

Masterarbeit
an der
HAW Hamburg – Studiengang Food Science



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

**Untersuchungen und Charakterisierung
ausgewählter β -Glucosidase-Varietäten
mit dem Ziel einer Weinaromaverbesserung**

Master-Thesis

zur Erlangung des akademischen Grades
„Master of Science (M.Sc.) in Food Science“



FACHHOCHSCHULE TRIER

Hochschule für Technik, Wirtschaft und Gestaltung
University of Applied Sciences

vorgelegt von:

Marvin J. Ferner

Matrikel-Nr.: 2032360



Fachgebiet: Lebensmittel-Analytik / Biochemie

Betreuer: Prof. Dr. Jan Fritsche
2. Prüfer: Prof. Dr. Heike Raddatz

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Marvin J. Ferner, dass ich diese Masterarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde noch an keiner anderen Hochschule vorgelegt.

Trier, den 23.08.2012

Marvin J. Ferner

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Heike Raddatz, die mir die Möglichkeit geboten hat, diese Abschlussarbeit an der FH Trier abzulegen und nicht zu Letzt möchte ich für ihre tolle Unterstützung danken!

Besonders möchte ich mich bei Oli Michel für eine angenehme Zusammenarbeit und die vielen hilfreiche Tipps und Anregungen bedanken.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Jan Fritsche für die überaus kompetente, zuverlässige und sehr menschliche Betreuung von Seiten HAW Hamburg.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern der FH Trier, FR Lebensmitteltechnik, insbesondere Alfons Berg, der bei Fragen immer ein offenes Ohr hat.

Und nicht zuletzt danke ich natürlich meiner Familie und Freunden.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
2 Aufgabenstellung	3
3 Stand des Wissens	4
3.1 Gesetzte	4
3.1.1 Wein	4
3.1.2 Einsatz von Enzymen	6
3.2 Wein	8
3.2.1 Herstellung	9
3.2.1.1 Gärung	9
3.2.1.2 Schwefeln	10
3.2.1.3 Abstich und Kellereibehandlung	11
3.2.2 Inhaltstoffe	12
3.2.2.1 Alkohol	13
3.2.2.1.1 Ethanol	13
3.2.2.1.2 Methanol	13
3.2.2.1.3 Höhere Alkohole	13
3.2.2.1.4 Mehrwertige Alkohole	14
3.2.2.2 Kohlenhydrate	14
3.2.2.2.1 Monosaccharide	14
3.2.2.2.2 Disaccharide	14
3.2.2.3 Säuren	14
3.2.2.4 Stickstoffverbindungen	15
3.2.2.5 Mineralstoffe	15
	III

3.2.3	Aromastoffe	16
3.2.3.1	glykosidisch gebundene Aromastoffe	17
3.2.3.2	terpenoide Verbindungen	18
3.2.3.3	C ₁₃ -Norisoprenoide	21
3.2.3.4	Methoxypyrazine	22
3.2.3.5	Schwefelhaltige organische Verbindungen	23
3.2.4	andere glykosidische Verbindungen im Wein	23
3.2.5	Hydrolyse der Glykoside	25
3.3	Enzyme	26
3.3.1	Herstellung von Enzympräparaten	28
3.3.2	Aroma-Enzympräparate	29
3.3.3	β-Glucosidasen	30
3.3.3.1	Klassifizierung	32
3.3.3.2	Herkunft	33
3.3.3.2.1	pflanzliche β-Glucosidasen	33
3.3.3.2.2	mikrobielle β-Glucosidasen	34
3.3.3.2.3	fungale β-Glucosidasen	35
3.3.3.3	Struktur	35
3.3.3.3.1	aktives Zentrum	36
3.3.3.4	Katalytischer Mechanismus	38
3.3.3.5	Einflussfaktoren auf den katalytischen Mechanismus	40
3.3.3.5.1	Substratspezifität	40
3.3.3.5.2	Kinetische Parameter für die Substrat-Hydrolyse	41
3.3.3.5.3	Inhibitoren und Cofaktoren	41
3.3.3.5.4	pH und Temperatur Optima und Stabilität	42
3.3.4	ausgewählte Enzympräparate	42
3.3.4.1	Lallzym β	43
3.3.4.2	AR 2000	44

3.3.4.3	Cellulase	44
3.3.4.4	β -Glucosidase	44
3.4	Analytik	45
3.4.1	UV/Vis-Spektrometrie Photometrie	45
3.4.2	Aktivitätsbestimmung der β -Glucosidase	46
3.4.2.1	Messgrößen und Einheiten	49
3.4.3	Isolation der flüchtigen Komponenten in Wein	49
3.4.3.1	SDE	50
3.4.4	Gaschromatographie	51
3.4.4.1	GC / MS	53
3.4.5	Aromen-Bestimmung mittels GC / MS	53
3.5	Fazit	54
4	Versuche und eigene Untersuchungen	56
4.1	Material und Methoden	56
4.1.1	Chemikalien/Reagenzien	56
4.1.2	Material/Geräte	57
4.1.2.1	Aktivitätsbestimmung	57
4.1.2.2	Rotationsverdampfer	57
4.1.2.3	SDE	57
4.1.2.4	GC/MS	57
4.1.2.5	Sonstiges	58
4.1.3	Methoden	58
4.1.3.1	Kontrolle molarer Extinktionskoeffizient von pNP	58
4.1.3.2	Enzym-Aktivitätsbestimmung	59
4.1.3.2.1	Aktivitätsbestimmung während der Gärung	61
4.1.3.2.2	Aktivitätsbestimmung im Wein	62
4.1.3.3	Gärversuche	62
4.1.3.4	Messung β -Glucosidase-Aktivität in Most & Wein	64

4.1.3.4.1	Wiederfindung in Most & Wein	64
4.1.3.5	Enzymzugabe zu Wein	66
4.1.3.6	Analyse-Daten von Most & Wein	66
4.1.3.6.1	D-Glucose / D-Fructose	66
4.1.3.6.2	Ethanol	67
4.1.3.7	Bestimmung des Aromaprofils	67
4.1.3.7.1	Simultane Destillation-Extraktion nach Likens-Nickerson	67
4.1.3.7.2	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)	69
4.2	Untersuchungen und Ergebnisse	70
4.2.1	photometrische Aktivitätsbestimmung mittels pNPG	70
4.2.1.1	Kontrolle molarer Extinktionskoeffizient von pNP	70
4.2.1.2	Aktivitätsbestimmung der ausgewählten Enzyme	71
4.2.1.2.1	Temperatur	71
4.2.1.2.2	pH-Wert	72
4.2.1.2.3	Ethanol-Gehalt	73
4.2.1.2.4	Glucose-Gehalt	73
4.2.1.2.5	Fructose-Gehalt	74
4.2.1.2.6	Kaliumdisulfit-Gehalt	75
4.2.1.2.7	Aktivität unter Wein-Parametern	76
4.2.1.3	Aktivitätsbestimmung während der Gärung	78
4.2.1.3.1	Wiederfindung von pNP in Most und Wein	78
4.2.2	Gärversuche	81
4.2.3	Analyse-Daten von Most & Wein	83
4.2.3.1	Analyse-Daten vom DLR Mosel	83
4.2.3.2	eigene Bestimmungen	84
4.2.3.2.1	Glucose/Fructose-Gehalt	84
4.2.3.2.2	Ethanol-Gehalt	85
4.2.3.2.3	pH-Werte	86

4.2.3.3	Aktivität über den Gärungsverlauf	86
4.2.3.3.1	gezügelte Gärung	86
4.2.3.3.2	ungezügelte Gärung	87
4.2.3.4	Aktivität während Enzymbehandlung von Wein	87
4.2.4	Bestimmung des Aromaprofils	88
4.2.4.1	gezügelte Gärung	88
4.2.4.2	ungezügelte Gärung	88
4.2.4.3	Wein	89
5	Diskussion	90
5.1	Enzymaktivität	90
5.1.1	Vergleich Methoden zur Enzymaktivitätsbestimmung	91
5.1.2	Enzymaktivität in Abhängigkeit der Temperatur	92
5.1.3	Enzymaktivität in Abhängigkeit des pH-Wert	93
5.1.4	Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt	95
5.1.5	Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt	96
5.1.6	Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt	97
5.1.7	Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt	98
5.1.8	Aktivität unter Weinparametern	101
5.1.9	Fazit nach Charakterisierung	103
5.2	Aktivität in Most und Wein	105
5.2.1	Parameter in Most und Wein	105
5.2.2	Aktivitätsverlauf während der Gärung	106
5.2.3	Aktivitätsverlauf über Weinbehandlung	107
5.3	Aromabestimmung mittels GC	108
6	Zusammenfassung	116
7	Summary	118
8	Literaturverzeichnis	119
9	Anhang	139

Abkürzungsverzeichnis

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

1,4-DBB	1,4-Dibrombenzol
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptionseinheit (Absorption Unit)
β G	β -Glucosidase
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
d	Tage
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
DH	Dehydrogenase
DLR	Dienstleistungszentrum ländlicher Raum
d. h.	das heißt
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
EC-Nr.	numerisches Klassifikationssystem für Enzyme (engl. Enzyme Commission numbers)
EG	Europäische Gemeinschaft
engl.	englisch
et al.	und andere (lat. et alia)
etc.	und so weiter (lat. et cetera)
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (engl. F ood and A griculture O rganization of the United Nations)
fr.	französisch
F-6-P	Fructose-6-Phosphat

G-6-P	Glucose-6-Phosphat
Gew.-%	Gewichtsprozent
GH	Glykosid Hydrolase
GRAS	Generally Recognized As Safe
HCA	Hydrophobic Cluster Analyses
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
HS	Headspace
I	einfallende Strahlung
I ₀	ausfallende Strahlung
i. d. R.	in der Regel
JECFA	Gemeinsame FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe (engl. J oint F AO/ W HO E xpert C ommittee on F ood A dditives)
Konz.	Konzentration
L	Länge
lat.	lateinisch
Lβ	Lallzym β
M	Molar
mg _E	mg _{Enzym}
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
mw	Massegewicht [in Da] (engl. mass weight)
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
n. a.	nicht angegeben
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
n. d.	nicht detektiert
NIST	National Institute of Standards and Technology
Nr.	Nummer
o. E.	ohne Enzym
Oe	Oechsle
OIV	Internationale Organisation für Rebe und Wein (fr. O rganisation Internationale de la V igne et du V in)
Opt	Optimum

pH	potentia Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration in wässriger Lösung
PDB ID	Protein Data Bank Identification
RGT	Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur
RM	Reaktionsmix
RT	Retentionszeit
S.	Seite
s.	siehe
sec	Sekunde
SDE	Festphasenextraktion, engl. Solid-Phase Extraction
SPME	Festphasenmikroextraktion, engl. Solid-Phase Microextraction
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
Verd.	Verdünnung
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche
Vol.-%	Volumenprozent
Wasser	entmineralisiertes Wasser
WF	Wiederfindung
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization)
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Wein-Herstellung	9
Abb. 2 Fingerprintmuster von Riesling	17
Abb. 3 Monosaccharid- und Disaccharid-Zuckerreste, die als Aroma-Präkursoren in Trauben identifiziert wurden	18
Abb. 4 Hydrolyse der Monoterpen-Glykoside	20
Abb. 5 die häufigsten freien und glykosidisch gebundenen Monoterpene	21
Abb. 6 sequentieller Mechanismus der Glucosidasen	25
Abb. 7 Struktur einer β -Glucosidase	37
Abb. 8 Bindungsreaktionen aktives Zentrum β -Glucosidase und pNPG	38
Abb. 9 Abstand zwischen den sauren und nucleophilen Resten	39
Abb. 10 Mechanismus von Retaining- und Inverting-Glucosidasen	40
Abb. 11 Spektrum von pNP	47
Abb. 12 <i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid	48
Abb. 13 Prinzip der SDE nach [<i>Likens & Nickerson (1964)</i>]	50
Abb. 14 eigenen Gärversuche	64
Abb. 15 eingesetzte SDE-Apparatur	68
Abb. 16 Steigungsgerade Bestimmung molarer Extinktionskoeffizient von pNP	90
Abb. 17 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit der Temperatur in Prozent	93
Abb. 18 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert in Prozent	94
Abb. 19 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt in Prozent	95
Abb. 20 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt in Prozent	96
Abb. 21 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt in Prozent	97
Abb. 22 Aktivität in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (pH 5,0) in U/mg	99
Abb. 23 Aktivität in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (pH 5,0) in Prozent	99
Abb. 24 Aktivität in Abhängigkeit des Kaliumdisulfit-Gehalt in U/mg (pH 3,2)	100
Abb. 25 Aktivität in Abhängigkeit des Kaliumdisulfit-Gehalt in Prozent (pH 3,2)	100
Abb. 26 Aktivität unter Wein-Parametern <i>trocken</i> in U/mg	101
Abb. 27 Aktivität unter Wein-Parametern <i>halbtrocken</i> in U/mg	102
Abb. 28 Aktivität unter Wein-Parametern <i>lieblich</i> in U/mg	102
Abb. 29 Aktivität unter Most-Parametern in U/mg	103
Abb. 30 Enzym-Aktivität über den Gärverlauf (gezügelt)	106
Abb. 31 Enzym-Aktivität über den Gärverlauf (ungezügelt)	107
Abb. 32 β -Glucosidase-Aktivität über die Weinbehandlung [U/mg]	108

Abb. 33 Chromatogramm Aromaprofil Gäransatz (gezügelt) mit AR 2000	109
Abb. 34 Chromatogramm Aromaprofil Gäransatz (ungezügelt) mit AR 2000	109
Abb. 35 Chromatogramm Aromaprofil Wein mit AR 2000	110
Abb. 36 Aromaprofil nach gezügelter Gärung	111
Abb. 37 Aromaprofil nach ungezügelter Gärung	112
Abb. 38 Aromaprofil Wein nach Enzym-Einsatz	113
Abb. 39 Ausschnitt Chromatogramm Abb. 35	115

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 zulässige Höchstwerte für Schwefeldioxid in Wein	5
Tab. 2 durchschnittliche Zusammensetzung von	13
Tab. 3 Strukturen, Geruchseigenschaften und Geruchsschwellenwerte	19
Tab. 4 Strukturen, Geruchseigenschaften und Geruchsschwellenwerte	22
Tab. 5 Strukturen, Geruchseigenschaften und Geruchsschwellenwerte	23
Tab. 6 Erhöhung der Terpen-Gehalte nach	30
Tab. 7 Chemikalien/Reagenzien	56
Tab. 8 verwendete Enzym- und Hefe-Präparate	57
Tab. 9 aufsummierte Zugabe an Stammlösung pNP	58
Tab. 10 Parameter-Veränderung bei der Aktivitätsbestimmung	60
Tab. 11 Einwaage/Konzentrationen der verwendeten Enzym-Präparate	61
Tab. 12 Parameter Modell-Most und -Wein	61
Tab. 13 Einwaage Enzympräparat	63
Tab. 14 Ablauf der Wiederfindung von pNP in Most	65
Tab. 15 Ablauf der Wiederfindung von pNP in Wein	65
Tab. 16 Einwaage Enzympräparat in Wein	66
Tab. 17 Bestimmung molarer Extinktionskoeffizient von pNP	70
Tab. 18 Kennwerte Bestimmung ϵ_{pNP}	71
Tab. 19 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit der Temperatur in U/mg	72
Tab. 20 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit der Temperatur in Prozent	72
Tab. 21 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert in U/mg	72
Tab. 22 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert in Prozent	72
Tab. 23 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt in U/mg	73
Tab. 24 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt in Prozent	73
Tab. 25 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt in U/mg	73
Tab. 26 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt in Prozent	74
Tab. 27 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt in U/mg	74
Tab. 28 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt in Prozent	74
Tab. 29 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit von Kaliumdisulfit (pH 3,2) in U/mg	75
Tab. 30 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit von Kaliumdisulfit (pH 3,2) in Prozent	75
Tab. 31 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit von Kaliumdisulfit (pH 5,0) in U/mg	76
Tab. 32 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit von Kaliumdisulfit (pH 5,0) in Prozent	76
Tab. 33 Aktivität über die Temperatur in einem Modell-Wein <i>trocken</i> in U/mg	77

Tab. 34 Aktivität über die Temperatur in Modell-Wein <i>halbtrocken</i> in U/mg	77
Tab. 35 Aktivität über die Temperatur in einem Modell-Wein <i>lieblich</i> in U/mg	77
Tab. 36 Aktivität über die Temperatur in einem Modell-Most in U/mg	77
Tab. 37 Vergleich Enzymaktivität vor und nach Membranfiltration	78
Tab. 38 Wiederfindung von pNP in Most	79
Tab. 39 Wiederfindung von pNP in Most	79
Tab. 40 Wiederfindung von pNP in Wein mit 0,9 ml & 2 ml Stopp-Reagenz	80
Tab. 41 Extinktionswerte Wiederfindung in Wein mit 0,9 ml Wein & 5 ml Stopp-Reagenz	80
Tab. 42 Wiederfindung von pNP in Most/Wein mit 0,9 ml Wein & 5 ml Stopp-Reagenz	80
Tab. 43 Extinktionswerte Wiederfindung in Wein	81
Tab. 44 Wiederfindung von pNP in Most/Wein	81
Tab. 45 Gärverlauf gezügelte Gärung	82
Tab. 46 Gärverlauf ungezügelte Gärung	83
Tab. 47 Analyse-Daten des verwendeten Most	84
Tab. 48 Analyse Daten des verwendeten Wein	84
Tab. 49 Gehalte an Glucose- und Fructose	85
Tab. 50 Ethanol-Gehalte	85
Tab. 51 pH-Werte der verschiedenen Proben	86
Tab. 52 β -Glucosidase-Aktivität über den Gärverlauf (gezügelt) [U/mg]	86
Tab. 53 β -Glucosidase-Aktivität über den Gärverlauf (ungezügelt) [U/mg]	87
Tab. 54 β -Glucosidase-Aktivität über die Weinbehandlung bei 25 °C [U/mg]	87
Tab. 55 Aromaprofil nach gezügelter Gärung	88
Tab. 56 Aromaprofil nach ungezügelter Gärung	88
Tab. 57 Aromaprofil Wein nach Enzym-Einsatz	89
Tab. 58 Vergleich Methode 4.1.3.2 und <i>Sigma-Aldrich</i> (1994)	92

1 Einleitung

Wein gehört bereits seit Jahrtausenden als Genussmittel zum Bestandteil vieler Kulturen und die chemische Zusammensetzung schwankt aufgrund der Beeinflussung durch Klima, Boden, Lage, Art und Behandlung von Trauben, Most und Wein innerhalb weiter Grenzen [Belitz *et al.* (2001), S. 905]. Außerdem ist die sensorische Wahrnehmung von Wein äußerst komplex und wird durch eine Vielzahl von geschmacks- und geruchsaktiven Verbindungen, wie Terpenen, Ester, Methoxypyrazine und Aldehyden, geprägt [Styger *et al.* (2011)]. Dabei kommt den terpenoiden Verbindungen beim Weinaroma eine zentrale Rolle zu. Diese können sowohl frei als auch glykosidisch gebunden in der Traube bzw. im Wein vorkommen, wobei die glykosidisch gebundenen häufiger als die freien Monoterpene vorkommen [Günata *et al.* (1985b); Mateo & Jiménez (2000)]. Dabei haben die glykosidisch gebundenen Monoterpene keinen direkten Einfluss auf das Aroma der Trauben bzw. Weine. Sie fungieren als Präkursoren einiger Aromen und können durch gezielte Freisetzung das sortentypische Aroma eines Weines verstärken [Rapp (1992)]. Die glykosidisch gebundenen Monoterpene werden daher als Aroma-Reservoir eines Weines bezeichnet.

Im Weinbau werden Enzyme u. a. zur Mostklärung, zur Farbstoff- und Saftextraktion aus der Weinbeerenhaut, zur Freisetzung von Mannoproteinen aus den Zellwänden von Hefezellen, zur Stabilisierung von Polyphenolen sowie zur Freisetzung von Aromen eingesetzt. I. d. R. handelt es sich um Enzyme mit hydrolytischer Aktivität wie Pektinylasen, Polygalacturonasen, Pektinesterasen, Cellulasen, Cinnamylesterasen oder β -Glucosidasen. Besonders pekteolytische Enzym-Präparate mit einer β -Glucosidase-Nebenaktivität, sogenannte „Aromaenzyme“ sind interessant und können helfen, das Rebsorten-typische Wein-Aroma auszubilden [Rapp (1992)]. β -Glucosidasen führen dabei zur Freisetzung aromaprägender Terpene [Hernández *et al.* (2003); Mendes Ferreira *et al.* (2001)]. Terpene gehören bei den Bukettrebsorten (Gewürztraminer, Muskateller, Riesling etc.) zu den prägenden Aromastoffen [Meinl *et al.* (2009)]. Insbesondere um die Aroma-Qualität von Wein bei einer sogenannten gezügelten Vergärung (Fermentation unter Kühlung) zu verbessern, werden vielfach Gemische dieser Enzyme verwendet, um glykosidisch gebundene Terpene

freizusetzen. Damit jedoch eine gewisse Aromabalance gehalten wird, d.h. nicht „zu viel“ Aroma freigesetzt wird, wird das Enzymgemisch nach einiger Zeit durch eine Bentonitschönung inaktiviert bzw. ausgefällt und geht verloren. Neben dem Verlust an aktivem Enzym ist hierbei nachteilig, dass bei jedem neuen Gärungsansatz neues Enzympräparat eingesetzt werden muss – was einen nicht unerheblichen Kostenfaktor für den Winzer darstellt – und dass auch eine Restenzymaktivität im Wein erhalten bleibt. Letzteres führt dazu, dass derart behandelte Weine sensorisch nach einem halben bis einem Jahr stark abbauen. Eine vollständige Rückgewinnung der Enzyme ist ebenfalls noch wichtig, um den gesetzlichen Anforderungen zu entsprechen, die die Anwesenheit von exogenen Proteinen in Wein verbietet [*Gallifuoco et al. (1999)*].

Im Rahmen des Projektes MAGNENZ sollen β -Glucosidasen und weitere glykosidhydrolytisch wirksame Enzyme über Au-Eisenoxidpartikel immobilisiert und ihre Wirksamkeit während der alkoholischen Gärung ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene Enzym-Präparate charakterisiert, um eine mögliche Verwendung im Wein abschätzen zu können. In einem weiteren Schritt wird die Wirksamkeit während der alkoholischen Gärung ermittelt sowie entsprechende Umsatzprodukte analytisch (z.B. mittels GC / MS) erfasst.

2 Aufgabenstellung

Diese Master-Thesis ist Teil des Projektes MAGNENZ und Ziel ist die Charakterisierung einiger ausgewählter Enzympräparate bezüglich ihrer β -Glucosidase-Aktivität.

Die Aufgabenstellung umfasst dabei eine umfangreiche Literaturrecherche über die β -Glucosidasen mit dem Schwerpunkt Einsatz im Wein. In einem weiteren Schritt sollen die Enzympräparate hinsichtlich eines möglichen Einsatzes in Wein entsprechend charakterisiert und ihre Enzym-Aktivität unter unterschiedlichen Bedingungen ermittelt werden. Dafür ist eine geeignete Methode zu entwickeln / finden.

Daneben soll ebenfalls mittels GC / MS eine mögliche Aroma-Freisetzung durch den Enzym-Einsatz während der Gärung und im Wein untersucht und abschließend über die mögliche Eignung der entsprechenden Enzympräparate im Wein entschieden werden.

3 Stand des Wissens

3.1 Gesetze

1970 wurde in der EU eine gemeinsame Marktordnung geschaffen, die entsprechenden Regelungen traten 1971 in Kraft. In den letzten Jahren wurde das europäische Weinrecht immer weiter harmonisiert. Mit der Verordnung (EG) Nr. 479/2008 wurde eine neue Marktorganisation durchgeführt und die bisherige Regelung Verordnung (EG) Nr. 1493/1999 damit abgelöst. Die Verordnung wurde durch mehrere sogenannte Durchführungsverordnungen ergänzt.

2009 wurde mit der Verordnung (EG) Nr. 491/2009 die Verordnung (EG) Nr. 479/2008 bereits wieder aufgehoben und die Bestimmungen in kleine Einheiten zerlegt und über zahlreiche Bestimmungen und Anhänge verteilt, die dann letztendlich in der Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 miteingegliedert wurden.

3.1.1 Wein

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

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

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

- **trocken**
- wenn der Zuckergehalt folgende Werte nicht überschreitet:
 - 4 g je Liter oder
 - 9 g je Liter, sofern der in g je Liter Weinsäure ausgedrückte

Gesamtsäuregehalt höchstens um 2 g je Liter niedriger ist als der Restzuckergehalt.

- **halbtrocken** - wenn der Zuckergehalt den vorgenannten Höchstwert überschreitet, folgende Werte aber nicht überschreitet:
 - 12 g je Liter oder
 - 18 g je Liter, sofern der in g je Liter Weinsäure ausgedrückte Gesamtsäuregehalt höchstens um 10 g je Liter niedriger ist als der Restzuckergehalt.

- **lieblich** - wenn der Zuckergehalt den vorgenannten Höchstwert überschreitet, aber nicht mehr als 45 g je Liter beträgt.

- **süß** - wenn der Zuckergehalt mindestens 45 g je Liter beträgt.

Tab. 1 zeigt die zulässigen Höchstwerte für Schwefeldioxid in Wein.

Tab. 1 zulässige Höchstwerte für Schwefeldioxid in Wein nach Verordnung (EG) Nr. 606/2009 Anhang I B

Art des Weines	EG-Höchstgrenze SO ₂ -Gehalt
Rotwein < 5 g/l Restzucker	150 mg/l (bis 31. Juli 2009: 160 mg/l)
Rotwein > 5 g/l Restzucker	200 mg/l (bis 31. Juli 2009: 210 mg/l)
Weißwein & Roséwein < 5 g/l Restzucker	200 mg/l (bis 31. Juli 2009: 210 mg/l)
Weißwein & Roséwein > 5 g/l Restzucker	250 mg/l (bis 31. Juli 2009: 260 mg/l)
Spätlese und vergleichbare ausländische Weine	300 mg/l
Auslese und vergleichbare ausländische Weine	350 mg/l
Beerenauslese und Trockenbeerenauslese, Eiswein und vergleichbare ausländische Weine	400 mg/l

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

3.1.2 Einsatz von Enzymen

Nach Verordnung (EG) Nr. 1493/99 (Anh. IV, Nr. 1j) sind pektolytische Enzyme, pektolytische Enzyme (Lysozym, Urease) mit β -glykosidischer Nebenaktivität und β -Glucanasen bei der Weinherstellung zugelassen. („Die Verwendung von Enzymen in Lebensmitteln ist seit Januar 2009 europaweit einheitlich durch eine Positiv-Liste geregelt (Verordnung (EU) Nr. 1332/2008). Doch bis das neue Gesetz in der gesamten Europäischen Union wirksam ist, wird es noch einige Zeit dauern. Bis dahin gelten die nationalen Vorschriften.“)

Mit der Verordnung (EU) Nr. 53/2011 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 606/2009 zu önologischen Verfahren kam es zu einer Ergänzung bzw. Änderungen einiger önologischer Verfahren:

Verwendung von önologischen enzymatischen Zubereitungen:

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

Enzym-Präparate müssen den allgemeinen und speziellen Reinheits- und Identitätskriterien der Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Food Chemical Codex (FCC) für Lebensmittelenzyme bzw. laut Verordnung (EU) Nr. 53/2011 den von der OIV veröffentlichten Reinheits- und Identitätskriterien des Internationalen Weinkodex entsprechen (RESOLUTION OIV-OENO 485-2012). Damit ist die europäische Gesetzgebung mit der neuen Verordnung weniger restriktiv, z. B. ließ die Verordnung (EG) 1493/1999 lediglich Pectinasen von *Aspergillus niger*, β -Glucanasen von *Trichoderma harzianum*, Urease von *Lactobacillus fermentum* und Lysozyme zu.

Pektin-, Cellulase- und Glucosidase-Präparate sind ebenfalls gemäß dem internationalen Weinkodex der OIV zur Aromaverbesserung zugelassen. Damit

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

3.2 Wein

Die Weinherstellung ist ein biologischer Prozess und das Aroma wird durch viele Faktoren, wie Variation der Rebsorte, Hefe, Enzyme und andere önologische Parameter, beeinflusst [Berger (2007), S. 241–242; Clarke & Bakker (2004), S. 3–5]. Bei dem Prozess der Weinherstellung spielen sowohl Hefe-Zellen als auch Enzyme eine Schlüsselrolle. In den letzten Jahrzehnten wurden einige Versuche durchgeführt um die Hefe-Stämme zu verbessern, die bei der Fermentation des Traubensaftes bzw. Most eingesetzt werden, daneben wurden ebenfalls Versuche zur Nutzung von exogenen mikrobiellen Enzymen während der Weinherstellung durchgeführt [Bhat (2000)]. Hauptsächlich werden drei exogene Enzyme in der Weinherstellung eingesetzt: Pectinasen, β -Glucanasen und Hemicellulasen [Kubicek & Harman (1998), S. 327–342 durch Bhat (2000)]. Vorteil dieser drei Enzyme bzw. deren Einsatz während der Weinherstellung: (1) bessere Einmischung der Traubenhaut und bessere Farbextraktion; (2) einfache Most Klärung und Filtration und (3) verbesserte Weinqualität und -stabilität [Bhat (2000)]. Ein viertes Enzym vom Typ β -Glucosidasen hat nun ebenfalls beträchtliche Aufmerksamkeit in der Weinindustrie auf sich gezogen, da β -Glucosidasen die Fähigkeit besitzen aus natürlicherweise vorhandener glykosidischen Präkursoren β -glykosidisch gebundene Terpene als Aroma freizusetzen [Caldini et al. (1994); Günata et al. (1990a)].

3.2.1 Herstellung

Abb. 1 stellt die Herstellung von Weiß-, Rosé- und Rotwein dar.

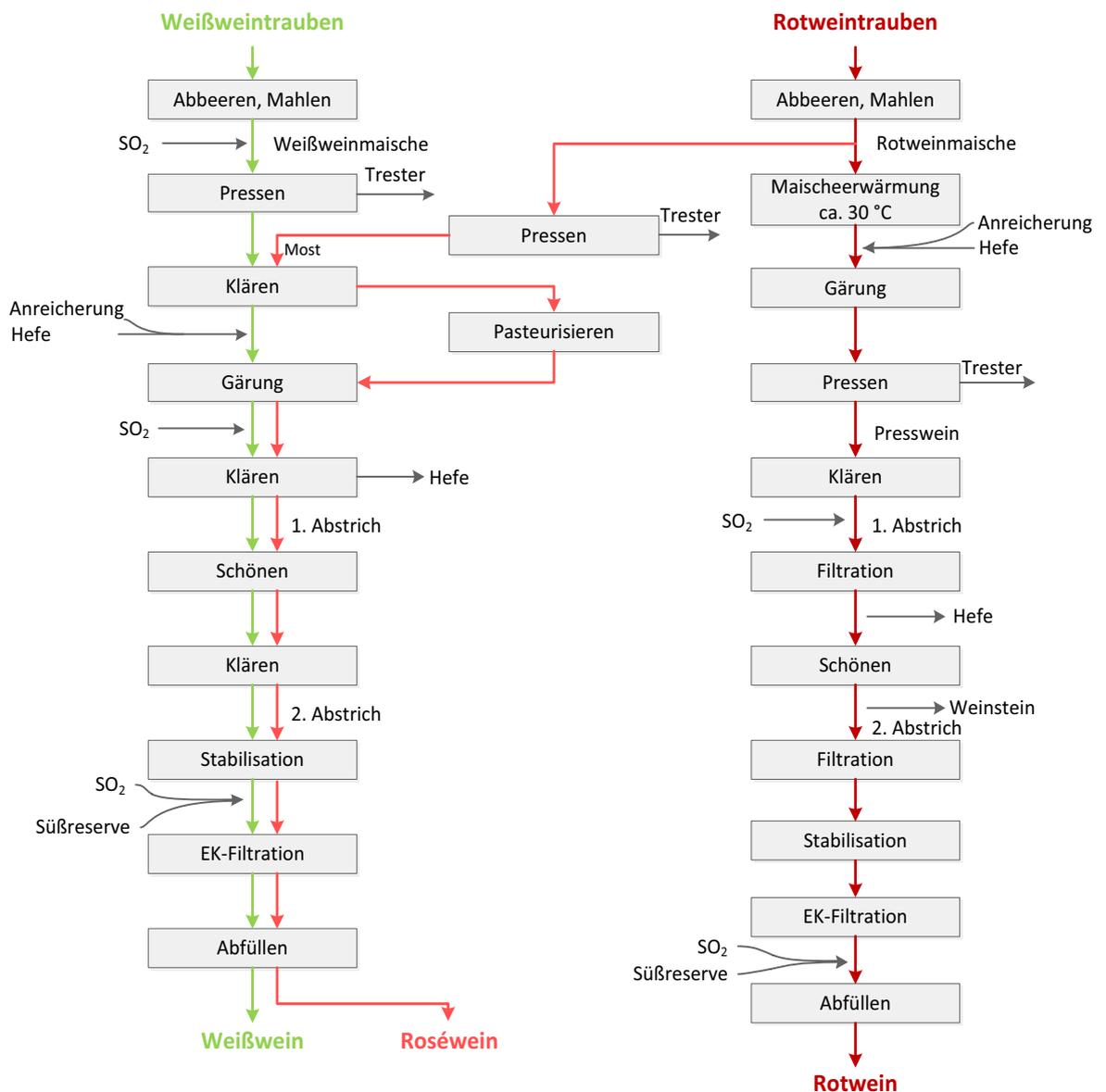


Abb. 1 Wein-Herstellung [eigene Darstellung nach Belitz et al. (2001), S. 894]

3.2.1.1 Gärung

Die Gärung von Traubenmost erfolgt in Fässern oder meist inahltanks mit Gärverschlüssen (wassergefüllte U-Rohre). Dabei werden die Behältnisse nur zu 70 bis 75 % gefüllt, damit noch Raum für den Gärungsschaum vorhanden ist [Krämer (2007), S. 247]. Eine Weingärung erfolgt entweder spontan, da sich verschiedene Hefen auf der Beerenoberfläche befinden, oder durch Verwendung einer Reinzuchtheefe. Um den Prozess der Gärung besser kontrollieren zu können, wird i. d. R. eine Reinzuchtheefe verwendet. *Saccharomyces apicultas* und *exiguus*

sind insbesondere bei den wilden Formen der Hefe zu nennen und Reinzuchthefen entstammen den Arten *Saccharomyces cerevisiae*, var. *ellipsoideus* oder *pastorianus* [Belitz et al. (2001), S. 902–903].

Bei den Reinzuchthefen gibt es für die unterschiedlichen Anforderungen unterschiedlicher Weine eine passende Hefe. Hauptsächlich werden hochvergärende Stämme, die hohe Alkoholausbeuten (bis 145 g/l) ermöglichen, benutzt. Daneben gibt es andere Hefetypen, wie sogenannte „Sulfithefen“, die gegen schwefelige Säure weniger empfindlich sind, oder „Kaltgärhefen“, die auch bei niedrigen Temperaturen wirksam bleiben. Dabei werden diese Trockenhefen i. d. R. mit 5 – 10 g pro Hektoliter Most dem Most im Gärbehälter zugesetzt. Die Gärung wird dabei meist gezügelt, d.h. langsam (bis 21 Tage) und kühl (bei Weißweinen unter 20 °C und 20 – 24 °C bei Rotweinen). Ein Einsatz von schwefeliger Säure verzögert den Gärbeginn bei 100 mg/l SO₂ um 3 Tage und bei 200 mg/l SO₂ um 3 Wochen [Belitz et al. (2001), S. 903].

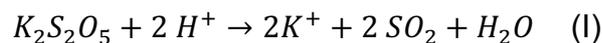
Die Hauptgärung findet in 5 – 7 Tagen statt. Am Ende ist der Zucker weitgehend zu Alkohol vergoren. Proteine, Pektin- und Gerbstoffe, Tartrate und Zellfragmente scheiden sich mit der Hefe als Bodensatz ab. Um eine vollständige Vergärung des Zuckers zu Alkohol zu verhindern bzw. um eine gewisse Restsüße des Weines zu erhalten, wird eine Nachgärung mit schwefeliger Säure unterbunden [Belitz et al. (2001), S. 903]. Bei der Nachgärung und der anschließenden Reifung des Weines spielen Milchsäurebakterien eine wichtige Rolle. Milchsäure bauen Äpfelsäure zu Milchsäure und CO₂ (biologischer Säureabbau) ab. Allerdings kann eine unkontrollierte Vermehrung dieser Mikroorganismen zu unerwünschten geschmacklichen Veränderungen (Milchsäurestich, Sauerkrautton u.a.) bzw. bei säurearmen Weinen zu einem unerwünschten Abbau der Äpfelsäure führen [Krämer (2007), S. 248].

3.2.1.2 Schwefeln

Eine Schwefelung kann mehrere Gründe haben. Zum einen dient die Schwefelung der Maische bzw. des Mostes der Erhaltung oxidationsempfindlicher Inhaltsstoffe, Verhinderung der enzymatischen Bräunung durch Phenoxidation und der Hemmung unerwünschter Mikroorganismen, wie wilde Hefen, Essigbakterien, Schimmelpilze, wobei hingegen echte Weinhefen der Gattung *Saccharomyces* kaum beeinflusst werden [Krämer (2007), S. 245]. Weitere wichtige Effekte sind eine Unterdrückung von Fehleraromen („Luftton“, „Oxidationston“, „Alterston“,

„Sherryton“) durch Bindung von Carbonylverbindungen (z.B. Ethanal) als Hydroxysulfonsäuren [Belitz et al. (2001), S. 904].

Zur Schwefelung zugelassen sind eine Verwendung von Schwefeldioxid oder Kaliumdisulfit (Verordnung (EG) Nr. 606/2009). Kaliumdisulfit wird dabei meist in Tablettenform dem Most bzw. Wein zugesetzt, wobei 10 g Kaliumdisulfit 5 g SO₂ entsprechen bzw. 50 % des Kaliumdisulfits zu SO₂ zerfallen [Bergner (1993), S. 125]. Kaliumdisulfit spaltet unter sauren Bedingungen, wie diese im Wein vorkommen, Schwefeldioxid ab [vgl. (I)].



Nur ein Teil bleibt als schwefelige Säure erhalten, ein Teil wird zu Sulfat oxidiert und ein weiterer Teil wird an Zucker und andere Carbonylverbindungen gebunden. Für den Gärverlauf, Reifung und Haltbarkeit von Wein ist eine richtige Dosierung von SO₂ von großer Bedeutung. Im fertig ausgebauten Wein wird ein Gehalt von 30 – 50 mg/l freies SO₂ angestrebt [Belitz et al. (2001), S. 904].

3.2.1.3 Abstich und Kellereibehandlung

Als Abstich wird das Abziehen des Weines von der Hefe bezeichnet. Nach etwa 6 bis 8 Wochen wird dies durchgeführt und der Wein durch Filtration vorgeklärt. Eine Autolyse der Hefezellen durch längere Lagerung über der Hefe kann zu Trübungserscheinungen und zur Bildung von Schwefelwasserstoff (Ursache für Hefe- oder Schwefelwasserstoff-Böckser) führen [Krämer (2007), S. 248]. Zum Abbinden überschüssigen Acetaldehyds, zum Abstoppen einer weiteren Gärung und zum Schutz vor mikrobiellen Verderb kann der Wein nochmals geschwefelt werden. Eine anschließende Reifung der Weine erfolgt heute überwiegend inahltanks. Nach der abgeschlossen Reifung werden die Weine geschönt und filtriert [Krämer (2007), S. 249].

3.2.1.3.1 Schöpfung und Filtration

Schönen bzw. Filtrieren haben beide den Sinn den Wein zu klären bzw. die Trubstoffe zu entfernen und den Wein damit zu stabilisieren. Zu den Trubstoffen zählen meist Proteine sowie oxidierte und kondensierte Polyphenole [Belitz et al. (2001), S. 904].

Geklärt wird der Wein i. d. R. durch Schöpfung (Fällung), Filtration oder Zentrifugation. Zu den Schöpfungsvorfahren gehören der Einsatz von Speisegelatine, Hausenblase kombiniert mit Casein, Eiereiweiß, Tannin, Bentonit,

Kaolin, Agar-Agar oder gereinigte Holzkohle. Diese Stoffe werden dem Wein zugesetzt und adsorbieren oder fällen trübende und unangenehm schmeckende Stoffe aus. Unerwünschte Schwefelverbindungen werden mit Kupfersulfat entfernt [Belitz et al. (2001), S. 904].

Zur endgültigen Klärung der geschönten Weine werden diese über Cellulose oder Kieselgur, entweder durch Schichtenfilter oder Anschwemmfilter, filtriert. Für Haltbarkeit von Wein und Süßmost hat eine entkeimende Filtration mittels Membranfiltern große Bedeutung erlangt [Belitz et al. (2001), S. 905].

3.2.2 Inhaltstoffe

Wein besteht aus zahlreichen chemischen Verbindungen, zusammenfassend kann man folgende Stoffgruppen nennen [Würdig et al. (1989), S. 466]:

- Alkohole
- Kohlenhydrate
- Säuren
- Stickstoffverbindungen
- Mineralstoffe
- Polyphenole

In geringeren Mengen kommen in Wein ebenfalls noch Aldehyde, Acetale, Ester, Enzyme, Vitamine und gelöste Gase wie Kohlendioxid, Schwefeldioxid, Sauerstoff und Schwefelwasserstoff vor [Würdig et al. (1989), S. 466].

Die chemische Zusammensetzung von Wein schwankt aufgrund der Beeinflussung durch Klima, Boden, Lage, Art und Behandlung von Trauben, Most und Wein innerhalb weiter Grenzen [Belitz et al. (2001), S. 905]. Die Qualität von Wein wird insbesondere durch den Gehalt an Ethanol, Extrakt, Zucker, Glycerin, Säuren und Bukettstoffen determiniert [Belitz et al. (2001), S. 905].

Tab. 2 zeigt die durchschnittliche Zusammensetzung von Traubenmost.

Tab. 2 durchschnittliche Zusammensetzung von Traubenmost [Belitz et al. (2001), S. 901]

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

3.2.2.1 Alkohol

3.2.2.1.1 Ethanol

Ethanol ist neben Wasser der Hauptbestandteil in Wein und weist i. d. R. einen Anteil von 7 bis 16 Vol.-% auf. Der durch die Gärung entstehende Ethanol kann kaum mehr als 16 Vol.-% erreichen, da Weinhefen i. d. R. durch höhere Ethanol-Gehalte gehemmt werden. Allerdings können mit Hilfe von alkoholresistenten Hefen auch höhere Ethanol-Gehalte erreicht werden. Dabei ist der natürliche Ethanol-Gehalte eines Weines ein direktes Maß für den Reifegrad der verarbeiteten Trauben bzw. für den Zuckergehalt der Trauben [Würdig et al. (1989), S. 484–485].

3.2.2.1.2 Methanol

Methanol ist giftig und kommt in Wein nur in geringer Mengen (38 – 200 mg/l) vor [Belitz et al. (2001), S. 906]. Das enthaltene Methanol stammt meist nur zu geringen Anteilen aus dem Stoffwechselprozess der Hefen, sondern entsteht größtenteils aus dem enzymatischen Abbaus des fruchteigenen Pektins. Eine Enzymbehandlung (mit pektolytische Enzymen) des Weins erhöht i. d. R. die Methanol-Gehalte [Würdig et al. (1989), S. 485–487].

3.2.2.1.3 Höhere Alkohole

Höhere Alkohole kommen im Wein zwischen 150 und 700 mg/l vor und weisen teilweise ausgeprägte Geruchs- und Geschmackseigenschaften auf, womit diese einen großen Beitrag zum Aroma des Weines leisten. Die mengenmäßig wichtigsten höheren Alkohole, sogenannte Fuselöle, sind Isobutanol und die

Amylalkohole 2-Methyl-butanol-1 und 3-Methyl-butanol-1. Diese Stoffe entstehen meist aus den Zuckern des Traubenmostes [*Würdig et al.* (1989), S. 486–494].

3.2.2.1.4 Mehrwertige Alkohole

Glycerin als Gärungsprodukt kommt mit 6 bis 10 g/l bzw. 8 - 10 % des gebildeten Alkohols mit Abstand am meisten unter den mehrwertigen Alkoholen vor und entsteht aus dem Zucker. Glycerin verleiht dem Wein Vollmundigkeit und einen abgerundeten Geschmack, den sogenannten Körper eines Weines [*Belitz et al.* (2001), S. 906; *Würdig et al.* (1989), S. 495–496].

3.2.2.2 Kohlenhydrate

3.2.2.2.1 Monosaccharide

I.d.R. enthalten vollständig vergorene Weine nur geringe Mengen an Kohlenhydraten (2 - 4 g/l). Im Wein kommen hauptsächlich D(+)-Glucose und D(-)-Fructose als Monosaccharide bzw. Hexosen vor. Weine enthalten nur in geringen Mengen Pentosen [*Würdig et al.* (1989), S. 502–510]. Bei den meisten Weinen überwiegt mit einem natürlichen Restzuckeranteil der Fructoseanteil, obwohl in der Reifen Traube Glucose und Fructose in etwa gleichen Mengen vorkommen [*Belitz et al.* (2001), S. 902]. Das hängt damit zusammen, dass die meisten *Saccharomyces cerevisiae* Stämme glucophil sind und somit hauptsächlich die Glucose verstoffwechseln und erst gegen Ende der Gärung auf Fructose zurückzuführen.

3.2.2.2.2 Disaccharide

Die Disaccharide Saccharose, Maltose und Melibiose kommen lediglich in Spuren vor [*Würdig et al.* (1989), S. 503–505].

3.2.2.3 Säuren

Wein wird wesentlich im Geschmack und Haltbarkeit durch seinen Gehalt an Säuren bestimmt [*Nagel et al.* (1982) durch *Würdig et al.* (1989), S. 516]. Der Gehalt an Säuren variiert stark durch die Parameter Traubensorte, Lage und Jahrgang, beispielsweise enthalten Weine aus reifen Trauben guter Jahrgänge geringere Gehalte an Säuren, als Weine aus unreifen Trauben sonnenarmer Jahre [*Würdig et al.* (1989), S. 516]. Der pH-Wert von Weinen liegt zwischen 2,8 und 3,8. Sogenannte titrierbare Säuren kommen in deutschen Weinen zwischen ca. 4 und 9 g/l vor [*Belitz et al.* (2001), S. 906].

Die enthaltenen Säuren sind sowohl Bestandteile der Trauben und des Traubenmostes (z. B. Weinsäure, Äpfelsäure, Citronensäure und die Aminosäuren) sowie Zwischen- bzw. Endprodukte der alkoholischen Gärung (z. B. Bernsteinsäure, Brenztraubensäure, gradkettige Fettsäuren Hexan-, Octan- und Dodecansäure) [Würdig et al. (1989), S. 516]. Essig- und Ameisensäure entstammen vorwiegend aus dem Stoffwechsel weineigener Bakterien [Würdig et al. (1989), S. 516].

