
JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN

Institut für Angewandte Mikrobiologie

HOCHSCHULE GEISENHEIM UNIVERSITY

Institut für Mikrobiologie und Biochemie

**Beeinflussung der analytischen und sensorischen Qualität von
Weißwein in Abhängigkeit der Mostzusammensetzung unter
besonderer Berücksichtigung schwefelhaltiger Komponenten**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. agr.) am
Fachbereich 09 - Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Maik Werner (M.Sc.)
aus Northeim

1. Gutachterin: Prof. Dr. Sylvia Schnell
Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Angewandte Mikrobiologie

2. Gutachterin: Prof. Dr. Doris Rauhut
Hochschule Geisenheim University*
Institut für Mikrobiologie und Biochemie

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten“.

Geisenheim, den 16.10.2012

Maik Werner

Datum der Disputation: 20.03.2013

Danksagung

Frau Prof. Dr. Doris Rauhut danke ich vielmals für die Möglichkeit der Promotion im Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie, für die hervorragende Zusammenarbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen in den 5 Jahren meiner Tätigkeit im Fachgebiet.

Herrn Prof. Dr. Manfred Großmann danke ich für die Möglichkeit der Projektmitarbeit und Finanzierung im Rahmen des EU-Projektes Orwine und für die fachliche Diskussion während meiner Promotionszeit.

Bei Frau Prof. Dr. Sylvia Schnell bedanke ich mich sehr für die Übernahme des Erstgutachtens und für hilfreiche Ratschläge bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachgebietes Mikrobiologie und Biochemie, die durch ihre hervorragende Zusammenarbeit zum Gelingen meiner Promotionsarbeit beigetragen haben. Besonders möchte ich mich bei Stefanie Fritsch und Beata Beisert für die große Unterstützung bei den gaschromatographischen Analysen bedanken.

Dem Fachgebiet Bodenkunde und Pflanzenernährung, insbesondere Stefan Muskat danke ich für die Möglichkeit des Weinausbaus und Birgit Krause für die Durchführung der Aminosäureanalyse.

Dem Fachgebiet Weinchemie und Getränkeanalytik danke ich vielmals für die Durchführung zahlreicher Analysen mittels FTIR und Ionenchromatographie. Insbesondere gilt mein Dank Anja Giehl für den vielfachen Einsatz.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Seckler des Fachgebietes Kellerwirtschaft für die Einlagerung und Bereitstellung verschiedener Versuchsmoste und bei Christoph Schüßler für die gute Zusammenarbeit bei zahlreichen Verkostungspanels und der SO₂-Analyse zahlreicher Weine.

Für die Möglichkeit der Versuchsdurchführung im Weinberg bedanke ich mich bei Prof. Dr. Randolph Kauer und dem Fachgebiet Weinbau.

Außerdem gilt mein Dank Anne Plaschke und Rebecca Materne für die Mitarbeit bei verschiedenen Versuchsdurchführungen.

Herrn Dr. Herrmann von der Universität Gießen danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Frau Sandra und meinem Sohn Yannik für die übergroße Geduld bis zur Fertigstellung dieser Arbeit !

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
1 EINLEITUNG	14
1.1 Aktuelle Situation und Konsequenzen für die Weinbereitung.....	14
1.2 Zielsetzung dieser Arbeit.....	19
2 LITERATURÜBERSICHT	20
2.1 Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.1.1 Morphologie und Speicherfunktionen in der Zelle.....	20
2.1.2 Entwicklung der Hefepopulation	22
2.1.3 Transportmechanismen in die Zelle.....	24
2.1.3.1 Einfache Diffusion	24
2.1.3.2 Trägergebundene erleichterte Diffusion	24
2.1.3.3 Aktiver Transport.....	25
2.1.3.4 Aufnahme von Aminosäuren	26
2.2 Grundsätze der alkoholischen Gärung.....	27
2.2.1 Endprodukte	27
2.2.2 Nebenprodukte	27
2.2.2.1 Bindungspartner von SO ₂	27
2.2.2.2 Glycerin	29
2.2.2.3 Sulfit	30
2.2.3 Hemmungs- und Stressfaktoren.....	30
2.2.3.1 Schwefelige Säure	30
2.2.3.2 Alkohol	31
2.2.3.3 Kohlenstoffdioxid	32
2.2.3.4 Temperatur.....	33
2.2.3.5 Anaerobe Bedingungen während der Alkoholischen Gärung ..	34
2.2.3.6 Trubgehalt und Rückstände aus dem Pflanzenschutz	34
2.3 Themenbereich „Nährstoffversorgung der Hefe und Aromabildung“ ..	36
2.3.1 Stickstoffmetabolismus.....	37
2.3.1.1 Ammonium	40
2.3.1.2 Aminosäuren	41
2.3.2 Mineralstoffe und Spurenelemente.....	45

2.3.2.1	Phosphor.....	45
2.3.2.2	Schwefel.....	46
2.3.2.3	Magnesium.....	46
2.3.2.4	Zink	47
2.3.3	Vitamine	48
2.3.3.1	Thiamin	48
2.3.3.2	Pantothensäure	49
2.3.3.3	Biotin und Folsäure	50
2.3.4	Hefenährstoffpräparate.....	50
2.3.5	Aromabildung durch <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
2.3.5.1	Ester.....	57
2.3.5.2	Höhere Alkohole.....	57
2.3.5.3	Flüchtige Fettsäuren.....	59
2.4	Themenbereich „Schwefel“	60
2.4.1	Der Schwefelstoffwechsel der Hefe.....	63
2.4.1.1	Sulfitbildung durch die Hefe.....	66
2.4.1.2	Regulierung der Sulfidbildung	67
2.4.1.3	Sulfidbildung in Abhängigkeit vom Stickstoff	68
2.4.1.4	Sulfidbildung durch Netzschwefel.....	72
2.4.1.5	Böckserbildung während der Flaschenlagerung.....	73
2.4.1.6	Möglichkeiten der Böckserbeseitigung	75
2.4.1.7	Sulfidbildung als Entgiftungsstrategie in der Hefezelle	76
2.4.2	Funktion des Tripeptids Glutathion	76
2.4.2.1	Grape Reaction Product.....	79
3	MATERIAL.....	80
3.1	Themenbereich „Nährstoffversorgung der Hefe und Aromabildung“ ..	81
3.1.1	Aufbau Versuch 1: Hefenährstoffe.....	81
3.1.2	Aufbau Versuch 2: Hefestammcharakteristik und Aromabildung....	85
3.2	Themenbereich „Schwefel“	86
3.2.1	Vorversuche im Labormaßstab.....	86
3.2.1.1	Aufbau Vorversuch 1: Effekt von Netzschwefel.....	86
3.2.1.2	Aufbau Vorversuch 2: Effekt von Glutathion.....	86
3.2.1.3	Aufbau Vorversuch 3: SO ₂ -Bildung während der Gärung	87
3.2.1.4	Aufbau Vorversuch 4: SO ₂ -Bildung bei unterschiedlichen Rebsorten	87
3.2.2	Aufbau Versuch 3: Bildung von flüchtigen und nicht-flüchtigen Schwefelverbindungen	87
3.2.3	Aufbau Versuch 4: Bildung von niedrig-siedenden Verbindungen durch Netzschwefelapplikationen	88
3.2.4	Aufbau Versuch 5: Bildung von niedrig-siedenden Verbindungen durch Stickstoffmangel	88
4	METHODEN.....	89
4.1	Dokumentation des Verlaufes der alkoholischen Gärung	89

4.2	Bestimmung der Hefezellzahl	89
4.3	Fourier-Transform-Infrared (FTIR)-Spektroskopie.....	90
4.4	Enzymatische Bestimmungen.....	90
4.5	Bestimmung der Aromastoffe mittels Kaltronmethode	91
4.6	Bestimmung der niedrig-siedenden Schwefelverbindungen	91
4.7	Bestimmung der Aminosäuren.....	92
4.8	Bestimmung von Sulfit im Jungwein.....	92
4.9	Bestimmung von Sulfat im Most und Jungwein.....	93
4.10	Hefeverfügbare Stickstoff.....	93
4.11	Durchführung des Weinausbaus	94
4.12	Statistische Auswertung.....	94
5	ERGEBNISSE.....	96
5.1	Themenbereich „Nährstoffversorgung der Hefe und Aromabildung“ ..	96
5.2	Externe Analysen zum Vitamingehalt.....	96
5.3	Versuch 1 : Gärverlauf	97
5.4	Versuch 1 : Hefezellzahl	101
5.5	Versuch 1 : SO ₂ - Bindungspartner.....	106
5.6	Versuch 1 : Gehalt Ammonium	108
5.7	Versuch 1 : Gehalt Aminosäuren	108
5.8	Versuch 1 : Beeinflussung der Aromastoffgehalte	112
5.8.1	Veränderung der Konzentration Essigsäureester	112
5.8.1.1	Essigsäureethylester	113
5.8.1.2	Essigsäure-2-phenylethylester	114
5.8.1.3	Essigsäure-2-methylbutylester	115
5.8.1.4	Essigsäure-3-methylbutylester	116
5.8.1.5	Essigsäurehexylester	117
5.8.2	Veränderung der Konzentration weiterer Ester	118
5.8.2.1	Propionsäureethylester	118
5.8.2.2	i-Buttersäureethylester	119
5.8.2.3	Buttersäureethylester	120

5.8.2.4	Capronsäureethylester	121
5.8.2.5	Caprylsäureethylester	122
5.8.2.6	Caprinsäureethylester	123
5.8.3	Veränderung der Konzentration höherer Alkohole.....	124
5.8.3.1	2- Phenylethanol	124
5.8.3.2	i- Butanol	125
5.8.3.3	2- Methylbutanol.....	126
5.8.3.4	3- Methylbutanol.....	127
5.8.4	Gehalt Flüchtige Fettsäuren	127
5.8.5	Hauptkomponentenanalyse.....	128
5.8.5.1	PCA für die Durchschnittswerte der 3 Versuchsjahre.....	129
5.9	Versuch 2 : Hefevergleich	134
5.9.1	Clusteranalyse auf Basis der Aromastoffe.....	135
5.9.2	Aromacharakteristik der Cluster	136
5.9.3	Bildung von SO ₂ und seinen Bindungspartnern.....	136
5.9.4	Korrelation von SO ₂ -Gehalt mit den Bindungspartnern	138
	Themenbereich „Schwefel“	139
5.9.5	Vorversuche	139
5.9.5.1	Vorversuch 1 : Effekt von Netzschwefel	139
5.9.5.2	Vorversuch 2 : Effekt von Glutathion	141
5.9.5.3	Vorversuch 3 : SO ₂ und Bindungspartner.....	141
5.9.5.4	Vorversuch 4 : SO ₂ -Bildung durch die Hefe	143
5.9.6	Versuch 3 : Flüchtige und nicht-flüchtige Schwefelverbindungen.	144
5.9.6.1	Gärkurven.....	145
5.9.6.2	Sulfatgehalt in Most und Wein.....	147
5.9.6.3	Produktion von SO ₂	148
5.9.6.4	Niedrig-siedende Schwefelverbindungen	150
5.9.7	Versuch 4 : Bildung niedrig-siedende Schwefelverbindungen durch Netzschwefel.....	151
5.9.7.1	Gärkurven.....	151
5.9.7.2	Flüchtige Schwefelverbindungen.....	154
5.9.7.3	Konzentration Gesamt-SO ₂	155
5.9.7.4	SO ₂ -Bindungspartner	156
5.9.8	Versuch 5 : Niedrig-siedende Schwefelverbindungen	158
5.9.8.1	Mostqualität im Versuchsjahr 1 und 2	158
5.9.8.2	Niedrig-siedende Schwefelverbindungen	159
6	Diskussion	161
6.1	Einfluss der Hefeernährung auf sekundäre Metabolite und die Aromabildung durch <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	161
6.2	Untersuchungen zur Stammabhängigkeit bei der Bildung verschiedener sekundärer Metabolite	168

6.3	Einflussfaktoren auf den Gehalt von Sulfat, schwefeliger Säure und niedrig-siedender Schwefelverbindungen	170
6.4	Abschlussbetrachtung.....	176
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	178
8	SUMMARY.....	180
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	182
10	ANHANG	196

Publikationen und Finanzierung

Teile dieser Dissertation wurden aus den Projekten "Zusatz von Hefenährstoffen zu Traubenmosten" Projektnummer 99HS050 des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, sowie aus dem Projekt "Orwine - Organic Viticulture and Winemaking", Projektnummer 022769 aus dem 6. Rahmenprogramm der Europäischen Union finanziert.

Ein Teil des Versuches 1 entstand im Rahmen des zweijährigen Projektes "Zusatz von Hefenährstoffen zu Traubenmosten" Projektnummer 99HS050 des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft. Hierbei war der Autor dieser Arbeit maßgeblich beteiligt. Auszüge der Ergebnisse wurden bereits im Abschlussbericht des Projektes dargestellt (Werner 2005; Rauhut 2006). Die Arbeit des Projektes wurde ein weiteres Jahr fortgesetzt, schließlich wurden in dieser Dissertation die Daten aller drei Jahre zusammen ausgewertet und interpretiert. Einzelne Diagramme wurden aus den Ergebnissen des EU-Projektes Orwine entnommen und in die Ergebnisse des Kapitels 5.10 integriert.

Darüber hinaus wurden einzelne Aspekte bereits auf zwei Tagungen und in zwei Buchbeiträgen vorgestellt:

Vortrag auf dem 16. Organic World Kongress der internationalen Dachorganisation für biologischen Landbau (IFOAM): Werner M, Materne R, Beisert M, Fischer S, Kauer R and Rauhut D. : Impact of different application rates of wettable sulphur and selected oenological practices on SO₂-levels and aroma active compounds in organic Riesling wine (Werner *et al.* 2008).

Vortrag auf dem Internationalen Intervitis Interfructa (IVIF) Kongress: Einfluss verschiedener Hefenährstoffe wie z.B. anorganischer und organischer Stickstoff auf die Population der Hefezellen und die Bildung ausgewählter Aromakomponenten bei Cool Climate Riesling Weinen vergoren mit *Saccharomyces cerevisiae* (Werner 2010).

Buchbeitrag: Usage and Formation of Sulphur Compounds in *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, S. 181-209, (Rauhut 2009).

Buchbeitrag im Rahmen des EU-Projektes Orwine: Natural production of sulphite (SO₂) by yeast during alcoholic fermentation. In *ORWINE: Code of good organic viticulture and wine-making*. S. 203-205, (Werner & Rauhut 2009).

Versuch 3 und 4 wurden teilweise auch in folgenden Diplomarbeiten der FH Wiesbaden behandelt: Materne (2008): Einfluss ausgewählter önologischer Verfahren zur Reduzierung des Bedarfs an schwefliger Säure bei Weinen aus ökologischer Erzeugung.

Plaschke (2010): Bestimmung des H₂S- und SO₂-Bildungsvermögens durch Hefen der Gattung *Saccharomyces* während der alkoholischen Gärung.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
DAHP	Diammoniumhydrogenphosphat
Fru	Fructose
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gln	Glutamin
Glu	Glucose
HZW	Hefezellwände
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
OD	Optische Dichte
M	Mol
N	Stickstoff
n.a.	nicht analysiert
n.n.	nicht nachweisbar
NOPA	<i>o</i> -Phthaldialdehyd/N-acetyl-L-cystein; entspricht dem freien α -Amino-Stickstoff
ppm	parts per million
rpm	rotations per minute (Umdrehungen in der Minute)
S	Schwefel
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
%vol.	Volumenprozent (Alkohol)
Y	Hefe (Englisch: Yeast)
YAN	Yeast Assimilable Nitrogen (Hefe verwertbarer Stickstoff)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Optischer Zustand von Trauben mit unterschiedlichem Reife- und Gesundheitszustand.....	16
Abbildung 2:	Variabilität der natürlichen Stickstoffversorgung im Most der Sorte Riesling (Jahrgang 2002 bis 2007) aus Geisenheimer Weinbergslagen.....	17
Abbildung 3:	Modell der Populationsdynamik der Hefezellen.....	23
Abbildung 4:	Aktiver Transport in die Zelle bei hoher Alkoholkonzentration.....	25
Abbildung 5:	Summenformel der alkoholischen Gärung.....	27
Abbildung 6:	Abbau der Aminosäuren.....	39
Abbildung 7:	Übersicht der metabolischen Wege zur Bildung von aromaaktiven Substanzen....	52
Abbildung 8:	Bildung von tertiären Aromastoffen in Abhängigkeit des hefeverwertbaren Stickstoff (YAN).....	53
Abbildung 9:	Übersicht über den Eintrag von schwefelhaltigen Komponenten während der alkoholischen Gärung und die möglichen Substanzen, die daraus gebildet werden.....	63
Abbildung 10:	Grundzüge des Schwefelstoffwechsels der Hefe und der Synthese schwefelhaltiger Aminosäuren.....	65
Abbildung 11:	Bildung von Schwefelwasserstoff in Abhängigkeit der Ammoniumzugabe.....	70
Abbildung 12:	Schwefelwasserstoff (H ₂ S) und seine Reaktionsprodukte im Jungwein.....	75
Abbildung 13:	Schematische Darstellung des Redoxpotentials ausgewählter Substanzen.....	77
Abbildung 14:	Struktur des Tripeptids Glutathion (GSH).....	77
Abbildung 15:	Thematische Beziehung der einzelnen Versuchsanstellungen.....	80
Abbildung 16:	Aufbau Versuch 1.....	81
Abbildung 17:	Versuch 1: Gärverlauf Variante V1 - V18 im Jahr 1.....	98
Abbildung 18:	Versuch 1: Gärverlauf Variante V1 - V18 im Jahr 2.....	99
Abbildung 19:	Versuch 1: Gärverlauf Variante V1 - V18 im Jahr 3.....	99
Abbildung 20:	Versuch 1: Maximale Lebendzellzahl; Variante V1-V18; Versuchsjahr 1- 2.....	101
Abbildung 21:	Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V2.....	102
Abbildung 22:	Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V5.....	103
Abbildung 23:	Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V12.....	103
Abbildung 24:	Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V13.....	104
Abbildung 25:	Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V4.....	105
Abbildung 26:	Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V6.....	105
Abbildung 27:	Versuch 1: Mittelwert der Konzentration von Acetaldehyd, Versuchsjahr 1-3.....	106
Abbildung 28:	Versuch 1: Mittelwert der Konzentration von Pyruvat, Versuchsjahr 1-3.....	107
Abbildung 29:	Versuch 1: Mittelwert der Konzentration von α -Ketoglutarat, Versuchsjahr 1-3....	107
Abbildung 30:	Versuch 1: Konzentration Ammonium nach der alkoholischen Gärung, Versuchsjahr 1-3.....	108
Abbildung 31:	Versuch 1: Summe der Aminosäuren im Versuchsjahr 1.....	110
Abbildung 32:	Versuch 1: Summe der Aminosäuren im Versuchsjahr 2.....	110
Abbildung 33:	Versuch 1: Summe der Aminosäuren im Versuchsjahr 3.....	111
Abbildung 34:	Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Essigsäureethylester.....	113
Abbildung 35:	Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Essigsäure-2-phenylethylester.....	114
Abbildung 36:	Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Essigsäure-2-methylbutylester.....	115
Abbildung 37:	Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Essigsäure-3-methylbutylester.....	116
Abbildung 38:	Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Essigsäurehexylester.....	117
Abbildung 39:	Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Propionsäureethylester.....	118
Abbildung 40:	Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von i-Buttersäureethylester.....	119
Abbildung 41:	Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Buttersäureethylester.....	120
Abbildung 42:	Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Capronsäureethylester.....	121
Abbildung 43:	Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Caprylsäureethylester.....	122

Abbildung 44: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Caprinsäureethylester	123
Abbildung 45: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von 2-Phenylethanol	124
Abbildung 46: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von i-Butanol.....	125
Abbildung 47: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von 2-Methylbutanol.....	126
Abbildung 48: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von 3-Methylbutanol.....	127
Abbildung 49: Versuch 1: Diagramme der Hauptkomponentenanalyse für die Durchschnittswerte der 3 Versuchsjahre	129
Abbildung 50: Versuch 1: Dendogramm der hierarchischen Clusteranalyse für Hefestamm 1- 35.	135
Abbildung 51: Versuch 1: Charakterisierung der Cluster 1 bis 4 anhand der einzelnen Aromastoffe.	136
Abbildung 52: Versuch 2: SO ₂ -Bildung der verschiedenen kommerziellen Hefestämmen.....	137
Abbildung 53: Versuch 2: Konzentration der SO ₂ -Bindungspartner.....	137
Abbildung 54: Versuch 2: Korrelativer Zusammenhang zwischen SO ₂ -Gehalt und den Bindungspartnern.	138
Abbildung 55: Effekt von Netzschwefel auf die Bildung flüchtiger S-Verbindungen:Hefe A.....	140
Abbildung 56: Effekt von Netzschwefel auf die Bildung flüchtiger S-Verbindungen:Hefe B.....	140
Abbildung 57: Effekt von Glutathion (GSH) auf die Bildung flüchtiger S-Verbindungen.....	141
Abbildung 58: Bildung von SO ₂ und seinen Bindungspartnern im Gärverlauf: Hefe A	142
Abbildung 59: Bildung von SO ₂ und seinen Bindungspartnern im Gärverlauf: Hefe B	143
Abbildung 60: SO ₂ -Bildung des gleichen kommerziellen Hefestammes bei unterschiedlichen Rebsorten.	144
Abbildung 61: Versuch 3: Gärverlauf Hefe 1	145
Abbildung 62: Versuch 3: Gärverlauf Hefe 2	146
Abbildung 63: Versuch 3: Gärverlauf Hefe 3	146
Abbildung 64: Versuch 3: Sulfatgehalt im Most und nach der alkoholischen Gärung im Wein....	147
Abbildung 65: Versuch 3: SO ₂ Gehalt im Wein	148
Abbildung 66: Versuch 3: Sulfatabbau und SO ₂ Zunahme.....	149
Abbildung 67: Versuch 3: Konzentration niedrig-siedende Schwefelverbindungen	150
Abbildung 68: Versuch 4: Gärkurven Applikation 1	151
Abbildung 69: Versuch 4: Gärkurven Applikation 2	152
Abbildung 70: Versuch 4: Gärkurven Applikation 3	153
Abbildung 71: Versuch 4: Bildung flüchtiger Schwefelverbindungen	154
Abbildung 72: Versuch 4: Konzentration Gesamt-SO ₂ bei verschiedenen Applikationsniveaus..	155
Abbildung 73: Versuch 4: Konzentration Acetaldehyd.....	156
Abbildung 74: Versuch 4: Konzentration Pyruvat.	157
Abbildung 75: Versuch 4: Konzentration α-Ketoglutarat.....	157
Abbildung 76: Versuch 5: Konzentration niedrig-siedende Schwefelverbindungen Versuchsjahr 1	159
Abbildung 77: Versuch 5: Konzentration niedrig-siedende Schwefelverbindungen Versuchsjahr 2	160
Abbildung 78: Wetterdaten im Jahrgang 2002 und 2003	196
Abbildung 79: Wetterdaten im Jahrgang 2004 und 2005	196
Abbildung 80: Wetterdaten im Jahrgang 2006 und 2007	197
Abbildung 81: Wetterdaten im Jahrgang 2008 und 2009	197
Abbildung 82: Versuch 4: Applikationsplan im Weinberg	202
Abbildung 83: Diagramme der Hauptkomponentenanalyse Jahr 1	214
Abbildung 84: Diagramme der Hauptkomponentenanalyse Jahr 2	215
Abbildung 85: Diagramme der Hauptkomponentenanalyse Jahr 3	216
Abbildung 86: Photos der Hefepräparate aus Versuch 1.....	218

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Analysenwerte von Rieslingmost der Forschungsanstalt Geisenheim, gewonnen aus Trauben mit unterschiedlichem Reife- und Gesundheitszustand... 16
Tabelle 2:	Durchschnittlicher Gehalt der SO ₂ - bindenden Stoffwechselprodukte im Wein..... 29
Tabelle 3:	Assimilierbare Stickstoffquellen für die Hefe 38
Tabelle 4:	Aminosäureaufnahme durch die Hefe während der alkoholischen Gärung in einem synthetischen Most 42
Tabelle 5:	Gruppierung der Aminosäuren bei der Aufnahme durch <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 44
Tabelle 6:	Gruppierung der Aminosäuren bei der Aufnahme aus Bierwürze durch <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 45
Tabelle 7:	Zusammensetzung der Trockensubstanz von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 51
Tabelle 8:	Wichtige Schwefelverbindungen des Weinaromas 55
Tabelle 9:	Wichtige Aromastoffe im Wein 56
Tabelle 10:	Aminosäureprofil von Traubenmost in verschiedenen Jahrgängen 62
Tabelle 11:	Übersicht der verschiedenen schwefelhaltigen Aromastoffe, die den Aromafehler „Böckser“ prägen. 69
Tabelle 12:	Versuch 1: Nährstoffvarianten 1-18 82
Tabelle 13:	Analysendaten (FTIR) Most der Versuchsjahre 1, 2 und 3. 83
Tabelle 14:	Liste der Zusätze in Versuch 1 und Versuch 3 84
Tabelle 15:	Vitaminkonzentration im Rieslingmost aus Versuchsjahr 1 und 2..... 97
Tabelle 16:	Vitaminkonzentration in vier unterschiedlichen Präparaten aus inaktiver Hefe 97
Tabelle 17:	Zusammenfassung der Gärleistung anhand der Parameter Gärfortschritt am 5. Tag (%) und Fructosekonzentration am Ende der Gärung (FTIR) für alle 3 Jahre. 100
Tabelle 18:	Versuch 1: Einteilung der Aminosäuren gemäß der Präferenz bei der Aufnahme durch die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 109
Tabelle 19:	Versuch 1: Übersicht über die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsvarianten und der Kontrollvariante V1. 131
Tabelle 20:	Analysenwerte des Mostes im Versuchsjahr 1 (2006) und 2 (2007) 158
Tabelle 21:	Daten der Mostanalyse Versuch 2 und Vorversuch 1 - 3 198
Tabelle 22:	Daten der Mostanalyse Versuch 4..... 199
Tabelle 23:	Daten der Mostanalyse Versuch 5..... 200
Tabelle 24:	Aminosäurekonzentration Most Versuch 3..... 201
Tabelle 25:	Versuch 1: Gärverlauf [g L ⁻¹] reduzierende Zucker Jahr 1 203
Tabelle 26:	Versuch 1: Gärverlauf [kumulierter Dichteverlust] Jahr 2 204
Tabelle 27:	Versuch 1: Gärverlauf [kumulierter Gewichtsverlust in g L ⁻¹] Jahr3 205
Tabelle 28:	Versuch 1: Hefezellzahl [KBE mL ⁻¹] im Versuchsjahr 1 206
Tabelle 29:	Versuch 1: Hefezellzahl [KBE mL ⁻¹] im Versuchsjahr 2 207
Tabelle 30:	Versuch 1: Konzentration Aminosäuren nach der Gärung [mg L ⁻¹] Jahr 1 208
Tabelle 31:	Versuch 1: Konzentration Aminosäuren nach der Gärung [mg L ⁻¹] Jahr 2 209
Tabelle 32:	Versuch 1: Konzentration Aminosäuren nach der Gärung [mg L ⁻¹] Jahr 3 210
Tabelle 33:	Versuch 1: Konzentration Aromastoffe nach der Gärung Jahr 1 211
Tabelle 34:	Versuch 1: Konzentration Aromastoffe nach der Gärung Jahr 2 212
Tabelle 35:	Versuch 1: Konzentration Aromastoffe nach der Gärung Jahr 3 213
Tabelle 36:	Versuch 2: Durchschnittswerte der Aromastoffe je Gruppe der Clusteranalyse... 217

1 EINLEITUNG

1.1 Aktuelle Situation und Konsequenzen für die Weinbereitung

Natürlicher Traubenmost stellt das wesentliche Gärsubstrat in der traditionellen und modernen Weinbereitung dar. Als Naturprodukt aus der Traube untersteht es großen Schwankungen bezüglich seiner Qualität bzw. seiner Zusammensetzung. Neben dem traditionell wichtigsten Parameter, dem Zuckergehalt muss die heutige Weinherstellung wesentlich mehr qualitätsbestimmende Parameter im Blick haben, um eine optimale alkoholische Gärung und eine optimale Weinqualität zu erreichen. Dementsprechend sind die typischen gärungsbeeinflussenden Faktoren wie hoher Zuckergehalt (Dittrich & Großmann 2005, Lafon-Lafourcade *et al.* 1979), Stickstoff und Vitaminmangel (Agenbach 1977, Dittrich 1983, Ough *et al.* 1989, Salmon 1989, Kunkee 1991), anaerobe Bedingungen (Giovanelli *et al.* 1996), hohe Ethanolkonzentration (Ferrerias *et al.* 1989), starke Mostvorklärung (Groat & Ough 1978) und die Anwesenheit von toxischen Fettsäuren (Geneix *et al.* 1983, Viegas *et al.* 1989) Gegenstand bisheriger und aktueller Forschungsarbeit. Auch der Klimawandel, der seit einigen Jahrzehnten beobachtet werden kann, hat einen Einfluss auf das Gärsubstrat, da er die Wachstumsbedingungen der Trauben und die daraus resultierende Zusammensetzung des Traubenmostes verändert. Jones & Davis (2000), Jones *et al.* (2005) und Schultz *et al.* (2009) weisen darauf hin, dass zukünftig neben einer Erhöhung der Durchschnittstemperatur die zunehmende Variabilität von Wetterereignissen das größte Problem für die Kultivierung von landwirtschaftlichen Produkten darstellen wird. Im Fall des Weinbaus, kommt es zunehmend zu heterogenen Reifezuständen der Weintraube und heterogenen Mostqualitäten als Folge von Trockenheit oder starken Niederschlagsereignissen.

Auch am Standort Geisenheim ließen sich seit 2000 sehr unterschiedliche Wetterbedingungen während der Vegetationsperiode bzw. der Reifephase der Trauben beobachten. Die genauen Daten für Niederschlag, Temperatur und Sonnenscheinstunden werden permanent von der Wetterstation Geisenheim des Deutschen Wetterdienstes erfasst und sind in den Abbildungen 78-81 für den Zeitraum 15. September bis 15. Oktober für die Jahre 2000 bis 2009 dargestellt. Die Daten veranschaulichen die Situation für das Weinbaugebiet Rheingau, das klimatisch als "Cool Climate Region" einzustufen ist, aber bereits heute mit veränderten Bedingungen hinsichtlich Trockenstress, mikrobiellem Befall der Trauben und Nährstoffversorgung

der Moste konfrontiert wird. Diese direkten Auswirkungen ergeben sich, wenn sich der mikrobielle Infektionsdruck in der Folge von Starkregen während der Reifephase stark erhöht (vgl. Jahrgang 2006). Die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln ist in dieser Phase oftmals nicht mehr zulässig oder wirksam. Kompakte Trauben, die in Folge von früher Blüte und starkem Fruchtansatz entstehen sind besonders von der Infektion mit *Botrytis cinerea* gefährdet (Baus *et al.* 2010).

Die Folge dieser Ereignisse sind eine höhere Population von wilden Hefen, Schimmelpilzen und Bakterien auf den Trauben, die wichtige Nährstoffe konsumieren und durch ihre Stoffwechselprodukte zur Qualitätsminderung der Trauben führen. Minderwertige Mostqualitäten, die durch *Botrytis cinerea* oder Essigfäule verursacht werden, weisen oft einen erhöhten Gehalt an Gluconsäure, Glycerin und flüchtiger Säure auf (Jörger *et al.* 2010, Schildberger *et al.* 2011). Abbildung 1 und Tabelle 1 veranschaulichen, wie unterschiedlich das Aussehen und die analytische Qualität von Trauben bzw. Most aus früher Lese, später Lese und aus Lese bei Infektion mit *Botrytis cinerea* ausfallen können. Typische analytische Eigenschaften unterschiedlicher Mostqualitäten sind Tabelle 1 zu entnehmen. Der Gehalt an Aminosäuren, der in gesunden Mosten etwa 2500 mg L⁻¹ beträgt, kann durch die *Botrytis* Infektion der Trauben um bis zu 40 % reduziert werden (Dittrich & Großmann, 2005). Andererseits führen lange Phasen mit Trockenheit (vgl. Jahrgang 2003) zu Wassermangel und einer Störung der Assimilation, wodurch die Einlagerung wichtiger Inhaltsstoffe (z.B. Saccharose und Aminosäuren) in die Trauben gemindert wird. Außerdem weisen diese Trauben oft einen niedrigen pH-Wert auf und bergen somit ein erhöhtes mikrobiologisches Risiko. Die Auswirkungen von weinbaulichen Stressfaktoren auf den Wein werden aktuell in zahlreichen Geisenheimer Forschungsarbeiten untersucht (Linsenmeier 2007, Linsenmeier & Pflieginger 2009, Linsenmeier *et al.* 2010, Hofmann & Schultz 2011). Die jährliche Variabilität der natürlichen Stickstoffversorgung bei Riesling für die Jahrgänge 2002 bis 2007 in Geisenheimer Weinbergslagen ist in Abbildung 2 zu sehen. Laut Löhnertz & Prior (1995) liegt eine mögliche Ursache für nährstoffarme Moste in der allgemein verringerten Stickstoffdüngung im Weinberg. Aber auch hohe Erträge und Stressfaktoren wie UV-Strahlung und Wassermangel könnten eine Verringerung des hefeverwertbaren Stickstoffes in Trauben und Most auslösen. Gleichfalls führt eine zu früh durchgeführte Lese zu einem zu geringen Gehalt an hefeverfügbarem Stickstoff in den Trauben, da dieser erst in der späten Reifephase bei Einsetzen der Blattwelke verstärkt in die Trauben eingelagert wird. Bei Geisenheimer Versuchen an der



Abbildung 1: Optischer Zustand von Trauben mit unterschiedlichem Reife- und Gesundheitszustand.

Bild A: Trauben bei früherer Lese in unreifem Zustand; Bild B: gesunde Trauben bei späterer Lese ohne Pilzinfektionen; Bild C: Trauben mit Infektion durch *Botrytis cinerea*.

Tabelle 1: Analysenwerte von Rieslingmost der Forschungsanstalt Geisenheim, gewonnen aus Trauben mit unterschiedlichem Reife- und Gesundheitszustand.

Substanz	Frühe Lese Jahrgang 2007	Späte Lese (Auslese) Jahrgang 2007	<i>Botrytis</i> -infizierte Trauben Jahrgang 2006
Reduzierende Zucker [g L ⁻¹]	184	210	248
Potentieller Alkohol [g L ⁻¹] / %vol.	86 / 10,9	98 / 12,35	116 / 17,7
Glu/Fru Verhältnis	n.a.	0,94	0,88
Gesamtsäure [g L ⁻¹]	11,5	7,5	10,6
pH-Wert	2,9	3,3	3,1
Glycerin [g L ⁻¹]	n.n.	0,1	6,9
Gluconsäure [g L ⁻¹]	2,1	1,4	3,7
Flüchtige Säure [g L ⁻¹]	0,1	0,2	0,4
Ethanol [g L ⁻¹]	0,6	1,7	2,4
Summe Aminosäuren [mg L ⁻¹]	521	1708	7

Rebsorte Riesling konnte eine Zunahme des Gesamtaminosäure-N-Gehaltes um fast 90 % zwischen 75° Oe und 80° Oe (Zeitspanne 13 Tage) beobachtet werden. Darüber hinaus ist der Stickstoffgehalt in den Trauben auch abhängig von der Düngung des Weinberges während der gesamten Vegetationsperiode (Prior 1997, Linsenmeier *et al.* 2008, Muskat *et al.* 2011). Sturm (2009) untersuchte die Gehalte an hefeverfügbarem Stickstoff im Most (NOPA) der 10 wichtigsten deutschen Rebsorten mittels FTIR Spektroskopie und ermittelte signifikante Unterschiede zwischen den Rebsorten einerseits und dem Gesundheitszustand der Trauben andererseits. Fäulnis führte bei den untersuchten Mosten zu einem NOPA Rückgang von durchschnittlich 23 %. Der durchschnittliche NOPA Wert der Sorte Riesling lag bei 112 mg L⁻¹ N, bei den Burgundersorten bei 182-254 mg L⁻¹ N.

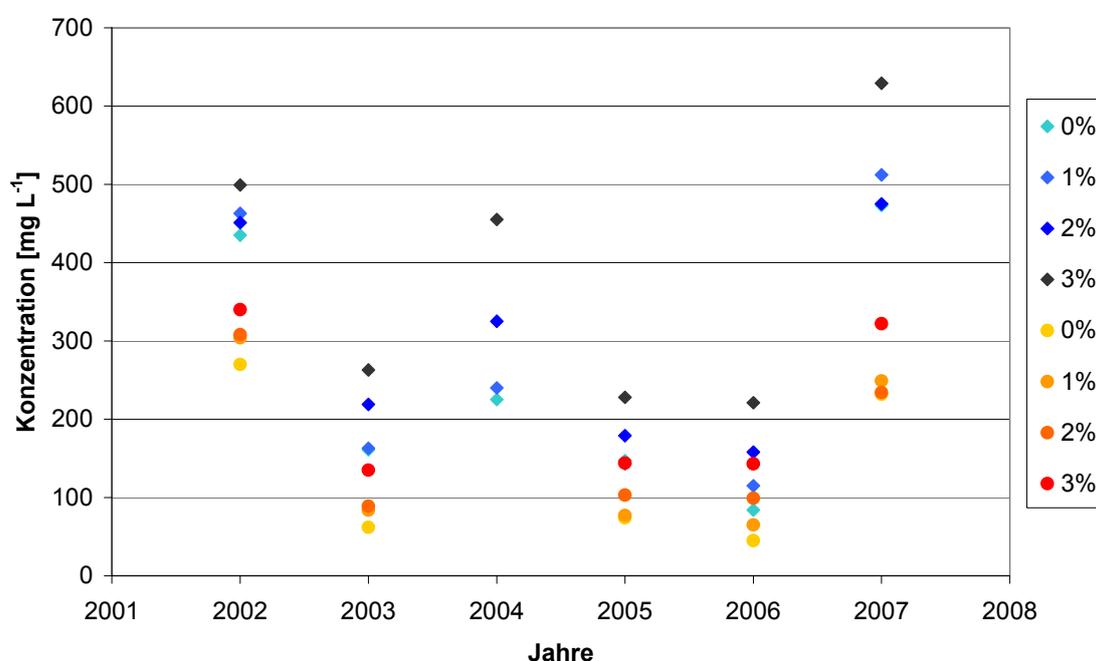


Abbildung 2: Variabilität der natürlichen Stickstoffversorgung im Most der Sorte Riesling (Jahrgang 2002 bis 2007) aus Geisenheimer Weinberglagen.

Blau gefärbte Datenpunkte zeigen den Gehalt Gesamt-N (mg L⁻¹) im Most; orange gefärbte Datenpunkte zeigen den Gehalt Aminosäure-N (mg L⁻¹) im Most. Durchschnittsprobe aus Most der jeweiligen Applikationsvariante (n=4). Die Prozentsätze beschreiben die Konzentration der Harnstofflösung als Blattapplikationen im Weinberg bei der Sorte Riesling. Quelle: modifiziert nach Muskat *et al.* (2011).

Um bei der Weinlese über die weiterführenden kellertechnischen und mikrobiologischen Maßnahmen zu entscheiden, sind die folgenden Qualitätsparameter des Lesegutes bzw. des Mostes von höchster Bedeutung: Phytosanitärer Zustand, Zuckergehalt, Säuregehalt, pH-Wert, Nährstoffgehalt (hefeverfügbarer Stickstoff,

Mineralstoffe, Vitamine) und evtl. Anwesenheit von Hemmstoffen wie Fungiziden. Entsprechend dieser Daten können Oenologen unterschiedliche Strategien zur Optimierung der alkoholischen Gärung und der Qualität des Weines einleiten. Wenn der Hefe bei der alkoholischen Gärung nur unzureichende Nährstoffmengen zur Verfügung stehen oder sie gewissen Stressfaktoren ausgesetzt ist, kann es zu Gärstörungen und Gärstockungen kommen (Salmon 1996, Bisson & Butzke 2000). Gärstörungen sind heutzutage keine Seltenheit in der Weinbereitung und die Folgen können vielfältig sein. Neben einem hohen Restzuckeranteil im Wein können sich auch Fehltonen entwickeln, die den Wein ungenießbar machen oder die Sortentypizität verfälschen. Bei den Weinproduzenten können somit hohe Kosten für Behandlungsmaßnahmen und hohe Verluste durch die Qualitätsminderung des Weines auftreten.

Um dem Nährstoffmangel im Most entgegenzuwirken sind in der Europäischen Union Nährstoffzusätze bei der Weinbereitung erlaubt. Die Zugabe von Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP) bzw. Diammoniumsulfat wird aktuell durch Verordnung (EG) 606/2009 geregelt und beläuft sich auf 100 g hL^{-1} . Außerdem regelt die Verordnung die Zugabe von Thiamin bis zu einer Menge von $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ und die Zugabe von Hefezellwandzubereitungen bis maximal 40 g hL^{-1} . Trotz dieser Zugaben kann es aber zu Gärproblemen und der Entwicklung von Fehleraromen kommen. Hohe Ammoniumgaben zu Beginn der Gärung führen zu einer Erhöhung der Zellzahl und der Biomasse. Die Nährstoffe reichen jedoch oft nicht mehr für spätere Phasen der Gärung aus. Besonders in der Endgärungsphase kann es zu einem erneuten Nährstoffmangel kommen. Dies ist ein Grund dafür, dass trotz Nährstoffgaben Gärstörungen oder Fehleraromen während der alkoholischen Gärung zu beobachten sind (Rauhut & Kürbel, 1994). Da bei einem Mangel an hefeverwertbarem Stickstoff meistens auch andere Nährstoffe im Defizit sind, ist es oftmals sinnvoll Kombinationsprodukte zu verwenden, um eine ausgewogene Nährstoffversorgung sicher zu stellen. Besonders im außereuropäischen, aber auch im europäischen Raum sind aus diesem Grund Hefenährstoffpräparate auf dem Markt, die auf inaktiven Hefezellen basieren und eine umfassende Nährstoffversorgung darstellen. Bereits im Herstellungsprozess dieser Produkte können die Hefen durch die Vermehrung auf nährstoffangereicherten Medien mit Mikronährstoffen (Mineralien, Spurenelemente, Vitamine) versorgt werden. Nach Inaktivierung dieser Hefen können sie als Hefenährstoff dienen und wichtige Mikroelemente wie z.B. Magnesium, Zink und Calcium liefern, die eine wichtige Rolle während der alkoholischen Gärung übernehmen (Ciesarova *et al.* 1996, Birch *et al.*

2003). Die Versuche in dieser Arbeit wurden in den Jahren 2004 bis 2009 durchgeführt. Der verwendete Most unterlag also den natürlichen Qualitätsschwankungen der entsprechenden Jahre.

1.2 Zielsetzung dieser Arbeit

In Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Themenbereiche bearbeitet, die in Abbildung 15 schematisch dargestellt werden. Der erste Themenbereich „Nährstoffversorgung der Hefe und Aromabildung“ untersucht die Bildung von Aromastoffen in Abhängigkeit von verschiedenen Hefenährstoffen und verschiedenen Reinzuchthefestämmen. Dabei kommen zugelassene und nicht zugelassene Nährstoffkomponenten zum Einsatz, die hinsichtlich ihres Potentials zur Verbesserung der alkoholischen Gärung und bezüglich ihres Einflusses auf die Aromastoffbildung untersucht werden. Eine zentrale Fragestellung ist somit: *Wie beeinflussen Reinzuchthefen und Hefenährstoffe die Aromabildung während der Gärung ?*

Der zweite Themenbereich analysiert „schwefelhaltige Metabolite“ der Hefe unter oenologischen Gesichtspunkten. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Einflussnahme der verschiedenen S-haltigen Substanzen im Gärsubstrat auf die Bildung sekundärer S-haltiger Metabolite im Wein. Neben elementarem Schwefel (Netzschwefel aus dem Pflanzenschutz) und Sulfat wird der Einfluss von S-haltigen Aminosäuren auf die Bildung flüchtiger und nicht-flüchtiger Schwefelverbindungen durch die Hefe untersucht. Aber auch Untersuchungen zur Bildung von schwefeliger Säure durch die Hefe stellen einen wichtigen Inhalt dar, da seit dem 1. August 2012 die gesetzlich erlaubten Grenzwerte für Gesamt-SO₂ im biologisch zertifizierten Wein um bis zu 30 % reduziert wurden. Diese Reduzierung ist eingebunden in die neuen Durchführungsbestimmungen für Biowein (Verordnung (EG) Nr. 203/2012), die Arbeiten behandeln somit ein hoch aktuelles Thema. Die zentrale Fragestellung des zweiten Themenbereiches ist somit: *Welche Faktoren der Mostzusammensetzung beeinflussen die Bildung schwefelhaltiger Metabolite ?*

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Der Mikroorganismus Weinhefe gehört zur Gattung *Saccharomyces* und der Art *cerevisiae*. Sie stellt in der modernen Weinbereitung den meist genutzten Mikroorganismus dar, der für den zentralen Vorgang der alkoholischen Gärung verantwortlich ist. Neben der zentralen Rolle der Alkoholbildung und Aromabildung können Hefezellen aber auch vielfältige andere Funktionen übernehmen, die zur Prägung der Zusammensetzung des Weines beitragen. Caridi (2007) gibt dazu einen detaillierten Überblick, wie die Hefezellwände durch parietale Adsorption die Interaktion mit Weinkomponenten beeinflussen. Die Autoren berichten, dass so z.B. Ochratoxin A, phenolische Substanzen oder Antocyane adsorbiert werden können. Desweiteren können auch verschiedene Mannoproteine oder Polysaccharide aus der Hefezelle freigesetzt werden. Die Einflussnahme der Hefe auf den Charakter des Weines ist also aufgrund der verschiedenen biochemischen und physikalischen Eigenschaften der Hefe sehr vielfältig. Aktive Trockenreinzuchthefer ist seit den 1970er Jahren (Görtges 1976) verfügbar und wird heute großtechnisch in Fermentern hergestellt (Kreuz 1995). Neben konventioneller Trockenhefe sind seit 2008 auch biozertifizierte Hefestämme auf dem Markt, die nach einem modifizierten Herstellungsprozess produziert werden (Werner *et al.* 2011). Schätzungen gehen davon aus, dass weltweit über 200 verschiedene kommerzielle Reinzuchthefestämme vertrieben werden (Cheraiti *et al.* 2010).

