert	52,3
8	60 cm/begr./ A-Folex/ West= Nicht entblättert	3,2
9	60 cm/begr./ A-Folex/ Ost= Entblättert	16,9
10	60 cm/begr./ B-Ultraphan/West= Nicht entblättert	2,2
11	60 cm/begr./ B-Ultraphan/Ost= Entblättert	21,6
12	60 cm/begr./ Kontrolle/ West= Nicht entblättert	11,4
13	60 cm/begr./ Kontrolle/ Ost= Entblättert	21,2
14	240 cm/begr./ A-Folex/West= Nicht entblättert	7,0
15	240 cm/begr./ A-Folex/ Ost= Entblättert	23,2
16	240 cm/begr./ B-Ultraphan/West= Nicht entblättert	10,8
17	240 cm/begr./ B-Ultraphan/Ost= Entblättert	19,2
18	240 cm/begr./ Kontrolle/ West= Nicht entblättert	15,7
19	240 cm/begr./ Kontrolle/ Ost= Entblättert	22,7
20	60 cm/begr./ Kontrolle/ Ost= Entblättert	20,4
21	240 cm/begr./ A-Folex/West= Nicht entblättert	20,7
22	240 cm/begr./ A-Folex/ Ost= Entblättert	19,0
23	240 cm/begr./ B-Ultraphan/West= Nicht entblättert	11,7
24	240 cm/begr./ B-Ultraphan/Ost= Entblättert	26,9
25	240 cm/begr./ Kontrolle/ West= Nicht entblättert	10,9

Tabelle 12: Gesamtsäure (g/l) und pH-Werte von Weißmosten Jahrgang 1997 (Rebenzüchtung, Geisenheim)

Nr	Klonen und Sorten	Gesamtsäure	pH-Wert
1	Kl. 24 - 196	7,1	3,07
2	Kl. 64 - 177	10	2,99
3	Kl. 94 - 02	9,7	3,01
4	Kl. 110 - 06	8,8	3,14
5	Kl. 110 - 18	9,8	3,04
6	Kl. 110 - 30	9,2	3,07
7	Kl. 198 - 16	9,6	3,09
8	Kl. 239 - 20	9,9	3,00
9	Kl. 239 - 25	9,9	3,08
10	Chardonnay	10,5	3,16
11	Weißburgunder	8,2	3,26
12	Ruländer	8,1	3,35
13	Silvaner	8,1	3,33

Tabelle 13: Gesamtsäure (g/l) und pH-Werte von Weißmosten Jahrgang 1996 (Rebenzüchtung, Geisenheim)

Nr	Klonen und Sorten	Gesamtsäure	pH-Wert
1	Kl. 24 - 196	12,8	2,97
2	Kl. 64 - 177	13,4	2,96
3	Kl. 94 - 02	13,1	2,95
4	Kl. 110 - 06	13,5	3,00
5	Kl. 110 - 18	13,3	2,98
6	Kl. 110 - 30	13,2	3,02
7	Kl. 198 - 16	13,7	3,01
8	Kl. 198 - 25	13,4	2,99
9	Kl. 239 - 20	12,6	3,04
10	Kl. 239 - 25	13,6	2,94
11	Chardonnay	15,0	2,99
12	Weißburgunder	10,7	3,14
13	Ruländer	10,6	3,16
14	Silvaner	10,3	3,18

Lebenslauf

- Persönliche Daten : Nurmiati
Geboren am 26.11.1962 in Padang, Indonesien
- 1970 - 1975 : Adabiah Grundschule in Padang
- 1976 - 1979 : Sekolah Menengah Pertama Adabiah (Mittelschule)
in Padang
- 1979 - 1982 : Sekolah Menengah Atas Adabiah (Oberschule)
in Padang
- 1982 - 1987 : Studium Biologie an der Andalas-Universität Padang
- 1987 - : Diplom Biologie (Sarjana Biologi) in Fachrichtung
Mikrobiologie
- Seit 1990 : Dozentin an der Andalas-Universität Padang
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaft
- Seit 1994 : beschäftigt im Fachbereich Mikrobiologie und Biochemie
der Forschungsanstalt Geisenheim mit dem Ziel Promotion
- Seit 1994 : Doktorandin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main, Fachbereich Biologie

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mir bei der experimentellen Durchführung und der Fertigstellung meiner Dissertation geholfen haben :

Mein Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. M. Brendel, Institut für Mikrobiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, der die Durchführung des Promotionsverfahrens erst ermöglicht hat. Ich danke ihm insbesondere für die Betreuung und Begutachtung meiner vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W.-R. Sponholz, Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie der Forschungsanstalt Geisenheim, danke ich für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich für seine wertvollen Ratschläge, seine Unterstützung und das große Verständnis bei der Durchführung und Anfertigung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Großmann, Leiter des Fachgebietes Mikrobiologie und Biochemie der Forschungsanstalt Geisenheim, danke ich insbesondere für die verständliche Unterstützung und die Bereitstellung der Arbeitsräume und der Mittel zur Durchführung dieser Arbeit.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachgebietes Mikrobiologie und Biochemie der Forschungsanstalt Geisenheim, möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und die angenehme gemeinsame Arbeitszeit bedanken. Weiterer Dank gilt darüber hinaus dem Fachgebiet Rebenzüchtung und Rebenveredlung sowie dem Fachgebiet Weinbau für die Bereitstellung der Probematerialien.