Wein- und Äpfelsäure überwiegen im Wein mengenmäßig. Je nach Reifegrad der Trauben überwiegt der Anteil an Äpfelsäure mit dem Drei- bis Vierfachen an Gehalten von Weinsäure. Bei gut ausgereiften Trauben liegt das Verhältnis der beiden Säuren i. d. R. bei 1:1. Außerdem kann zwischen nördlichen und südlichen Anbaugebieten unterschieden werden, im Allgemeinen sind Weine aus südlichen Anbaugebieten säureärmer [Würdig et al. (1989), S. 516].

3.2.2.4 Stickstoffverbindungen

Die Stickstoffverbindungen des Mostes fallen zum Teil beim Einmaischen und Kellern gebunden an Gerbstoffen aus und ein großer Teil (70 – 80 %) wird durch die Hefen verstoffwechselt. Bei den noch vorhandenen Stickstoffverbindungen handelt es sich hauptsächlich um Aminosäuren, wobei Prolin dominiert [Belitz et al. (2001), S. 907]. Die Aminosäuren sind zum Teil Präkursoren von Aromastoffen des Weines. Der Gesamtgehalt an freien Aminosäuren vermindert sich während der alkoholischen Gärung. Rapp (1965) beschreibt eine Verminderung von 25 bis 75 % der im Traubenmost vorhandenen Aminosäuren-Konzentration. Der Gesamtgehalt hängt stark von Herkunft und Sorte des Weines ab. In der Literatur schwanken die Werte von 250 bis 4330 mg/l. Arginin, Prolin und Alanin treten quantitativ deutlich hervor [Würdig et al. (1989), S. 540–546].

3.2.2.5 Mineralstoffe

Der Aschegehalt eines Weines gibt eine erste Größenordnung über den Mineralstoffgehalt. In deutschen Weinen liegt dieser normalerweise meist zwischen 1,8 und 4 g/l [Bergner (1993), S. 207]. Die Zusammensetzung des Mineralstoffgehalts wird beeinflusst durch den Boden/Standorteinfluss (geologische Beschaffenheit, Verwitterungszustand, pH-Wert), den Jahrgang (Niederschlag, Temperaturen, Reifegrad). Die Gehalte können je nach Kellerbehandlung (Kontaktzeit der Beerenhäute und dem Stiel der Weintraube und

der Resorption der Hefen bei der Gärung) und Kellerbehandlungsstoffen (Kieselgur, Aktivkohle, Bentonit etc.) variieren [Bergner (1993), S. 209].

3.2.3 Aromastoffe

Das Aroma von Weinen ist das Resultat einer Vielzahl von Interaktionen zwischen einer großen Anzahl chemischer Komponenten und den sensorischen Rezeptoren. Das chemische Profil eines Weines ist abhängig von der Traube, der Fermentations-Mikroflora (Hefe etc.), einer möglichen sekundären mikrobiologischer Fermentation, die stattfinden kann, und der Alterung bzw. der Lagerungsbedingungen. Die Trauben-Zusammensetzung wiederum hängt von Faktoren, wie Sorte und spezifischen Umweltbedingungen ab [Styger *et al.* (2011)]. Weitere Einflussfaktoren der chemischen Zusammensetzung des Weins sind Sorte und Qualität der Traube, sowie Reifegrad, spezifische Verarbeitungstechniken und Fermentation und bestimmen somit letztendlich das Aroma des Weines [Styger *et al.* (2011)].

Die sensorische Wahrnehmung von Wein ist äußerst komplex, den Wein enthält eine Vielzahl von geschmacks- und geruchsaktiven Verbindungen wie Terpene, Ester, Methoxypyrazine und Aldehyde. Diese vermitteln ein ausgeprägtes Aroma und den Geschmack, wie floral, fruchtig, pfeffrig und holzig [Bloem *et al.* (2007); Park *et al.* (2009); Styger *et al.* (2011); ter Schure *et al.* (1998)]. Außerdem wird der sensorische Eindruck eines Weines, wie süß, sauer, salzig und bitter, durch die Anwesenheit von Zucker, mehrwertigen Alkoholen, Salz, Polyphenolen und Flavonoiden hervorgerufen [Styger *et al.* (2011)]. Über 800 Aromastoffe wurden bisher detektiert, wobei für die unterschiedlichen Aromastoffe die Schwellenwerte über einen weiten Konzentrationsbereich variieren [Belitz *et al.* (2008), S. 950; Rapp (1992); Rapp *et al.* (1976)].

Die Aromastoffzusammensetzung variiert signifikant zwischen den verschiedenen Rebsorten. Aufgrund dessen können diese anhand von GC-Chromatogrammen deutlich voneinander abweichenden Leitsubstanzen über sogenannte „Fingerprintmustern“ unterschieden bzw. identifiziert werden [Rapp (1992)]. Der Gehalt einiger dieser „Leitsubstanzen“ gibt analytisch Aufschluss über den Sortencharakter [Rapp (1992); Rapp & Mandery (1986)]. Abb. 2 zeigt ein sogenanntes Fingerprintmuster von einem Riesling-Wein.

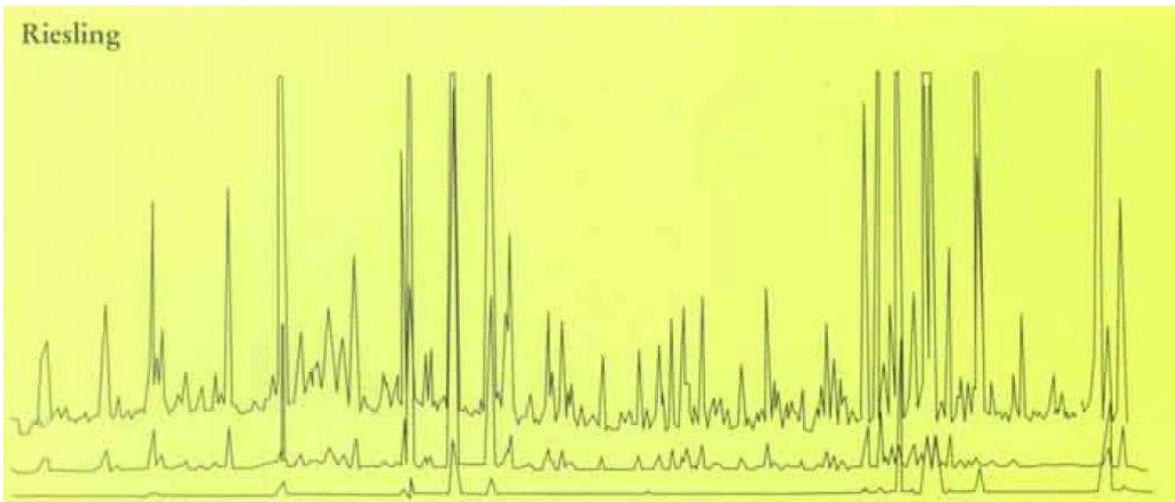


Abb. 2 Fingerprintmuster von Riesling bei unterschiedlichen Empfindlichkeiten [Rapp (1992)]

Eine große Anzahl an Aroma-Komponenten in Pflanzengewebe sind glykolytiert oder als nicht-flüchtige und geschmacklose Glykokonjugate akkumuliert [Mateo & Di Stefano (1997); Stahl-Biskup et al. (1993); Winterhalter & Skouroumounis (1997)]. Die meisten Norisoprenoide in Früchten (einige sind Präkursoren wichtiger Aromastoffe), sowie zahlreiche Terpene wurden in ihrer glykosidischen Form nachgewiesen. Insbesondere Terpene besitzen geringe Aromaschwellenwerte. In Verbindung mit den sensorischen Eigenschaften der Aglyka sind glykosidische Verbindungen eine wichtige potentielle Quelle für Aroma während Fruchtsaft-Verarbeitung bzw. der Weinherstellung [Maicas et al. (1999b)] und können insbesondere bei Wein zum blumigen Aroma beitragen [Mateo & Jiménez (2000)]. Die Präkursoren können durch Säuren [Günata et al. (1985b)] oder Enzyme hydrolysiert [Rapp & Mandery (1986); Williams et al. (1980)] werden.

3.2.3.1 glykosidisch gebundene Aromastoffe

Bei den Glykosiden wurden als Zucker-Reste 6-O- α -L-Rhamnopyranosyl- β -D-Glucopyranosid, 6-O- α -L-Arabinofuranosyl- β -D-Glucopyranosid, 6-O- β -L-Arabinofuranosyl- β -D-Glucopyranosid oder lediglich β -D-Glucopyranosid bzw. β -D-Glucose identifiziert [Günata et al. (1985b); Voirin et al. (1990); Williams et al. (1982)]. Der Aglykon-Teil wird oft mit Terpenolen gebildet. Daneben werden Linalool-Oxide, Terpendiole/-tione ebenfalls gefunden. Des Weiteren können andere Aroma-Präkursoren, wie lineare oder cyclische Alkohole (z.B. Hexanol, Phenylethanol, Benzylalkohol, C₁₃-Norisoprenoide, Phenolsäuren und vermutlich flüchtige Phenole wie Vanillin) vorkommen [Mateo & Jiménez (2000); Schwab & Schreier (1990)].

Betrachtet man nur die Glykoside der aromareichsten Aglyka, kommen am häufigsten Apiosylglykoside (bis zu 50 % abhängig von der Rebsorte), gefolgt von Rutinosiden (6 - 13 %) und danach die Glykoside mit (4 – 9 %) vor. Genauere Analysen deuten darauf hin, dass alle Glykoside nicht in allen Sorten enthalten sind und die Verhältnisse ebenfalls sortenabhängig differieren [Bayonove et al. (1992) durch Mateo & Jiménez (2000)].

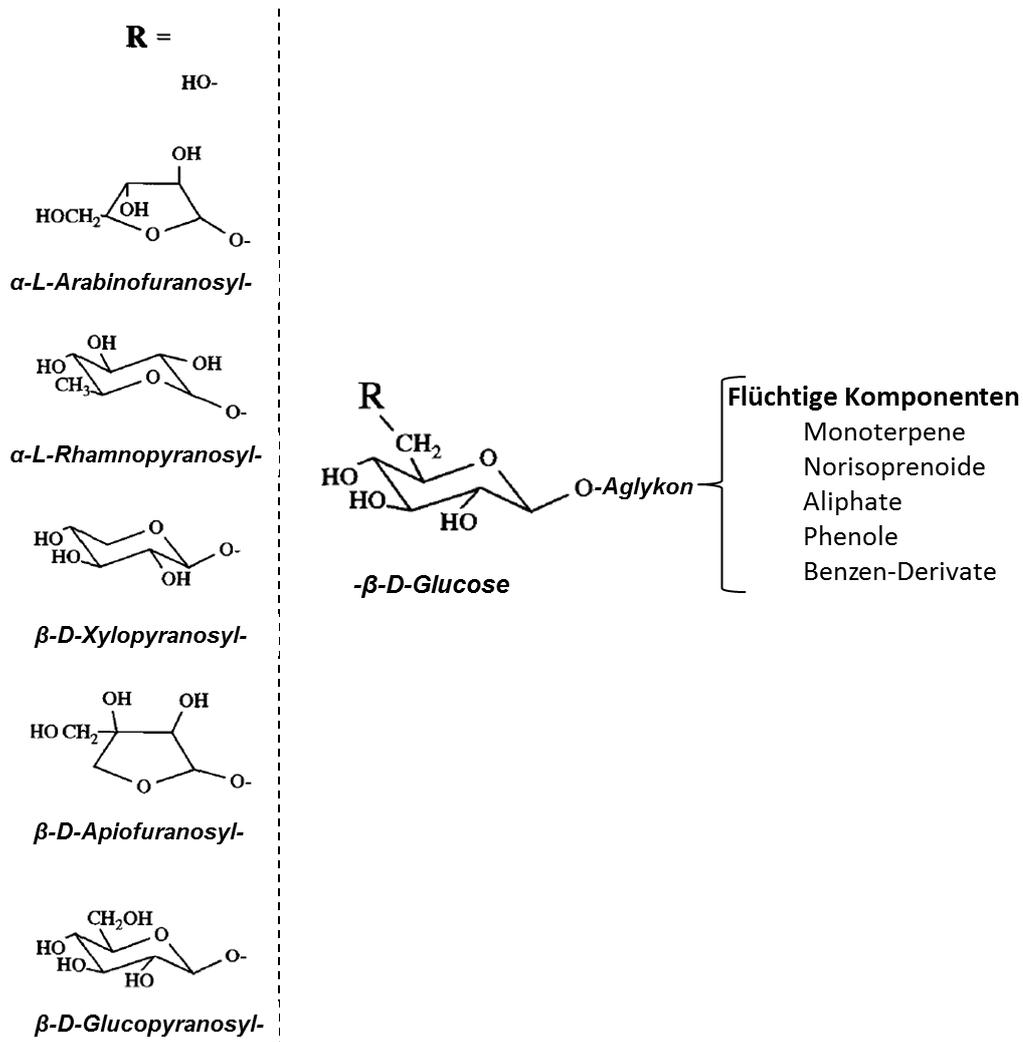
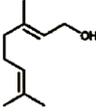
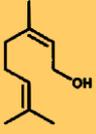
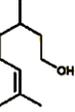
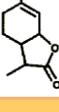
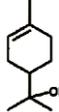
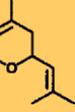


Abb. 3 Monosaccharid- und Disaccharid-Zuckerreste, die als Aroma-Präkursoren in Trauben identifiziert wurden [angepasste Darstellung nach Williams (1993), S. 287]

3.2.3.2 terpenoide Verbindungen

Den terpenoiden Verbindungen im Wein kommt beim Aroma eine zentrale Rolle zu. Mindestens 70 Monoterpenkomponenten im Wein sind bekannt. Die dominierenden Monoterpenverbindungen sind Linalool, Geraniol, Nerol, α -Terpineol und Citronellol [Singer & Teyssen (2005), S. 55–88]. In Tab. 3 sind ihre Strukturen und sensorischen Eigenschaften zusammengestellt.

Tab. 3 Strukturen, Geruchseigenschaften und Geruchsschwellenwert einiger wichtiger Monoterpene in Wein [Wüst (2003)]

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

Es gibt drei Kategorien von Monoterpenen in Trauben mit einigen Zusammenhängen zwischen diesen Kategorien [Mateo & Jiménez (2000)]. Da gibt es zunächst die freien Aromakomponenten, i.d.R. handelt es sich dabei meist um Linalool, Geraniol und Nerol und die Pyran- und Furan-Formen der Linalool-Oxide. Dazu kommen abhängig von Saft-/Most-Behandlung und externen

Faktoren wie z. B. Klima, einige zusätzliche Monoterpene, z.B. das Citronellol, α -Terpineol, Myrecenol plus einige andere Oxide, Aldehyde und Kohlenwasserstoffe. In Wein wurden außerdem verschiedene Monoterpen-Ethyl-Ester und -Acetat-Ester neben den freien Aromakomponenten gefunden.

Zweitens gibt es die polyhydroxylierten Formen der Monoterpene oder die freien geruchlosen Polyole. Eine Besonderheit bei den Polyolen ist, dass diese Verbindungen keinen direkten Einfluss auf das Aroma haben. Allerdings sind einige sehr reaktiv und können relativ leicht aufbrechen und so angenehme und wirksame flüchtige Stoffe freisetzen. So kann z.B. Diendiol zu *ho*-Trienol und Nerol-Oxiden abgebaut werden [Williams et al. (1980)].

Bei der Klassifizierung sind drittens noch die glykosidisch konjugierten Formen der Monoterpene zu nennen. Diese haben ebenfalls keinen direkten Einfluss auf das Aroma der Trauben bzw. des Weines. Allerdings ist an diesen glykosidisch gebundenen Monoterpenen interessant, dass sie als Präkursoren einiger Aromen sind und daher durch gezielte Freisetzung das sortentypische Aroma eines Weines verstärken können [Mateo & Jiménez (2000); Rapp (1992); Rapp & Mandery (1986); Rusjan et al. (2009)]. Dabei kommen die gebundenen Glykosid-Monoterpene häufiger als die freien [Günata et al. (1985b)] und die Polyole vor [Singer & Teyssen (2005), S. 55–88]. In Trauben sind etwa 90 % der Terpene als Glykoside präsent [Ebeler (2001)]. Man kann bei glykosidisch gebundenen Monoterpenen also von einer bzw. einem Aroma-Reserve/Reservoir sprechen. Abb. 4 zeigt die Hydrolyse der Monoterpen-Glykoside.

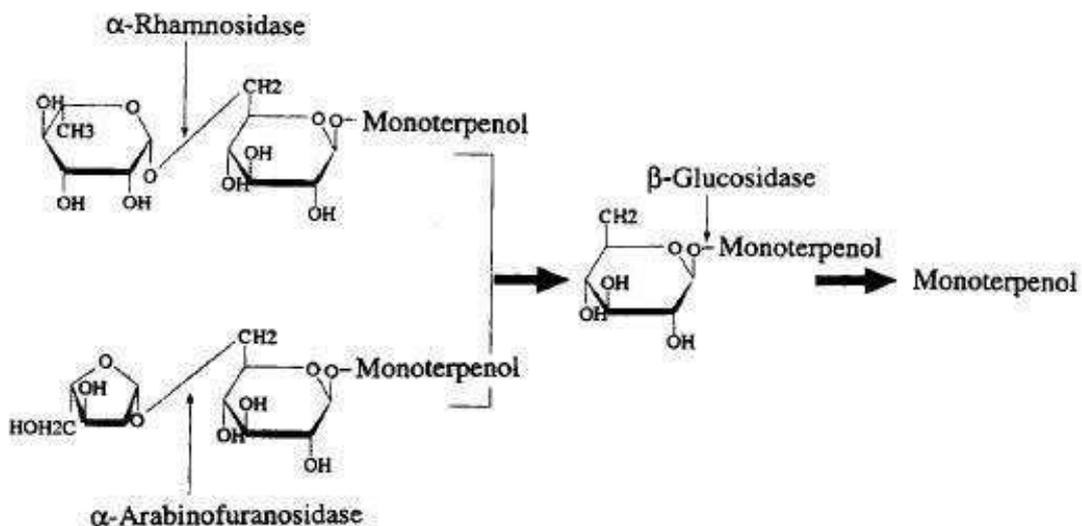


Abb. 4 Hydrolyse der Monoterpen-Glykoside [Vasserot et al. (1995)]

Glykosid-Präkursoren sind zahlreicher und relativ häufiger in Aroma-Trauben als in Wein, sie kommen zwischen 6,5 und 28 mg/l im Traubensaft vor [Mateo & Di Stefano (1997)]. Die meisten Rebsorten enthalten freie und gebundene Glykosid-Terpene, allerdings sind die Konzentrationen in Aroma-Sorten höher. Festzuhalten bleibt, dass gebundene Glykosid-Monoterpene häufiger sind als die freien [Günata et al. (1985b)]. Abb. 5 stellt die häufigsten freien und glykosidisch gebundenen Monoterpene in *Vitis vinifera* dar.

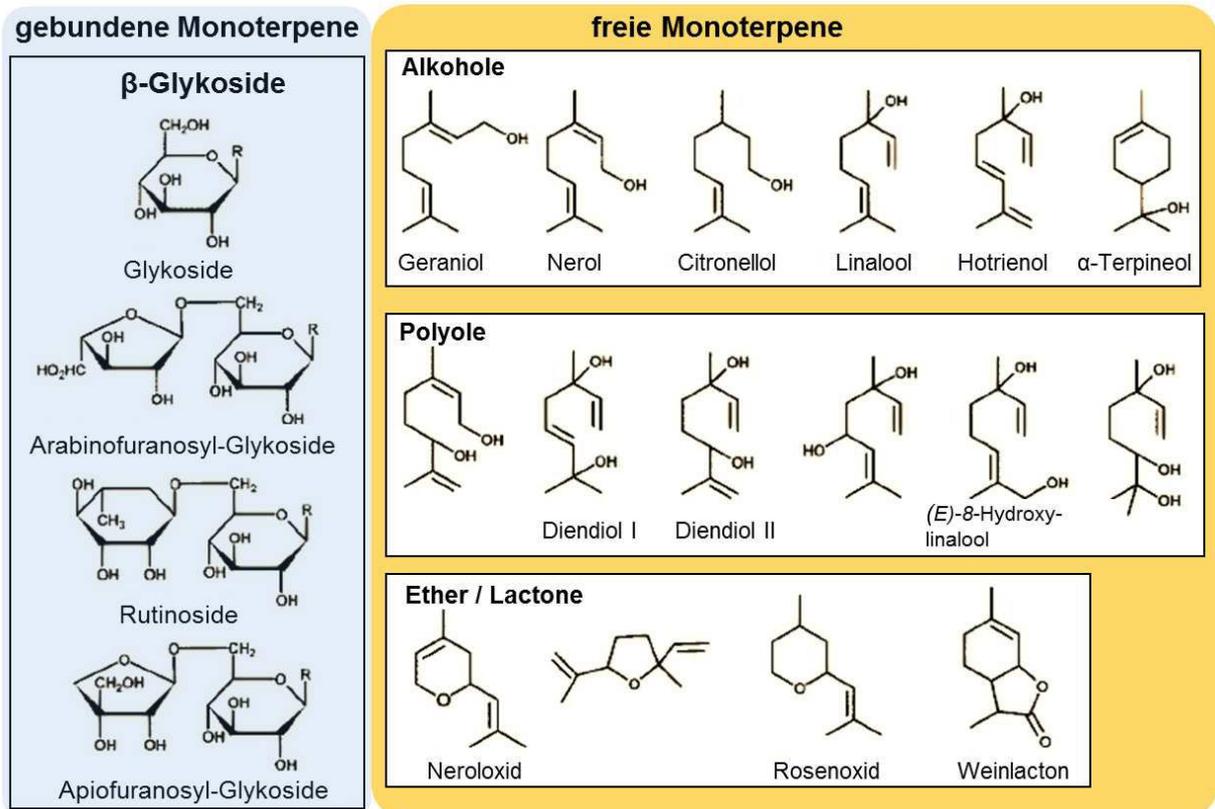


Abb. 5 die häufigsten freien und glykosidisch gebundenen Monoterpene in *Vitis vinifera* [angepasste Darstellung nach Wüst (2003)]

3.2.3.3 C₁₃-Norisoprenoide

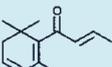
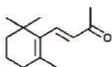
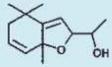
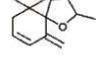
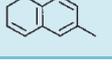
Diese sehr heterogene Gruppe von Naturstoffen wird vermutlich durch eine oxidative Spaltung der Carotinoid-Moleküle zwischen den C₉ und C₁₀-Positionen erzeugt, wodurch Norisoprenoide mit 13 Kohlenstoffatomen entstehen. Obwohl andere Norisoprenoide von 9 bis 20 Kohlenstoffatomen in der Natur vorkommen, sind für Wein lediglich die C₁₃ Norisoprenoide von Bedeutung. Vergleichbar mit den Monoterpenen, kommt der Großteil der C₁₃-Norisoprenoide als Glykoside vor, allerdings nur als Mono-Glykoside.

Betrachtet man das Aroma der C₁₃-Norisoprenoide, dann liefern Säure-katalysierte Umlagerungen im Wein sehr potente Aromastoffe, wie z.B. (*E*)-β-Damascenon [Berger (2007), S. 246]. (*E*)-β-Damascenon hat eine äußerst niedrige

Geschmacksschwelle (50 ng/l in einem Modell-Wein [Escudero et al. (2004)]). Dabei werden niedrige Konzentrationen eher als zitronenmelissenartig beschrieben, wohingegen 100-fach höhere Konzentration als Apfel, Rosen und Hönig-Note beschrieben werden [Fischer (1995)].

Die C₁₃-Norisoprenoide Vitispiran, Riesling-Acetal oder 1,1,6-trimethyl-1,2-Dihydronaphthalen (TDN) gehören ebenfalls zur Gruppe der C₁₃-Norisoprenoide. Sie werden durch Abbau der Carotenoide Antheraxanthin, Violaxanthin and Neoxantin und anschließender Enzym- und Säure-katalysierte Umlagerungen gebildet [Wüst (2003)] und mit dem Alterungs-Geschmack bei Riesling in Verbindung gebracht. Dieser Alterungsgeschmack wird als petroleum-, kerosin-, dieselartig oder eben im Deutschen als *Firne* beschrieben [Simpson & Miller (1983)]. In jungen Weinen ist TDN i. d. R. nicht vorhanden, kann sich dann allerdings bei gealtertem Wein bis 200 µg/l entwickeln. Der Geschmacksschwellenwert dieser Verbindung liegt bei 20 µg/l [Berger (2007), S. 246]. In Tab. 4 sind ihre Strukturen und sensorischen Eigenschaften zusammengestellt.

Tab. 4 Strukturen, Geruchseigenschaften und Geruchsschwellenwerte einiger wichtiger C₁₃-Norisoprenoide im Wein [Wüst (2003)]

Aromastoff	Struktur	Geruchseigenschaft	Geruchsschwellenwert [µg/l]
(E)-β-Damascenon		süß, blumig	50
β-Ionon		süß, blumig	800
Actinidol		campherartig	-
Vitispiran		harzig, balsmisch	800
TDN		kerosinartig	20

3.2.3.4 Methoxypyrazine

Methoxypyrazine sind extrem potente Geruchsstoffe mit sehr niedriger Geruchsschwelle in Wasser und Wein. Sie sind N-Heterozyklen und werden bei der Reaktion von Glycin mit Leucin, Isoleucin und Valin gebildet, was die

verschiedenen Reste an der C₃-Position erklärt [Bungert et al. (2001)]. Methoxypyrazine haben ein typischen Geruch nach grünem Pfeffer und grünem Paprika und sind auf Cabernet Sauvignon, Sauvignon blanc und in gewissem Maße Cabernet franc, Merlot und Kreuzungen unter Beteiligung der letztgenannten Sorten beschränkt. Lokalisiert sind die Methoxypyrazine hauptsächlich in der Beerenhaut [Berger (2007), S. 247]. In Tab. 5 sind ihre Strukturen und sensorischen Eigenschaften zusammengestellt.

Tab. 5 Strukturen, Geruchseigenschaften und Geruchsschwellenwerte einiger wichtiger Methoxypyrazine im Wein [Wüst (2003)]

Aromastoff	Struktur	Geruchseigenschaft	Geruchsschwellenwert [µg/l]
2-Methoxy-3-isobutyl		grüner Pfeffer	2
2-Methoxy-3-isopropyl		grüner Pfeffer, erdig	2
2-Methoxy-3-sec-butyl		grüner Pfeffer	1
2-Methoxy-3-ethyl		grüner Pfeffer, erdig	400

3.2.3.5 Schwefelhaltige organische Verbindungen

Diese Verbindungen entstehen hauptsächlich im Hefestoffwechsel und nehmen nach der Gärung wieder ab. Eine vermehrte Bildung kann nach der Anwendung bestimmter Schwefelpräparate vorkommen. Durch ihre niedrige Wahrnehmungsschwellenwerte können sie das Weinaroma sowohl negativ als auch positiv beeinflussen [Bergner (1993), S. 205].

3.2.4 andere glykosidische Verbindungen im Wein

Neben den glykosidisch gebundenen Aromastoffen gibt es ebenfalls andere Gruppen glykosidischer Verbindungen im Wein, interessant sind da besonders die Phenole. Den Phenole bzw. Polyphenole werden mit positiven Gesundheitseffekten in Verbindung gebracht, wobei die deglykolisierte Formen einiger glykosidischen Verbindungen vorteilhafter sind [Meng et al. (2004); Williamson et al. (1996)]. Polyphenole zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen, sind an der oxidativen Bräunung von Mosten und Weinen weißer Rebsorten

beteiligt sind [Cheynier et al. (1988)] und beeinflussen folglich die sensorischen Eigenschaften, speziell Farbe und Geschmack eines Weines und speziell im Rotwein [Komes et al. (2007)]. Zu den Polyphenolen gehören u. a. Phenolcarbonsäuren, Flavone, Anthocyane und Catechine [Würdig et al. (1989), S. 101]. In der Traube sind die Polyphenole unterschiedlich verteilt, im Traubenkern sind ca. 60 % der Polyphenole vertreten, größtenteils Proanthocyanidine, Catechine, sowie deren Oligo- und Polymere. Allerdings umschließt den Traubenkern eine Lipidschicht, was eine Extraktion der Polyphenole während der Mazeration verhindert. In der Traubenhaut sind nochmal 30 % der extrahierbaren Polyphenole enthalten, hauptsächlich Anthocyane und Resveratol [Simon et al. (1992)]. Letzteres zählt zu den anerkannten Antioxidantien und kann freie Radikale einfangen. Dadurch werden den Polyphenolen positive gesundheitliche Effekte wie krebsvorbeugende Eigenschaften zugesprochen [Greenwald et al. (2001); Visioli et al. (2000); Whitehurst & Oort (2010), S. 203].

Alonso et al. (1986) konnte aus Rot- und Weißweinen sechs Flavanol-Glykoside nachweisen. In spanischen Weinen wurde vermehrt das ein Quercetin-3-O-Glukosid nachgewiesen [Alonso et al. (1986)]. Quercetin hat von allen in der Literatur beschriebenen Polyphenolen das stärkste antioxidative Potential [Lermusieau et al. (2001)]. Daneben können auch andere Polyphenole glykosidisch gebunden vorliegen und so durch eine β -Glucosidase-Aktivität freigesetzt werden.

Anthocyane, verantwortlich für die Farbe im Wein, wurden in jungen Weinen in ihrer glykosidischen Form vorgefunden. Allerdings ist nicht klar welchen Effekt die Anthocyan-Deglykosidation auf die Farbe und Stabilität während der Alterung und Reifung des Weins hat [Capaldo et al. (2011)]. Einige Studien zu Fruchtsäften [Wightman et al. (1997)] und sizilianischen Blutorangen [Barbagallo et al. (2007)] zeigen, dass ein deutlicher Abbau der Anthocyane mit steigender Glucosidase-Aktivität festzustellen ist. Allerdings zeigten [Wightman & Wrolstad (1996)], dass es zu keinem Verlust an Pigmentierung kommt, daher empfiehlt sich bei der kommerziellen Fruchtsaftherstellung der Einsatz von Enzympräparaten der β -Glucosidase z. B. im Boysenberry Saft.

3.2.5 Hydrolyse der Glykoside

Die Traubenglykoside können durch Säurehydrolyse gebundene Monoterpene freisetzen und so das Aroma des Traubensaftes verbessern/erhöhen [Williams et al. (1982)]. Allerdings führt eine Säurehydrolyse in Verbindung mit der Erhitzung zu einer Umgruppierung der Monoterpen-Aglyka [Mateo & Di Stefano (1997)]. Als Alternative dazu gibt es enzymatische Methoden, um mit einer minimalen Änderung der natürlichen Monoterpen-Verbindungen die Konzentration an freien Aromastoffen im Traubensaft zu erhöhen [Günata et al. (1985b)].

Einige Studien zeigten, dass die enzymatische Hydrolyse der Trauben Monoterpen-Diglykoside in zwei Schritten von statten geht. Zunächst wird die inter-Zucker Verbindung durch α -L-Arabinofuranosidase oder α -L-Rhamnosidase ungeachtet der Struktur des Aglykon-Restes gespalten und das korrespondierende Monoterpenyl- β -D-Glykosid freigesetzt. Die Freisetzung des Aglykon-Restes kann nur während dem zweiten Schritt stattfinden durch eine β -Glucosidase gegenüber dem zuvor entstandenen Monoterpen- β -D-Glykosid [Günata et al. (1988)]. Abb. 6 zeigt den sequentiellen Mechanismus der Glucosidasen.

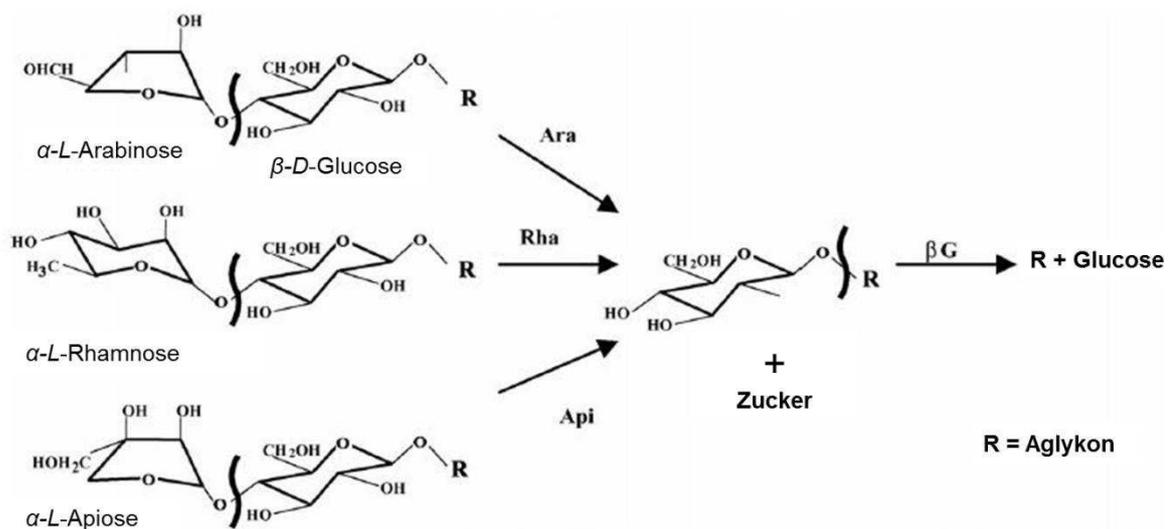


Abb. 6 sequentieller Mechanismus der Glucosidasen [übersetzte Darstellung nach Palmeri & Spagna (2007)]

3.3 Enzyme

Enzyme sind hochmolekulare Proteine mit katalytischer Aktivität sogenannte Biokatalysatoren und werden von biologischen Zellen synthetisiert. D. h. sie beschleunigen Reaktionen ohne dabei selbst verbraucht zu werden [Belitz et al. (2001), S. 88; Frank (1990), S. 91–92].

Enzyme sind substrat- bzw. reaktionsspezifisch. Durch ihre räumliche Struktur der Enzyme können im sogenannten aktiven Zentrum nur bestimmte Substrate binden → Schlüssel-Schloss-Prinzip [Belitz et al. (2001), S. 104], so dass das Enzym dann eben nur eine bestimmte Reaktion katalysiert [Belitz et al. (2001), S. 89–90]. Daher ermöglichen Enzyme bei geringem technischen Aufwand eine schnelle, kontinuierliche und gelenkte Reaktionsführung [Belitz et al. (2008), S. 148].

Enzyme sind meist um einige Zehnerpotenzen größer als ihre Substrate, folglich kommt bei der Katalyse nur ein kleiner Teil des Enzyms mit dem Substrat in Kontakt Man spricht bei diesem Bereich vom aktiven Zentrum [Belitz et al. (2001), S. 101]. Das aktive Zentrum des Enzyms kann als Vertiefung in der Enzymoberfläche angesehen werden (meist nur aus wenigen Aminosäure-Seitenketten). Eine Bindung eines Substratmoleküls in das aktive Zentrum, führt zu einer leichten Konformationsänderung mit der Folge, dass das Substrat fester umschlossen wird → „induced-fit“-Mechanismus [Campbell & Reece (2006), S. 115–117]. Bei der Anlagerung bzw. Bindung von einem Substrat mit dem Enzym an das aktive Zentrum → „Enzym-Substrat-Komplex“ handelt es sich meist um eine Wechselwirkung von Wasserstoffbrücken und Ionenbindungen. Die Umwandlung des Substrats erfolgt katalytisch über die wenigen Aminosäure-Ketten des aktiven Zentrums. Das/die Produkt(e) verlassen das aktive Zentrum und das nächste Substratmolekül kann binden. Dabei können bis zu 1000 oder mehr Substratmoleküle pro Sekunde umgesetzt werden [Campbell & Reece (2006), S. 116].

Es gibt verschiedene Parameter, die eine Enzymaktivität beeinflussen: Substratkonzentration, Temperatur, pH-Wert und Anwesenheit bestimmter Chemikalien (als Inhibitoren oder Substratkonkurrenten).

Mit steigender Substratkonzentration steigt die Reaktionsgeschwindigkeit, bis zu dem Punkt, an dem alle aktiven Zentren besetzt sind, danach erfolgt eine Hemmung der Reaktion [Campbell & Reece (2006), S. 117].

Enzyme besitzen ein Temperaturoptimum, an diesem Punkt ist die Reaktionsgeschwindigkeit maximal. Grob kann man sagen, dass die Enzymaktivität mit steigender Temperatur zunimmt bis zum Optimum, danach fällt die Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund der Denaturierung des Enzyms rapide ab (Zerstörung der Tertiärstruktur) [Belitz *et al.* (2001), S. 125–129; Campbell & Reece (2006), S. 117].

Analog verhält es sich beim pH-Wert. Jedes Enzym ist nur in einem gewissen pH-Bereich katalytisch aktiv. Das pH-Optimum liegt meist zwischen pH 5,5 – 7,5 und bei pH-Werten ober- oder unterhalb dieser Grenzen kommt es zu Ladungsverschiebungen, die letztendlich ebenfalls zur Denaturierung führen können [Belitz *et al.* (2001), S. 122; Campbell & Reece (2006), S. 117]. Andere Zusätze, wie Ethanol, Glucose oder Salze, haben ähnliche Auswirkungen auf die Enzymstruktur.

Zusätzlich dazu gibt es noch sogenannte Cofaktoren, organisch oder anorganisch, die entweder permanent oder reversibel mit dem Substrat an das aktive Zentrum binden und so für katalytische Aktivität benötigt werden bzw. diese erhöhen können. Bei organischen Cofaktoren spricht man Coenzymen oder Cosubstraten [Belitz *et al.* (2001), S. 95; Campbell & Reece (2006), S. 117–118].

Die Enzym-Aktivität wird neben der Substratkonzentration auch von der Art und Konzentration anderer Stoffe wie den Inhibitoren beeinflusst, die die Geschwindigkeit der Katalyse reduzieren können. Dabei gibt es zwei Arten der Hemmung, die irreversible und die reversible [Belitz *et al.* (2001), S. 120; Campbell & Reece (2006), S. 118–119].

Bei der irreversiblen Hemmung reagieren die Inhibitoren meist kovalent und das Enzym ist irreversible inaktiviert. Die reversible Hemmung hängt vom Gleichgewicht zwischen Enzym und Inhibitor ab. Dabei kann basierend auf der entsprechenden Kinetik zwischen drei reversiblen Hemmungen unterschieden: kompetitive, nichtkompetitive und unkompetitive Hemmung [Belitz *et al.* (2001), S. 121]. Bei der kompetitiven Hemmung reagiert der Inhibitor nur mit dem freien Enzym und steht somit in Konkurrenz zu dem Substrat. Die nicht-kompetitive Hemmung, auch allosterische Hemmung genannt, zeichnet sich durch einen Inhibitor aus, der nicht an das aktive Zentrum des Enzyms bindet, sondern an eine andere Stelle des Enzyms, also sowohl mit freiem Enzym als auch mit dem Enzym-Substrat-Komplex reagiert. Bei der unkompetitiven Hemmung reagiert

der Inhibitor nur mit dem Enzym-Substratkomplex [*Belitz et al.* (2001), S. 121–122].

3.3.1 Herstellung von Enzympräparaten

Die gezielte Verwendung von Enzympräparaten hat den Vorteil einer ausgeprägten Substrat- und Reaktionsspezifität sowie einer hohen Reaktionsgeschwindigkeit unter produktschonenden Bedingungen (pH, Temperatur). Somit ist eine gelenkte, schnelle und kontinuierliche Reaktionsführung bei geringem technischem Aufwand möglich [*Belitz et al.* (2001), S. 139].

In der Regel bekommt man aus pflanzlichem, tierischem Material oder Mikroorganismen schonend gewonnene Enzymgemische mit einer spezifischen Aktivität. Durch geeignete Verfahren werden aus diesen Enzymgemische die sogenannten „Leitenzyme“ angereichert und dann entsprechend weiterverarbeitet → trocknen, mahlen, mit anderen Lebensmittelbestandteilen mischen bzw. binden für die gewünschte Anwendungskonzentration. Neben der Aktivität des Hauptenzym kommen in solchen Präparaten meist auch technischen unvermeidbare Fremd- bzw. Nebenaktivitäten vor, die sowohl gewünscht als unerwünscht sein können [*Frank* (1990), S. 92].

Im Prinzip umfasst die Isolierung von Enzymen zwei Schritte: Zerkleinerung des Gewebes mit einer anschließenden Extraktion und Anreicherung. Das biologische Material muss zunächst zerkleinert mit dem Ziel des vollständigen Zellaufschlusses werden. In Gegenwart eines Extraktionspuffers wird das Material dann homogenisiert und die Enzyme mittels geeigneten Verfahren extrahiert, so dass diese in Lösung gehen [*Belitz et al.* (2001), S. 90–91].

Anschließend erfolgt eine Anreicherung der Enzyme. Dazu müssen zunächst die Begleitproteine abgetrennt werden, um die Enzyme weiter aufzureinigen. Dabei wird häufig eine fraktionierte Fällung oder eine Auftrennung der extrahierten Proteine nach Molekulargewicht mittels Gelchromatographie angewendet. Die Fraktion mit dem Enzym wird gesammelt und weiter aufgetrennt (z. B. Ionenaustauschchromatographie). Je nach gewünschter Reinheit werden auch andere aufwendigere Verfahren angewendet. Die Aufarbeitung der Enzyme für technische Zwecke zielt, im Gegensatz zu den weitgehend gereinigten Enzymen für die Analytik, nur darauf ab, störende Fremdaktivitäten zu reduzieren bzw. beseitigen. Bei den Fraktionierungen werden daher meist selektive

Fällungsoperationen, wie Adsorption an anorganischen Gelen, Chromatographie an porösen Gelen und eine Ultrafiltration durch Membranen angewandt [Belitz et al. (2001), S. 139].

Vermarktet werden diese Präparate dann mit definierter katalytischer Aktivität, die bei Anwendung durch Zusatz geeigneter Verdünnungsmittel (z. B. Salze, Kohlenhydrate) auf die erforderliche Konzentration eingestellt wird. Der Gehalt an aktivem Enzym ist meist relativ gering, um eine einfache Dosierung zu gewährleisten [Belitz et al. (2001), S. 139]. Nachteilig bei solchen löslichen Präparaten ist, dass diese nur ein einziges Mal eingesetzt werden können. Immobilisierte Enzyme hingegen können mehrfach verwendet werden. Dazu werden die Enzyme an ein festes Trägermaterial fixiert. Nachfolgend kann in einem kontinuierlichen Verfahren die Reaktion anschließend sehr einfach über die Fließgeschwindigkeit kontrolliert werden. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten Enzyme zu immobilisieren [Belitz et al. (2001), S. 139,141]:

Gebundene Enzyme werden kovalent oder in einzelnen Fällen adsorptiv über Ionenbeziehungen, H-Brücken und/oder hydrophobe Wechselwirkungen an ein Trägermaterial gebunden. **Eingeschlossene Enzyme** werden bei der Herstellung von Polymeren in Hohlräume eingeschlossen, die über Poren zugänglich sind.

Vernetzte Enzyme werden durch eine Umsetzung mit einem bifunktionellen Reagenz zu unlöslichen Komplexen vernetzt, die weiterhin katalytisch wirksam sind. Allerdings sind solche Komplexe meist mechanisch relativ instabil.

Durch eine Immobilisierung verändern sich oft die Eigenschaften der Enzyme [Belitz et al. (2001), S. 141–142]. Dabei hängen die Eigenschaften stark von der Matrix und Art der Immobilisierung ab. So steigert sich z. B. die thermische Stabilität einer immobilisierten β -Glucosidase um knapp 80 % im Vergleich zur nicht immobilisierten β -Glucosidase [Zaborsky (1973) durch Belitz et al. (2001), S. 142].

3.3.2 Aroma-Enzympräparate

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

Schwierigkeit beim Einsatz von Enzymen im Most bzw. Wein stellt der hohe Zuckergehalt dar. Zu hoher Zuckergehalt hemmt die Wirkung des Enzyms. Daher ist eine Zugabe erst in der abklingenden Gärung sinnvoll. Allerdings hat der Einsatz des Enzyms zu Beginn der Gärung den Vorteil, dass freigesetzte Aromastoffe durch die intensive Gärung weiter reagieren zu „reifen“ Stoffen. Eine Behandlung am Ende der Gärung stellt ein Infektionsrisiko dar [Meinl *et al.* (2009)].

Van Rensburg & Pretorius (2000) erwähnen, dass zu den wichtigen Enzymen für die Weinbereitung u. a. Pektinase, Proteinasen, Glucosidasen und Glucose-Oxidase zählen. Von diesen Enzymen sind die β -D-Glucosidasen mit die bedeutungsvollsten, die zu einem sortentypischen Wein-Aroma und -Geschmack beitragen. Tab. 6 zeigt eine mögliche Erhöhung der Terpen-Gehalte in Wein mittels enzymatischer Behandlung. Die Verwendung verschiedener Quellen an β G-Enzymen wurde als mögliches Verfahren zur Verbesserung des Weingeschmacks vorgeschlagen.

Tab. 6 Erhöhung der Terpen-Gehalte nach enzymatischer Behandlung nach [Palmeri & Spagna (2007)]

Terpene	ohne Enzym	mit Enzym
	[μ g/l]	[μ g/l]
Linalool	160	342
α -Terpineol	40	40
Citronellol	30	335
Nerol	12	75
Geraniol	80	190
Gesamt-Terpengehalt	322	982

3.3.3 β -Glucosidasen

Glucosidasen sind in der Natur weitverbreitet und katalysieren effizient die Hydrolyse vieler verschiedener Glykoside und Oligosaccharide [Dale *et al.* (1986)]. Die β -Glucosidase gehört zu den Hydrolasen mit der EC-Nr. 3.2.1.21. Synonyme für die β -Glucosidase sind Cellobiase und Amygdalase [Belitz *et al.* (2001), S. 325]. Die β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) aus süßen Mandel gehörte zu den ersten Enzymen, die näher untersucht wurden [Fischer (1898); Wöhler & Liebig (1837)]. β -Glucosidasen hydrolysieren Kohlenhydrate mit Aryl-, Amino- oder Alkyl- β -D-

Glykoside-Resten, kurze Oligosaccharide und Disaccharide [Bhatia et al. (2002)]. Die Aktivität solcher β -Glucosidasen unterscheidet sich stark in Abhängigkeit von der Herkunft [Bisaria et al. (1989); Ketudat Cairns & Esen (2010); Kubicek et al. (1993)].