2.1.1 Morphologie und Speicherfunktionen in der Zelle

Die Morphologie der Zellen ist typischerweise rundlich bis oval mit einer Größe von 5-10 x 5-12 µm. Die Sprossung ist multilateral, d.h. sie kann an jeder Stelle der Zelloberfläche erfolgen. Die meisten Zellen liegen im gärenden Most als Einzelzelle oder Zellpaare vor (Dittrich 2005).

Der Aufbau der Hefezellwand ist mehrschichtig und strukturiert mit einer Dicke von 100-300 nm. Die innere Abgrenzung zum Cytoplasma bildet die Plasmamembran mit einer Schichtdicke von 6-30 nm. Unter stoffwechselphysiologischer Sicht gehört die Zellwand zum extrazellulären Raum der Hefezelle. Die äußere Zellwand besteht aus Polysacchariden, so z.B. aus Phosphomannan, das das Flockungsvermögen der Zellen beeinflusst. Zwischen der äußeren Phosphomannanschicht und der inneren Glucanschicht sind Proteinmoleküle eingebettet. Es handelt sich dabei um Struktur-

und Enzymproteine. Diese externen Enzyme der *Saccharomyces* Hefen haben verschiedene Stoffwechselfunktionen.

Die innere Hefeglucanschicht besteht hauptsächlich aus einem β -1,3 Glucan mit einigen β -1,6-glycosidischen Bindungen. Die Plasmamembran ist eine fluide Doppelschicht aus Lipiden und bildet die eigentliche Trennung zwischen dem Zellinneren und dem Außenmedium. Die Plasmamembran bestimmt mit ihren Transportproteinen den selektiven Durchtritt von Nährstoffen, die Ausscheidung von Abbauprodukten, die Osmoregulation und den allgemeinen aktiven Stofftransport. Diese substratspezifischen Transportproteine können feinste Poren ausbilden und ihre Gestalt ändern und bewegen so die Teilchen von der äußeren Membran in das Innere der Zelle (Baurhuber & Knull 1989). Größere Stoffe, besonders hydrophile Stoffe wie Zucker und Ionen, können nur auf diese Weise durch die Lipiddoppelschicht hindurch treten.

Die Vakuole in der Hefezelle ist ein intrazellulärer Raum, der durch Membranen vom Cytoplasma abgegrenzt ist. Die Form und die Größe der Vakuole können sich während der Entwicklung der Zelle verändern. In ihr sind zahlreiche Proteasen, wie z.B. Carboxypeptidase Y, Protease A und B und einige Hydrolasen zu finden (Huber-Wälchli & Wiemken 1979). Die Autoren betonen, dass viele dieser Enzyme ausschließlich in der Vakuole und nicht im Cytoplasma zu finden sind. Neben der Funktion als Reaktionsraum für Enzyme ist die Vakuole auch Speicherraum für Metabolite. Die Hefe ist in der Lage, Aminosäuren in der Vakuole zu speichern. Somit kann die Konzentration der Aminosäuren im Cytoplasmaraum der Zelle für metabolische Zwecke niedrig gehalten werden, während die Gesamtmenge in der Zelle weit über dem Bedarf einer neu zu bildenden Zelle liegt (Cooper 1982, Messenguy 1987). Nach Wiemken & Dürr (1974) beträgt die Konzentration der Aminosäuren im Cytoplasma von *Saccharomyces cerevisiae* nur 0,2 M, währenddessen sie in der Vakuole fünf mal höher liegt (0,975 M). Dies bedeutet, dass etwa 60 % des in den Spheroplasten der Zelle enthaltenen Aminosäure Pools in den Vakuolen zu finden ist. In der Vakuole befinden sich demnach die basischen Aminosäuren Lysin und Ornithin, in besonders hoher Konzentration sind Arginin, Glutamin und Citrullin zu finden. Glutaminsäure, als zentrale Aminosäure im Stickstoffmetabolismus, konnte in den Versuchen besonders im Cytoplasma identifiziert werden. In einer späteren Arbeit beschreiben Huber-Wälchli & Wiemken (1979), dass sich in der Vakuolenmembran ein höherer Gehalt an Phospholipiden und ungesättigten Fettsäuren, aber ein niedrigerer Gehalt an Sterolen befindet, wodurch die höhere Elastizität der Vakuolenmembran im

Vergleich zur Plasmamembran erklärt werden kann. Die Zellkompartimente dienen dazu, die Stoffwechsellzyme von ihrem Substrat zu trennen, um einen besseren Ablauf der Stoffwechselvorgänge zu gewährleisten. Die Vakuole dient der Hefezelle dabei als Speicher für den verfügbaren Stickstoff. Ein wichtiger Faktor ist dabei das proteolytische System der Vakuole. Es baut Proteine, die vom Cytoplasma in die Vakuole geschleust werden, in Aminosäuren ab (Wiemken & Dürr 1974). Wenn die N-Verbindungen gebraucht werden, werden sie in geregelter Menge von der Vakuole in das Cytoplasma freigelassen. Die Strategie der Hefe unterscheidet sich dabei von anderen Mikroorganismen, die nur soviel aufnehmen, wie nötig. Die schwierigen Bedingungen während der alkoholischen Gärung (steigender Ethanolgehalt, Stickstoffarmut im Gärsubstrat) verlangen dieses jedoch (Watson 1976). Die Vakuolen erfüllen auch bei der Zellautolyse eine wichtige Funktion. Sie verursachen durch Freilassen von Hydrolasen (Proteasen) das Abbauen der Zellbestandteile. Dies ist besonders dann der Fall wenn mechanische, thermische oder osmotische Belastungen auf die Hefezellen wirken. Die Autolyse tritt besonders bei alten Zellen mit großen Vakuolen auf.

2.1.2 Entwicklung der Hefepopulation

Die Höhe der Beimpfung mit Hefezellen beeinflusst sowohl die weitere Entwicklung der Population, als auch den Verlauf der alkoholischen Gärung. Bei einer Population von unter $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Milliliter unterliegt die Wachstumsrate deutlichen Schwankungen.

Bei dieser geringen Beimpfung bleiben die Tochterzellen sehr klein und erreichen nicht die Größe der Mutterzellen. Bei $10^5 - 10^6$ Zellen pro Milliliter sind die Wachstumsraten relativ stabil (Kockova-Kratochvilova 1990).

Die Internationale Organisation für Rebe und Wein (OIV) empfiehlt eine Lebendzellzahl für Trockenreinzuchthefen von mindestens 1×10^{10} KBE pro Gramm Trockenreinzuchthefer (Resolution OIV/OENO 329/2009). Bei einer Beimpfung von 20 g hl^{-1} entspricht dies einer Lebendzellzahl von 2×10^6 KBE pro Milliliter im beimpften Most. Wie in Abbildung 3 dargestellt, müssen sich in der anfänglichen latenten Phase (A) die beimpften Zellen erst an das neue Medium adaptieren und Nährstoffe aufnehmen. In dieser Phase kann die Lebendzellzahl zunächst etwas sinken. Anschließend steigt die Biomasse wieder an, da sich die Hefezellen durch Zellteilung vermehren. Je mehr das Gärmedium vom Optimum entfernt ist, desto länger dauert die anfängliche latente Phase.

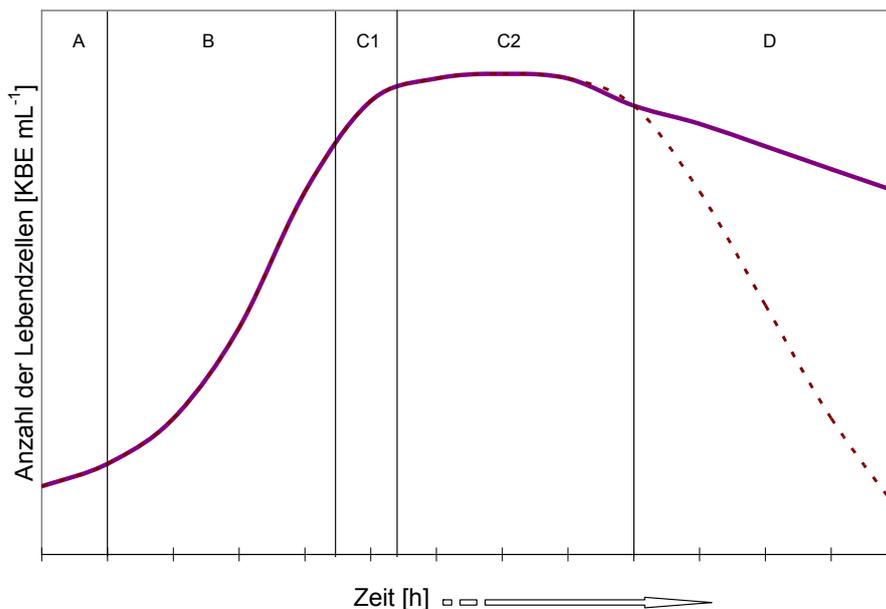


Abbildung 3: Modell der Populationsdynamik der Hefezellen.

Phase A: in der latenten Phase adaptieren sich die Zellen an das neue Medium; Phase B: exponentielle Phase mit höchster Vermehrungsrate; Phase C: die Zellteilung wird eingestellt und die stationäre Phase beginnt. Die Zellen beginnen Stoffwechsel zu betreiben (C2). Phase D: Absterbephase der Zellen. Quelle: modifiziert nach (Kockova-Kratochvilova 1990)

So verlängert auch eine Mostschwefelung bei der Weinherstellung diese Phase. Die exponentielle Phase (B) wird gekennzeichnet durch die höchste Vermehrungsrate in der Wachstumskurve. Hefezellen vermehren sich vorwiegend durch ungeschlechtliche (vegetative) Vermehrung durch multilaterale Zellsprossung mit Zellkernteilung. Die abgeteilten Tochterzellen sind nahezu so groß wie die Mutterzellen. Am Ende der exponentiellen Phase erreicht die Gesamtfläche der permeablen Membran ihr Maximum, wodurch ein Anstieg der Stoffwechselrate zu verzeichnen ist. Der Anteil an toten Zellen ist niedrig, besonders am Ende praktisch Null. Die Zellteilung erreicht bereits in der ersten Hälfte der exponentiellen Phase das Maximum und nimmt im zweiten Teil der exponentiellen Phase wieder ab. Am Ende wird die Zellteilung fast eingestellt.

Wenn die Zellteilung nun zum Erliegen kommt (C1), beginnt die stationäre Phase. Die Zellen nehmen etwas an Größe zu und beginnen Stoffwechsel zu betreiben (C2). Es vollzieht sich die alkoholische Gärung unter anaeroben Bedingungen. Die Absterbephase wird auch als die Phase des negativen Wachstums bezeichnet (D). Die Hefezellen sterben ab, autolysieren und setzen Metabolite in das Medium frei. Die Zellzersetzung (Autolyse) erfolgt durch Enzyme und beschleunigt das negative Wachstum.

2.1.3 Transportmechanismen in die Zelle

Der Stofftransport durch die Hefezelle spielt eine wichtige Rolle als Stoffwechselregulationsmechanismus. Durch die Zellmembran erfolgt eine Trennung des Außenmediums vom Cytoplasma. Intrazellulär erfolgt eine Trennung in verschiedene Zellkompartimente, also Reaktionsräume, die durch Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und Vakuolen dargestellt werden. Diese Reaktionsräume haben Membranen, die selektiv permeabel sind. Nährstoffe und Stoffwechselprodukte werden unter Beteiligung bestimmter Träger (Carrier) durch die lipidartigen Membranen hindurchgeschleust. Das Verhalten dieses Stofftransportes funktioniert nach Art der Michaelis-Menten-Kinetik. Der Nettotransport von außen nach innen ist ein Ergebnis der parallel stattfindenden influx- und efflux- Prozesse. Annemüller *et al.* (2008) beschreiben verschiedene Mechanismen des Stofftransportes durch die Hefezellwand.

2.1.3.1 Einfache Diffusion

Bei der einfachen Diffusion erfolgt der Stofftransport ohne Energieaufwand nur über ein Konzentrationsgefälle. Diese passive Diffusion ist unspezifisch und hängt von der Molekülgröße und den lipophilen Eigenschaften der Stoffe ab. Durch einfache Diffusion werden z.B. Wasser und Sauerstoff aufgenommen. Für Zucker konnten solche Prozesse nicht nachgewiesen werden (Schlegel 1992). Wahrscheinlich erfolgt auch der CO₂-Transport aus der Zelle durch einfache Diffusion.

2.1.3.2 Trägergebundene erleichterte Diffusion

Die erleichterte Diffusion wird von einer Proteinstruktur unterstützt, verbraucht aber keine Energie in Form von ATP. Dieser Vorgang kann dazu dienen, Konzentrationen zwischen dem Inneren und dem Äußeren einer Zelle auszugleichen und folgt der Michaelis-Menten-Kinetik. Die Sättigung der Transportgeschwindigkeit ist bei höheren Außenkonzentrationen substratspezifisch. Die Transportgeschwindigkeit ist höher als bei reiner Diffusion. Die erleichterte Diffusion fördert Stoffe sowohl in die Zelle hinein als auch heraus. Bei der Hefe trifft diese Form des Transports für Saccharose zu. Diese wird vorher durch zelleigene Invertase in der äußeren Zellwand hydrolysiert und anschließend in Form von Monosacchariden (Glucose, Fruktose) in die Zelle transportiert. Die Aufnahme der Glucose durch *S. cerevisiae* wird durch verschiedene Hexosetransporter kontrolliert Ozcan & Johnston (1999), die unterschiedliche Substratspezifitäten haben und unter bestimmten Bedingungen expremiert werden (Reifenberger *et al.* 1997).

2.1.3.3 Aktiver Transport

Der aktive Transport stützt sich auf Transportproteine in der Membran und benötigt Energie (ATP). Er ist somit auch in der Lage, Stoffe entgegen einem Konzentrationsgefälle zu transportieren. Die meisten N-haltigen Komponenten (z.B. Aminosäuren) werden mit dem aktiven Transportsystem aufgenommen und liegen dann in der Zelle in höherer Konzentration vor als außerhalb der Zelle (Bisson 1991). Die dazu erforderlichen Permeasen werden erst bei Bedarf von der Zelle gebildet. Die Permeasen koppeln den Transport eines Aminosäuremoleküls oder Ammoniummoleküls an den Fluss eines Hydrogen - Ions. Die H^+ - Ionen wandern mit dem Konzentrationsgefälle, da die H^+ - Ionen - Konzentration im Most höher ist als im Cytoplasma. Die H^+ - Konzentration in der Zelle darf jedoch nicht zu stark ansteigen, sonst droht eine Versäuerung in der Zelle. Sie werden über die ATPase wieder herausbefördert, wobei gleichzeitig pro H^+ - Ion ein Molekül ATP zu ADP hydrolysiert wird. Dieser Vorgang verbraucht also Energie. Die Aminosäureaufnahme wird durch Ethanol stark gehemmt (Ferrerias *et al.* 1989).

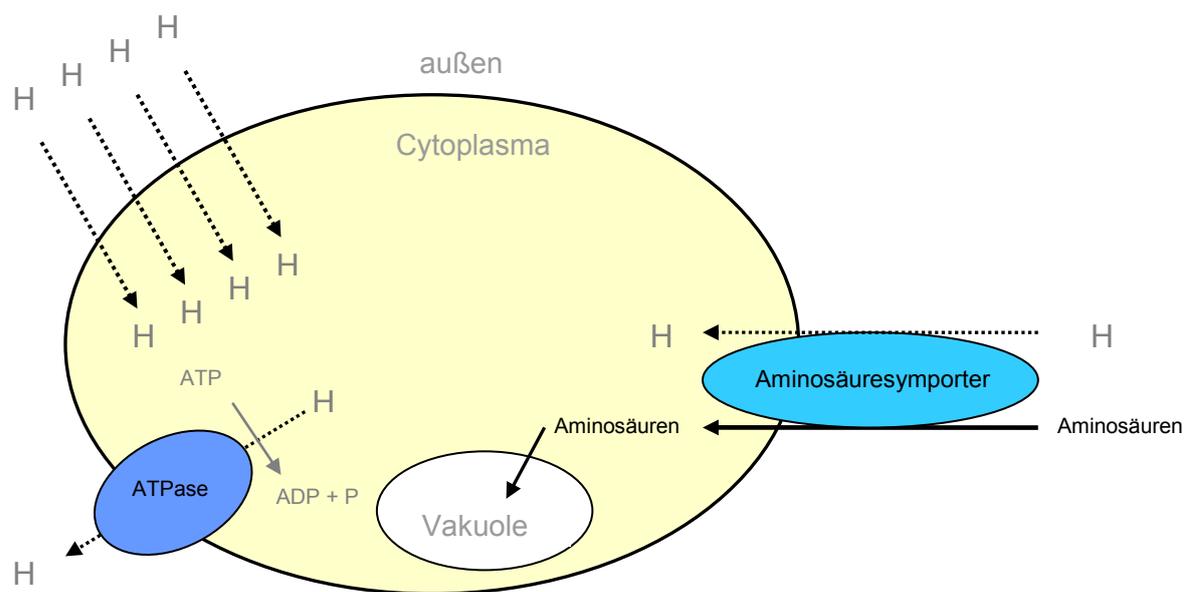


Abbildung 4: Aktiver Transport in die Zelle bei hoher Alkoholkonzentration

Der Transport eines Aminosäuremoleküls oder Ammoniummoleküls ist an den Fluss eines H^+ - Ions gekoppelt. Quelle: modifiziert nach Bisson (1991)

Ethanol erhöht den passiven Fluss der H^+ - Ionen in die Zelle. Die Zelle kann diese H^+ - Ionen zwar über die ATPase wieder herausbringen, sie fährt den H^+ - Ionen gekoppelten Transportmechanismus aber herunter, um eine H^+ Überkonzentration in der Zelle zu

verhindern. Je höher der Alkoholgehalt ist, desto niedriger ist die Aminosäureaufnahme (Bisson 1991).

2.1.3.4 Aufnahme von Aminosäuren

Die Hefezelle nimmt Aminosäuren durch verschiedene Membranproteine auf, wobei hauptsächlich zwei Wege unterschieden werden. Ein erster Weg ist der Transport durch die Allgemeine Aminosäure Permease (GAP), die Aminosäuren unspezifisch aufnimmt (Grenson 1992). Sie wird jedoch durch die Anwesenheit von Ammonium-Ionen gehemmt (Hess *et al.* 2006). Somit ist die GAP nur während der zweiten Hälfte der Gärung aktiv, wenn der Most kein freies Ammonium mehr enthält.

Der zweiten Weg, den *Saccharomyces cerevisiae* beschreitet, erfolgt über zahlreiche spezifische Aminosäure Permeasen (Garrett 2008). Jede einzelne Permease ist in der Lage, eine ganz bestimmte Einzelaminosäure oder eine ganz bestimmte Gruppe von Aminosäuren zu transportieren. Diese Permeasen können nicht durch Ammonium gehemmt werden. Sie ermöglichen es der Hefe, während der latenten Phase und bei Beginn der Gärung Aminosäuren aus dem Most aufzunehmen.

Nicht nur Glutamin und Arginin werden schnell aufgenommen. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Hefen eine Mischung aus verschiedenen Aminosäuren aufnehmen. Darunter sind z.B. auch Alanin, Asparagin, Cystein, Histidin und Leucin. Aminosäuren, die sich den gleichen Transporter teilen, stehen gegeneinander im Wettbewerb. Dieser Wettbewerb resultiert aus der begrenzten Aufnahme bestimmter Verbindungen, sorgt aber für eine ausgewogene Mischung der Aminosäuren. Man nennt dieses Phänomen die „trans-inhibition“. Meistens ist Arginin in der höchsten Konzentration im Most enthalten. Prolin kann unter anaeroben Bedingungen nicht von der Hefe verstoffwechselt werden und wird auch nicht aufgenommen (Ribereau-Gayon *et al.* 1999). Die Aufnahme des größten Teils der Aminosäuren ist bereits beendet, wenn die ersten 30 g Zucker vergoren sind. Die Strategie der Hefen ist es, die Aminosäuren aufzunehmen, wenn Energie vorhanden ist, der Ethanolgehalt aber noch gering ist. Die Aminosäuren werden anfangs in der Vakuole gespeichert und erst dann verstoffwechselt, wenn sie gebraucht werden (Wiemken & Dürr 1974). Insgesamt werden von der Hefe 1 bis 2 g L⁻¹ Aminosäuren metabolisiert (Watson 1976).

2.2 Grundsätze der alkoholischen Gärung

Die alkoholische Gärung nimmt die zentrale Position in der Weinbereitung ein und ist maßgebend für die Qualität eines Weines. Neben den Hauptprodukten Alkohol und CO₂ werden noch zahlreiche Nebenprodukte produziert.

2.2.1 Endprodukte

Bei der Weinbereitung vollzieht die Hefe unter anaeroben Bedingungen die alkoholische Gärung. Beim Kohlenhydratabbau laufen in der Hefezelle bis zum Pyruvat die gleichen Reaktionen ab wie bei der Glykolyse. Das Pyruvat wird jedoch noch weiter zu Acetaldehyd decarboxyliert und schließlich zu Ethanol reduziert. Die Details können zahlreichen Quellen entnommen werden (Karlson 1989, Dittrich & Großmann 2005). Als Endprodukt der alkoholischen Gärung entstehen aus jedem Molekül Glucose bzw. Fructose zwei Moleküle Ethanol und zwei Moleküle CO₂ (Abb. 5). Die theoretische Ausbeute bei der alkoholischen Gärung liegt bei 51,1 % Ethanol und 48,9 % CO₂. Die praktische Ausbeute liegt jedoch darunter, bei ca. 47 % (Dittrich 1987).

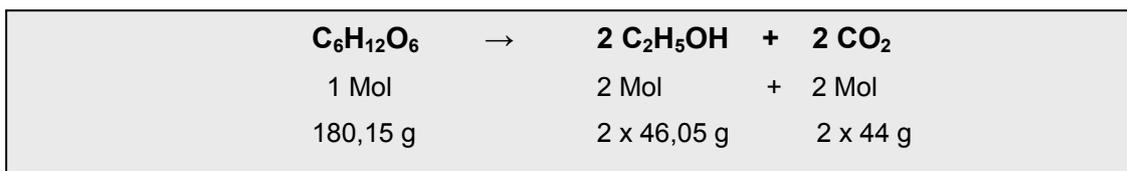


Abbildung 5: Summenformel der alkoholischen Gärung.

2.2.2 Nebenprodukte

Ethanol und Kohlenstoffdioxid stellen stoffwechselphysiologisch die Hauptprodukte der Gärung dar. Weine enthalten somit je nach Zuckergehalt des Mostes einen Alkoholgehalt von bis zu 16 %vol, während das Kohlenstoffdioxid zum kleinen Teil im Wein gelöst wird, hauptsächlich aber in die Umgebung entweicht. Im Folgenden sind sekundäre Metabolite beschrieben, die in geringerer Konzentration vorliegen, aber einen wichtigen Beitrag zu den Eigenschaften des Weines beitragen.

2.2.2.1 Bindungspartner von SO₂

Während der alkoholischen Gärung werden durch die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verschiedene Bindungspartner für schwefelige Säure (H₂SO₃) gebildet. Die Hauptsubstanzen sind Acetaldehyd, Pyruvat und α-Ketoglutarat (Weeks 1969). Weine mit einem hohen Gehalt an Bindungspartnern benötigen eine hohe Gabe an Gesamt-SO₂, um eine gewisse Konzentration an freier SO₂ zu erreichen. Die eigentliche

Schutzfunktion für den Wein kann nur durch die freie SO_2 gegeben werden, da nur sie die antimikrobiologischen, antienzymatischen und antioxidativen Eigenschaften besitzt. Eine Graphik zum typischen Konzentrationsverlauf dieser drei Bindungspartner ist Dittrich & Großmann (2005) auf Seite 47 zu entnehmen.

2.2.2.1.1 Acetaldehyd

Biochemisch betrachtet ist Acetaldehyd (Ethanal) die Vorstufe des Ethanols. In Bezug auf die alkoholische Gärung hat es einen Einfluss auf die Alkoholproduktion, die Stabilität des Weines und die Toxizität. Es wird typischerweise am Anfang der Gärung gebildet und diffundiert aus der Hefezelle heraus (Cheraiti *et al.* 2010). Mit fortschreitender Gärung wird es von den Hefezellen wieder aufgenommen und abgebaut (Dittrich & Großmann 2005). Bei einer abgestoppten Gärung ist die Ethanal-Konzentration deshalb relativ hoch. Auch bei Spontangärungen ist die Konzentration höher als bei der Vergärung mit Reinzuchthefer. Acetaldehyd ist einerseits sehr reaktionsfreudig, andererseits im Wein schon bei geringer Konzentration riechbar und schmeckbar. Ein wichtiger Bindungspartner ist die schwefelige Säure (H_2SO_3). Um den Gehalt an schwefeliger Säure im Wein niedrig zu halten, sollte die Gärführung einen niedrigen Acetaldehyd-Gehalt zum Ziel haben. Jackowetz *et al.* (2011) untersuchten die Kinetik der Acetaldehydbildung während der alkoholischen Gärung und stellten eine direkte Korrelation zu bestimmten Parametern fest. Während das Grundmuster der Acetaldehydbildung in allen Vergärungen gleich war, unterschieden sich die Varianten im Wert des anfänglichen Höchstwertes ($62 - 119 \text{ mg L}^{-1}$) und der Endkonzentration nach 15 Tagen ($22 - 49 \text{ mg L}^{-1}$) wesentlich. Die Faktoren SO_2 -Zugabe, Rebsorte und Nährstoffzugabe korrelierten positiv mit der Maximalkonzentration am Anfang der Gärung. Die Faktoren SO_2 -Zugabe, Rebsorte und Temperatur korrelierten positiv mit der Höhe der Endkonzentration am Ende der Gärung. Die Autoren konnten eine Zunahme der Acetaldehydkonzentration um $366 \mu\text{g}$ je Milligramm SO_2 -Zugabe feststellen. Verschiedene Autoren beschäftigen sich auch mit der Tatsache, dass Acetaldehyd als toxisch einzustufen ist (Koji 2000, O'Brien *et al.* 2005). Die Reduzierung dieser Substanz durch eine gute Gärführung ist also eine wichtige Zielsetzung der modernen Oenologie.

2.2.2.1.2 Pyruvat

Pyruvat kommt, wie auch Acetaldehyd, besonders in der Angärphase in größeren Mengen im Most vor. Es ist ebenfalls ein H_2SO_3 Bindungspartner. Eine Erhöhung des Pyruvat-Gehaltes während der Gärung wird in erster Linie durch Befall des Lesegutes

mit dem Schimmelpilz *Botrytis cinerea* oder durch Erhitzen des Mostes hervorgerufen. Der Grund liegt darin, dass Thiamin im Most durch *Botrytis cinerea* oder Erhitzung abgereichert wird und es anschließend als Coenzym des Pyruvat und Ketoglutarat decarboxylierenden Enzyms fehlt (Dittrich 1983, Würdig & Woller 1989). In der Folge liegt Pyruvat am Ende der Gärung in erhöhten Mengen vor.

2.2.2.1.3 α -Ketoglutarat

Dieser Hefemetabolit ist neben Pyruvat und Acetaldehyd an der Bindung von schwefliger Säure beteiligt. α -Ketoglutarat liegt bereits im Most in geringer Konzentration vor, der Gehalt nimmt jedoch während der Gärung noch leicht zu. Eine erhöhte Bildung des α -Ketoglutarat ist bei der Verarbeitung von *Botrytis*-infiziertem Lesegut und bei stark zuckerhaltigen Mosten zu finden.

Tabelle 2: Durchschnittlicher Gehalt der SO₂-bindenden Stoffwechselprodukte im Wein

Quelle: Würdig & Woller (1989) S. 200

Substanz:	Durchschnitt	Minimum	Maximum
Acetaldehyd (mg L ⁻¹)	50	11	152
Pyruvat (mg L ⁻¹)	27	0	152
α -Ketoglutarat (mg L ⁻¹)	48	7	147

2.2.2.2 Glycerin

Der dreiwertige Alkohol Glycerin wird bei jeder Gärung gebildet. Im Durchschnitt beträgt die Menge 8 % vom entstandenen Alkohol. Glycerin wird durch Hydrierung des Gärungszwischenproduktes Dihydroxyacetonphosphat gebildet. Die Glycerinbildung wird durch eine hohe Gärtemperatur, aber auch durch eine hohe Zuckerkonzentration gefördert. Bei der Vergärung mit Reinzuchthefer wird weniger Glycerin gebildet als bei Spontangärungen, da die in Spontangärungen oft aktive Hefe *Zygosaccharomyces rouxii* eine hohe Glycerinbildung aufweist (Würdig & Woller 1989).

Es erfüllt verschiedene Funktionen für die Hefe. Einerseits dient es als Vorstufe für die Biosynthese der Phospholipide. Diese sind Bestandteil der Zellmembranen und somit wichtig für das Hefewachstum. Außerdem hilft Glycerin das Redox-Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. Dies ist nötig für die Energielieferung durch ATP. Außerdem schützt Glycerin die Hefen vor hohem osmotischem Stress, der durch hohe Zuckerkonzentrationen hervorgerufen wird (Swiegers *et al.* 2005).

2.2.2.3 Sulfit

Die Weinhefen sind in der Lage, während der alkoholischen Gärung schwefelige Säure (H_2SO_3) zu bilden, das am Ende der Gärung als Gesamt- SO_2 vorliegt. Detaillierte Erläuterungen sind Kapitel 2.4.2 (Sulfitbildung durch die Hefe) zu entnehmen.

2.2.3 Hemmungs- und Stressfaktoren

Die Hefezelle ist besonders während der alkoholischen Gärung vielfältigen Stressfaktoren ausgesetzt (Nährstoffmangel, Alkoholgehalt, Schwefelung, pH-Wert, Temperatur, etc.). Jedoch auch schon vor der Gärung kann die Hefe durch eine hohe Gabe an Sulfit gehemmt werden. Im Folgenden werden die wichtigsten Aspekte beschrieben.

2.2.3.1 Schwefelige Säure

Die Maische- oder Mostschwefelung in einer Höhe von 30-50 mg L^{-1} ist ein gängiges Verfahren, um frühzeitig die Aktivität von oxidierenden Enzymen (Polyphenoloxidasen), die das Braunwerden des Mostes verursachen und außerdem die Aktivität von unerwünschten Mikroorganismen zu unterdrücken. Die Höhe einer möglichen Maische- bzw. Mostschwefelung bestimmt maßgeblich den Zeitpunkt des Gärbeginns. Der Schwefel diffundiert in seiner molekularen Form in die Hefezelle ein und wirkt bereits wenige Minuten nach der Zugabe. Abhängig vom pH-Wert und der Sensibilität des Hefestammes kommt es zu einer Verzögerung des Gärbeginns, wobei der Gärverlauf selbst nicht negativ beeinflusst wird (Dittrich 2005). Nur die molekular vorliegende Form der schwefeligen Säure ist dabei entscheidend, die Gesamtmenge SO_2 ist bei der Inaktivierung der Hefezelle von untergeordneter Bedeutung. Bei der Gärung mit Reinzuchthefer kann durch die Schwefelung die Vermehrung von Nicht-Saccharomyceten verhindert werden, da diese im Vergleich zu Saccharomyceten empfindlicher gegenüber SO_2 sind. Durch das SO_2 , das in die Hefezellen eindringen kann, wird die Vermehrung der Hefe gehemmt, da es im Zellinneren zur Hemmung von Enzymaktivitäten kommt. Pilkington & Rose (1988) haben einen Einfluss auf den pH-Wert im Cytoplasma festgestellt. Außerdem berichten die Autoren, dass die Hemmung des Zellwachstums mit einer Bildung von Acetaldehyd und Glycerin einherging.

Zur Konservierung von Lebensmitteln ist Schwefel ein weitverbreitetes Additiv. Laut Zusatzstoff- Zulassungsverordnung (ZZuV) ist es unter Beachtung bestimmter Höchstgrenzen für eine Vielzahl von getrockneten Obst-, Gemüse-, Wurst- und Meerestierwaren zulässig. Auch im Wein findet schwefelige Säure (SO_2) weltweit

Einsatz, unterliegt aber gewissen Höchstgrenzen, die je nach Weinart und Restzuckeranteil variieren (siehe Verordnung (EG) Nr. 606/2009 und Verordnung (EG) Nr. 203/2012). Der Vorteil des SO_2 Einsatzes im Wein liegt darin, dass eine Substanz gleichzeitig vier wichtige Funktionen zum Schutz des Weines ausübt. Schwefelige Säure bietet Oxidationsschutz, hat antimikrobielle Wirkung, unterbindet enzymatische Aktivitäten und bindet Gärungsnebenprodukte wie Acetaldehyd, die in freier Form einen negativen sensorischen Einfluss haben. Dennoch gibt es weltweit Bestrebungen, den Zusatz von schwefeliger Säure in Lebensmitteln und Wein zu minimieren.

Die verschiedenen Zustandsformen der schwefeligen Säure in Abhängigkeit vom pH-Wert werden von Würdig & Woller (1989) für die Bedingungen im Wein ausführlich dargestellt. Wenn gasförmige schwefelige Säure in einer wässrigen Lösung gelöst wird, kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen verschiedenen Zustandsformen. Abhängig vom pH-Wert, kann sie als molekulares Schwefeldioxid (SO_2), als Bisulfition (HSO_3^-) oder als Sulfitanion (SO_3^{2-}) vorliegen (Fugelsang & Edwards 2007).

2.2.3.2 Alkohol

Ethanol, das bei der Gärung von der Hefe gebildet wird, beeinflusst die Struktur der Zellmembran und stört die Aufnahme von Zucker und die Assimilation von Stickstoff. Ethanol hemmt die Protonen pumpende ATPase, wodurch der aktive Transportmechanismus gehemmt oder sogar deaktiviert wird. Van Uden (1989) berichtet, dass die Ammonium- und Glukoseaufnahme unterschiedlich von Ethanol beeinflusst wird, wobei der Glukosetransport weniger empfindlich sei. Ferreras *et al.* (1989) bestätigen eine fortschreitende Verminderung der Transportaktivität der Allgemeinen Aminosäure Permease (GAP) wenn sich Ethanol in der Zelle ansammelt. Die Autoren vermuten, dass Ethanol die Allgemeine Aminosäure Permease durch eine selektive Hemmung bestimmter Komponenten des Transportproteins in der Plasmamembran deaktiviert. Diese Beobachtung würde auch erklären, dass das Hefewachstum empfindlicher gegenüber Alkohol reagiert als die Gäraktivität. Außerdem verlängert die Anwesenheit von Alkohol die latente Phase zum Zeitpunkt der Beimpfung mit Hefezellen. Eine erhöhte Temperatur verstärkt diesen Effekt noch zusätzlich. Leao (1984) berichtet, dass durch Ethanol die Membranpermeabilität zugunsten der Protonen erhöht wird. Ethanol ist in der Phospholipid Doppelschicht löslich und verändert die Ladung der Fettsäuren. Der strukturelle Aufbau wird zerstört und die Lipidschicht wird verflüssigt (Alexandre *et al.* 1994, Schmidt *et al.* 2006). Es folgt eine Lähmung der Hefe in Bezug auf wichtige aktive Transportfunktionen

(Henschke & Jiranek 1993). Laut Baurhuber & Knull (1989) gehen die Hefepilze im eigenen Ausscheidungsprodukt zugrunde, sobald das bei der Gärung entstehende Ethanol die Konzentration von 15 %vol übersteigt. Dieses mag allgemein zutreffen, es gibt jedoch auch selektionierte Hefestämme, die bei einem Alkoholgehalt von >15 %vol zu einer vollständigen Endvergärung kommen. Um die Robustheit von Reinzuchthefen gegenüber Ethanol systematisch zu untersuchen, haben die Autoren Schmidt *et al.* (2006) in ihrer Forschungsarbeit vier Kriterien definiert: Die Fähigkeit von Hefezellen bei Anwesenheit von Ethanol zu wachsen, Zucker zu metabolisieren, Biomasse zu bilden und die Überlebensfähigkeit in einer alkoholischen Lösung. Die Ergebnisse zeigten, dass der Parameter „Überlebensfähigkeit in einer alkoholischen Lösung“ am wenigsten dazu geeignet ist, die allgemeine Robustheit der Reinzuchtheife bezüglich ihrer Gärfähigkeit bei hohem Alkoholgehalt vorherzusehen. Vielmehr hängt die Robustheit von der Kombination mehrerer Parameter ab, die sich im Verlauf der alkoholischen Gärung anpassen. Mineralstoffe wie Calcium und Magnesium, die im Gärmedium vorliegen, können den hemmenden Effekt des Ethanols wesentlich verringern (Ciesarova *et al.* 1996). Die Autoren stellen für beide Elemente eine grundsätzlich positive Wirkung auf die Alkoholtoleranz der Hefe fest, wobei sich Magnesium besonders positiv auf das Zellwachstum auswirkt. Verschiedene Versuche zeigen, dass das Verhältnis (Ratio) zwischen Magnesium und Calcium hoch sein muss, da Calcium auch einen hemmenden Effekt auf die Bindung von Magnesium an die Zelloberfläche und somit auf die Magnesiumaufnahme besitzt. Außerdem werde die ATPase Aktivität durch eine zu hohe Calciumkonzentration geschwächt. Zum Thema Alkoholtoleranz von *Saccharomyces cerevisiae* ist das Review von Stanley *et al.* (2010) zu empfehlen.

2.2.3.3 Kohlenstoffdioxid

Kohlenstoffdioxid (CO₂) ist ein Gärungsprodukt und wird von der Hefezelle ausgeschieden, da es gleichzeitig ein Zellgift ist und die Vitalität der Hefe hemmt. Kohlenstoffdioxid liegt dabei vorwiegend als wässrig gelöstes Gas in der Hefezelle vor. Da die Plasmamembran eine hohe Permeabilität für das unpolare Gas CO₂ aufweist, diffundiert es leicht aus der Zelle heraus. Dieser Prozess unterliegt einem Lösungsgleichgewicht zwischen dem intra- und extrazellulären Kohlenstoffdioxidgehalt (Annemüller *et al.* 2008). Eine hemmende Wirkung des CO₂ kann besonders während der Drucktanggärung bei der Schaumweinherstellung auftreten. Nach Würdig & Woller (1989) hört die Vermehrung der Hefe bei etwa 15 g L⁻¹ CO₂ auf. Das entspricht einem CO₂-Druck von 7,2 bar bei 15°C. Die Gärungsaktivität hingegen kommt erst bei etwa

30 g L⁻¹ CO₂ zum Erliegen. Dieser Umstand kann auch technologisch genutzt werden. Troost (1988) beschreibt ein CO₂ - Druckgärverfahren, welches das Ziel hat, die Hefevermehrung und Gärung durch Druck kontrolliert zu hemmen.

Bei der Herstellung von Stillwein kann Kohlenstoffdioxid über den üblichen Gäraufsatz entweichen und übt normalerweise keine Hemmung auf die Gärung aus. Die hemmende Wirkung des CO₂ beruht im Wesentlichen auf der Bildung von Carbamaten im intrazellulären Raum. Es reagiert dabei mit freien Aminen, Peptiden und freien Aminogruppen von Aminosäuren. Dieser Vorgang ist besonders zu beobachten, wenn der pH-Wert oberhalb des isoelektrischen Punktes der Proteine und Aminosäuren liegt. Der Aufbau der Proteine und die Aktivität der Enzyme wird dadurch nachhaltig gestört (Annemüller *et al.* 2008). Der hemmende Effekt ist besonders stark bei hohem Alkoholgehalt (Kunkee & Ough 1966).

2.2.3.4 Temperatur

Die Temperatur während der Hefevermehrung und der alkoholischen Gärung hat einen großen Einfluss auf die Vermehrungsrate, die Nährstoffaufnahme und die metabolischen Prozesse in der Hefezelle. Bei der alkoholischen Gärung werden pro Molekül assimilierter Glucose 40 kcal frei. Die Hefe nutzt diese Energie für das Wachstum, die Vermehrung und um die Lebensfunktionen aufrecht zu erhalten. Außerdem werden zwei Moleküle Adenosintriphosphat (ATP) von einem Zuckermolekül gebildet. Die ATP Moleküle stellen einen Energiespeicher dar. Es braucht 7,3 kcal Energie, um ein ATP Molekül zu bilden. Die Differenz (40-14,6 = 25,4 kcal) ist nicht verbrauchte Energie und entweicht in Form von Wärme. Dementsprechend steigt die Temperatur im Gärmedium theoretisch auf 45 °C. Eine derart hohe Temperatur würde zu einer Denaturierung der Proteine führen und die Hefezellen töten. Kühlsysteme sind also unerlässlich für die Vitalität der Hefe. In der modernen Oenologie gehören Kühlsysteme zur etablierten Ausstattung im Weinkeller. Würdig & Woller (1989) berichten, dass die Optimaltemperatur für die Vermehrung und die Gärung bei 25 °C liegt. Eine größere Abweichung von diesem Wert hemmt den Stoffwechsel der Hefe.

Laut Van Uden (1989) ist eine Kühlung besonders wichtig wenn die Temperatur über 30 °C ansteigt, da die Empfindlichkeit der Hefezelle gegenüber Alkohol bei dieser Temperatur ansteigt und die Gärung vorzeitig stecken bleiben könnte. Grund ist die Eiweiß denaturierende Wirkung der Kombination aus hoher Temperatur und Alkohol. Da sowohl Enzyme als auch Struktur- und Transportproteine aus Eiweiß aufgebaut sind, hat diese Kombination eine verheerende Wirkung für die Hefe. Der

Hefemetabolismus hängt wesentlich von der Aufnahme von Nährstoffen durch Permeasen ab. Die Struktur dieser Membranenzyme ist sehr temperaturabhängig, wodurch die Nährstoffaufnahme außerhalb des Optimums leicht gehemmt wird (Entian & Barnett 1992). Niedrige Temperaturen verringern die Durchlässigkeit der Plasmamembran und verringern die Aktivität der Permeasen.

Der Einfluss sehr niedriger Temperaturen wird von Beltran *et al.* (2007) beschrieben. In ihren Versuchen konsumierten Hefezellen bei 13 °C weniger Ammonium und Glutamin als bei 25 °C. Sie nahmen jedoch verstärkt die Aminosäuren Arginin, Glutaminsäure und Tryptophan aus einem synthetischen Medium auf. Tryptophan erhöht die Resistenz von *Saccharomyces cerevisiae* gegenüber Alkohol (Stanley *et al.* 2010). Laut ihren Beobachtungen veränderte die niedrige Temperatur die Stickstoff Katabolismus Repression (NCR) dahingehend, dass nur die vorteilhaften Aminosäuren aufgenommen wurden, während ungünstige Stickstoffquellen nicht aufgenommen wurden. Die Autoren erklären diese Beobachtung damit, dass die Hefe bei niedrigen Temperaturen eine geringe Zuckeraufnahmerate hat und somit weniger Kohlenstoffskelette für die Synthese von Aminosäuren zur Verfügung stehen. Durch die gezielte Aufnahme von Aminosäuren kann diesem Mangel an Kohlenstoff entgegen gewirkt werden.

2.2.3.5 Anaerobe Bedingungen während der alkoholischen Gärung

Während der alkoholischen Gärung herrschen nach kurzer Zeit anaerobe Bedingungen. Unter diesen Bedingungen sind Hefezellen darauf angewiesen Fettsäuren oder Ergosterole aufzunehmen. Untersuchungen von Rosenfeld *et al.* (2003) zeigten, dass auch Phytosterole aus den Trauben als Sauerstoffersatz unter anaeroben Bedingungen dienen können. Der Grund besteht darin, dass die Ergosterolsynthese unter anaeroben Bedingungen nicht möglich ist (Ratledge & Evans 1989). Nach Delfini & Costa (1993) liegt ein häufiger Grund für steckenbleibende Gärungen in der Abreicherung der natürlichen Fettsäuren des Mostes im Zuge einer starken Mostvorklärung. Die Zugabe von Sterolen (Ergosterol) kann also den Metabolismus und die Widerstandsfähigkeit der Hefezelle fördern. Umfangreiche Arbeiten zum Thema Widerstandsfähigkeit durch Sterole wurden von Salmon (1996), Fornairon-Bonnefond *et al.* (2002) und Deytieux *et al.* (2005) durchgeführt.

2.2.3.6 Trubgehalt und Rückstände aus dem Pflanzenschutz

Der Trubgehalt ist ein wichtiger gärungsbeeinflussender Faktor. Stark vorgeklärte Traubenmoste gären später an als ungeklärte Moste, und sie gären auch nur mit

mäßiger Intensität durch. Selbst nach Reinzuchtheferzugabe gären stark geklärte Moste langsamer als das ungeklärte Ausgangsmaterial. Die gärfördernde Wirkung des Trubes erklärt sich durch eine direkte Entbindung des entstehenden Kohlenstoffdioxid (CO_2). Die Hefezellen setzen sich an den Trubteilchen, die als Entbindungspunkte dienen, fest. Die Trubteilchen werden außerdem zusammen mit ihren Hefezellen herumgewirbelt und setzen auch an anderer Stelle CO_2 frei. Außerdem gelangt die Hefe somit an Stellen, an denen noch eine höhere Zuckerkonzentration herrscht. Auf diese Weise wird eine optimierte Zuckerversorgung mit der Entfernung des hemmenden CO_2 gekoppelt.

Durch eine starke Klärung des Mostes wird eventuell auch ein Teil der im Most enthaltenen Aminosäuren und Vitamine entfernt. Bei zu starker Vorklärung kommt es außerdem zum schnelleren Absinken der zugesetzten Reinzuchthefer. Die Hefe kann am Boden nur aus ihrer unmittelbaren Umgebung Zucker aufnehmen. In diesem Bereich nimmt der Zuckergehalt schnell ab, der Gehalt an hemmendem CO_2 und Alkohol aber schnell zu. Die Endvergärung des Mostes wird dadurch erschwert.

Die Vorklärung kann andererseits Reste von Pflanzenschutzmitteln entfernen, die ebenfalls eine gärhemmende und geschmacksbeeinflussende Wirkung haben (Würdig & Woller 1989). Pflanzenschutzrückstände, die sich noch zum Zeitpunkt der Ernte auf den Trauben befinden, gelangen in den trüben Most. Durch eine gute Vorklärung wird der Gehalt stark minimiert. In einigen Pflanzenschutzpräparaten sind Dichlofluanid (DCF) oder Phosphorsäureester enthalten. Beide sind als hefetoxisch einzustufen. Der Wirkstoff Dichlofluanid kann schon ab einer Konzentration von 3 mg L^{-1} zu Gärverzögerungen führen (Dittrich & Großmann 2005). Netzschwefelrückstände ($\text{S}_{\text{elementar}}$) können eher eine leichte Förderung der Gärung bewirken, sie können jedoch auch zu Schwefelwasserstoff (H_2S) reduziert werden und einen Bockser verursachen (Wenzel & Dittrich 1978). Detaillierte Ausführungen sind dem Kapitel 2.4.1.4 zu entnehmen. Über die Entfernung des Trubes werden auch die Netzschwefelrückstände fast vollständig entfernt. Kupferreste aus dem Pflanzenschutz liegen gelöst im Most vor und gelangen wahrscheinlich in die Gärung. Kupfer fällt jedoch mit H_2S , das in jeder Gärung in kleinen Mengen entstehen kann, als Kupfersulfid aus und wird später mit dem Hefetrub entfernt. Kupferrückstände sind neben dem allgemeinen Risiko einer Kupfertrübung besonders bei der Sorte Sauvignon blanc sehr problematisch. Gemäß den Untersuchungen von Darriet *et al.* (2001) beeinträchtigen Kupferionen die sortentypische Aromausprägung dieser Sorte während der alkoholischen Gärung.

Spritzungen mit kupferhaltigen Präparaten haben außerdem eine Auswirkung auf die Cu^{2+} Anreicherung im Boden. Wightwick *et al.* (2008) berichten von Untersuchungen aus Australien, bei denen Kupferrückstände im Weinbergsboden von 6-150 mg kg^{-1} gefunden wurden. In Europa liegen die Werte mit 130-1280 mg kg^{-1} noch weit darüber, wie die Autoren feststellten.

2.3 Themenbereich „Nährstoffversorgung der Hefe und Aromabildung“

Es gibt viele Faktoren, die Einfluss auf den Hefestoffwechsel haben, wobei eine ungünstige Konstellation Stress für die Hefezelle bewirkt. Neben dem Klärungsgrad, dem SO_2 -Gehalt, der Temperatur und Rückständen von Fungiziden hat die Zusammensetzung der Nährstoffe im Most eine zentrale Bedeutung. Der Gehalt an Zucker, Sauerstoff, Stickstoff, Mineralien, Spurenelementen und Vitaminen sind entscheidende Faktoren. Grundsätzlich variiert der Gehalt je nach Rebsorte, Bodenbeschaffenheit, Düngereinsatz, Reifeverlauf der Trauben und Behandlungsmaßnahmen des Mostes. Der natürliche Gehalt von Stickstoff liegt in den Untersuchungen von Sablayrolles *et al.* (1996) bei 60 bis 500 mg L^{-1} . Die Hefe benötigt Stickstoff für den Aufbau von Aminosäuren und Biomasse. Die Literatur spricht daher vom Gehalt an hefeverwertbarem Stickstoff (YAN=Yeast Assimilable Nitrogen), der definiert wird als die Summe aus α -Aminosäure Stickstoff und Ammonium (Ugliano *et al.* 2007). Ein Indikator für den hefeverwertbaren Stickstoff (FAN=Free Assimilable Nitrogen) aus α -Aminosäuren (ohne Prolin) ist der NOPA Wert. Der NOPA (α -phtaldialdehyd/N-acetyl-L-cystein Spektrophotometrie) Wert gibt den freien α -Aminostickstoff an und geht auf die Autoren Dukes & Butzke (1998) zurück. Laut Bely *et al.* (1990) ist ein NOPA Wert von mindestens 140 mg L^{-1} Stickstoff nötig, um eine vollständige alkoholische Gärung zu vollziehen. Spayd *et al.* (1995) bestimmen in ihren Versuchen einen Mindestgehalt von 150 mg L^{-1} Stickstoff, um Most aus unterschiedlichen Düngevarianten vollständig zu vergären. Der natürliche Gehalt an hefeverfügbarem Stickstoff (YAN) im Most lag bei Untersuchungen von Hagen *et al.* (2008) bei durchschnittlich $124 \pm 62 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$.

Es ist zu bedenken, dass Reinzuchthefen einen sehr unterschiedlichen Stickstoffbedarf während der alkoholischen Gärung besitzen. Ortiz-Julien *et al.* (2011) haben 112 kommerzielle Hefestämme in einem definierten Most (100 $\text{mg L}^{-1} \text{ N}$) auf ihren Stickstoffkonsum pro Milligramm Zucker untersucht. Die Ergebnisse waren von 0,3 mg N pro Gramm Zucker bis 1,5 mg N pro Gramm Zucker gestreut, wobei über 60 % der Hefestämme unter 0,8 mg N pro Gramm Zucker konsumiert haben.

Mineralstoffe und Vitamine können als Kofaktoren von Enzymen wirken und so zu einer Verbesserung der Gäraktivität der Hefe führen. Zink hat neben der katalytischen Funktion als Kofaktor auch eine strukturelle Rolle in Enzymen und nicht katalytischen Proteinen. Entscheidend ist auch der Zugabezeitpunkt. Nährstoffe, die am Ende der Gärung zugegeben werden, haben oft keine Wirkung, da die Aufnahmemechanismen der Hefe durch den hohen Ethanolgehalt in der Zellumgebung gehemmt werden (Bisson 1991). Das Review von Bell & Henschke (2005) über die Details der Stickstoffversorgung der Traube und der Hefe sei an dieser Stelle sehr empfohlen.

2.3.1 Stickstoffmetabolismus

Stickstoffverbindungen sind essentiell für das Wachstum und den Stoffwechsel von Hefen. Nach Kohlenstoff ist Stickstoff der mengenmäßig zweitwichtigste Nährstoff für die Hefe (Henschke & Jiranek 1993). Die für Hefen leicht verfügbare Form des Stickstoffes wird einerseits durch Ammonium (NH_4), andererseits durch Aminosäuren gedeckt. Ammonium stellt dabei eine besonders leicht assimilierbare Stickstoffquelle dar, die direkt in ein Protein eingebaut werden kann. Aminosäuren können ebenfalls von *Saccharomyces cerevisiae* direkt aufgenommen und in ein Protein eingebaut werden oder sie werden in freien Stickstoff abgebaut und stehen dann für die Synthese einer neuen Verbindung zur Verfügung. Sie bilden somit einen Stickstoffpool, aus dem sich die Hefe in einer Mangelsituation bedienen kann. Die Aufnahme der Aminosäuren ist abhängig von der Art und Anzahl der Permeasen, von denen es sowohl spezifische als auch eine Allgemeine Aminosäure Permease (GAP) gibt. Außerdem wird die Stickstoffaufnahme in die Zelle von einem Mechanismus gesteuert, der sich "Nitrogen Catabolite Repression" (NCR) nennt. Wenn wichtige Stickstoffverbindungen im Gärmedium vorhanden sind, wird die Transkription von Genen, die für die Aufnahme dieser Stickstoffverbindungen verantwortlich sind, repressiert (Wiame *et al.* 1985, Grenson 1992, ter Schure *et al.* 2000). Die Synthese von Permeasen, die für den Transport von Aminosäuren und Ammonium verantwortlich sind wird also in einem nährstoffreichen Most vom NCR herunter reguliert, in einem nährstoffarmen Most hingegen gefördert.

Verschiedene Arbeiten (Henschke & Jiranek 1993, Mendes-Ferreira *et al.* 2003) beschreiben die Stickstoffanreicherung in intrazellulären Vakuolen der Hefezelle. Diese Stickstoffreserven können dann zu einem späteren Zeitpunkt in der stationären Phase der alkoholischen Gärung zur Synthese neuer Proteine dienen. Der anfallende Kohlenstoff kann entweder ausgeschieden werden oder für den Aufbau von C- haltigen Komponenten genutzt werden.

Neben der Bildung von Proteinen für die Biomasse werden die Stickstoffverbindungen für die Synthese von anderen wichtigen Proteinen benötigt. Zu diesen Proteinen zählen Enzyme, die die alkoholische Gärung beschleunigen und Membranproteine (Permeasen), die in der Zellmembran lokalisiert sind und als Transporter für Aminosäuren und Zucker in die Hefezelle verantwortlich sind. Ein Stickstoffmangel führt meistens zu einer schleppenden oder stockenden alkoholischen Gärung. Je nach Art und auch Zugabezeitpunkt der Stickstoffquelle in die alkoholische Gärung können die Bildung der Biomasse, die Gärleistung, das Profil des Ammonium- und Aminosäureverbrauchs und in der Folge auch die Produktion von sekundären Metaboliten beeinflusst werden (Beltran *et al.* 2005). Als assimilierbare Stickstoffquelle eignen sich für die Hefe die in Tabelle 3 aufgezählten Substanzen.

Tabelle 3: Assimilierbare Stickstoffquellen für die Hefe

Quelle: modifiziert nach Henschke & Jiranek (1993)

Verbindungen:	Beispiel:
Anorganische Ionen:	Ammonium (NH ₄ ⁺)
Organische Hydrolysate:	Proteinhydrolysat
Aminosäuren:	Asparaginsäure, Glutaminsäure
Amide:	Asparagin, Glutamin
Organische Verbindungen:	Purine, Pyrimidine

Stickstoff kann auf zwei verschiedene Arten in ein Rezeptormolekül eingebaut werden. Einerseits durch direkte Aminierung von Ammonium. Andererseits kann der Einbau durch eine Transaminierungsreaktion geschehen, bei der eine zweite Stickstoffverbindung beteiligt ist, die als Protonendonator fungiert.

Meistens dient Glutaminsäure als Protonendonator in Transaminierungsreaktionen des Hefestoffwechsels. Glutaminsäure und Ammonium stehen somit im Mittelpunkt der Biosynthese von N- haltigen Verbindungen.

Die Zelle ist stets bestrebt ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen diesen Stickstoffsubstanzen aufrecht zu erhalten. Wie Abbildung 6 zeigt, werden die von der Zelle aufgenommenen Aminosäuren direkt oder indirekt in Ammonium oder Glutaminsäure umgewandelt. Der Argininabbau wird zuerst durch die Arginase katalysiert, hierbei resultieren Ornithin und Harnstoff. Harnstoff wird weiter durch das Enzym Harnstoff- Amidolyase abgebaut. Dieses Enzym katalysiert zwei Vorgänge: Es

carboxyliert Harnstoff zu Allophenat und hydrolysiert Allophenat zu je einem Molekül Ammonium und einem Molekül Kohlendioxid.

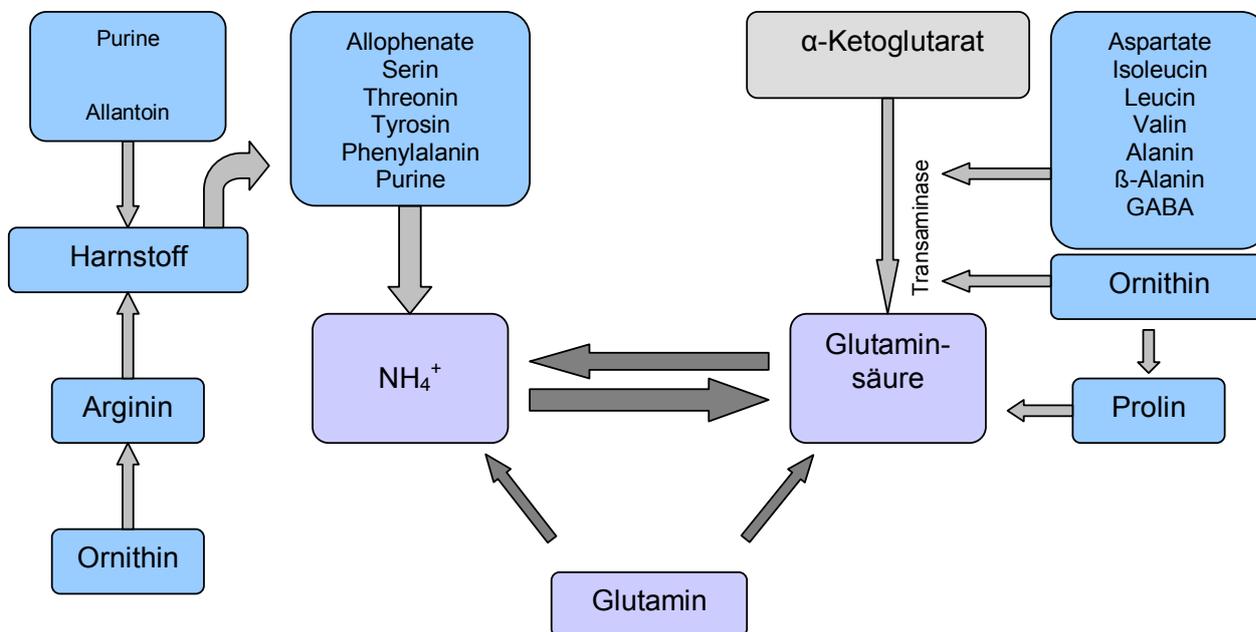


Abbildung 6: Abbau der Aminosäuren

Die Hefezelle ist bestrebt ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen den Stickstoffsubstanzen aufrecht zu erhalten. Besonders Ammonium und Glutaminsäure stehen dabei im Mittelpunkt. Quelle: modifiziert nach Bisson (1991)

Ornithin kann weiter abgebaut werden zu Prolin oder Polyaminen. Das im Cytoplasma gebildete Prolin wird in die Mitochondrien transportiert und dort zu Glutaminsäure umgewandelt. Dieser Vorgang kann jedoch nur unter aeroben Bedingungen stattfinden, nicht unter anaeroben. Die Polyamine spielen während des Zellwachstums eine große Rolle. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt keine Ureaseaktivität (Cooper 1982). Im Falle eines Stickstoffüberangebotes in der Zelle kann die Zelle den relativ ungiftigen Harnstoff über die erleichterte Diffusion ausscheiden. Für Ammonium ist ein solches Diffusionssystem nicht bekannt. Bei Bedarf kann Harnstoff über zwei Transportwege wieder aufgenommen werden. Einmal über einen aktiven Mechanismus, der an Ionen gekoppelt ist und auch von den Aminosäuren bekannt ist. Andererseits über die nicht Ionen abhängige Diffusion (Cooper 1982). Wie Abbildung 6 zu entnehmen ist, kann Glutamin durch hydrolytische Spaltung durch das Enzym Glutaminase in Ammonium und Glutaminsäure abgebaut werden.

Da der hefeverfügbare Stickstoff zunächst einmal von der Rebe aus dem Boden aufgenommen und in die Trauben eingelagert werden muss, spielen Umweltfaktoren wie klimatische Verhältnisse, Bodenzusammensetzung, Wasserverfügbarkeit und Düngung eine wichtige Rolle. Je nach Unterlage und Rebsorte haben sie einen entscheidenden Einfluss auf die Stickstoffkonzentration in der Traubenbeere.

Die Aminosäure Prolin wird von *Saccharomyces cerevisiae* nur verstoffwechselt, wenn molekularer Sauerstoff anwesend ist (Duteurtre *et al.* 1971). Dieser ist essentiell für die Aktivität der Prolinoxidase. Wie in Tabelle 10 dargestellt, kann der Anteil von Prolin an der Gesamt- Aminosäurekonzentration je nach Rebsorte sehr unterschiedlich ausfallen. Der Verbrauch von Ammonium und Glutaminsäure ist dagegen unabhängig von der Verfügbarkeit von Sauerstoff (Valero *et al.* 2003).

2.3.1.1 Ammonium

Die Definition der optimalen Stickstoffversorgung des Mostes während der alkoholischen Gärung ist nach wie vor ein schwieriges Feld. Wie aktuelle Veröffentlichungen zeigen kommen verschiedene Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der optimalen Strategie zur Vermeidung von Gärstockungen und unerwünschten Aromen. Stickstoffarmut im Gärsubstrat Most führt zu steckengebliebenen oder stockenden Gärungen (Salmon 1989, Bisson & Butzke 2000). Ammonium stellt die bevorzugte Stickstoffquelle für *Saccharomyces cerevisiae* dar (Torija *et al.* 2003, Beltran *et al.* 2005) und wird weltweit zur Erhöhung des hefeverwertbaren Stickstoffs im Most verwendet. In Europa ist die Zugabe über die Verordnung (EG) Nr. 606/2009 geregelt und auf maximal 100 g hL⁻¹ Diammoniumhydrogenphosphat oder Ammoniumsulfat begrenzt.

Vielfältige Effekte auf die alkoholische Gärung werden beschrieben. Laut Henschke & Jiranek (1993), Bely *et al.* (2003) und Beltran *et al.* (2005) fördert die Zugabe einer Stickstoffquelle zum Most sowohl die Biomassebildung der Weinhefe als auch die Stoffwechselrate des Zuckers. Dieser Effekt kann durch die Stimulation der Neubildung von Enzymen erklärt werden, die auch während der stationären Phase anhält (Mendes-Ferreira *et al.* 2004). Einige dieser Enzyme sind Zucker transportierende Permeasen und spielen eine wesentliche Rolle für den Ablauf der alkoholischen Gärung (Salmon *et al.* 1993).

Andererseits kann eine zu hohe Konzentration an hefeverfügbarem Stickstoff zu erhöhten Werten an höheren Alkoholen (Beltran *et al.* 2005), Essigsäure (Bely *et al.* 2003), Ethylcarbamate (Ough *et al.* 1988) oder Schwefelwasserstoff (H₂S) (Wang *et al.* 2003) führen. Ugliano *et al.* (2010) zeigten in einem Versuch mit 5 verschiedenen

Saccharomyces cerevisiae Hefestämmen, dass niedrige und moderate YAN Konzentrationen (hefeverwertbarer Stickstoff) hohe Konzentrationen an H₂S und hohe YAN Konzentrationen niedrige Konzentrationen H₂S im Jungwein produziert haben.

Beltran *et al.* (2005) zeigten auch, dass die Zugabe von Ammonium in den Most eine Repression in der Hefezelle induziert, die die Aufnahme der Aminosäuren in die Hefezelle hemmt und die alkoholische Gärung verlangsamt. All diese Beobachtungen stehen zusätzlich in Abhängigkeit zum Hefestamm und zu den Gärbedingungen (z.B. Zuckerkonzentration, Temperatur, Sauerstoff). Eine sogar toxische Wirkung von Ammonium wurde von Hess *et al.* (2006) beobachtet. Wenn Kalium- Ionen im Gärmedium stark limitiert sind (1,3 mM K⁺) und Ammonium (NH₄) die einzige Stickstoffquelle ist, kann Ammonium über die Transportkanäle des Kaliums unreguliert in die Zelle eindringen. In der Folge werden die Assimilationswege für Ammonium herunter reguliert und Ammonium besitzt nun eine toxische Wirkung für die Zelle. Als Entgiftungsstrategie konnte von den Autoren die Bildung und Ausscheidung von Aminosäuren in das Gärsubstrat ermittelt werden. Da dieser Prozess Energie und Kohlenstoff verbraucht, wurde parallel auch ein erhöhter Verbrauch von Glucose gemessen (Hess *et al.* 2006). Weitere Untersuchungen bestätigten den Autoren, dass diese Stoffwechselreaktion nicht stammabhängig war.

Die über Verordnung (EG) Nr. 606/2009 geregelte Maximalmenge von DAHP führt unter Umständen zu erhöhten Restgehalten von Ammonium im Jungwein. In einem Versuch von Beltran *et al.* (2005) im synthetischem Medium und mit unterschiedlichen Zugabezeitpunkten zeigte sich, dass die Hefe zu Anfang der Gärung bevorzugt Ammonium aufnimmt. Es konnte aber nur vollständig aufgenommen werden, wenn die Zugabe in der ersten Hälfte der alkoholischen Gärung erfolgte. Köhler *et al.* (2011) stellten in ihren Versuchen ebenfalls fest, dass der Zusatz von 1 g L⁻¹ DAHP zu Restmengen an NH₄-Stickstoff im Jungwein führte.

2.3.1.2 Aminosäuren

Die Hefe baut Aminosäuren ab, um den darin enthaltenen Stickstoff zu nutzen. In erster Linie baut sie daraus die Verbindungen auf, die sie gerade für ihre Stoffwechselaktivität benötigt. Wie bereits erwähnt, beschreiben Beltran *et al.* (2005), dass Ammonium nur vollständig aufgenommen werden kann, wenn die Zugabe in der ersten Hälfte der alkoholischen Gärung erfolgt. Bei späteren Zugaben werde der Stickstoffbedarf hauptsächlich aus Aminosäuren gedeckt. Tabelle 4 zeigt eine Gruppierung der Aminosäuren gemäß dem Aufnahmeprofil durch die Hefe im Verlauf der alkoholischen Gärung. Die Kontrollvariante beinhaltet die Zugabe einer

Nährstoffmischung (Kombination aus Ammonium und Aminosäuren) vor Zugabe der Hefe. Die weiteren Varianten wurden durch die Zugabe der gleichen Nährstoffmischung zu späteren Zeitpunkten bei OD 1060, OD 1040, OD 1020 und OD 1000 kreiert. Der Zugabezeitpunkt der Nährstoffmischung beeinflusste wesentlich das Aufnahmeprofil der verschiedenen Aminosäuren.

Tabelle 4: Aminosäureaufnahme durch die Hefe während der alkoholischen Gärung in einem synthetischen Most

Durch Variation des Zugabezeitpunktes der Nährstoffmischung konnte das Aufnahmeprofil der Aminosäuren bestimmt werden. Es zeigte sich, dass Glutamin, Tryptophan, Threonin, Histidin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Valin und Methionin bevorzugt aufgenommen wurden. Arginin, Glutamat, Glycin, Alanin, Aspartat, Serin, Lysin und Tyrosin wurden nur in einer Nährstoffmangelsituation von der Hefe aufgenommen. Quelle: modifiziert nach Beltran *et al.* (2005).

Aminosäure	Konzentration im natürlichen Nährstoffmedium	Anteil an der Gesamt-Aminosäureaufnahme durch die Hefe in der Kontrollvariante	Fazit aus Varianten OD 1060, 1040, 1020, 1000: Aufnahmeprofil während der Gärung
Glutamin, Tryptophan	32,2 %	49 %	Aufnahme unabhängig von den Gärbedingungen vor und nach Zugabe der Nährstoffmischung
Arginin, Glutamat, Glycin, Alanin, Aspartat	44 %	2 %	Aufnahme nur bei Nährstoffmangel, also nur vor Zugabe der Nährstoffmischung
Threonin, Histidin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Valin, Methionin	17,8 %	41,5 %	Aufnahme vor und nach Zugabe der Nährstoffmischung
Serin, Lysin, Tyrosin	6 %	6,5 %	Aufnahme nur vor Zugabe der Nährstoffmischung

Glutamin ist laut Matthews & Webb (1991) eine der wichtigsten Aminosäuren für die Hefe. Es zählt zu den neutralen Aminosäuren und trägt eine Carbonsäureamid-Gruppe. Glutamin kann selbst von der Hefe gebildet werden. Ammoniak (NH_3) bzw. Ammonium (NH_4^+) entsteht während des Aminosäurestoffwechsels, es ist jedoch giftig für die Hefezelle und muss deshalb in eine andere Verbindung umgewandelt werden. Katalysiert durch die Glutamin-Synthetase kann Ammonium zusammen mit Glutaminsäure zu Glutamin reagieren ($\text{Glutaminsäure} + \text{ATP} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{Glutamin} +$

ADP + P_i). Über diese Reaktion hat Glutamin also die Funktion des Stickstoffspeichers im Stoffwechselkreislauf der Hefezelle. An anderer Stelle kann es dann als NH₂-Donator bei der Synthese von Aminosäuren dienen. Glutamin dient auch als Ausgangssubstrat für die Purin- Synthese und die Bildung von Glucosamin. Man kann es somit auch als Transportform des Ammoniaks im Organismus bezeichnen. Durch das Enzym Glutaminase kann es leicht wieder zu Glutaminsäure und NH₄⁺ hydrolytisch gespalten werden und für andere Prozesse zur Verfügung stehen (Karlson 1989). Arginin, eine der Hauptaminosäuren im Traubenmost, gehört zu den basischen Aminosäuren. Es wird sowohl über die Allgemeine Aminosäure Permease transportiert, als auch über spezifische Arginin Permeasen, die durch die Anwesenheit von Arginin induziert werden. Durch die Anwesenheit von Ammonium wird diese Permease gehemmt (Bisson 1991). Einen ausführlichen Überblick über die Regulierung der Allgemeinen Aminosäure Permease gibt Garrett (2008). In Versuchen von Butzke & Park (2011) konnte gezeigt werden, dass eine hohe Konzentration von Arginin zu einer nachhaltig andauernden Förderung (gemessen in Form von CO₂ Freisetzung) der Gäraktivität während der gesamten Gärung führt. Eine H₂S Bildung in der zweiten Hälfte der Gärung konnte somit verhindert werden.

Bisson (1991) beschreibt, dass vor Einsetzen der Wachstumsphase der gärenden Hefe alle Aminosäuren in transportfähiger Form vorliegen, aber durch verschiedene Faktoren wie der Konkurrenz um den gleichen Transporter oder der Hemmung durch Ammonium einige Aminosäuren schneller aufgenommen werden als andere. Grundsätzlich teilt Bisson das Aufnahmemuster der Aminosäuren aus dem Traubenmost in 3 Phasen auf, wie in Tabelle 5 dargestellt.

Für die Nutzung von Prolin als Stickstoffquelle benötigt die Hefe Sauerstoff. Unter anaeroben Gärungsbedingungen kann die Hefe diese Aminosäure also nicht nutzen. Prolin enthält keine freie Aminogruppe und kann nicht transaminiert werden. Dies sollte bei der Beurteilung der Analyse von hefeverwertbarem Stickstoff berücksichtigt werden.

Gleichzeitig gibt es verschiedene Literaturquellen, die sich mit den Aminosäuren Trehalose und Prolin in der Funktion als "Stresschutz" der Hefezelle beschäftigen.

Wiemken (1990) stellt Trehalose neben seiner untergeordneten Rolle als Reservesubstanz vor allem als Schutzsubstanz der Hefe gegen Umwelteinflüsse dar. Auch Argüelles (2000) beschreibt eine doppelte Funktion von Trehalose. Einerseits hat Trehalose eine Reservefunktion in vegetativen Zellen, andererseits stellt es ein

Stressmetabolit dar. Eine weitere Einteilung erfolgte durch Pierce (1987) für die Aufnahme der Aminosäuren aus Bierwürze in Tabelle 6.

Takagi (2008) zeigte bei Versuchen *in vitro*, dass eine intrazelluläre Anreicherung von Prolin die Toleranz der Hefe gegenüber Tiefgefrieren, Trocknung, Oxidation und Ethanol wesentlich verbessern konnte. Ein Effekt, der besonders bei der Herstellung von Trockenreinzuchthefen genutzt werden könnte. Kaino & Takagi (2009) bestätigten dies für bestimmte Bedingungen *in vitro*, Versuche *in vivo* bestätigten diese Ergebnisse jedoch nicht.

Tabelle 5: Gruppierung der Aminosäuren bei der Aufnahme durch *Saccharomyces cerevisiae*.

Quelle: modifiziert nach Bisson (1991)

Phase I	Phase II	Phase III
Alanin Ammonium Arginin Asparagin Asparaginsäure Cystein Glutaminsäure Glutamin Glycin Histidin Isoleucin Leucin Lysin Methionin Phenylalanin Serin Threonin Tryptophan Tyrosin Valin	Ammonium Alanin Arginin GABA	Prolin

Aktuelle Untersuchungen von Köhler *et al.* (2011) zeigten einen Anstieg der Prolinkonzentration während der alkoholischen Gärung in Stickstoff-unterversorgten Mosten. Bei einer hohen Dosage von 1 g L⁻¹ Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP) in den Most nahm die Konzentration an Prolin im Verlauf der Gärung nicht zu. In der Kontrollvariante (Variante mit Stickstoffmangel) konnte ein Anstieg der Prolinkonzentration ab dem fünften Tag der Gärung beobachtet werden. Die Endkonzentration lag bei 720 mg L⁻¹ Prolin im Vergleich zu 370 mg L⁻¹ Prolin in der Kontrollvariante. Abstufungen der DAHP-Zugabe wiesen entsprechend Konzentrationen zwischen diesen beiden Werten auf. Die verstärkte Bildung von Prolin

in der N-unterversorgten Variante bestätigt, dass Prolin als "Stressschutz" bzw. als "Reservesubstanz" bezeichnet werden kann.

Tabelle 6: Gruppierung der Aminosäuren bei der Aufnahme aus Bierwürze durch *Saccharomyces cerevisiae*

Quelle: Pierce (1987) in: Lodolo *et al.* (2008)

Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Arginin	Histidin	Alanin	Prolin
Asparagin	Isoleucin	Glycin	
Aspartat	Leucin	Phenylalanin	
Glutamat	Methionin	Tyrosin	
Glutamin	Valin	Tryptophan	
Lysin		Ammonium	
Serin			
Threonin			

2.3.2 Mineralstoffe und Spurenelemente

Mineralien sind gemäß Jones & Greenfield (1984) für das Wachstums eines Organismus oder Einzellers essentiell, entweder im mikromolaren oder nanomolaren Konzentrationsbereich. Mineralstoffe haben eine große Bedeutung für den Zellaufbau und für den Stoffwechsel der Hefezelle. Metalle wie Mg, Fe, Cu, Zn, Co, Mo, Cr, As und Se sind für den Stoffwechsel von großer Bedeutung. Sie haben die Funktion eines Coenzym. Die Bioverfügbarkeit bestimmter Mineralien im Traubenmost ist also ein wichtiger Faktor für die Vitalität der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3.2.1 Phosphor

Im Energiehaushalt aller lebenden Zellen spielt Phosphor eine zentrale Rolle. Vor allem ist dabei Adenosintriphosphat (ATP) zu nennen. Oft kommt es auch an Kalium organisch gebunden vor. Kalium kommt als osmotisch wirksames Ion im Plasma der Hefezelle eine große Bedeutung zu. Es ist essentiell wichtig für den Quellzustand des Cytoplasmas und für den Übergang von Stoffen durch die Zellmembran.

2.3.2.2 Schwefel

Schwefel (S) spielt für die Hefe *Saccharomyces* eine essentielle Rolle. Maw (1963) gibt einen ausführlichen Überblick über die Schwefelverwendung durch Hefe. Es ist Bestandteil von essentiellen Aminosäuren und des Tripeptids Glutathion. Fast alle Hefen können auf einer Quelle aus anorganischem Schwefel oder Methionin wachsen. Die Fähigkeit Cystein, Cystin oder Glutathion zu verstoffwechseln, ist aber je nach Hefestamm unterschiedlich ausgeprägt. Ein optimales Wachstum erfolgte bei Versuchen mit *Saccharomyces cerevisiae* ab einer Konzentration von 10 mg S pro Liter (Maw 1963).

2.3.2.3 Magnesium

Das biochemisch wichtige Magnesium stellt 6 % der Heferinde und 0,4 % des Trockengewichtes einer Hefezelle dar. Das Magnesium-Ion ist ein Cofaktor für viele Enzym- katalysierte Prozesse, es erfüllt zahlreiche Funktionen im Zuge der Glycolyse und der Fettsäurebiosynthese, z.B. durch die Hexokinase, Phosphofruktokinase, Phosphoglyceratkinase, Enolase und Pyruvatkinase (Walker & Maynard 1996). Magnesium gilt als einer der wichtigsten Cofaktoren in der Hefezelle. Es stimuliert ganz wesentlich das Wachstum, den Zuckertransport und die Ethanolproduktion während der alkoholischen Gärung (Walker 1998). Magnesium wird in Konzentrationen von der Hefe benötigt, die um den Faktor 100 höher liegen als für Zink, wie Birch *et al.* (2003) in ihren Versuchen zeigten. Magnesium wirkt auf die Phosphorylierungs-Vorgänge im Citronensäurezyklus, in der Atmungskette und weiteren Stoffwechselfvorgängen. Es ist an allen durch ATP katalysierten Enzymreaktionen beteiligt, z.B. der Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat durch Hexokinase und der Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat durch Phosphofruktokinase. Magnesium spielt außerdem eine Rolle bei der Biosynthese von Fettsäuren. Es wirkt als Stabilisator von Plasmamembranen, intrazellulären Membranen und Nukleinsäuren. Walker (1994) berichtet außerdem, dass Magnesium den Stress der Hefe, der durch Ethanol, Temperatur und osmotischen Druck entsteht, verringert. Laut Kockova-Kratochvilova (1990) kann Magnesium in hohen Mengen aber auch giftig sein.

Bereits 1957 berichteten Conway und Beary von Versuchen zur Aufnahmekinetik von Magnesium bei Bäckerhefe. Die Autoren zeigten eine konstante Steigerung der Magnesiumaufnahme je höher die Ionenkonzentration im Außenmedium ist, bis zu einer Konzentration von 300 mM. Kalium wirkte hingegen als Kompetitor am aktiven Carriersystem des Magnesiums und hemmte die Magnesiumaufnahme. Als den

stärksten Inhibitor identifizierten die Autoren H^+ Ionen. In einer Modellösung wurde die Magnesiumaufnahme bei einem pH-Wert kleiner 5,5 stark gehemmt (Conway & Beary 1957). Magnesium und Calcium haben einen antagonistischen Effekt. Aus diesem Grund ist auch ein bestimmtes Verhältnis dieser beiden Mikroelemente für eine optimale Förderung der Hefe wichtig. Rees & Stewart (1997) haben dieses bei Vergärungen mit *Saccharomyces cerevisiae* in Bierwürze folgendermaßen bestimmt. Hohe Vergärungsraten wurden besonders mit einem Mg:Ca Verhältnis von 17:1 und 11:1 erzielt, bei einem natürlichen Verhältnis von 3:1 konnte jedoch kein positiver Effekt festgestellt werden. Ciesarova *et al.* (1996) benennen den optimalen Gehalt an Calcium mit 3 mM bei einer Anwesenheit von 10 %vol Ethanol. Calcium stabilisiert dabei eher eine hohe Alkoholproduktion als das Wachstum der Hefe.

Walker (1998) machte Untersuchungen mit Weinhefe in Ethanollösungen. Er stellte fest, dass die Lebendzellzahl auf 0 % fiel, wenn die Hefezellen für 24 Stunden in einer ethanolischen Lösung mit 10 %vol und 50 ppm Magnesium lagen. In der gleichen Lösung mit einer Magnesiumkonzentration von 500 ppm überlebten 53 % der Hefezellen.

2.3.2.4 Zink

Zink gilt als ein essentielles Mikroelement und ist in der Biologie an mehr als 300 Enzymen als Cofaktor bekannt. Bei Mikroorganismen ist Zink ein wichtiger Faktor in der Biosynthese von DNA und Proteinen. Zink beeinflusst die Eiweißsynthese, die Zellvermehrung und die alkoholische Gärung. Als bekannteste Funktion in der Oenologie gilt die Funktion des Cofaktors der Alkoholdehydrogenase am Ende der alkoholischen Gärung. Dort ist es an der Reaktion von Acetaldehyd zu Ethanol beteiligt. Zinkmangel kann somit zu empfindlichen Gärstörungen führen. Weitere wichtige Zink- enthaltenden Enzyme sind die Aldolase, die Carboxypeptidase A und die Malat- und Glutamat- Dehydrogenase. Zink katalysiert als Coenzym der Aldolase die Reaktion von Fructose-1,6-bisphosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Zink ist dabei im aktiven Zentrum proteingebunden. Außerdem werden die für die Nukleinsäuresynthese benötigten Polymerasen durch Zink aktiviert (Römpf 1999). In *S. cerevisiae* wird Zink über spezifische Zinktransporter in der Plasmamembran aufgenommen und über sie reguliert. Die Aktivität dieser Transporter wird transkriptional und post-transkriptional über die Konzentration im Inneren geregelt (Eide 2003). Nach Brady & Duncan (1994) erfolgt diese Aufnahme in einem ersten Schritt über das Binden an Sulfhydrylreste des Cysteins in der Mannoproteinschicht der Hefezellwand. Anschließend wird Zink über die Zinktransporter aufgenommen und

in der Vakuole eingelagert. In einer Arbeit von Nicola *et al.* (2003) wird gezeigt, dass Zink schon innerhalb der ersten 2 Stunden nach Inokulation der Hefezellen in den Traubensaft vollständig aufgenommen wurde. Ein Einfluss auf das Wachstum und die Viabilität der Hefezellen konnte nicht festgestellt werden, bei einer Konzentration von 1,5 und 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Zink konnte aber eine Optimierung der Gärleistung erreicht werden. In Brauereien spielt die Sicherung des Zinkbedarfs der Brauereihefe eine wichtige Rolle, da die reinen Malzbierwürzen oft einen Mangel an Zink aufweisen (Annemüller *et al.* 2008).

2.3.3 Vitamine

Hefen der Gattung *Saccharomyces* sind heterotrophe Mikroorganismen und können bestimmte Wuchsstoffe nicht selbst synthetisieren. So sind die Hefezellen von *Saccharomyces cerevisiae* z. B. auf die Zufuhr von essentiellen Vitaminen wie Pantothensäure, Biotin und m-Inosit angewiesen (Annemüller *et al.* 2008). Aufgrund der Konkurrenz um die Vitamine können konkurrierende Hefen im Most einen Einfluss auf die Vitalität von *Saccharomyces cerevisiae* haben und indirekt für schleppende Gärungen verantwortlich sein (Ough *et al.* 1989). Nicht-Saccharomyceten wie *Kloeckera*, *Hanseniaspora* und *Candida* können im Angärstadium wichtige Vitamine verbrauchen, die später den *Saccharomyces* Hefen nicht mehr als Nahrung zur Verfügung stehen. Bataillon *et al.* (1996) berichten, dass wilde Hefen wie *Kloeckera apiculata* die Thiaminkonzentration auf ein Level reduzieren können, das für *Saccharomyces* ein Mangel darstellt. Neben Thiamin und D-Pantothensäure sind auch D-Biotin und m-Inosit von großer Bedeutung für die Vitalität der Hefe. Die Bedeutung der Vitamine für Most und Gärung wurde schon früh entdeckt (Hall *et al.* 1956), detaillierte Literatur in der Oenologie ist aber sehr eingeschränkt verfügbar. Dittrich & Großmann (2005) berichten von Thiaminkonzentrationen in gesunden Mosten von 318 ng ml^{-1} und in Mosten aus faulem Lesegut von 35 ng ml^{-1} . Hagen *et al.* (2008) untersuchten in den Jahren 2001 bis 2003 Riesling und Chardonnay Most in Washington State (USA) auf ihren Vitamingehalt und fanden folgende Durchschnittswerte: Biotin: $<1\mu\text{g L}^{-1}$, Pantothensäure : $513 \pm 181 \text{ mg L}^{-1}$.

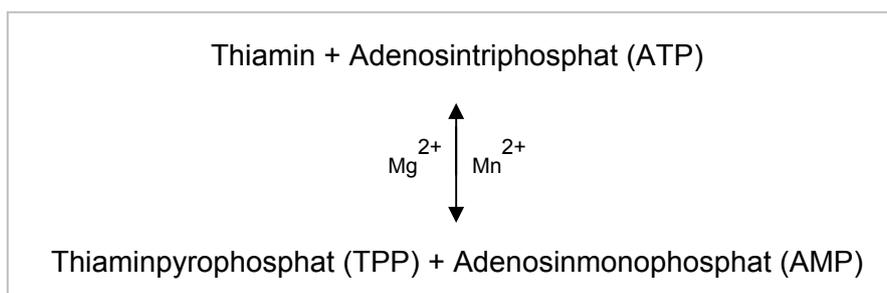
2.3.3.1 Thiamin

Laut Kocková-Kratochvilová (1990) spielt Thiamin in der Hefe als Bestandteil des Thiaminpyrophosphat (TPP) eine wichtige Rolle. Der Transport des Thiamin durch die Membran von *Saccharomyces cerevisiae* ist sehr spezifisch und hängt vom pH-Wert, der Temperatur und der Stoffwechselenergie ab. Thiaminpyrophosphat (TPP) hat im

Wesentlichen drei Funktionen, die für Hefen eine Bedeutung haben. Es ist Cofaktor der Pyruvatdecarboxylase (Thiamindiphosphat = prosthetische Gruppe), es ist Coenzym der Transketolase und es ist an der Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat im Zitronensäurezyklus beteiligt. Thiamin ist in den Zellen sowohl in freier als auch in enzymatisch gebundener Form vorhanden.

Wenn Thiamin im Medium vorhanden ist, nehmen es die Hefen auf und speichern es intrazellulär in der 2-3 fach höheren Konzentration wie üblich. Man findet es zu 10 % im Zellkern, zu 35 % in den Mitochondrien, zu 5 % in den Mikrosomen und zu 50 % im Cytoplasma, wo es der Zuckerverstoffwechslung dient. Thiamin hat somit auch einen wesentlichen Einfluss auf die Bildung von Biomasse und die Schnelligkeit der alkoholischen Gärung (Bataillon *et al.* 1996).

Im Zuge der alkoholischen Gärung wird Pyruvat gebildet. Pyruvat wird durch die Pyruvat- Decarboxylase weiter verstoffwechselt, bei dem Thiaminpyrophosphat (TPP) als Cofaktor agiert. Die Bildung von TPP vollzieht sich nach der folgenden Gleichung:



Die Ionen Mg^{2+} und Mn^{2+} haben die Funktion des allosterischen Aktivators für diese Reaktion. Die Pyruvat- Decarboxylase ist kein spezifisches Enzym und kann auch andere Ketosäuren decarboxylieren. Die Pyruvat-Decarboxylierung stellt in Saccharomyceten die Hauptrichtung im Stoffwechsel der Saccharide dar. Es entstehen Ethanol und CO_2 . Verbleibendes Pyruvat bindet im Jungwein an schwefelige Säure, Thiamin gilt somit als wichtigster Faktor wenn es um die Reduzierung des SO_2 -Bedarfs im Jungwein geht.

2.3.3.2 Pantothersäure

Im Jahr 1933 isolierte erstmals der amerikanische Ernährungsbiologe Roger Williams Pantothersäure aus Hefe. Später wurde Pantothenat als ein Bestandteil von aktivierter Essigsäure (Coenzym A; Abkürzung: CoA) entdeckt. Acetyl-CoA nimmt eine Schlüsselposition zwischen den Stoffwechselwegen ein, da es ein Verbindungsglied zwischen Zitronensäurezyklus, Glykolyse und Fettstoffwechsel darstellt. Es ist beteiligt an der Synthese von Fetten und der Verwertung von Carboxysäuren im

Citronensäurezyklus (Kocková-Kratochvilová 1990). Als Vitamin wird das rechtsdrehende Calciumpantothenat zum B-Komplex gezählt und tritt in Mikroorganismen als Wuchsstoff auf (Römpf 1999). Waller (1970) erreichte bei der Hefe *Saccharomyces carlsbergensis* unter aeroben Bedingungen und einer gesättigten Pantothenatkonzentration eine Zunahme des Wachstums um bis zu 41 %. Edwards & Bohlscheid (2007) demonstrierten in ihren Untersuchungen, dass eine ausreichende Konzentration an Pantothenensäure ($< 200 \mu\text{g L}^{-1}$) wichtig für die Verhinderung der Schwefelwasserstoffbildung während der alkoholischen Gärung ist. Als Cofaktor des CoA spielt Pantothenensäure eine Rolle bei der Synthese von o-Acetylserin und o-Acetylhomoserin, den stickstoffhaltigen Vorstufen, die sich mit Schwefelwasserstoff verbinden.