β -Glucosidasen werden in allen Bereichen lebender Organismen gefunden und spielen eine entscheidende Rolle bei der Entfernung von nicht-reduzierenden, terminalen Glycosyl-Resten von Sacchariden und Glykosiden. Die β -Glucosidase hat zahlreiche Funktionen in den verschiedenen Organismen, unter anderem die Aufspaltung von Glycolipiden und exogenen Glykosiden in Tieren, Lignifikation/Zellwand-Verholzung, Abbau von Zellwand-Oligosacchariden, Phytohormon-Konjugat-Aktivierung, Freisetzung von aromatischen Verbindungen in Pflanzen und die Umwandlung von Biomasse in Mikroorganismen. Diese Funktionen sind der Grund für viele landwirtschaftliche und industrielle Anwendungen [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Bakterielle oder Pilz- β -Glucosidasen sind meist Teil eines Cellulase-Enzym-Systems (s. verwendetes Präparat 3.3.4.3) und verantwortlich für die Hydrolyse von kurzkettigen Oligosacchariden und Cellobiose zu Glucose als geschwindigkeitsbestimmendem Schritt [Bhatia et al. (2002)]. Die Enzym-Aktivität sinkt, wenn die Glucose-Kettenlänge steigt [Bisaria et al. (1989); Kubicek et al. (1993)]. Kurz und knapp festgehalten, β -Glucosidasen von unterschiedlicher Herkunft unterscheiden sich in ihrer Spezifität für den Aglykon-Part (Aryl-, Alkyl- oder Amino), der glykosidisch gebunden ist. Neben der Einteilung in EC-Klassen, entwickelte Henrissat eine alternative Einteilung der Glykosid-Hydrolasen (GH) anhand ihrer Aminosäure-Sequenz [Cantarel et al. (2009); Henrissat (1991); Henrissat & Davies (1997)]. Diese Einteilung ist die aktuell akzeptierte Methode diese Enzyme zu klassifizieren [Bhatia et al. (2002)]. Die β -Glucosidase wird in die Familie der Glykosid-Hydrolasen GH1, GH3, GH5, GH9 und GH30 eingeteilt [Brunner et al. (2002); Cantarel et al. (2009); Henrissat (1991); Opassiri et al. (2007)]. Familien, die ähnliche Strukturen im katalytischen Bereich aufweisen und ähnliche katalytische Aminosäuren enthalten, was auf eine gemeinsame Abstammung und ähnlichen katalytischen Mechanismus schließen lässt, sind nochmal in sogenannte Clans gruppiert [Cantarel et al. (2009); Henrissat & Davies (1997)]. Der Clan GH-A hat den größten Anteil an Familien und enthält die Familien der β -Glucosidasen GH1, GH5 und GH30. GH1 enthält die größte Anzahl an charakterisierter

β -Glucosidasen [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Die meisten β -Glucosidasen EC 3.2.1.21 gehören zur Familie der GH1, besonders pflanzliche [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. GH3 umfassen β -Glucosidasen einiger bakterieller, Schimmelpilz- und Hefe-Herkunft [Bhatia et al. (2002)].

Beide Familien (GH1 und GH3) umfassen sogenannte „Retaining“-Enzyme, die ihre Substrate hydrolysieren mit einer Netto-Retention der anomeren Konfiguration über ein Doppel-Verlagerungs-Mechanismus [Withers (2001)] (s. 3.3.3.4).

Die Monomer-Größe der Enzyme variiert von ca. 14000 bis 17000 Da. Diese Enzyme variieren in ihrer strukturellen Zusammensetzung von im Wesentlichen fast ausschließlich α -helikalen bis hin zu fast ausschließlich zur β -Faltblatt Anordnung [Withers (2001)].

3.3.3.1 Klassifizierung

β -Glucosidasen sind eine heterogene Gruppe von hydrolytischen Enzymen und wurden daher bereits nach verschiedenen Kriterien klassifiziert. Allerdings gibt es noch keine gut definierte Methode für diese mannigfaltigen Enzyme [Bhatia et al. (2002)]. Im Allgemeinen gibt es in der Literatur zwei Methoden zur Klassifizierung, die einmal auf der Substrat-Spezifität basiert und einmal auf der Nukleotid-Sequenz-Identität (NSI) [Henrissat & Bairoch (1996)].

Basierend auf der Substratspezifität wurden diese Enzyme in (1) Aryl- β -Glucosidasen, die auf Aryl-Glykoside wirken, in (2) wahre Cellobiasen, die Cellobiose unter Freisetzung von Glucose hydrolysieren und in (3) breite Substratspezifitäts-Enzyme, die bei einem weiten Spektrum auf Substraten wirken [Bhatia et al. (2002)]. Die meisten β -Glucosidasen, die bis dato charakterisiert wurden, wurden der letzten Kategorie zugeordnet. Eines der ersten Klassifizierungssysteme, basierend auf der verfügbaren Sequenz, teilt diese Enzyme in zwei Typen ein, Typ I und Typ II β -Glucosidasen [Beguin (1990)]. Ein anderes System nach Rojas et al. (1995) unterteilt die β -Glucosidasen in zwei Subfamilien, Subfamilie A (BGA) und Subfamilie B (BGB). Allerdings wurden diese frühen Methoden größtenteils durch das NSI-System von Henrissat & Bairoch (1996), basierend auf der Sequenz und der Faltungs-Ähnlichkeiten (HCA Hydrophobic Cluster Analyses) dieser Enzyme ersetzt. HCA verschiedener solcher Enzyme lässt vermuten, dass die α -Helices und die β -Stränge in ähnlichen Positionen in der gefalteten Konformation lokalisiert sind [Bhatia et al. (2002)]. Hinzu kommt, dass einige hoch/stark konservierte Aminosäuren ebenfalls in der Nähe

des aktiven Zentrums geclustert wurden. Es wird erwartet, dass eine solche Klassifizierung strukturelle Besonderheiten, evolutionäre Beziehungen und katalytische Mechanismen dieser Enzyme reflektieren kann [Bhatia et al. (2002)]. Das Klassifizierungssystem für alle Glycosylhydrolasen, fast 2000, umfasste im Jahr 2002 88 Familien [Bhatia et al. (2002)]; 2006 wurden 104 Familien und β -Glucosidasen in GH1 und GH3 gefunden [Marana (2006)]. Die Nomenklatur wird stark genutzt, ständig aktualisiert und ist auf <http://www.cazy.org/> abrufbar [Cantarel et al. (2009); Henrissat (1991); Henrissat & Davies (1997)]. Familie GH1 umfasst fast 62 β -Glucosidasen von Archaeobakterien, Pflanzen, Säugetieren und enthält ebenfalls 6-Phosphoglucosidasen und Thioglucosidasen. Die meisten Familie GH1 Enzyme zeigen auch eine signifikante β -Galactosidase-Aktivität [Bhatia et al. (2002)]. Zusätzlich wurden die GH1 Glucosidasen als Mitglieder der 4/7 Super Familie mit einer gemeinsamen $(\beta/\alpha)_8$ -Fass Struktur (8 verdrehte, parallele Beta-Faltblätter in Form eines Fasses; die α -Helices, die die Fassanteile miteinander verbinden, liegen außerhalb [Löffler et al. (2007), S. 69–79]). Familie GH3 der Glykosylhydrolasen enthält nahezu 44 β -Glucosidasen, die von Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen stammen [Bhatia et al. (2002)].

3.3.3.2 Herkunft

3.3.3.2.1 pflanzliche β -Glucosidasen

Trauben besitzen ein Enzym mit einer β -Glucosidase-Aktivität, allerdings wurde nur eine geringe α -Rhamnosidase, α -Arabinosidase oder β -Apiosidase-Aktivität festgestellt [Günata et al. (1990b); Maicas & Mateo (2005); Mateo & Jiménez (2000)]. Außerdem zeigen die Trauben- β -Glucosidasen eine geringe Stabilität und ebenfalls eine geringe Aktivität bei den Traubensaft bzw. weinähnlichen pH-Werten [Lecas et al. (1991)]. Ähnliche β -Glucosidase-Aktivität wurde in Rebenblättern beobachtet [Günata et al. (1990b); Mateo & Jiménez (2000)]. Überdies weisen β -Glucosidasen pflanzlicher Herkunft eine geringere Aktivität bei Terpen-Monoglykosiden mit einer tertiären Alkoholgruppe (Linalool, α -Terpineol) auf und sind meist nur fähig Terpen-Monoglykosiden mit primärer Alkoholgruppe (Geraniol, Nerol, Citronellol) zu hydrolysieren [Aryan et al. (1987); Günata et al. (1990b); Mateo & Jiménez (2000)]. Günata et al. (1998) zeigten, dass eine Endo-Glucosidase aus der Traubenhaut fähig ist die heterosidische Bindung von Disaccharide-Glykosiden zu Disaccharid

und Aglykon zu spalten und das Enzym ist ziemlich tolerant gegenüber einer Glucose-Inhibition ist.

3.3.3.2 mikrobielle β -Glucosidasen

- **Hefe β -Glucosidasen:**

Hefen zeigen ebenfalls β -Glucosidase-Aktivität und können so das sortentypische Aroma von Rebsorten beeinflussen [Rosi *et al.* (1994)]. Bei Hefen handelt es sich um endogene β -Glucosidasen. Einige Hefen weisen eine β -Glucosidase-Aktivität auf, wie z. B. *Hansenula41*, *Candida molischian42a*, *C. wickerhamii43*, werden meist aber durch höhere Glucose-Konzentrationen inhibiert [Grossmann *et al.* (1987)]. Die meisten *Saccharomyces* Stämme zeigen hingegen keine β -Glucosidase-Aktivität, lediglich ein Hefe-Stamm der *Saccharomyces cerevisiae* von 153 wies eine β -Glucosidase-Aktivität auf [Rosi *et al.* (1994)]. Daher sind non-*Saccharomyces* β -Glucosidasen für die Entwicklung des sortentypischen Weinaromas wichtig [González-Pombo *et al.* (2011)]. Die Vorgänge bei *Saccharomyces cerevisiae* sind komplexer, da diese Hefe fähig ist das Terpenprofil von Wein zu ändern (Umwandlung von Geraniol und Nerol zu Citronellol). Die Intensität der Umwandlung hängt allerdings vom Stamm der Hefe ab [Dugelay *et al.* (1992)]. Daneben weisen ebenfalls einige Daten auf eine β -Glucosidase-Aktivität von weiteren önologischen Hefestämmen hin und die damit verbundenen technologischen Vorteile dieser Enzyme, wie z. B. Glucose tolerant, allerdings werden diese durch Ethanol inhibiert [Mateo & Di Stefano (1997)].

- **bakterielle β -Glucosidasen:**

Zu Milchsäurebakterien gibt es nur wenige Daten zur β -Glucosidase-Aktivität in der Weinherstellung, wie z. B. *Oenococcus oeni* als vorteilhaft für das Weinaroma beschrieben sind [Maicas *et al.* (1999a)]. Über wirksame β -Glucosidase-Aktivitäten einiger *O. oeni* Stämme wurde bereits berichtet [Barbagallo *et al.* (2004); D'Incecco *et al.* (2004)]. Zusätzlich entdeckten Mansfield *et al.* (2002), dass einige *O. oeni* Stämme β -Glucosidase-Enzyme produzieren. Kommerzielle Enzyme für den önologischen Gebrauch werden meist aus Pilz- weniger aus bakteriellen Quellen isoliert [Capaldo *et al.* (2011)]. Allerdings benötigen Bakterien meist ein niedrigeres pH-Optimum zum Wachstum als Pilze und sind daher fähig auch bei rauen Bedingungen nach

der alkoholischen Gärung mit bis zu 15 Vol.-% Ethanol zu wachsen [Henick-Kling (1993)]. Daraus ist zu schließen, dass Enzyme, die von Bakterien stammen, potentiell besser für weinähnliche Bedingungen geeignet sind.

3.3.3.2.3 fungale β -Glucosidasen

- **Exogene β -Glucosidasen:**

Die geeignetsten Enzympräparate bei der Weinherstellung, besitzen eine β -D-Glucopyranosidase, α -L-Arabinofuranosidase, α -L-Rhamnopyranosidase und β -D-Apiofuranosidase-Aktivität [Cordonnier et al. (1989)] und werden meist aus *Aspergillus niger* gewonnen. Diese Enzyme kommen in kommerziell erhältlichen Präparaten meist nur in geringen Mengen vor. Hauptsächlich weisen sie eine β -D-Apiosidase-Aktivität auf [Günata (1994)]. Eine Bestimmung der freien flüchtigen Verbindungen (Terpene, Norisoprenoide und flüchtige Phenole) zeigt, dass die Konzentrationen bei Enzym-behandelten Weine stark zunehmen (265 bis 2000 %) und zwar nicht nur bei Aromasorten, sondern auch bei neutralen Rebsorten [Günata et al. (1990c) durch Mateo & Jiménez (2000)].

Allerdings ist eine Freisetzung des glykosidisch gebundenen Aromas aus dem einfachen Grund meist nur in trockenen Weinen erfolgreich, da β -Glucosidasen in fungalen Enzympräparaten durch den geringeren Anteil an Glucose kaum gehemmt werden können. Eine Hydrolyse der Terpenglykoside in süßen Weinen ist daher meist nicht komplett bzw. sehr schwach [Günata et al. (1990c) durch Mateo & Jiménez (2000)].

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

3.3.3.3 Struktur

β -Glucosidasen haben eine Vielzahl von Strukturen, allerdings ist die Faltung des katalytischen Bereiches bei allen β -Glucosidasen der GH-Familie ähnlich [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Der Clan GH-A, zu dem GH1, GH5 und GH 30 gehören, haben alle ähnliche (β/α)₈-Fass Bereiche, die die aktiven Zentren enthalten [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Deren aktive Zentren enthalten zwei konservierte Carbonsäurereste auf den β -Strängen 4 und 7 und dienen als katalytische Säure/Base und als Nucleophil [Henrissat et al. (1995); Jenkins et al. (1995)]. Die Länge und Subunit-Masse der GH1 Enzyme variiert beträchtlich, abhängig von der

Anwesenheit von Hilfs- und redundanter GH1-Bereichen. Allerdings variiert der katalytische Bereich von 440 bis 550 Resten, abhängig von der Länge der variablen Schleifen an den C-terminalen Enden der β -Stränge der $(\beta/\alpha)_8$ -Fässer [Sanz-Aparicio et al. (1998)]. Diese Monomere bilden eine Vielzahl von Quartärstrukturen, einschließlich monomerer Enzyme, Dimere, Tetramere, Hexamere, Octamere und große Aggregate [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Die GH3 β -Glucosidasen haben eine Zwei-Domän-Struktur, eine $(\beta/\alpha)_8$ -Fass gefolgt von einem α/β -Sandwich, was eine 6-strängige β -Seite zwischen drei α -Helices auf der anderen Seite einklemmt [Varghese et al. (1999)]. Das aktive Zentrum der GH3 Enzyme liegt zwischen der $(\beta/\alpha)_8$ - und $(\alpha/\beta)_6$ -Sandwich Domäne, von denen jedes einen katalytischen Carboxylat-Rest besitzt. Das katalytische Nucleophils der Gerste *Exo I* ist ein Aspartat beim Rest D285, was sich auf der Schleife nach dem β -Strang 7 der $(\beta/\alpha)_8$ Barrel befindet, während die katalytische Säure/Base Glutamat E491 ist, was sich auf einer langen Schleife von der $(\alpha/\beta)_6$ -Sandwich Domäne erstreckt [Hrmova et al. (2001)].

Im Rahmen der Arbeit werden vier Enzym-Präparate (AR 2000, Lallzym β , Cellulase und Mandel- β -Glucosidase) eingesetzt. Ausgehend von den verwendeten Präparaten kann anhand der Herkunft die Familie der β -Glucosidase lediglich anhand der Datenbank von www.cazy.org und der Häufigkeit des Vorkommens abgeschätzt werden, da zu den verwendeten Präparaten keine entsprechenden Daten vorliegen. AR 2000 und Lallzym β stammen beide aus *Aspergillus niger*, d.h. es handelt sich wahrscheinlich um eine GH3- oder GH1-Glucosidase. Bei der vorliegenden Cellulase von *Trichoderma longibrachiatum* handelt es sich wahrscheinlich um die Familie GH1. Allerdings – egal ob GH1 (Clan GH-A) oder GH3 (kein Clan) – beide hydrolysieren nach dem Retaining-Mechanismus. GH1 weist eine $(\beta/\alpha)_8$ -Struktur auf und das katalytische Nucleophil bzw. Base ist die Glutaminsäure, die gegebenenfalls Säure ist. Bei GH3 ist das katalytische Nucleophil bzw. Base die Asparaginsäure und die Säure wieder die Glutaminsäure. Zur eingesetzten β -Glucosidase aus Mandeln lassen sich leider keine Daten finden. Auf Grund ihrer pflanzlichen Herkunft ist davon auszugehen, dass es sich um eine GH1-Glucosidase handelt.

3.3.3.3.1 aktives Zentrum

Mit Hilfe des substratanalogen Inhibitors Conduritol B Epoxid konnte die Beteiligung einer Carboxylgruppe an der Katalyse nachgewiesen werden [Belitz et

al. (2001), S. 102-103 Abb. 2.22]. Abb. 7 zeigt eine β -Glucosidase in Verbindung mit pNPG, welches im aktiven Zentrum gebunden ist. Abb. 8 zeigt Bindungsreaktionen des aktiven Zentrums mit pNPG. Allerdings stellen die beiden Abbildungen nur exemplarisch für eine bestimmte β -Glucosidase die Bindungsreaktionen des aktiven Zentrums dar. Je nach Herkunft variieren die räumliche Struktur und damit ebenfalls die möglichen Bindungsreaktionen.

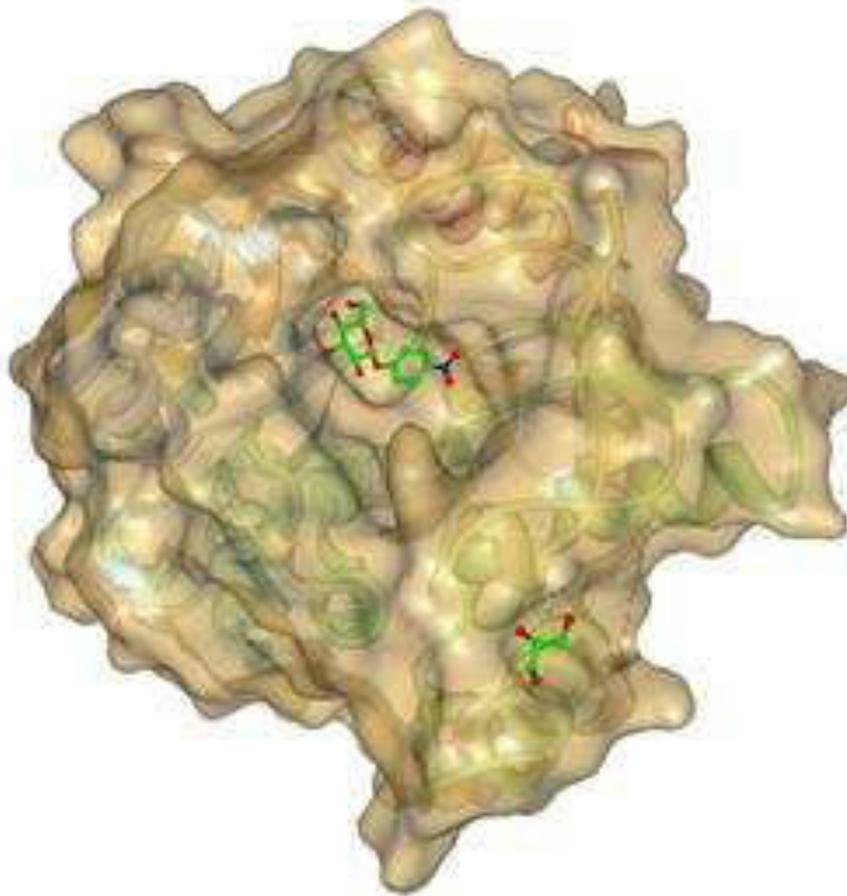


Abb. 7 Struktur einer β -Glucosidase (Herkunft: *termite Neotermes koshunensis*) im Komplex mit pNPG [Jeng et al. (2011)]. PDB ID: 3A10

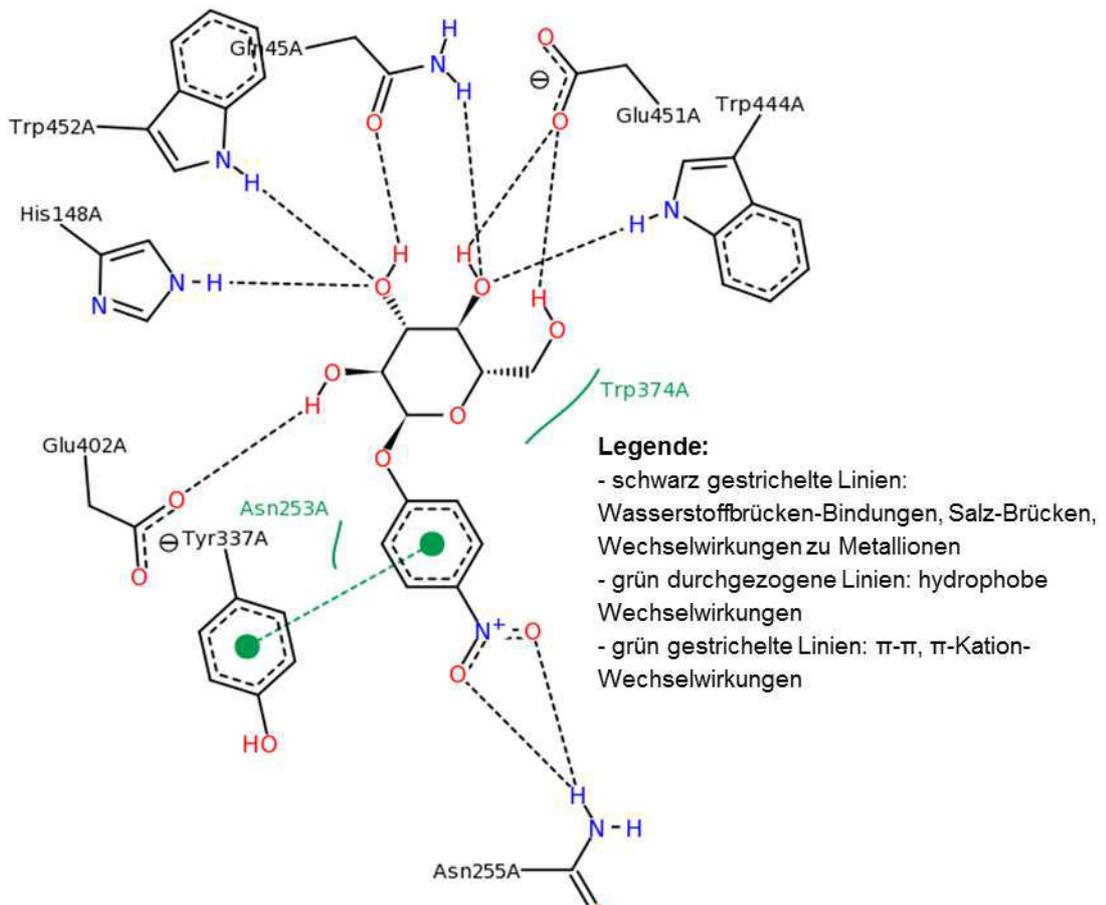


Abb. 8 Bindungsreaktionen aktives Zentrum β -Glucosidase von *termite Neotermes koshunensis* und pNPG [Jeng et al. (2011)] by PoseView [Stierand et al. (2006)] PDB ID: 3A10

3.3.3.4 Katalytischer Mechanismus

Es gibt zwei Mechanismen wie die Glykosid-Hydrolyse abläuft, ein Mechanismus unter Inversion („Inverting“) und einer unter Beibehaltung der Chiralität am anomeren Kohlenstoffatom („Retaining“) [Park et al. (2002)]. Beide Mechanismen verwenden ein Paar von sauren und nucleophilen Resten, i. d. R. Carbonsäuren, auf jeder Seite des Zuckers, im Retaining-Mechanismus (B) mit einem Abstand ungefähr 5 Å und von 10 Å im Inverting-Mechanismus (A). Hier muss ein Wassermolekül zwischen die katalytische Base und das Substrat passen (s. Abb. 9) [Ketudat Cairns & Esen (2010)].

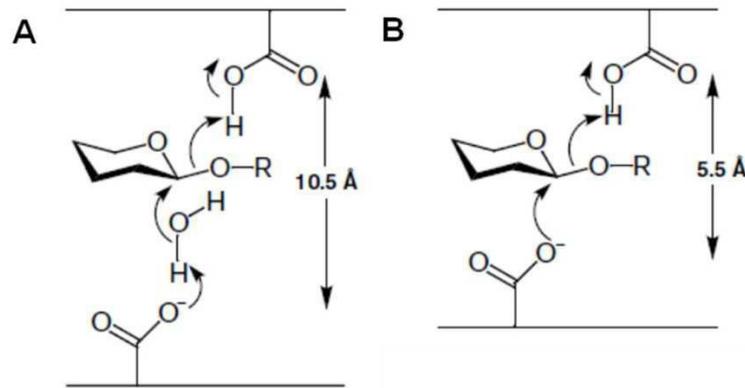


Abb. 9 Abstand zwischen den sauren und nucleophilen Resten [Rye & Withers (2000)]

GH9 Enzyme sind die ersten β -Glucosidasen, die den Inverting-Mechanismus verwenden, was ungewöhnlich ist, da alle anderen beschriebenen β -Glucosidasen nach dem Retaining-Mechanismus arbeiten. Beim **Inverting-Mechanismus** macht ein aktiviertes Wasser-Molekül einen direkten nucleophilen Angriff auf das anomere Kohlenstoffatom um das Aglykon in einem Schritt abzutrennen [Qi et al. (2008)]. Die katalytische Base zieht ein Proton aus dem ankommenden Wassermolekül, während die katalytische Säure die verlassende Aglykon-Gruppe protoniert [Ketudat Cairns & Esen (2010)].

Der allgemein akzeptierte Mechanismus für die Hydrolyse der β -Glucosidasen ist der **Retaining-Mechanismus** unter Beibehaltung der anomeren Konfiguration, wie z.B. bei GH Clan A und den Familien GH1, GH3 und GH30 der β -Glucosidasen. Der Glucose-Rest wird bei der Bindung an das Enzym in Vorbereitung zur Bildung des 4H_3 der Halb-Sesselkonformation des beabsichtigten Übergangszustands in eine 1S_3 Skew-Boot verzerrt [Rye & Withers (2000)]. Die Katalyse läuft in zwei Schritten ab: Glykolysierung und Deglykolysierung [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Beim ersten Schritt der Glykolysierung gibt die katalytische Säure ein Proton an das Aglykon ab, während das katalytische Nucleophil von der gegenüberliegenden Seite unter Bildung eines α -verknüpften, kovalenten Enzym-Glykon-Zwischenproduktes angreift. Im zweiten Schritt – der Deglykolysierung – wird der Prozess wieder umgekehrt. Die katalytische Base (die gleiche Carboxylatgruppe wie bei der katalytische Säure) entzieht ein Wassermolekül, was die nucleophile Energie erhöht, um das anomere Kohlenstoffatom anzugreifen und das katalytische Nucleophil wieder von der Glucose zu verdrängen. Abb. 10 gibt beide Mechanismen wieder.

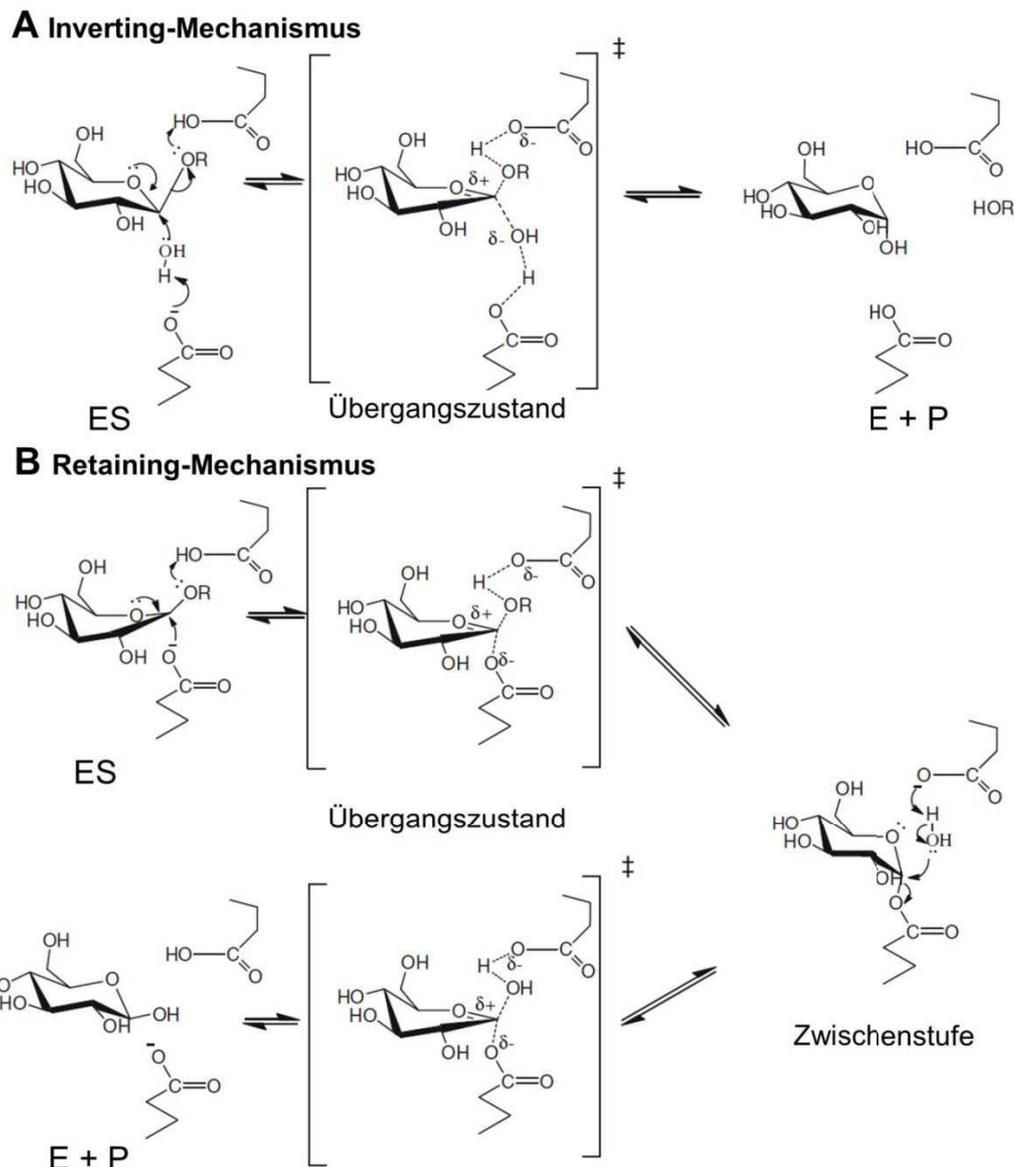


Abb. 10 Mechanismus von Retaining- und Inverting-Glucosidasen [übersetzte Darstellung [Ketudat Cairns & Esen (2010)]]

3.3.3.5 Einflussfaktoren auf den katalytischen Mechanismus

3.3.3.5.1 Substratspezifität

Die GH1 Enzyme besitzen eine ziemlich breite Glykon-Spezifität. *Marana* (2006) analysierte die Spezifität der GH1 Enzyme und kam zum Schluss, dass konserviertes Glutamat, was die Glykon-Hydroxylgruppen 4 und 6 in Enzymen mit einer β -Glucosidase- und β -Galactosidase-Aktivität überbrückt, aber in 6-phospho-Glucosidasen ersetzt, von entscheidender Bedeutung für die Unterscheidung zwischen den Enzymen ist. Außerdem wurde beobachtet, dass die Bindung des Aglykons ebenfalls einen Effekt auf die Zucker-Bindungsstelle hat [Czjzek et al. (2000); Verdoucq et al. (2003)], so dass ein Einfluss auf die Glykon-

Spezifität durch weiter entfernte Reste in der Substrat-Bindungstasche nicht ausgeschlossen werden kann [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Allerdings haben einige GH1 Hydrolasen gezeigt, dass die unterschiedlichen Reste nicht der einzige Grund für die Substratspezifität sein können [Cicek et al. (2000); Verdoucq et al. (2004)]. Es kann festgehalten werden, dass im Gegensatz zu stark/hoch konservierten Glykon-Bindungsstelle andere Reste der aktiven Bindungsstellen sich so ergänzend gegenseitig beeinflussen, sofern diese sich überlappen, um mit dem Aglykon in jeder GH1 Glucosidase, die bis dato untersucht wurden, zu interagieren [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Turan & Zheng (2005) zeigten ebenfalls bei β -D-glykosidisch gebundenen Substraten, dass die Aktivität der β -Glucosidase stark vom vorherrschenden Substrat abhängt.

3.3.3.5.2 Kinetische Parameter für die Substrat-Hydrolyse

β -Glucosidasen haben unterschiedliche kinetische Parameter bei den jeweiligen Substraten [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Die K_m -Werte für natürliche vorkommende Substrate und andere gute Substrate liegen üblicherweise bei 1 mM oder weniger, allerdings variieren diese Werte grob um 1000-fache. Wenn β -Glucosidasen mit unterschiedlicher Effizienz sich in der Fähigkeit das Aglyka wieder zu verdrängen unterscheiden, ist der limitierende/geschwindigkeitsbegrenzende Schritt die Glykosylierungsreaktion. Unterscheidet sich allerdings das Substrat im Glykon, ist die Glykosylierung-, Deglykosylierungs-Schritt oder beide der limitierende Schritt [Ketudat Cairns & Esen (2010)].

3.3.3.5.3 Inhibitoren und Cofaktoren

β -Glucosidasen werden durch das Zucker-Analog im Übergangszustand, substratanaloge Glykoside und durch freie Aglyka des Substrats, sowie durch nur langsam hydrolysierte Substrate gehemmt [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Da sich die Aglykon- und Glykon-Bindungstaschen im aktiven Zentrum unterscheiden, können Zucker-Analoga, die ähnlich wie die Halb-Sessel-Konformation des Übergangszustandes ausgeprägt sind, so an die Glykon-Bindungsstelle binden und das Enzym inhibieren, wohingegen freie Aglyka an die Aglykon-Bindungsstelle binden können. Freie Glucose ist ein schwacher Inhibitor (üblicherweise $K_i = 100 - 200$ mM), da Glucose erst zur Halb-Sessel-Konformation verformt werden muss, um an die Glykon-Bindungsstelle anzudocken, wobei angenommen wird, dass dazu ein Teil der Energie der

Aglykon-Bindung benötigt wird [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Im Gegensatz dazu können freie Aglyka wirksame kompetitive Inhibitoren sein, da sie ohne energetisch ungünstig Verformung an die Aglykon-Bindungsstelle binden können [Ketudat Cairns & Esen (2010)].

Die meisten Metall-Ionen inhibieren die β -Glucosidasen, z.B. sind Ag^+ und Hg^{2+} wirksame Inhibitoren [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Von einer Hemmung ebenfalls durch Cu^{2+} und Fe^{3+} Ionen berichtet wurde [Ketudat Cairns & Esen (2010); Zollner (1990), S. 94–95].

3.3.3.5.4 pH und Temperatur Optima und Stabilität

Aufgrund ihrer Herkunft und Aminosäure-Sequenz zeigen β -Glucosidasen eine Reihe von pH-Optima und Stabilitäten [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Die Optima der meisten β -Glucosidasen variieren zwischen pH 4,0 und 7,5 und zeigen eine Stabilität zwischen pH 4,0 und 9,0.

Ähnlich sieht es bei der Temperaturstabilität und den Temperatur Optima aus. Auch diese variieren sehr stark und hängen äußerst stark von der Herkunft der Enzyme ab. Mesophile β -Glucosidasen weisen die höchste Aktivität bei 30 – 65 °C auf, werden allerdings im Allgemeinen über 55 – 70 °C inaktiviert [Chuankhayan et al. (2005); Dharmawardhana et al. (1995); Nagano et al. (2005); Nisius (1988)]. Eine höhere Aktivität bei Temperaturen oberhalb der Extreme der natürlichen Enzym-Bedingungen ist physiologisch nicht relevant und könnte zu einer schnellen Hitze-Denaturierung führen. Daher werden Enzym-Aktivitäts-Assays meistens zwischen 30 bis 40 °C durchgeführt [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Eine höhere Temperaturstabilität einiger thermophilen Enzyme, im Vergleich zu mesophilen Enzymen, wird auf die steigende Anzahl an Prolin-Resten, elektrostatische Brücken, internen Wasser-Molekülen und die Bindung von mehreren Untereinheiten in der quartären Struktur zurückgeführt [Chi et al. (1999)].

3.3.4 ausgewählte Enzympräparate

Nach Auskunft des DLR Mosel (2012) kommen bei den Winzern verschiedene Enzympräparate zur Aroma-Verbesserung/Freisetzung zum Einsatz. Das Präparat AR 2000 (Fa. DSM food), wird dabei am häufigsten verwendet, Panzym Arome (Fa. BEGEROW) und Lallzym β (Fa. Lallemand) werden ebenfalls häufig

eingesetzt, weniger zum Einsatz kommt das Präparat Trenolin Bukett DF (Fa. Erbslöh).

Insgesamt wurden bei dieser Masterarbeit 4 verschiedene Enzympräparate eingesetzt. Zwei Enzympräparate, Lallzym β und AR 2000, sind speziell für den Einsatz in Most und Wein entwickelt worden. Die Cellulase und β -Glucosidase (beide von Sigma Aldrich) wurden als mögliche Alternativen ausgewählt, um den Einfluss von Enzymen, die nicht speziell für die Weinverarbeitung hergestellt wurden, darzustellen. Außerdem besonders war der Einsatz bzw. die Wirkung einer reinen β -Glucosidase ohne Kombination mit anderen pektolytische Enzymen interessant.

3.3.4.1 Lallzym β

Lallzym β ist speziell für den Einsatz im Most und Wein gedacht und stellt eine Kombination verschiedener Enzyme dar, um gezielt Aroma freizusetzen. Lallzym β besitzt eine pektolytische Hauptaktivität und weist zusätzlich eine β -Glucosidase-, Arabinosidase- und Rhamnosidase-Nebenaktivität auf. Gewonnen wird das Enzympräparat aus *Aspergillus niger*. Das Präparat ist mikrogranuliert. Eine Verwendung von Lallzym β soll eine signifikante Aromaverstärkung bei Rebsorten mit größerem Terpenegehalt (Riesling, Müller-Thurgau, Muskat, Gewürztraminer) hervorrufen.

Lallzym β benötigt eine Mindest-Temperatur von 12 °C und sollte mindestens 3 Wochen im Wein/Most verbleiben.

Anwendung:

Nach Herstellerangaben sollte eine Zugabe von Lallzym β sofort nach Abschluss der alkoholischen Gärung erfolgen, um so die höheren Temperaturen der Gärung zu nutzen. Durch eine anschließende Bentonitschönung wird die Enzymaktivität gestoppt.

Dosierung:

5 g pro hl Weißweinmost

5 - 7 g pro hl Weißwein

bis 10 g pro hl Wein mit Restsüße

[Dipl. Ing. Thonhauser GmbH (20.03.2012); Fa. Lallemand (20.03.2012)]

3.3.4.2 AR 2000

Ähnlich wie das Lallzym β ist das Enzympräparat AR 2000 von DSM Food speziell für den Einsatz im Most und Wein entwickelt und stellt ebenfalls eine Kombination verschiedener pektolytische Enzyme dar. AR 2000 besitzt GRAS-Status und ist ein pektolytisches Enzym gewonnen aus *Aspergillus niger* und. AR 2000 besitzt eine spezifische β -Glucosidase-Nebenaktivität auf, um so glykosidische Aroma-Präkursoren freizusetzen. Das Präparat ist mikrogranuliert.

Anwendung:

Nach Herstellerangaben sollte sine Zugabe von AR 2000 ebenfalls am Ende der alkoholischen Gärung vorgenommen werden.

AR 2000 ist in einem weiten Bereich von 10 bis 50 °C und einem pH-Bereich von 2,8 bis 5,0 aktiv. Durch eine anschließende Bentonitschönung wird die Enzymaktivität gestoppt (10 g/hl Bentonit). AR 2000 erlaubt eine Kontaktzeit von 2 bis 10 Wochen mit dem Wein.

Dosierung:

2 – 3 g/hl in den Most/Wein.

[DSM Food (28.03.2012)]

3.3.4.3 Cellulase

Die Cellulase von Sigma-Aldrich ist im Gegensatz zur den beiden vorherigen Enzympräparaten nicht für den Einsatz im Most und Wein entwickelt. Allerdings weist dieses Enzympräparat eine β -Glucosidase Nebenaktivität auf und ist daher interessant für den Einsatz im Most und Wein. Gewonnen wird dieses Enzympräparat aus *Trichoderma longibrachiatum*.

Es handelt sich hier um eine Säure-Cellulase mit Xylanase, Pectinase, Mannanase, Xyloglucanase, Laminarase, β -Glucosidase, β -Xylosidase, α -L-Arabinofuranosidase, Amylase, und einer Protease-Aktivität. Dieses Enzympräparat ist ein Pulver.

[Fa. Sigma Aldrich (02.04.2012)]

3.3.4.4 β -Glucosidase

Die β -Glucosidase von Sigma-Aldrich wird aus Mandeln isoliert und ist lyophilisiert. Dieses Präparat ist im Gegensatz zu den drei vorherigen keine Kombination von verschiedenen pektolytischen Enzymen.

[Fa. Sigma Aldrich (29.03.2012)]

3.4 Analytik

3.4.1 UV/Vis-Spektrometrie Photometrie

Die Photometrie gehört zu den Standardverfahren in der Analytik. Die Grundlage ist die elektromagnetische Strahlung, deren Energie im ultravioletten (UV) oder sichtbaren (Vis) Bereich liegt. Optische, spektroskopische bzw. spektrometrische Verfahren beruhen auf einem gemeinsamen Merkmal, der Wechselwirkung von Materie und Energie in Form von Strahlung. In der Lebensmittelanalytik werden besonders die UV/Vis- und die IR-Spektrometrie eingesetzt, da diese wichtige Hinweise auf die Probenzusammensetzungen geben können [Matissek et al. (2010), S. 379]:

- qualitative Interpretationen der Spektren ermöglichen eine Identifizierung einzelner Strukturelemente oder auch ganzer Strukturelemente
- quantitative Bestimmungen werden besonders durch photometrische Analyseverfahren durchgeführt

Bei der UV/Vis-Photometrie wird elektromagnetische Strahlung (Energie im UV bzw. Vis-Bereich) unter bestimmten Voraussetzungen beim Durchgang durch eine Probe absorbiert. Diese Absorption der Lichtquanten beruht auf Elektronenübergängen zwischen diskreten Energiezuständen der Moleküle in der Probe, die Übergänge erfolgen meist zwischen einem bindenden Orbital oder dem Orbital eines einsamen Elektronenpaares und einem nicht-bindenden oder antibindenden Orbital [Matissek et al. (2010), S. 380].

Aufgenommen werden die Spektren meist von sehr verdünnten Lösungen in entsprechenden Lösungsmitteln (i.d.R. Wasser, Ethanol oder Kohlenwasserstoffe). In einer für die Messung geeigneten Küvette (je nach Wellenlängenbereich und Lösungsmittel aus Quarz, Glas oder Kunststoff) mit einer Schichtdicke von (üblicherweise) 1 cm wird die zu messende Lösung im Photometer in den Probenstrahl eingesetzt.

Das UV/Vis-Spektrum zeigt die Extinktion E in Abhängigkeit der Wellenlänge λ . Sind die Lösungen hinreichend verdünnt, besteht zwischen der Konzentration c der absorbierenden Moleküle und der Durchlässigkeit D der Probe gegenüber der UV/Vis-Strahlung ein Zusammenhang. Die Extinktion E , negativer dekadischer Logarithmus der Durchlässigkeit, ist ein Parameter, der zur Konzentration c direkt

proportional ist und im Allgemeinen direkt aus den UV/Vis-Spektren abgelesen werden kann [Formel (1)].

Formel (1)

$$E_{\lambda} = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \varepsilon_{\lambda} * c * d$$

Lambert-Beer'sches Gesetz

- E_{λ} : Extinktion der Probe bei der Wellenlänge λ
 I_1 : Intensität der Strahlung nach Durchgang durch die Probe
 I_0 : Intensität der Strahlung vor Durchgang durch die Probe (entsprechend der Intensität des Referenzstrahls)
 ε_{λ} : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei einer Wellenlänge λ
 c : Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit
 d : Schichtdicke der Küvette

Eben dieser lineare, für hinreichend verdünnte Lösungen gültige Zusammenhang bildet die Grundlage der photometrischen Verfahren.

Die quantitative Auswertung der UV/Vis-Spektren bekannter Substanzen beruht auf diesem Gesetz. Allerdings muss nicht über den ganzen Spektrenbereich gemessen werden, sondern nur bei einer Wellenlänge (dem Absorptionsmaximum). In der Regel wird zuerst die Extinktion von Lösungen ermittelt, die die zu bestimmende Substanz in genau definierten Konzentrationen enthalten (Standardlösungen). Aus diesen Werten wird dann eine Kalibrierkurve bzw. –gerade erstellt. Durch Interpolation kann daraus mit dem Extinktionswert der aufbereiteten Probe die Konzentration der untersuchten Substanz rechnerisch (graphisch) ermittelt werden [Matissek et al. (2010), S. 380-382].

3.4.2 Aktivitätsbestimmung der β -Glucosidase

In der Literatur werden zahlreiche Methoden zur Aktivitätsbestimmung von β -Glucosidasen beschrieben [Barbagallo et al. (2007); Barbagallo et al. (2002); Barbagallo et al. (2004); Blondin et al. (1983); Capaldo et al. (2011); Chang & Juang (2007); D'Incecco et al. (2004); Dopico et al. (1989); Fia et al. (2005); Gallifuoco et al. (1999); Gallifuoco et al. (1998); Gautam & Simon (2006); González-Pombo et al. (2011)]. Die meisten dieser Methoden basieren auf der von Blondin et al. (1983) veröffentlichten Methode. Dabei handelt sich prinzipiell um ein β -glykosidisch verbundenes Glucopyranosid, in den meisten Fällen fungiert

p-Nitrophenol als Aglykon. Nach Spaltung der glykosidischen Bindung durch die β -Glucosidase kann das freigesetzte *p*-Nitrophenol anschließend im alkalischen Milieu photometrisch bei 400 nm erfasst und mittels molaren Extinktionskoeffizient mengenmäßig bestimmt werden. Das Substrat *p*-Nitrophenol- β -D-Glucopyranosid ist ein farbloses Pulver, während *p*-Nitrophenol ein gelbes Pulver mit einem Absorptionsmaximum von ca. 400 nm unter alkalischen Bedingungen ist (vgl. Abb. 11). In der RESOLUTION OENO 5/2007 des internationalen önologischen Kodex wird ebenfalls eine β -D-Glucosidase-Aktivität mittels pNPG bei 400 nm durchgeführt.