2.3.3.3 Biotin und Folsäure

Biotin ist sowohl an der Aminosäurebildung als auch an der Lipidsynthese beteiligt. Ein Mangel an Biotin kann also auch die Bildung von höheren Alkoholen, Esterverbindungen und Fettsäuren beeinflussen (Lynen *et al.* 1980). Ein Biotinmangel hat außerdem einen direkten Einfluss auf die Bildung von Schwefelwasserstoff (H_2S), da das Vitamin als Kofaktor bei der Synthese von Kohlenstoffverbindungen beteiligt ist, die am Ende des "Sulfate Reduction Pathway" benötigt werden (Jordan & Slaughter 1986, Thomas & Surdin-Kerjan 1997). In Versuchen von Bohlscheid *et al.* (2006) konnte bei niedrigem Gehalt an hefeverfügbarem Stickstoff (YAN) die Erhöhung der Biotinkonzentration von 1 auf $10 \mu\text{g L}^{-1}$ die H_2S Produktion signifikant reduzieren. Der Einfluss auf höhere Alkohole zeigte sich jedoch nicht homogen und sehr stark Hefestamm abhängig.

Der durchschnittliche Gehalt an Folsäure in getrockneter Bierhefe liegt bei $20 \mu\text{g}$ pro g Trockengewicht (Schertel *et al.* 1965).

2.3.4 Hefenährstoffpräparate

Hefenährstoffe werden in vielen verschiedenen Varianten angeboten. Als Ammoniumsalz kommen die beiden Formen Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP) und Ammoniumsulfat in kristalliner oder flüssiger Form zum Einsatz. Ein weiteres Produkt sind Hefezellwände. Sie sind die vom Zellsaft getrennten Zellwände in aufgereinigter Form. Sie werden oft als Kombinationsprodukt mit Vitamin B_1 (Thiamin) verkauft. Gesetzlich geregelt sind sie durch Verordnung (EG) 606/2009. Relativ neu sind Hefenährstoffpräparate auf Basis inaktiver Hefezellen. Sie bestehen aus vollständigen Hefezellen, also der Zellwand und dem Zellsaft mit all seinen

Inhaltsstoffen. Die Zusammensetzung dieser inaktiven Hefe hängt im Wesentlichen von folgenden Faktoren ab: den Züchtungsbedingungen, der Intensität der Vermehrung, dem Zellalter und von der Nährstoffversorgung des Hefesatzes. Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung der Trockensubstanz von Hefen (*Saccharomyces*).

Tabelle 7: Zusammensetzung der Trockensubstanz von *Saccharomyces cerevisiae*

Quelle: Annemüller *et al.* (2008)

Bestandteile:	Beispiele:
Rohprotein (45-60 %):	Proteine, Aminosäuren, Nukleinsäuren
Kohlenhydrate (15-39 %):	Glycogen, Hefemannan, Hefeglucan, Trehalose
Rohfett (2-11 %):	Neutralfette, Phosphatide, Sterine
Asche (6-12 %):	P ₂ O ₅ , K ₂ O, MgO, CaO, Na ₂ O, SiO ₂ , FeO ₃ , SO ₄

Fettlösliche Vitamine kommen normalerweise nicht in Hefen vor. Lediglich die Vorstufe des Vitamin D, Ergosterin kann in Hefezellen nachgewiesen werden. Die wasserlöslichen Vitamine und Hefewuchsstoffe B₁, B₂, Nicotinsäure, B₆, Pantothenensäure, Folsäure, m-Inosit, p-Aminobenzoesäure und Cholin sind in der Hefe vorhanden (Annemüller *et al.* 2008). Durch spezielle Hefeaufzucht und Hefeaufbereitung können diese Stoffe im Endprodukt der inaktiven Hefe angereichert werden und stehen somit während der Gärung für eine gezielte Nährstoffversorgung der Hefe zur Verfügung.

2.3.5 Aromabildung durch *Saccharomyces cerevisiae*

Die Aromastruktur eines Weines ist sehr vielschichtig und wird durch zahlreiche Faktoren geprägt. In dem folgenden Kapitel wird besonders die Rolle der Hefe hinsichtlich ihrer Aromaprägung erläutert.

Die Aromatik eines Weines kann sich je nach Weinstil und Rebsorte sehr stark unterscheiden. Etwa 800 verschiedene Aromastoffe mit unterschiedlichen Geruchsschwellenwerten machen die Typizität einer Rebsorte aus. Rapp (1992) erläutert, dass sich in einem Aromagramm deutlich voneinander abweichende Leitsubstanzen ermitteln lassen, die signifikant für eine Rebsorte stehen.

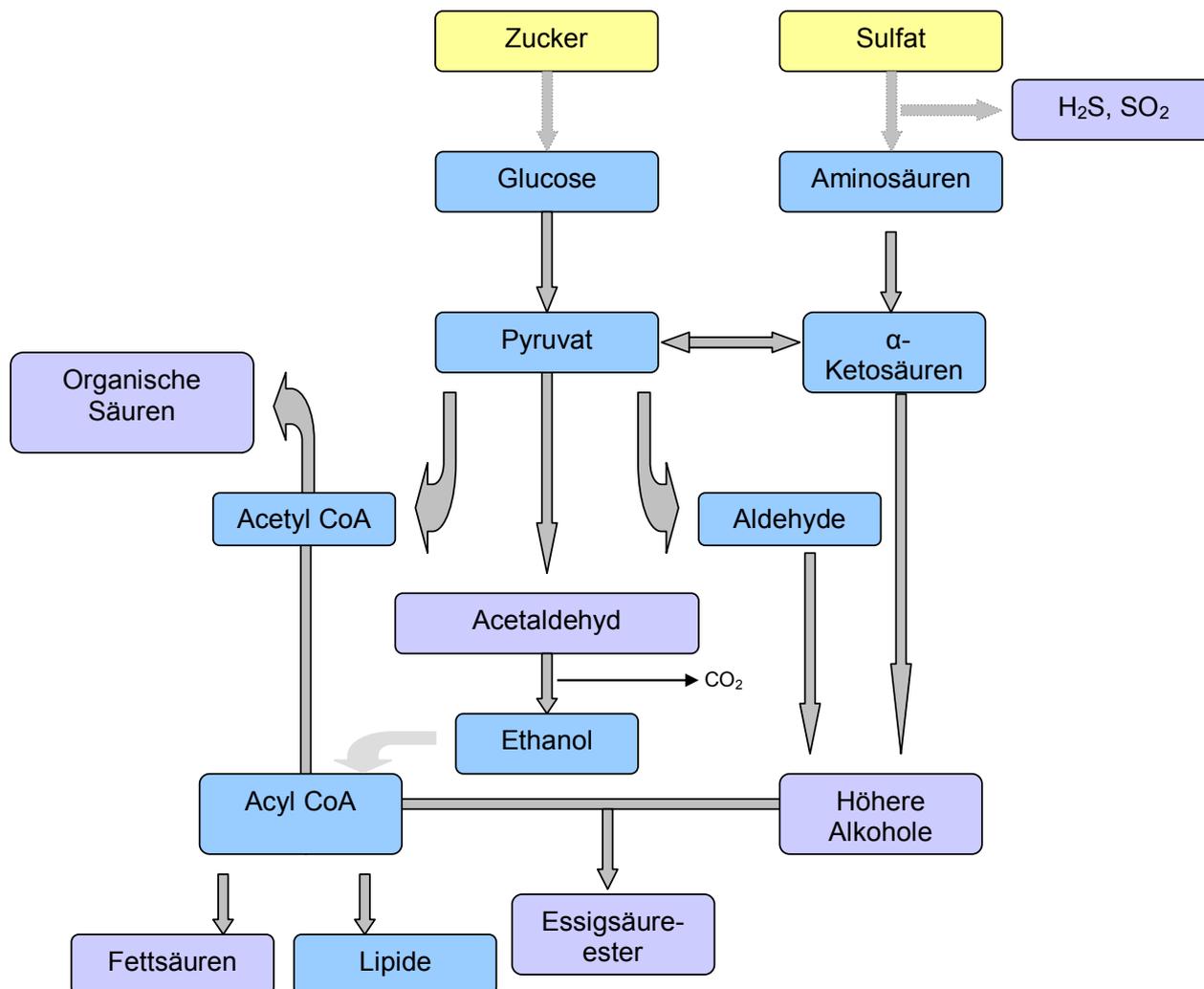


Abbildung 7: Übersicht der metabolischen Wege zur Bildung von aromaaktiven Substanzen

Tertiäre Aromastoffe entstehen während der alkoholischen Gärung und hängen in ihrer Konzentration von den unterschiedlichen Gärbedingungen und dem Hefestamm ab. Quelle: modifiziert nach Hammond (1993)

Die größte Bedeutung haben dabei Terpenoide. So haben Monoterpenalkohole und Monoterpendiole wie z. B. Geraniol, Nerol, Linalool und Citronellol einen großen Einfluss auf die geschmackliche Ausprägung der Sorte.

Die Terpenverbindungen der Weinbeeren sind überwiegend in der Beerenhaut lokalisiert, nur ein geringer Teil findet sich im Fruchtfleisch. Monoterpenalkohole durchlaufen den Hefestoffwechsel unverändert und eignen sich somit besonders als Leitsubstanz für Rebsorten. Demgegenüber stehen aber auch zahlreiche Aromastoffe, die maßgeblich durch den vergärenden Hefestamm bestimmt werden. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen vier Aromastoffgruppen. Die primären Aromastoffe sind in der unverletzten Traubenbeere enthalten und prägen den

fruchtigen Charakter eines Mostes oder Weines. Die sekundären Aromastoffe entstehen bei der Verarbeitung (Mahlen, Maischen, Pressen) der Trauben durch enzymatisch- chemische Reaktionen. Besonders eine Maischestandzeit gibt viel Zeit für enzymatisch bedingte Aromastoffveränderungen. Tertiäre Aromastoffe, auch Gärbukett genannt, entstehen während der alkoholischen Gärung. Sie werden maßgeblich durch die Anwendung unterschiedlicher oenologischer Verfahren oder der Vergärung mit unterschiedlichen Hefestämmen beeinflusst.

Die so entstehenden Aromastoffe dienen nicht zur Sortencharakterisierung. Bei den tertiären Aromastoffen spielen höhere Alkohole, Fettsäuren, Fettsäureestern und Essigsäureester die wesentliche Rolle (siehe Abbildung 7). Die Bildung dieser Aromastoffe ist ebenfalls durch den Gehalt an hefeverfügbarem Stickstoff (YAN) beeinflusst (Ugliano *et al.* 2007), wie Abbildung 8 zeigt. Aber auch verschiedene Schwefelverbindungen spielen für das Weinaroma eine entscheidende Rolle, da sie einen sehr geringen Geruchsschwellenwert haben.

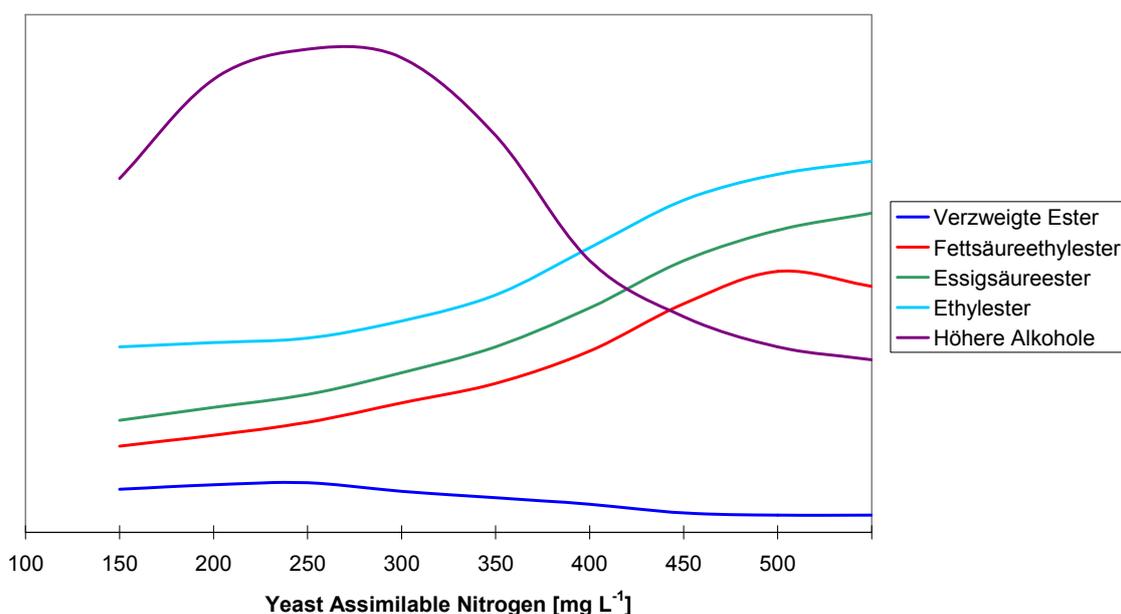


Abbildung 8: Bildung von tertiären Aromastoffen in Abhängigkeit des hefeverwertbaren Stickstoff (YAN).

Die Bildung von Aromastoffen wird auch durch den Gehalt an hefeverfügbarem Stickstoff (YAN) beeinflusst. Quelle: modifiziert nach Ugliano *et al.* (2007)

Es gibt Schwefelverbindungen, die einen negativen Geruchseindruck hervorrufen, den man im deutschsprachigen Raum als "Böckser" bezeichnet. Diese Stoffgruppe wird in Kapitel 2.4 ausführlich behandelt. Es werden aber auch schwefelhaltige Aromen hervorgerufen, die positiv beurteilt werden. Unter den weißen Rebsorten wird besonders der Sauvignon blanc, aber auch der Riesling und der Semillon von positiven Schwefelverbindungen geprägt. Die flüchtigen Schwefelverbindungen liegen fast nicht in der Traube vor, sie entwickeln sich erst während der Gärung durch die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Murat *et al.* 2001, Swiegers *et al.* 2009). In der Traube liegen sie als nicht flüchtige Form an Cystein (Tominaga *et al.* 1998; Darriet *et al.*, 2001; Maeva *et al.*, 2008, Lund *et al.* 2009, Patel *et al.* 2010) gebunden vor.

Während der alkoholischen Gärung werden diese Thiole enzymatisch durch die β -Lyase Aktivität der Hefe freigesetzt (Tominaga *et al.* 1998, Peyrot des Gachons *et al.* 2000).

Letztlich wird jedoch nur ein kleiner Teil der flüchtigen Thiole aus den Vorstufen abgespalten. In erster Linie haben weinbauliche und kellerwirtschaftliche Maßnahmen einen Einfluss auf den Gehalt an Precursoren bzw. flüchtigen Thiolen im späteren Wein (des Gachons *et al.* 2005). Der Eintrag von Kupfer-Ionen (Pflanzenschutz, Böckserbehandlung) führt zu wesentlichen Verlusten an 3-Mercaptohexanol, 3-Mercapto-2-methylpropanol und 4-Mercapto-4-methylpentan-2-on (Darriet *et al.* 2001), also dem typischen Aroma dieser Weine. Die in Tabelle 8 aufgeführten Schwefelverbindungen spielen die wichtigste Rolle bezüglich einer positiven Aromatik bei Sauvignon blanc.

Tabelle 8: Wichtige Schwefelverbindungen des Weinaromas

Name	Abkürzung	Geruchsschwellenwert (ng L ⁻¹)	Attribut
4- Mercapto-4-methylpentan-2-on	4MMP	60 *	Cassis, Buchsbaum
4-Mercapto-4-methylpentan-2-ol	4 MMPOH	55 ***	Zitronenschale
3- Mercaptohexan-1-ol	3 MH	60 *	Grapefruit, Maracuja
3- Mercaptohexyl acetat	3 MHA	2-4 *	Tropische Frucht, Riesling- Typ
3-mercapto-3-methylbutan-1-ol	3 MMB	1.500 *	Maracuja, Grapefruit
2-Methoxy-3-isobutylpyrazin	ibMP	2 **	Grüne Paprika

- * Geruchsschwellenwert in wässriger Lösung (Takatoshi *et al.* 1998).
- ** Geruchsschwellenwert in Wein (Ling *et al.* 1969)
- *** Geruchsschwellenwert in ethanolischer Lösung (Tominaga *et al.*, 2000)

Dominierend im Wein sind jedoch die Fettsäureethylester und die Acetate der höheren Alkohole. Die höheren Alkohole können als sekundäre Hefemetabolite in niedriger Konzentration sehr positiv beurteilt werden. Unter einer Konzentration von 300 mg L⁻¹ tragen sie zu einem fruchtigen und komplexen Aroma bei. In hoher Konzentration (> 400 mg L⁻¹) können sie zu einem stechenden negativen sensorischen Eindruck führen (Rapp & Mandery 1986). Der Hefestoffwechsel nimmt bei ihrer Bildung die entscheidende Rolle ein. Ferner spielen höhere Alkohole eine wichtige Rolle als Vorstufe der Esterverbindungen, die einen positiven Beitrag zum Weinaroma besitzen. Die Bildung der Ethyl- und Acetatester steigt mit zunehmender Zuckerkonzentration des Mostes, mit steigender Gärgeschwindigkeit und mit steigender Hefemenge (Francis & Newton 2005). Die Ester bringen eine Vielzahl von fruchtigen Aromen in den Wein, die einen qualitativ hochwertigen Wein ausmachen (Swiegers *et al.* 2005). Tabelle 9 zeigt ausgewählte Verbindungen, die die Aromatik eines Weines prägen. Die quartären Aromastoffe werden durch chemische Reaktionen während der Flaschenlagerung gebildet und werden auch als Lagerungsbukett eines Weines

bezeichnet. Im Laufe der Lagerung kommt es z.B. zur Abnahme von Linalool und zur Zunahme von 1,8- Terpin. Der Wein verändert sich geschmacklich und es kommt zu einem Verlust des sortentypischen Weinbuketts (Rapp 1992).

Tabelle 9: Wichtige Aromastoffe im Wein

Quelle: modifiziert nach Francis & Newton (2005), Swiegers *et al.* (2005)

Name	Geruchseigenschaft	Konzentration in Weißwein (mg L ⁻¹)	Geruchsschwellenwert (mg L ⁻¹)
Ester:			
Essigsäureethylester	Ananas, Lösungsmittel,	22-200	7,5 *
Propionsäureethylester	Ananas, Rum		
i-Buttersäureethylester	süß		0,015
Buttersäureethylester	Apfel, blumig	0,01-1,8	0,02 *
Capronsäureethylester	Apfel		0,014
Caprylsäureethylester	fruchtig		0,005
Caprinsäureethylester	Traube		0,2
Essigsäure-2-phenylethylester	Rosen, Honig, Tabak	0,08-0,4	0,25 *
Essigsäure-3-methylbutylester	Fruchtigkeit, Eisbonbon		0,03
Essigsäurehexylester	fruchtig, Banane		
Höhere Alkohole:			
i- Butanol	Lösungsmittel, Fuselöl, Spiritus	32-108	40 *
3-Methylbutanol	weinig		30
2- Phenylethanol	Honig, Würze, Rose	4-197	10 *
Hexanol	grünes Gras, blumig	0,3-12	4 **
Flüchtige Fettsäuren:			
Capronsäure	Schweiß, süß	4-13	0,5 *
Caprylsäure	Käse, Schweiß, süß	4,9-13	0,5 *
Caprinsäure	ranzig, Fett, süß	0,7-2,1	1 *
Monoterpene:			
Geraniol	Rosen, Geranien	0,001-0,044	30 *
Linalool	Lavendel, Rosen	0,004-0,3	0,025 ***

- * Geruchsschwellenwert in ethanolischer Lösung (10%)
- ** Geruchsschwellenwert in Wein

- *** Geruchsschwellenwert in synthetischem Wein

2.3.5.1 Ester

Ester sind allgemein für den fruchtigen und angenehmen Geruchseindruck eines Weines verantwortlich, der besonders im Jungweinstadium stark ausgeprägt ist. Esterverbindungen werden von der Hefe während der alkoholischen Gärung gebildet und prägen als Sekundärprodukte des Zuckermetabolismus ganz wesentlich das Gärbukett. Einzelne Geruchseindrücke können aber nur selten mit bestimmten Esterverbindungen in Verbindung gebracht werden. Zudem ist es auch bekannt, dass Ester synergistische Effekte aufweisen können und so auch unterhalb ihres Geruchsschwellenwertes aromarelevant sein können.

Als Bildungswege im Hefemetabolismus werden zwei Wege beschrieben. Der erste Bildungsweg wird über Enzymsysteme katalysiert. Dabei werden die Ester aus Alkohol und Acetyl-CoA synthetisiert (Nordström 1963). Ist Acetyl-CoA der Reaktionspartner, so entsteht ein Acetatester. Sind dagegen Acyl-CoA und Fettsäuren daran beteiligt, so entstehen Fettsäureester wie kurzkettige C₆-C₁₀ Fettsäure-Ethylester (Mason & Dufour 2000). Der zweite Bildungsweg geht über die chemische Kondensationsreaktion (Esterifikation) von Alkoholen und organischen Säuren (Lambrechts & Pretorius 2000). Reinzuchthefestämme der Gattung *S. cerevisiae* variieren sehr in ihrer Esterbildung, dominierende Ester sind z.B: Isoamyl acetat, Hexylacetat, Ethylhexanoat und Ethyloctanoat (Lambrechts & Pretorius 2000). Rojas *et al.* (2003) beschreiben, dass eine Mischung aus Wildhefen (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia anomala*) in Kombination mit *Saccharomyces cerevisiae* noch weitaus höhere Gehalte an Esterverbindungen produzieren kann.

Allgemein können drei Gruppen von Estern unterschieden werden. Die erste Fraktion besteht aus leicht flüchtigen Verbindungen, die zeitlich vor Isoamylalkohol flüchtig sind: z.B. Ethyl-, Isobutyl- und Isoamylester von kurzkettigen Fettsäuren. Die mittlere Fraktion besteht aus Komponenten zwischen Ethylcapronsäure und Phenylethylalkohol, so z.B.: Ethylester der Capryl- und Caprinsäure. Die letzte Fraktion eluiert nach Phenylethanol, so z.B. Ethylester der Tetradecanoic- und Hexadecanoicsäure.

2.3.5.2 Höhere Alkohole

Höhere Alkohole sind quantitativ die wichtigste Gruppe der Gärungsaromen. Ihr Name leitet sich aus der Anzahl der Kohlenstoffatome (< 2) ab, ihr Molekulargewicht und ihr Siedepunkt liegen höher als bei Ethanol. Ihr Einfluss auf die Sensorik von Wein, aber

auch von Destillaten ist sehr groß. Unter der Konzentration von 300 mg L^{-1} tragen höhere Alkohole zu einem angenehmen Bukett bei.

Bei einer Konzentration über 400 mg L^{-1} werden höhere Alkohole eher als negativ beschrieben (Rapp & Mandery 1986). Höhere Alkohole werden in 2 Gruppen eingeteilt: die aliphatischen Alkohole und die aromatischen Alkohole. Zu den aliphatischen Alkoholen gehören Propanol, Isobutyl-Alkohol, Amylalkohol und Isoamylalkohol. Zu den aromatischen gehören Phenylethylalkohol und Tyrosol. Isoamylalkohol ist der wichtigste Alkohol der von der Hefe gebildet wird. Andere wichtige sind Propanol und Isobutylalkohol. Sowohl weinbauliche Maßnahmen als auch die Hefeauswahl können einen wichtigen Einfluss auf die Konzentration der höheren Alkohole im Wein haben. Giudici *et al.* (1990) haben in ihren Arbeiten 100 verschiedene Hefestämme untersucht. Sie konnten keine Korrelation der Stammcharakteristiken wie z.B. Flockungseigenschaft, Schäumungsneigung oder H_2S Produktion mit der Bildung höherer Alkohole (i-Butanol und i-Amylalkohol) finden. Sie konnten aber eine Korrelation zwischen einer hohen Konzentration an n-Propanol und der Unfähigkeit der Hefe zur H_2S -Produktion feststellen.

Aminosäuren sind die metabolische Vorstufe von höheren Alkoholen. Höhere Alkohole werden während der alkoholischen Gärung durch die Umwandlung von verzweigten Aminosäuren wie Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin und Phenylalanin gebildet (Henschke & Jiranek 1993). Die Bildung der höheren Alkohole kann über zwei Wege laufen. Einerseits über den Ehrlich-Weg, andererseits über katabolische Mechanismen. Am Anfang steht dabei die Transaminierung zwischen einer Aminosäure und einer α -Ketosäure mit nachfolgender Decarboxylierung und Reduktion. Laut Zoecklein *et al.* (1995) kann die α -Ketosäure von der Hefe entweder ausgeschieden oder decarboxyliert und reduziert werden. Im Fall der Reduzierung wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert, was für ein ausgeglichenes Redox-Gleichgewicht in der Zelle sorgt. Ein Mechanismus, der hauptsächlich von Acetaldehyd erfüllt wird. Laut Vollbrecht & Radler (1973) ist die Bildung von höheren Alkoholen auf die Phase des exponentiellen Wachstums beschränkt. Reazin *et al.* (1973) untersuchte die Bildung von höheren Alkoholen mit radioaktiven Markern und fand heraus, dass 35 % der höheren Alkohole von Kohlenhydraten stammen. Die Bildung über den anabolischen Weg hängt aber auch vom Stickstoffgehalt ab. Äyräpää (1968) beschreibt eine positive Korrelation zwischen Stickstoffarmut und der Bildung von höheren Alkoholen. Die katabolische und auch die anabolische Synthese können durch Stickstoffgaben verringert werden. Aminosäuren können direkt über einen katabolischen Weg (Ehrlich Mechanismus) in

höhere Alkohole überführt werden. Der Ehrlich-Weg beschreibt dabei die Umwandlung von Aminosäuren zu höheren Alkoholen über drei verschiedene enzymatische Schritte: Transaminierung, Decarboxylierung und Reduzierung. Schulthess & Ettliger (1978) unterscheiden zwei Wirkungszusammenhänge. Die katabolische Bildung der höheren Alkohole nimmt zu, wenn auch die korrespondierenden Aminosäuren in ihrer Konzentration zunehmen. Die anabolische Bildung hingegen nimmt ab, je mehr die korrespondierenden Aminosäuren im Most vorhanden sind. Giudici *et al.* (1993) stellen fest, dass neben dem Hefestamm die Mostzusammensetzung und besonders der Aminosäuregehalt im Most die Unterschiede in der Bildung von höheren Alkoholen ausmachen.

2.3.5.3 Flüchtige Fettsäuren

Alkoholische Getränke enthalten hauptsächlich gesättigte, unverzweigte Fettsäuren. Der Gehalt an flüchtigen Fettsäuren liegt im Wein zwischen 500 – 1000 mg L⁻¹ (Lambrechts & Pretorius 2000). Laut Sponholz *et al.* (1981) ist die wichtigste von der Weinhefe gebildete Fettsäure die Essigsäure, deren Konzentration im Laufe der Gärung bis auf 600 mg L⁻¹ ansteigen kann. Flüchtige Säure besteht meist zu mehr als 90 % aus Essigsäure. Von den meisten Hefestämmen werden ca. 300–400 mg L⁻¹ Essigsäure gebildet. Hexansäure ist mit bis zu 8 mg L⁻¹ ebenfalls eine mengenmäßig wichtige Fettsäure, Propionsäure, 2-Methylpropionsäure, n-Buttersäure sowie 2- und 3-Methylbuttersäure werden nur in Spuren (< 1 mg L⁻¹) im Jungwein gefunden. Der erste wichtige Schritt bei der Bildung von Fettsäuren ist die Bildung von Acetyl Coenzym A (Acetyl-CoA) durch oxidative Decarboxylierung von Pyruvat. Für die weitere Bildung gibt es zwei enzymatische Wege: einerseits die Acetyl-CoA-Carboxylase und andererseits die Fettsäuresynthetase. Die Acetyl-CoA-Carboxylase wandelt Acetyl-CoA unter ATP-Verbrauch in Malonyl-CoA um. Dieses wird dann zu Malonyl-ACP umgewandelt (Carrierprotein = Acyl Carrier Protein (ACP)). Die nachfolgende Kondensationsreaktion wird von der Fettsäuresynthetase bewirkt und es entstehen gesättigte Fettsäuren (Paltauf *et al.* 1992). Ravaglia & Delfini (1993) untersuchten 48 verschiedene Hefestämmen auf ihre Bildung von C₈ und C₁₀ Fettsäuren. Wenige Fettsäuren wurden dabei von *Zygosaccharomyces bailii*, *Kloeckera apiculata* und *Schizosaccharomyces japonicus* gebildet. Hohe Gehalte von Caprylsäure (C₈) (0,9 - 7 mg L⁻¹) wurden dabei nur von *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* und *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* gebildet. Hohe Gehalte von Ethylcaproat wurden nur von *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* und *Saccharomyces japonicus* gebildet. Auch Huehn *et al.* (1998) bestätigen diese starke

Stammabhängigkeit der Bildung von Fettsäuren und ihren Ethylestern während der alkoholischen Gärung.

2.4 Themenbereich „Schwefel“

Anorganischer Schwefel und organisch gebundener Schwefel sind in der Natur weit verbreitet und liegen in vielfachen Formen vor. Die verschiedenen Formen sind verschieden stabil und besitzen eine unterschiedliche Oxidationszahl. Sulfid besitzt die am stärksten reduzierte Form mit der Oxidationszahl -2 , Sulfat ist die am stärksten oxidierte Form mit der Oxidationszahl $+6$. Pflanzen, z.B. die Weinrebe, nehmen Schwefel als Sulfat-Ionen über die Wurzeln auf und nutzen es zur Bildung von organischen Schwefelverbindungen. Die Hauptmenge des Sulfats wird über das Xylem in die Blätter transportiert und dort in den Chloroplasten reduziert. Der Weg führt dabei von Sulfat (SO_4^{2-}) über Sulfit (SO_3^{2-}) und Sulfid (H_2S) zu Cystein und Methionin (Saito 2003). Auch Hefen benötigen Schwefel für ihr Wachstum. Die biologische Bedeutung von Schwefel liegt darin, dass es ein wichtiger Bestandteil der Aminosäuren Cystein und Methionin ist, diese wiederum sind wichtige Bausteine für Peptide, Proteine und Enzyme in verschiedenen Organismen (Maw 1963). Im Verlauf der alkoholischen Gärung dient in erster Linie Sulfat als Schwefelquelle für die Hefe (Rauhut 1996).

Heutzutage findet Schwefel in vielfältiger Weise Verwendung. So dient er als wichtige Komponente in der pharmazeutischen Industrie, aber auch bei der Produktion von Kunstdünger, Insektiziden und von Fungiziden (z.B. Netzschwefel) in der Landwirtschaft. Bei der Produktion von Netzschwefel wird hochreiner Schwefel unter Zugabe eines Netzmittels sehr fein vermahlen. Gelöst in Wasser entsteht eine homogene, spritzfähige Suspension, die besonders gegen Schorf bei Obstbäumen und gegen Echten Mehltau bei der Weinrebe wirkt. Schwefelpartikel, die auf der Blattoberfläche der Reben haften, bilden durch die Einwirkung von Feuchtigkeit, Licht und Sauerstoff Schwefeldioxid (SO_2). Diese Verbindung wirkt bereits in geringer Konzentration gegen pilzliche Schaderreger, die sowohl Blätter als auch Trauben befallen. Die entscheidende Wirkung besteht darin, dass Schwefelteilchen in die Pilzorganismen eindringen und diese von innen abtöten, da sie enzymatische Reaktionen stören. Netzschwefel findet sowohl in der konventionellen Landwirtschaft als auch im biologischen Anbau Anwendung.

Der Schwefel wird in den biologischen Kreislauf eingeführt, in dem er als anorganisches Sulfat durch die Weinrebe aufgenommen wird und im Rahmen der assimilatorischen Sulfatreduktion (Sulfate Reduction Pathway) der Weinrebe zu Sulfid reduziert wird. Sulfat kommt in Traubenmosten in Konzentrationen bis 700 mg L^{-1} vor

(Amerine *et al.* 1980). Ough (1992) berichtet von Sulfatkonzentrationen zwischen 70 und 3.000 mg L⁻¹ im Traubenmost. Die Reduktionswege der Pflanze und der Mikroorganismen ähneln sich sehr. Für die Synthese von schwefelhaltigen Aminosäuren ist Schwefel in der reduzierten Form als Sulfid notwendig. Es dient in der Pflanze aber auch in der Hefezelle als zentrales Zwischenprodukt und wird in den weiteren Stoffwechselschritten in die Aminosäuren Cystein und Methionin und bei der Proteinbiosynthese in Proteinstrukturen eingebaut. Sulfid wird durch die Sulfitreduktase zu Sulfid (H₂S) reduziert (Rauhut 2009). Das Zwischenprodukt Sulfid der Sulfatreduktion kann sowohl aktiv durch die Sulfidpermease als auch passiv durch einfache Diffusion aus der Hefezelle in den gärenden Most gelangen. Im umgebenden Medium reagiert das Sulfid direkt mit den von der Hefe gebildeten SO₂ – Bindungspartnern (z.B. Acetaldehyd, Pyruvat, 2-Ketoglutarat). Ebenfalls können Sulfid und Schwefeldioxid per Diffusion durch die Plasmamembran ins Zellinnere (Stratford & Rose 1986) gelangen und dort direkt zu Sulfid reduziert werden (Ugliano *et al.* 2009). Da die Sulfidaufnahme in die Hefezelle keiner aktiven Regulation unterliegt, kann es zu einer überhöhten Produktion an Schwefelwasserstoff (H₂S) kommen (Ugliano *et al.* 2009). Abbildung 9 verdeutlicht die unterschiedlichen Quellen für den Eintrag von schwefelhaltigen Komponenten in die alkoholische Gärung.

In den Trauben liegen bestimmte Gehalte an S-haltigen Aminosäuren vor, die teilweise beim Pressen in den Traubenmost übergehen. Tabelle 10 gibt einen Überblick über typische Aminosäureprofile für Traubenmost aus den Sorten Riesling und Chardonnay. Die Sorte Chardonnay besitzt im Vergleich zu allen anderen Rebsorten ein sehr unterschiedliches Aminosäureprofil. Wie aktuelle Untersuchungen zeigen, kann diese Tatsache einen sortenbedingten Grund für Gärstörungen darstellen (Sommer 2011). Im Traubenmost kann Schwefel aber auch noch in Form von Sulfat (SO₄) vorliegen, von der Hefe aufgenommen werden und über den Sulfatreduktionsweg der Hefe reduziert werden. Die Stoffwechselvorgänge in der Weinrebe beeinflussen die Zusammensetzung im Traubenmost, die wiederum die Ausgangssituation für die Hefe und die alkoholische Gärung darstellen. Schwefel spielt in der Hefe eine wichtige Rolle als Cofaktor für Thiamin, Biotin, die Coenzyme A und M und Liponsäure.

Tabelle 10: Aminosäureprofil von Traubenmost in verschiedenen Jahrgängen

Aminosäuren [mg L ⁻¹]:	Riesling (Jhg. 1976) (Würdig & Woller 1989)	Riesling (Jhg. 2007)	Chardonnay (Jhg. 2008) (Sommer 2011)
Taurin	10	n.a.	n.d.
Phosphoäthanolamin	20	n.a.	n.d.
Asparaginsäure	75	46,4	104,9
Threonin	110	75,2	n.d.
Serin	126	52,7	n.d.
Asparagin	44	6,6	n.d.
Glutaminsäure	140	63,9	148,0
Glutamin	1000	173,9	n.d.
Sarkosin	9	n.a.	n.d.
alpha-Amoniadipinsäure	4	n.a.	n.d.
Prolin	165	307,5	756,6
Glycin	11	4,4	5,3
Alanin	102	102,2	283,5
alpha-Aminobuttersäure	22	n.a.	n.d.
Valin	18	60,7	19,2
Cystin		0,4	7,0
Methionin	11	11,3	4,3
Isoleucin	18	53,1	8,1
Leucin	24	65,6	15,8
β-Alanin	11	n.a.	n.d.
Tyrosin	24	12,8	20,2
Phenylalanin	21	78,5	17,4
γ-Aminobuttersäure	113	105,1	n.d.
Ornithin	8	2,6	9,9
Lysin	6	7,2	7,5
Tryptophan	5	24,9	19,9
Histidin	24	23,5	21,6
Arginin	498	351,6	4,5
Summe Aminosäuren:	2619	1630	1457

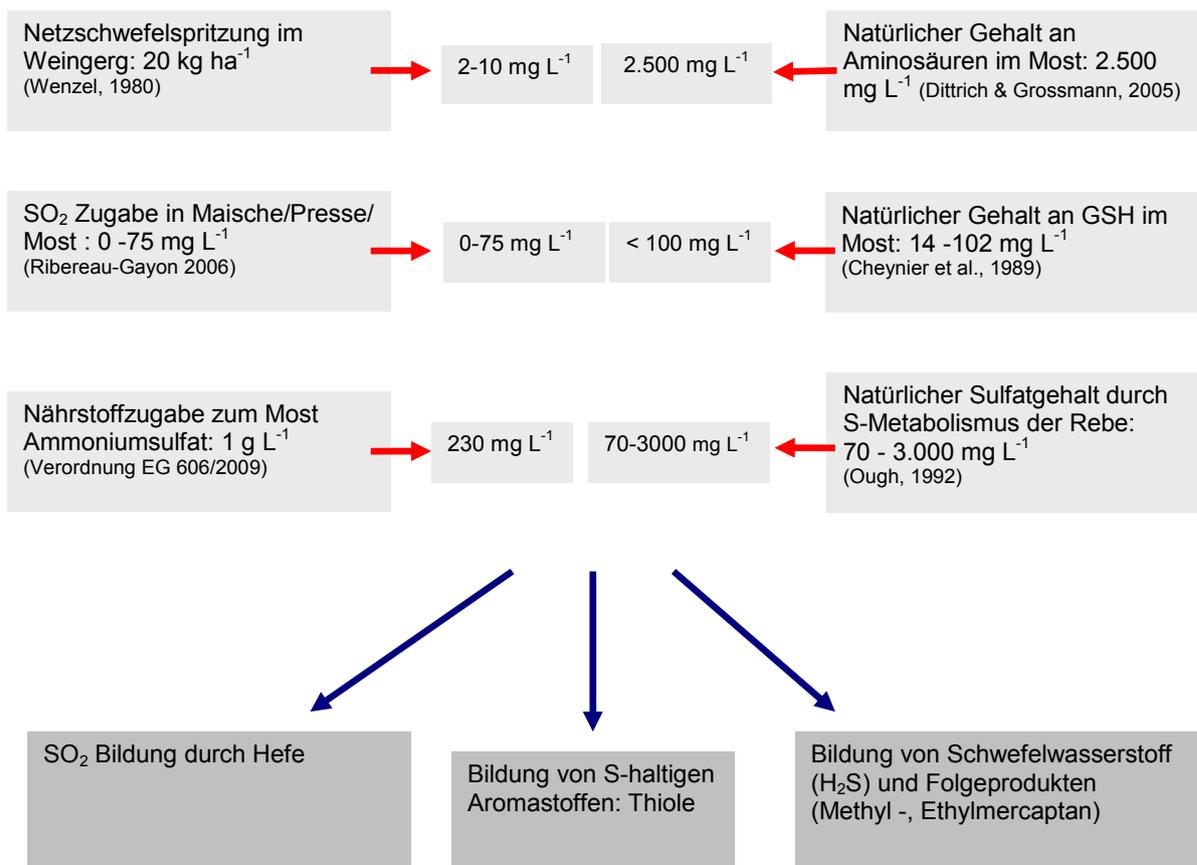


Abbildung 9: Übersicht über den Eintrag von schwefelhaltigen Komponenten während der alkoholischen Gärung und die möglichen Substanzen, die daraus gebildet werden.

Die Schwefelquellen können sowohl aus weinbaulichen und oenologischen Praktiken stammen (Netzschwefelspritzung im Weinberg, Maischeschwefelung, Ammoniumsulfat als Hefenährstoff), als auch natürlicherweise im Most enthalten sein (Aminosäuren, Glutathion, Sulfat).

2.4.1 Der Schwefelstoffwechsel der Hefe

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kann sowohl auf den anorganischen Schwefelquellen Sulfat und Thiosulfat als auch auf den organischen Schwefelquellen Homocystein, Cystein, Methionin, S-Adenosylmethionin (Thomas *et al.* 1992) und Glutathion (Elskens *et al.* 1991) gut wachsen. Abbildung 10 zeigt die Grundzüge des Schwefelstoffwechsels der Hefe mit Regulationsmöglichkeiten zur Beeinflussung der Sulfidbildung. Beginnend bei der Sulfatreduktion wird der Reaktionsverlauf zur Bildung von Methionin, Cystein und Glutathion dargestellt. Die im Traubenmost dominierende Schwefelquelle Sulfat wird von der Hefe über zwei sulfatspezifische Permeasen aufgenommen (Breton & Surdin-Kerjan 1977). Als unter physiologischen Bedingungen

inertes Molekül muß Sulfat vor einer Reduktion erst mittels ATP zu Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und 3'-Phosphoryladenosen-5'-phosphosulfat (PAPS) aktiviert werden. Die Reduktion des Schwefelatoms erfolgt dann in zwei Schritten. Von PAPS, dem aktivierten Sulfat, wird im ersten Reduktionsschritt der Sulfonylrest auf eine Thiolgruppe des reduzierten Thioredoxins übertragen. Damit entsteht unter Freisetzung von 3'-Phosphoryladenosen-5'-phosphat ein thiolgebundenes Sulfit. Für den zweiten Reduktionsschritt übernimmt der Sulfitreduktasekomplex das gebundene Sulfit. Dabei wird oxidiertes Thioredoxin freigesetzt und durch eine Thioredoxinreduktase NADPH-abhängig regeneriert. Durch den Sulfitreduktasekomplex wird das enzymgebundene Sulfit NADPH-abhängig zum Sulfid reduziert. Dieses wird direkt auf O-Acetylhomoserin unter Bildung von Homocystein übertragen. Zur Synthese des Methionins wird das entstandene Homocystein weiter methyliert. Ausgehend vom Methionin kann eine rasche Umwandlung zu S-Adenosylmethionin erfolgen, das sich über einen Zwischenschritt wieder in Homocystein umwandeln läßt (Cherest *et al.* 1969, Cherest *et al.* 1973). Die Bildung von Cystein aus Serin über O-Acetylserin konnte bisher nur in vitro nachgewiesen werden. Die Bildung von Cystein aus Homocystein läuft bei der Hefe über eine Transsulfierung, bei der das Schwefelatom des Homocysteins (C₄-Gerüst) auf Serin (C₃-Gerüst) übertragen wird. Mutationen in Genen des Transsulfierungswegs führen zur Cysteinauxotrophie (Cherest & Surdin-Kerjan 1992). Obwohl ein Enzym mit in vitro Aktivität für die direkte Bildung von Cystein aus Sulfid und O-Acetylserin bzw. Serin identifiziert wurde (Yamagata 1980). Die reverse Transsulfierung kann auch der Umwandlung von Cystein in Methionin dienen.

Aus Cystein und den zwei Aminosäuren Glutaminsäure und Glycin wird in zwei Schritten das für die Hefe essentielle Tripeptid Glutathion synthetisiert. Die Menge an Glutathion in der Hefezelle entspricht etwa 1 % des Trockengewichts (Elskens *et al.* 1991). Das Glutathion hat so viele wichtige Funktionen, dass die Hefe bei einer kompletten Blockade der Glutathionsynthese auf eine Supplementierung aus dem Medium angewiesen ist.

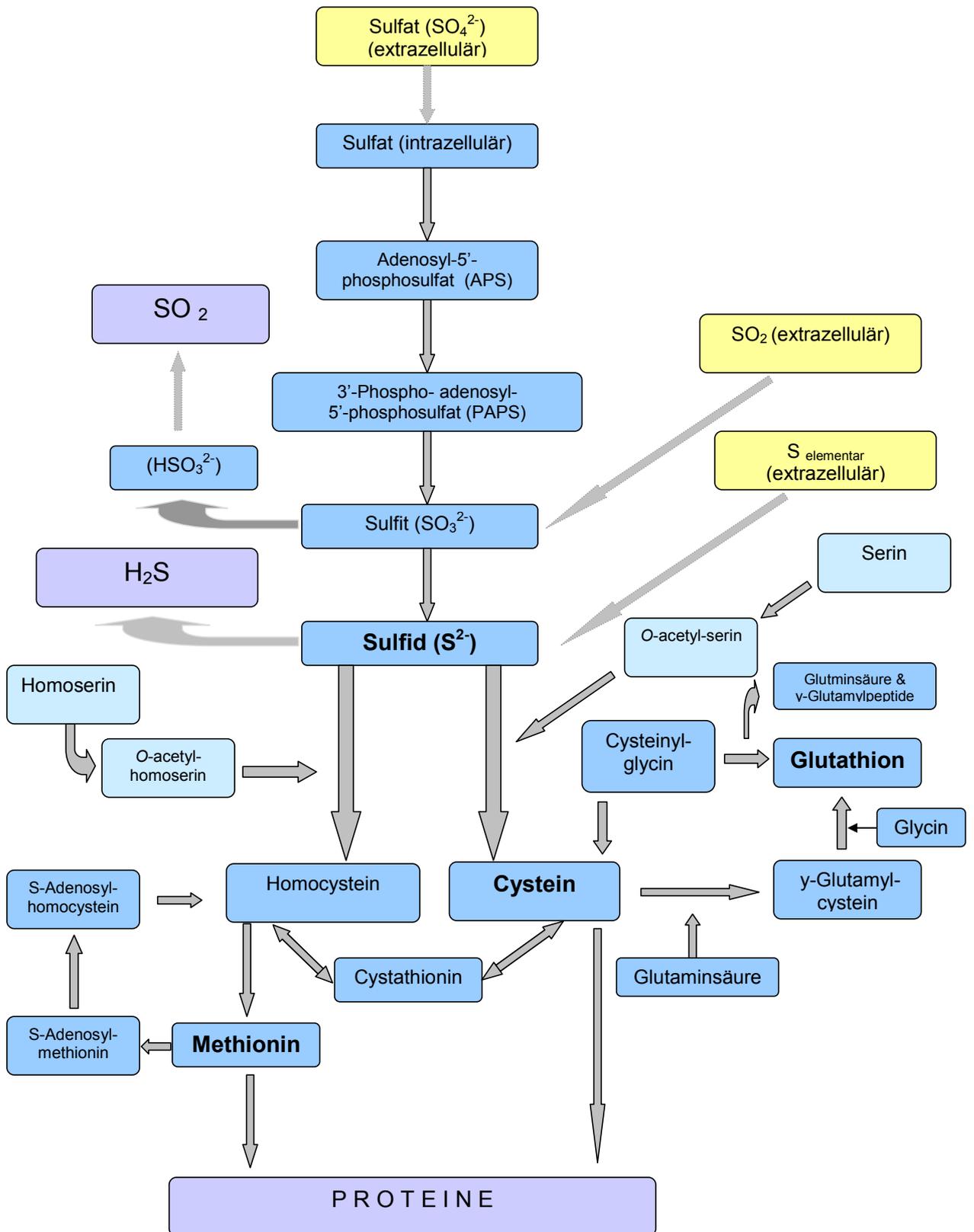


Abbildung 10: Grundzüge des Schwefelstoffwechsels der Hefe und der Synthese schwefelhaltiger Aminosäuren

Quelle: modifiziert nach Henschke & Jiranek (1993), Thomas & Surdin-Kerjan (1997), Wang *et al.* (2003), Bell & Henschke (2005); Rauhut (2009)

Unter Glutathionlimitierung kommt es zu einer drastischen Verringerung der Wachstumsrate (Ohtake & Yabuuchi 1991). Glutathion oder andere Thiole scheinen auch an der enzymatischen Umsetzung der anorganischen Schwefelquelle Thiosulfat beteiligt zu sein (Chauncey & Westley 1983).

Der zu Sulfid reduzierte Schwefel wird für die Synthese der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein verwendet. Diese entstehen durch enzymatische Reaktionen des Sulfids mit stickstoffhaltigen Vorstufen (Rauhut 2009; Ugliano *et al.* 2009). Die Synthese des Cysteins erfolgt, indem im ersten Schritt der Cysteinsynthese das Sulfid durch das Enzym *O*-Acetylhomoserin-*O*-acetylserinsulfhydrylase mit *O*-Acetylhomoserin zu Homocystein verbunden wird. Das Homocystein wird im folgenden Schritt durch die Cystathioninsynthase zu Cystathionin umgebaut. Die Cystathionase katalysiert die Reaktion von Cystathionin zu Cystein. Cystein kann ausschließlich durch den Transsulfurationsweg gebildet werden (Rauhut 2009). Zur Bildung der schwefelhaltigen Aminosäure Methionin dient ebenfalls *O*-acetylhomoserin als stickstoffhaltige Vorstufe. Diese wird durch *O*-acetylserinsulfhydrolase mit Sulfid zu Homocystein verbunden. Durch das Enzym Homocysteinmethyltransferase entsteht aus Homocystein die schwefelhaltige Aminosäure Methionin. Aus Methionin wird Met – tRNA und S – adenosylmethionin gebildet (Rauhut 2009; Ugliano *et al.* 2009).

Die Synthese von Glutathion erfolgt durch die Reaktion von Cystein mit Glutaminsäure zu Glutamylcystein, die durch die Glutamylcystein-Synthase katalysiert wird. Im Folgenden wird dann Glutamylcystein mit Glycin durch die Glutathion-Synthase zu Glutathion umgesetzt (Rauhut *et al.* 1996).

2.4.1.1 Sulfitbildung durch die Hefe

Die Bildung von Sulfit (SO_2) während der alkoholischen Gärung wurde bereits in den 1970er Jahren von zahlreichen Autoren untersucht. Die Beobachtung, dass es Hefestämme mit geringer und mit hoher Sulfitproduktion gibt, führte zu einer genaueren Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Sulfataufnahme, Sulfid- und Sulfitproduktion. Rankine & Pocock (1969) beschrieben die Bildung von SO_2 während der Gärung und die Abbindung von SO_2 in Abhängigkeit vom Hefestamm. Würdig & Schlotter (1970) haben die SO_2 -Bildung in einen direkten Zusammenhang mit der Substratzusammensetzung und der Reduktion von Sulfat gebracht. Eschenbruch & Bonish (1976) untersuchten die Bildung in Abhängigkeit vom pH-Wert. Entsprechend ihren Ergebnissen teilten sie die untersuchten Hefestämme in 3 Gruppen ein. Gruppe 1 mit einer niedrigen Sulfitbildung ($< 25 \text{ mg L}^{-1}$) hat nicht auf eine Veränderung des pH-Wertes reagiert.

Gruppe 2 hatte eine hohe SO_2 Produktion ($> 25 \text{ mg L}^{-1}$), war aber ebenfalls unbeeinflusst bei einer pH-Wert Erhöhung. Die Hefestämme der Gruppe 3 bildeten bei pH 5,0 teilweise doppelt so viel SO_2 wie bei pH 3,0. Umfangreiche Untersuchungen zur Aufnahmekinetik von Sulfat liegen von Maw (1963) und Breton & Surdin-Kerjan (1977) vor. In den Untersuchungen von Maw (1963) wurde ein synthetisches Medium verwendet und die Aufnahme von markiertem $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ durch eine Bierhefe analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Sulfataufnahme mit einer Aufnahmerate von 97,1% wesentlich von der Anwesenheit der Komponenten Glucose, Ammonium, Citrat und Phosphat begünstigt wurde. In Wasser wurden nur 11,2 % aufgenommen. Weitere Untersuchungen zur Aufnahmekinetik von Sulfat bei *Saccharomyces cerevisiae* wurden von Horák *et al.* (1981) durchgeführt. Sie erkannten, dass Ammonium und die Aminosäuren Leucin, Aspartat, Cystein und Methionin einen hemmenden Einfluss auf die Sulfataufnahme haben. Die Aminosäuren Arginin und Lysin und das Kation Kalium (K^+) besitzen hingegen einen stimulierenden Effekt.

2.4.1.2 Regulierung der Sulfidbildung

Die Regulation des Schwefelstoffwechsels bei *S. cerevisiae* ist sehr komplex. Sie orientiert sich an dem Bedarf an schwefelhaltigen Aminosäuren, wobei ein oberstes Ziel die Verhinderung von toxischen Konzentrationen an Sulfit (SO_2) und Sulfid (H_2S) in der Hefezelle ist. Die Hauptregulation erfolgt auf der Ebene der Transkription. Der positive Regulator Met4p und der Repressor Met30p spielen dabei eine Schlüsselrolle (Thomas *et al.* 1992; Thomas *et al.*, 1995). Bei einer niedrigen Konzentration von Methionin bzw. S-Adenosylmethionin in der Zelle werden die MET-Gene der Sulfatassimilation aktiviert. Im Gegenzug kann eine hohe Konzentration an Methionin bzw. S-Adenosylmethionin über den Repressor Met30p diese Aktivierung verhindern. Der Repressor Met30p reprimiert auf die gleiche Weise auch die Expression des Gens der Glucose-6-phosphatdehydrogenase, des ersten Enzyms des Pentosephosphatwegs (Thomas *et al.* 1995). Der Schwefelstoffwechsel steht also in enger Beziehung zu anderen Stoffwechselwegen der Hefezelle. Jiranek *et al.* (1995) berichten, dass unter bestimmten Bedingungen die Möglichkeit einer Steigerung der Sulfidbildung über den Weg der Sulfatreduktion besteht. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn nur eine geringe Menge an Homoserin bzw. O-Acetylhomoserin zum Einbau des Sulfids zur Verfügung steht. So führt der einsetzende Stickstoffmangel während der exponentiellen Phase aufgrund eines generellen Mangels an Aminosäurevorläuferverbindungen zu einer Steigerung der Sulfidbildung. Linderholm *et al.* (2008) erklären, dass die Freisetzung von überflüssigem Sulfid aus der Hefezelle

anschließend zur Bildung von Schwefelwasserstoff (H_2S) führt, da im Gärmedium ein reduktives Milieu in anaeroben Bedingungen und niedrigem pH-Wert herrscht.

Eine zu hohe Konzentration an Threonin im Medium kann über eine Feedback-Hemmung der Aspartatkinase zu einer verringerten Umsetzung von Aspartat zum Homoserin führen. Somit kann letztendlich die Methioninsynthese gehemmt werden. Die daraus resultierende niedrige Konzentration an Methionin- bzw. S-Adenosylmethionin führt zu einer Aktivierung der Expression von sulfat- und sulfitreduzierenden Enzymen. In der Folge wird die Produktion von Sulfit und Schwefelwasserstoff gefördert (Gyllang *et al.* 1989; Korch *et al.* 1991). Je geringer die Methioninmenge im Medium anfangs ist, desto früher und desto stärker kommt es nach einer Reduzierung der Methioninkonzentration zu einer Anhäufung von Sulfid. Da aber Sulfid eine hemmende Wirkung auf die Sulfitreduktase besitzt, kann über die Sulfatreduktion nur eine begrenzte Steigerung der Sulfidbildung erreicht werden (Hansen & Kielland-Brandt 1996).

Außerdem kann die Hefe Thiosulfat zu Sulfid umzusetzen, wozu keine ATP-Aktivierung notwendig ist. Die Nutzung des "Sulfan"-Schwefelatoms von Thiosulfat erfolgt dabei unabhängig von Enzymen des Sulfatreduktionswegs, die Nutzung des "Sulfit"-Schwefelatoms setzt aber eine aktive Sulfitreduktase voraus. Bei Hefen mit einer Störung des Sulfideinbaus durch die O-Acetylhomoserinsulfhydrylase, oder bei Hefen mit einer Mutation im Gen des oben erwähnten Transkriptionsaktivators Met4p, ist die Nutzung einer anorganischen Schwefelquelle wie Thiosulfat nicht möglich (Thomas *et al.* 1992).

Kikuchi (1965) und Stratford & Rose (1985) berichten von ihren Arbeiten, dass die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage ist molekulares Sulfit (SO_2), das als externe Substanz zugegeben wurde, in Schwefelwasserstoff (H_2S) zu überführen. Darüber hinaus kann die Hefezelle SO_2 in einer Konzentration akkumulieren, die weit über der Umgebungskonzentration liegt (Stratford & Rose 1985).

2.4.1.3 Sulfidbildung in Abhängigkeit vom Stickstoff

Sensorisch wahrnehmbare reduktive Noten (im deutschen Sprachgebrauch: Bockser) basieren in erster Linie auf einer verstärkten Bildung von Schwefelwasserstoff (H_2S) während der alkoholischen Gärung (Rankine 1963, Henschke & Jiranek 1991, Rauhut & Kürbel 1994). Durch eine Weiterreaktion mit verschiedenen anderen Metaboliten kann es aber zu einer Vielfalt an unterschiedlichen schwefelhaltigen Aromastoffen kommen (siehe Tabelle 11). Dementsprechend variiieren auch die Ausprägungen des Bockser. Man spricht sowohl vom Schwefelwasserstoffböckser, als auch vom

Mercaptan- und Lagerböckser. Diese sind also von der Zusammensetzung und der Konzentration der verschiedenen schwefelhaltigen Aromastoffe abhängig.

Tabelle 11: Übersicht der verschiedenen schwefelhaltigen Aromastoffe, die den Aromafehler „Böckser“ prägen.

Quelle: Review von Rauhut *et al.* (1995)

Name	Abkürzung	Geruchsschwellenwert ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Attribut
Schwefelwasserstoff	H ₂ S	10 - 80	verfaulte Eier
Methanthiol	MeSH	0,3	Gekochter Kohl, Zwiebel
Ethanthiol	EtSH	1,1	Zwiebel, Gummi
Dimethylsulfid	DMS	25	Spargel, Mais
Dimethyldisulfid	DMDS	15, 29	Gekochter Kohl, Zwiebel
Diethyldisulfid	DEDS	4,3	Knoblauch, verbranntes Gummi
Thioessigsäure-S-methylester	MeSAc	10-40	käseartig
Thioessigsäure-S-ethylester	EtSAc	10-30	schwefelartig, verbrannt

Der in der Literatur meist aufgeführte Grund für die verstärkte Bildung von Schwefelwasserstoff ist der Mangel an assimilierbarem Stickstoff, der zur Störung des Schwefelstoffwechsels der Hefe führt (Jiranek *et al.* 1995, Spiropoulos *et al.* 2000). Durch den Mangel an assimilierbarem Stickstoff können die stickstoffhaltigen Vorstufen, die zur Synthese schwefelhaltiger Aminosäuren benötigt werden nicht ausreichend zur Verfügung gestellt werden, und es kommt zur Anreicherung von Schwefelwasserstoff in der Hefezelle (Henschke & Jiranek 1991, Rauhut 1996). Da Schwefelwasserstoff ein Zellgift darstellt, wird es von der Hefe ausgeschleust (Nowak *et al.* 2004). Im Fall von Stickstoffmangel kann die Hefe, wie in Kapitel 2.3.1.2 beschrieben, schwefelhaltige Komponenten wie Cystein, Methionin oder Glutathion intrazellulär abbauen (Jiranek *et al.* 1995). Der enthaltene Stickstoff wird zur Synthese

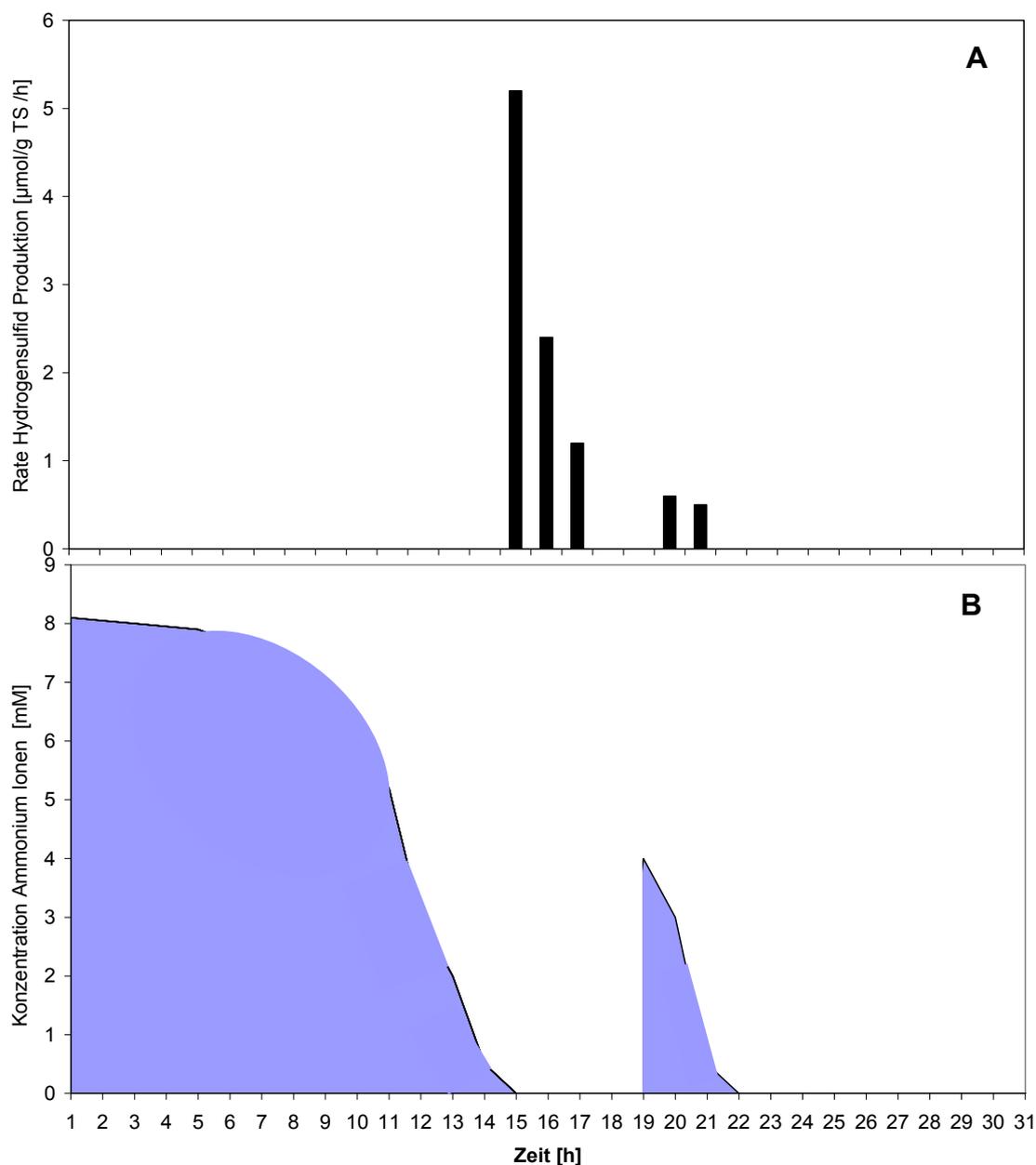


Abbildung 11: Bildung von Schwefelwasserstoff in Abhängigkeit der Ammoniumzugabe

Diagramm A zeigt die Stärke der Schwefelwasserstoffbildung H_2S durch die Hefe. Diagramm B zeigt die Konzentration von Ammonium im Gärsubstrat Most. Am 19. Tag erfolgt eine neue Zugabe von Ammonium in den Most. Quelle: modifiziert nach Jiraneck *et al.* (1995)

von benötigten Aminosäuren eingesetzt, wobei der anfallende Schwefel über Schwefelwasserstoff (H_2S) entsorgt wird. Auch Rauhut (2009) stellte einen Zusammenhang zwischen hohen Glutathionkonzentrationen ($> 50 \text{ mg L}^{-1}$) und H_2S -Bildung während der alkoholischen Gärung fest.

Mit dem Mangel an assimilierbarem Stickstoff ist meist auch ein Mangel der Mikronährstoffe Pantothensäure und Pyridoxin verbunden, der ebenfalls zur verstärkten Bildung von Schwefelwasserstoff beiträgt (Edwards & Bohlscheid 2007). Die zahlreichen Publikationen über die Bildung reduktiver Noten aufgrund von Stickstoffmangel dürfen nicht verschleiern, dass auch hohe Stickstoffkonzentrationen immer wieder zu einer erhöhten H₂S-Bildung führen. Ugliano et al (2009) stellte in Versuchen fest, dass es bei einem stickstoffunversorgten Most (YAN 110 mg L⁻¹) zu Beginn der Gärung zur Schwefelwasserstoffbildung kam. Bei höheren Stickstoffwerten im gleichen Most (YAN 260 mg L⁻¹) wurden aber mit etwas Verzögerung noch höhere Schwefelwasserstoffkonzentrationen gemessen. Erst bei wiederum höheren Stickstoffgehalten (YAN 419 mg L⁻¹) nahm die Schwefelwasserstoffbildung wieder ab. Jiranek *et al.* (1995) beschreiben Ergebnisse, in denen die H₂S Bildung in der alkoholischen Gärung erst einsetzte, nachdem die zugesetzte Menge DAHP aufgebraucht war. Bei erneuter Zugabe nahm die H₂S Bildung wieder ab. Als die zweite Gabe DAHP jedoch aufgebraucht war, verstärkte sich die H₂S Bildung wieder, wie in Abbildung 11 dargestellt.

Eine aktuelle Publikation von Butzke & Park (2011) kommt ebenfalls zu dem Schluss, dass eine hohe Konzentration an verfügbarem Stickstoff nicht zwangsläufig die H₂S Bildung verhindern kann. Außerdem sahen sie eine starke Abhängigkeit vom vergärenden Hefestamm und erhielten das Ergebnis, dass die H₂S Bildung der Hefe bei einer hohen Zugabe von DAHP am Anfang der Gärung höher ist als bei einer vergleichbaren natürlichen Stickstoffkonzentration im Most. Die Autoren Butzke und Park ziehen die Schlussfolgerung, dass der enzymatische Reaktionsweg der H₂S-Bildung und die genetische Expression der Enzyme entscheidend sei. Der einzelne Hefestamm und seine individuelle Enzymrepression entscheiden bezüglich des Sulfat Reduktionsweges oder der direkten Sulfitreduktion darüber, zu welchem Grad Sulfat oder Sulfit zur H₂S-Bildung beitragen. In jedem Fall könne der Mostzusammensetzung der größte Einfluss auf die Expression des Enzymsystems, das zur H₂S Bildung führt, zugesprochen werden. Kumar *et al.* (2010) untersuchten 170 Hefestämme auf ihre Neigung H₂S zu produzieren. Im Zuge der Clusteranalyse ließen sich 14 unterschiedliche Gruppen von Hefen differenzieren. Die Untersuchung zeigte jedoch keine hohe Korrelation zwischen der H₂S Bildung und dem Stickstoffgehalt im Gärmedium.

2.4.1.4 Sulfidbildung durch Netzschwefel

Der Einsatz von Schwefel im Kampf gegen Weinbergsschädlinge, vor allem *Oidium tuckeri*, hat eine lange Geschichte. Die moderne Formulierung des Netzschwefels (Zusammensetzung 80 % elementarer Schwefel, 20 % Ligninsulfonat als Netz- und Haftmittel) hat dazu beigetragen, die Applikation zu verbessern und die Aufwandmengen zu verringern. Netzschwefel dringt leicht in die Zellmembranen der Pilzsporen von *Oidium tuckeri* ein und tötet die Zellen von innen ab. Die Wirksamkeit der Netzschwefelanwendung ist von der Konzentration des elementaren Schwefels in der Dampfphase und von der Temperatur abhängig. Außerdem ist es wichtig, dass die Schwefelteilchen gleichmäßig auf dem Blatt verteilt sind. Das Verhalten des Netzschwefels nach der Aufbringung auf den Blättern ist besser untersucht als auf den Trauben (Emmett 2003). Hill *et al.* (2010) weisen aber darauf hin, dass eine ausreichende Belagsmenge auf den Trauben erst ab 8 kg Netzschwefel pro Hektar erreicht werden kann.

Die Fähigkeit der Weinhefe, elementaren Schwefel zu Schwefelwasserstoff zu reduzieren birgt jedoch ein Risiko für die Sensorik des Weines und wurde bereits seit den 1960er Jahren von verschiedenen Autoren untersucht (Rankine 1963, Acree *et al.* 1972, Schutz & Kunkel 1977, Thomas *et al.* 1993). Die nachweisbaren Netzschwefelrückstände im Traubenmost variieren sehr stark. Sie sind abhängig von zahlreichen Faktoren, wie der Anzahl der Applikationen, der Aufwandmenge pro Hektar und dem Witterungsverlauf. Daher ist in Deutschland nach der letzten Netzschwefelapplikation eine Wartezeit von 56 Tagen bis zur Lese veranschlagt. Auch die weitere Verarbeitungsweise der Trauben wie beispielsweise die Dauer der Maischestandzeit, die mechanische Belastung der Maische und die Schärfe der Mostvorklärung beeinflussen die Konzentration (Lemperle & Lay 1989). Lange Zeit waren jedoch die Schwefelrückstandsmengen auf Traubenbeeren und die Menge an Schwefel, die nach dem Pressen der Trauben im Most vorliegen, unbekannt.

Erste Angaben über Schwefelrückstände auf Traubenbeeren stammen von Lemperle (1978 in: Wenzel & Dittrich 1978). Er berichtete von Schwefelrückständen auf gelesenen Trauben nach 8 Applikationen und einer Wartezeit von 49 Tagen, die bei 5 - 8 ppm lag. Die Entwicklung der Schwefelkonzentration auf den Trauben vom Zeitpunkt der Abschluss-spritzung bis zur Lese und den Übergang der Rückstände in den Traubenmost beschrieben erstmals Wenzel *et al.* (1980). In ihren Versuchen konnten

sie zeigen, dass von der Abschluss-spritzung bis zur Lese die Schwefelrückstände auf den Trauben durchschnittlich um 68 % abnahmen. Das Abwaschen von den Trauben sei aber immer witterungsabhängig. Gleichzeitig untersuchten sie den Übergang des Netzschwefels von der Traube in den Most. Der Übergang ist sehr stark abhängig von der Presstechnik. Bei der von Wenzel *et al.* (1980) verwendeten Methode belief sich die in den Most gelangte Netzschwefelmenge auf ca. 60 % der auf den Trauben befindlichen Rückstandsmenge. Nach 24 h Sedimentation waren schließlich nur noch ca. 10 % der im Most befindlichen Netzschwefelmenge nachweisbar. Die Schwefelrückstände auf den Traubenbeeren betragen 0,6 - 5,3 mg kg⁻¹ Traubenbeeren bei einer normalen Spritzfolge gegen Echten Mehltau (6 Applikationen). Die trüben Moste enthielten 0,3 - 8,9 mg L⁻¹ elementaren Schwefel. Thomas *et al.* (1993) berichten von Schwefelrückständen nach der letzten Applikation von 7,9 – 13,6 µg g⁻¹ Beere und einer Reduktion des Schwefelrückstandes bis zum Zeitpunkt der Lese auf 2,3 - 3 µg g⁻¹ Beere.

Wenzel *et al.* (1980) berichten auch von dem eindeutigen Ergebnis, dass Jungweine, die von Netzschwefel- behandelten Trauben und aus nicht zentrifugiertem Most stammten, wesentlich mehr Schwefelwasserstoff enthielten, als Jungweine aus unbehandelten Trauben. In weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass das Zentrifugieren den entscheidenden Unterschied zur Verhinderung des H₂S- Böckers machte. Ihre Versuchsergebnisse ergaben, dass es bei Schwefelrückständen über 1 mg L⁻¹ zu einer erhöhten Schwefelwasserstoffkonzentration im Jungwein kommt. Nach Rauhut & Kürbel (1994) sind 3 – 5 mg L⁻¹ Netzschwefel ausreichend, um einen Böckser in deutlicher Ausprägung zu erhalten.

Die Netzschwefelrückstände können bei korrekter Applikationstechnik und durch moderne kellerwirtschaftliche Verfahren der Mostvorklärung stark minimiert werden. Die erwähnten Arbeiten belegen jedoch, dass selbst geringste Mengen einen Einfluss auf die Aromatik des Weines haben können.

2.4.1.5 Böckserbildung während der Flaschenlagerung

Neben der Entstehung von niedrig siedenden Schwefelverbindungen während der alkoholischen Gärung gibt es auch das Phänomen, daß reduktive Aromaten nach der Flaschenfüllung auftreten können. Schwefelwasserstoff kann im Jungwein zu weiteren, ebenfalls übel riechenden Aromaverbindungen weiter reagieren. Da sie aber einen höheren Geruchsschwellenwert besitzen (siehe Tabelle 12), sind diese oft nicht sofort wahrnehmbar. Darüber hinaus können viele dieser Komponenten nicht durch

kupferhaltige Schönungsmittel entfernt werden. Abbildung 12 gibt einen Überblick über die Reaktionszusammenhänge dieser Substanzen. S-haltige Ausgangssubstrate werden über den Sulfat Reduktionsweg in die Hefe aufgenommen und im weiteren Verlauf reduziert. Wenn Schwefelwasserstoff entsteht, wird dieser aus der Hefezelle geschleust und an die Umgebung abgegeben, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben. Bei ungestörten Gärungen wird das Schwefelwasserstoffgas bis auf kleine Restmengen von der Gärungskohlensäure ausgetrieben. Der Geruchsschwellenwert von H_2S liegt im Wein bei $10\text{-}80 \mu\text{g L}^{-1}$ (Rauhut *et al.* 1995). Schon während der Vergärung und im Jungwein kann Schwefelwasserstoff mit Alkohol zu Thioalkoholen (z.B. Methylmercaptan und Ethylmercaptan) reagieren. Diese Substanzen werden mit den Attributen "Zwiebel" und "verbranntem Gummi" beschrieben. Ein Überblick über diese Substanzen wird in Tabelle 12 gegeben. Durch Oxidation reagieren die Mercaptane weiter zu Disulfiden (z.B. Dimethylsulfid, Diethylsulfid oder Methylethylsulfid) die mit den Attributen "grüner Spargel" oder "Kochton" assoziiert werden. Kupferionen, die in Form von Kupfersulfat oder Kupfercitrat gemäß Verordnung (EG) 606/2009 zur Bockserentfernung eingesetzt werden können, sind gegenüber diesen Substanzen wirkungslos. Aus Thioalkohol und Essigsäure können vermutlich auch Thioessigsäure-S-ester entstehen, so z.B. Thioessigsäure-S-ethylester. Der genaue Reaktionsweg ist nicht vollständig aufgeklärt. Der Geruchsschwellenwert liegt bei diesen Ethylestern oberhalb des Geruchsschwellenwertes von H_2S , so dass sie sensorisch nicht so leicht im Wein erkannt werden können. Wenn diese Substanzen in einem bereits abgefüllten Wein vorhanden sind, kann sich auch im Verlauf der Flaschenlagerung eine Bocksernote einstellen. Durch Hydrolyse können aus der Esterverbindung wieder übelriechende Mercaptane entstehen. Diese Reaktion ist die Erklärung für erneute Bockser, die trotz einer Kupferschönung im Jungwein auftreten können. Diese Reaktion wird laut Limmer (2005) vom Schraubverschluss begünstigt, da in diesem Fall ein niedriges Redoxpotential von circa 150 mV in der Flasche herrscht. Eine signifikante Zunahme dieses Phänomens wird auch von Cowey (2008) bei der Verwendung von Schraubverschlüssen anstelle von natürlichen Korken beschrieben. Da weltweit immer mehr Schraubverschlüsse zum Einsatz kommen, wird diese Substanzgruppe zukünftig noch an Bedeutung zunehmen. Die teilweise praktizierte Zugabe einer minimalen Kupfergabe vor der Füllung ist allgemein nicht zu empfehlen, da Kupferionen oxidative Reaktionen als Cofaktor beschleunigen können (Ugliano *et al.* 2009).

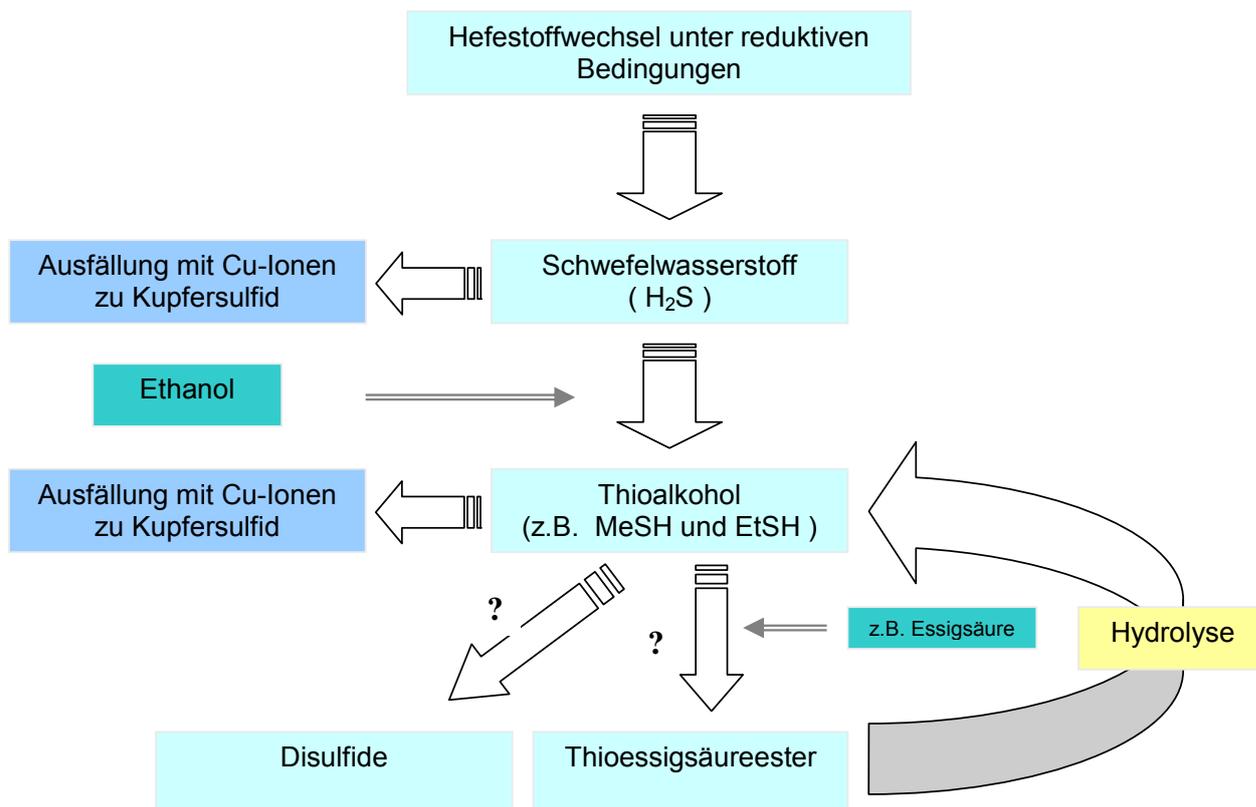


Abbildung 12: Schwefelwasserstoff (H₂S) und seine Reaktionsprodukte im Jungwein

Die Abbildung zeigt die Möglichkeit der Bockserentfernung durch Kupfer und die Möglichkeit der verzögerten Bockserbildung bei der Alterung von Wein unter reduktiven Bedingungen in der Flasche. Die Bildung von flüchtigen Schwefelkomponenten ist laut (Hébert *et al.* 2011) im Detail noch ungeklärt. Die Fragezeichen zeigen, dass die verantwortlichen Enzyme noch nicht zugeordnet werden konnten.

2.4.1.6 Möglichkeiten der Bockserbeseitigung

Um Bockser zu verhindern, ist es zu empfehlen die bekannten Ursachen, die in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben wurden, zu beachten. Neben einer angemessenen Mostvorklärung zur Abtrennung von Netzschwefelrückständen, sollte eine angepasste Nährstoffgabe erfolgen. Ziel ist es, die Hefe nicht in eine Stresssituation bezüglich ihrer Stickstoffversorgung zu versetzen. Neben diesen prophylaktischen Maßnahmen gibt es die kurativen Maßnahmen der Belüftung bei leichten reduktiven Noten (Funk 2001) und der Schönung mit Kupfersulfat oder Kupfercitrat (Görtges 2009). Aktuell wird auch die Zulassung von Silberchlorid zur Schönung von der Internationalen Organisation der Reben und des Weines (OIV) diskutiert. In der Schweiz ist Silberchlorid zur Bockserentfernung bereits zugelassen (Schweizer Weinverordnung). Bei der Belüftung wird der Schwefelwasserstoff zu

Schwefel und Wasser oxidiert. Diese Maßnahme ist jedoch nur bei sehr leichten reduktiven Noten zu empfehlen. Wenn bereits Thioalkohole vorhanden sind, können diese mit Sauerstoff zu Methyl- oder Diethylsulfid reagieren und sind dann nicht mehr mithilfe einer Kupferbehandlung zu entfernen. Gleiches gilt auch für Thioessigsäure-S-ester. Bei der Kupferbehandlung sind Vorversuche unbedingt zu empfehlen, da es einen gesetzlichen Grenzwert für Kupferionen (Cu^{++}) im Wein von 1 mg L^{-1} gibt. Kupfersulfat reagiert mit H_2S und Mercaptanen zu schwer löslichem Kupfersulfid und fällt als schwarzer Niederschlag aus.

2.4.1.7 Sulfidbildung als Entgiftungsstrategie in der Hefezelle

Die vermehrte Bildung von Schwefelwasserstoff (H_2S) aus anorganischen Schwefelverbindungen während der alkoholischen Gärung von Wein und Bier beeinflusst die Sensorik meist negativ. Für die Hefezelle stellt dieser Prozess aber in zweifacher Hinsicht eine Entgiftung dar. Schwefelwasserstoff, der sich in der Hefezelle befindet, ist in höherer Konzentration toxisch. Sie kann also über die Freisetzung von Schwefelwasserstoff regulierend eingreifen. Für die Hefe hat die Freisetzung außerdem den Vorteil, daß toxische Schwermetalle (z.B. Kupfer, Cadmium, etc.) als S-haltige Komplexe ausgefällt werden und zu Boden sinken. Bei der Reaktion von H_2S und Kupferionen bildet sich Kupfersulfid, das als schwarze Ausfällung zu Boden sinkt. Während der weiteren Verarbeitung des Weines werden diese Komplexe mit der sedimentierten Hefe abgetrennt und aus dem Wein entfernt. Die Bildung von S-haltigen Komplexen, die unter physiologischen Bedingungen nahezu unlöslich sind, unterstützt die bei Eukaryonten übliche Strategie, die Konzentration freier Metalle im Cytosol möglichst niedrig zu halten.

2.4.2 Funktion des Tripeptids Glutathion

Glutathion (GSH; γ -L-glutamyl-L-cystinylglycine) ist ein Tripeptid, das aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin aufgebaut ist, die über Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Die Struktur von Glutathion ist in Abbildung 14 dargestellt. Es kommt in fast allen lebenden Zellen vor. In Hefen wurde Glutathion 1921 von Hopkins und Kendall entdeckt (Kockova-Kratochvilova 1990). Glutathion ist ein natürliches Antioxidans und besitzt ein höheres antioxidatives Potential als andere in der Lebensmittelindustrie bekannte Substanzen, die in Abbildung 13 beschrieben sind. GSH hat im Wesentlichen drei Funktionen. Erstens wirkt es als Antioxidans und hat somit eine sehr wichtige Rolle im nicht-enzymatischen Verteidigungssystem der Hefe. Es dient in der Hefezelle als Radikalfänger für reaktive

Sauerstoffspezies (ROS), auch „freie Radikale“ genannt. Die freien Radikale entstehen während der Zellatmung und können zahlreiche Zellbestandteile wie die DNA, Lipide und Proteine zerstören.

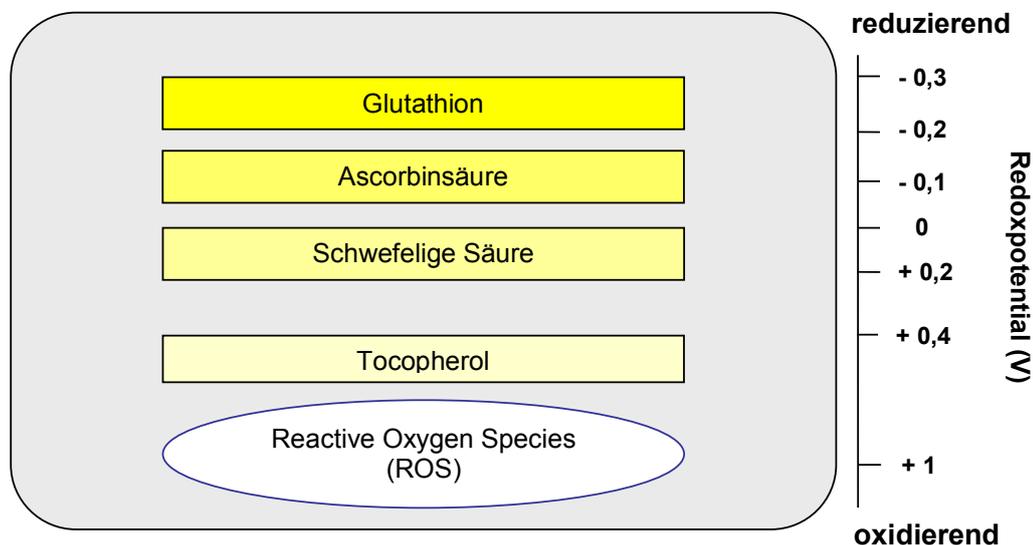


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Redoxpotentials ausgewählter Substanzen.

Antioxidantien kommen sowohl in lebenden Zellen vor, als auch in Form von Zusätzen in Lebensmitteln. Diese Reduktionsmittel haben ein sehr niedriges Redox-Potential. Sie werden leichter oxidiert als die zu schützende Substanz (z.B. Aromastoffe). Die dargestellten Standardpotentiale bei pH 7 und 25 °C betragen: Tocopherol: + 0,48 V (α -Tocopheryloxy/ α -Tocopherol), schwefelige Säure: + 0,12 V, Ascorbinsäure: - 0,1 V (Dehydroascorbat/Ascorbat), Glutathion: - 0,24 V (Glutathion/Glutathiondisulfid).
Quelle: modifiziert nach: Foyer & Noctor (2005), Aslund et al. (1997), Buettner (1993), Sonni et al (2011)

In seiner Funktion als Radikalfänger wird Glutathion (GSH) oxidiert und geht von seiner monomeren Form in ein Dimer (GSSG) über. Die freie Thiolgruppe des Glutathions (Abb. 14) ermöglicht die Übertragung von Elektronen auf die freien Radikale, wodurch diese unschädlich gemacht werden.

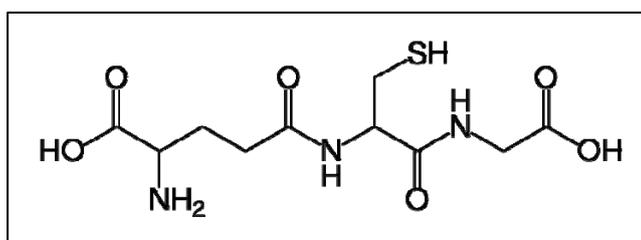


Abbildung 14: Struktur des Tripeptids Glutathion (GSH)

Dabei oxidieren jeweils zwei Glutathion-Moleküle (GSH) und verbinden sich unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zu Glutathion-Disulfid (GSSG). Durch das Enzym Glutathionreduktase können aus dem Dimer (GSSG) unter Verbrauch von NADPH wieder zwei reduzierte Moleküle GSH hergestellt werden.

Durch die Aktivität der Glutathionreduktase kann ein ausgeglichenes Verhältnis von GSH und GSSG in der Zelle aufrecht gehalten werden.

In seiner zweiten Funktion ist Glutathion Teil eines Entgiftungsmechanismus als Reaktion auf die Anwesenheit von Schwermetallen. In Pflanzen, Algen und Pilzen dient das Glutathion als Substrat für die Synthese von Phytochelatinen, die wie Metallothioneine eine wichtige Rolle bei der Bindung von Schwermetallen spielen (Zenk 1996). Genauso wie Glutathion bestehen Phytochelatine aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Phytochelatine entstehen durch die enzymatische Spaltung eines Glutathion-Moleküls. Glycin wird dabei abgespalten und ein weiteres Glutathion-Molekül angehängt. Das einfachste Phytochelatin besitzt daher die Struktur γ Glu-Cys- γ Glu-Cys-Gly. Die Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins bindet an die Metall-Ionen und gemeinsam werden sie in die Vakuole der Hefezelle transportiert. In der Vakuole sind die Schwermetalle vom Stoffwechsel im Cytosol abgeschirmt, so dass sie dort nicht die enzymatischen Reaktionen des Stoffwechsels stören können (Sandermann 1992). Sie können aber auch aus der Zelle heraustransportiert werden.