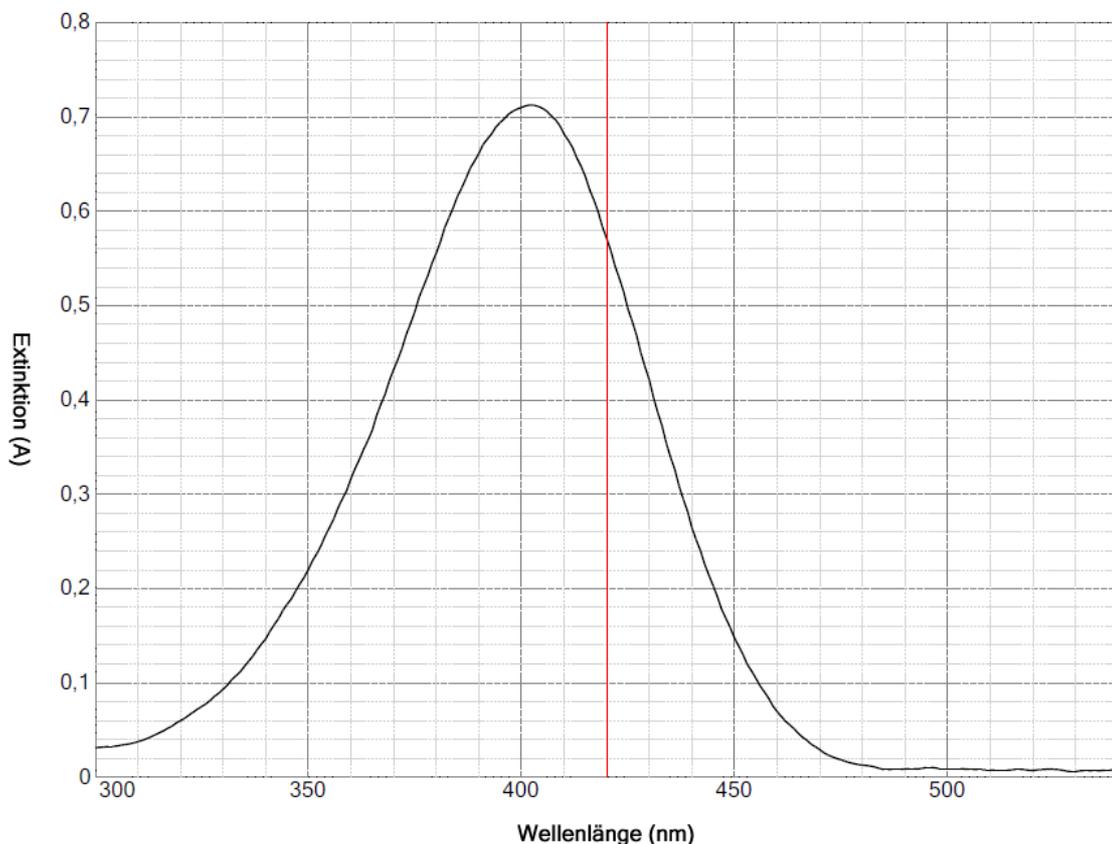


Abb. 11 Spektrum von pNP (0,1 ml 1 mM pNP-Lösung in 3 ml 1M Na₂CO₃-Lösung), Absorptionsmaximum liegt bei 402 nm mit einer Extinktion von 0,713

Daneben beschreibt eine weitere Methode von Sigma-Aldrich die Erfassung der Aktivität der β -Glucosidase mittels des natürlichen Glykosids *Salicin* [Sigma-Aldrich (1994)]. Dabei wird die freigesetzte Glucose nach Nelson (1944) & Somogyi (1952) bestimmt. Angewendet wurde diese Methode ebenfalls in einer Bachelorarbeit der FH Trier [Schäfer (2012)]. Der Nachteil dieser Methode ist zum einen, dass die Methode deutlich Zeit intensiver ist und dadurch, dass bei jeder Versuchsreihe eine Kalibrierreihe gemacht werden muss auch, wesentlich aufwendiger. Außerdem bereitet eine Erfassung der Aktivität über die freigesetzte

Glucose Probleme bei einer Änderung der Bedingungen, z. B. um den Einfluss von Glucose oder Fructose auf eine β -Glucosidase zu erfassen. Eine photometrische Bestimmung des *p*-Nitrophenol bietet den Vorteil, dass unmittelbar nach der Inkubation der Proben, diese photometrisch ohne weitere Aufarbeitung vermessen werden können. *Romero et al.* (1985) hat einen Vergleich der pNPG-Methode (α -L-Rhamnosid) mit einer HPLC Methode publiziert. Laut *Romero et al.* (1985) bietet eine photometrische Aktivitätsbestimmung der β -Glucosidase mittels pNPG ebenfalls zahlreiche Vorteile. Die Methode ist spezifisch für die Bestimmung der β -Glucosidase Aktivität, im Gegensatz zur photometrischen Methode von Nelson-Somogyi [*Nelson* (1944); *Somogyi* (1952)] für reduzierende Zucker. Die photometrische Methode ist genauso spezifisch wie die HPLC Variante, allerdings deutlich schneller und günstiger. Hinzu kommt eine hohe Sensitivität dieser Methode für pNP unter alkalischen Bedingungen (s. Tab. 17 und Tab. 18, S. 70-71).

Außerdem muss beachtet werden, dass je nach verwendetem Substrat unterschiedliche Aktivitäten gemessen werden. *o*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid zeigt im Vergleich zu *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid eine 116 % höhere Aktivität, wo hingegen Salicin und D(+)-Cellobiose lediglich eine relative Aktivität von 10,4 bzw. 12,9 % aufweisen [*Turan & Zheng* (2005)]. Da, wie weiter oben beschrieben, in der Literatur als Substrat fast ausschließlich *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid verwendet wird, macht für eine Vergleichbarkeit der Aktivitäten die Verwendung von *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid ebenfalls weiter Sinn.

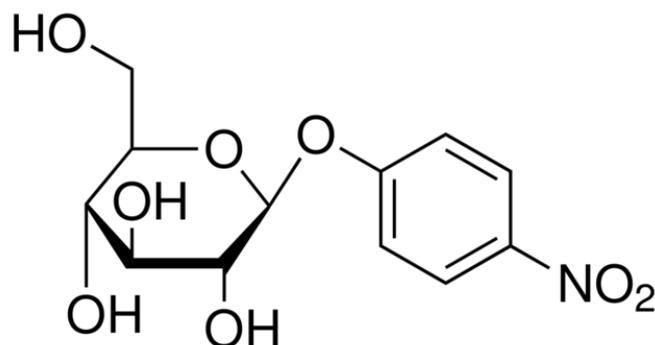


Abb. 12 *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid [Fa. *Sigma Aldrich* (28.03.2012)]

Das *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (Abb. 12) hat die CAS-Nummer 2492-87-7 und ein Molekulargewicht von 301,26 g/mol.

3.4.2.1 Messgrößen und Einheiten

Die katalytische Aktivität eines Enzym wird unter definierten Versuchsbedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur, Art des Puffers, Cofaktoren) ermittelt. Die Wirkung des Enzyms bei einem solchen Reaktionsansatzes wird als Geschwindigkeit des Substrat-Umsatzes oder Produktbildung gemessen. Die Geschwindigkeit wird üblicherweise in der SI-Einheit $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ in Katal [kat] gemessen, d.h. Umsetzung an Mol Substrat pro Sekunde [Belitz et al. (2001), S. 95].

In der Literatur wird allerdings größtenteils noch die etwas ältere Definition „Unit“ [U] verwendet. 1 U ist definiert als die Menge an Enzym, die benötigt wird um 1 mmol Substrat pro Minute umzusetzen [Gueguen et al. (1997)].

Umrechnung und Definition von Unit in Katal:

$$\begin{aligned}1 \text{ U} &= 1 \mu\text{mol}/\text{min} \\1 \text{ U} &= 1,667 \cdot 10^{-8} \text{ kat}\end{aligned}$$

3.4.3 Isolation der flüchtigen Komponenten in Wein

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Aroma-Komponenten aus Wein zu isolieren. Die konventionelle Methode stellt die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE, engl. liquid/liquid-extraction) dar [Linskens et al. (1988), Chapter 3]. In der Literatur werden einige Methoden beschrieben, bei denen die flüchtigen Komponenten mittels Polymeren adsorbiert werden, dann wieder mit geeignetem Lösungsmittel eluiert werden und anschließend entsprechend destillativ konzentriert werden [González-Pombo et al. (2011)]. Im speziellen ist hier die Festphasenmikroextraktion (SPME, vom engl. **S**olid-**P**hase **M**icro**e**xtraction) zu nennen, die 1989 von Pawliszyn entwickelt wurde [Arthur & Pawliszyn (1990)]. Eine spezielle Form der SPME ist die Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME, engl. **H**eads**p**ace **S**olid-**P**hase **M**icro**e**xtraction). Diese für die Isolation von Aromakomponenten aus Wein wird hauptsächlich verwendet [Bonino et al. (2003); Canuti et al. (2009); De la Calle García et al. (1998a), De la Calle García et al. (1998b); Fan et al. (2006); Kang et al. (2010); Prosen et al. (2007); Rodríguez-Bencomo et al. (2003)]. Vorteile dieser Methode sind kein Lösungsmittelgebrauch und Schnelligkeit. Daneben soll sie laut Kang et al. (2010) für Weinaromen hohe Reproduzierbarkeit und Sensitivität besitzen. Prinzipiell erfolgt die Extraktion bei der HS-SPME über eine Adsorption der flüchtigen Komponenten an einer speziell

beschichteten Faser und einer anschließenden Desorption der flüchtigen Komponenten in dem heißen Injektor der GC/MS [Kang et al. (2010)]. Die hohe Reproduzierbarkeit schuldet die Tatsache, dass alle Arbeitsschritte durch einen Autosampler-Roboter durchgeführt werden und der Mensch als mögliche Fehlerquelle größtenteils ausgeschlossen ist.

In dieser Arbeit wird die SDE angewandt, die sich in einer vorangegangenen Arbeit [Leonhardt (2006)] als sicherste Methode bewährt hat. Im folgenden Abschnitt wird genauer drauf eingegangen.

3.4.3.1 SDE

Die **s**imultane **D**istillation-**E**xtraktion, kurz SDE, gehört zu den am häufigsten zitierten Proben-Vorbereitungen [Chaintreau (2001)]. 1964 entwickelten Likens und Nickerson [Likens & Nickerson (1964)] eine weithin akzeptierte SDE Methode, im Originalen als Gerät für die Hopfen-Öl-Analyse. Abb. 13 zeigt das Prinzip der SDE.

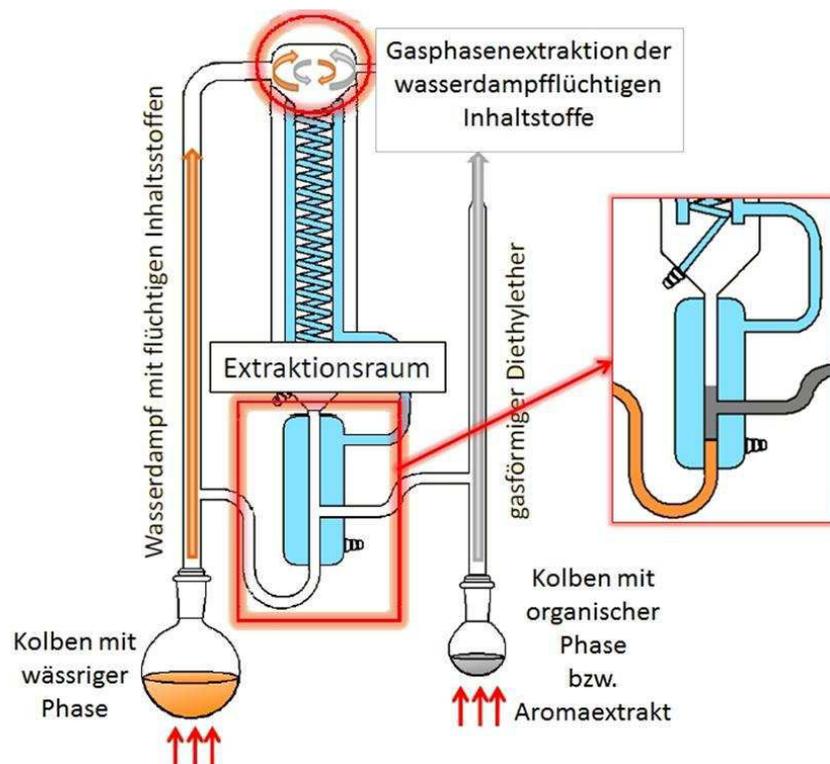


Abb. 13 Prinzip der SDE nach Likens & Nickerson (1964) [angepasste Darstellung nach Hofer (2009)]

Diese Ein-Schritt-Isolation-Konzentration der Aroma Komponenten erlaubt eine drastische Zeiteinsparung über den Trennprozess und durch das kontinuierliche Recycling eine Reduktion an Lösungsmitteln [Chaintreau (2001)].

Prinzipiell wird eine wässrige Probe in einem Rundkolben gekocht und der Wasserdampf steigt in den linken Arm des Apparats. Die flüchtigen Stoffe werden mit Wasserdampf zum oberen Teil des linken Arms destilliert. Simultan wird die organische Phase/ Lösungsmittel ebenfalls destilliert, der Dampf steigt zum oberen Teil der rechten Seite der Apparatur. Der Dampf kondensiert an dem Kühlfinger bzw. Allihnkühler und der Extraktionsprozess beginnt dann zwischen beiden Flüssigkeitsfilmen an der Kondensatoroberfläche. Das Wasser und das Lösungsmittel, gesammelt und im Separator/Extraktionsraum dekantiert, fließt in die jeweiligen Kolben zurück [Chaintreau (2001)]. I. d. R. muss der Extrakt vor einer GC-Injektion nochmals konzentriert werden. Für Hopfenöl-Bestandteile z. B. wurden Wiederfindungsraten von 54 – 99 % erreicht, natürlich abhängig von den verwendeten Komponenten, der Extraktionszeit und dem pH-Wert [Nickerson & Likens (1966)]. Godefroot et al. (1981) ermittelte mit einer Micro-SDE Wiederfindungsraten für weinrelevante Aromastoffe, wie Linalool, von 70 bis 113 %. Auch im Vergleich zu anderen Extraktionsmethoden von flüchtigen Komponenten zeigt die SDE gute Wiederfindungsraten [Chaintreau (2001)]. Viele Parameter, wie Destillation-Extraktion-Zeit und die Wahl des Lösungsmittels, beeinflussen die Wiederfindung der Aromakomponenten, in dieser Arbeit wird auf eine bewährte Methode der TU Dresden [Leonhardt (2006)] zurückgegriffen.

3.4.4 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) gehört zu den chromatographischen Verfahren und beruht auf dem Prinzip der Trennung von Stoffgemischen auf Grund von Wechselwirkungen zwischen einem Analyt, einer mobilen Phase (Eluent) und einer stationären Phase. Dabei ist die stationäre Phase ein Feststoff (Adsorbens, Sorbens) oder eine Flüssigkeit und die mobile Phase ein nicht-lösliches Gas oder eine mit der stationären Phase nichtmischbare Flüssigkeit [Matissek et al. (2010), S. 355].

Die Gaschromatographie im speziellen ist ein Verfahren zur Trennung von flüchtigen Verbindungen in einem Gasstrom über/durch die in einem langen, dünnen Rohr fixierte stationäre Phase. Als Trägergas wird ein inertes Gas, z. B. Stickstoff, Helium, Wasserstoff oder Argon, verwendet und dieses übernimmt den Transport der in der injizierten Probe enthaltenen flüchtigen Substanzen. Wie bei jeder chromatographischen Trennung, ist Voraussetzung für die Trennung der flüchtigen Substanzen, dass die einzelnen Substanzen von der stationären Phase

gelöst bzw. absorbiert werden. Aufgrund dieser Wechselwirkungen der einzelnen Substanzen mit der stationären Phase werden die verschiedenen Komponenten mehr oder weniger stark von der stationären Phase zurückgehalten und erreichen somit den Detektor am Ende der Säule nach kürzerer oder längerer Strömungszeit des Trägergases [Matissek et al. (2010), S. 360–361].

Bei den Trennsäulen bzw. stationären Phasen der GC gibt es zwei Varianten. Bei stationären Phasen mit einem Feststoff, also Packungsmaterial mit Adsorptionseigenschaften, spricht man von Gas-Solid-Chromatography (GSC). Handelt es sich bei der stationären Phase allerdings um eine nichtflüchtige (viskose) Flüssigkeit, die als dünner Film auf einen inerten Träger aufgebracht ist, so spricht man in diesem Fall von Gas-Liquid-Chromatography (GLC) [Matissek et al. (2010), S. 361]. Es gibt eine große Anzahl flüssiger Phasen, die bis zu Arbeitstemperaturen oberhalb von 400 °C zur Verfügung stehen. Damit ist dies die vielseitigste und selektivste Form der GC. Sowohl gasförmige als vollständig verdampfbare Stoffe können untersucht werden [Matissek et al. (2010), S. 361]. Bei den Trennsäulen der GC wird unterschieden zwischen gepackten Säulen und Kapillarsäulen. Gepackte Säulen sind konventionelle Säulen mit Innendurchmessern über 1 mm und Längen i. d. R. von 2 – 3 m (Glas, Metall), die mit Phasen getränktem Festkörpergranulat gefüllt sind. Die Korngrößen solcher Trägermaterialien liegen bei 0,125 – 0,150 mm bei kürzeren Säulen und 0,180 bis 0,250 mm bei längeren Säulen [Matissek et al. (2010), S. 362]. Kapillarsäulen sind lange Glas-/Silica-Kapillaren mit Innendurchmessern i. d. R. von 0,2 – 0,3 mm und Längen meist von 50 m. Daneben wird noch weiter unterschieden in Support Coated Open Tubular (SCOT)-, Wall Coated Open Tubular (WCOT)-Kapillaren, chemische gebundene Phasen und Fused Silica-Kapillaren [Matissek et al. (2010), S. 362].

Die Probenaufgabe wird meist mittels Injektionsspritzen (Mikroliterspritzen mit Volumina zwischen 0,5 und 10 µl) durch ein Septum (selbstdichtende Gummimembran) in den thermostatisierten Injektor gebracht und die Probe dort verdampft. Die Probeaufgabemenge hängt vom Säulentyp, von der Menge an stationärer Phase in der Säule bzw. der Filmdichte bei Dünnsfilm-Kapillaren, von der Löslichkeit der wichtigsten Komponenten in der stationären Phase und der Temperatur ab. Optimale Probenaufgabemengen bei gepackten Säulen liegen

zwischen 0,1 – 1 µl pro Komponente. Für Kapillarsäulen wird i. d. R. eine Split-Injection (Stromteilung) angewendet [Matissek et al. (2010), S. 363].

Ein isothermer Betrieb von GC-Anlagen schränkt die Verwendbarkeit der GC-Analyse auf Verbindungen mit engem Siedepunktsbereich ein. Bei konstanter Temperatur eluieren die Verbindungen mit niedrigen Siedepunkten meist schnell nacheinander und so dass die Peaks sich überlappen. Hochsiedende Komponenten eluieren dann als flache, kaum registrierbare Peaks und es kommt teilweise Komponenten dadurch auf der Säule zurückgehalten werden (Memory-Effekt). Temperaturprogramme hingegen ermöglichen für jede einzelne Fraktion oder Komponente einen optimalen Siedebereich, um möglichst vollständig abgetrennte Peaks zu erhalten [Matissek et al. (2010), S. 363].

3.4.4.1 GC / MS

Bei der Massenspektrometrie (MS) handelt es sich um eine Methode zur Trennung und Messung von Ionen unterschiedlicher Masse in der Gasphase. Die Probe bzw. die vorher aufgetrennte Probe wird in das Massenspektrometer eingebracht, dabei verdampft und ionisiert. Die ionisierten Moleküle der Probe werden durch elektrische und magnetische Felder geführt. Dabei ist die Beschleunigung der Teilchen abhängig von ihrer Masse (Trägheit) und ihrer Ladung (Kraft). Daher wird bei der Massenspektrometrie das Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z gemessen. Die Nachweisempfindlichkeit der MS hängt stark vom Ionisierungsgrad ab [Matissek et al. (2010), S. 373].

Der Aufbau von MS-Systemen besteht prinzipiell aus einem Einlass-System für die Probe, einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Ionendetektor, der das entsprechende massenspezifische Signal empfängt und verstärkt [Matissek et al. (2010), S. 373].

3.4.5 Aromen-Bestimmung mittels GC / MS

In der Literatur werden viele Methoden zur Aromen-Bestimmung in Wein abhängig von den untersuchenden Substanzen beschrieben. *González-Pombo et al. (2011)* beschreibt eine GC/MS-Methode bei der die flüchtigen Komponenten mittels einer gebundenen Silica-Kapillarsäule – mit Polyethylenglykol beschichtet (WAX-Säule) – und interner Standard-Methode analysiert werden. Auch an anderen Stellen in der Literatur wird am häufigsten bei der Wein-Aroma-Analyse eine WAX Säule beschrieben [Canuti et al. (2009); De la Calle García et al. (1998a); Fan et al.

(2006); *González-Pombo et al.* (2011); *Kang et al.* (2010); *Rodríguez-Bencomo et al.* (2003); *Schneider et al.* (2004); *Schneider et al.* (2001)]. Bei den sogenannten WAX-Säulen (einige Herstellerbezeichnungen: DB-WAX, SB-Wax, BP-20, CP-Wax 52 CB, Supelcowax-10, Stabilwax, PE-CW, HP-20M, AT-Wax) handelt es sich um eine Kapillarsäule mit einer auf Polyethylenglykol basierenden Phase und ist daher eine sehr polare Phase dar. Da diese Säule leider nicht zur Verfügung stand, musste mit der für die Terpen-Analytik typischen DB5-Phase (5 % Polyphenylmethylsiloxan) als Säulenmaterial gearbeitet werden [*Adams* (1995)]. Aufgrund der großen Anzahl Aroma-Komponenten in Wein wird meist eine semi-quantitative Bestimmung über einen internen Standard angewendet [*Kang et al.* (2010)]. Dabei wird der Gehalt der flüchtigen Komponenten über die Peakfläche bezüglich der Peakfläche des internen Standards berechnet.

In dieser Arbeit wird auf eine bewährte Methode der TU Dresden [*Leonhardt* (2006)] zurückgegriffen mit einem abgewandelten internen Standard aus einer Bachelorarbeit der FH Trier [*Bodtländer* (2012)].

3.5 Fazit

Festhalten kann man, dass die glykosidisch gebundenen terpenoiden Verbindungen bei den sogenannten Aromasorten ein erheblichen Aroma-Reservoir bieten und so bei geeigneter Enzym-Behandlung diese glykosidisch-gebundenen Aroma-Präkursoren freisetzen können (Tab. 6). Daher ist eine gezielte Behandlung mit entsprechenden Enzymen für die Weinindustrie äußerst interessant. Bei den ausgewählten Enzympräparaten ist davon auszugehen, dass die beiden Präparate Lallzym β und AR 2000 das größte Potential besitzen Aroma-Präkursoren freizusetzen. Allerdings ist interessant welchen Einfluss eine Cellulase und eine reine β -Glucosidase aus Mandeln auf das Wein-Aroma und das Potential Aroma freizusetzen haben.

Zur Charakterisierung der ausgewählten Präparate ist davon auszugehen, dass nach der Literaturrecherche eine Aktivitätsbestimmung mittels *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid als geeignete Methode angesehen werden kann. Ein abschließender Vergleich mit der Methode [*Sigma-Aldrich* (1994)], welche in der Bachelorarbeit [*Schäfer* (2012)] verwendet wurde, soll diese Vermutung bestätigen. Vorteile der Methode mittels pNPG sind die schnelle und einfache Methodenvorbereitung und -durchführung, sowie die Möglichkeit, die Bedingungen für das Enzym in weiten Teilen anpassen zu können (Glucosekonzentration etc.).

Bei dieser Methode bietet besonders die Bestimmung an freigesetztem pNP mittels molaren Extinktionskoeffizient Vorteile, da eine Kalibration zu jeder Versuchsreihe entfällt. Außerdem wird diese Methode bei den meisten Charakterisierungen von β -Glucosidasen in der Literatur angewendet und bietet daher die Möglichkeit Werte zu vergleichen.

Bei der Aromen-Bestimmung wird auf eine bewährte Methode der TU Dresden [Leonhardt (2006)] zurückgegriffen, da im Vordergrund eine umfangreiche Charakterisierung der verwendeten Enzympräparate steht. Bei dieser Methode werden die Aromakomponenten mittels SDE konzentriert und anschließend mittels GC/MS detektiert. Eine mögliche Aroma-Freisetzung durch die β -Glucosidasen soll so erfasst werden.

Die Aktivitäten der eingesetzten Enzyme sollen bei weintypischen Parametern in Abhängigkeit von der Temperatur (gezügelter, ungezügelter Gärung), dem pH-Wert, Glucose- und Fructose-Gehalt sowie der Schwefelung anhand von nachgestellten Modell-Wein unterschiedlichen Charakters und eines regionaltypischen Riesling-Weines ermittelt werden.

4 Versuche und eigene Untersuchungen

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Chemikalien/Reagenzien

Tab. 7 Chemikalien/Reagenzien

Chemikalie	Firma	Artikelnummer
1,4-Dibrombenzol	Alfa Aesar	
Bentonit	Roth	
Citronensäure-Monohydrat, zur Analyse	Merck	1.00244.0500
D(-)-Fructose, für biochemische Zwecke	Merck	00104007
D(+)-Glucose, für biochemische Zwecke	Merck	00108337
Diethylether, zur Analyse	Geyer Chemsolute	00002362
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fluka Chemika	71645
Ethanol, absolut zur Analyse	Merck	1.00983.2500
Kaliumdisulfit, zur Analyse	Merck	00105057
Kieselgur, grobkörnig	Macherey-Nagel	00730595
L(+)-Weinsäure, zur Analyse	Merck	00100804
Natriumcarbonat, zur Analyse	Merck	00106392
Natriumchlorid, zur Analyse	Geyer Chemsolute	00001367
Natronlauge 1M	Grüssing	
n-Pentan, zur Analyse	Geyer Chemsolute	00001147
Pentan, für die GC	Sigma-Aldrich	00076869
p-Nitrophenol, zur Analyse	Merck	106798
p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid, für die Biochemie	Roth	4082.2
Salzsäure 1 M	Grüssing	23204
Enzym-Kits		
UV-Test zur Bestimmung von D-Glucose/D-Fructose in Lebensmitteln	r-biopharm	10 139 106 035
UV-Test zur Bestimmung von Ethanol in Lebensmitteln	r-biopharm	10 176 290 035

In Tab. 7 sind die verwendeten Chemikalien dargestellt, zusätzlich wurde entmineralisiertes Wasser aus eigener Herstellung verwendet. In Tab. 8 sind die verwendeten Enzympräparate und Hefen dargestellt.

Tab. 8 verwendete Enzym- und Hefe-Präparate

Enzympräparat	Firma	Artikelnummer
β-Glucosidase	Sigma-Aldrich	49290-1G
Cellulase	Sigma-Aldrich	C9748-100G
Lallzym β	Lallemand	
Rapidase AR 2000	DSM foods	
Hefepräparat		
SIHA CRYAROME	BEGEROW	93150
LALVIN GO-FERM	BEGEROW	96080

4.1.2 Material/Geräte

4.1.2.1 Aktivitätsbestimmung

Vortexmixer: SA8, Fa. stuart
Wasserbad: Fa. Köttermann
Photometer: Lambda XLS+, Fa. PerkinElmer
Einmal-Küvetten: Makro-Küvette (PS) 2,5 ml, Fa. Brand

4.1.2.2 Rotationsverdampfer

Rotationsverdampfer: ROTAVAPOR – RE; Fa. Büchi
 Umlaufkühlung über Leitungswasser
 Vakuum über Wasserstrahlpumpe

4.1.2.3 SDE

SDE-Apparatur
Allihnkühler
Wasserkühlung
Heizpilze
 Rotationsverdampfer s. 4.1.2.2

4.1.2.4 GC/MS

Autosampler: Automatic Sampler 7673A, Fa. Hewlett Packard
Autosampler-Steuerung: GC AutoSampler Controller, Fa. Agilent

Injektion: HP6890 Series Injection, Fa. Hewlett Packard
GC: GCD System G1800B mit Massenspektrometer (EI),
 Fa. Hewlett Packard
Säule: Kapillarsäule HP-5 (30 m x 0,25 mm ID; 0,25 µm Film)
 5 % Phenylmethylsiloxan, Fa. Hewlett Packard

4.1.2.5 Sonstiges

Ultraschallbad: Emmi 30, Fa. EMAG
Einmalfilter: CHROMAFIL Xtra PET-20/25, Fa. Macherey-Nagel
pH-Meter: SevenEasy, Fa. Mettler Toledo
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCT
Temperierschrank: GTR0214, Fa. Memmert

4.1.3 Methoden

4.1.3.1 Kontrolle molarer Extinktionskoeffizient von pNP

Die Methode zur Bestimmung bzw. Kontrolle des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ wird in leicht abgewandelter Form nach der Methode *Platen* (2008) durchgeführt. Dazu wird eine 1,0 mM Stammlösung mit pNP hergestellt. In einer Messküvette werden 2,0 ml 1,0 M Na₂CO₃-Lösung vorgelegt und 1,0 ml Wasser hinzugefügt. Der Blindwert wird bestimmt. Anschließend werden die entsprechende µl-Mengen der Stammlösung (s. Tab. 9) in die Messküvette dazugegeben und mit einem Rührspatel vermischt. Nach jedem Hinzufügen wird die Extinktion der Lösung bestimmt. Der Versuch wird im Duplikat durchgeführt.

Tab. 9 aufsummierte Zugabe an Stammlösung pNP [ml]

V _{Base}	V _{pNP}	V _{Ges}
3,0	0,00	3,00
3,0	0,01	3,01
3,0	0,02	3,02
3,0	0,03	3,03
3,0	0,04	3,04
3,0	0,05	3,05
3,0	0,06	3,06
3,0	0,07	3,07
3,0	0,08	3,08
3,0	0,09	3,09
3,0	0,10	3,10
3,0	0,12	3,12
3,0	0,14	3,14
3,0	0,16	3,16

4.1.3.2 Enzym-Aktivitätsbestimmung

Die Methode zur Aktivitätsbestimmung von β -Glucosidase wurde mit leichten Abwandlungen nach *Blondin et al.* (1983), *Martino et al.* (1994) und *Spagna et al.* (2002) durchgeführt.

Die Aktivität wurde mit Hilfe des Glykosids *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (pNPG) durchgeführt. Dazu wird zuerst eine 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer nach *McIlvaine* (1921) mit den entsprechenden pH-Werten hergestellt (s. Tab. 10). Die weiteren Bedingungen wurden den möglichen Parametern im Wein angepasst [*Belitz et al.* (2001), S. 901; *Würdig et al.* (1989), S. 466–628], die Schwefeldioxid-Gehalte wurden auf Grund der gesetzlich vorgeschriebenen Höchstmengen und der Tatsache, dass unter sauren Bedingungen 50 % des Kaliumdisulfits zu SO_2 zerfallen, festgelegt [*Bergner* (1993), S. 125]. Anschließend wird für die Substratlösung 5,0 mM pNPG in der entsprechenden Puffer-Lösung gelöst. Die Substratlösung wird erst kurz vor jeder Messung hergestellt. Für die Enzym-Lösungen wurden die entsprechenden Enzyme (s. Tab. 11) in kaltem entmineralisiertem Wasser gelöst. Die Enzym-Lösungen wurden an jedem Versuchstag neu angesetzt, jeweils im Duplikat und zwischen den Messungen wurden die Enzymlösungen kühl (ca. 4 °C) gelagert. Zum Abstoppen des Reaktionsmixes wird ein 1,0 M Na_2CO_3 -Puffer (Stopp-Reagenz) hergestellt. Für eine Versuchsreihe werden drei Reagenzgläser mit je 0,9 ml Substratlösung plus ein Reagenzglas für den Blindwert im Wasserbad entsprechend temperiert. 0,1 ml Enzym-Lösung werden dazugegeben und für 5 min inkubiert. Danach werden dem Reaktionsmix sofort 2 ml Stopp-Reagenz hinzugefügt und mit dem Vortexmixer gemischt. Die Proben müssen anschließend schnell vermessen werden, da das Glykosid sich im alkalischen Milieu langsam weiter zersetzt [*Michlmayr et al.* (2010)] und so das Messergebnis verfälschen könnte. Die Proben werden in eine Messküvette gegeben und bei 400 nm wird die Absorption des freigesetzten pNP erfasst. Der molare Extinktionseffizient beträgt $18300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 400 nm und darüber wird die Konzentration an freigesetztem pNP bestimmt werden. Es handelt sich hier um eine doppelte Dreifach-Bestimmung. Berechnung freigesetztes *p*-Nitrophenol über Formel (2) und (3).

Formel (2)

$$\Delta E = E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blindwert}}$$

Formel (3)

$$c = \frac{\Delta E}{\varepsilon * d} = \frac{\Delta E}{0,0183 \mu\text{Mol/l} * 1 \text{ cm}}$$

Die Aktivität des Enzyms wird in Units (U) angegeben und 1 U entspricht der Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 μMol Substrat (pNPG) pro Minute unter den gegebenen Bedingungen freizusetzen.

Formel (4)

$$\frac{U}{\text{mg}_E} = \frac{\mu\text{Mol freigesetztes pNP im RM}}{5 \text{ min} * \frac{\text{mg}_E}{\text{RM}}}$$

Tab. 10 Parameter-Veränderung bei der Aktivitätsbestimmung

Parameter	Vergleich	Änderung					
pH-Wert	5,0	4,0	3,0		2,8		
Temperatur	37	25	20		15		
Ethanol-Gehalt	-	5	10		15		
Glucose-Gehalt	-	0,5	0,9/1,0	1,8/2,0	4,5/5,0	10,0	20,0
Fructose-Gehalt	-	0,5	0,9/1,0	1,8/2,0	4,5/5,0	10,0	20,0
Kaliumdisulfit-Gehalt	pH 5,0	100	200	300	400	500	
	pH 3,2						

Tab. 11 Einwaage/Konzentrationen der verwendeten Enzym-Präparate

Enzym-Präparat	Einwaage	Verdünnung	Konzentration
<i>β-Glucosidase</i>	50,0 mg/ 100 ml	1:50	0,01 mg/ml
<i>Lallzym β</i>	200,0 mg/ 100 ml	-	2 mg/ml
<i>Cellulase</i>	75,0 mg/ 25 ml	-	3 mg/ml
<i>AR 2000</i>	140 mg/ 100 ml	-	1,4 mg/ml

Zusätzlich wird zu jeder Messreihe/-tag die Wiederfindung bestimmt. Außerdem wird für die entsprechenden Extinktionswerte ein Ausreißertest nach Grubbs durchgeführt.

Für die Aktivitätsbestimmung der Enzyme unter Weinparametern werden 4 Modelle angesetzt (Modell-Most und -Wein trocken bis lieblich). Die entsprechenden Konzentrationen sind in Tab. 12 ausgeführt und der pH wird auf 3,2 mittels 1,0 M NaOH-Lösung eingestellt.

Tab. 12 Parameter Modell-Most und -Wein

Modell	Ratio	Glucose [g/l]	Fructose [g/l]	Weinsäure [g/l]	Ethanol [Vol.-%]
Most	1,0	100	100	6,0	0,0
Wein trocken	0,6	3,6	5,4	6,0	12
Wein halbtrocken	0,6	7,2	10,8	6,0	12
Wein lieblich	0,6	18	27	6,0	12

4.1.3.2.1 Aktivitätsbestimmung während der Gärung

Die Methode wird wie in 4.1.3.2 beschrieben angewendet mit folgenden Abwandlungen:

Die Proben der Gäransätze werden mittels Membranfilter klar filtriert. In alle Reagenzgläser werden 0,9 ml der Probe gegeben und entsprechend temperiert. Anschließend werden den Proben 100 µl Substrat-Lösung (13,6 mg/ml pNPG) dazugeben und die Zeitmessung gestartet. Für den Blindwert werden ebenfalls 0,9 ml der Probe inkubiert, allerdings wird die Substratlösung erst nach der

Zugabe der Na_2CO_3 -Lösung dazugegeben, um eine Hydrolyse des pNPG durch das enthaltene Enzym zu verhindern. Nach der Inkubationszeit wird die Reaktion mit 2,0 ml der Na_2CO_3 -Lösung gestoppt. Die Inkubationszeit wurde aufgrund der geringen Extinktionswert-Veränderungen von 5 min über 10 min auf 30 min verlängert (s. Anhang A.2.6.1). Die restliche Messung wird wie in 4.1.3.2 durchgeführt.

4.1.3.2.2 Aktivitätsbestimmung im Wein

Da die Wein-Proben des DLR Mosel bei der Anwendung der Methode 4.1.3.2.1 eine relativ hohe Extinktion aufwiesen (ca. 0,900), werden diese in dieser Methode entsprechend weiter verdünnt. Daher wird diese Methode wie in 4.1.3.2.1 angewendet mit dem Unterschied, das lediglich 0,4 ml der Probe eingesetzt werden und mit 2,5 ml Na_2CO_3 -Lösung anstatt 2,0 ml versetzt. Außerdem wird auf eine Filtration der Proben verzichtet. Die Inkubationszeit beträgt 30 min.

4.1.3.3 Gärversuche

Die Gärversuche wurden in Mehrhalsrundkolben durchgeführt, eine Öffnung wird mit einem Gärröhrchen versehen, und eine weitere so verschlossen, das während der Gärung weiterhin Proben entnommen werden können. Bei der Probennahme ist darauf zu achten, dass möglichst wenig Umgebungsluft in das Gärgefäß gelangt, damit weiterhin die anaeroben Verhältnisse erhalten bleiben.

- *Gäransatz für gezügelte Gärung:*

30 l Süßreserve (Riesling) wurde vom DLR Mosel zur Verfügung gestellt. Ca. 200 ml Most wurden entnommen und bis ca. 400 ml mit Wasser aufgefüllt, anschließend wurde das Most/Wasser-Gemisch bei ca. 30 – 35 °C temperiert und anschließend zuerst 9 g GoFerm dazugegeben und gelöst. Danach wurden 7 g Hefe (SIHA CRYAROME) dazugeben und gelöst. Der Ansatz wurde im Brutschrank bei ca. 35 °C 10 min bebrütet und die Hefe rehydratisiert. Das Gemisch wurde anschließend dem restlichen Most dazugegeben und mit einem Holzlöffel gleichmäßig im Tank verteilt.

Dieser Ansatz wurde nun für ca. 1 Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen bis die Gärung merklich begonnen hat (Gasentwicklung), die Hefe wurde nochmals kurz aufgerührt und dann jeweils 900 ml für die entsprechenden Enzymversuche abgenommen. Das abgewogene Enzym (s. Tab. 13) wurde in ca. 50 ml Hefe/Most-Gemisch gelöst, dem den 900 ml jeweils wieder zugegeben und in

Mehralsrundkolben abgefüllt. Anschließend wurden die einzelnen Gäransätze bei 16 °C gelagert.

- *Gäransatz für ungezügelte Gärung:*

Für die ungezügelte Gärung wurden 5 l Most (Riesling, DLR) verwendet. 200 ml Most/Wasser-Gemisch (1:1, v/v) wurde bei 30 – 35 °C temperiert und anschließend mit 1,5 g GoFerm versetzt und gelöst. Zu diesem Gemisch wurde danach 1,25 g Hefe (SIHA CRYAROME) gelöst und 10 min bei 35 °C rehydratisiert. Der rehydratisierte Hefeansatz wurde dem Most wieder zurückgeführt und gleichmäßig verteilt. Dieser Ansatz wurde nun für ca. 1 Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen bis die Gärung merklich begonnen hat, die Hefe wird nochmals kurz aufgerührt und dann jeweils 900 ml für die Enzymversuche abgenommen. Das abgewogene Enzym (s. Tab. 13) wurde in ca. 50 ml Hefe/Most-Gemisch gelöst, dem den 900 ml jeweils wieder zugegeben und in Mehralsrundkolben abgefüllt.

Abb. 14 zeigt den durchgeführten Gärversuch mittels Mehralsrundkolben.

Tab. 13 Einwaage Enzympräparat

Enzym- Präparat	Einwaage	Konzentration
<i>Glucosidase</i>	4,5 mg	0,005 mg/ml
<i>Lallzym beta</i>	45 mg	0,05 mg/ml
<i>Cellulase</i>	45 mg	0,05 mg/ml
<i>AR 2000</i>	27 mg	0,03 mg/ml



Abb. 14 eigene Gärversuche

Nach dem die Gärung abgeschlossen ist (keine Gasentwicklung mehr), wird der Wein von der Hefe abgezogen und mit ca. 0,2 g Bentonit auf 900 ml Gäransatz versetzt. Das Bentonit wird am ersten Tag mehrmals wieder aufgeschüttelt und am Ende des zweiten Tages wird die Probe über Kieselgur klar filtriert.

4.1.3.4 Messung β -Glucosidase-Aktivität in Most & Wein

4.1.3.4.1 Wiederfindung in Most & Wein

Um die Wiederfindung von pNP in Most und Wein zu bestimmen, werden den Most bzw. Wein-Proben in entsprechenden Konzentrationen 1,0 mM pNP-Lösung zugesetzt, die Extinktion gemessen und über den molaren Extinktionskoeffizient die Konzentration wieder bestimmt.

4.1.3.4.1.1 Most

Für die Bestimmung der Wiederfindung in Most wird die Most-Probe mittels Membranfilter klar filtriert. In einer Messküvette wird anschließend zuerst der Blindwert der Probe ermittelt, dazu werden 0,9 ml des filtrierten Mostes und 2,0 ml Na_2CO_3 -Lösung in der Messküvette vermischt und die Extinktion gemessen, danach werden der Messküvette in entsprechender Konzentration der 1,0 mM pNP-Stammlösung zugegeben (s. Tab. 14), das ganze abermals vermischt und die Extinktion gemessen. Über den molaren Extinktionskoeffizienten von pNP ($\epsilon = 18300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wird nun die Wiederfindung ermittelt. Dieser Versuch wird im Duplikat durchgeführt.

Tab. 14 Ablauf der Wiederfindung von pNP in Most

V_{Probe} [ml]	V_{Lauge} [ml]	V_{pNP} [ml]	V_{ges} [ml]	c_{Std-Lsg} [μM]	Soll c_{Lsg} [μM]
0,9	2,0	0,01	2,91	1000	3,436
0,9	2,0	0,02	2,92	1000	6,849
0,9	2,0	0,04	2,94	1000	13,605
0,9	2,0	0,06	2,96	1000	20,270
0,9	2,0	0,08	2,98	1000	26,846
0,9	2,0	0,10	3,00	1000	33,333

4.1.3.4.1.2 Wein

Für die Bestimmung der Wiederfindung in Wein wird prinzipiell ähnlich wie der Wiederfindung in Most verfahren, mit dem Unterschied, dass der Wein nicht filtriert werden muss, da dieser bereits geklärt ist. Wie in Tab. 40 zu sehen ist, sind die Extinktionswerte bei der gleichen Durchführung wie in 4.1.3.4.1.1 mit bis zu 1,5 zu hoch. Daher werden nicht 0,9 ml der Wein-Probe eingesetzt, sondern 0,4 ml und entsprechend mit 2,5 ml 1,0 M Na₂CO₃-Lösung auf 2,9 ml in der Messküvette aufgefüllt. Das Ganze wird gemischt und analog zu 4.1.3.4.1.1 die Extinktion für den Blindwert gemessen. Anschließend wird der Messküvette in entsprechender Konzentration der 1,0 mM pNP-Stammlösung zugegeben (s. Tab. 15), das ganze abermals vermischt und die Extinktion gemessen. Über den molaren Extinktionskoeffizienten von pNP ($\epsilon = 18300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wird nun die Wiederfindung ermittelt. Dieser Versuch wurde ebenfalls im Duplikat durchgeführt.

Tab. 15 Ablauf der Wiederfindung von pNP in Wein

V_{Probe} [ml]	V_{Lauge} [ml]	V_{pNP} [ml]	V_{ges} [ml]	c_{Std-Lsg} [μM]	Soll c_{Lsg} [μM]
0,4	2,5	0,01	2,91	1000	3,436
0,4	2,5	0,02	2,92	1000	6,849
0,4	2,5	0,04	2,94	1000	13,605
0,4	2,5	0,06	2,96	1000	20,270
0,4	2,5	0,08	2,98	1000	26,846
0,4	2,5	0,10	3,00	1000	33,333

4.1.3.5 Enzymzugabe zu Wein

Bei diesem Versuch wurden die jeweiligen Enzyme fertigem Wein zugegeben. Der Wein (Kueser Kardinalsbergs, Qualitätswein trocken) wurde vom DRL Mosel zur Verfügung gestellt (Analysewerte s. Tab. 48).

1 l des Weins wurde jeweils in einen Maßkolben überführt. Ca. 50 ml wurden dem Wein entnommen und mit dem jeweiligen Enzym versetzt und gelöst (s. Tab. 16). Dieser Ansatz wurde dem jeweiligen Wein anschließend wieder zurückgeführt. Alle Enzym-Ansätze plus zusätzlich eine Referenz-Probe ohne Enzymzugabe wurden bei 25 °C im Brutschrank 3 Wochen gelagert. Die Temperatur wurde auf 25 °C gesetzt, um eine erhöhte Enzymaktivität zu erreichen.

In regelmäßigen Abschnitten wurden Proben entnommen, um die Enzymaktivität zu messen (s. Methode 4.1.3.2.2).

Tab. 16 Einwaage Enzympräparat in Wein

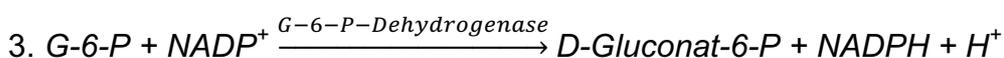
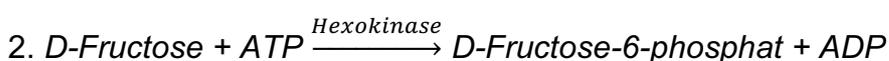
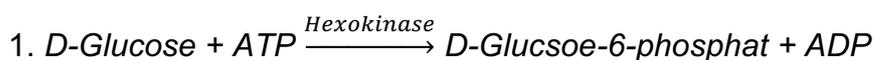
Enzym- Präparat	Einwaage	Konzentration
<i>β-Glucosidase</i>	5,0 mg	0,005 mg/ml
<i>Lallzym β</i>	50 mg	0,05 mg/ml
<i>Cellulase</i>	50 mg	0,05 mg/ml
<i>AR 2000</i>	30 mg	0,03 mg/ml

4.1.3.6 Analyse-Daten von Most & Wein

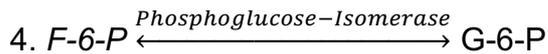
4.1.3.6.1 D-Glucose / D-Fructose

Diese Methode wird entsprechend der Herstelleranleitung [*r-biopharm a*] durchgeführt.

Prinzip:



NADPH ist hier die Messgröße und die gebildete Menge an NADPH ist äquivalent zur Glucose-Menge.