In seiner dritten Funktion dient Glutathion innerhalb des Schwefelstoffwechsels als Reservestoff für Schwefel und Stickstoff, wobei besonders die Komponente Cystein unentbehrlich für die Proteinbiosynthese ist. Glutathion wird erst in einer absoluten Mangelsituation von der Hefe abgebaut, um die Lebensfunktionen der Hefezelle aufrechtzuerhalten (Rauhut 2009). Während des Hefewachstums in einem ausreichend mit Stickstoff versorgten Medium befindet sich das Glutathion zu je 50 % im Cytoplasma und in der Vakuole der Hefezelle. Mehdi & Penninckx (1997) berichten von Untersuchungen, bei denen infolge von starkem Stickstoffmangel mehr als 90 % des Glutathions in die Vakuole der Hefezelle transportiert wurden. Rauhut (2009) berichtet von Versuchen mit zugesetztem Glutathion während der alkoholischen Gärung, bei denen es zur Bildung von Schwefelwasserstoff gekommen ist. Das im Most vorkommende Glutathion kann durch zwei Transportsysteme in die Hefezelle aufgenommen und von der Hefe als Stickstoff- oder Schwefelquelle genutzt werden. Dies erklärt die Entstehung flüchtiger Schwefelkomponenten (z.B. H_2S) unter bestimmten Bedingungen nach Anreicherung von Glutathion im Most, wie von Rauhut (2009) berichtet. Auch Hallinan *et al.* (1999) schildern den Zusammenhang von

Glutathion und H₂S-Bildung unter bestimmten Bedingungen. Natürlicherweise kommt Glutathion im Traubenmost in Konzentrationen von 14 – 102 mg L⁻¹ vor (Cheynier *et al.* 1989). Dubourdieu (2002) berichtet von Glutathion Konzentrationen bis 30 mg L⁻¹ in französischen Sauvignon blanc Mosten.

2.4.2.1 Grape Reaction Product

Im Most hat Glutathion Einfluss auf Bräunungsreaktionen, indem die Thiolgruppe des Cysteins mit Chinonen zum farblosen „Grape Reaction Product“ (GRP) reagiert. Chinone entstehen durch enzymatische Oxidation eines Phenols (z.B. Kaftarsäure) und sind für die Braunfärbung des Mostes verantwortlich. Sie können im Most oder Wein mit Glutathion reagieren. Die mit Glutathion gebundene Form (S-glutathionyl-2-*trans*-cafeoyltartaricacid) heißt Grape Reaction Product. Das Grape Reaction Product beendet den Oxidationsprozess und limitiert somit die Oxidation des Mostes oder Weines (Cheynier *et al.* 1988). In Anwesenheit von Laccase, der Polyphenoloxidase des Pilzes *Botrytis* ist das Grape Reaction Product oxidierbar, nicht jedoch durch Thyrosinase, der traubeneigenen Polyphenoloxidase (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006).

Dubourdieu und Lavigne-Cruege (2002) (zitiert in Rauhut 2009) beschreiben, dass Glutathion eine wichtige Rolle spielt beim Erhalt von flüchtigen Thiolen (Rebsortencharakteristik von z.B. Sauvignon blanc) während der Alterung abgefüllter Weißweine. Somit könnten Hefestämme mit einer höheren Bildung und Freigabe von Glutathion während der Gärung und der Hefelagerung zur Stabilisierung von flüchtigen Thiolen und zur Vorbeugung von Bräunungsreaktionen in einem gewissem Umfang beitragen. Bei Sauvignon blanc Weinen verhindert beispielsweise der Zusatz von 10 mg L⁻¹ Glutathion vor der Flaschenfüllung Bräunungsreaktionen, den Verlust der Sortentypizität sowie die Entstehung des untypischen Alterungstons (Dubourdieu 2002). Patel *et al.* (2010) untersuchten den Einfluss von Glutathion auf den Gehalt an Thiolverbindungen im Wein. Du Toit *et al.* (2007) untersuchten den Glutathiongehalt im Most bei verschiedenen Sauerstoffeinträgen.

In Hefezellen kommt Glutathion in Konzentrationen bis zu 10 mM pro Hefezelle vor (Elskens *et al.* 1991, Mehdi & Penninckx 1997, zitiert in Rauhut 2009).

3 MATERIAL

In dieser Arbeit werden die beiden Themenbereiche **Nährstoffversorgung der Hefe und Aromabildung** und **schwefelhaltige Metabolite** unter oenologischen Gesichtspunkten behandelt. Beide Themenbereiche beinhalten mehrere Versuchsanstellungen, die entweder im Labormaßstab, im Kleinausbau oder als Feldversuch durchgeführt wurden. Als Gärmedium wurde stets natürlicher Traubenmost der Forschungsanstalt Geisenheim verwendet. Die Basisanalyse der Moste ist in Tabelle 13 und Tabelle 21-23 zu finden. Eine Übersicht zur thematischen Beziehung der Versuchsanstellungen ist in Abbildung 15 zu sehen. Der Aufbau der einzelnen Versuche wird in den folgenden Unterkapiteln in einer Skizze dargestellt und kurz erläutert.

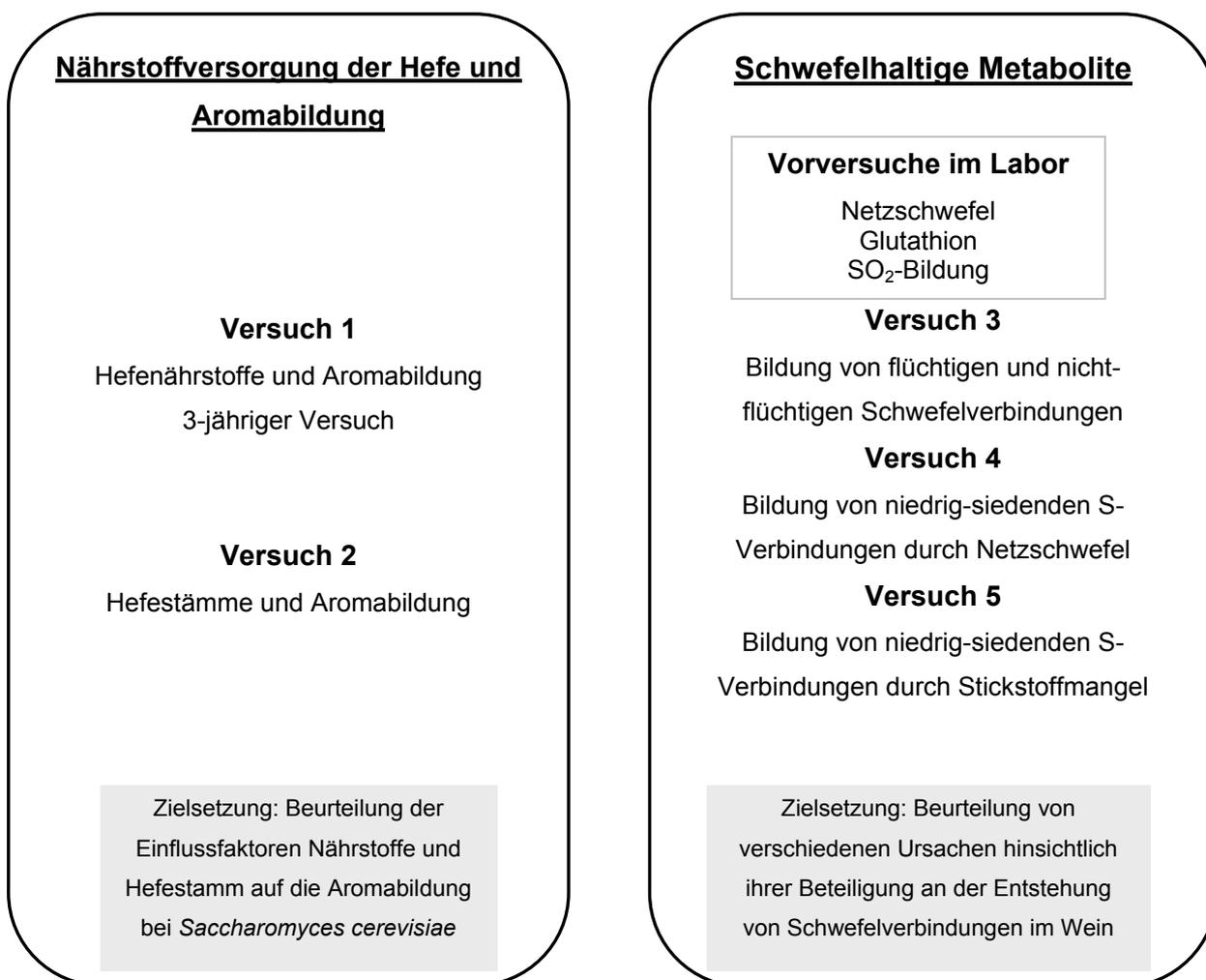


Abbildung 15: Thematische Beziehung der einzelnen Versuchsanstellungen

3.1 Themenbereich „Nährstoffversorgung der Hefe und Aromabildung“

3.1.1 Aufbau Versuch 1: Hefenährstoffe

Dieser 3-jährige Vinifikationsversuch ermittelte die Auswirkung von Hefenährstoffen auf die Gäraktivität der Hefe und die Aromastuktur des Weines. Dazu wurden in drei Jahren relativ stickstoffarme natürliche Rieslingmoste aus den Parzellen der Forschungsanstalt Geisenheim ausgewählt und unter gleichen Bedingungen mit der gleichen kommerziellen Hefe vergoren. Die insgesamt 18 Nährstoff-Varianten, die eine unterschiedliche Nährstoffzusammensetzung des Gärsubstrates Most herbeiführten, sind im Detail aus Tabelle 12 zu entnehmen. Die Vergärung erfolgte in allen Jahren in Glasballons mit 25 Liter Inhalt, in die jeweils 22 Liter Riesling Most gefüllt wurden. Als Verschluss diente ein mit Wasser gefüllter Gäraufsatz, durch den das während der Gärung entstehende CO₂ entweichen konnte. Die äußeren Bedingungen während der gesamten Gärung waren für alle Gärballons gleich, die Umgebungstemperatur wurde auf 18° C reguliert. Abbildung 16 zeigt die Skizze des 3-jährigen Nährstoffversuchs, Tabelle 12 und 14a definieren die Nährstoffvarianten im Detail.

Natürlicher Cool Climate Riesling Most																		
Versuchsvarianten																		
Jahr 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Jahr 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Jahr 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Alkoholische Gärung mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> bei 18°C																		
Analytik																		

Abbildung 16: Aufbau Versuch 1

Tabelle 12: Versuch 1: Nährstoffvarianten 1-18

1	Kontrolle (ohne Zusätze)
2	Diammoniumhydrogenphosphat (1 g L^{-1} am Anfang), Hefezellwände ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), Thiamin ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$)
3	Diammoniumhydrogenphosphat ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) am Anfang der Gärung
4*	Diammoniumhydrogenphosphat ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) am Anfang der Gärung und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei 1/3 der Gärung
5*	Diammoniumhydrogenphosphat ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) am Anfang der Gärung und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei 1/3 der Gärung, Hefezellwände ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), Thiamin ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$)
6	Thiamin ($1,2 \text{ mg L}^{-1}$) (hohe Konzentration)
7	Aminosäure Glutamin (200 mg L^{-1})
8	Aminosäure Arginin (250 mg L^{-1})
9	Aminosäuren: Glutamin (200 mg L^{-1}), Arginin (250 mg L^{-1})
10	Mineralstoffe: Zink (2 mg L^{-1}) und Magnesium (100 mg L^{-1})
11	Vitamine: Pantothersäure (1 mg L^{-1}) und Folsäure ($1,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$)
12*	Diammoniumhydrogenphosphat ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) am Anfang der Gärung und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei 1/3 der Gärung, Hefezellwände ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), Thiamin ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$) Glutamin (200 mg L^{-1}), Arginin (250 mg L^{-1}) Zink (2 mg L^{-1}) und Magnesium (100 mg L^{-1}) Pantothersäure (1 mg L^{-1}) und Folsäure ($1,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$)
13*	Diammoniumhydrogenphosphat $0,5 \text{ g L}^{-1}$ am Anfang der Gärung und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei 1/3 der Gärung, Hefezellwände ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), Thiamin ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$) Hefepräparat A zum Aromaschutz ($0,5 \text{ g L}^{-1}$)
14*	Diammoniumhydrogenphosphat $0,5 \text{ g L}^{-1}$ am Anfang der Gärung und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei 1/3 der Gärung, Hefezellwände ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), Thiamin ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$) Glutamin (200 mg L^{-1}), Arginin (250 mg L^{-1}), Zink (2 mg L^{-1}) und Magnesium (100 mg L^{-1}), Pantothersäure (1 mg L^{-1}) und Folsäure ($1,5 \text{ } \mu\text{g/L}$) Hefepräparat A zum Aromaschutz ($0,5 \text{ g L}^{-1}$)
15	Hefepräparat B zur Rehydratation der Trockenreinzuchthefen ($0,3 \text{ g L}^{-1}$)
16*	Hefepräparat B zur Rehydratation der Trockenreinzuchthefen ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) Diammoniumhydrogenphosphat $0,5 \text{ g L}^{-1}$ am Anfang der Gärung und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei 1/3 der Gärung, Hefezellwände ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), Thiamin ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$), Hefepräparat A zum Aromaschutz ($0,5 \text{ g L}^{-1}$)
17	Hefepräparat C zur Förderung der Gäraktivität ($0,4 \text{ g L}^{-1}$)
18	Hefepräparat B zur Rehydratation der Trockenreinzuchthefen ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) Hefepräparat C zur Förderung der Gäraktivität ($0,4 \text{ g L}^{-1}$)

Quelle: modifiziert nach Rauhut (2005)

Bei den mit * gekennzeichneten Varianten entfiel die zweite Ammoniumgabe ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) im Jahr 2.

Most

Der 3-jährige Versuch wurde mit Most der Rebsorte Riesling (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) aus den Jahrgängen 2004, 2005 und 2008 durchgeführt. Um den Einfluss wilder Hefen auszuschließen, wurde der Most pasteurisiert. Die Analysedaten sind der Tabelle 13 zu entnehmen. Der Vitamingehalt im Most in den Jahren 1 und 2 ist der Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 13: Analysedaten (FTIR) Most der Versuchsjahre 1, 2 und 3.

Parameter:	Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3
Reduzierende Zucker [g L ⁻¹]	230,0	226	193
Gesamtsäure [g L ⁻¹]	9,6	8,0	10,2
Weinsäure [g L ⁻¹]	5,7	5,5	8,5
Äpfelsäure [g L ⁻¹]	4,25	2,9	1,3
Milchsäure [g L ⁻¹]	0,35	0,7	n.n.
Flüchtige Säure [g L ⁻¹]	n.n.	n.n.	n.n.
pH-Wert	3,12	3,2	2,8
Alkohol [g L ⁻¹]	1,2	0,5	0,2
Glycerin [g L ⁻¹]	0,9	0,9	1,5
Gluconsäure [g L ⁻¹]	0,2	0,7	0,5
Freies Ammonium [g L ⁻¹]	43	40	20
NOPA	158	82	70

Reinzuchthefer

Die verwendete Hefe ist ein selektionierter Trockenreinzuchthefestamm der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*, der gleichermaßen für die Rot- und Weißweibereitung eingesetzt werden kann. Die Hefe ist für alle Maischen und Moste geeignet, zeigt einen günstigen Gärverlauf und einen hohen Endvergärungsgrad von bis zu 14 %vol Alkohol.

Tabelle 14: Liste der Zusätze in Versuch 1 und Versuch 3

a	Versuch 1		Zugabeform	Summenformel	
	Stickstoffquelle	DAHP	Diammonium- hydrogenphosphat	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	
		L-Arginin		$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	
		L-Glutamin		$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$	
	Spurenelemente	Magnesium	Magnesiumsulphat- heptahydrat	$\text{Mg O}_4\text{S} * 7 \text{ H}_2\text{O}$	
		Zink	Zinksulfat- heptahydrat	$\text{Zn SO}_4 * 7 \text{ H}_2\text{O}$	
	Vitamine	Folsäure	Folsäure		
		Pantothensäure	Calcium D (+) – pantothenat		
		Thiamin	Thiaminchlorid- hydrochlorid		
	Hefepräparate		Funktion:		
		Hefezellwände	Adsorption von gärhemmenden Fettsäuren, Pestiziden. Eintrag von Sterolen		
		Präparat A	Präparat aus inaktiven Hefen, reich an Polysacchariden, mit antioxidativem Potential zum Aromaschutz. Zugabe am Ende der alkoholischen Gärung		
		Präparat B	Präparat aus inaktiven Hefen, Stärkung der Hefe bei der Rehydratation		
		Präparat C	Mischpräparat aus inaktiven Hefen, Thiamin, DAHP, Ammoniumsulfat		
b	Versuch 3		Dosage:		
		Ammoniumsulfat	500 mg L^{-1}	Anteil N: 100 mg L^{-1}	
	DAHP	Diammonium- hydrogenphosphat	500 mg L^{-1} ;	Anteil N: 100 mg L^{-1}	
	S _{elementar}	Netzschwefel	15 mg L^{-1}	Anteil S: $12,5 \text{ mg L}^{-1}$	
	GSH	Glutathion (reduziert)	75 mg L^{-1}		
		Cystein	$29,6 \text{ mg L}^{-1}$		

3.1.2 Aufbau Versuch 2: Hefestammcharakteristik und Aromabildung

Natürlicher Riesling Most

Versuchsvarianten (Hefestämme)																	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	

Alkoholische Gärung bei 18°C

Analyse

Zur Vergärung wurde ein pasteurisierter Riesling Most verwendet, der in sterile Glasflaschen (0,75 L) gefüllt wurde. Die Rehydratation der Reinzuchthefen erfolgte für alle Hefestämme gleich nach folgendem Protokoll. Rehydratation der Hefe in Wasser bei 35°C. Zugabe direkt in den Most. Vergärung bei 18 °C. Der Versuch wurde in 3-facher Wiederholung angesetzt.

3.2 Themenbereich „Schwefel“

3.2.1 Vorversuche im Labormaßstab

Um den Effekt von Netzschwefel und Glutathion als Schwefelquelle zu testen, wurden kleine Gäransätze im Labormaßstab durchgeführt. Dazu wurden die Reinsubstanzen in ansteigenden Konzentrationen direkt in das Gärmedium dosiert und mit Reinzuchthefer unter kontrollierten Bedingungen vergoren. Zwei weitere Vorversuche dienten der Messung der Gesamt-SO₂ Konzentration im Verlauf der Gärung bei zwei unterschiedlichen Reinzuchthefer und der Messung der SO₂ Konzentration bei unterschiedlichen Rebsorten, vergoren mit der gleichen Reinzuchthefer. Der Aufbau der Vorversuche ist in den folgenden Skizzen dargestellt.

3.2.1.1 Aufbau Vorversuch 1: Effekt von Netzschwefel

Natürlicher Riesling Most (pasteurisiert)				
2 Reinzuchthefer				
Netzschwefeldosage (mg L ⁻¹)				
Produkt: Stulln Netzschwefel, Agrostulln GmbH. Wirkstoff: 80 % S				
0	2,5	5	10	20
Versuchsvarianten				
1	2	3	4	5

Die Daten der Mostanalyse sind Tabelle 21 zu entnehmen.

3.2.1.2 Aufbau Vorversuch 2: Effekt von Glutathion

Natürlicher Riesling Most (pasteurisiert)		
1 Reinzuchthefer		
Glutathion (mg L ⁻¹)		
Produkt: L-Glutathion reduziert, Carl Roth GmbH & Co KG		
0	50	100
Versuchsvarianten		
1	2	3

3.2.1.3 Aufbau Vorversuch 3: SO₂-Bildung während der Gärung

Natürlicher Riesling Most (pasteurisiert)
2 Reinzuchthefen
Messung: Gäraktivität, SO ₂ -Bildung, SO ₂ -Bindungspartner

3.2.1.4 Aufbau Vorversuch 4: SO₂-Bildung bei unterschiedlichen Rebsorten

Natürlicher Most verschiedener Rebsorten Riesling, Chardonnay, Müller-Thurgau, Bacchus, Silvaner, Kerner, Roter Traminer, Pinot blanc
2 Reinzuchthefen
Messung: Gäraktivität, SO ₂ -Bildung, SO ₂ -Bindungspartner

3.2.2 Aufbau Versuch 3: Bildung von flüchtigen und nicht-flüchtigen Schwefelverbindungen

Natürlicher Cool Climate Riesling Most (10 % mit H ₂ O verdünnt)																	
Hefestamm 1						Hefestamm 2						Hefestamm 3					
Versuchsvarianten																	
1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Alkoholische Gärung bei 18°C																	
Analytik																	

Der natürliche Riesling Most wurde mit 10 % Wasser verdünnt und vor der Gärung mit einer geringen Dosage Thiamin angereichert. Die Analyse der Aminosäuren ist Tabelle 24 zu entnehmen. Die Rehydratation der Hefe erfolgte unter Zugabe eines Hefepräparates aus inaktiver Hefe im Verhältnis 1:1. Die Versuchsvarianten sind Tabelle 14 b zu entnehmen. Der Versuch wurde in 3-facher Wiederholung angesetzt. Es kamen 3 verschiedene Hefen mit unterschiedlicher Charakteristik zum Einsatz.

3.2.3 Aufbau Versuch 4: Bildung von niedrig-siedenden Verbindungen durch Netzschwefelapplikationen

Versuch 4 beleuchtete den Einfluss von realen Netzschwefelspritzungen im Weinberg bezüglich der Spritzhäufigkeit des Netzschwefels und der eingesetzten Hefestämme.

	Applikationsniveau 1		Applikationsniveau 2		Applikationsniveau 3	
	Trubniveau 1			Trubniveau 2		
	Versuchsvarianten					
Hefestamm 1	1	2	3	4	5	6
Hefestamm 2	1	2	3	4	5	6
Spontangärung	1	2	3	4	5	6

Alkoholische Gärung bei 18°C

Analytik

3.2.4 Aufbau Versuch 5: Bildung von niedrig-siedenden Verbindungen durch Stickstoffmangel

	Natürlicher Rieslingmost aus Versuchen zum Bioweinbau							
	2 verschiedene Hefestämme							
	Versuchsvarianten							
Jahr 1	1	2	3	4	5	6	7	8
Jahr 2	1	2	3	4	5	6	7	8

Alkoholische Gärung bei 18°C

Analytik

4 METHODEN

Die Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten wurden, unterlagen den folgenden Methoden:

4.1 Dokumentation des Verlaufes der alkoholischen Gärung

Zur Erstellung der Gärkurve im Versuch 1 erfolgte im Versuchsjahr 1 die Bestimmung des reduzierenden Zuckers nach Rebelein.

Prinzip: Reduzierende Zucker werden mit einer alkalischen Kupfersulfat- Lösung oxidiert, wobei das zweiwertige Kupfer zum einwertigen Kupferoxid reduziert wird. Anschließend wird das nicht oxidierte Kupfersulfat durch Zugabe von Kaliumjodid in eine freie Form überführt und kann schließlich mit Natriumthiosulfat zurücktitriert werden (Tanner & Brunner 1979).

Im Versuchsjahr 2 erfolgte die Bestimmung mithilfe eines Biegeschwingers der Firma Anton Paar. Im Versuchsjahr 3 wurde der Gewichtsverlust mithilfe einer Waage bestimmt.

4.2 Bestimmung der Hefezellzahl

Die Hefezellzahl wurde mithilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Durch Anfärben der Hefezellen kann zwischen toten (blau) und lebenden (hell) Hefezellen unterschieden werden. Durch Addieren der Zellzahlen kann auch die Gesamtzellzahl bestimmt werden.

Prinzip: Die Thoma- Zählkammer besteht aus einem dicken, plangeschliffenen Objektträger. Auf diesem Objektträger befinden sich zwei senkrecht verlaufende Stege, welche als Auflage für das Deckglas dienen. Zwischen den Stegen befinden sich zwei Flächen, in die jeweils 16 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten eingraviert sind. Die Fläche eines Großquadrates beträgt $0,004 \text{ mm}^2$. Bei einem Abstand des Deckglases von $0,01 \text{ mm}$ ergibt sich ein Volumen von $0,004 \text{ mm}^3$ pro Großquadrat bei aufgesetztem Deckglas. Man erhält also ein definiertes Volumen, in dem sich eine bestimmte Anzahl von Hefezellen befindet. Die Anzahl pro Milliliter Probenflüssigkeit lässt sich mathematisch ermitteln.

4.3 Fourier-Transform-Infrared (FTIR)-Spektroskopie

Folgende Daten wurden anhand der Fourier-Transform-Infrared (FTIR)-Spektroskopie ermittelt: Dichte, Reduzierende Zucker, Glucose, Fructose, Alkohol, Flüchtige Säure, Gluconsäure, Milchsäure, Glycerin. Prinzip: Das Infrarotspektrometer misst die Durchlässigkeit einer Most- oder Weinprobe für Infrarotstrahlen. Die Infrarotstrahlung besteht aus unzerlegtem polychromatischem Licht, das auf zwei ungleich langen Wegen durch die Probe zum Detektor geführt wird. Dadurch entsteht ein sogenanntes Interferogramm, ein Wellenmuster, das die gesamte Information des Infrarotspektrums enthält. Diese Information wird über das mathematische Verfahren der Fourier – Transformation aus dem Interferogramm berechnet (Patz 1999, Baumgartner *et al.* 2001). Analysegeräte: Wine Scan von FOSS Electric. Dänemark.

4.4 Enzymatische Bestimmungen

Die enzymatische Bestimmung der SO₂-Bindungspartner (Acetaldehyd, Pyruvat, α-Ketoglutarat) erfolgte mittels der Methode von Boehringer (1989).

Prinzip: Das enzymatische Verfahren bedient sich der Absorptions-Photometrie. Bei der Messung durchstrahlt monochromatisches Licht eine Küvette mit der Probenlösung. Die Stärke der Absorption hängt von der Konzentration des zu bestimmenden Stoffes ab. Als Messgröße dient der Energieträger NADH. Es wird im langwelligen UV-Bereich bei 340 nm gemessen. Die während des Messzeitraumes verbrauchte bzw. gebildete Menge des NADH ist äquivalent zum Gehalt des untersuchten Stoffes. Acetaldehyd: Acetaldehyd wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD), in Anwesenheit von Acetaldehyd-Dehydrogenase (AL-DH) komplett zu Acetat (Essigsäure) oxidiert. Pyruvat: Pyruvat wird durch reduziertes Nicotinamin-dinucleotid (NADH) in Gegenwart des Enzyms L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu L-Lactat reduziert. α-Ketoglutarat: α-Ketoglutarat wird durch reduziertes NADH in Gegenwart von NH₄⁺ und des Enzyms Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) zu α-Aminoglutarat reduziert. Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Ketoglutaratmenge äquivalent und kann im UV-Bereich gemessen werden. Ammonium: Arginin wird mithilfe des Enzyms Arginase zu Ornithin und Harnstoff gespalten. Harnstoff wird unter Einwirkung des Enzyms Urease zu Ammoniak und CO₂ gespalten. α-Ketoglutarat wird in Anwesenheit von Glutamat-Dehydrogenase und reduzierendem Nicotinamin-adenin-dinucleotid (NADH) mithilfe von Ammoniak zu L-Glutamat umgesetzt.

Analysengeräte: UV/VIS Spectrometer Lambda 2 (Perkin Elmer GmbH, Überlingen, Germany). Ausgestattet mit einem temperierten Zirkulationsgerät Model F25-ME (JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Germany). Temperatur: 25 °C gemäß Analysenmethode.

4.5 Bestimmung der Aromastoffe mittels Kaltronmethode

Die flüchtigen Gärungsnebenprodukte wie Ester, höhere Alkohole, Fettsäuren und Fettsäureester wurden mittels der „Kaltronmethode“ nach Rapp *et al.* (1994) analysiert. Anhand der „Kaltronmethode“ kann eine einfache und schnelle Bestimmung der flüchtigen Komponenten im Wein vorgenommen werden.

Prinzip:

Bei der Gaschromatographie tritt in einer langen Säule ein mit einem Trägergas bewegtes Probengas mit einer stationären Phase in Wechselwirkung. Diese Wechselwirkung besteht in der Adsorption des Probengases. Jede Substanz hat somit eine unterschiedliche Wandergeschwindigkeit in der Säule. Die Weinproben werden mithilfe einer Flüssig-flüssig Extraktion mit 1,1,2-Trifluortrichlorethan gemäß einer modifizierten Methode nach Fischer & Rauhut (2009) vorbereitet. Dabei werden 10 ml der Lösung für 20 Minuten geschüttelt und 2 g NaCl hinzugegeben, um die Extraktion zu verbessern. Als interner Standard zur Quantifizierung dienen 1188 µg L⁻¹ 2,6-Dimethyl-5-hepten-2-ol, als interner Kontrollstandard dienen 112 µg L⁻¹ Isopropylbenzen. Als Extraktionslösung dienen 100 µg L⁻¹ 1,1,2-Trifluortrichlorethan (Freon 113 oder Kaltron). Die Mischung wird 8 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und anschließend über Natriumsulfat-anhydrat (50 mg auf Glaswolle) getrocknet. Die überstehende Flüssigkeit wird in den Gaschromatographen/Massenspektrometer (GC-MS) injiziert.

Analysegeräte: Gaschromatograph: Hewlett-Packard, HP 5890 Series II; Injektionssystem: Gekühltes Injektions System CIS-3 (Gerstel GmbH, Germany); Säule: J&W Scientific DB5-MS: 60m x 0,32mm x 1µm; Massenspektrometer: HP 5972 Mass Selective Detector.

4.6 Bestimmung der niedrig-siedenden Schwefelverbindungen

Die niedrig-siedenden Schwefelverbindungen wurden mithilfe der Headspace-Methode gaschromatographisch mit einem gepulsten flammenphotometrischen Detektor (GC-PFPD) bestimmt (Rauhut *et al.* 2005).

Prinzip:

Zu Beginn werden die Weinproben zunächst bei 4 °C gelagert und das GC Vial mit Argon gespült. Danach werden 5 ml der gekühlten Weinproben zusammen mit 1,7 g NaCl in die Vials pipettiert. Anschließend werden 5 µl 2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol (entspricht 4 mg L⁻¹) als Antioxidans, 20 µl Ethylendiamin-tetra-essigsäure (0.2 g L⁻¹) und 10 µl Propanal (500 mg L⁻¹) als SO₂-Bindungspartner hinzugefügt. Schließlich werden 10 µl des internen Standards (6 µg L⁻¹ S i-MPS and 6 µg L⁻¹ S BMS) hinzugefügt.

Analysegeräte: Gaschromatograph: Hewlett-Packard, HP 6890; Autosampler: Multipurpose Sampler MPS 2; Injektionssystem: Gekühltes Injektions System CIS-4 (Gerstel GmbH, Germany); Detektor: OI 5380 Pulse Flame Photometric Detector (PFPD) (OI Analytical, USA).

4.7 Bestimmung der Aminosäuren

Die Analyse der Aminosäuren umfasst insgesamt 25 Substanzen.

Prinzip: Um die Aminosäuren in der klaren, filtrierten Probe zu analysieren, müssen die Peptidverbindungen zuerst gebrochen werden. Dies geschieht standardmäßig durch Hydrolyse mit Salzsäure (24 Stunden bei 110°C). Nach einer chromatographischen Separierung der einzelnen Aminosäuren erfolgt eine Derivatisierung mit Ninhydrin bei einer Temperatur von 100 - 130 °C. Das Reaktionsprodukt wird wiederum decarboxyliert und resultiert in einem Ninhydrinderivat, das eine Aminogruppe trägt. Dieses Derivat reagiert an seinem mittleren C- Atom mit einem zweiten Ninhydrinmolekül, welches sich blau-violett verfärbt (Ruhmann's purple). Die eigentliche Identifikation erfolgt über die Retentionszeit während der Chromatographie. Die Quantifizierung erfolgt über die Absorption (Ruhmann's purple) in einem Photometer.

Analysegeräte: Versuchsjahr 1 und 2: Amino Acid Analyzer A 200 (Aminonova AG, Henningsdorf, Germany); Versuchsjahr 3: Amino Acid Analyzer S433 (Sykam GmbH, Eresing, Germany).

4.8 Bestimmung von Sulfit im Jungwein

Mithilfe der Flow Injection Analysis (FIA) lässt sich die Konzentration von freier SO₂ und Gesamt-SO₂ in Weißwein, Rotwein und Saft bestimmen. Die Methode orientiert sich an der Veröffentlichung von Dubernet & Grasset (1998).

Prinzip: Die Bestimmung der freien SO_2 erfolgt durch die Injektion der Probe in einen wässrigen Trägerstrom, der mit Salzsäure angesäuert wird, um das gasförmige SO_2 freizusetzen. Das freigesetzte SO_2 diffundiert durch eine gasdurchlässige Membran in einen Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 8,4. Anschließend wird als Reagenz 2,2'Dinitro-5,5'dithio-dibenzoessäure (DNTB) hinzugefügt. Die Mischung reagiert mit SO_2 unter Bildung einer stark gelben Farbe, die bei einer Extinktion von 420 nm gemessen wird und die Konzentration errechnen lässt. Die Bestimmung der Gesamt- SO_2 erfolgt durch die Injektion der Probe direkt in den Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 8,4. Nach Zugabe der Reagenz DNTB erfolgt eine Erwärmung auf 50 °C. Die Reaktion führt zur Bildung einer stark gelben Farbe, die durch Dialyse verdünnt wird. Die Bestimmung der Konzentration von Gesamt- SO_2 erfolgt durch Messung der Extinktion bei 420 nm. Das Gerät ist für freie SO_2 für den Bereich von 2-200 mg L⁻¹ und für die Gesamt- SO_2 für den Konzentrationsbereich von 5-250 mg L⁻¹ kalibriert.

Analysengeräte: FIASTAR 5000 (Foss, Dänemark); Injektor: 6 Port Rotationsventil mit variablem Volumen; Pumpe: Peristaltische Pumpe; Durchflusszelle: 10 mm Länge; 18 ml Volumen; Detektor: Digitales Zweistrahl-Photometer; Wellenlängenbereich: 400-1000 nm.

4.9 Bestimmung von Sulfat im Most und Jungwein

Die Analysen von Sulfat im Most und Wein wurden mittels Ionenchromatographie (IC) gemessen. Das Prinzip der Ionenchromatographie wird von Weiss (1985) beschrieben. Genaue Daten zur Durchführung und den Analysegeräten können in den Handbüchern der Firma DIONEX (USA) nachgelesen werden.

Analysengeräte: Ionenchromatograph: ICS 2100 (Dionex Corporation) mit EG40-Eluent-Generatorsystem und ASAR 300; Säule: IonPac AS17 Anion-Austausch Säule (2 x 250 mm).

4.10 Hefeverfügbare Stickstoff

Als Indikator für den Gehalt an hefeverwertbarem Stickstoff wurde der NOPA Wert herangezogen. Der NOPA Wert gibt die Konzentration des freien α -amino Stickstoff an und gibt sie relativ zum Isoleucin-Gehalt in mg pro Liter an. Die Methode geht auf die Autoren Dukes & Butzke (1998) zurück.

4.11 Durchführung des Weinausbaus

Versuch 1: Vor der Zugabe der Hefe erfolgte die Zugabe der einzelnen Nährstoffe. Diese wurden je nach Variante in kleine Bechergläser eingewogen und als Mischung in die Ballons gegeben. Stoffe, die nur in sehr geringen Mengen zum Einsatz kamen, wurden aus einer Stammlösung mithilfe einer Pipette zudosiert (Pantothensäure, Folsäure). Die Mineralstoffe wurden in Form von Salzen zugegeben. Zink wurde als Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) und Magnesium als Magnesiumsulfat ($\text{MgO}_4\text{S} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) zugegeben. Die Bestandteile der Verbindung wurden bei der Zugabe entsprechend dem Molekulargewichtsanteil berücksichtigt.

Die Reinzuchtheife wurde als Trockenreinzuchtheife eingesetzt. Das bedeutet, dass sie vor der Inokulation rehydriert werden muss. Dies erfolgte in Wasser mit einer Temperatur von 35-40 °C für eine Dauer von 30 Minuten. Die Dosage erfolgte in der Regel mit 25 g hl^{-1} oder 30 g hl^{-1} . Das Nährstoffpräparat, das während der Rehydrierung eingesetzt wurde, wurde nach 10 Minuten in den Rehydrationsansatz eingerührt. Die Vergärung wurde kontrolliert bei 18 °C durchgeführt.

Der Ausbau des Jungweines erfolgte auf die folgende Weise: Nach Ende der Gärung erfolgte der Abstich der Weine in einen anderen Glasballon. Auf diesem Weg wurde der klare Jungwein vom abgesetzten Hefedepot getrennt. Außerdem wurde der Wein auf einen Wert von 40 mg L^{-1} freier schwefliger Säure eingestellt. Durch die Schwefelung wird die Oxidation des Weines und ein Braunwerden verhindert. Die neuen Glasballons wurden erneut mit einem Gäraufsatz versehen und die Weine wurden für weitere 4 Wochen gelagert. Schließlich folgte der 2. Abstich um zwischenzeitlich abgesetzte Hefe abzutrennen. Der Wein wurde dabei in neue Edelstahlbehälter (Inhalt 19,5 L) gefüllt und mit CO_2 überschichtet. Im Zuge des zweiten Abstiches wurden die Proben für die Analytik entnommen.

4.12 Statistische Auswertung

Um aus allen analytischen und sensorischen Daten die Einflüsse der verschiedenen Versuchsvarianten ermitteln zu können, benötigt man das passende statistische Verfahren. Zur Bestimmung der signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten wurde die **Varianzanalyse** (analysis of variance = ANOVA) in Kombination mit den statistischen Tests Duncan und Dunnet durchgeführt. Voraussetzung für die Anwendung der ANOVA ist ein normalverteilter Datensatz.

Aus diesem Grund wurde in bestimmten Fällen die Transformation durchgeführt, die alle abhängigen Variablen (Analysewerte) und alle unabhängigen Variablen (Varianten) vergleichbar machte. Dazu wurde für jeden Analyseparameter innerhalb einer Versuchsreihe der Mittelwert gebildet und jeder Analysewert der einzelnen Varianten wurde durch diesen Mittelwert dividiert. Auf diese Art und Weise konnte die Normalverteilung sichergestellt werden.

Die **Hauptkomponentenanalyse**, auch Principal Component Analysis (PCA) genannt, dient vorrangig der Datenreduzierung und der Erklärung der dem Datensatz zugrunde liegenden Strukturen. Die aus der Analytik stammenden Parameter (abhängige Variablen) werden durch neue und in der Anzahl reduzierte Variablen, den Principal Components (PCs) ersetzt. Diese erklären in abnehmendem Maß die Gesamtvarianz. Die Darstellung erfolgt in dieser Arbeit nur für die ersten beiden Principal Components. Der angegebene Prozentsatz an den beiden Achsen sagt aus, in welchem Maß die Gesamtvarianz durch sie erklärt werden kann. Zur Veranschaulichung werden in dem Ausgabediagramm Vektoren (loadings bzw. Ladungen) dargestellt. Besitzt eine Variable ein hohes „loading“ auf einer PC (ausgedrückt durch die Länge des Vektors), so ist sie maßgeblich an deren Definition beteiligt. Die relative Lage der Vektoren gibt Auskunft über den Grad ihrer Korrelation untereinander. Der Winkel zwischen den Vektoren ist folgendermaßen zu interpretieren: Ein Winkel nahe 0° signalisiert eine hohe, positive Korrelation, ein Winkel nahe 180° eine hohe, aber negative Korrelation. Für die Beziehung zwischen den abhängigen Variablen bedeutet dies: Wenn die Konzentration des einen Aromastoffs ansteigt, nimmt die Konzentration des anderen ab. Ein Winkel nahe 90° zeigt eine sehr geringe Korrelation zwischen den Variablen (Fischer 1991). Neben den „loadings“ der Variablen sind die „scores“ der Einzelproben (Versuchsvarianten) von Interesse. Über diese Koordinaten kann der Einzelprobe ebenfalls eine Position in dem durch PC 1 und 2 definierten Koordinatensystem zugewiesen werden und eine Gruppierung vorgenommen werden. Die **Clusteranalyse** wurde mithilfe der Ward Methode angefertigt. Die Auswertung für alle Analysen erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 15.0 der Firma SPSS Inc. Chicago,USA.

5 ERGEBNISSE

5.1 Themenbereich „Nährstoffversorgung der Hefe und Aromabildung“

Die Kapitel 5.2 bis 5.8 beschäftigen sich mit der Optimierung der Nährstoffversorgung der Hefe während der alkoholischen Gärung. Im Mittelpunkt standen die Zugabe von oenologischen Nährstoffen und ihr Einfluss auf wichtige Gärungsparameter und die Aromastoffbildung im Wein. Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Veröffentlichungen genutzt: Rauhut *et al.* (2004), Rauhut *et al.* (2005), Rauhut (2006), Werner (2010).

5.2 Externe Analysen zum Vitamingehalt

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurden externe Analysen bezüglich des Vitamingehaltes im Most aus den Versuchsjahren 1 und 2, sowie von vier unterschiedlichen Präparaten auf Basis von inaktiver Hefe angefertigt. Die Ergebnisse der Vitaminanalyse sind den Tabellen 15 und 16 zu entnehmen. Das für die Gärung wichtige Vitamin B₁ (Thiamin) ist im pasteurisierten Most in geringer Konzentration enthalten: 0,01 mg 100 g⁻¹ im Jahr 1 und 0,03 mg 100 g⁻¹ im Jahr 2.

In den Hefepräparaten A, B und D ist Thiamin im Bereich von 5,5-8,7 mg 100 g⁻¹ enthalten. In Präparat C sind 124 mg 100 g⁻¹ Thiamin enthalten, dabei handelt es sich aber um ein kommerzielles Mischpräparat, bei dem eine Thiaminzugabe erfolgte. In den Hefepräparaten ist das Vitamin Pantothensäure mit einer Konzentration zwischen 2,4 bis 4,2 mg 100 g⁻¹ und Biotin zwischen 25 und 88 µg 100 g⁻¹ enthalten. Über Hefepräparate können diese wichtigen Substanzen in das Gärungsmedium eingebracht werden und so zur Sicherung der Gärung beitragen.

Tabelle 15: Vitaminkonzentration im Rieslingmost aus Versuchsjahr 1 und 2

Substanz	Einheit	Most Jahr 1	Most Jahr 2
Retinol (Vit. A)	$\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	< 0,5	< 0,5
Thiaminchlorid- hydrochlorid	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	0,0135	0,041
Thiamin (Vit. B ₁)	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	0,0106	0,032
Pyridoxin (Vit. B ₆)	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	< 0,05	0,039
Cyanocobalamin (Vit. B ₁₂)	$\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	0,01	0,029
Ca- Pantothenat	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	0,052	0,050
Pantothensäure	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	0,0478	0,046
Niacin	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	0,121	0,122
Biotin	$\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	2,05	1,16
Folsäure	$\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	4,5	16,5
Cholinchlorid	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	13,4	5,95
Cholin	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	10,0	4,44
Inosit	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	20,3	39,5

Tabelle 16: Vitaminkonzentration in vier unterschiedlichen Präparaten aus inaktiver Hefe

Substanz	Einheit	Hefenährstoff- präparat A	Hefenährstoff- präparat B	Hefenährstoff- präparat C	Hefenährstoff- präparat D
Retinol (Vit. A)	$\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Thiaminchlorid- hydrochlorid	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	11	7,09	158	8,67
Thiamin (Vit. B ₁)	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	8,68	5,58	124	6,82
Pyridoxin (Vit. B ₆)	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	0,491	1,3	0,076	1,27
Cyanocobalamin (Vit. B ₁₂)	$\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	8,88	0,253	9,32	0,104
Ca- Pantothenat	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	n.d.	4,31	n.d.	3,95
Pantothensäure	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	4,22	3,97	2,44	3,63
Niacin	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	3,88	30,5	2,24	28,0
Biotin	$\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	33,4	88,1	25,4	47,2
Folsäure	$\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	140	594,0	132	878,0
Cholinchlorid	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	1166	1391,0	224	1431,0
Cholin	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	870	1038,0	167	1068,0
Inosit	$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	349	305,0	176	255,0

Tabelle 15 und 16 : Quelle: Rauhut (2006)

Zur Beurteilung des Einflusses der Nährstoffversorgung auf die Hefe wird als oberstes Kriterium die Gärleistung beurteilt. Je aktiver die Weinhefe in der Gärung ist, desto schneller baut sie den Zucker ab und produziert Ethanol und Kohlenstoffdioxid (CO_2) als Hauptmetabolite. Die Veränderung im Verlauf der Gärung im Versuch 1 ist für Jahr 1 als kumulierter Zuckerverlust dargestellt (Abb. 17), für Jahr 2 als kumulierter Dichteverlust (Abb. 18) und für Jahr 3 als kumulierter Gewichtsverlust (Abb. 19). Auch wenn die Erfassungsmethode in den 3 Versuchsjahren unterschiedlich war, lassen sich die Unterschiede sehr deutlich erkennen und Parallelen zwischen den drei Versuchsjahren feststellen.

Wie der Kurvenverlauf zu erkennen gibt, wurde im Jahr 1 (Abb. 17) eine starke Förderung der Gärleistung durch die Varianten V2, V5, V12, V13, V14 und V16 bewirkt.