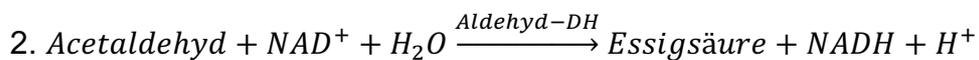
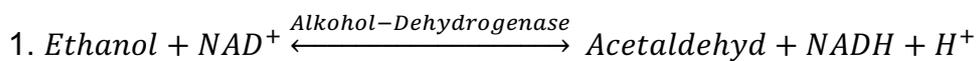
G-6-P reagiert weiter wie in Schritt 3. Auch hier ist NADPH wieder Messgröße und die gebildete NADPH-Menge ist ebenfalls äquivalent zur Fructose-Menge.

[Bergmeyer et al. (1974); Bernt & Bergmeyer ; Beutler (1984b); Kunst et al. (1984); Schmidt (1961)]

4.1.3.6.2 Ethanol

Diese Methode wird entsprechend der Herstelleranleitung [*r-biopharm b*] durchgeführt.

Prinzip:



NADH ist die Messgröße der Ethanol-Bestimmung und die Absorption wird bei 340 nm bestimmt.

[Beutler (1984a); Beutler & Michal (1977)]

4.1.3.7 Bestimmung des Aromaprofils

4.1.3.7.1 Simultane Destillation-Extraktion nach Likens-Nickerson

Prinzip:

Mit Hilfe einer modifizierten Destillationsapparatur nach *Likens & Nickerson* (1964) werden die Aromen aus der Probe in ein Lösungsmittelgemisch überführt, eingeeengt und für die Gaschromatographie-Massenspektrometrie eingesetzt. Abb. 15 zeigt die eingesetzte SDE-Apparatur.

Chemikalien:

Natriumchlorid

n-Pentan, zur Analyse

Pentan, für die GC

Diethylether

1,4-Dibrombenzol (1,4-DBB) (interner Standard; 10 mg/ml in 20 ml *n*-Pentan)

Durchführung:

250 ml der Most- bzw. Weinprobe werden in einen 1 l-Rundkolben überführt. Man fügt etwa 2,5 g NaCl und Glasperlen hinzu. Nach Zugabe von 1,0 ml 1,4-DBB-Standardlösung wird der Kolben zur besseren Durchmischung leicht geschwenkt.

Parallel füllt man in einen 250 ml-Rundkolben je 25 ml n-Pentan und Diethylether hinzu.

Beide Kolben werden an die SDE-Apparatur angeschlossen und das U-Rohr der Anlage so mit Wasser und n-Pentan gefüllt, bis die Flüssigkeiten in die jeweiligen Kolben zurück fließen.

Die Kolben werden gleichzeitig langsam zum Sieden erhitzt, wobei die Lösungsmitteldämpfe den Kopfraum zuerst erreichen sollten. Die Destillationsdauer beträgt 4 Stunden.

Die Lösungsmittel werden anschließend am Rotationsverdampfer bei 50°C und Normaldruck entfernt, bei erhöhtem Ethanol-Gehalt im Extrakt muss zusätzlich ein Vakuum mittels Wasserstrahlpumpe angelegt werden. Der Rückstand wird mit wenig Pentan aufgenommen, in einen 1,0 ml-Maßkolben überführt und bis zur Marke aufgefüllt.

Das gewonnene Destillat kann zur Gaschromatographie-Massenspektrometrie eingesetzt werden.



Abb. 15 eingesetzte SDE-Apparatur [eigene Darstellung]

4.1.3.7.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC / MS)

Parameter GC / MS:

Trennsäule:	Kapillarsäule HP-5 (30 m x 0,25 mm ID; 0,25 µm Film) 5% Phenylmethylsiloxan, Fa. Hewlett Packard
Injektor:	120°C, pulsed splitless, 0,5 min, 25 psi
Injektionsvolumen:	1,0 µl
Temperaturprogramm:	2 min 50°C 5°C/min bis 109°C 3,0 min 109°C 5°C/min bis 113°C 3 min 113°C 5°C/min bis 250°C 10 min 250°C
Trägergas:	Helium, 1,0 ml/min
Detektor:	280°C, massenselektiver Detektor (MS) Elektronenstoßionisation (positiv), 70 eV dwell time 80

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt über die Software HP GCD ChemStation (G1074B Version A.01.00) und die Stoffdatenbank NIST (National Institute of Standards and Technology) von 1998. Über den internen Standard werden die Verhältnisse der gefundenen Komponenten dargestellt. Die Verbindungen werden auf Basis ihrer Retentionszeiten und Spektren unter Verwendung der durchsuchbaren EI-MS-Spektren Bibliothek (NIST98) identifiziert.

4.2 Untersuchungen und Ergebnisse

4.2.1 photometrische Aktivitätsbestimmung mittels pNPG

Die Aktivitätsbestimmungen der Enzyme wurden photometrisch über die Freisetzung von pNP aus pNPG bestimmt. Unter 4.2.1.3.1 wurde eine mögliche Aktivitätsbestimmung in Most bzw. Wein über die Wiederfindung von pNP kontrolliert.

4.2.1.1 Kontrolle molarer Extinktionskoeffizient von pNP

In der Literatur wird für pNP ein molarer Extinktionskoeffizient ϵ von $18300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angegeben. Hier soll nun dieser Wert über einen Konzentrationsbereich von 3,3 bis $50,6 \mu\text{M}$ kontrolliert werden, ob dieser Wert mit der Realität übereinstimmt. Zusätzlich wird bei jedem Messtag die Wiederfindung mit einer $1,0 \text{ mM}$ pNP-Lösung durchgeführt.

Tab. 17 Bestimmung molarer Extinktionskoeffizient von pNP nach 4.1.3.1

V_{Base} [ml]	V_{pNP} [ml]	V_{Ges} [ml]	$C_{\text{Std-Lsg}}$ [mM]	C_{Lsg} [mM]	d [cm]	E_{400}	$E_{400\text{-BW}}$	ϵ_{pNP} [$\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
3,0	0,00	3,00	1	0,0000000	1	0,004	0,000	xxxxxxx
3,0	0,01	3,01	1	0,0033223	1	0,064	0,060	18,060
3,0	0,02	3,02	1	0,0066225	1	0,125	0,121	18,271
3,0	0,03	3,03	1	0,0099010	1	0,177	0,173	17,473
3,0	0,04	3,04	1	0,0131579	1	0,250	0,246	18,696
3,0	0,05	3,05	1	0,0163934	1	0,308	0,304	18,544
3,0	0,06	3,06	1	0,0196078	1	0,369	0,365	18,615
3,0	0,07	3,07	1	0,0228013	1	0,430	0,426	18,683
3,0	0,08	3,08	1	0,0259740	1	0,482	0,478	18,403
3,0	0,09	3,09	1	0,0291262	1	0,537	0,533	18,300
3,0	0,10	3,10	1	0,0322581	1	0,602	0,598	18,538
3,0	0,12	3,12	1	0,0384615	1	0,695	0,693	18,018
3,0	0,14	3,14	1	0,0445860	1	0,815	0,813	18,234
3,0	0,16	3,16	1	0,0506329	1	0,940	0,938	18,526
Mittelwert								18,358
Standardabweichung								0,352
prozentuale Standardabweichung								1,92%

Tab. 18 Kennwerte Bestimmung ϵ_{pNP}

Arbeitsbereich [μM]	3,32-50,63
Achsenabschnitt b	0,0095
Steigung m	5,7983
Korrelationskoeffizient r	0,9996
Reststandardabweichung der Gerade	0,0067
Verfahrensstandardabweichung [mM]	0,0012
Verfahrensvariationskoeffizient	4,82%

4.2.1.2 Aktivitätsbestimmung der ausgewählten Enzyme

In diesem Versuchsabschnitt werden die vier Enzympräparate entsprechenden den Bedingungen in Tab. 10 und Tab. 12 charakterisiert (Methode 4.1.3.2). Der Aktivitätsverlauf der Enzympräparate wird in Prozent dargestellt, da die Aktivitäten der β -Glucosidase im Vergleich der anderen Enzympräparate sehr hoch sind und eine Darstellung in U/mg sehr unübersichtlich machen würde. Als 100 % wird für alle Enzympräparate der Aktivitätswert bei pH 5,0 und 37 °C gesetzt. ΔE kleiner 0,040 sind mit Vorsicht zu genießen, da die Methode in diesem Bereich nicht validiert ist bzw. es zu größeren Schwankungen bei der Wiederfindung kommt und bereits kleine Schwankungen der Extinktionswerte zu größeren Veränderung beim Aktivitätswert hervorrufen können. Besonders betroffen sind die Aktivitätswerte der β -Glucosidase, da kleine Schwankungen durch die sehr geringe Einwaage große Auswirkungen auf den Aktivitätswert haben. Daher kann man bei ΔE kleiner 0,040 von Aktivitätswerten von 0 bzw. nahe 0 ausgehen.

Als Aktivitätsoptimum wurde $\text{pH}_{\text{Opt}} = 5,0$ und $T_{\text{Opt}} = 37 \text{ °C}$ festgelegt [Ketudat Cairns & Esen (2010)].

4.2.1.2.1 Temperatur

Tab. 19 und Tab. 20 stellen den Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit der Temperatur dar.

Tab. 19 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit der Temperatur in U/mg

Temperatur [°C]	Cellulase	Lβ	βG	AR 2000
37	0,069	0,071	20,3	0,161
25	0,027	0,022	11,0	0,049
20	0,018	0,014	8,4	0,032
15	0,011	0,007	6,1	0,020

Tab. 20 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit der Temperatur in Prozent

Temperatur [°C]	Cellulase	Lβ	βG	AR 2000
37	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
25	39,8%	31,0%	54,3%	30,4%
20	26,1%	19,7%	41,6%	19,7%
15	15,9%	9,9%	30,0%	12,6%

4.2.1.2.2 pH-Wert

Tab. 21 und Tab. 22 stellen den Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert dar.

Tab. 21 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert in U/mg

pH-Wert	Cellulase	Lβ	βG	AR 2000
5,0	0,069	0,071	20,3	0,161
4,0	0,031	0,065	9,9	0,159
3,2	0,009	0,030	1,1	0,067
3,0	0,006	0,028	0,8	0,050
2,8	0,005	0,018	0,4	0,038

Tab. 22 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert in Prozent

pH-Wert	Cellulase	Lβ	βG	AR 2000
5,0	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
4,0	44,9%	91,5%	49,0%	98,4%
3,2	13,3%	41,6%	5,6%	41,6%
3,0	8,7%	39,4%	3,7%	30,9%
2,8	7,2%	25,4%	1,9%	23,8%

4.2.1.2.3 Ethanol-Gehalt

Tab. 23 und Tab. 24 stellen den Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt dar.

Tab. 23 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt in U/mg

Ethanol [Vol.-%]	Cellulase	L β	β G	AR 2000
0%	0,069	0,071	20,3	0,161
5%	0,088	0,082	15,6	0,180
10%	0,094	0,097	9,8	0,199
15%	0,094	0,098	6,8	0,208

Tab. 24 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt in Prozent

Ethanol [Vol.-%]	Cellulase	L β	β G	AR 2000
0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
5%	127,5%	115,5%	76,9%	111,5%
10%	136,2%	136,6%	48,4%	123,5%
15%	136,2%	138,0%	33,4%	129,0%

4.2.1.2.4 Glucose-Gehalt

Tab. 25 und Tab. 26 stellen den Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt dar.

Tab. 25 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt in U/mg

Glucose [g/l]	Cellulase	L β	Glucose [g/l]	β G	AR 2000
0	0,069	0,071	0	20,3	0,161
5	0,037	0,037	5	18,9	0,066
9	0,028	0,025	10	19,1	0,047
18	0,018	0,016	20	17,4	0,032
45	0,008	0,007	50	14,3	0,014
100	0,004	0,003	100	12,5	0,008
			200	7,3	

Tab. 26 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt in Prozent

Glucose [g/l]	Cellulase	L β	Glucose [g/l]	β G	AR 2000
0	100,0%	100,0%	0	100,0%	100,0%
5	53,6%	52,1%	5	93,5%	40,9%
9	39,9%	35,8%	10	94,2%	29,2%
18	26,7%	21,9%	20	85,7%	20,0%
45	11,6%	9,9%	50	70,6%	8,6%
100	5,8%	4,2%	100	61,7%	4,9%
			200	36,0%	

4.2.1.2.5 Fructose-Gehalt

Tab. 27 und Tab. 28 stellen den Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt dar.

Tab. 27 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt in U/mg

Fructose [g/l]	Cellulase	L β	Fructose [g/l]	β G	AR 2000
0	0,069	0,071	0	20,3	0,161
5	0,071	0,084	5	19,9	0,179
9	0,073	0,093	10	21,2	0,200
18	0,073	0,104	20	18,5	0,221
45	0,080	0,110	50	18,1	0,229
100	0,083	0,094	100	17,4	0,198
200	0,071	0,062	200	14,3	0,121

Tab. 28 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt in Prozent

Fructose [g/l]	Cellulase	L β	Fructose [g/l]	β G	AR 2000
0	100,0%	100,0%	0	100,0%	100,0%
5	102,9%	118,1%	5	98,5%	110,7%
9	105,8%	131,2%	10	104,5%	123,7%
18	105,8%	146,2%	20	91,5%	137,1%
45	115,9%	155,5%	50	89,5%	141,7%
100	120,3%	131,9%	100	85,8%	122,8%
200	102,9%	86,7%	200	70,5%	75,1%

4.2.1.2.6 Kaliumdisulfit-Gehalt

Bei der Messung des Kaliumdisulfit-Gehalts, sowohl bei pH 5,0 und pH 3,2, schwankten die Extinktionswerte stark und machten eine Messung schwierig. Außerdem sind die Blindwerte höher als üblich mit bis 0,144 (s. Anhang A.2), was auf eine Hydrolyse von pNPG durch Kaliumdisulfit bzw. Schwefeldioxid schließen lässt. Tab. 29 und Tab. 30 stellen den Aktivitätsverlauf bei pH 3,2 und Tab. 31 und Tab. 32 bei pH 5,0 in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt dar.

- pH 3,2

Tab. 29 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (pH 3,2) in U/mg

Kaliumdisulfit [mg/l]	Cellulase	L β	AR 2000	β G
0	0,009	0,030	0,067	1,14
100	0,011	0,033	0,072	1,25
200	0,010	0,034	0,076	1,23
300	0,012	0,036	0,078	0,96
400	0,011	0,035	0,075	1,23
500	0,011	0,034	0,076	1,19

Tab. 30 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (pH 3,2) in Prozent

Kaliumdisulfit [mg/l]	Cellulase	L β	AR 2000	β G
0	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
100	116,6%	110,9%	107,0%	109,3%
200	111,3%	116,3%	112,7%	107,7%
300	130,0%	123,3%	116,5%	84,3%
400	117,7%	119,4%	112,1%	108,0%
500	116,6%	114,4%	113,2%	104,3%

- pH 5,0

Tab. 31 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (pH 5,0) in U/mg

Kaliumdisulfit [mg/l]	Cellulase	L β	AR 2000	β G
0	0,069	0,071	0,174	20,25
100	0,072	0,068	0,172	19,40
200	0,070	0,073	0,177	21,27
300	0,072	0,074	0,187	18,52
400	0,072	0,074	0,184	18,15
500	0,069	0,073	0,192	19,15

Tab. 32 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (pH 5,0) in Prozent

Kaliumdisulfit [mg/l]	Cellulase	L β	AR 2000	β G
0	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
100	104,2%	96,2%	98,7%	95,8%
200	101,0%	102,8%	102,0%	105,0%
300	104,6%	104,3%	107,7%	91,5%
400	104,8%	104,4%	105,8%	89,6%
500	100,4%	102,7%	110,3%	94,5%

4.2.1.2.7 Aktivität unter Wein-Parametern

Die Aktivität unter Most- bzw. Wein-Parametern wurde nach der Methode 4.1.3.2 durchgeführt und die entsprechenden Parameter sind in Tab. 12 (S. 61) dargestellt. Die β -Glucosidase wird in den entsprechenden Diagrammen nicht dargestellt, da die Extinktionswerte (s. Anhang A.2.5) sehr gering sind (außerhalb des aussagekräftigen Messbereich) und auf Grund der sehr geringen Einwaage, lediglich festgehalten werden kann, dass die Aktivität der β -Glucosidase unter Most- bzw. Wein-Parametern gleich bzw. nahe 0 liegt. Als Vergleichs bzw. Bezugspunkt wurde analog zu den vorherigen Untersuchungen der entsprechende Aktivitätswert bei Temperatur_{Opt} 37 °C und pH_{Opt} 5,0 gewählt (in den Abbildungen mit gestrichelter Linie abgetrennt). Die Ergebnisse sind in Tab. 33, Tab. 34, Tab. 35 und Tab. 36 dargestellt.

- Modell-Wein trocken

Tab. 33 Aktivität über die Temperatur in einem Modell-Wein *trocken* in U/mg

Temp. [°C]	Cellulase	%	Lβ	%	AR 2000	%	βG	%
15	0,006	9,3	0,012	17,0	0,025	15,4	0,268	1,3
20	0,010	13,8	0,017	23,7	0,038	23,3	0,202	1,0
25	0,015	21,5	0,028	39,7	0,056	35,1	0,131	0,6
37	0,069	100,0	0,071	100,0	0,161	100,0	20,3	100,0

- Modell-Wein halbtrocken

Tab. 34 Aktivität über die Temperatur in Modell-Wein *halbtrocken* in U/mg

Temp. [°C]	Cellulase	%	Lβ	%	AR 2000	%	βG	%
15	0,004	5,6	0,007	10,5	0,015	9,2	0,186	0,9
20	0,004	8,3	0,007	15,3	0,015	15,6	0,235	1,2
25	0,008	12,0	0,017	23,9	0,036	22,1	0,224	1,1
37	0,069	100,0	0,071	100,0	0,161	100,0	20,3	100,0

- Modell-Wein lieblich

Tab. 35 Aktivität über die Temperatur in einem Modell-Wein *lieblich* in U/mg

Temp. [°C]	Cellulase	%	Lβ	%	AR 2000	%	βG	%
15	0,002	3,1	0,003	4,1	0,007	4,0	0,219	1,0
20	0,003	4,3	0,004	5,7	0,010	6,2	0,284	1,4
25	0,005	6,5	0,007	10,0	0,016	10,2	0,197	1,1
37	0,069	100,0	0,071	100,0	0,161	100,0	20,3	100,0

- Modell-Most

Tab. 36 Aktivität über die Temperatur in einem Modell-Most in U/mg

Temp. [°C]	Cellulase	%	Lβ	%	AR 2000	%	βG	%
15	0,001	0,8	0,001	0,8	0,001	0,5	0,290	1,4
20	0,001	0,8	0,001	0,8	0,001	0,5	0,492	2,4
25	0,005	6,5	0,007	10,0	0,016	10,2	0,464	2,3
37	0,069	100,0	0,071	100,0	0,161	100,0	20,3	100,0

4.2.1.3 Aktivitätsbestimmung während der Gärung

Hier muss man einschränkend festhalten, dass die Aktivitätsbestimmung während der Gärung lediglich einen Anhaltspunkt über die Aktivität der entsprechenden Enzyme gibt, da das synthetische Substrat pNPG in direkter Konkurrenz zu den natürlichen Glykosiden im Most steht. Allerdings kann man Aussagen über den Aktivitätsverlauf während der Gärung für das entsprechende Enzym treffen. Wie in Tab. 37 zu sehen ist, geht durch die Membranfiltration kein Enzym verloren und die Membranfilter sind daher gut für die Filtration des Mostes geeignet.

Tab. 37 Vergleich Enzymaktivität vor und nach Membranfiltration
(nach Methode 4.1.3.2.2, mit einer Einwaage von 0,16 mg/ml AR 2000)

Ansatz	μmol freigesetztes pNP	U/mg
nach 10 min:		
unfiltriert	0,079	0,127
filtriert	0,080	0,129
nach 5 min:		
unfiltriert	0,041	0,131
filtriert	0,039	0,126

Die Abweichung vom Mittelwert nach 10 min beträgt 0,8 % und nach 5 min 1,9 %.

4.2.1.3.1 Wiederfindung von pNP in Most und Wein

Die folgenden Tabellen (Tab. 38, Tab. 39, Tab. 40, Tab. 41, Tab. 42, Tab. 43 und Tab. 44) zeigen die Ergebnisse bei der Bestimmung der Wiederfindung von pNP in Most und Wein.

Tab. 38 Wiederfindung von pNP in Most nach Methode 4.1.3.4.1.1

WF	V _{lauge} [ml]	V _{pNP} [ml]	V _{ges} [ml]	C _{Std-Lsg} [µM]	E ₄₀₀	E _{BW}	E _{400-BW}
1.1	2,9	0,01	2,91	1000	0,378	0,317	0,061
2.1	2,9	0,02	2,92	1000	0,440	0,317	0,123
3.1	2,9	0,04	2,94	1000	0,549	0,317	0,232
4.1	2,9	0,06	2,96	1000	0,675	0,317	0,358
5.1	2,9	0,08	2,98	1000	0,790	0,317	0,473
6.1	2,9	0,10	3,00	1000	0,905	0,317	0,588
1.2	2,9	0,01	2,91	1000	0,374	0,313	0,061
2.2	2,9	0,02	2,92	1000	0,439	0,313	0,126
3.2	2,9	0,04	2,94	1000	0,558	0,313	0,245
4.2	2,9	0,06	2,96	1000	0,683	0,313	0,370
5.2	2,9	0,08	2,98	1000	0,798	0,313	0,485
6.2	2,9	0,10	3,00	1000	0,915	0,313	0,602

Tab. 39 Wiederfindung von pNP in Most nach Methode 4.1.3.4.1.1

WF	Soll c _{Lsg} [µM]	1. Ist c _{Lsg} [µM]	1. Wieder- findung	2. Ist c _{Lsg} [µM]	2. Wieder- findung	MW [µM]	Std- Abweichung
1.	3,436	3,333	97,0%	3,333	97,0%	3,333	0,0%
2.	6,849	6,721	98,1%	6,885	100,5%	6,803	1,7%
3.	13,605	12,678	93,2%	13,388	98,4%	13,033	3,9%
4.	20,270	19,563	96,5%	20,219	99,7%	19,891	2,3%
5.	26,846	25,847	96,3%	26,503	98,7%	26,175	1,8%
6.	33,333	32,131	96,4%	32,896	98,7%	32,514	1,7%

Tab. 40 Wiederfindung von pNP in Wein nach Methode 4.1.3.2.2 mit 0,9 ml 2 ml Stopp-Reagenz

V _{lauge} [ml]	V _{pNP} [ml]	V _{ges} [ml]	c _{Std-Lsg} [mM]	Soll c _{Lsg} [mM]	E ₄₀₀	E _{korr}	E _{400-BW}	Ist c _{Lsg} [mM]	WF
2,9	0,01	2,91	1	0,0034364	1,037	0,959	0,078	0,004262	124,0%
2,9	0,02	2,92	1	0,0068493	1,096	0,959	0,137	0,007486	109,3%
2,9	0,04	2,94	1	0,0136054	1,205	0,959	0,246	0,013443	98,8%
2,9	0,06	2,96	1	0,0202703	1,318	0,959	0,359	0,019617	96,8%
2,9	0,08	2,98	1	0,0268456	1,415	0,959	0,456	0,024918	92,8%
2,9	0,10	3,00	1	0,0333333	1,526	0,959	0,567	0,030984	93,0%

Die Extinktionswerte sind zu hoch, daher werden die Proben weiter verdünnt (Tab. 41 und Tab. 42).

Tab. 41 Extinktionswerte Wiederfindung in Wein mit 0,9 ml Wein und 5 ml Stopp-Reagenz

WF	V _{lauge} [ml]	V _{pNP} [ml]	V _{ges} [ml]	c _{Std-Lsg} [µM]	E ₄₀₀	E _{BW}	E _{400-BW}
1.1	5,9	0,01	5,91	1000	0,514	0,474	0,040
2.1	5,9	0,05	5,95	1000	0,635	0,474	0,161
3.1	5,9	0,10	6,00	1000	0,774	0,474	0,300
1.2	5,9	0,01	5,91	1000	0,515	0,473	0,042
2.2	5,9	0,05	5,95	1000	0,636	0,473	0,163
3.2	5,9	0,10	6,00	1000	0,778	0,473	0,305

Tab. 42 Wiederfindung von pNP in Most/Wein mit 0,9 ml Wein und 5 ml Stopp-Reagenz

WF	Soll c _{Lsg} [mM]	1. Ist c _{Lsg} [mM]	1. Wiederfindung	2. Ist c _{Lsg} [mM]	2. Wiederfindung	MW [µM]	Std-Abweichung
1.	1,692	2,186	129,2%	2,295	135,6%	2,240	3,4%
2.	8,403	8,798	104,7%	8,907	106,0%	8,852	0,9%
3.	16,667	16,393	98,4%	16,667	100,0%	16,530	1,2%

Leichte Modifikation der Methode, anstatt 0,9 ml wird auf 0,4 ml Wein reduziert und entsprechend auf 2,5 ml Stopp-Reagenz erhöht (Tab. 43 und Tab. 44).

Tab. 43 Extinktionswerte Wiederfindung in Wein nach Methode 4.1.3.4.1.2

WF	V _{lauge} [ml]	V _{pNP} [ml]	V _{ges} [ml]	C _{Std-Lsg} [µM]	E ₄₀₀	E _{BW}	E _{400-BW}
1.1	2,9	0,01	2,91	1000	0,491	0,434	0,057
2.1	2,9	0,02	2,92	1000	0,550	0,434	0,116
3.1	2,9	0,04	2,94	1000	0,680	0,434	0,246
4.1	2,9	0,06	2,96	1000	0,801	0,434	0,367
5.1	2,9	0,08	2,98	1000	0,909	0,434	0,475
6.1	2,9	0,10	3,00	1000	1,026	0,434	0,592
1.2	2,9	0,01	2,91	1000	0,500	0,434	0,066
2.2	2,9	0,02	2,92	1000	0,556	0,434	0,122
3.2	2,9	0,04	2,94	1000	0,673	0,434	0,239
4.2	2,9	0,06	2,96	1000	0,788	0,434	0,354
5.2	2,9	0,08	2,98	1000	0,901	0,434	0,467
6.2	2,9	0,10	3,00	1000	1,017	0,434	0,583

Tab. 44 Wiederfindung von pNP in Most/Wein nach Methode 4.1.3.4.1.2

WF	Soll c _{Lsg} [µM]	1. Ist c _{Lsg} [µM]	1. Wiederfindung	2. Ist c _{Lsg} [µM]	2. Wiederfindung	MW [µM]	Std-Abweichung
1.	3,436	3,115	90,6%	3,607	105,0%	3,361	10,3%
2.	6,849	6,339	92,5%	6,667	97,3%	6,503	3,6%
3.	13,605	13,443	98,8%	13,060	96,0%	13,251	2,0%
4.	20,270	20,055	98,9%	19,344	95,4%	19,699	2,5%
5.	26,846	25,956	96,7%	25,519	95,1%	25,738	1,2%
6.	33,333	32,350	97,0%	31,858	95,6%	32,104	1,1%

4.2.2 Gärversuche

- gezügelte Gärung

Die gezügelte Gärung wurde nach Methode 4.1.3.3 durchgeführt. Tab. 45 zeigt den Gärverlauf der gezügelten Gärung.

Tab. 45 Gärverlauf gezügelte Gärung

Datum	Ereignis
25.06.2012	Zugabe der Hefe zum Most
26.06.2012	Enzymzugabe und anschließende Lagerung bei 16 °C
26.06.2012	Probennahme für Aktivitätsbestimmung
28.06.2012	Probennahme für Aktivitätsbestimmung
02.07.2012	Probennahme für Aktivitätsbestimmung
05.07.2012	Probennahme für Aktivitätsbestimmung
09.07.2012	keine CO ₂ -Bildung mehr zu erkennen → Gärung beendet → Abstich + Probennahme für Aktivitätsbestimmung + anschließende Schönung mit Bentonit (ca. 0,2 g) und Filtration

- ungezügelte Gärung

Die gezügelte Gärung wurde nach Methode 4.1.3.3 durchgeführt. Tab. 46 zeigt den Gärverlauf der gezügelten Gärung.

Tab. 46 Gärverlauf ungezügelter Gärung

Datum	Ereignis
11.07.2012	Zugabe der Hefe zum Most
12.07.2012	Enzymzugabe und anschließende Lagerung bei Raumtemperatur
12.07.2012	Probennahme für Aktivitätsbestimmung
16.07.2012	Probennahme für Aktivitätsbestimmung
17.07.2012	Probennahme für Aktivitätsbestimmung
19.07.2012	Probennahme für Aktivitätsbestimmung
20.07.2012	Probennahme für Aktivitätsbestimmung + verminderte Gasbildung zu erkennen
23.07.2012	keine CO ₂ -Bildung mehr zu erkennen → Gärung beendet → Abstich + Probennahme für Aktivitätsbestimmung + anschließende Schönung mit Bentonit (ca. 0,2 g) und Filtration

Nach der Bentonit-Schönung wurden alle Proben bei 4 – 8 °C gelagert.

4.2.3 Analyse-Daten von Most & Wein

4.2.3.1 Analyse-Daten vom DLR Mosel

Beides (Tab. 47 und Tab. 48) wurde dankenswerter Weise vom Dienstleistungszentrum ländlicher Raum (DLR) Mosel zur Verfügung gestellt und per NIR-Screening ermittelt.

- Most

2011er Riesling, Ausgangsmostgewicht 90 °Oe, der Most war leicht ins gären gekommen, daher hat dieser nur noch 67 °Oe und bereits 18,5 g/l Ethanol.

Tab. 47 Analyse-Daten des verwendeten Most

Most	Dichte	Ethanol	red. Zucker	Glucose	Fructose	pH	Säure ges.	Weinsäure	Milchsäure	Äpfelsäure	Methanol	flüchtige Säuren	Glycerol
2011er Riesling	1,0676	18,5	165,8	76,3	86,1	3,14	6,2	7,7	2,4	1,3	1,58	1,0	0,0

- Riesling

Kueser Kardinalsbergs, Qualitätswein trocken

Ausgangsmostgewicht 76 °Oe, angereichert auf 85 °Oe

Tab. 48 Analyse Daten des verwendeten Wein

Wein	Dichte	Ethanol	red. Zucker	Glucose	Fructose	Saccharose	pH	Säure ges.	Weinsäure	Milchsäure	Äpfelsäure	flüchtige Säuren	Essigsäure	Glycerol
2011er Riesling	0,9945	93,6	7,0	2,0	6,8	0,0	3,13	5,94	3,1	0,1	1,9	0,47	0,31	5,05

4.2.3.2 eigene Bestimmungen

4.2.3.2.1 Glucose/Fructose-Gehalt

Tab. 49 stellt die Glucose- und Fructose-Gehalte der verschiedenen Proben dar.

Tab. 49 Gehalte an Glucose- und Fructose nach 4.1.3.6.1

Ansatz	Gehalt_{D-Glucose} [g/l]	Gehalt_{D-Fructose} [g/l]
<i>gezügelte Gärung</i>		
Most 1	75,1	87,4
Referenz	0,03	3,09
AR 2000	0,02	1,76
Lallzym β	0,17	3,57
Cellulase	0,09	2,21
βG	0,05	3,43
<i>ungezügelt Gärung</i>		
Most 2	73,0	89,5
Referenz	0,09	3,45
AR 2000	0,02	2,04
Lallzym	0,04	2,00
Cellulase	0,05	2,86
βG	0,01	1,24

4.2.3.2.2 Ethanol -Gehalt

Tab. 50 stellt die Ethanol-Gehalte der verschiedenen Proben dar.

Tab. 50 Ethanol-Gehalte nach 4.1.3.6.2

Ansatz	Gehalt_{EtOH} [g/l]	Gehalt_{EtOH} [Vol-%]
<i>gezügelte Gärung</i>		
Referenz	72,6	9,2
AR 2000	86,4	10,9
Lallzym β	77,8	9,9
Cellulase	75,5	9,6
βG	86,4	10,9
<i>ungezügelt Gärung</i>		
Referenz	81,8	10,4
AR 2000	73,7	9,3
Lallzym β	72,0	9,1
Cellulase	89,3	11,3
βG	81,8	10,4

4.2.3.2.3 pH-Werte

Tab. 51 stellt die pH-Werte der verschiedenen Proben dar.

Tab. 51 pH-Werte der verschiedenen Proben

Ansatz		pH
Most		3,22
<i>gezügelt</i>	Cellulase	3,08
	Lallzym β	3,10
	β G	3,07
	AR 2000	3,11
	Referenz	3,06
<i>ungezügelt</i>	Cellulase	3,10
	Lallzym β	3,09
	β G	3,09
	AR 2000	3,13
	Referenz	3,08

4.2.3.3 Aktivität über den Gärungsverlauf

Wie in Methode 4.1.3.3 beschrieben, wurden nach dem die Gärung stoppte alle Proben von der Hefeabgezogen (Abstich), mit Bentonit versetzt und abschließend über einen Zellulosefilter und Kieselgur klar filtriert.

4.2.3.3.1 gezügelte Gärung

Tab. 52 zeigt die Aktivität der jeweiligen Enzyme in den Gärversuchen über den gesamten Gärverlauf (Methode 4.1.3.2.1). Die gezügelte Gärung stoppte nach 14 Tagen.

Tab. 52 β -Glucosidase-Aktivität über den Gärverlauf (gezügelt) [U/mg]

Tag	Cellulase	L β	β G	AR 2000
0	0,010	0,003	0,031	0,005
2	0,006	0,005	0,057	0,011
6	0,005	0,008	0,047	0,012
9	0,002	0,004	0,012	0,005
13	0,003	0,001	0,010	0,003

4.2.3.3.2 ungezügelte Gärung

Tab. 53 zeigt die Aktivität der jeweiligen Enzyme in den Gärversuchen über den gesamten Gärverlauf (Methode 4.1.3.2.1). Die gezügelte Gärung stoppte nach 12 Tagen.

Tab. 53 β -Glucosidase-Aktivität über den Gärverlauf (ungezügelt) [U/mg]

Tag	Cellulase	L β	β G	AR 2000
0	0,005	0,001	0,013	0,002
4	0,005	0,004	0,005	0,007
5	0,005	0,004	0,005	0,007
7	0,007	0,011	0,014	0,012
8	0,011	0,011	0,013	0,017
11	0,011	0,008	0,024	0,014

4.2.3.4 Aktivität während Enzymbehandlung von Wein

Tab. 54 zeigt die Aktivität der jeweiligen Enzyme während der Enzymbehandlung (Methode 4.1.3.2.2). Die Enzyme wurden nach 21 Tagen durch Bentonit inaktiviert und abschließend über einen Zellulosefilter und Kieselgur klar filtriert.

Tab. 54 β -Glucosidase-Aktivität über die Weinbehandlung bei 25 °C [U/mg]

Tag	Cellulase	L β	β G	AR 2000
0	0,014	0,020	0,079	0,048
1	0,009	0,022	0,023	0,059
4	0,007	0,015	0,012	0,050
5	0,007	0,016	0,016	0,061
7	0,006	0,017	0,043	0,053
12	0,006	0,017	0,025	0,057
14	0,005	0,019	0,051	0,059
20	0,004	0,020	0,043	0,060

4.2.4 Bestimmung des Aromaprofils

Die Flächen der detektierten Komponenten wurden jeweils zum internen Standard 1,4-DBB ins Verhältnis gesetzt (0).

4.2.4.1 gezügelte Gärung

Tab. 55 zeigt das Aromaprofil nach der gezügelten Gärung.

Tab. 55 Aromaprofil nach gezügelter Gärung (4.1.3.3) nach Methode 4.1.3.7

Substanzname	Most	Referenz	AR 2000	Lallzym	Cellulase	βG
Ethylcaprylat	8,2%	104,9%	150,7%	86,2%	120,0%	121,8%
Dehydrolinalool	55,0%	52,3%	61,9%	35,8%	55,2%	58,5%
4-Ethylguajacol	17,9%	34,8%	56,4%	27,7%	36,0%	52,9%
Phenylethylacetat	n. d.	14,7%	11,5%	9,8%	6,8%	9,9%
Linalooloxid	11,1%	12,2%	20,1%	9,2%	12,6%	11,2%
α-Ionon	12,1%	11,5%	13,4%	9,3%	11,8%	13,7%
Linalool	9,6%	9,4%	11,1%	11,8%	11,5%	10,1%
Neroloxid	n. d.	3,3%	6,7%	3,8%	2,7%	3,8%
Ethyllaurat	3,9%	3,2%	2,4%	2,1%	5,1%	9,8%

4.2.4.2 ungezügelte Gärung

Tab. 56 zeigt das Aromaprofil nach der ungezügelten Gärung.

Tab. 56 Aromaprofil nach ungezügelter Gärung (4.1.3.3) nach Methode 4.1.3.7

Substanzname	Most	Referenz	AR 2000	Lallzym	Cellulase	βG
Ethylcaprylat	8,2%	114,6%	119,9%	91,2%	97,7%	103,3%
Dehydrolinalool	55,0%	49,8%	59,8%	42,5%	51,9%	50,3%
4-Ethylguajacol	17,9%	14,1%	49,9%	36,2%	38,1%	41,5%
Hexansäureethylester	n. d.	9,7%	25,0%	17,3%	28,4%	28,4%
Linalooloxid	11,1%	15,5%	20,2%	16,5%	15,9%	11,2%
α-Ionon	12,1%	17,4%	14,6%	12,6%	12,4%	12,2%
Linalool	9,6%	11,7%	12,4%	9,2%	11,8%	10,7%
Phenylethylacetat	n. d.	8,1%	12,3%	9,2%	8,4%	12,4%
2-Furaldehyd-Diethylacetal	12,9%	11,6%	11,3%	9,7%	15,4%	16,5%
Neroloxid	n. d.	5,9%	7,0%	5,6%	5,0%	5,5%
Ethyllaurat	3,9%	94,1%	6,6%	5,7%	4,9%	4,8%

4.2.4.3 Wein

Tab. 57 zeigt das Aromaprofil von Wein nach 21 Tagen Enzymzusatz.

Tab. 57 Aromaprofil Wein nach Enzym-Einsatz (4.1.3.5) nach Methode 4.1.3.7

Substanzname	Referenz	AR 2000	Lallzym β	Cellulase	β G
Ethylcaprylat	147,3%	112,3%	118,5%	103,6%	104,3%
1-Hexanol	43,7%	51,4%	55,4%	54,3%	47,5%
Hexansäureethylester	40,2%	44,8%	51,8%	31,0%	43,2%
Dehydrolinalool	30,4%	33,6%	33,7%	28,2%	31,2%
α-Ionon	9,5%	9,1%	10,0%	10,2%	7,8%
Linalool	6,6%	8,9%	9,4%	7,9%	7,0%
Neroloxid	1,1%	3,1%	4,4%	4,6%	3,5%
Linalooloxid	8,4%	n. d.	n. d.	11,3%	n. d.

5 Diskussion

5.1 Enzymaktivität

Die Kennwerte der Bestimmung des molarem Extinktionskoeffizienten pNP (Tab. 18, S. 71) zeigen, dass eine photometrische Bestimmung der Konzentration über ϵ eine effektive und reproduzierbare Methode darstellt. Ohne großen Aufwand kann so schnell und einfach die Menge an freigesetztem pNP bestimmt und anhand des die Aktivität des entsprechenden Enzyms ermittelt werden. Abb. 16 zeigt die Steigungsgerade der Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizient von pNP.

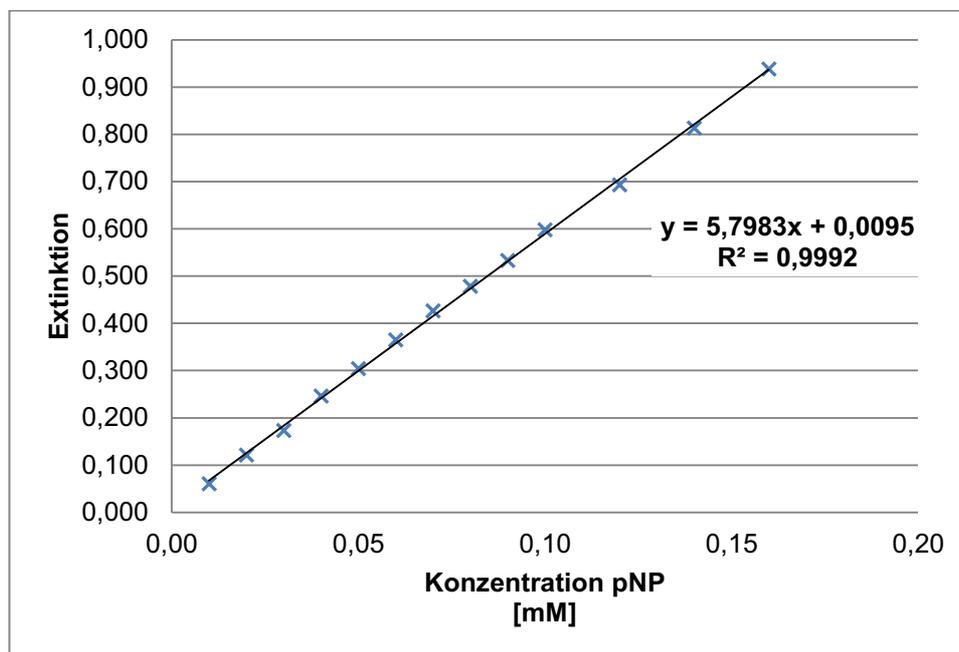


Abb. 16 Steigungsgerade der Bestimmung des molarer Extinktionskoeffizient von pNP

Der erhaltene Korrelationskoeffizient von 0,9996 ist ein guter Wert. Der Verfahrenskoeffizient von 4,82 % liegt ebenfalls im akzeptablen Bereich. Außerdem konnte der molare Extinktionskoeffizient von pNP mit $18300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ mit $18358 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und einer Standardabweichung von 1,92 % bestätigt werden. Zu den Aktivitätswerten der Charakterisierung kann man festhalten, dass sich die β -Glucosidase-Aktivität der β -Glucosidase aus Mandeln im Vergleich zu den anderen drei Enzympräparaten (AR 2000, Cellulase und Lallzym β) deutlich voneinander unterscheidet. Die Aktivität der Mandel- β -Glucosidase ist mit 20,3 U/mg (unter optimalen Bedingungen) deutlich höher. Dieser Unterschied ist damit zu erklären, dass es sich bei diesem Präparat um reine β -Glucosidase handelt, während bei den anderen drei Präparaten jeweils um Enzym-

Mischungen. Kritisch muss bei der β -Glucosidase aus Mandeln angemerkt werden, dass diese auf Grund der geringen Einwaage und kristallinen Struktur äußerst schwer zu dosieren war und daher sehr schwer bis gar nicht reproduzierbare Ergebnisse erhalten wurden. Aufgrund der hohen Aktivität der β -Glucosidase und der im Vergleich niedrigen Aktivität der drei anderen Enzympräparate wird in der folgenden Diskussion mehr auf die prozentualen Ergebnisse eingegangen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Als Bezugspunkt für die prozentualen Werte bzw. Diagramme der Enzym-Aktivität wurden die Parameter $\text{pH}_{\text{Opt}} 5,0$ und $\text{Temperatur}_{\text{Opt}} 37\text{ °C}$ genommen [Ketudat Cairns & Esen (2010)].

5.1.1 Vergleich Methoden zur Enzymaktivitätsbestimmung

Der Vergleich der eigenen Aktivitätswerte mit den Werten aus der vorangegangenen Bachelorarbeit [Schäfer (2012)] (Tab. 58), bestätigt für die Mandel- β -Glucosidase ihre starke Substratspezifität [Turan & Zheng (2005)]. Für die verwendete β -Glucosidase bedeutet das eine Aktivität von 20,3 U/mg, erhalten über die pNPG-Methode, im Vergleich zu einer Aktivität von 5,46 U/mg mit der Salicin-Methode (beides bei 37 °C und pH 5,0). Die Aktivität von dieser β -Glucosidase mit Salicin liegt bei ca. 26,9 % im Vergleich zu pNPG mit 100 %. Turan & Zheng (2005) beschreibt eine Aktivität von 10,4 % bei Salicin im Vergleich zu pNPG, allerdings mit einer anderen β -Glucosidase, bei pH 7,3, 40 °C und einer Substratkonzentration von 10 mM. Obwohl in dieser Arbeit andere Bedingungen angewandt wurden, bestätigen die erhaltenen Ergebnisse diese Substratabhängigkeit der katalytischen Wirkung der Mandel- β -Glucosidase. Tab. 58 zeigt den Vergleich der Salicin-Methode [Sigma-Aldrich (1994)] nach Schäfer (2012) und der pNPG-Methode (4.1.3.2).

Tab. 58 Vergleich Methode 4.1.3.2 und [*Sigma-Aldrich* (1994)] nach Schäfer (2012)

Parameter- veränderung		β-Glucosidase				Lallzym β			
		Salicin		pNPG		Salicin		pNPG	
		U/mg	%	U/mg	%	U/mg	%	U/mg	%
Temperatur	37	5,46	100,0	20,3	100,0	0,099	100,0	0,161	100,0
	25	5,53	101,3	11,0	54,3	0,145	146,5	0,049	31,0
	20	4,46	81,7	8,4	19,7	0,083	83,8	0,032	19,7
	15	3,09	56,6	6,1	12,6	0,066	66,7	0,020	9,9
pH-Wert	5,0	5,46	100,0	20,3	100,0	0,099	100,0	0,161	100,0
	4,0	4,74	86,8	9,9	49,0	0,114	115,2	0,159	91,5
	3,0	3,21	58,8	0,8	3,7	0,090	90,9	0,050	39,4
	2,8	0,91	16,7	0,4	1,9	0,120	121,2	0,038	25,4
Ethanol- Gehalt	5 %	5,21	95,4	15,6	76,9	0,090	90,9	0,180	115,5
	10 %	3,99	73,1	9,8	48,4	0,086	86,9	0,199	136,6
	15 %	2,58	47,3	6,8	33,4	0,083	83,8	0,208	138,0

Betrachtet man Tab. 58 genauer, insbesondere die prozentualen Werte der Aktivität, dann stellt man fest, dass die Aktivitätswerte eklatant voneinander abweichen. Besonders beim Lallzym β kann man die Werte nicht miteinander vergleichen. Die Werte mit Salicin schwanken immer um 100 %. Ein Einfluss der verändernden Bedingungen auf das Enzym ist nicht zu erkennen. Bei der Mandel-β-Glucosidase ähneln sich die Aktivitätsverläufe der beiden Methoden tendenziell, allerdings wird die Hemmung durch das Substrat pNPG deutlich besser dargestellt, was damit zusammenhängen kann, dass die Anfangsaktivität mit pNPG deutlich höher ist als mit dem Substrat Salicin. Erstaunlicherweise liegt die Aktivität der β-Glucosidase bei pH 3,0 mit dem Substrat Salicin bei 3,21 U/mg im Vergleich zu 0,8 U/mg mit pNPG deutlich höher.

Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass Enzympräparate mit einer geringen β-Glucosidase-(Neben-)Aktivität mit der Salicin-Methode [*Sigma-Aldrich* (1994)] nicht erfasst werden können. Die Aktivität von Präparaten mit hoher Enzymaktivität hingegen kann erfasst werden, wobei sich die Aktivitätswerte im Vergleich zu anderen Substraten deutlich unterscheiden.

5.1.2 Enzymaktivität in Abhängigkeit der Temperatur

Abb. 17 zeigt den Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit der Temperatur.

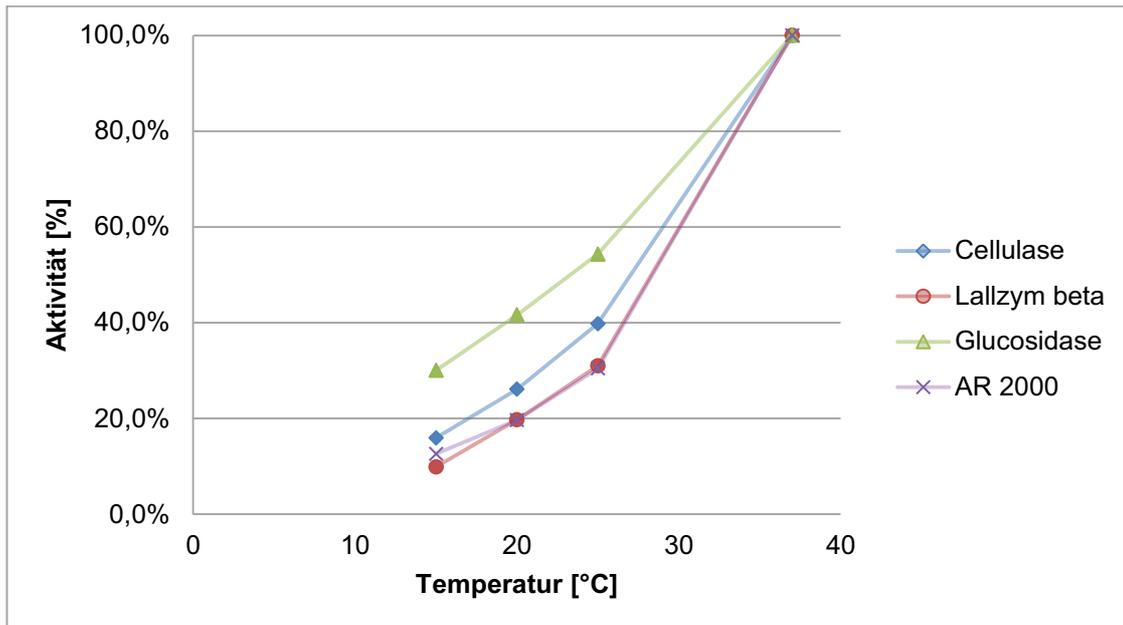


Abb. 17 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit der Temperatur
 (100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

Zu erkennen ist, dass alle vier Enzympräparate in Abhängigkeit der Temperatur einen sehr ähnlichen Aktivitätsverlauf haben, wobei die β -Glucosidase eine bessere Stabilität im Vergleich zu den anderen Präparaten aufweist. Diese hat bei 15 °C immer noch eine Aktivität von 30 % im Vergleich zu 9,9 bis 15,9 % bei den anderen drei Enzympräparaten. Betrachtet man die absoluten Units (Tab. 19, S. 72) zeigt die β -Glucosidase eine Aktivität von 20,3 U/mg beim Temperatur-Optimum von 37 °C, wohingegen die Aktivität bei AR 2000 bei 0,161 U/mg, die Cellulase bei 0,069 U/mg und Lallzym β bei 0,071 U/mg liegen. Betrachtet man lediglich diese drei Enzympräparate, zeigen die Cellulase und Lallzym β einen sehr ähnlichen Verlauf. AR 2000 weist eine deutlich höhere Aktivität auf, bei fast allen Temperaturen mehr als doppelt so hoch, was an einer höheren β -Glucosidase-Nebenaktivität liegen könnte

5.1.3 Enzymaktivität in Abhängigkeit des pH-Wert

Die Aktivität über den pH-Wert zeigt ein anderes Bild, wie in Abb. 18 zu erkennen ist.

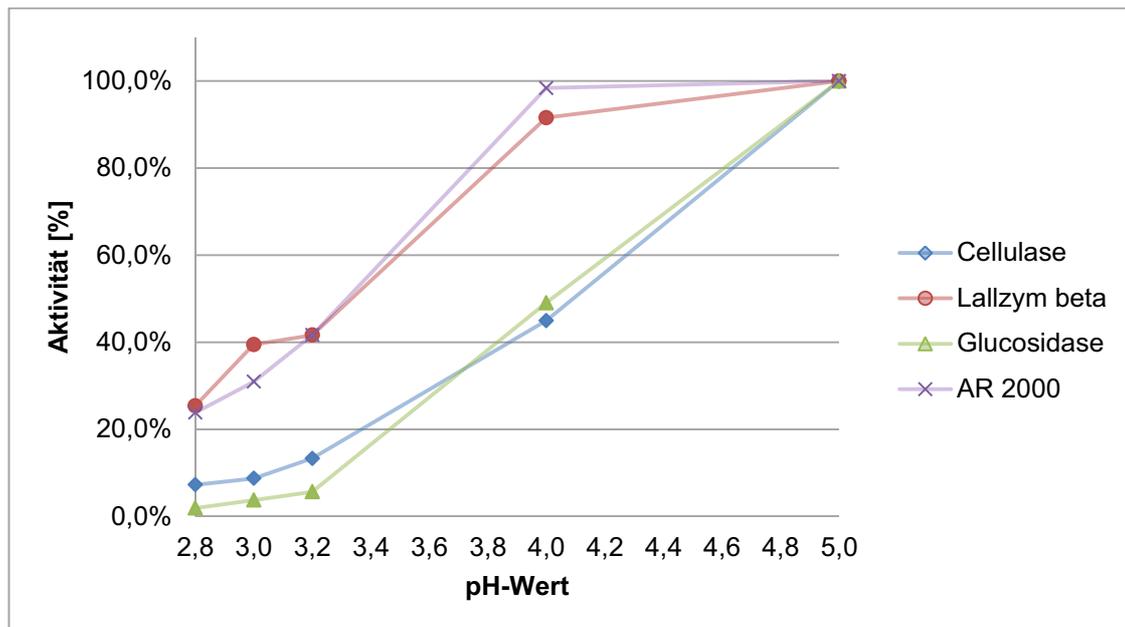


Abb. 18 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert
(100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

Vergleicht man die prozentualen Aktivitäten, weisen die zwei önologischen Enzympräparate eine sehr ähnliche Charakteristik auf und sind auch noch bei niedrigen pH-Wert relativ aktiv. Eine pH-Wert-Absenkung von 5,0 auf 4,0 hat kaum einen Effekt (von jeweils 100 % auf 98,4 % bei AR 2000 und 91,5 % bei Lallzym β) und auch bei einem sehr sauren pH-Wert von 2,8, wie diese selten bei Wein zu finden sind – pH-Werte im Wein liegen meist zwischen 3,0 und 4,0 – sind beide Präparate noch mit 25,4 % (Lallzym β) und 23,8 % (AR 2000) aktiv (Tab. 22, S. 72). Die Cellulase und β -Glucosidase weisen ebenfalls eine ähnliche Charakteristik auf, werden aber deutlich stärker durch pH-Wert-Absenkungen gehemmt. Bereits bei einer Absenkung von 5,0 auf 4,0 verlieren beide über 50 % ihrer Aktivität (44,9 % bei Cellulase und 49,0 % bei β G) und bei pH 3,0 sind beide Präparate quasi inaktiv. Besonders bei der β -Glucosidase ist kaum noch eine Aktivität zu messen bzw. die Extinktionswerte waren bereits zu klein um verlässliche Aussagen treffen zu können ($E_{400-BW} < 0,040$, s. Anhang A.2.3). Betrachtet man die absoluten U/mg-Werte der drei Enzym-Mischungen (vgl. Tab. 21, S. 72), zeigt das Präparat AR 2000 die höchsten Aktivitätswerte (0,161 U/mg runter auf 0,038 U/mg, im Vergleich zu 0,071 runter auf 0,018 U/mg bei Lallzym β und 0,069 runter auf 0,005 U/mg bei der Cellulase). Wie bei der Temperatur sind auch bei AR 2000 die Aktivitäts-Werte im Vergleich zu Lallzym β und Cellulase mindestens doppelt so hoch. Auf Grund dieser Ergebnisse sind die beiden

önologischen Enzyme – Lallzym β und AR 2000 – am besten für einen Einsatz unter Weinbedingungen geeignet.

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse mit den Erkenntnissen des Wirkungsmechanismus der β -Glucosidasen (Abschnitt 3.3.3.4, S. 38), kann man den Aktivitätsverlust bei sauren pH-Bereichen erklären. Beide Mechanismen – egal ob Retaining oder Inverting – protonieren im ersten Schritt das Glykosid und je saurer der pH ist, desto mehr wird die Protonierung zurückgetränkt bzw. behindert. Daher ist der pH ein limitierender Faktor bei der katalytischen Aktivität der β -Glucosidasen.

5.1.4 Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt

Die Ergebnisse der Enzym-Aktivität in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt sind interessant, da bei den Enzympräparat Cellulase, Lallzym β und AR 2000 sich eine Aktivitätssteigerung ergab. Lediglich bei der β -Glucosidase wirkt der Ethanol hemmend (vgl. Abb. 19).

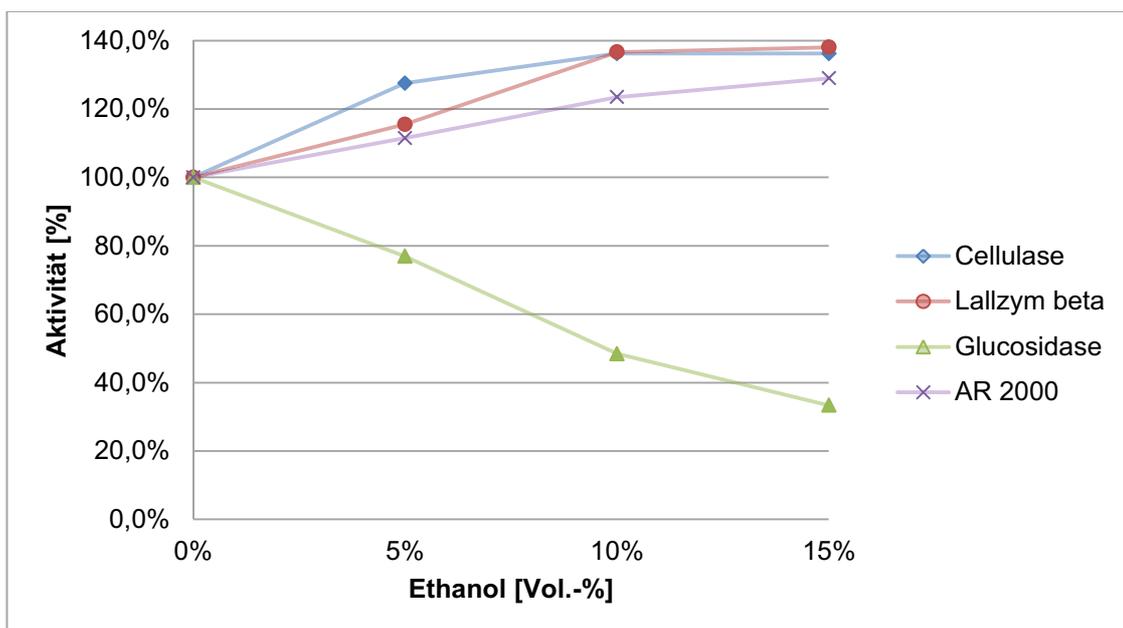


Abb. 19 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt in Prozent (100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

Die Aktivität der β -Glucosidase reduziert sich bei 15 Vol.-% Ethanol auf 33,4 %. Bei allen drei anderen Präparaten hingegen konnte eine Steigerung der Aktivität im Bereich von 30 % festgestellt werden.

Für einen Einsatz in Wein bedeuten die erhaltenen Ergebnisse, dass eine Dosierung der Enzyme am Ende der Gärung – bei höheren Ethanol-Gehalten – zu

höheren Aktivitäten führt. Der Einsatz der drei Enzympräparate Lallzym β , AR 2000 und Cellulase am Ende der Gärung ist daher von Vorteil. Die Mandel- β -Glucosidase hingegen wird durch die Ethanol-Gehalte am Ende der Gärung gehemmt.

5.1.5 Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt

Abb. 20 zeigt die Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt.

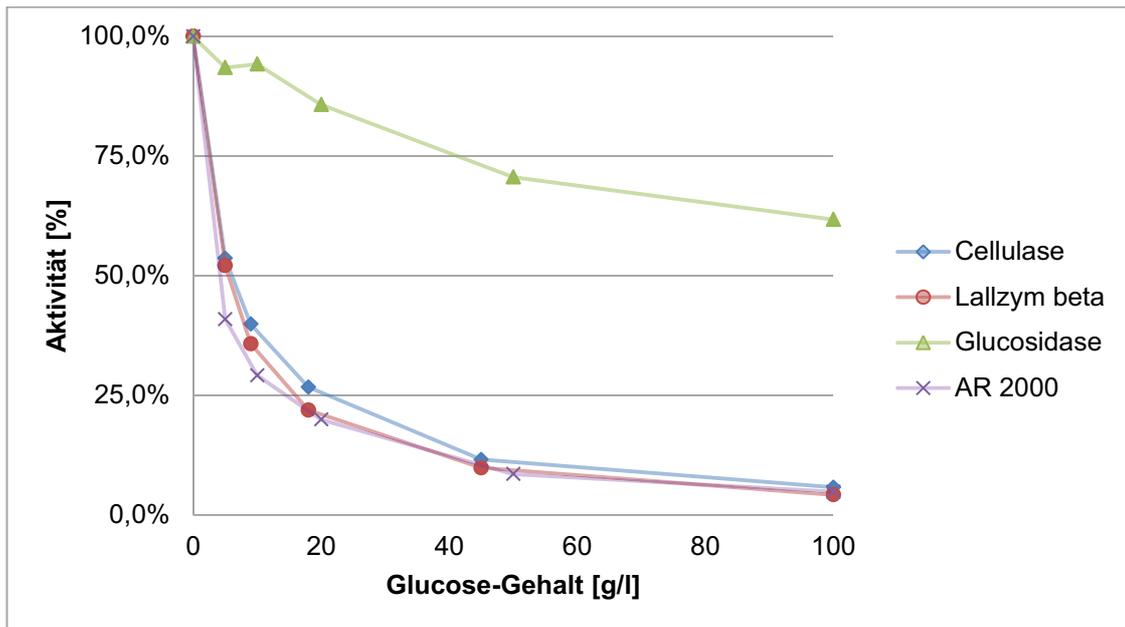


Abb. 20 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt in Prozent
(100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

Zu erkennen ist, dass das Präparat Cellulase, Lallzym β und AR 2000 stark durch Glucose gehemmt werden. Bereits Glucose-Gehalte von 0,5 % hemmen die Cellulase und Lallzym β um knapp 50 %, AR 2000 sogar um knapp 60 %. Die Mandel- β -Glucosidase hingegen zeigt ein anderes Verhalten. Sie ist deutlich resistenter gegenüber Glucose. Gehalte bis 1 % Glucose führen zu praktisch keinem Aktivitätsverlust. Auch bei 2 % Glucose ist die β -Glucosidase ebenfalls noch zu 85,7 % aktiv. Selbst bei 20 % Glucose zeigt dieses Enzym noch 36 % Aktivität.

Betrachtet man die absoluten Werte von Cellulase, L β und AR 2000 (Tab. 25, S. 73), weisen alle drei Präparate ein ähnliches Verhalten auf und werden äußerst stark durch Glucose gehemmt. Glucose-Gehalten von ca. 100 g/l, wie diese in Most vorkommen, führen zu einer nahezu vollständigen Hemmung der β -Glucosidase-Aktivität der drei Enzym-Mischungen.

Auch hier ist für die drei Enzym-Präparate Lallzym β , AR 2000 und Cellulase ein Einsatz am Ende der Gärung von Vorteil, da hier die Glucose-Gehalte am geringsten sind. Außerdem ist davon auszugehen, dass die drei Präparate in trockenem Wein (bis 4,5 g/l Restsüße) die höchsten Aktivitäten aufweisen und bei lieblichen Wein (bis 45 g/l Restsüße) bereits mit einer Hemmung von über 90 % zu rechnen ist. Zu beachten ist, dass bei der glykosidischen Spaltung Glucose freigesetzt wird und so eben falls zu einer Hemmung der Enzyme führen könnte. Diese Hemmung ist allerdings zu vernachlässigen, da die Konzentration an freigesetzter Glucose im Spurenbereich liegt. Die Mandel- β -Glucosidase stellt auch hier wieder eine Ausnahme dar, da diese die Glucose-Gehalte deutlich besser toleriert.

5.1.6 Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt

In Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt waren die Ergebnisse, ähnlich wie bei den Ethanol-Gehalten, sehr interessant (vgl. Abb. 21).

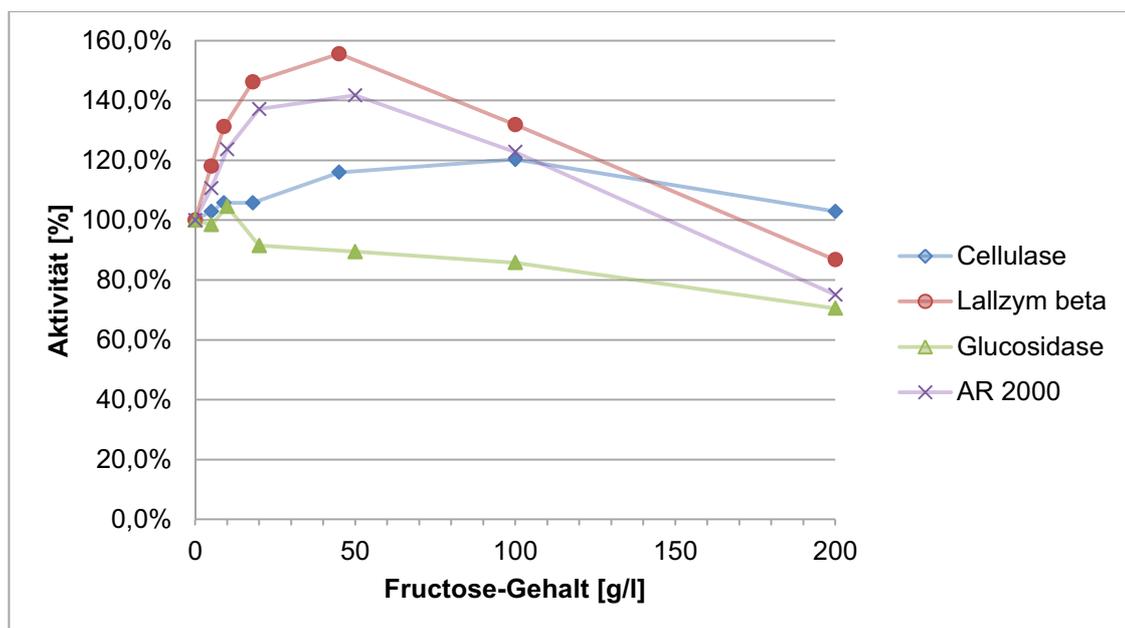


Abb. 21 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt in Prozent (100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

Erst hohe Gehalte von bis zu 200 g/l Fructose hemmen die Enzyme, allerdings dann auch nur schwach. Die Mandel- β -Glucosidase weist bei 200 g/l Fructose noch eine Aktivität von 70,5 % auf, AR 2000 noch 75,1 % und Lallzym β von 86,7 %, die Cellulase sogar von 102,9 %. Bei keinem Enzym findet eine Hemmung statt. Das Interessante an den Werten ist, dass niedrigere

Konzentration Fructose (5 bis 100 g/l) die Aktivität bis zu einem gewissen Grad sogar steigert und erst sehr hohe Konzentration wieder zu einem Abfall der Aktivität führen (Tab. 28, S. 74). Das vermeintliche Optimum mit maximaler Aktivität liegt bei Lallzym β und AR 2000 bei ca. 5 g/l Fructose mit einer Aktivität von 155,5 % bzw. 141,7 % und bei Cellulase bei etwa 100 g/l mit einer Aktivität von 120,3 %. Die Mandel- β -Glucosidase zeigt diese Steigerung der Aktivität allerdings nicht, bis ca. 10 g/l Fructose bleibt die Aktivität bei ca. 100 % und danach fällt diese leicht ab.

Für den Einsatz der Enzympräparate Lallzym β , AR 2000 und Cellulase in Wein bedeutet dies, dass von keiner Hemmung durch Fructose auszugehen ist, sondern durch die geringen Gehalte an Fructose in Wein (bis zu 50 g/l) ist eine Steigerung der Aktivität zu erwarten. Der Punkt bei dem eventuell von einer Hemmung auszugehen durch Fructose (200 g/l) wird in Wein und selbst in Most nicht erreicht.

5.1.7 Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt

Beim Kaliumdisulfit wurde zusätzlich zum pH 5,0 ein pH von 3,2 gewählt. Dies hat zwei Gründe zum einen ist der pH 3,2 ein weintypischer pH-Wert und zum anderen spaltet Kaliumdisulfit unter sauren Bedingungen Schwefeldioxid ab. 50 % des Kaliumdisulfits zerfallen zu SO_2 [Bergner (1993), S. 125].

Die Enzympräparate werden durch Kaliumdisulfit bzw. Schwefeldioxid tendenziell kaum bis gar nicht gehemmt (vgl. Abb. 22, Abb. 23, Abb. 24 und Abb. 25).

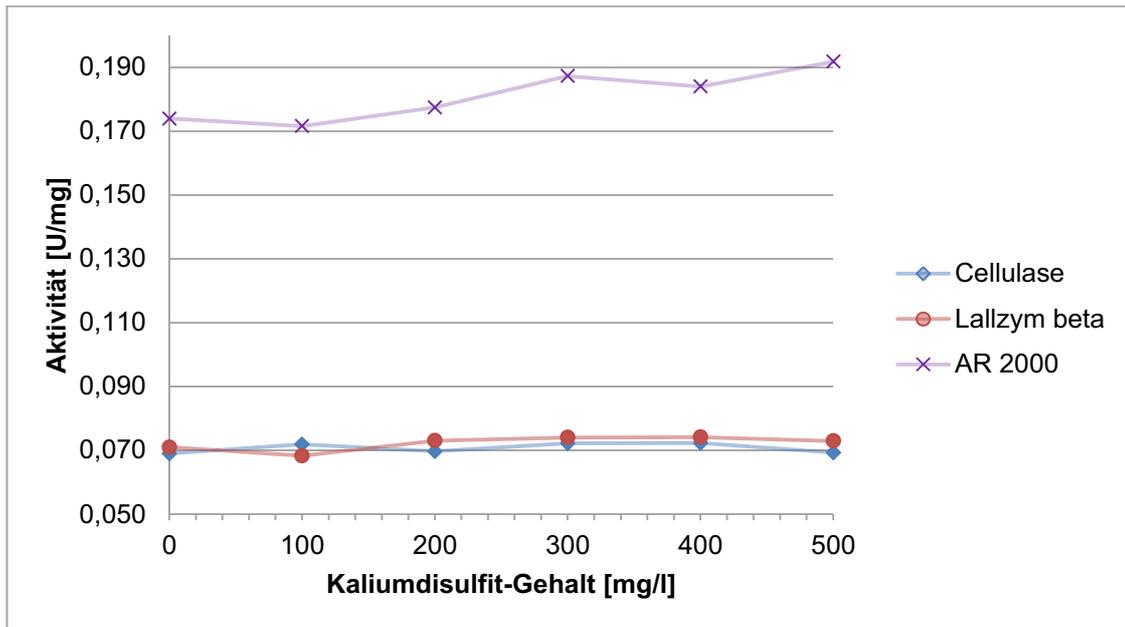


Abb. 22 Aktivität in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (bei pH 5,0) in U/mg (100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

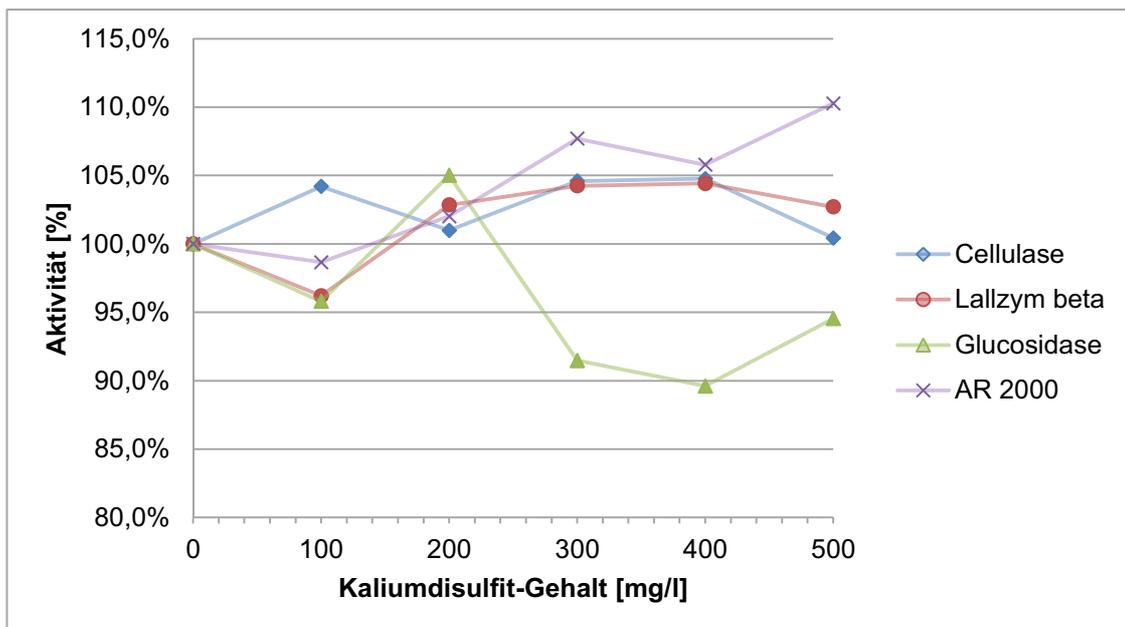


Abb. 23 Aktivität in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (bei pH 5,0) in Prozent (100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

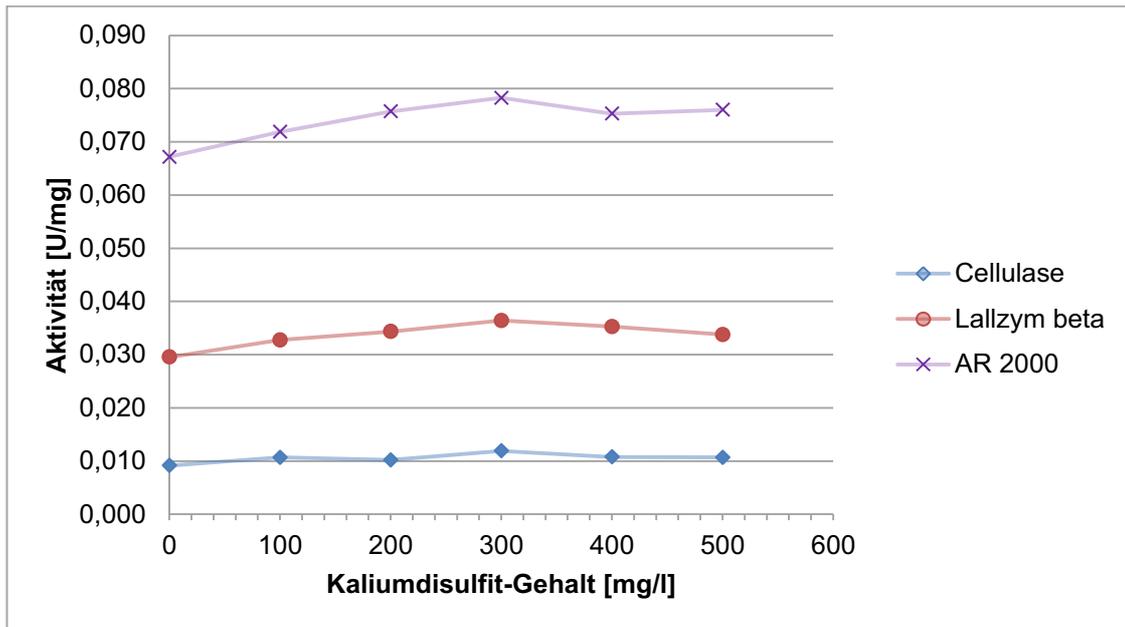


Abb. 24 Aktivität in Abhängigkeit des Kaliumdisulfit-Gehalt in U/mg (pH 3,2)
(100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

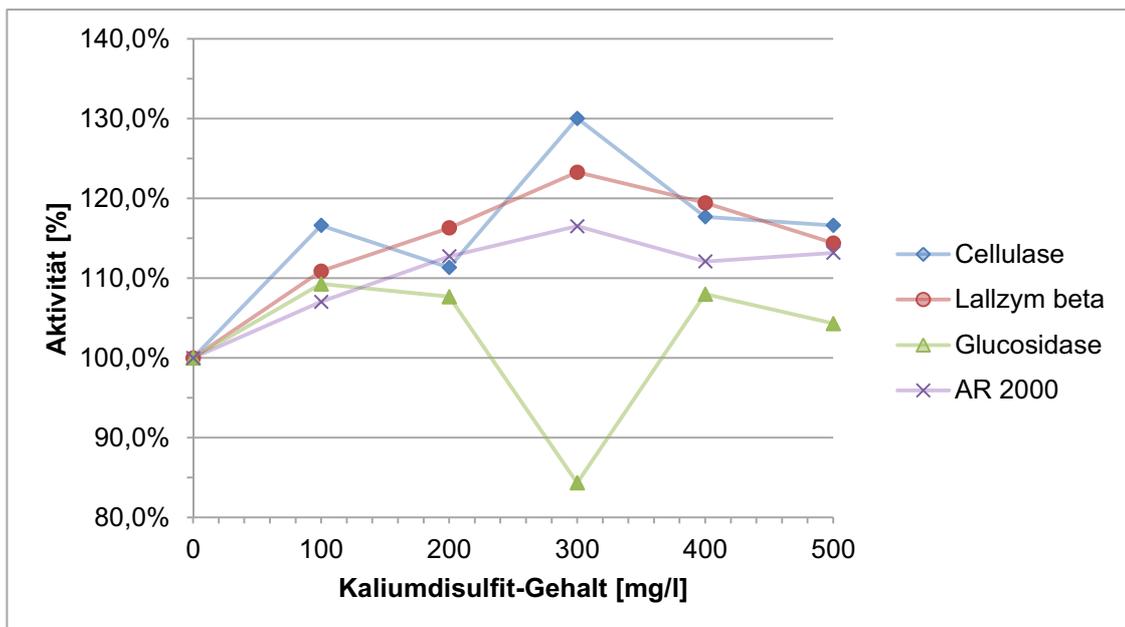


Abb. 25 Aktivität in Abhängigkeit des Kaliumdisulfit-Gehalt in Prozent (pH 3,2)
(100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

Die Aktivitätswerte bewegen sich bei ein weintypischen pH-Wert von 3,2 alle in einem Bereich von 100 bis 130 % (Tab. 30, S. 75), bei pH 5,0 schwanken diese um ca. 100 % (Tab. 32, S. 76). Die Aktivitätswerte bei pH 3,2 von 100 bis 130 % lassen vermuten, das Kaliumdisulfit bzw. Schwefeldioxid sogar zu einer Aktivitätssteigerung führen kann. Allerdings aufgrund der Schwankungen der Werte (s. Anhang A.2) ist eher davon auszugehen, dass es durch die Anwesenheit von Kaliumdisulfit bzw. Schwefeldioxid zu einer chemischen Hydrolyse von pNPG zu pNP kommt, wofür ins besonders die beobachteten starken Schwankungen bei

den Blindwerten, die Kaliumdisulfit ohne Enzymzusatz enthielten, sprechen. Daher war es auch bei der Aktivitätsmessung es äußerst schwierig konstante Extinktionswerte zu erhalten.

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

5.1.8 Aktivität unter Weinparametern

Für alle drei Modell-Weine gilt, dass die Werte für Säure/pH und Ethanol-Gehalt konstant sind (vgl. Tab. 12, S. 61). Lediglich die Temperatur sowie der Gehalt an Restsüße (Glucose und Fructose) wurden variiert. Der pH von 3,2 ist für die meisten Weine typisch. Beim Modell-Most entfällt der Ethanol.

Die Enzymaktivität im Modellwein *trocken* der Enzympräparate Cellulase, Lallzym β und AR 2000 verringert sich erwartungsgemäß von 60 % über 57,1 % bis hin zu 50 % über die Temperatur (25 °C \rightarrow 15 °C, Tab. 33, S. 77 und Abb. 26).

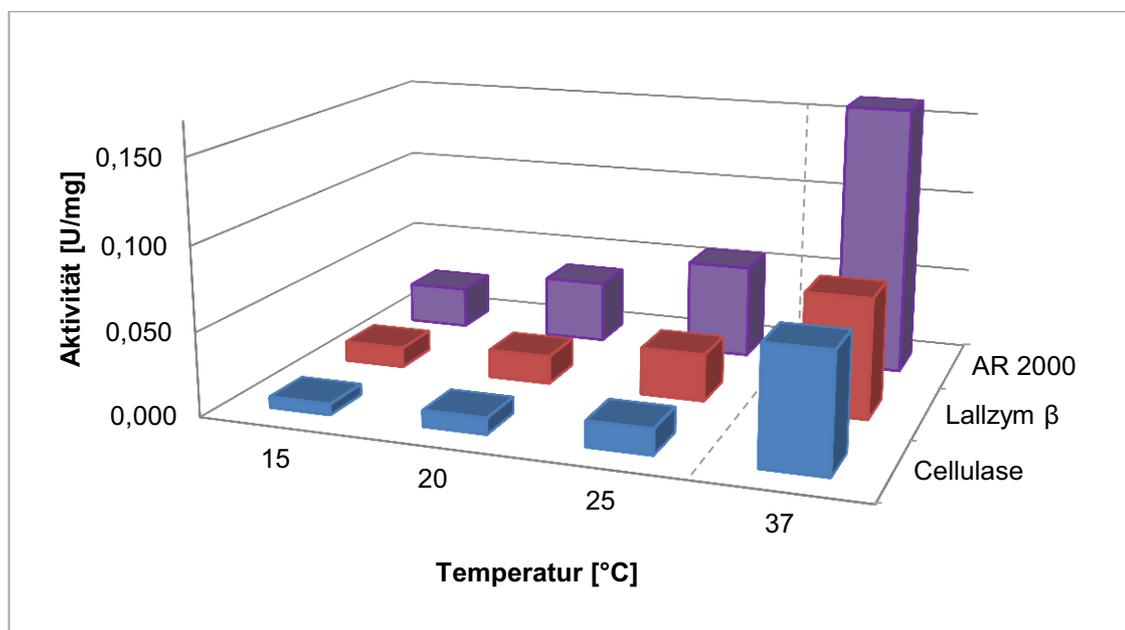


Abb. 26 Aktivität unter Wein-Parametern *trocken* in U/mg (100 % Aktivität entspricht $\text{pH}_{\text{Opt}} 5,0$ und $T_{\text{Opt}} 37 \text{ °C}$ [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

Ähnlich verhält es sich bei Modellwein *halbtrocken* und *lieblich* (vgl. Abb. 27 und Abb. 28).

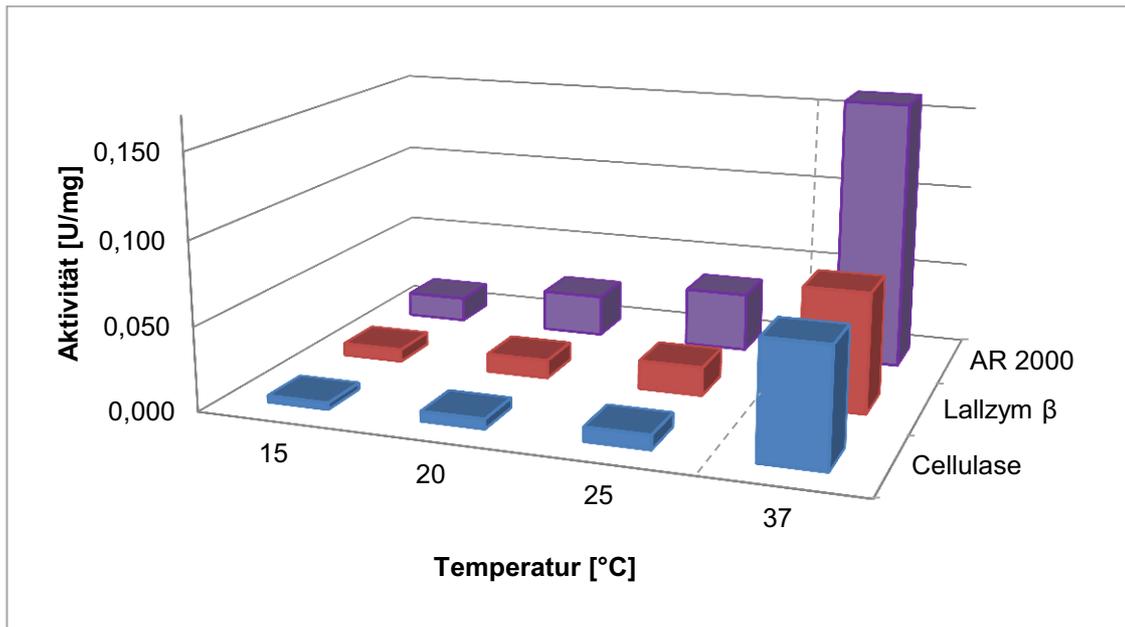


Abb. 27 Aktivität unter Wein-Parametern *halbtrocken* in U/mg
(100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

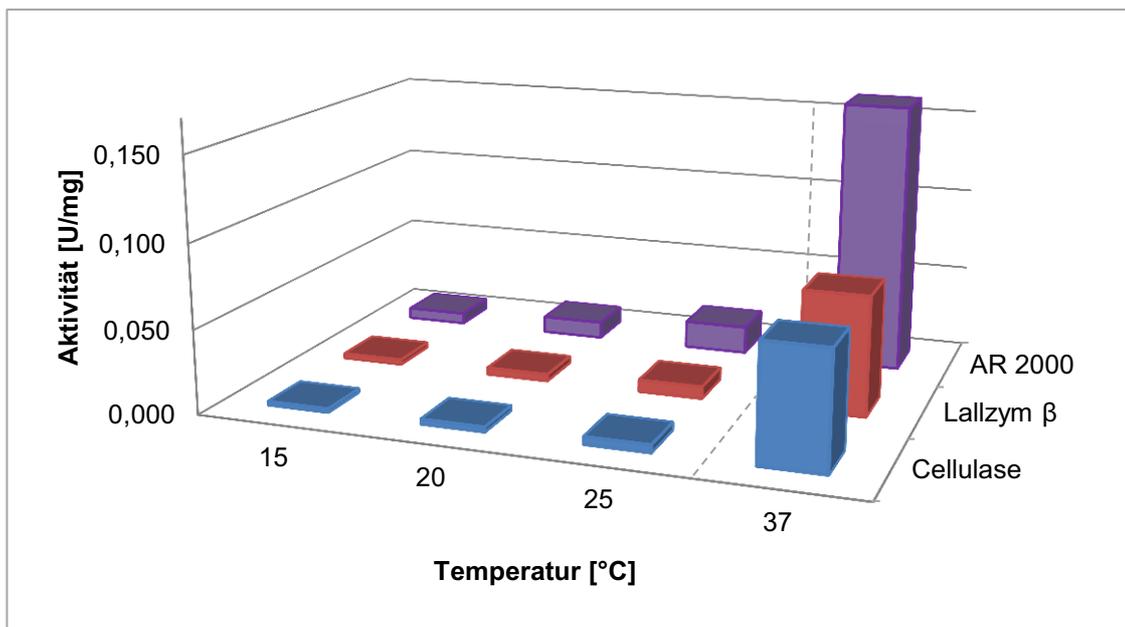


Abb. 28 Aktivität unter Wein-Parametern *lieblich* in U/mg
(100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

Nimmt man den Aktivitätswert der Enzym bei 37 °C und pH 5,0 als Referenz, hat sich beim Modellwein *trocken* (25 °C) die Aktivität der Cellulase um 78,3 %, bei Lallzym β um 60,6 % und bei AR 2000 um 65,2 % verringert. Deutlich stärker ist die Verringerung bei Modellwein *halbtrocken* (25 °C) 88,4 %, 76,1 % und 77,6 %. Im Modellwein *lieblich* (25 °C) liegt eine Verringerung von 92,8 %, 90,1 % und ebenfalls 90,1 % vor.

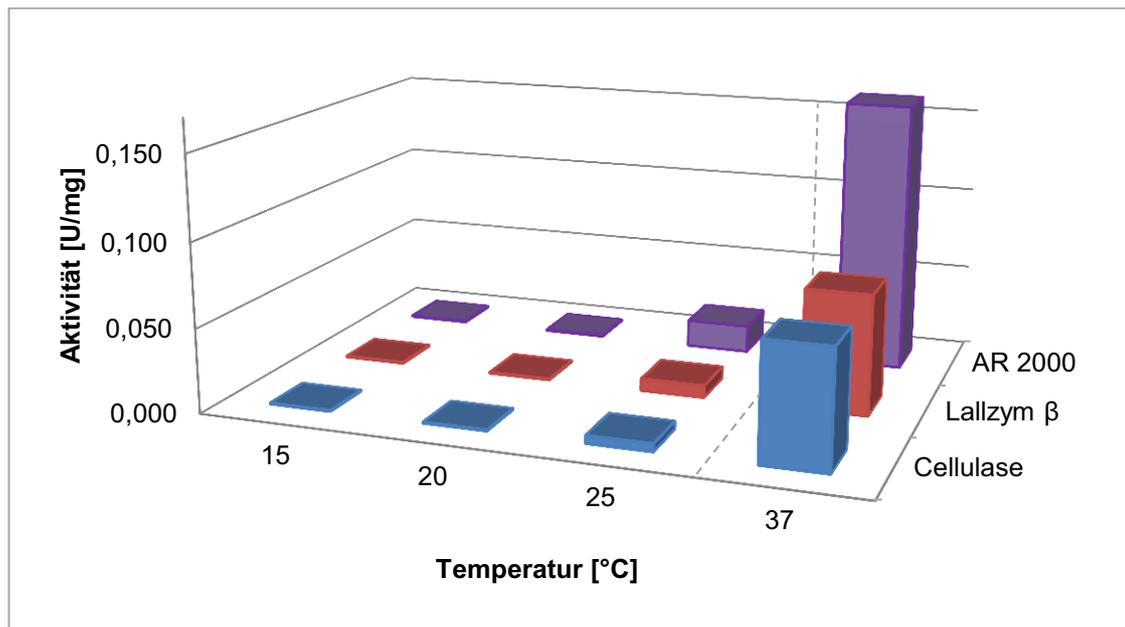


Abb. 29 Aktivität unter Most-Parametern in U/mg
 (100 % Aktivität entspricht pH_{Opt} 5,0 und T_{Opt} 37 °C [Ketudat Cairns & Esen (2010)])

Im Modell-Most (vgl. Abb. 29) sind diese Werte bei 25 °C identisch, allerdings ist bei den niedrigeren Temperaturen prinzipiell keine Aktivität mehr zu messen, da die Extinktionswerte außerhalb des Messbereiches liegen und man daher davon ausgehen kann, dass keine bzw. nur noch eine sehr schwache Aktivität vorhanden ist.

Wie zu erwarten, fällt mit steigendem Glucose-Gehalt und sinkender Temperatur die Aktivität der Enzyme stark ab. Temperatur und Restsüße – im Speziellen Glucose – sind hier die Haupteinflussfaktoren und man kann festhalten, dass der Glucose-Gehalt neben der Temperatur die Aktivität der Enzympräparate am meisten hemmen. Die Mandel-β-Glucosidase wird allerdings unter allen weintypischen Bedingungen so stark gehemmt, dass keine Aktivität mehr zu messen ist.

5.1.9 Fazit nach Charakterisierung

Anhand der erhaltenen Werte können Aussagen über eine mögliche Aktivität der Enzym-Präparate in Most und Wein getroffen werden.

In Most ist bei allen Enzym-Präparaten von keiner bis kaum einer Aktivität auszugehen, bei 25 °C zeigen die Präparate Cellulase, Lallzym β und AR 2000 noch eine geringe Restaktivität von 6 – 10 % im Vergleich zu 37 °C und pH 5,0. Bei 20 °C ist die Aktivität bei allen drei Präparate nahe 0 und es ist von keiner

Aktivität mehr auszugehen. Die β -Glucosidase aus Mandeln zeigt unter Weinparametern prinzipiell keine Aktivität mehr.

Die Temperatur hat auf alle Enzym-Präparate, auf Grund der RGT-Regel, einen ähnlichen Effekt. Mit sinkender Temperatur sinkt die Aktivität.

In Abhängigkeit vom pH-Wert verhalten die Präparate sich anders. Die zwei Enzympräparate für den önologischen Einsatz tolerieren niedrige pH-Bereiche deutlich besser als die Präparate Cellulase und β -Glucosidase, die um den pH-Bereich 3,0 nahezu keine Aktivität mehr aufweisen.

Die Präparate Cellulase, Lallzym β und AR 2000 tolerieren nicht nur steigende Ethanol-Gehalte, sondern diese führen sogar zu einer Aktivitätssteigerung.

Lediglich die β -Glucosidase verliert mit steigendem Ethanol-Gehalt an Aktivität, bei 10 Vol.-% gut 50 %.

Steigende Glucose-Gehalte führen bei allen vier Präparaten zu Aktivitätsverlusten, wobei die β -Glucosidase weniger stark an Aktivität verliert. Aber für alle Präparate ist die Glucose ein Inhibitor. Die Fructose verhält sich konträr zur der Glucose, steigende Fructose-Gehalte führen bei den Enzym-Präparaten nicht zu einem Aktivitätsverlust, sondern bis zu 100 g/l Fructose sogar zu einer Steigerung der Aktivität bzw. die β -Glucosidase wird lediglich leicht, knapp 15 % bei 100 g/l Fructose, gehemmt.

In der Weinwirtschaft zugelassene Kaliumdisulfit- bzw. Schwefeldioxid-Gehalte haben keinen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme.

Als Haupteinflussfaktoren für die Aktivität der Enzympräparate sind Glucose und Temperatur neben dem pH-Wert zu nennen. Daher ist eine Dosierung der Enzympräparate am Ende der Gärung sinnvoll, insbesondere bei einer gezügelten Gärung.

Das Enzympräparat β -Glucosidase zeigt zwar deutlich höhere Aktivitätswerte, bis zu 21,2 U/mg, allerdings ist dies der Tatsache zu schulden, dass es sich bei diesem Präparat nicht um ein Enzymgemisch mit einer β -Glucosidase-Nebenaktivität handelt, sondern um eine reine lyophilisierte β -Glucosidase. Unter Wein-Parametern wird die β -Glucosidase von allen Präparaten am stärksten gehemmt bzw. es ist keine Aktivität mehr messbar und daher ist diese β -Glucosidase für den Einsatz in Most und Wein eher ungeeignet.