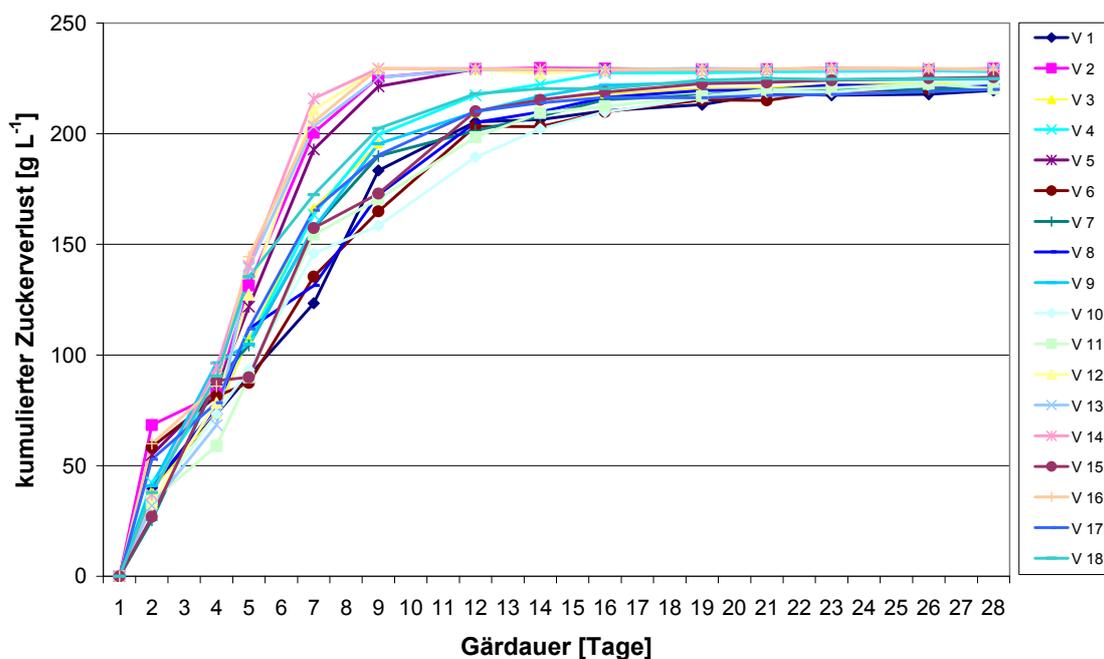


Abbildung 17: Versuch 1: Gärverlauf Variante V1 - V18 im Jahr 1

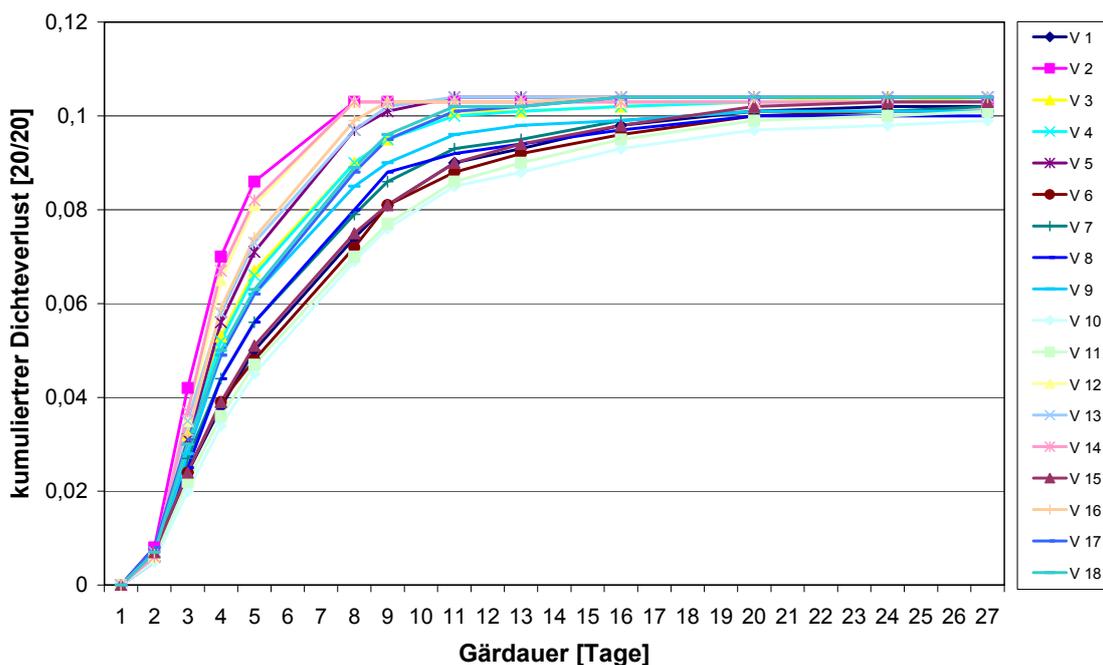


Abbildung 18: Versuch 1: Gärverlauf Variante V1 - V18 im Jahr 2

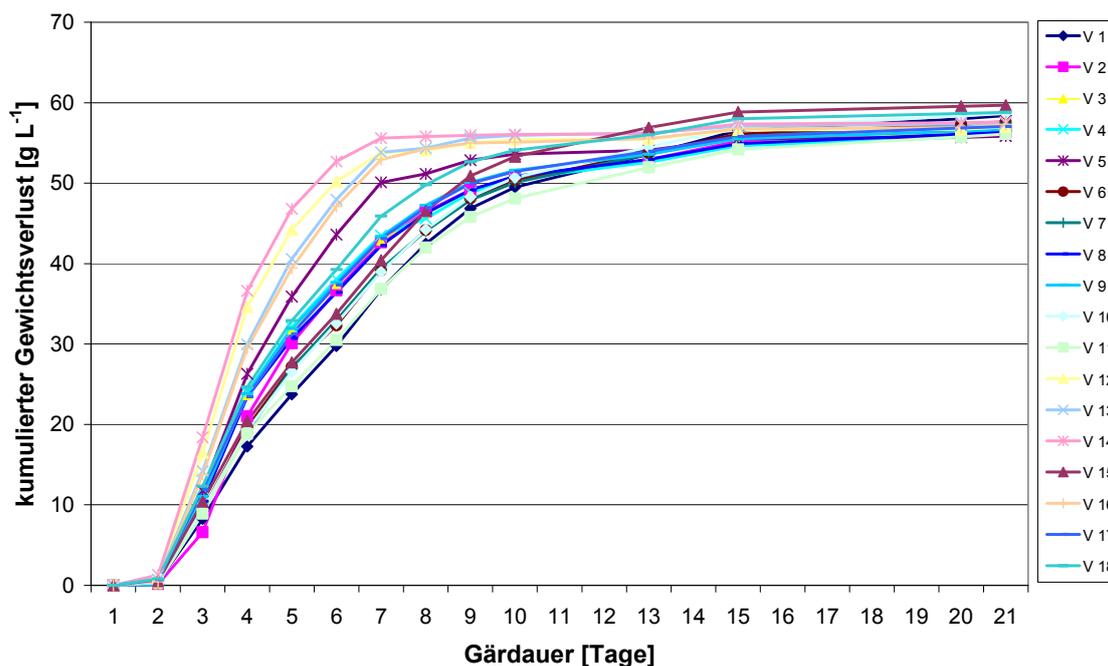


Abbildung 19: Versuch 1: Gärverlauf Variante V1 - V18 im Jahr 3

Eine mittlere Förderung wurde durch die Varianten V3, V4, V7, V9, V17 und V18 bewirkt. Eine sehr geringe Gärförderung bewirkten die Kontrollvariante (Variante V1), V6, V8, V10, V11 und die Variante V15. Diese Unterschiede ließen sich besonders zwischen dem achten und zehnten Gärtag beobachten, wobei insgesamt 2 Varianten auffielen. Einerseits wies die Kontrollvariante (V1) nicht durchweg die geringste Gärleistung auf und andererseits bewirkte die Variante V2 die schnellste Förderung nach Gärtstart, wie bereits am zweiten Gärtag zu beobachten war.

Im Jahr 2 zeigte sich ein sehr ähnliches Bild. Wie in Abb. 18 zu erkennen ist, wiesen die Varianten V2, V5, V12, V13, V14 und V16 ebenfalls die stärkste Gärleistung auf. Auch im dritten Versuchsjahr hoben sich ebenfalls diese Varianten mit der stärksten Gärleistung hervor, wobei im dritten Jahr Variante V2 nicht in diese Gruppe einzuordnen war. Sie lag eher im Mittelfeld der Gärkurven. Um die Beurteilung zu vereinfachen ist eine sehr prägnante Zusammenfassung der Gärleistung in Tabelle 17 dargestellt. Zur Beurteilung wurden die beiden Parameter Gärfortschritt am 5. Tag in Prozent (%) und Fructosekonzentration am Ende der Gärung (g L^{-1}) festgelegt. Da der verwendete Hefestamm glucophil ist, sei auf die Darstellung der Glucosewerte ($< 2 \text{ g L}^{-1}$)

Tabelle 17: Zusammenfassung der Gärleistung anhand der Parameter Gärfortschritt am 5. Tag (%) und Fructosekonzentration am Ende der Gärung (FTIR) für alle 3 Jahre

Variante	Jahr 1		Jahr 2		Jahr 3	
	Gärungsfortschritt am 5. Tag [%]	Fructosekonzentration Ende der Gärung (FTIR)	Gärungsfortschritt am 5. Tag [%]	Fructosekonzentration Ende der Gärung (FTIR)	Gärungsfortschritt am 5. Tag [%]	Fructosekonzentration Ende der Gärung (FTIR)
		[g l^{-1}]		[g l^{-1}]		[g l^{-1}]
V 1	39	7	48	8	40	8
V 2	57	1	83	1	51	1
V 3	47	5	64	4	54	6
V 4	46	2	63	4	54	1
V 5	53	1	68	1	61	1
V 6	38	8	46	10	46	2
V 7	46	8	54	9	46	4
V 8	49	5	54	11	52	3
V 9	46	4	60	8	54	2
V 10	41	6	43	10	45	5
V 11	39	7	45	10	42	3
V 12	56	1	78	1	75	1
V 13	61	1	70	1	69	1
V 14	61	1	79	1	79	1
V 15	39	4	49	5	47	1
V 16	63	1	71	1	67	1
V 17	49	10	60	1	53	2
V 18	59	4	61	2	56	1

an dieser Stelle verzichtet. Durch grau hinterlegte Felder sind jeweils die Varianten hervorgehoben, die am Stichtag mehr als 50 % der zu erwartenden Gärleistung erbracht haben. Es lassen sich deutliche Parallelen zwischen den einzelnen

Versuchsjahren erkennen. Besonders die Varianten V2, V12, V14 und V16 fielen durchgängig durch eine weit fortgeschrittene Gärung am 5. Gärtag und durch die niedrigsten Fructosegehalte am Ende der Gärung auf. In den Varianten V6 bis V11 ließ sich eine deutliche Tendenz zu erhöhten Fructosewerten am Ende der Gärung erkennen, wobei dies nicht in jedem Jahr der Fall war. Die Kontrollvariante V1 wies in jedem Jahr einen geringen Gärfortschritt und hohe Fructosegehalte von 7 bis 8 g L⁻¹ auf.

5.4 Versuch 1 : Hefezellzahl

Die Hefezellzahl steht in engem Zusammenhang mit der Ernährung der Hefezelle während der Gärung. In Abb. 20 sind die maximalen Konzentrationen der Lebendzellzahlen während der Gärung im Jahr 1 und 2 dargestellt. Es fällt auf, dass auch hier die Varianten V2, V12, V13, V14 und V16 in jedem Jahr die höchsten Lebendzellzahlen aufwiesen. Eine auffällig geringe Maximalzahl an lebenden Zellen ließ sich in den Varianten V3, V4, V6, V7 und V10 feststellen. Dort lag der Maximalwert sogar unterhalb der Werte für die Kontrolle.

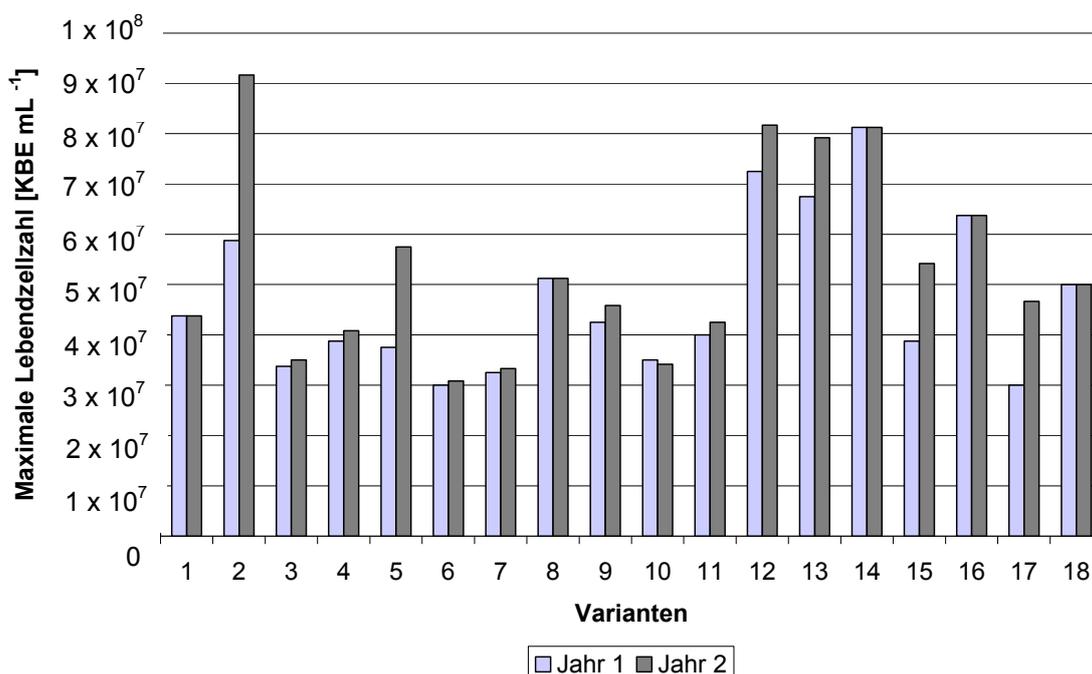


Abbildung 20: Versuch 1: Maximale Lebendzellzahl; Variante V1-V18; Versuchsjahr 1+ 2

Die komplette Dokumentation der Hefezellzahlen ist den Tabellen 28 und 29 im Anhang zu entnehmen. Nachfolgend sind die Diagramme der Hefezellzahlen von sechs ausgewählten Varianten des ersten Versuchsjahres dargestellt, die die verschiedenen Effekte der Nährstoffzugabe widerspiegeln. Es ist zu beachten, dass die Probe für alle Varianten immer aus dem Zentrum des Gärgebundes genommen wurde, so dass nur in Schwebelage befindliche Zellen erfasst wurden.

Abbildung 21 zeigt die Variante V2 mit der Zugabe Diammoniumhydrogenphosphat (1 g L^{-1} am Anfang der Gärung), Hefezellwände ($0,4 \text{ g L}^{-1}$) und Thiamin ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$) im Vergleich zur Kontrollvariante V1. Es zeigt sich, dass die Gesamtzellzahl in Variante V2 mit $7 \times 10^7 \text{ KBE ml}^{-1}$ einen Hochpunkt aufwies, während zu diesem Zeitpunkt die Variante 1 bereits sinkende Zellzahlen aufwies. Die Zahl der toten Hefezellen lag in Variante 1 am 13. Tag bei $2,2 \times 10^7 \text{ KBE ml}^{-1}$, während in Variante V2 am Tag 8 nur $1 \times 10^7 \text{ KBE ml}^{-1}$ bestimmt wurden. Der maximale Anteil toter Hefezellen war in Variante V8 also wesentlich geringer. Variante V1 wies aufgrund der langsamer verlaufenden Gärung eine sich länger in Schwebelage befindende Hefepopulation auf, die aber insgesamt nicht das Niveau der Variante V2 erreichen konnte.

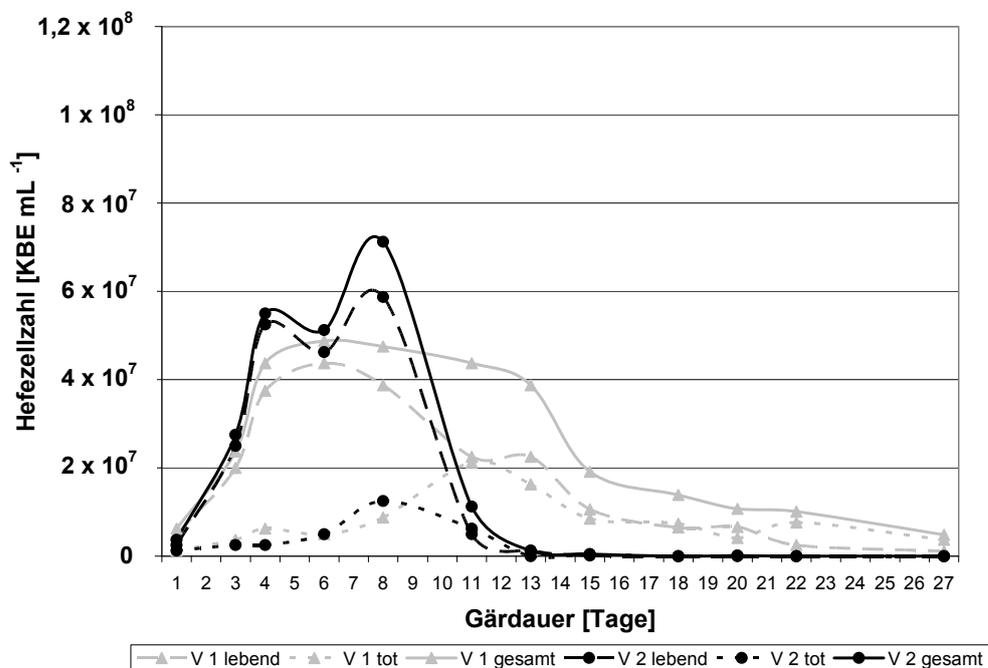


Abbildung 21: Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V2.

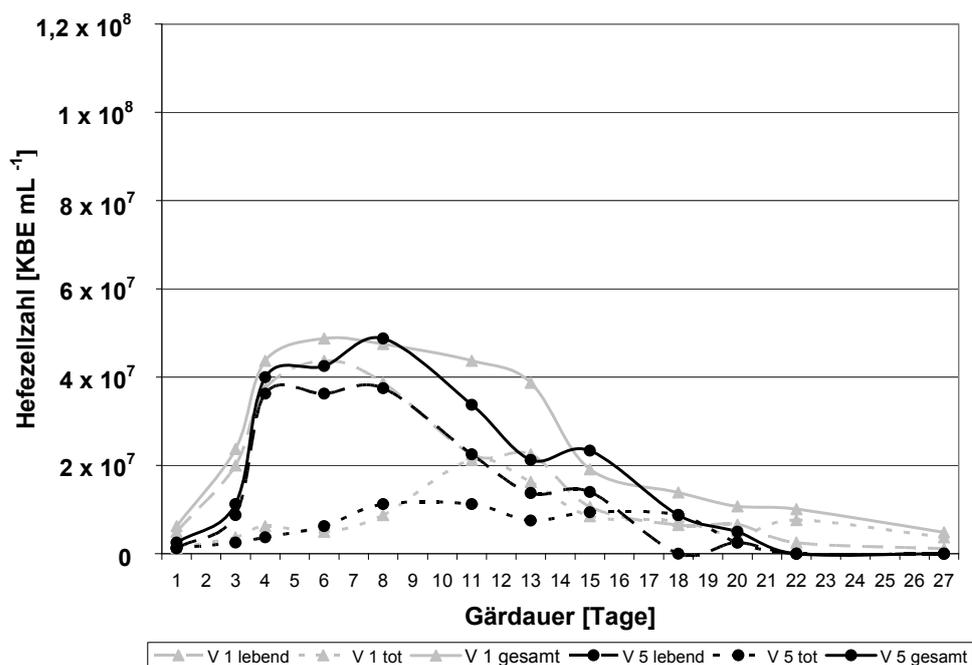


Abbildung 22: Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V5.

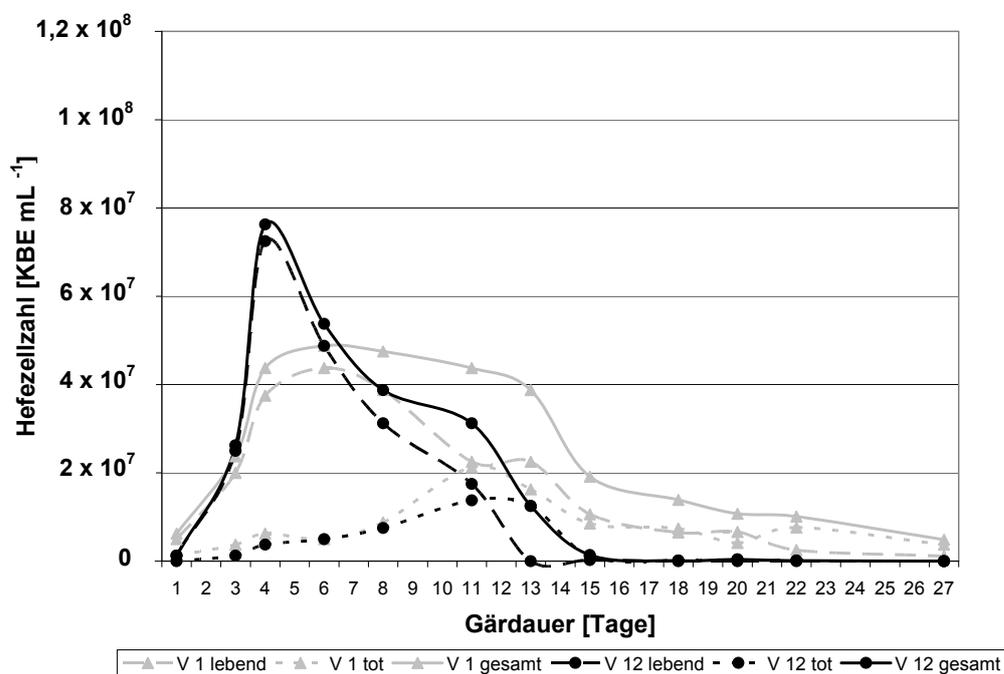


Abbildung 23: Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V12.

Abbildung 22 zeigt, dass Variante V5 [Diammoniumhydrogenphosphat ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) am Anfang der Gärung und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei 1/3 der Gärung, Hefezellwände ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), Thiamin ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$)] im Vergleich zu Variante V1 keine Unterschiede in der Hefezellzahl bewirkte.

Der Vergleich von Variante V12 [Diammoniumhydrogenphosphat ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) am Anfang der Gärung und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei $1/3$ der Gärung, Hefezellwände ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), Thiamin ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$) Glutamin (200 mg L^{-1}), Arginin (250 mg L^{-1}) Zink (2 mg L^{-1}) und Magnesium (100 mg L^{-1}) Pantothen säure (1 mg L^{-1}) und Folsäure ($1,5 \mu\text{g L}^{-1}$)] mit Variante V1 zeigte hingegen deutliche Unterschiede in den maximalen Zellzahlen (Abbildung 23). Variante V12 zeigte einen sehr schnellen Anstieg der Gesamtzellzahl auf $7,3 \times 10^7 \text{ KBE mL}^{-1}$, gefolgt von einem stetigen Abfall der Zellzahl bis zum Tag 15, an dem die Gärung beendet war.

Variante V13 [Diammoniumhydrogenphosphat $0,5 \text{ g L}^{-1}$ am Anfang der Gärung und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei $1/3$ der Gärung, Hefezellwände ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), Thiamin ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$), Hefepräparat 1 ($0,5 \text{ g L}^{-1}$)] zeigt in Abbildung 24 eine sehr ähnliche Gärkurve. Der Hochpunkt auf einem Niveau von $7,4 \times 10^7 \text{ KBE mL}^{-1}$ zog sich jedoch über vier Tage hin, erst dann folgte der stetige Abfall der Gesamtzellzahl bis zum Tag 18. Abbildung 25 zeigt den Vergleich der Hefezellzahl von Variante V1 und Variante V4 [Diammoniumhydrogenphosphat ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) am Anfang der Gärung und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ bei $1/3$ der Gärung]. Die Zahl der lebenden und toten Hefezellen erreicht in beiden Varianten das gleiche Niveau. Die Anzahl der toten Hefezellen erreichte in Variante V4 schon am 8. Tag ihr Maximum, während dies in Variante V1 erst am 13. Tag der Fall war. Der Vergleich von Variante V1 mit Variante V6 [Thiamin ($1,2 \text{ mg L}^{-1}$) zeigte sogar eine Hemmung der Hefepopulation gegenüber der Kontrolle (V1). Die Zellzahlen von V6 lagen insgesamt unterhalb der Kontrolle ohne Zusätze (Abbildung 26).

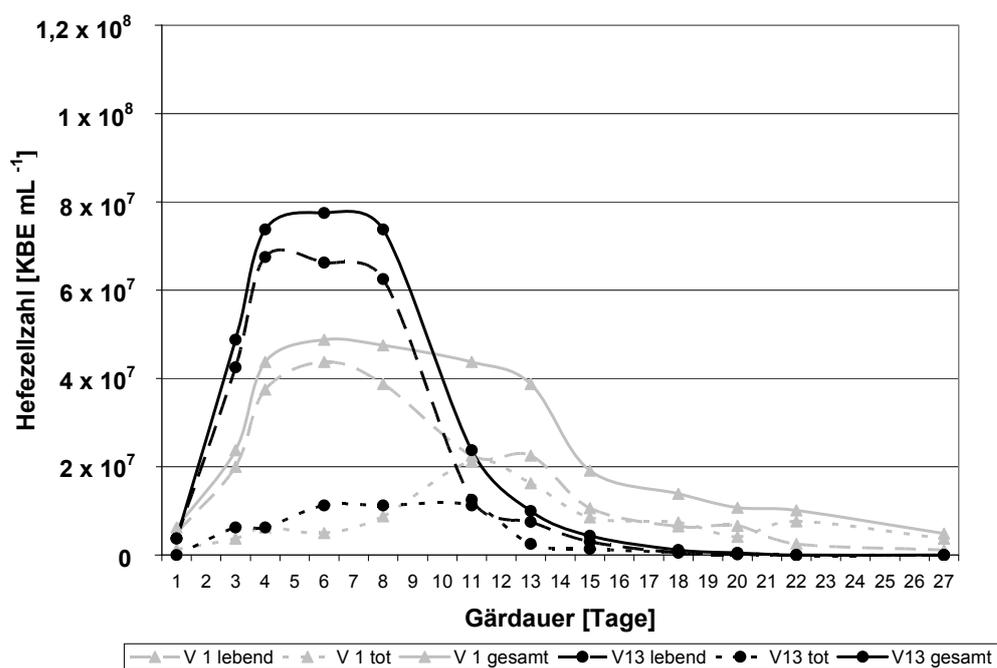


Abbildung 24: Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V13.

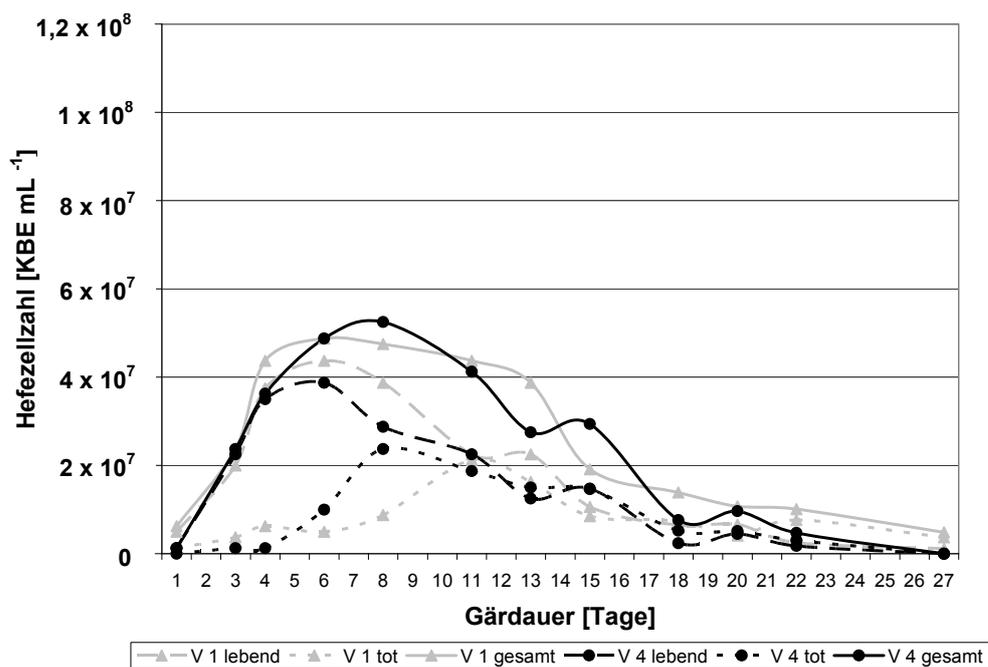


Abbildung 25: Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V4.

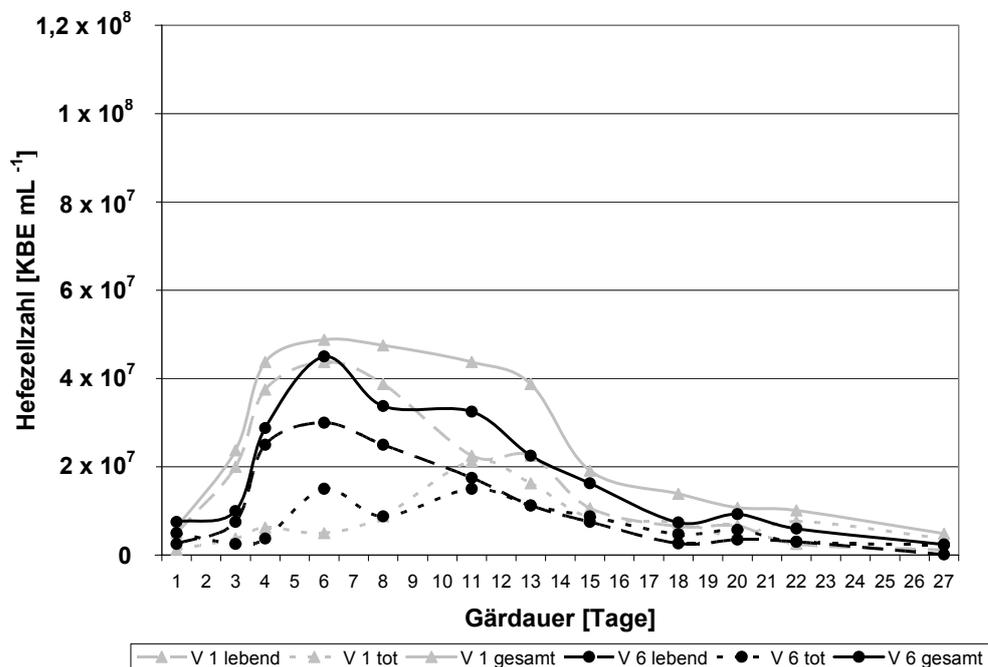


Abbildung 26: Versuch 1: Hefezellzahl Variante V1 und V6.

Der Einfluss der Nährstoffe zeigte in allen drei Jahren das gleiche Muster. Auf die Darstellung der Diagramme aus Jahr 2 und 3 wird an dieser Stelle verzichtet.

5.5 Versuch 1 : SO₂- Bindungspartner

Die Konzentration der wichtigsten SO₂-Bindungspartner (Acetaldehyd, Pyruvat, α-Ketoglutarat) stellt einen wichtigen Indikator für die Qualität der Gärung dar. Die Substanzen beeinflussen maßgeblich den SO₂ Bedarf im Jungwein. Die Konzentration von Acetaldehyd (Abb. 27) schwankte in den Jahren 1 und 2 nur gering zwischen 17 und 30 mg L⁻¹. Lediglich Variante V13 und V16 fielen in beiden Jahren durch Werte von maximal 20 mg L⁻¹ auf. Die Werte im Jahr 3 lagen alle auf einem geringeren Niveau zwischen 5 und 16 mg L⁻¹. Variante V1 hatte mit 16 mg L⁻¹ den höchsten Wert, alle Nährstoffzugaben konnten die Konzentration von Acetaldehyd im Jahr 3 verringern, wobei Variante 14 den geringsten Wert aufwies. Die Mittelwerte der Konzentration von Pyruvat (Abb. 28) erreichten maximal 18 mg L⁻¹, wobei tendentiell die Varianten V2, V5 und V13 in allen 3 Jahren durch die niedrigsten Werte auffielen. Die Konzentration von α-Ketoglutarat schwankte hingegen sehr stark zwischen den einzelnen Varianten und den Versuchsjahren (Abb. 29). Auffällig ist besonders das Jahr 2, in dem die Varianten V2, V5, V12, V13, V14 und V16 Werte zwischen 60 und 88 mg L⁻¹ aufwiesen. Mit Ausnahme von Variante V2 zeigte sich der gleiche Effekt bei den gleichen Varianten auch im Jahr 3, aber auf geringerem Niveau, bei maximal 66 mg L⁻¹. Das Konzentrationsniveau im Jahr 3 lag hingegen bei maximal 33 mg L⁻¹ α-Ketoglutarat.

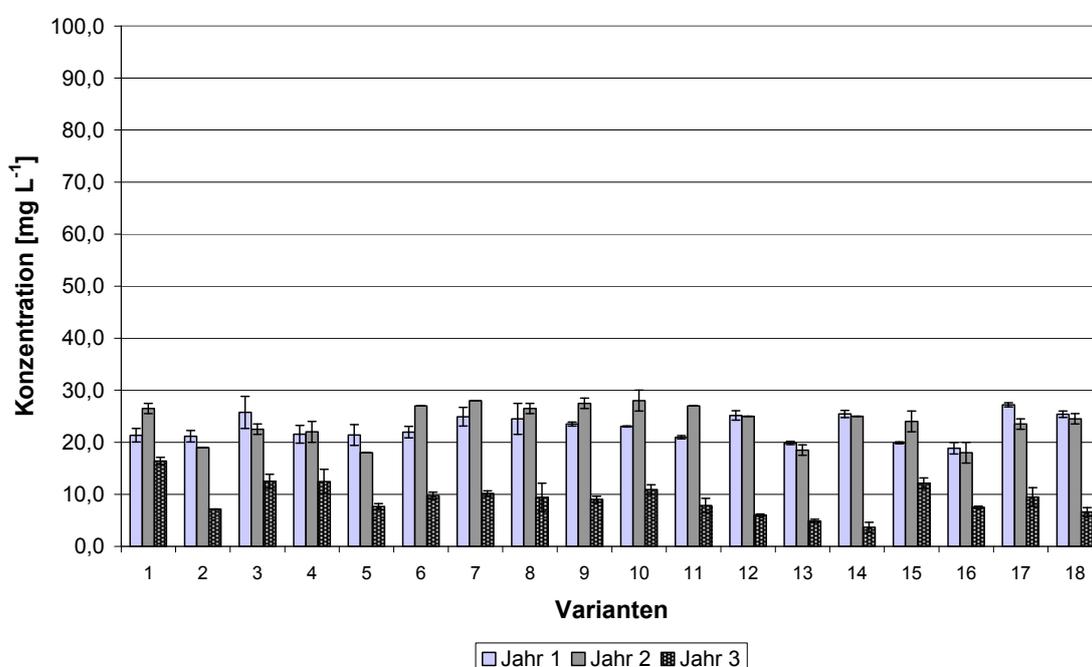


Abbildung 27: Versuch 1: Mittelwert der Konzentration von Acetaldehyd, Versuchsjahr 1-3

Die Balken zeigen die Abweichung vom Mittelwert (n=2).

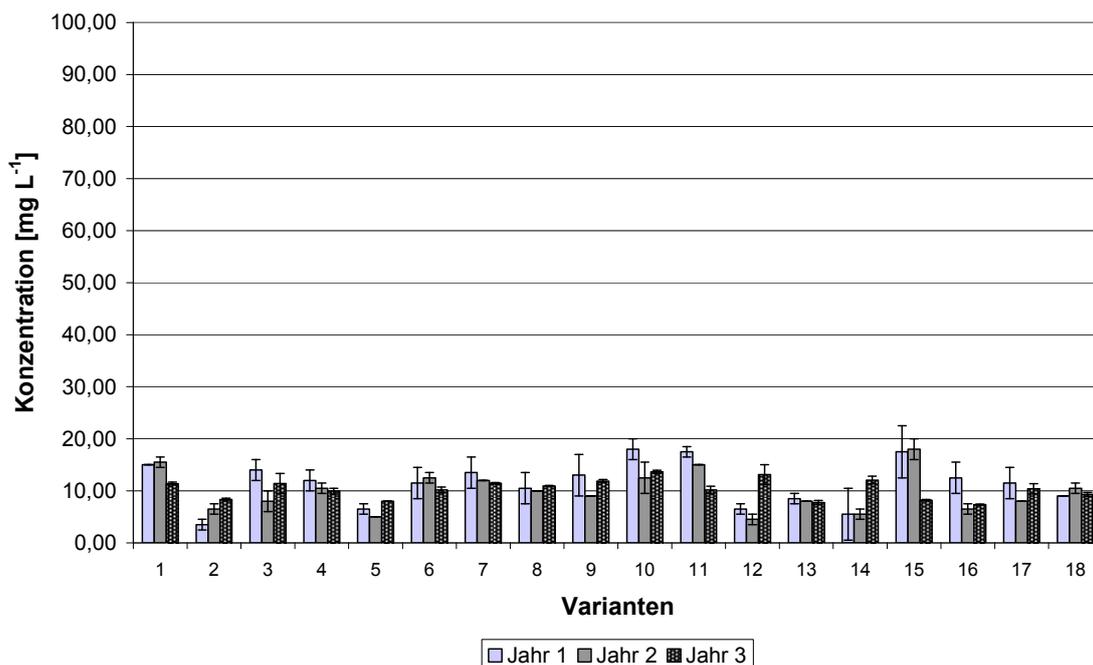


Abbildung 28: Versuch 1: Mittelwert der Konzentration von Pyruvat, Versuchsjahr 1-3

Die Balken zeigen die Abweichung vom Mittelwert (n=2).

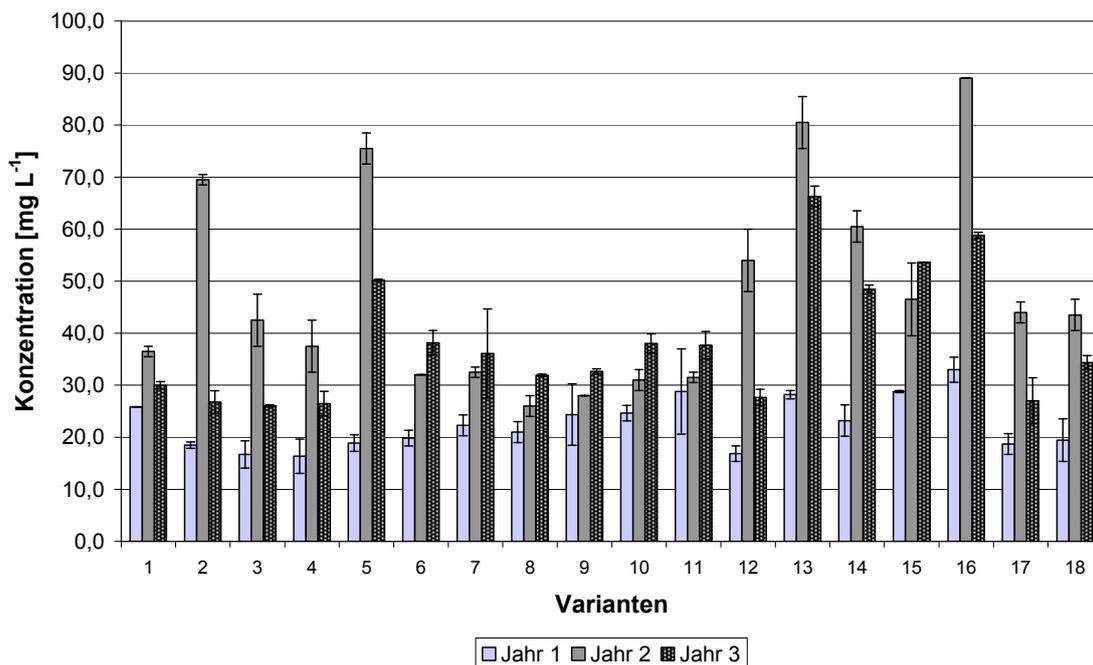


Abbildung 29: Versuch 1: Mittelwert der Konzentration von α-Ketoglutarat, Versuchsjahr 1-3.

Die Balken zeigen die Abweichung vom Mittelwert (n=2)

5.6 Versuch 1 : Gehalt Ammonium

Die Ammoniumkonzentration im Most lag in den Versuchsjahren 1, 2 und 3 bei durchschnittlich $18,3 \pm 1,9 \text{ mg L}^{-1}$ Ammonium (NH_4). Nach der alkoholischen Gärung zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Varianten. Im Jahr 1 und im Jahr 3 konnten in den Varianten V4 und V5 Restmengen zwischen 35 und 56 mg L^{-1} Ammonium nachgewiesen werden. In den Varianten V12, V13, V14 und V16 konnten in den Jahren 1 und 3 Konzentrationen zwischen 64 und 72 mg L^{-1} Ammonium nachgewiesen werden. In diesen Varianten erfolgte eine zweite Ammoniumgabe bei $1/3$ der Gärung. Alle anderen Varianten der Jahre 1 und 3 wiesen nach der Gärung Gehalte unter 8 mg L^{-1} Ammonium (NH_4) auf. Die Werte des Jahres 2 lagen alle unter 2 mg L^{-1} Ammonium (NH_4). Im Jahr 2 wurde keine zweite Ammoniumgabe durchgeführt.

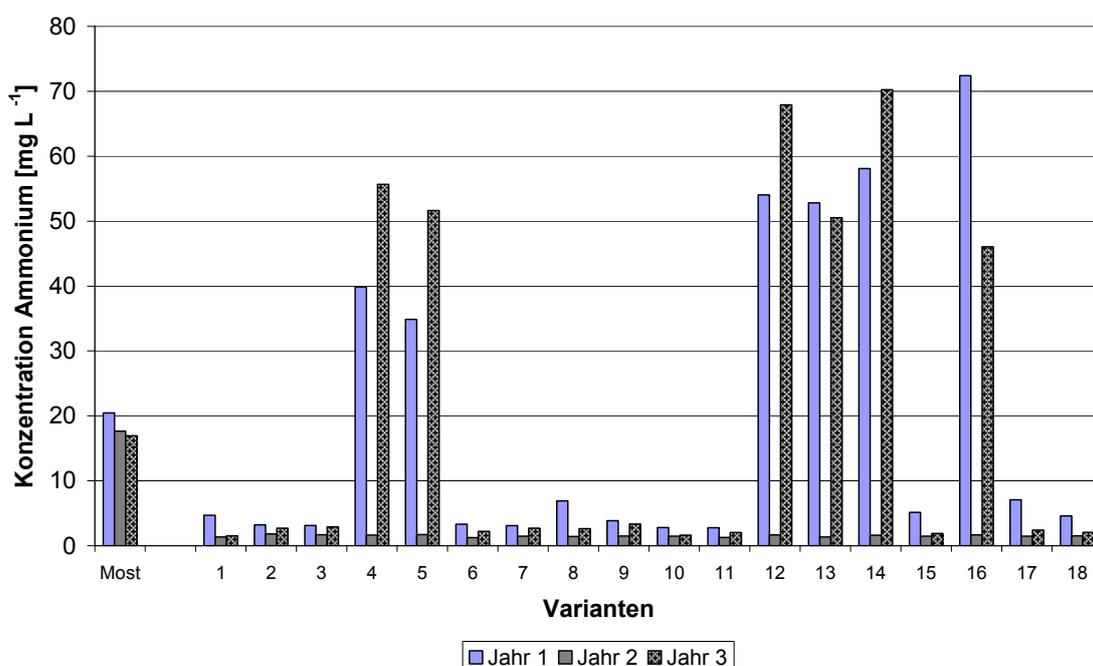


Abbildung 30: Versuch 1: Konzentration Ammonium nach der alkoholischen Gärung, Versuchsjahr 1-3

5.7 Versuch 1 : Gehalt Aminosäuren

Der Gehalt an Aminosäuren wurde sowohl im Most (vor der Gärung) als auch im Jungwein (nach der Gärung) untersucht. Die genauen Analysedaten der einzelnen Aminosäuren können in den Tabellen 30-32 im Anhang nachgelesen werden. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass es eine starke Bevorzugung seitens der Hefe für die Aminosäuren Glutamin, Threonin, Serin, Isoleucin, Leucin Arginin und γ -Aminobuttersäure (GABA) gab. Ihre Restgehalte betragen im Wein meistens unter 10 bzw. 30 mg L^{-1} . Tabelle 18 gibt einen Überblick über die Präferenz gemäß den Restgehalten im Wein nach der alkoholischen Gärung.