Das Enzympräparat Cellulase verhält sich bezüglich der β -Glucosidase-Aktivität ähnlich wie die Präparate Lallzym β und AR 2000. Allerdings wird die Cellulase

ähnlich stark durch niedrige pH-Bereiche wie die β -Glucosidase gehemmt, ca. 90 % Hemmung bei einem pH-Bereich um 3,0. Daher ist ein Einsatz dieses Präparates in Most und Wein ebenfalls schwierig. Überraschenderweise zeigt die Cellulase unter Weinparametern allerdings ähnlich hohe Aktivitätswerte wie Lallzym β und daher ist ein Einsatz dieses Präparates in Wein auf jeden Fall interessant.

Das Enzympräparat Lallzym β zeigt bei niedrigen pH-Bereichen noch ca. 40 % Aktivität und verhält sich auch sonst sehr ähnlich zu dem Präparat AR 2000, die prozentualen Aktivitätswerte der beiden Präparate differieren meist nur um etwa 1 %-Punkt.

AR 2000 zeigt zwar ein ähnliches Verhalten wie Lallzym β , allerdings sind die absoluten Aktivitätswerte [U/mg] meist um das Doppelte höher. Bei weniger Mengen-Einsatz dieses Enzympräparats kann also die gleiche Aktivität im Wein erreicht werden.

5.2 Aktivität in Most und Wein

Da es sich bei der Aktivitätsbestimmung in Most und Wein mittels pNPG um eine stark abgewandelte Form der Methode 4.1.3.2 handelt, wurde zuerst eine Kontrolle dieser Methode über die Wiederfindungsrate durchgeführt (4.2.1.3.1). In Most wurde eine durchschnittliche Wiederfindung von 97,5 % und einer Standardabweichungen von 0 bis 3,9 % festgestellt und in Wein wurde eine durchschnittliche Wiederfindung von 96,6 % und einer Standardabweichungen von 1,1 bis 10,3 % festgestellt. Die hohe Standardabweichung von 10,3 % kommt im niedrigen Konzentrationsbereich von 3,4 μ M vor, in diesem Bereich haben geringe Extinktionsabweichungen eine große Wirkung und können so zu höheren Abweichungen führen. Daher ist bei niedrigen Nettoextinktionswerten ($\Delta E < 0,040$) darauf zu achten und dies bei der Ergebnisauswertung zu beachten.

5.2.1 Parameter in Most und Wein

Die Proben aus dem gezügeltem bzw. ungezügeltem Gäransatz (Tab. 49, Tab. 50 und Tab. 51, S. 85 - 86) weisen Schwankungen in einem Bereich von 1,24 bis 3,57 g/l Fructose, 0,01 bis 0,09 g/l Glucose und 9,1 bis 11,3 Vol.-% Ethanol. Das lässt darauf schließen, dass eine Gärung in einem kleinen Gäransatz von ca. 1 l nicht gleich verläuft, sondern zu unterschiedlichen Gärverläufen und so zu

anderen Gärprodukten führen kann. Bei weiteren Gärversuchen sind daher größere Gäransätze in größeren Behältnissen zu empfehlen.

5.2.2 Aktivitätsverlauf während der Gärung

Der Aktivitätsverlauf über die gezügelte Gärung (Tab. 52, S. 86 und Abb. 30) zeigt, dass alle Enzympräparate eine Aktivität nahe 0 aufweisen und tendenziell kaum von einer nennenswerten β -Glucosidase-Aktivität im Gäransatz auszugehen ist.

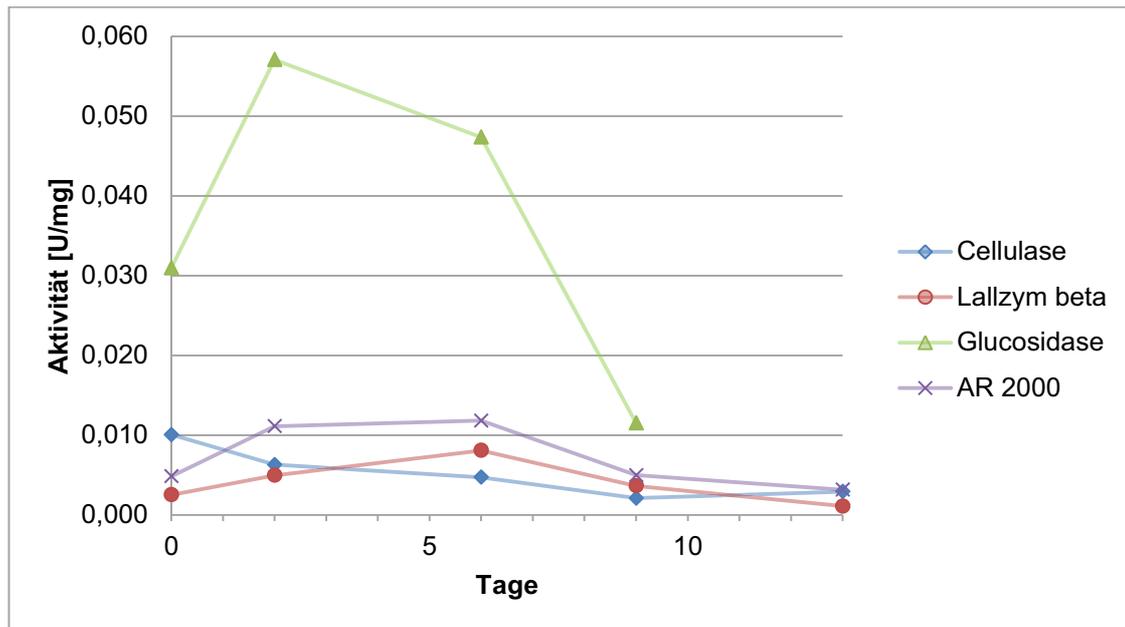


Abb. 30 Enzym-Aktivität über den Gärverlauf (gezügelt)

Die etwas höheren Werte der Mandel- β -Glucosidase spiegeln allerdings nicht die tatsächliche Aktivität wieder, sondern haben mit der geringen Einwaage der β -Glucosidase zu tun. Damit führen bereits geringe Extinktionswerte bzw. -änderung zu hohen Aktivitätswerten. Effektiv ist davon auszugehen, dass die Aktivität der β -Glucosidase während der ganzen gezügelten Gärung bei 0 liegt. Die erhaltenen Werte sind vergleichbar mit den Aktivitätswerten unter Weinparametern. Die niedrige Temperatur von 16 °C bei der gezügelten Gärung führen zu einer äußerst geringen Aktivität, die Aktivität der Cellulase und Lallzym β liegen immer unter 0,010 U/mg, lediglich das Präparat AR 2000 kommt knapp über 0,010 U/mg hinaus.

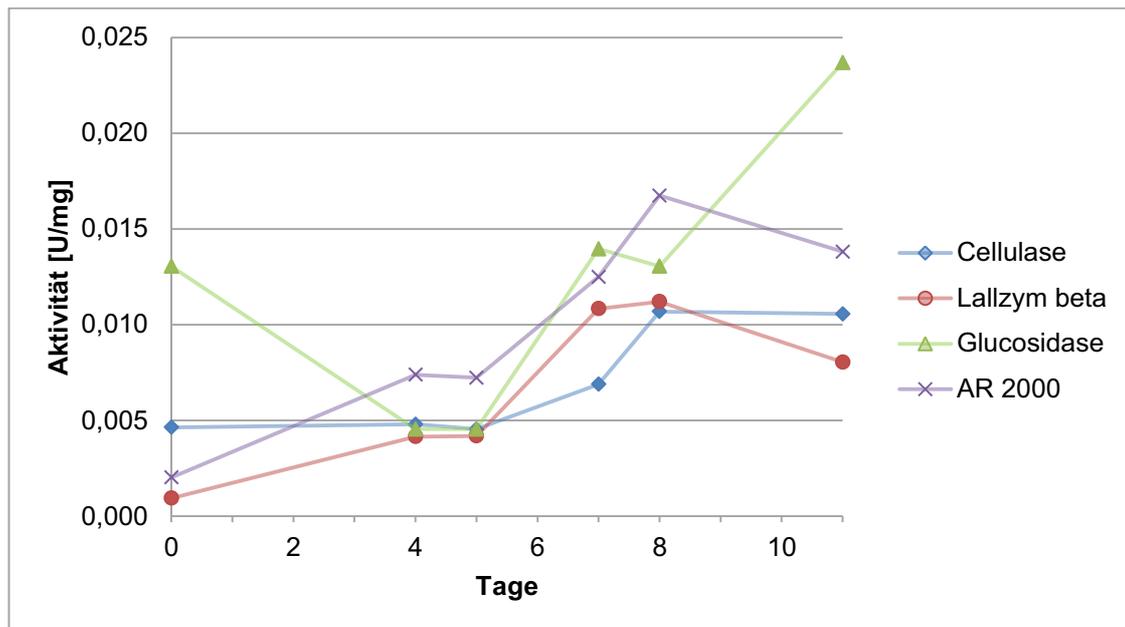


Abb. 31 Enzym-Aktivität über den Gärverlauf (ungezügelt)

Bei der ungezügelten Gärung – Temperaturen liegen in einem Bereich von 20 bis 25 °C – zeigen die Enzympräparate einen anderen Aktivitätsverlauf (Tab. 52, S. 87 und Abb. 31). Man kann den Trend erkennen, dass mit zunehmender Dauer der Gärung die Aktivitäten leicht steigen. Wie schon bei der gezügelten Gärung, sind die Mandel- β -Glucosidase-Werte zu vernachlässigen, da die Extinktionswerte zu gering sind, um Aussagen treffen zu können. Das Enzympräparat AR 2000 zeigt auch hier die höchsten Aktivitätswerte pro mg. Interessant ist, dass das Präparat Cellulase einen ähnlichen Aktivitätsverlauf wie Lallzym β aufweist, obwohl es sich bei der Cellulase um kein önologisches Enzympräparat handelt. Die erhaltenen Parameter der beiden Gäransätze (vgl. Abschnitt 4.2.3) spiegeln typische pH-Werte, Ethanol-Gehalte, Fructose- und Glucose-Gehalte von Weinen wieder. Auch hier bestätigt sich die Vermutung, dass Temperatur und Glucose den größten Einfluss auf die Aktivität der Enzympräparate besitzen. Bei der gezügelten Gärung mit einer Temperatur von etwa 16 °C ist bei keinem Enzympräparat eine bzw. kaum eine Aktivität festzustellen. Bei der ungezügelten Gärung steigt mit zunehmender Dauer der Gärung – also sinkendem Glucose-Gehalt – die Aktivität der Enzympräparate an.

5.2.3 Aktivitätsverlauf über Weinbehandlung

Auch hier lagen die Extinktionswerte des Enzympräparats β -Glucosidase aus Mandeln wieder außerhalb des Messbereichs, was den stark schwankenden Verlauf erklärt (vgl. Abb. 32) und es ist von einer Aktivität nahe 0 auszugehen.

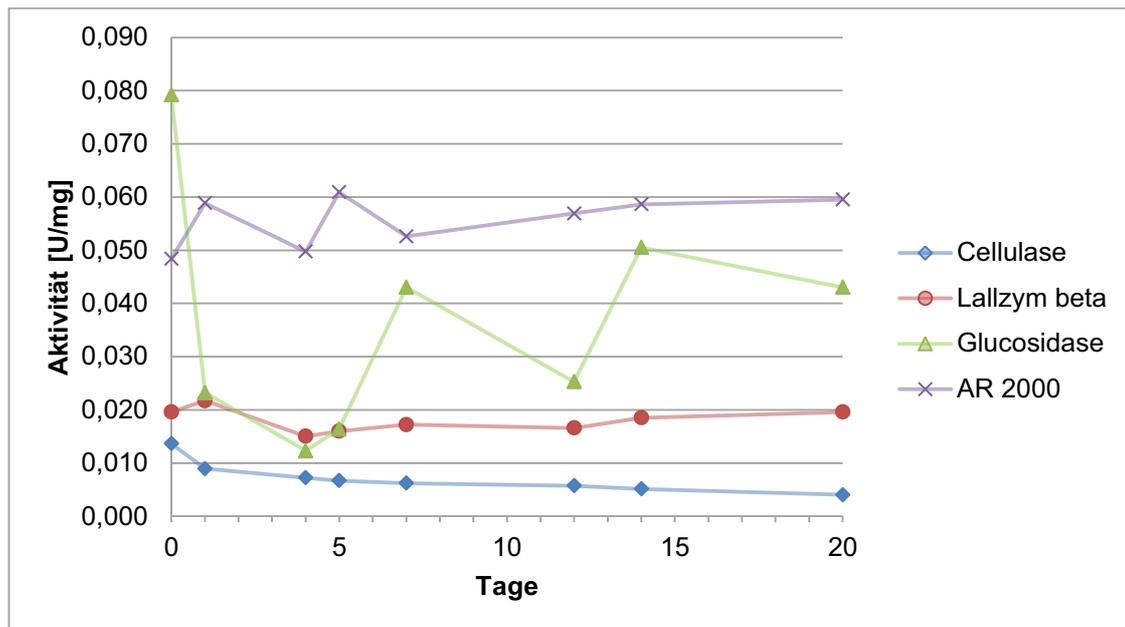


Abb. 32 β -Glucosidase-Aktivität über die Weinbehandlung [U/mg]

Alle anderen Enzympräparate zeigen über die Enzymbehandlung des Weines einen relativ konstanten und gleichbleibenden Aktivitätsverlauf bei 25 °C (Tab. 54, S. 87). Der Mittelwert von AR 2000 liegt bei 0,056 U/mg und deckt sich damit mit dem Aktivitätswert im Modellwein trocken bei 25 °C (Tab. 33, S. 77). Lallzym β weist einen Aktivitäts-Mittelwert von 0,018 U/mg im Vergleich zu 0,028 U/mg im Modellwein trocken bei 25 °C. Ähnlich sieht es bei der Cellulase aus, 0,07 U/mg im Vergleich zu 0,015. Auch hier zeigt sich das Präparat AR 2000 wieder als gut für den Einsatz im Wein geeignet.

5.3 Aromabestimmung mittels GC

Als ergänzende Untersuchung wurden die Aromaprofile mit und ohne Enzymzusatz im Wein ermittelt. Bei der Auswertung der Aromaprofile wurden die Peakflächen der gefundenen Substanzen im Verhältnis zur Peakfläche des internen Standards 1,4-Dibrombenzol gesetzt (Response Ratio). Die erhaltenen Ergebnisse sind als Screening zu betrachten. Abb. 33, Abb. 34 und Abb. 35 zeigen das typische Bild für die erhaltene GC-Trennung.

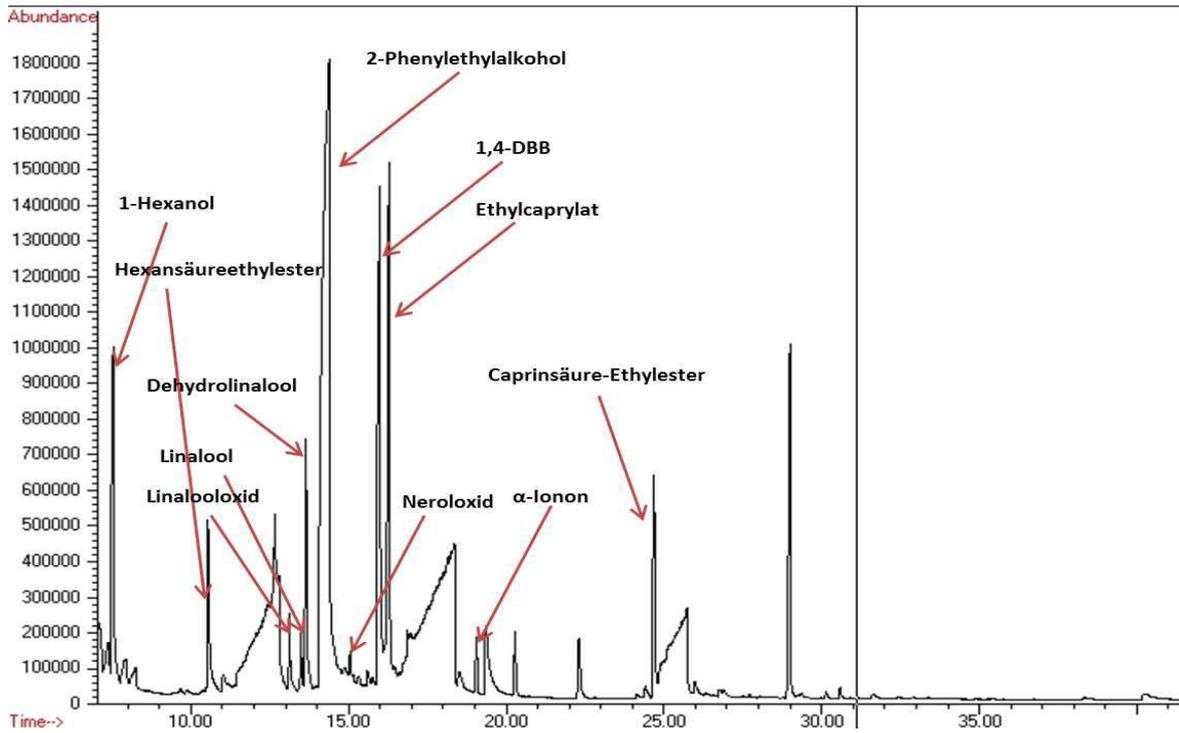


Abb. 33 Chromatogramm Aromaprofil Gäransatz (gezügelt) mit AR 2000 (nach Methode 0)

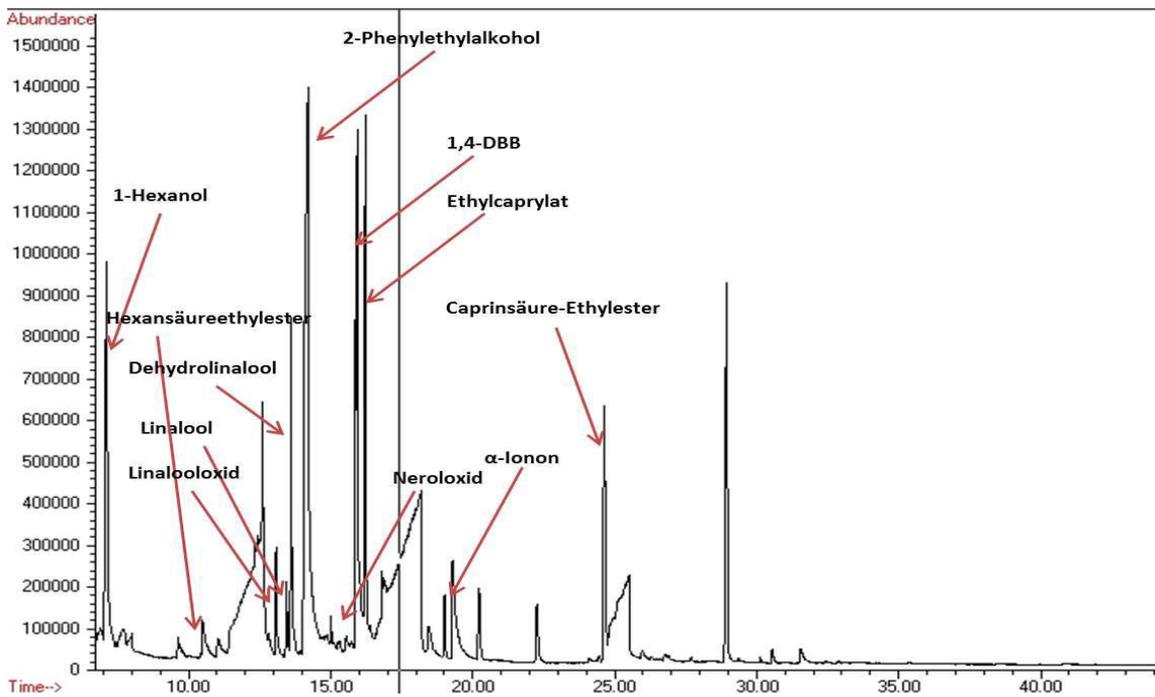


Abb. 34 Chromatogramm Aromaprofil Gäransatz (ungezügelt) mit AR 2000 (nach Methode 0)

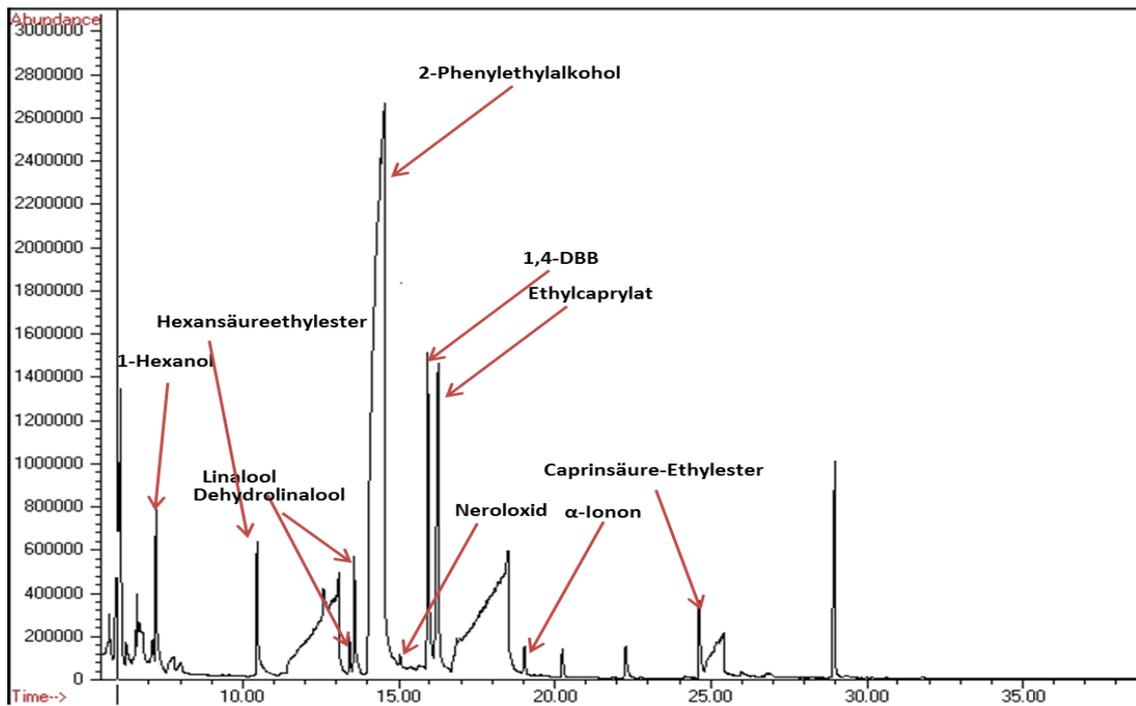


Abb. 35 Chromatogramm Aromaprofil Wein mit AR 2000 (nach Methode 0)

Bei der gezügelten Gärung zeigt der Gäransatz (s. Anhang A.4.1), der mit AR 2000 versetzt wurde, die höchsten Gehalte an Linalooloxid, Dehydrolinalool, Neroloxid, α -Ionon und 4-Ethylguajacol. Lallzym β zeigt den höchsten Gehalt an Linalool und die β -Glucosidase bei α -Ionon, wie Abb. 36 verdeutlicht.

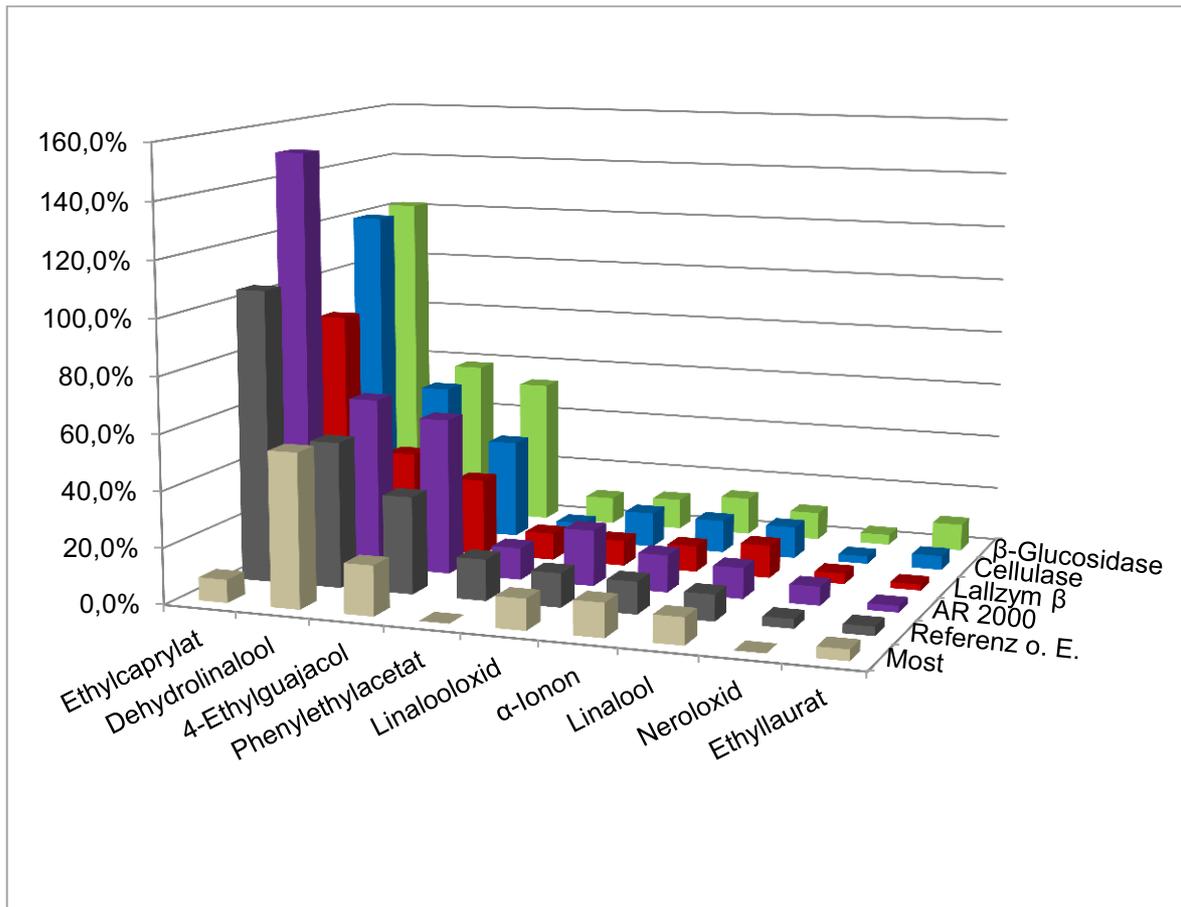


Abb. 36 Aromaprofil nach gezügelter Gärung (4.1.3.3) nach Methode 4.1.3.7

Signifikante Unterschiede des Monoterpens Linalool im Vergleich zum Most und dem Referenz-Gäransatz zeigt aufgrund der doch teilweise recht hohen Abweichung vom Mittelwert (vgl. Anhang A.4.1) keiner der mit Enzym behandelten Gäransätze. Z. B. weist Linalool bei dem Gäransatz mit AR 2000 eine sehr starke Abweichung von ca. 35 % vom Mittelwert auf (vgl. Anhang A.4.1.5).

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei dem ungezügelter Gäransatz (vgl. Abb. 37).

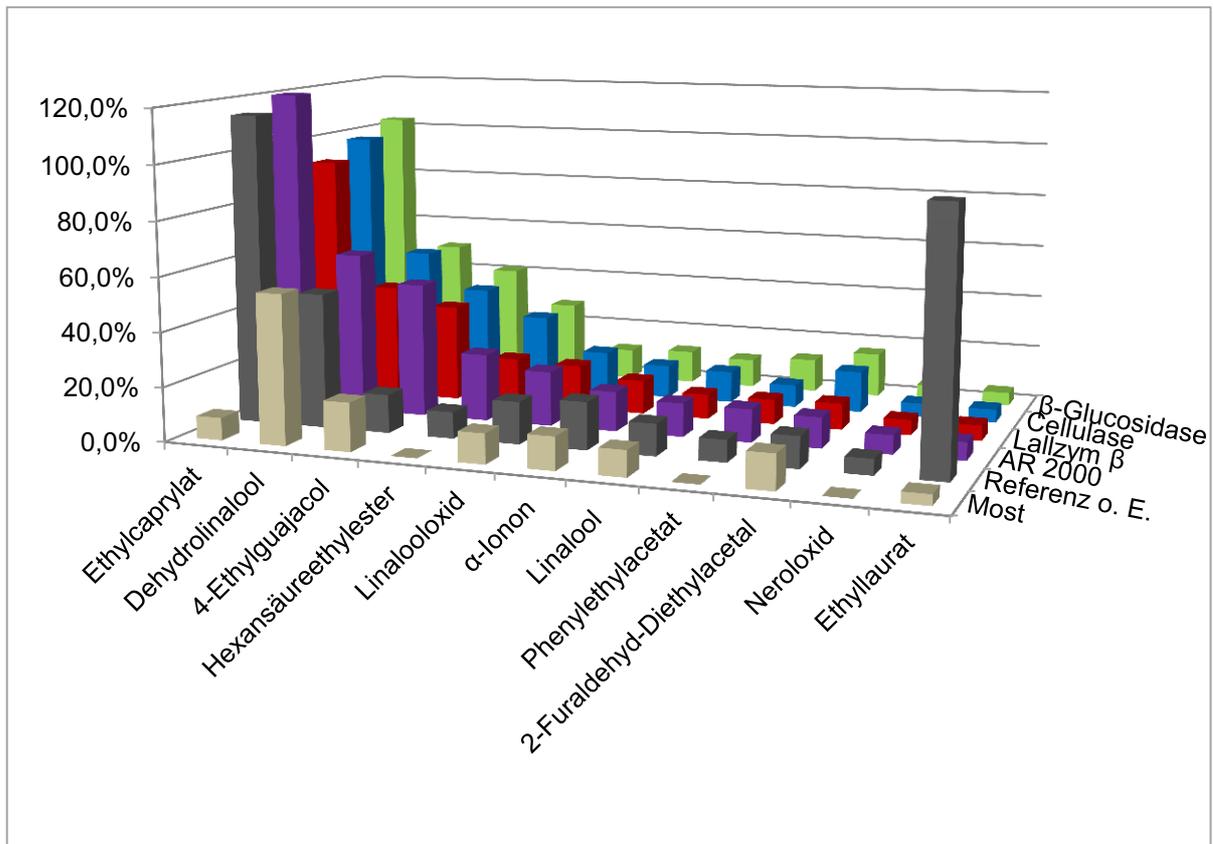


Abb. 37 Aromaprofil nach ungezügelter Gärung (4.1.3.3) nach Methode 4.1.3.7

Auch hier weist AR 2000 wieder für einige Komponenten, wie Linalool, Neroloxid, 4-Ethylguajacol, Linalooloxid, die höchsten Werte auf. Allerdings, betrachtet man die Werte des Linalools in Bezug auf den internen Standard genauer, liegen diese in einem Bereich von 9,2 % bis 12,4 % und der Referenz-Gäransatz ohne Enzymbehandlung liegt dabei mit 11,7 % im oberen Bereich (s. Anhang A.2). Aufgrund einer großen prozentualen Schwankung in Bezug auf den Mittelwert der jeweiligen Doppelbestimmung in einem Bereich von 6 bis 15 % können auch hier ebenfalls keine konkreten Aussagen getroffen werden.

Abb. 38 zeigt das Aromaprofil der Weine mit und ohne Enzymzusatz.

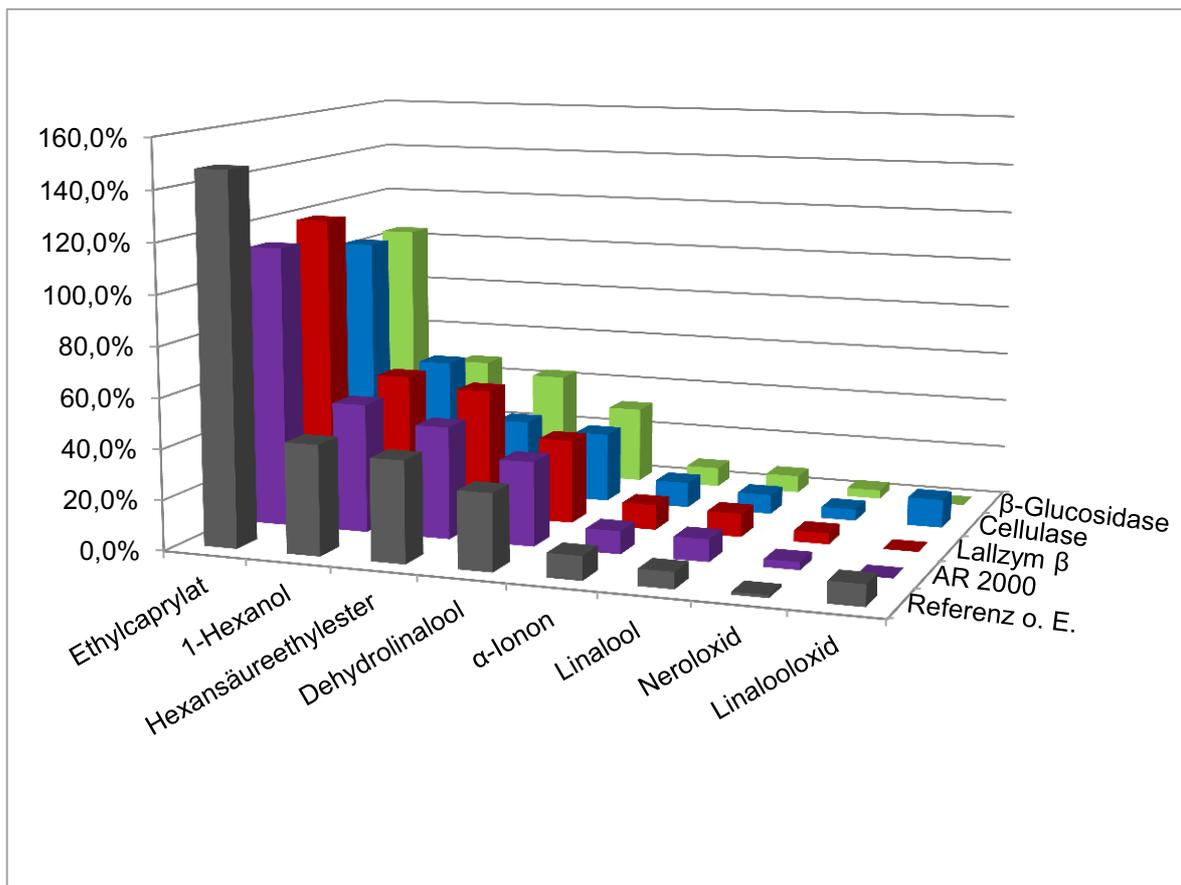


Abb. 38 Aromaprofil Wein nach Enzym-Einsatz (4.1.3.5) nach Methode 4.1.3.7

Zum Aromaprofil der Weine mit Enzymbehandlung können ähnlich wenig konkrete Aussagen getroffen werden, da auch hier die prozentuale Abweichung vom Mittelwert von Linalool bis zu 15 % beträgt (s. Anhang A.3). Allerdings fällt auf, dass der Gehalt an Linalool mit 6,6 % in der Referenz-Wein-Probe ohne Enzymzusatz geringer ausfällt, als bei den Gäransätzen mit Enzymen und im verwendeten Most. Außerdem ist bei allen enzymbehandelten Weinen zu erkennen, dass die Werte von Linalool höher ausfallen im Vergleich zur Referenz-Wein-Probe ohne Enzym.

Die höchsten Werte zeigen eine Behandlung mit Lallzym β (9,4 %) und AR 2000 (8,9 %). Die Veränderungen durch eine Behandlung mit dem Präparat Cellulase respektive β-Glucosidase sind erkennbar geringer.

Insgesamt, wenn man die Daten der Bestimmung des Aromaprofils betrachtet, im speziellen Linalool, kann man festhalten, dass ein Trend zu erkennen ist: Linalool ist i. d. R. bei einer Behandlung mit einem Enzympräparat in größeren Anteilen vertreten, wobei die zwei önologischen Enzympräparate (Lallzym β und AR 2000) dabei die höchsten Anteile zeigen. Allerdings kann man anhand dieser Ergebnisse

nicht abschätzen, ob ein Einsatz der Präparate während oder nach der Gärung Vor- bzw. Nachteile besitzt. Wenn man allerdings den Trend betrachtet sind bei einem Enzymzusatz vor der eigentlichen Gärung anschließend kaum bis gar keine Veränderungen im Aromaprofil festzustellen. Werden die Enzyme nach der Gärung dem fertigen Wein zugesetzt ist ein Trend zu höheren Terpenegehalten zu erkennen. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Aktivitätsbestimmung (vgl. 5.1.9) Anhand der Daten muss man allerdings kritisch festhalten, dass zum einen die SDE als Extraktion und Destillations-Methode bezüglich der Reproduzierbarkeit ihrer Probleme mit sich bringen kann (vgl. 3.4.3.1, S. 50). Das kann zum einen damit zusammenhängen, dass die Aromen-Aufarbeitung mittels SDE zahlreiche Fehlerquellen bietet, zum einen führt die lange Kochzeit der Weinprobe sehr wahrscheinlich zur Veränderung des Aromaprofils, z. B. werden Acetale, wie Linalylacetat, durch die Aufarbeitung teilweise zerstört und Linalool und α -Terpineol treten als typische Fragmente auf [Noack (2006)]. Dazu kommt, dass bei der Einengungen des Aromaextrakts von ca. 50 ml auf 1,0 ml die Gefahr groß ist, dass durch das Abrotieren selbst ohne Vakuum bereits einiges an Aroma verloren geht, zu stark eingeengt wird und dadurch Aroma verloren geht bzw. das Aroma-Profil sich verändert. Bei der SDE ist ein Übergang von Ethanol in den Extrakt meist nicht zu verhindern, was beim Abdestillieren des Lösungsmittels Probleme bereitet, da der Ethanol einen höheren Dampfdruck besitzt als Pentan bzw. Diethylether und dadurch mehr Zeit und eine höhere Temperatur bei der Einengung nötig sind.

Auf diese Problematik könnten die teilweise hohen Schwankung des Mittelwertes (s. Anhang A.4) hinweisen. Die Reproduzierbarkeit mit dieser Methode ist nur in Grenzen gegeben, so dass sind die Ergebnisse auch nicht wirklich aussagekräftig sind. Daneben scheinen die Ergebnisse zu zeigen, dass die vorhandene Methode um glykosidisch freigesetzte Aroma-Komponenten (Linalool etc.) zu bestimmen eher ungeeignet ist, da lediglich Linalool und Neroloxid nur bedingt als wichtige Vertreter der Monoterpene detektiert werden konnten. Mit der vorhanden GC-Anlage bzw. der eingesetzten Säule, sind diese Komponenten schwer zu detektieren.

Neben der Probenaufbereitung bietet die GC ebenfalls weitere mögliche Fehlerquellen. So wird deutlich, dass die verwendete Säule speziell für polare Komponenten, wie Capron-, Capryl- und Caprinsäure ungeeignet ist, was an den

starken Wechselwirkungen dieser Verbindungen zur stationären Phase der verwendeten DB5 (sichtbar in den breiten Peaks, vgl. Abb. 35 und Abb. 39) liegt.

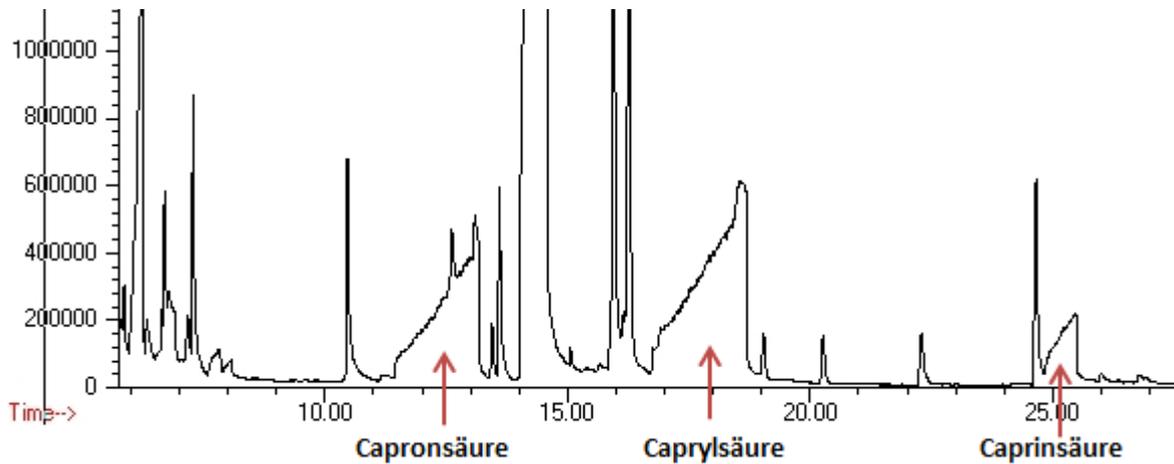


Abb. 39 Ausschnitt Chromatogramm Abb. 35

Für eine effektive Bestimmung der Terpene im Wein sollte die Methode dahingehend so modifiziert werden, dass eventuell die vorhandene Säule getauscht wird. Wie in 3.4.5 beschrieben, sollte eine DB-WAX-Säule eingesetzt werden, da diese in der Literatur als bewährte Säule für die Bestimmung von Terpenen in Wein eingesetzt wird. Außerdem sollte zur Quantifizierung wichtiger Monoterpene eine quantitative Methode im Speziellen für Linalool, Geraniol, Nerol, α -Terpineol und Citronelool erstellt werden.

6 Zusammenfassung

Zunächst wurde im Rahmen der Arbeit eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt, mit der bestätigt werden konnte, dass der Einsatz von Enzympräparaten zur Aromaverbesserung von Wein sinnvoll ist. Durch β -Glucosidasen kann der Gehalt an Terpenen signifikant gesteigert werden und das sortentypische Aroma verstärkt werden [Rapp (1992)]. Zur Aktivitätsbestimmung der eingesetzten Enzyme hat sich die Verwendung von *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (pNPG) als Substrat als effiziente und geeignete Methode herausgestellt. Eingesetzt wurden folgende Enzympräparate: zwei önologische Präparate Lallzym β (pektolytische Hauptaktivität mit β -Glucosidase-, Arabinosidase- und Rhamnosidase-Nebenaktivität) und AR 2000 (pektolytische Hauptaktivität mit β -Glucosidase-Nebenaktivität), sowie eine Cellulase (Säure-Cellulase mit Xylanase, Pectinase, Mannanase, Xyloglucanase, Laminarase, β -Glucosidase, β -Xylosidase, α -L-Arabinofuranosidase, Amylase und Protease Aktivität) und eine β -Glucosidase aus Mandeln.

Des Weiteren ergab sich, dass die Herkunft der β -Glucosidase von entscheidender Bedeutung für die Aktivität unter Weinbedingungen ist [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. Die Ergebnisse zeigen, dass die getesteten önologischen Enzympräparate Lallzym β und AR 2000 auch bei niedrigen pH-Wert noch akzeptable Aktivitäten besitzen. Beide Präparate werden aus dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* gewonnen. Die Cellulase hingegen wird aus *Trichoderma longibrachiatum* gewonnen und zeigt unter Weinbedingungen niedrigere Aktivitätswerte im Vergleich zu den Handelspräparaten Lallzym β und AR 2000. Bei der β -Glucosidase aus Mandeln ist unter diesen Bedingungen keine nennenswerte Aktivität mehr festzustellen. Daher eignen sich für einen Einsatz im Wein am besten die zwei Präparate AR 2000 und Lallzym β . Die ausgewählte Cellulase erwies sich als nur bedingt anwendbar und β -Glucosidase aus Mandeln sogar als ungeeignet.

Interessant bei der Charakterisierung war, dass AR 2000, Lallzym β und Cellulase durch steigende Ethanol-Gehalte an Aktivität gewinnen. Ähnlich verhält es sich bei steigenden Fructose-Gehalten bis zu 100 g/l. Glucose hingegen fungiert für alle Enzympräparate ein Inhibitor. Selbst eine geringe Konzentration von 5 g/l hemmt die Enzympräparate teilweise bis zu über 50 %.

Daneben wurden auch inhibierende Effekte durch die für Wein typischen sauren pH-Werte und die niedrigen Temperaturen bei der üblichen gezügelten Gärung festgestellt. Die Erkenntnisse stehen im Einklang mit Literaturdaten [*Caldini et al.* (1994); *Murray et al.* (2004); *Palmeri & Spagna* (2007)].

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sinnvoll ist das entsprechende Enzympräparat erst nach dem Gipfelpunkt zum Ende der Gärung zuzusetzen bzw. nicht gleich zu Beginn.

Die angewandte Methode zur Bestimmung des Aromaprofils mittels SDE und GC/MS erwies sich im speziellen für das Erfassen der prägenden Terpene Linalool, Nerol, Geraniol, α -Terpineol und Citronellol für eine effiziente Trennung unzureichend und sollte für weitere Untersuchungen entsprechend angepasst werden.

Um den Prozess der Freisetzung der glykosidisch gebundenen Aromen besser kontrollieren und überwachen zu können, ist außerdem in einem nächsten Schritt eine Entwicklung einer HPLC-Methode zur Bestimmung der im Most und Wein befindlichen Glykoside sinnvoll und soll in einem nächsten Schritt des Projektes MAGNENZ angewandt werden.

7 Summary

First, in the context of this work has been carried out an extensive literature review, confirmed that the use of enzyme preparations for flavor improvement of wine is useful. The content of terpenes increased significantly by use of β -glucosidases and enhances the varietal wine aroma [Rapp (1992)]. For determining the activity of the enzymes used, the use of *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) as substrate emerged as an efficient and appropriate method. The following enzyme preparations have been used: two oenological preparations Lallzym β (pectolytic main activity with β -glucosidase-side activity) and AR 2000 (pectolytic main activity with β -glucosidase-side activity), and a cellulase (acid-cellulase with xylanase, pectinase, mannanase, xyloglucanase, Laminarase, β -glucosidase, β -xylosidase, α -L-arabinofuranosidase, amylase and protease activity) and a β -glucosidase from almonds.

Furthermore, it was found that the origin of the β -glucosidase is essential for the activity under wine conditions [Ketudat Cairns & Esen (2010)]. The results demonstrated that the tested oenological enzyme preparations, Lallzym β and AR 2000, showed even at low pH acceptable activities. Both products are obtained from the fungus *Aspergillus niger*. In contrast, the cellulase obtained from *Trichoderma longibrachiatum* shows under wine conditions lower activity values compared to the commercial preparations Lallzym β and AR 2000. β -glucosidase from almonds shows under these conditions no longer significant activity.

Therefore most suitable for the use in wine are the two preparations AR 2000 and Lallzym β . The selected cellulase was found to be only of limited applicability and the β -glucosidase from almonds even as inappropriate.

Of interest in this characterization was that AR 2000, cellulase and Lallzym β to gain activity by increasing ethanol levels, similarly with increasing fructose concentrations up to 100 g/l. Glucose, however, is an inhibitor for all enzyme preparations. Even a small concentration of 5 g/l inhibits the enzyme preparations partially over 50%. In addition, inhibitory effects were also detected by the typical wine acidic pH values and the low temperatures in the usual restrained fermentation. The findings are confirmed by literature [Caldini *et al.* (1994); Murray *et al.* (2004); Palmeri & Spagna (2007)].

The results indicate that it is useful to add the enzyme preparations after the peak at the end of fermentation.

8 Literaturverzeichnis

- ADAMS, R. Phillip (1995). *Identification of essential oil components by gas chromatography and mass spectroscopy*. Carole Stream: Allured Publ. Corp.
- ALONSO, E., ESTRELLA, M. & REVILLA, E. (1986). HPLC separation of flavonol glycosides in wines. *Chromatographia*, **22** (7), S. 268–270.
- ARTHUR, C. L. & PAWLISZYN, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*. *Anal. Chem*, **62** (19), S. 2145–2148.
- ARYAN, A. P., WILSON, B., STRAUSS, C. R. & WILLIAMS, P. J. (1987). The Properties of Glycosidases of *Vitis vinifera* and a Comparison of Their β -Glucosidase Activity with that of Exogenous Enzymes. An Assessment of Possible Applications in Enology. *American Journal of Enology and Viticulture*, **38** (3), S. 182–188.
- BARBAGALLO, R. N., PALMERI, R., FABIANO, S., RAPISARDA, P. & SPAGNA, G. (2007). Characteristic of β -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, **41**, S. 570–575.
- BARBAGALLO, R. N., SPAGNA, G., ABBATE, C., AZZARO, G. & PALMERI, R. (2002). Inexpensive isolation of β -d-glucopyranosidase from α -l-arabinofuranosidase, α -l-rhamnopyranosidase, and o-acetylcysteine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **101**, S. 1–13.
- BARBAGALLO, R. N., SPAGNA, G., PALMERI, R., RESTUCCIA, C. & GIUDICI, P. (2004). Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, S. 58–66.
- BAYONOVE, C. L., GÜNATA, Z. Y., SAPIS, J. C., BAUMES, R. L., DUGELAY, I. & GRASSIN, C. (1992). Augmentation des arômes dans le vin et utilisation d'enzymes. *Rev. Oenol.*, **65**, S. 15–18.

- BEGUIN, P. (1990). Molecular Biology of Cellulose Degradation. Annual Review of Microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, **44** (1), S. 219–248.
- BELITZ, H.-D., GROSCH, W. & SCHIEBERLE, P. (2001). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Mit über 900 Formeln und 620 Tabellen.* 5. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer.
- BELITZ, H.-D., GROSCH, W. & SCHIEBERLE, P. (2008). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie.* 6. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer.
- BERGER, R. (2007). *Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability.* Berlin: Springer.
- BERGMEYER, U. H., BERNT, E., SCHMIDT, F. H. & STORK, H. (1974)*In:* BERGMEYER, U. H., Hrsg. *Methoden der enzymatischen Analyse.* Weinheim: Chemie, S. 1241–1246.
- BERGNER, K.-G. (1993). *Weinkompandium. Für Apotheker, Ärzte und Naturwissenschaftler.* Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- BERNT, E. & BERGMEYER, U. H. , S. 1349–1352.
- BEUTLER, H. O. (1984a)*In:* BERGMEYER, U. H., Hrsg. *Methods of enzymatic analysis.* Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel: Verlag Chemie, S. 598–606.
- BEUTLER, H. O. (1984b)*In:* BERGMEYER, U. H., Hrsg. *Methods of enzymatic analysis.* Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel: Verlag Chemie, S. 321–327.
- BEUTLER, H. O. & MICHAL, G. (1977). Neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Äthanol in Lebensmitteln. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **284** (2), S. 113–117.
- BHAT, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, **18** (5), S. 355–383.

- BHATIA, Y., MISHRA, S. & BISARIA, V. S. (2002). Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. *Critical Reviews in Biotechnology*, **22** (4), S. 375–407.
- BISARIA, V. S., MISHRA, S. & EVELEIGH, D. E. (1989). Regulatory Aspects of Cellulase Biosynthesis and Secretion. *Critical Reviews in Biotechnology*. *Critical Reviews in Biotechnology*, **9** (2), S. 61–103.
- BLOEM, A., BERTRAND, A., LONVAUD-FUNEL, A. & REVEL, G. de (2007). Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, **44** (1), S. 62–67.
- BLONDIN, B., RATOMAHENINA, R., ARNAUD, A. & GALZY, P. (1983). Purification and properties of the β -glucosidase of a yeast capable of fermenting cellobiose to ethanol: *Dekkera intermedia* van der Walt. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **17**, S. 1–6.
- BODTLÄNDER, C. (2012). *Entwicklung einer GC/MS- Bestimmungsmethode für Weinaromakomponenten* [Bachelor-Abschlussarbeit].
- BONINO, M., SCHELLINO, R., RIZZI, C., AIGOTTI, R., DELFINI, C. & BAIOCCHI, C. (2003). Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS–SPME analysis coupled with GC–ITMS. *Food Chemistry*, **80**, S. 125–133.
- BRUNNER, F., WIRTZ, W., ROSE, J. K. C., DARVILL, A. G., GOVERS, F., SCHEEL, D. & NÜRNBERGER, T. (2002). A β -glucosidase/xylosidase from the phytopathogenic oomycete, *Phytophthora infestans*. *Phytochemistry*, **59** (7), S. 689–696.
- BUNGERT, M., JAHNS, T. & BECKER, H. (2001). 2-Methoxy-3-(1'-methylpropyl)pyrazine, pea odour, from the marine bacterium *Halomonas venusta*. *Flavour and Fragrance Journal*, **16** (5), S. 329–333.
- CALDINI, C., BONOMI, F., PIFFERI, P. G., LANZARINI, G. & GALANTE, Y. M. (1994). Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. *Enzyme and Microbial Technology*, **16** (4), S. 286–291.

- CAMPBELL, N. A. & REECE, J. B. (2006). *Biologie*. 6., aktualisierte Aufl., [Nachdr.] [2. dt. Ausg. der amerikan.]. München: Pearson Studium. (biologie).
- CANTAREL, B. L., COUTINHO, P. M., RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD, V. & HENRISSAT, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, **37** (suppl 1), S. D233.
- CANUTI, V., CONVERSANO, M., CALZI, M. Li, HEYMANN, H., MATTHEWS, M. A. & EBELER, S. E. (2009). Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for profiling free volatile compounds in Cabernet Sauvignon grapes and wines. *Journal of Chromatography A*, **1216** (15), S. 3012–3022.
- CAPALDO, A., WALKER, M. E., FORD, C. M. & JIRANEK, V. (2011). β -Glucoside metabolism in *Oenococcus oeni*: Cloning and characterization of the phospho- β -glucosidase CelD. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **69**, S. 27–34.
- CHARENTREAU, A. (2001). Simultaneous distillation–extraction: from birth to maturity—review. *Flavour and Fragrance Journal*, **16** (2), S. 136–148.
- CHANG, M.-Y. & JUANG, R.-S. (2007). Use of chitosan–clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase. *Biochemical Engineering Journal*, **35**, S. 93–98.
- CHEYNIER, V., OWE, C. & RIGAUD, J. (1988). Oxidation of Grape Juice Phenolic Compounds in Model Solutions. *Journal of Food Science*, **53** (6), S. 1729–1732.
- CHI, Y.-I., MARTINEZ-CRUZ, L. A., JANCARIK, J., SWANSON, R. V., ROBERTSON, D. E. & KIM, S.-H. (1999). Crystal structure of the β -glycosidase from the hyperthermophile *Thermosphaera aggregans*: insights into its activity and thermostability. *FEBS Letters*, **445** (2–3), S. 375–383.
- CHUANKHAYAN, P., HUA, Y., SVASTI, J., SAKDARAT, S., SULLIVAN, P. A. & KETUDAT CAIRNS, J. R. (2005). Purification of an isoflavonoid 7-O- β -apiosyl-glucoside β -glycosidase and its substrates from *Dalbergia nigrescens* Kurz. *Phytochemistry*, **66** (16), S. 1880–1889.

- CICEK, M., BLANCHARD, D., BEVAN, D. R. & ESEN, A. (2000). The Aglycone Specificity-determining Sites Are Different in 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA)-glucosidase (Maize β -Glucosidase) and Dhurrinase (Sorghum β -Glucosidase). *Journal of Biological Chemistry*, **275** (26), S. 20002–20011.
- CLARKE, R. J. & BAKKER, J. (2004). *Wine flavour chemistry*. Oxford, UK ;, Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd.
- CORDONNIER, R. E., GÜNATA, Z. Y., BAUMES, R. L. & BAYONOVE, C. L. (1989). Recherche d'un matériel enzymatique adapté a l'hydrolyse des précurseurs d'arôme de nature glycosidique du raisin. *Conn. Vigne Vin*, **23**, S. 7–23.
- CZJZEK, M., CICEK, M., ZAMBONI, V., BEVAN, D. R., HENRISSAT, B. & ESEN, A. (2000). The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97** (25), S. 13555–13560.
- D'INCECCO, N., BARTOWSKY, E., KASSARA, S., LANTE, A., SPETTOLI, P. & HENSCHKE, P. (2004). Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiology*, **21** (3), S. 257–265.
- DALE, M. P., KOPFLER, W. P., CHAIT, I. & BYERS, L. D. (1986). beta.-Glucosidase: substrate, solvent, and viscosity variation as probes of the rate-limiting steps. *Biochemistry*. *Biochemistry*, **25** (9), S. 2522–2529.
- DE LA CALLE GARCÍA, D., REICHENBÄCHER, M., DANZER, K., HURLBECK, C., BARTZSCH, C. & FELLER, K.-H. (1998a). Analysis of Wine Bouquet Components Using Headspace Solid-Phase Microextraction-Capillary Gas Chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*, **21** (7), S. 373–377.
- DE LA CALLE GARCÍA, D., REICHENBÄCHER, M., DANZER, K., HURLBECK, C., BARTZSCH, C. & FELLER, K.-H. (1998b). Use of solid-phase

- microextraction-capillary-gas chromatography (SPME-CGC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **360**, S. 784–787.
- DHARMAWARDHANA, D. P., ELLIS, B. E. & CARLSON, J. E. (1995). A [beta]-Glucosidase from Lodgepole Pine Xylem Specific for the Lignin Precursor Coniferin. *Plant Physiology*, **107** (2), S. 331–339.
- DIPL. ING. THONHAUSER GMBH . LALLZYM β . ENZYM ZUR FREISETZUNG VON GEBUNDENEN AROMEN. [WWW]
<http://www.thonhauser.net/pix/Weintechnologie/Oenologie/Lallzyme/Lallzyme%20Beta.pdf>. (20. März 2012).
- DOPICO, B., NICOLÁS, G. & LABRADOR, E. (1989). Partial purification of cell wall β -galactosidases from *Cicer arietinum* epicotyls. Relationship with cell wall autolytic processes. *Physiologia Plantarum*, **75** (4), S. 458-464.
- DSM FOOD . AR 2000. The enzyme to improve wine quality and enhance aroma. [WWW] http://www.dsm.com/en_US/downloads/oenology/AR_2000.pdf. (28. März 2012).
- DUGELAY, L., GÜNATA, Z. Y., SAPIS, J. C., BAUMES, R. L. & BAYONOVE, C. L. (1992). ÉTUDE DE L'ORIGINE DU CITRONELLOL DANS LES VINS. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **26**, S. 177–184.
- EBELER, S. E. (2001). ANALYTICAL CHEMISTRY: UNLOCKING THE SECRETS OF WINE FLAVOR. Food Reviews International. *Food Reviews International*, **17** (1), S. 45–64.
- ESCUDERO, A., GOGORZA, B., MELÚS, M. A., ORTÍN, N., CACHO, J. & FERREIRA, V. (2004). Characterization of the Aroma of a Wine from Maccabeo. Key Role Played by Compounds with Low Odor Activity Values. Journal of Agricultural and Food Chemistry. *J. Agric. Food Chem*, **52** (11), S. 3516–3524.
- FA. LALLEMAND . Lallzym Beta. [WWW]
http://www.lallemmandwine.com/catalog/img/catalog/description_activity_image_1210752366_lallzyme%20Beta%20eng.pdf. (20. März 2012).

- FA. SIGMA ALDRICH . *Produktkatalog. b-Glucosidase*. [WWW]
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/49290?lang=de®ion=DE>
(29. März 2012).
- FA. SIGMA ALDRICH . *Produktkatalog. Cellulase*. [WWW]
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9748?lang=de®ion=DE>
(2. April 2012).
- FA. SIGMA ALDRICH . *Produktkatalog. 4-Nitrophenyl β -D-glucoopyranoside*.
[WWW]
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n7006?lang=de®ion=DE>
(28. März 2012).
- FAN, W., XU, Y. & YU, A. (2006). Influence of Oak Chips Geographical Origin, Toast Level, Dosage and Aging Time on Volatile Compounds of Apple Cider. *Journal of the Institute of Brewing*, **112**, S. 255–263.
- FIA, G., GIOVANI, G. & ROSI, I. (2005). Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *Journal of Applied Microbiology*, **99**, S. 509–517.
- FISCHER, E. (1898). Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **26**, S. 60–87.
- FISCHER, U. (1995). *Mass balance of aroma compounds during the dealcoholization of wine. Correlation of chemical and sensory data*. [S.l: s.n.,].
- FRANK, H. K. (1990). *Lexikon Lebensmittel-Mikrobiologie*. Hamburg: Behr's.
- GALLIFUOCO, A., ALFANI, F., CANTARELLA, M., SPAGNA, G. & PIFFERI, P. G. (1999). Immobilized β -glucosidase for the winemaking industry: study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors. *Process Biochemistry*, **35**, S. 179–185.
- GALLIFUOCO, A., D'ERCOLE, L., ALFANI, F., CANTARELLA, M., SPAGNA, G. & PIFFERI, P. G. (1998). On the use of chitosan-immobilized β -glucosidase in

- wine-making: kinetics and enzyme inhibition. *Process Biochemistry*, **33** (2), S. 163–168.
- GAUTAM, S. & SIMON, L. (2006). Partitioning of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature. *Biochemical Engineering Journal*, **30**, S. 104–108.
- GODEFROOT, M., SANDRA, P. & VERZELE, M. (1981). New method for quantitative essential oil analysis. *Journal of Chromatography A*, **203**, S. 325–335.
- GONZÁLEZ-POMBO, P., FARINA, L., CARRAU, F., BATISTA-VIERA, F. & BRENA, B. M. (2011). A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*, **46**, S. 385–389.
- GREENWALD, P., CLIFFORD, C. K. & MILNER, J. A. (2001). Diet and cancer prevention. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, **37** (8), S. 948–965.
- GROSSMANN, C., RAPP, A. & RIETH, W. (1987). Enzymatische Freisetzung gebundener Aromastoffe in Wein. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, **83**, S. 7–12.
- GUEGUEN, Y., CHEMARDIN, P., PIEN, S., ARNAUD, A. & GALZY, P. (1997). Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. *Journal of Biotechnology*, **55**, S. 151–156.
- GÜNATA, Z. Y. (1994). Etude de exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'arômes du raisin de nature glycosidique. *Rev. Oenol. Tech. Vitivinic. Oenol.*, **74**, S. 22–27.
- GÜNATA, Z. Y., BAYONOVE, C. L., BAUMES, R. L. & CORDONNIER, R. E. (1985b). THE AROMA OF GRAPES. I. EXTRACTION AND DETERMINATION OF FREE AND GLYCOSIDICALLY BOUND FRACTIONS OF SOME GRAPE AROMA COMPONENTS. *Journal of Chromatography A*, **331**, S. 83–90.

- GÜNATA, Z. Y., BAYONOVE, C. L., CORDONNIER, R. E., ARNAUD, A. & GALZY, P. (1990a). Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii* β -glucosidases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **50**, S. 499–506.
- GÜNATA, Z. Y., BAYONOVE, C. L., TAPIERO, C. & CORDONNIER, R. E. (1990b). Hydrolysis of Grape Monoterpenyl β -D-Glucosides by Various β -Glucosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**, S. 1232–1236.
- GÜNATA, Z. Y., BITTEUR, S., BRILLOUET, J.-M., BAYONOVE, C. L. & CORDONNIER, R. E. (1988). SEQUENTIAL ENZYMIC HYDROLYSIS OF POTENTIALLY AROMATIC GLYCOSIDES FROM GRAPE. *Carbohydrate Research*, **184**, S. 139–149.
- GÜNATA, Z. Y., BLONDEEL, C., VALLIER, M. J., LEPOUTRE, J. P., SAPIS, J. C. & WATANABE, N. (1998). An Endoglycosidase from Grape Berry Skin of Cv. M. Alexandria Hydrolyzing Potentially Aromatic Disaccharide Glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. J. Agric. Food Chem*, **46** (7), S. 2748–2753.
- GÜNATA, Z. Y., DUGELAY, I., SAPIS, J. C., BAUMES, R. L. & BAYONOVE, C. L. (1990c). Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **24**, S. 133–144.
- HARRIS, D. C. & WERNER, G. (2002). *Lehrbuch der quantitativen Analyse*. 1. Aufl. 1998, Nachdr. Berlin, Heidelberg: Springer.
- HENICK-KLING, T. (1993). Malolactic fermentation. *In: FLEET, G. H., Hrsg. Wine microbiology and biotechnology*. Chur, Philadelphia, Pa: Harwood Academic Publishers, S. 289–326.
- HENRISSAT, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, **280** (2), S. 309–316.
- HENRISSAT, B. & BAIROCH, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *The Biochemical journal*, **316** (2), S. 695–696.

- HENRISSAT, B. & DAVIES, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, **7** (5), S. 637–644.
- HENRISSAT, B., CALLEBAUT, I., FABREGA, S., LEHN, P., MORNON, J. P. & DAVIES, G. (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92** (15), S. 7090–7094.
- HERNÁNDEZ, L. F., ESPINOSA, J. C., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. & BRIONES, A. (2003). β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, **80** (2), S. 171–176.
- HOFER, M. (2009). *Apfelaroma – Analytik* [26. Fachbereichstag – Lebensmitteltechnologie und Verpackungstechnik]. Beuth Hochschule für Technik. [WWW] http://prof.beuth-hochschule.de/fileadmin/user/kabbert/pdf_s/Hofer_Apfelaroma-Analytik.pdf. (16. Mai 2012).
- HRMOVA, M., VARGHESE, J. N., GORI, R. de, SMITH, B. J., DRIGUEZ, H. & FINCHER, G. B. (2001). Catalytic Mechanisms and Reaction Intermediates along the Hydrolytic Pathway of a Plant β -D-glucan Glucohydrolase. *Structure*, **9** (11), S. 1005–1016.
- JENG, W.-Y., WANG, N.-C., LIN, M.-H., LIN, C.-T., LIAW, Y.-C., CHANG, W.-J., LIU, C.-I., LIANG, P.-H. & WANG, A. H.-J (2011). Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology*, **173** (1), S. 46–56.
- JENKINS, J., LO LEGGIO, L., HARRIS, G. & PICKERSGILL, R. (1995). β -Glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold β/α architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. *FEBS Letters*, **362** (3), S. 281–285.

- KANG, W., XU, Y. & QIN, L. Wang Y. (2010). Effects of Different β -D-Glycosidases on Bound Aroma Compounds in Muscat Grape Determined by HS-SPME and GC-MS. *Journal of the Institute of Brewing*, **116** (1), S. 70–77.
- KETUDAT CAIRNS, J. R. & ESEN, A. (2010). β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67** (20), S. 3389–3405.
- KOMES, D., ULRICH, D., KOVACEVIC GNIC, K. & LOVRIK, T. (2007). Study of phenolic and volatile composition of white wine during fermentation and a short time of storage. *Vitis*, **46** (29), S. 77–84.
- KRÄMER, J. (2007). *Lebensmittel-Mikrobiologie. 49 Tabellen*. 5. Aufl. Stuttgart: Ulmer.
- KUBICEK, C. P. & HARMAN, G. E. (1998). *Trichoderma And Gliocladium. Volume 2: Enzymes, Biological*. London: CRC Press.
- KUBICEK, C. P., MESSNER, R., GRUBER, F., MACH, R. L. & KUBICEK-PRANZ, E. M. (1993). The Trichoderma cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, **15** (2), S. 90–99.
- KUNST, A., DRAEGER, B. & ZIEGENHORN, J. (1984) *In*: BERGMAYER, U. H., Hrsg. *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel: Verlag Chemie, S. 163–172.
- LECAS, M., GÜNATA, Z. Y., SAPIS, J. C. & BAYONOVE, C. L. (1991). Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape. *Phytochemistry*, **30** (2), S. 451–454.
- LEONHARDT, S. (2006). *Vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung kontaktallergener Duftstoffe in Kosmetika und Wasch- und Reinigungsmitteln* [wissenschaftliche Abschlussarbeit].
- LERMUSIEAU, G., LIEGEOIS, C. & COLLIN, S. (2001). Reducing power of various hop varieties. *Cerevisia*, **26** (1), S. 33–41.
- LIKENS, S. T. & NICKERSON, G. B. (1964). Determination of certain hop oil constituents in brewing products. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, S. 5–13.

- LINSKENS, H. F., JACKSON, J. F. & CONTE, L. S. (1988). *Wine analysis*. Berlin, New York: Springer.
- LÖFFLER, G., PETRIDES, P. E. & HEINRICH, P. C. (2007). *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- MAICAS, S. & MATEO, J. J. (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **67** (3), S. 322–335.
- MAICAS, S., GIL, J.-V., PARDO, I. & FERRER, S. (1999a). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International*, **32** (7), S. 491–496.
- MAICAS, S., GONZÁLEZ-CABO, P., FERRER, S. & PARDO, I. (1999b). Production of *Oenococcus oeni* biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition. *Biotechnology Letters*, **21**, S. 349–353.
- MANSFIELD, A. K., ZOECKLEIN, B. W. & WHITON, R. S. (2002). Quantification of Glycosidase Activity in Selected Strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, **53** (4), S. 303–307.
- MARANA, S. R. (2006). Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases. *IUBMB Life*, **58** (2), S. 63–73.
- MARTINO, A., PIFFERI, P. G. & SPAGNA, G. (1994). Production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* using carbon sources derived from agricultural wastes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **60** (3), S. 247-252.
- MATEO, J. J. & DI STEFANO, R. (1997). Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiology*, **14** (6), S. 583–591.
- MATEO, J. J. & JIMÉNEZ, M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A*, **881**, S. 557–567.
- MATISSEK, R., STEINER, G. & FISCHER, M. (2010). *Lebensmittelanalytik*. 4. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer.

- MCILVAINE, T. C. (1921). A BUFFER SOLUTION FOR COLORIMETRIC COMPARISON. *Journal of Biological Chemistry*, **49** (1), S. 183–186.
- MEINL, J., RÖHRIG, G., MEYERS, J. P., ADAM, L. & ENGEL, K.-H. (2009). Freisetzung von Aromastoffen in Obstmaischen. *Kleinbrennerei*, S. 12–14.
- MENDES FERREIRA, A., CLÍMACO, M. C. & MENDES FAIA, A. (2001). The role of non-Saccharomyces species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - a preliminary study. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, S. 67–71.
- MENG, X., MALIAKAL, P., LU, H., LEE, M.-J. & YANG, C. S. (2004). Urinary and Plasma Levels of Resveratrol and Quercetin in Humans, Mice, and Rats after Ingestion of Pure Compounds and Grape Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. J. Agric. Food Chem*, **52** (4), S. 935–942.
- MICHLMAYR, H., SCHÜMMANN, C., BARREIRA BRAZ DA SILVA, N., KULBE, K. & DEL HIERRO, A. (2010). Isolation and basic characterization of a β -glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture. *Journal of Applied Microbiology*, **108** (2), S. 550-559.
- MURRAY, P., ARO, N., COLLINS, C., GRASSICK, A., PENTTILÄ, M., SALOHEIMO, M. & TUOHY, M. (2004). Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Protein Expression and Purification*, **38**, S. 248–257.
- NAGANO, A. J., MATSUSHIMA, R. & HARA-NISHIMURA, I. (2005). Activation of an ER-body-localized β -Glucosidase via a Cytosolic Binding Partner in Damaged Tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **46** (7), S. 1140–1148.
- NAGEL, C. W., AMISTOSO, J. L. & BENDEL, R. B. (1982). The Effect of pH and Titratable Acidity on the Quality of Dry White Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **33** (2), S. 75–79.

- NELSON, N. (1944). A PHOTOMETRIC ADAPTATION OF THE SOMOGYI METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE. *Journal of Biological Chemistry*, **153** (2), S. 375–380.
- NICKERSON, G. B. & LIKENS, S. T. (1966). Gas Chromatography evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *Journal of Chromatography A*, **21** (0), S. 1–5.
- NISIUS, A. (1988). The stromacentre in *Avena* plastids: an aggregation of β -glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta*, **173** (4), S. 474–481.
- NOACK, I. (2006). *Duftstoffe in kosmetischen Mitteln als Precursor für Kontaktallergene* [wissenschaftliche Abschlussarbeit].
- OPASSIRI, R., POMTHONG, B., AKIYAMA, T., NAKPHAICHIT, M., ONKOKSOONG, T., KETUDAT CAIRNS, M. & KETUDAT CAIRNS, J. R. (2007). A stress-induced rice (*Oryza sativa* L.) beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain. *Biochemical Journal*, **408** (2), S. 241–249.
- PALMERI, R. & SPAGNA, G. (2007). β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, S. 382–389.
- PARK, J. Kweon, WANG, L.-X., PATEL, H. V. & ROSEMAN, S. (2002). Molecular Cloning and Characterization of a Unique β -Glucosidase from *Vibrio cholerae*. *Journal of Biological Chemistry*, **277** (33), S. 29555–29560.
- PARK, Y., SHAFFER, C. & BENNETT, G. (2009). Microbial formation of esters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85** (1), S. 13–25.
- PLATEN, H. (2008). *Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von 4-Nitrophenol*. Fachhochschule Gießen-Friedberg. [WWW] http://kmubserv.tg.fh-giessen.de/pm/platen/HP2110_UGChP_Th05_V01_Aufl_04.pdf. (15. März 2012).
- PROSEN, H., JANEŠ, L., STRLIČ, M., RUSJAN, D. & KOČAR, D. (2007). Analysis of free and bound aroma compounds in grape berries using

- headspace solid-phase microextraction with GC-MS and a preliminary study of solid-phase extraction with LC-MS. *Acta chimica slovenica*, **54**, S. 25–32.
- QI, M., JUN, H.-S. & FORSBERG, C. W. (2008). Cel9D, an Atypical 1,4- β -D-Glucan Glucohydrolase from *Fibrobacter succinogenes*: Characteristics, Catalytic Residues, and Synergistic Interactions with Other Cellulases. *Journal of Bacteriology*, **190** (6), S. 1976–1984.
- RAPP, A. (1965). *Über Inhaltsstoffe von Traubenmosten und Weinen. Unter bes. Berücks. d. flüchtigen Verbindgn u. d. stoffl. Geschehens während d. Hefegärg. (Gekürzte Fassg.)*. Mainz.
- RAPP, A. (1992). Aromastoffe des Weines. *Chemie in unserer Zeit*, **26** (6), S. 273–284.
- RAPP, A. & MANDERY, H. (1986). Wine aroma. *Experientia*, **42**, S. 873–884.
- RAPP, A., HASTRICH, H. & ENGEL, L. (1976). Gaschromatographische Untersuchungen über die Aromastoffe von Weinbeeren. I. Anreicherung und kapillar-chromatographische Auftrennung. *Vitis*, **15**, S. 29–36.
- R-BIOPHARM A. *UV-Test zur Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose in Lebensmitteln und anderen Probematerialien*.
- R-BIOPHARM B. *UV-Test zur Bestimmung von Ethanol in Lebensmitteln und anderen Probematerialien*.
- RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J., CONDE, J. E., GARCÍA-MONTELONGO, F. & PÉREZ-TRUJILLO, J. P. (2003). Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **991** (1), S. 13–22.
- ROJAS, A., AROLA, L. & ROMEU, A. (1995). beta-Glucosidase families revealed by computer analysis of protein sequences. *Biochemistry and molecular biology international*, **35** (6), S. 1223–1231.
- ROMERO, C., MANJÓN, A., BASTIDA, J. & IBORRA, J. (1985). A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Analytical Biochemistry*, **149** (2), S. 566–571.

- ROSI, I., VILLENA, M. A. & DOMIZIO, P. (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Microbiology*, **77** (5), S. 519-527.
- RUSJAN, D., STRLIC, M., KOSMERL, T. & PROSEN, H. (2009). The response of Monoterpenes to different enzyme preparations in Gewürztraminer (*Vitis vinifera* L.) wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **30** (1), S. 56–64.
- RYE, C. S. & WITHERS, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, **4** (5), S. 573–580.
- SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J. A., MARTÍNEZ-RIPOLL, M., LEQUERICA, J. L. & POLAINA, J. (1998). Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *Journal of Molecular Biology*, **275** (3), S. 491–502.
- SCHÄFER, A. (2012). *Untersuchung und Charakterisierung von β -Glucosidase mit dem Ziel einer Weinaromaverbesserung.*
- SCHMIDT, F. H. (1961). Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander. *Journal of Molecular Medicine*, **39** (23), S. 1244–1247.
- SCHNEIDER, R., CHARRIER, F., MOUTOUNET, M. & BAUMES, R. L. (2004). Rapid analysis of grape aroma glycoconjugates using Fourier-transform infrared spectrometry and chemometric techniques. *Analytica chimica acta*, **513** (1), S. 91–96.
- SCHNEIDER, R., RAZUNGLES, A., AUGIER, C. & BAUMES, R. L. (2001). Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines. *Journal of Chromatography A*, **936**, S. 145–157.
- SCHWAB, W. & SCHREIER, P. (1990). Vomifoliol 1-O- β -d-xylopyranosyl-6-O- β -d-glucopyranoside: A disaccharide glycoside from apple fruit. *Phytochemistry*, **29** (1), S. 161–164.

- SIGMA-ALDRICH (1994). *Enzymatic Assay of β -Glucosidase (EC 3.2.1.21)*.
[WWW]
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/bglucosidcolor.Par.0001.File.dat/bglucosidcolor.pdf. (10. März 2012).
- SIMON, B. F., HERNANDEZ, T., ESTELLA, I. & GOMEZ-CORDOVES, C. (1992). Variation in phenol content in grapes during ripening: low molecular-weight phenols. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **194**, S. 351–354.
- SIMPSON, R. F. & MILLER, G. C. (1983). Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis*, **22**, S. 51–63.
- SINGER, M. & TEYSSEN, S., Hrsg. (2005). *Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten*: Springer.
- SOMOGYI, M. (1952). NOTES ON SUGAR DETERMINATION. *Journal of Biological Chemistry*, **195** (1), S. 19–23.
- SPAGNA, G., BARBAGALLO, R. N., GRECO, E., MANENTI, I. & PIFFERI, P. G. (2002). A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilised by inclusion in chitosan gels. *Enzyme and Microbial Technology*, **30** (1), S. 80–89.
- STAHL-BISKUP, E., INTERT, F., HOLTHUIJZEN, J., STENGELE, M. & SCHULZ, G. (1993). Glycosidically bound volatiles—a review 1986–1991. *Flavour and Fragrance Journal*, **8**, S. 61–80.
- STIERAND, K., MAASS, P. C. & RAREY, M. (2006). Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **22** (14), S. 1710–1716.
- STYGER, G., PRIOR, B. & BAUER, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **38** (9), S. 1145–1159.
- TER SCHURE, E. G., FLIKWEERT, M. T., VAN DIJKEN, J. P., PRONK, J. T. & VERRIPS, C. Theo (1998). Pyruvate Decarboxylase Catalyzes Decarboxylation of Branched-Chain 2-Oxo Acids but Is Not Essential for Fusel Alcohol

- Production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (4), S. 1303–1307.
- TURAN, Y. & ZHENG, M. (2005). Purification and Characterization of an Intracellular β -Glucosidase from the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry (Moscow)*, **70** (12), S. 1363–1368.
- VAN RENSBURG, P. & PRETORIUS, I. S. (2000). Enzymes in winemaking: Harnessing natural catalysts for efficient Biotransformations - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **21**, S. 52–70.
- VARGHESE, J. N., HRMOVA, M. & FINCHER, G. B. (1999). Three-dimensional structure of a barley β -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. *Structure*, **7** (2), S. 179–190.
- VASSEROT, Y., ARNAUD, A. & GALZY, P. (1995). Monoterpenol glycosides in plants and their biotechnological transformation. *Acta Biotechnologica*, **15** (1), S. 77-95.
- VERDOUCQ, L., CZJZEK, M., MORINIÈRE, J., BEVAN, D. R. & ESEN, A. (2003). Mutational and Structural Analysis of Aglycone Specificity in Maize and Sorghum β -Glucosidases. *Journal of Biological Chemistry*, **278** (27), S. 25055–25062.
- VERDOUCQ, L., MORINIÈRE, J., BEVAN, D. R., ESEN, A., VASELLA, A., HENRISSAT, B. & CZJZEK, M. (2004). Structural Determinants of Substrate Specificity in Family 1 β -Glucosidases. *Journal of Biological Chemistry*, **279** (30), S. 31796–31803.
- VISIOLI, F., BORSANI, L. & GALLI, C. (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular research*, **47** (3), S. 419–425.
- VOIRIN, S. G., BAUMES, R. L., BITTEUR, S., GÜNATA, Z. Y. & BAYONOVE, C. L. (1990). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38** (6), S. 1373–1378.

- WHITEHURST, R. J. & OORT, M. van (2010). *Enzymes in food technology*. 2. Aufl. Chichester, U.K. ;, Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- WIGHTMAN, J. D. & WROLSTAD, R. E. (1996). β -glucosidase Activity in Juice-Processing Enzymes Based on Anthocyanin Analysis. *Journal of Food Science*, **61** (3), S. 544–548.
- WIGHTMAN, J. D., PRICE, S. F., WATSON, B. T. & WROLSTAD, R. E. (1997). Some Effects of Processing Enzymes on Anthocyanins and Phenolics in Pinot noir and Cabernet Sauvignon Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **48** (1), S. 39–48.
- WILLIAMS, P. J. (1993). Hydrolytic flavor release in fruit and wines through hydrolysis of nonvolatile precursors. In: ACREE, T. E. & TERANISHI, R., Hrsg. *Flavor science. Sensible principles and techniques*. Washington, DC: American Chemical Society.
- WILLIAMS, P. J., STRAUSS, C. R. & WILSON, B. (1980). Hydroxylated Linalool Derivatives as Precursors of Volatile Monoterpenes of Muscat Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **28**, S. 766–771.
- WILLIAMS, P. J., STRAUSS, C. R., WILSON, B. & MASSY-WESTROPP, R. A. (1982). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*, **21** (8), S. 2013–2020.
- WILLIAMSON, G., PLUMB, G. W., UDA, Y., PRICE, K. R. & RHODES, M. J. (1996). Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalcl7 cells. *Carcinogenesis*, **17** (11), S. 2385–2387.
- WINTERHALTER, P. & SKOUROUMOUNIS, G. K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation. In: BERGER, R. et al., Hrsg. *Biotechnology of Aroma Compounds*: Springer. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), S. 73–105.
- WITHERS, S. G. (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate Polymers*, **44** (4), S. 325–337.

WÖHLER, F. & LIEBIG, J. (1837). Ueber die Bildung des Bittermandelöls. *Annalen der Pharmacie*, **22** (1), S. 1-24.

WÜRDIG, G., WOLLER, R. & BREITBACH, K. (1989). *Chemie des Weines*. Stuttgart: Ulmer.

WÜST, M. (2003). Wein — Qualität entscheidet sich in Nanogramm: Zur Biochemie des sortentypischen Weinaromas. *Chemie in unserer Zeit*, **37** (1), S. 8–17.

ZABORSKY, O. R. (1973). *Immobilized enzymes*. Cleveland: CRC Press.

ZOLLNER, H. (1990). *Handbook of enzyme inhibitors*. Reprint. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.

9 Anhang

Alle ermittelten Daten befinden sich als Dokument *Anhang* auf der beiliegenden CD.

Inhaltsverzeichnis – Anhang

Tabellenverzeichnis	A-3
A.1 Formeln	A-6
A.1.1 Formeln zur statistischen Berechnung	A-6
A.1.2 Formeln zur linearen Regression Berechnung	A-6
A.1.3 Formeln zur Gaschromatographie	A-7
A.2 Charakterisierung der Enzym	A-8
A.2.1 Cellulase	A-8
A.2.2 Lallzym β	A-11
A.2.3 β -Glucosidase	A-16
A.2.4 AR 2000	A-20
A.2.5 Aktivität unter Weinbedingungen	A-23
A.2.5.1 Modell-Wein 25 °C	A-23
A.2.5.2 Modell-Wein 20 °C	A-25
A.2.5.3 Modell-Wein 15 °C	A-26
A.2.6 Aktivität in Most & Wein	A-28
A.2.6.1 gezügelte Gärung	A-28
A.2.6.1.1 Cellulase	A-28
A.2.6.1.2 Lallzym β	A-29
A.2.6.1.3 β -Glucosidase	A-29
A.2.6.1.4 AR 2000	A-30
A.2.6.2 ungezügelte Gärung	A-30
A.2.6.2.1 Cellulase	A-30
A.2.6.2.2 Lallzym β	A-31
A.2.6.2.3 β -Glucosidase	A-31

A.2.6.2.4 AR 2000	A-32
A.2.6.3 Wein	A-33
A.2.6.3.1 Cellulase	A-33
A.2.6.3.2 Lallzym β	A-34
A.2.6.3.3 β -Glucosidase	A-35
A.2.6.3.4 AR 2000	A-36
A.3 Parameter Most & Wein	A-37
A.3.1 Glucose/Fructose-Bestimmung	A-37
A.3.2 Ethanol-Bestimmung	A-38
A.4 Aroma-Profile	A-39
A.4.1 nach gezügelter Gärung	A-39
A.4.1.1 Referenz	A-39
A.4.1.2 Cellulase	A-40
A.4.1.3 Lallzym β	A-40
A.4.1.4 β -Glucosidase	A-41
A.4.1.5 AR 2000	A-41
A.4.2 nach ungezügelter Gärung	A-41
A.4.2.1 Referenz	A-41
A.4.2.2 Cellulase	A-42
A.4.2.3 Lallzym β	A-43
A.4.2.4 β -Glucosidase	A-43
A.4.2.5 AR 2000	A-44
A.4.3 Wein	A-44
A.4.3.1 Referenz	A-44
A.4.3.2 Cellulase	A-44
A.4.3.3 Lallzym β	A-45
A.4.3.4 β -Glucosidase	A-45
A.4.3.5 AR 2000	A-46

Tabellenverzeichnis - Anhang

Tab. A-1 Aktivitätsverlauf der Cellulase in Abhängigkeit der Temperatur	A-8
Tab. A-2 Ausreißertest nach Grubbs	A-8
Tab. A-3 Aktivitätsverlauf der Cellulase in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt	A-9
Tab. A-4 Aktivitätsverlauf der Cellulase in Abhängigkeit vom pH-Wert	A-9
Tab. A-5 Aktivitätsverlauf der Cellulase in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt	A-9
Tab. A-6 Aktivitätsverlauf der Cellulase in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt	A-10
Tab. A-7 Ausreißertest nach Grubbs	A-10
Tab. A-8 Aktivitätsverlauf der Cellulase in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (pH 5,0)	A-10
Tab. A-9 Ausreißertest nach Grubbs	A-11
Tab. A-10 Aktivitätsverlauf der Cellulase in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (pH 3,2)	A-11
Tab. A-11 Aktivitätsverlauf von Lallzym β in Abhängigkeit der Temperatur	A-12
Tab. A-12 Aktivitätsverlauf von Lallzym β in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt	A-12
Tab. A-13 Aktivitätsverlauf von Lallzym β in Abhängigkeit vom pH-Wert	A-12
Tab. A-14 Ausreißertest nach Grubbs	A-13
Tab. A-15 Aktivitätsverlauf von Lallzym β in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt	A-13
Tab. A-16 Ausreißertest nach Grubbs	A-13
Tab. A-17 Aktivitätsverlauf von Lallzym β in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt	A-14
Tab. A-18 Ausreißertest nach Grubbs	A-14
Tab. A-19 Aktivitätsverlauf von Lallzym β in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (pH 5,0)	A-14
Tab. A-20 Ausreißertest nach Grubbs	A-15
Tab. A-21 Aktivitätsverlauf von Lallzym β in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt (pH 3,2)	A-15
Tab. A-22 Ausreißertest nach Grubbs	A-15
Tab. A-23 Aktivitätsverlauf der β -Glucosidase in Abhängigkeit der Temperatur	A-16
Tab. A-24 Aktivitätsverlauf der β -Glucosidase in Abhängigkeit von Ethanol	A-16
Tab. A-25 Ausreißertest nach Grubbs	A-16
Tab. A-26 Aktivitätsverlauf der β -Glucosidase in Abhängigkeit vom pH-Wert	A-17
Tab. A-27 Ausreißertest nach Grubbs	A-17
Tab. A-28 Aktivitätsverlauf der β -Glucosidase in Abhängigkeit von Glucose	A-17
Tab. A-29 Ausreißertest nach Grubbs	A-18

Tab. A-30 Aktivitätsverlauf der β -Glucosidase in Abhängigkeit von Fructose	A-18
Tab. A-31 Ausreißertest nach Grubbs	A-18
Tab. A-32 Aktivitätsverlauf β -Glucosidase in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt pH 5,0	A-19
Tab. A-33 Aktivitätsverlauf β -Glucosidase in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt pH 3,2	A-19
Tab. A-34 Aktivitätsverlauf von AR 2000 in Abhängigkeit der Temperatur	A-20
Tab. A-35 Aktivitätsverlauf von AR 2000 in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt	A-20
Tab. A-36 Aktivitätsverlauf von AR 2000 in Abhängigkeit vom pH-Wert	A-21
Tab. A-37 Aktivitätsverlauf von AR 2000 in Abhängigkeit vom Glucose-Gehalt	A-21
Tab. A-38 Aktivitätsverlauf von AR 2000 in Abhängigkeit vom Fructose-Gehalt	A-22
Tab. A-39 Ausreißertest nach Grubbs	A-22
Tab. A-40 Aktivitätsverlauf von AR 2000 in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt pH 5,0	A-22
Tab. A-41 Aktivitätsverlauf von AR 2000 in Abhängigkeit vom Kaliumdisulfit-Gehalt pH 3,2	A-23
Tab. A-42 Aktivität der Enzyme in Modell-Wein trocken bei 25 °C	A-23
Tab. A-43 Aktivität der Enzyme in Modell-Wein halbtrocken bei 25 °C	A-24
Tab. A-44 Aktivität der Enzyme in Modell-Wein lieblich bei 25 °C	A-24
Tab. A-45 Aktivität der Enzyme in Modell-Most bei 25 °C	A-24
Tab. A-46 Wiederfindung von pNP	A-24
Tab. A-47 Aktivität der Enzyme in Modell-Wein trocken bei 20 °C	A-25
Tab. A-48 Aktivität der Enzyme in Modell-Wein halbtrocken bei 20 °C	A-25
Tab. A-49 Aktivität der Enzyme in Modell-Wein lieblich bei 20 °C	A-25
Tab. A-50 Ausreißertest nach Grubbs	A-26
Tab. A-51 Aktivität der Enzyme in Modell-Most bei 20 °C	A-26
Tab. A-52 Wiederfindung von pNP	A-26
Tab. A-53 Aktivität der Enzyme in Modell-Wein trocken bei 15 °C	A-26
Tab. A-54 Aktivität der Enzyme in Modell-Wein halbtrocken bei 15 °C	A-27
Tab. A-55 Aktivität der Enzyme in Modell-Wein lieblich bei 15 °C	A-27
Tab. A-56 Aktivität der Enzyme in Modell-Most bei 15 °C	A-27
Tab. A-57 Wiederfindung von pNP	A-27
Tab. A-58 Aktivitätsverlauf der Cellulase während gezügelter Gärung	A-28
Tab. A-59 Aktivitätsverlauf von Lallzym β während gezügelter Gärung	A-29

Tab. A-60 Aktivitätsverlauf der β -Glucosidase während gezügelter Gärung	A-29
Tab. A-61 Aktivitätsverlauf von AR 2000 während gezügelter Gärung	A-30
Tab. A-62 Aktivitätsverlauf der Cellulase während ungezügelter Gärung	A-30
Tab. A-63 Aktivitätsverlauf von Lallzym β während ungezügelter Gärung	A-31
Tab. A-64 Aktivitätsverlauf der β -Glucosidase während ungezügelter Gärung	A-31
Tab. A-65 Aktivitätsverlauf von AR 2000 während ungezügelter Gärung	A-32
Tab. A-66 Aktivitätsverlauf der Cellulase während Weinbehandlung	A-33
Tab. A-67 Aktivitätsverlauf von Lallzym β während Weinbehandlung	A-34
Tab. A-68 Aktivitätsverlauf der β -Glucosidase während Weinbehandlung	A-35
Tab. A-69 Aktivitätsverlauf von AR 2000 während Weinbehandlung	A-36
Tab. A-70 Bestimmung Glucose/Fructose	A-37
Tab. A-71 Bestimmung von Ethanol	A-38
Tab. A-72 Aromaprofil von Most	A-39
Tab. A-73 Aromaprofil von Referenz-Probe nach gezügelter Gärung	A-39
Tab. A-74 Aromaprofil der Cellulase-Probe nach gezügelter Gärung	A-40
Tab. A-75 Aromaprofil von Lallzym β -Probe nach gezügelter Gärung	A-40
Tab. A-76 Aromaprofil der β -Glucosidase-Probe nach gezügelter Gärung	A-41
Tab. A-77 Aromaprofil der AR 2000-Probe nach gezügelter Gärung	A-41
Tab. A-78 Aromaprofil der Referenz-Probe nach ungezügelter Gärung	A-42
Tab. A-79 Aromaprofil der Cellulase-Probe nach ungezügelter Gärung	A-42
Tab. A-80 Aromaprofil der Lallzym β -Probe nach ungezügelter Gärung	A-43
Tab. A-81 Aromaprofil der β -Glucosidase-Probe nach ungezügelter Gärung	A-43
Tab. A-82 Aromaprofil der AR 2000-Probe nach ungezügelter Gärung	A-44
Tab. A-83 Aromaprofil der Referenz-Probe	A-44
Tab. A-84 Aromaprofil der Cellulase-Probe	A-44
Tab. A-85 Aromaprofil der Lallzym β -Probe	A-45
Tab. A-86 Aromaprofil der β -Glucosidase-Probe	A-45
Tab. A-87 Aromaprofil der AR 2000-Probe	A-46