Tabelle 18: Versuch 1: Einteilung der Aminosäuren gemäß der Präferenz bei der Aufnahme durch die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Restgehalt < 15 mg L ⁻¹	Restgehalt < 30 mg L ⁻¹	Heterogenes Ergebnis	Teilweise Zunahme
Glutamin Threonin Serin	Isoleucin Leucin Arginin Phenylalanin GABA	Histidin Asparaginsäure Glutaminsäure Alanin Methionin Tyrosin	Prolin Asparagin

In den folgenden Diagrammen sind die Summen aus 21 untersuchten Aminosäuren dargestellt. Die Aminosäure Prolin wird separat ausgewiesen, da sie laut Duteurtre *et al.* (1971) unter anaeroben Gärbedingungen nicht von der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verstoffwechselt wird. In einigen Varianten konnte hingegen eine Zunahme der Prolinkonzentration verzeichnet werden. Die Summe der verwertbaren Aminosäuren (ohne Prolin) lag im Most im Versuchsjahr 1 bei 839 mg L⁻¹, im Versuchsjahr 2 bei 612 mg L⁻¹ und im Versuchsjahr 3 bei 715 mg L⁻¹ (siehe Abb.31-33). Die Konzentrationen im Jungwein (ohne Prolin) lagen im Durchschnitt bei 257 mg L⁻¹ im Versuchsjahr 1, bei 157 mg L⁻¹ im Versuchsjahr 2 und bei 182 mg L⁻¹ im Versuchsjahr 3. Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, enthielten die Varianten V1 (Kontrolle), V6, V10 und V11 Werte unter 200 mg L⁻¹ Aminosäuren im Wein, diesen Varianten wurden nur Vitamine oder Spurenelemente zugesetzt. Außerdem unter 200 mg L⁻¹ lag die Variante V 15, der zur Rehydration ein Hefepräparat aus inaktiver Hefe zugegeben wurde. Die höchsten Konzentrationen (>300 mg L⁻¹) an Aminosäuren hatten die Varianten V3, V4, V8, V9, V12, V13, V14 und V16. Diese Varianten haben entweder hohe Mengen Diammoniumhydrogenphosphat (V3, V4), ausgewählte Aminosäuren (V8, V9) oder beides (V12, V13, V14, V16) zugesetzt bekommen.

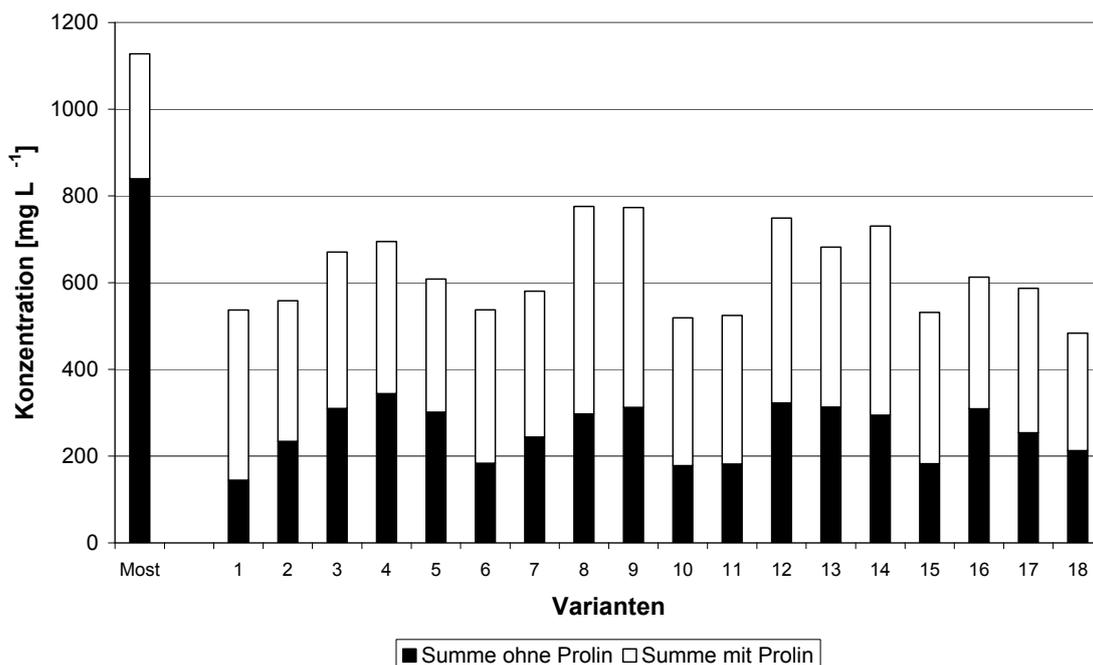


Abbildung 31: Versuch 1: Summe der Aminosäuren im Versuchsjahr 1

Der schwarze Teil des Balkens zeigt die Summe der Aminosäuren ohne Prolin, der weiße Teil zeigt die Konzentration von Prolin für jede Variante.

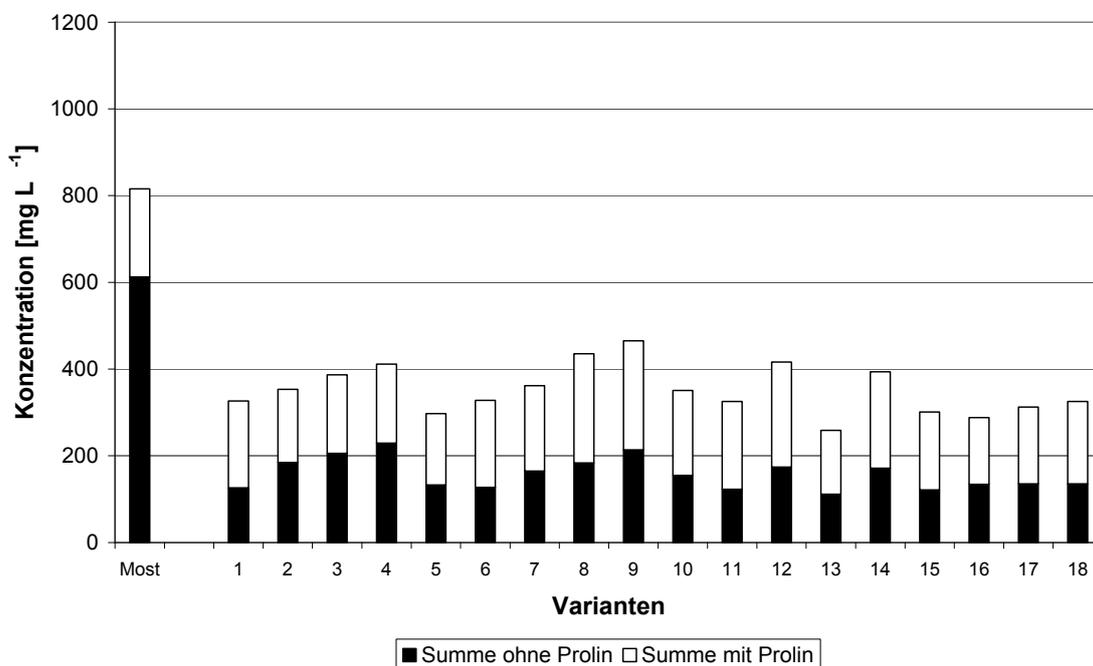


Abbildung 32: Versuch 1: Summe der Aminosäuren im Versuchsjahr 2

Der schwarze Teil des Balkens zeigt die Summe der Aminosäuren ohne Prolin, der weiße Teil zeigt die Konzentration von Prolin für jede Variante.

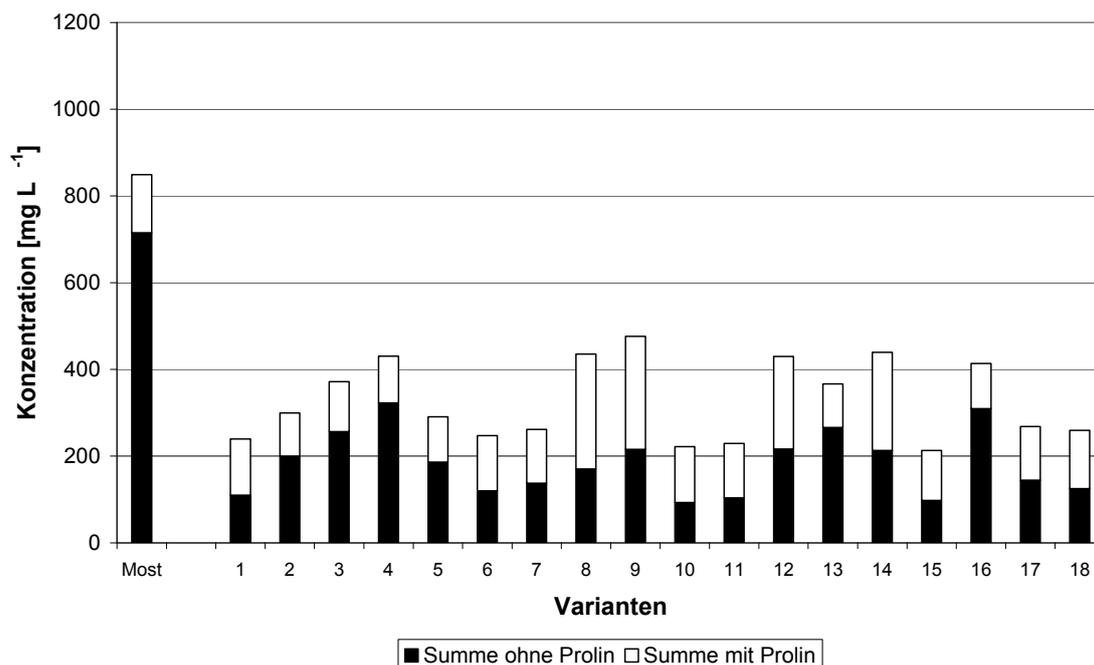


Abbildung 33: Versuch 1: Summe der Aminosäuren im Versuchsjahr 3

Der schwarze Teil des Balkens zeigt die Summe der Aminosäuren ohne Prolin, der weiße Teil zeigt die Konzentration von Prolin für jede Variante.

In der Abbildung 32 zeichnete sich die gleiche Tendenz wie in Abbildung 31 ab, die Unterschiede zwischen den Varianten waren jedoch nicht so groß. Bis auf Variante V4 und V9 lagen alle Varianten unter 200 mg L^{-1} Gesamt-Aminosäuren (ohne Prolin). Insgesamt lag der Durchschnittswert der Aminosäuren mit 157 mg L^{-1} im zweiten Versuchsjahr am niedrigsten. Abbildung 33 zeigt die Werte des dritten Versuchsjahres. Auch in diesem Jahr zeigte sich das gleiche Muster bei den Restgehalten. Die Varianten V3, V4, V9, V12, V13 und V15 wiesen Gehalte von über 200 mg L^{-1} auf (ohne Prolin). Die Kontrollvariante V1 und die Varianten V6, V7, V10, V11 und V15 enthielten die geringsten Werte.

5.8 Versuch 1 : Beeinflussung der Aromastoffgehalte

5.8.1 Veränderung der Konzentration Essigsäureester

Die Absolutwerte der Konzentration der Essigsäureester, sonstigen Ester, höheren Alkohole und Fettsäureester können im Anhang (Tabellen 33-35) im Detail nachgelesen werden. Ziel des Versuches war es, den Einfluss der Nährstoffzugaben im Vergleich zur Kontrollvariante zu untersuchen. Um die jahrgangsbedingten Effekte auszublenden, wurde für die Darstellung der Ergebnisse in Kapitel 5.7 eine prozentuale Darstellung gewählt. Dargestellt wird die prozentuale Abweichung der jeweiligen Variante von der Kontrollvariante (V1) des jeweiligen Jahrgangs. Alle drei Jahrgänge werden in einem Diagramm dargestellt. Der Wert der Variante V1 bildet also die Bezugslinie, von der die relative Abweichung [%] ins Positive oder Negative abgetragen wurde.

Somit kann auf einen Blick beurteilt werden, ob sich in den Jahrgangswiederholungen gleiche Einflusseffekte für die jeweilige Variante ergaben. Dargestellt werden die Mittelwerte (n = 2).

5.8.1.1 Essigsäureethylester

Die Abweichungen für den Aromastoff Essigsäureethylester sind in Abb. 34 dargestellt. Im Jahr 1 zeigte sich eine Reduzierung der Konzentration gegenüber der Kontrollvariante um über 40 % in den Varianten V2, V5, V12, V13, V14, V15 und V16. Die Varianten V3, V4, V11, V17 und V18 lagen zwischen 10 % und 40 % negativer Abweichung. Nur die Werte der Variante 6 zeigten eine geringe Erhöhung der Konzentration um < 10 %, die Varianten V7, V8, V9 und V10 zeigten eine geringe Reduzierung um < 10 %. Im Jahr 2 kam es ebenfalls zu einer Reduzierung der Konzentration um mindestens 40 % für die Varianten V3, V4, V12, V13, V14, V16. Eine Reduzierung um mindestens 10 % erfuhren die Varianten V7, V8, V9, V10, V17 und V18. Eine leichte Erhöhung (max. 20 %) konnte für die Varianten V2, V5, V6, V11 und V15 festgestellt werden. Im Jahr 3 zeigte sich insgesamt nur eine geringe Beeinflussung durch die Nährstoffvarianten. Die Varianten V3, V6, V7, V10, V11 und V13 bis V17 wiesen um maximal 20 % reduzierte Werte auf. Variante 18 (-22%) lag knapp darüber. Die Varianten V2, V4, V8 und besonders V12 fallen durch ihre positive Abweichung im Jahr 3 auf.

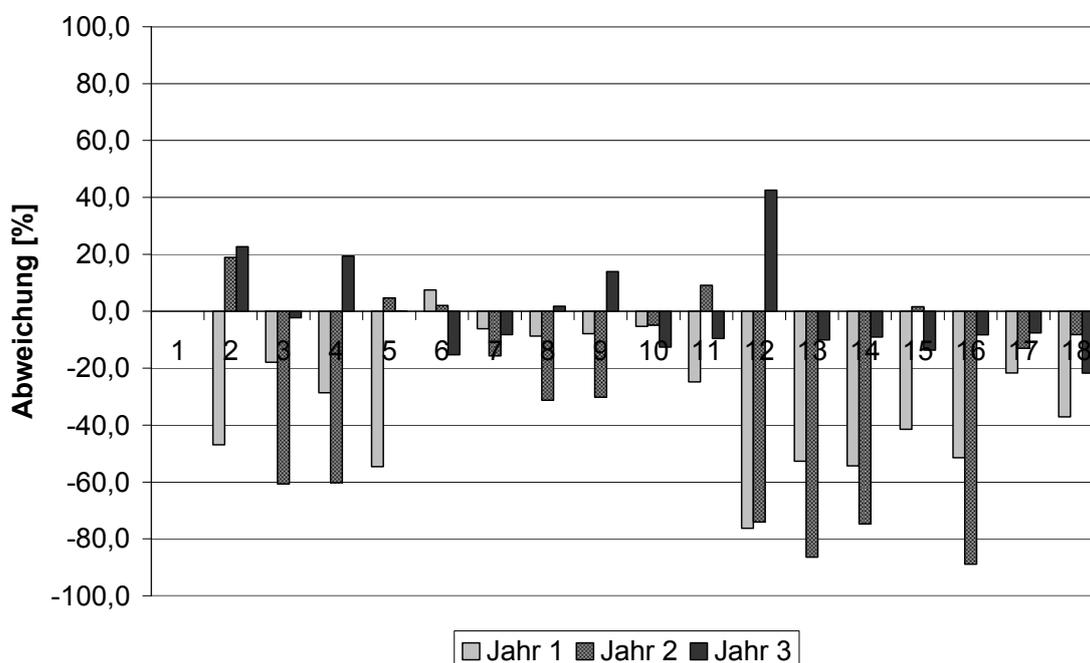


Abbildung 34: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Essigsäureethylester

5.8.1.2 Essigsäure-2-phenylethylester

Die Abweichungen für den Aromastoff Essigsäure-2-phenylethylester sind in Abb. 35 dargestellt. Im Jahr 1 zeigte sich eine Reduzierung der Konzentration gegenüber der Kontrollvariante um mehr als 20 % bei den Varianten V2, V3 und V4. Eine Reduzierung um mindestens 10 % erfolgte bei den Varianten V9, V12, V13 und V14. Für die Varianten V 5, V6, V7, V8, V10, V11, V16, V17 und V18 lag die Reduzierung unter 10 %. Die Variante V 15 zeigte eine Erhöhung gegenüber der Kontrollvariante um max. 20 %. Im zweiten Versuchsjahr wurde die Konzentration von Variante V2, V7, V9, V13 und V 17 um mehr als 10 % gegenüber der Kontrollvariante V1 gefördert. Für die Varianten V8, V15 und V18 zeigte sich eine Reduzierung kleiner als 10 %. Eine leichte Erhöhung (max. 20 %) wiesen die Varianten V3, V5, V6, V10, V11, V12 und V 14 auf. Im Jahr 3 zeigte sich eine Reduzierung nur für die Varianten V3, V9 und V14 um mindestens 10 %, für die Varianten V4, V12 und V17 um maximal 10 %. Eine Erhöhung des Wertes lag für die Varianten V5, V6, V7, V8, V10, V11, V13, V15, V16 und V18 vor. Variante V5 und V18 wiesen eine Erhöhung um mehr als 20 % gegenüber V1 des dritten Jahres auf.

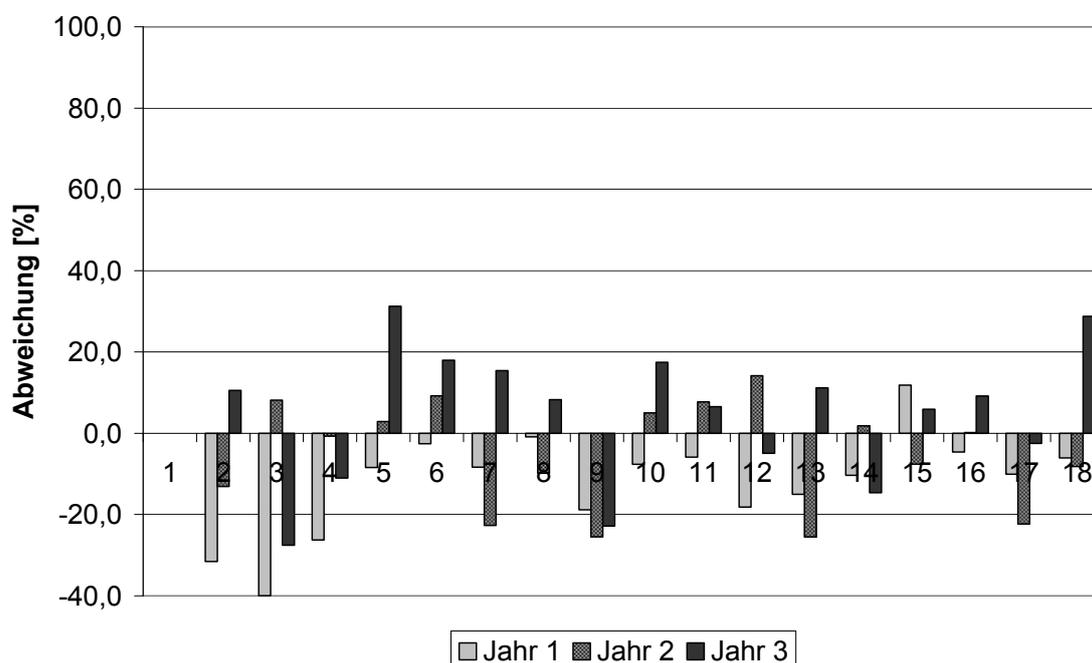


Abbildung 35: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Essigsäure-2-phenylethylester

5.8.1.3 Essigsäure-2-methylbutylester

Die Abweichungen für den Aromastoff Essigsäure-2-methylbutylester sind in Abb. 36 dargestellt. Die Beeinflussung dieser Esterverbindung zeigte ein sehr ähnliches Bild für alle drei Versuchsjahre. In Jahr 1 lagen ausschließlich erhöhte Werte vor, mit Ausnahme von Variante V6, V10 und V17 (Reduzierung um <10%). Erhöhte Werte um mindestens 20 % lagen für die Varianten V4, V5, V7, V8, V9, V12, V13, V14 und V16 vor. Die Erhöhung gegenüber V1 lag bei < 10 % bei den Varianten V3, V11, V15 und V18. Im zweiten Versuchsjahr lagen die Werte alle im positiven Bereich. Die Konzentration bei allen Varianten lag um mehr als 20 % höher als bei der Kontrollvariante V1, die Varianten V2, V3, V5, V9, V12, V13, V14, V16 und V18 wiesen sogar eine Erhöhung um mehr als 50 % auf. Im Jahr 3 zeigten sich geringe Abweichungen (< 20 %) ins Negative für V3, V9, V10, V11, V15 und V17. Es zeigten sich geringe Abweichungen ins Positive (< 20 %) für die Varianten V7 bis V8, V16 und V18. Eine Erhöhung um mehr als 20 % zeigte sich für die Varianten V2, V5, V12, V13 und V14.

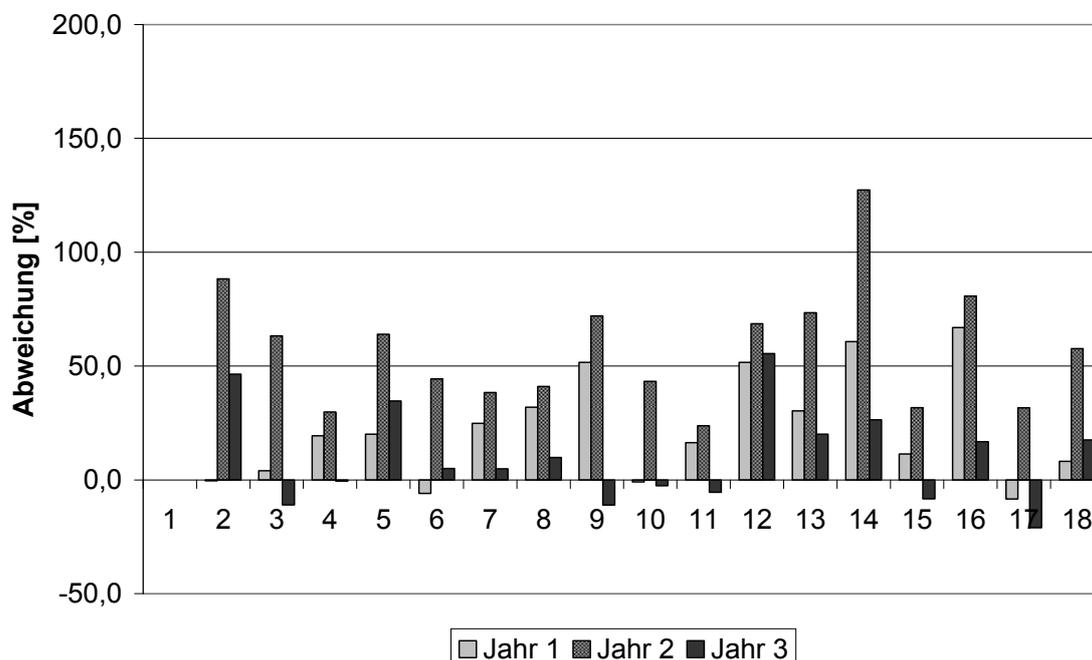


Abbildung 36: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Essigsäure-2-methylbutylester

5.8.1.4 Essigsäure-3-methylbutylester

Die Veränderungen für den Aromastoff Essigsäure-3-methylbutylester sind in Abb. 37 dargestellt. Mit Ausnahme von einigen kleinen Reduzierungen in den Jahren 1 und 3 konnte die Konzentration durch die Nährstoffgaben der Varianten durchweg erhöht werden. Für die Varianten V2, V4, V5, B8, B9, V12, V13, V14, V16 betragen die Erhöhungen gegenüber der Variante V1 in allen Jahren mindestens 20 %. Die Varianten V12 und V14 fielen durch besonders hohe Werte (< 100 % Erhöhung) auf. Im Gegensatz dazu fielen die Veränderungen für die Varianten V6, V7, V10, V11, V15, V17 und V18 sehr gering aus, teilweise betragen sie unter 10 %.

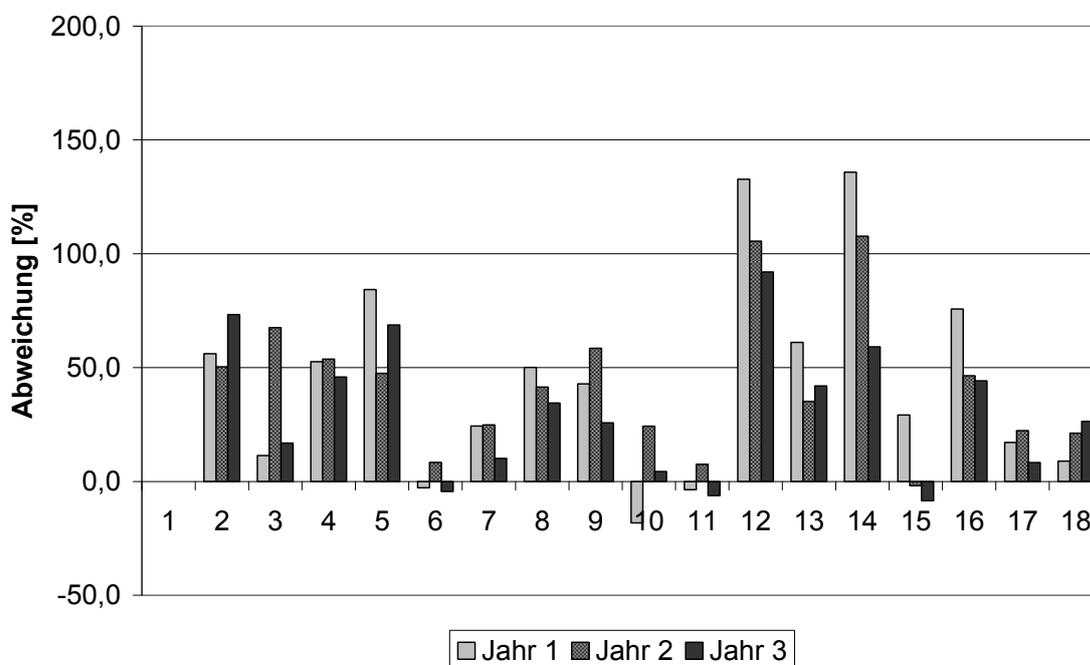


Abbildung 37: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Essigsäure-3-methylbutylester

5.8.1.5 Essigsäurehexylester

Die Abweichungen für den Aromastoff Essigsäurehexylester sind in Abb. 38 dargestellt. Die Konzentration dieses Esters wurden im Jahr 1 ausschließlich gefördert, mit Ausnahme von Variante V6 und V10. Im Jahr 1 lagen die Erhöhungen für die Varianten V 3, V11, V13, V15, V16, V17 und V18 unter 20 %, für die Varianten V4, V5, V7, V8, V9, V12 und V14 über 20 % im Vergleich zur Kontrollvariante V1. Im Jahr 2 zeigte sich eine Erhöhung der Werte um mehr als 20 % nur für die Varianten V3, V9 und V12. Alle anderen Varianten wiesen eine geringere Erhöhung auf (< 20 %). Die Varianten V2, V5, V13, V15 bis V18 wiesen sogar eine negative Veränderung auf. Im Jahr 3 wurden die Konzentrationen vor allem erhöht. Erhöhungen von mindestens 20 % lagen für die Varianten V2, V3, V4, V5, V7, V8, V9, V12, V14 und V18 vor, wobei deutliche Erhöhungen von mehr als 40 % für die Varianten V2, V4 und V12 dokumentiert werden konnten.

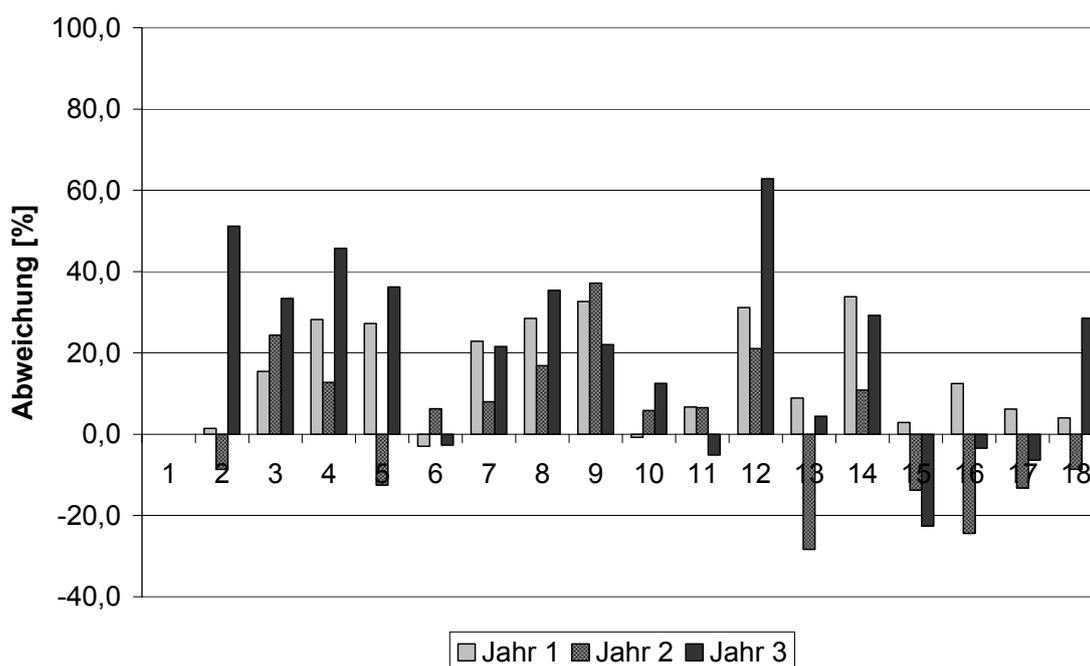


Abbildung 38: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Essigsäurehexylester

5.8.2 Veränderung der Konzentration weiterer Ester

5.8.2.1 Propionsäureethylester

Die Abweichungen für den Aromastoff Propionsäureethylester sind in Abb. 39 dargestellt. Der Aromastoff wurde in seiner Konzentration im Vergleich zur Kontrollvariante V1 in den Varianten V2, V5, V12 bis V18 deutlich gefördert (< 20 %), wobei besonders das Jahr 2 und Jahr 3 positiv auffielen. Teilweise lagen die Zuwächse sogar bei über 100 % (V2, V13, V14, V16 im Jahr 3). Die Varianten V3, V4 und V6 bis V11 fielen durch eine nur sehr geringe Förderung, teilweise durch eine minimale Reduzierung der Konzentration im Vergleich zur Variante V1 auf.

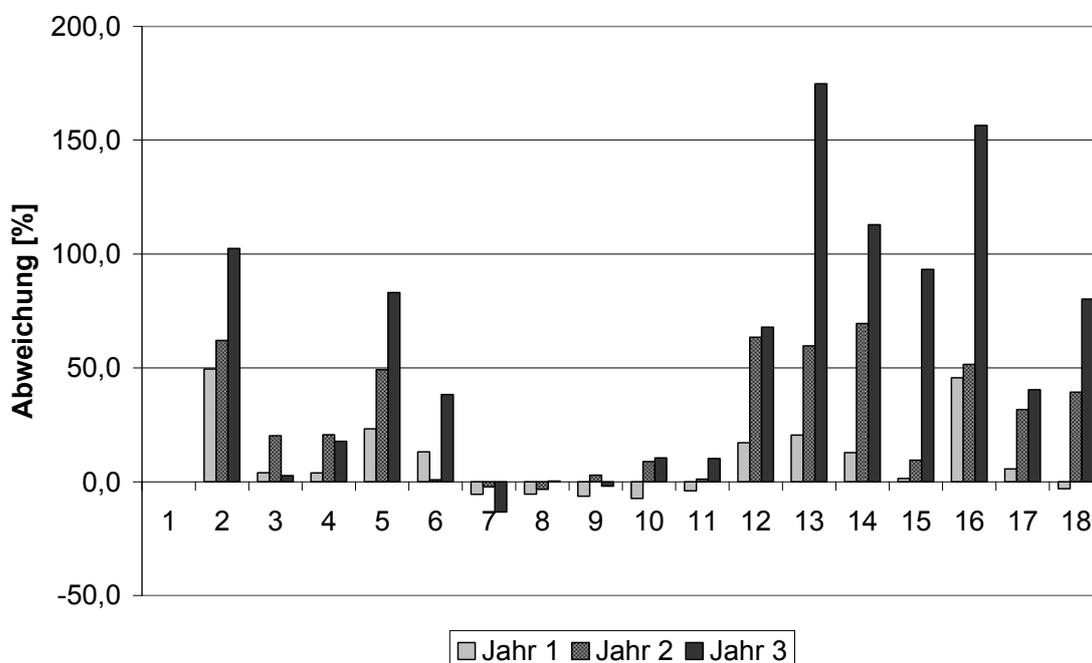


Abbildung 39: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Propionsäureethylester

5.8.2.2 i-Buttersäureethylester

Die Abweichungen für den Aromastoff i-Buttersäureethylester sind in Abb. 40 dargestellt. Im Jahr 1 wurde die Konzentration dieses Esters mit Ausnahme von Variante V15 durchweg vermindert, in den Varianten V4, V9, V12, V14 und V18 um mehr als 20 %. Im zweiten Versuchsjahr zeigte sich ein anderes Bild. Die Konzentrationen wurden im Vergleich zur Variante V1 vorwiegend erhöht, nur in den Varianten V4, V8, V9 und V12 kam es zu einer Verringerung. Im Jahr 3 überwog der vermindernde Einfluss. In den Varianten V6, V8, V11, V13, V15, V16 und V18 kam es zu einer minimalen Erhöhung, diese lag nur bei Variante V18 bei über 20 %, sonst bei < 10%.

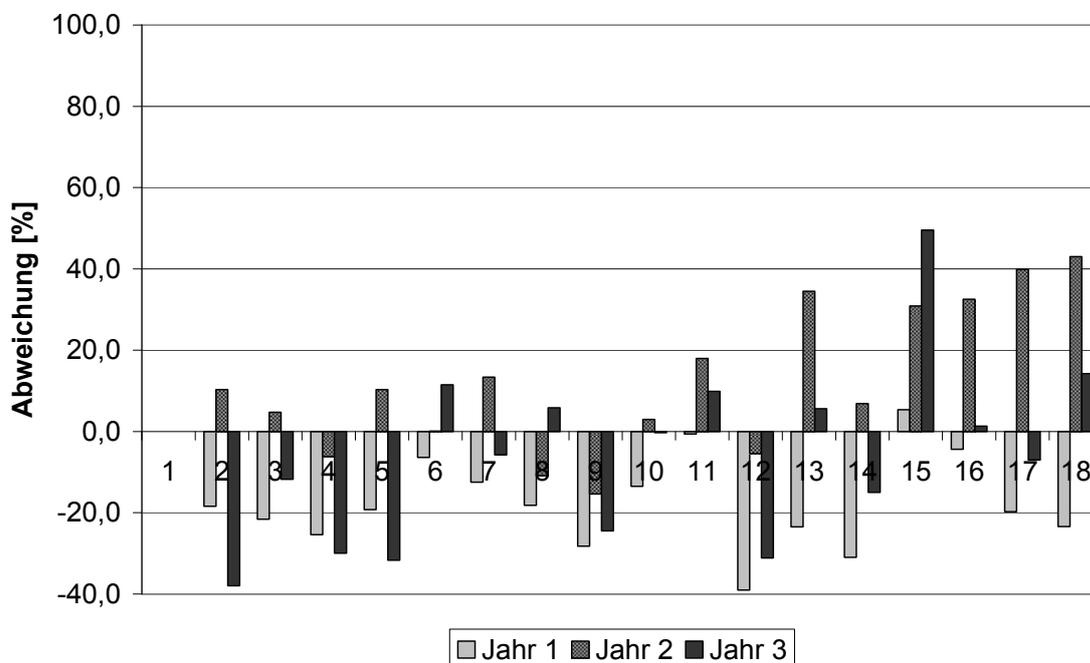


Abbildung 40: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von i-Buttersäureethylester

5.8.2.3 Buttersäureethylester

Die Abweichungen für den Aromastoff Buttersäureethylester sind in Abb. 41 dargestellt. Insgesamt zeigten die Varianten einen fördernden Effekt auf diesen Ester mit einem recht homogenen Bild über die drei Versuchsjahre. Die Varianten V2, V3, V4, V8, V9, V12 und V14 wiesen eine deutliche Erhöhung des Wertes um mindestens 20 % auf. Die Konzentrationen der Varianten V6, V10, V11, V13, V17 und V18 wurden nur sehr leicht erhöht, teilweise (V15 und V16) sogar leicht vermindert.

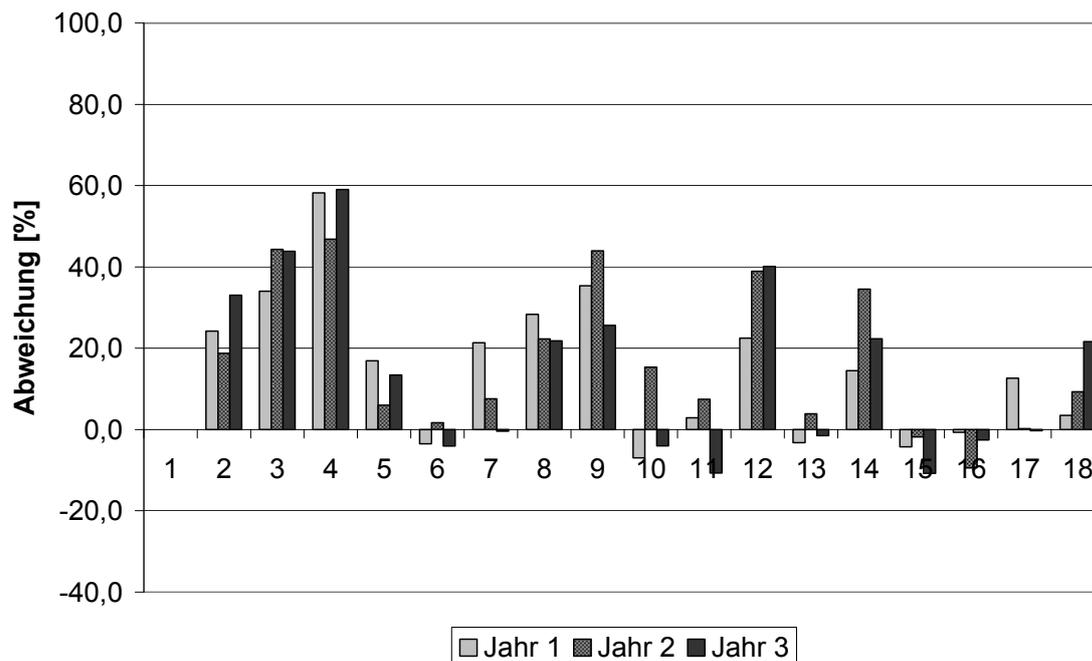


Abbildung 41: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Buttersäureethylester

5.8.2.4 Capronsäureethylester

Die Abweichungen für den Aromastoff Capronsäureethylester sind in Abb. 42 dargestellt. Die Beeinflussung war insgesamt gering. Sie betrug in allen Jahren bei allen Varianten maximal 20 % (mit Ausnahme von V13, V15 und V16). Die Werte der Varianten V2 bis V12 wurden insgesamt eher gefördert, die Werte der Varianten V13 bis V16 wurden durchweg vermindert.

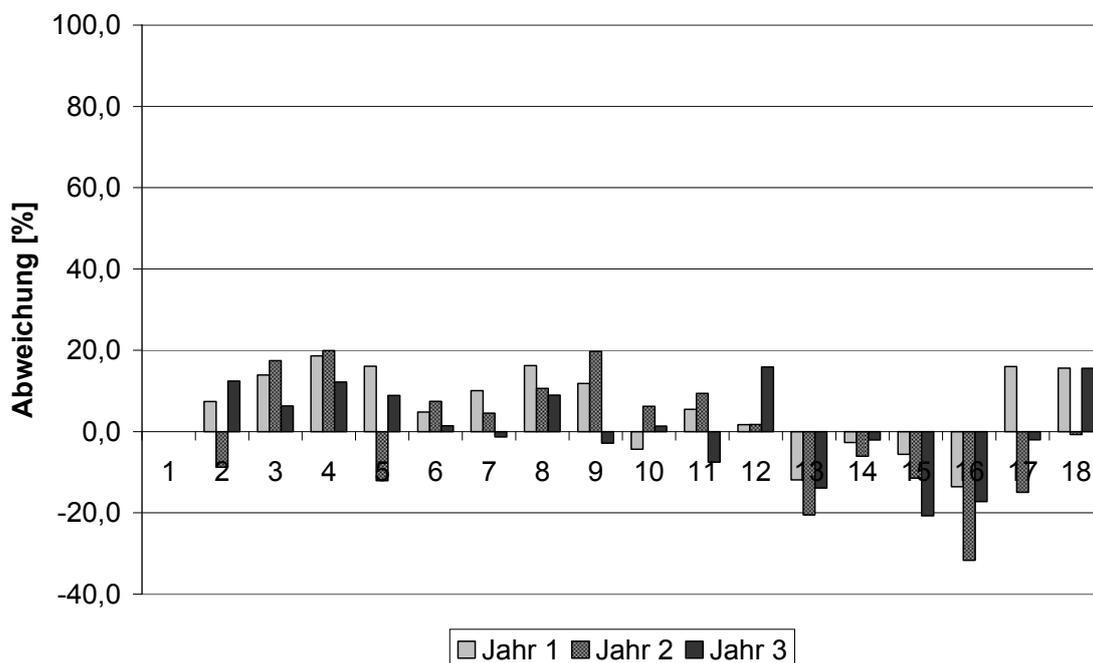


Abbildung 42: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Capronsäureethylester

5.8.2.5 Caprylsäureethylester

Die Abweichungen für den Aromastoff Caprylsäureethylester sind in Abb. 43 dargestellt. Die Werte dieses Fettsäureethylesters wiesen für die Varianten V3, V4, V7, V8 und V9 in allen drei Jahren eine Konzentrationserhöhung um bis zu 20 % auf. Die Varianten V13 bis V17 wiesen in allen drei Jahren eine Reduzierung der Konzentration um ca. 20 %, in Ausnahmen bis zu 48 % (V16) auf. Im Jahr 3 erfuhren die Varianten V2 und V5 ebenfalls eine Verminderung um mehr als 20 %.

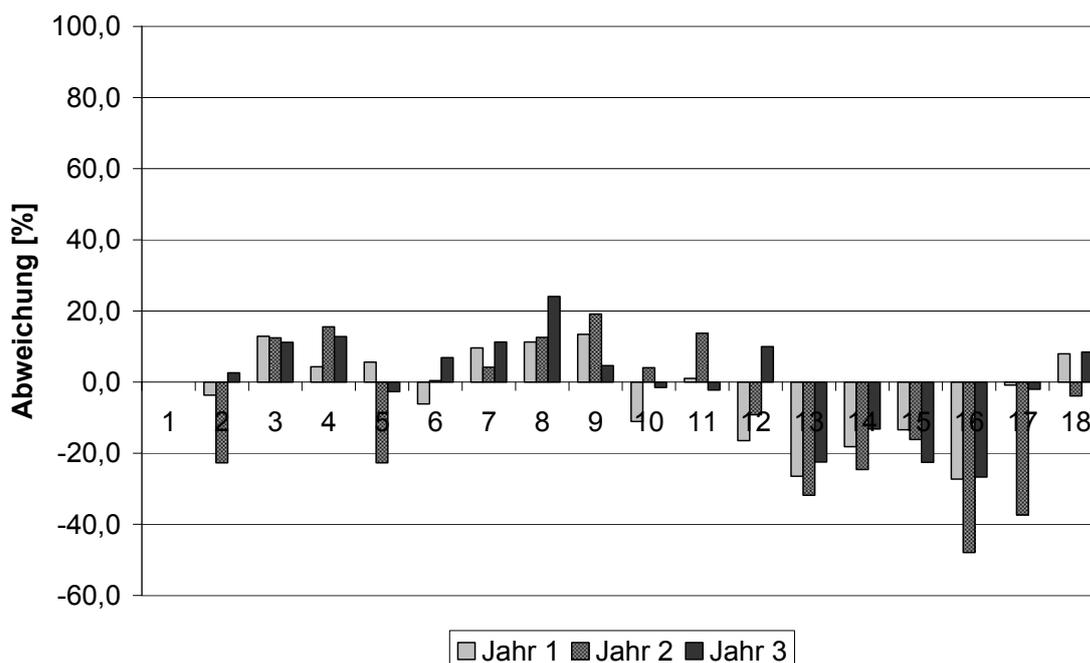


Abbildung 43: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Caprylsäureethylester

5.8.2.6 Caprinsäureethylester

Die Abweichungen für den Aromastoff Caprinsäureethylester sind in Abb. 44 dargestellt. Im Jahr 1 erfolgte eine Verminderung der Werte für die Varianten V2, V4, V6, V10, V12 bis V17 und V18 zwischen 10 und 40 % gegenüber der Variante V1. Eine geringe Erhöhung konnte für die Varianten V3, V5, V7, V9, V11 und V18 festgestellt werden. Diese betrug aber maximal 15 %. Im Jahr 2 zeigte sich ein geringer Anstieg der Konzentrationen für die Varianten V6, V10 und V18 um maximal 20 %, für die Varianten V3, V4, V7, V8, V9 und V11 um mehr als 20 und bis zu 40 %. Die Varianten V2, V5 und V12 bis V17 wiesen eine deutliche Reduzierung der Werte auf. Die Werte des dritten Jahres fielen durch ihre ausnahmslose Reduzierung für alle Varianten auf. Die Reduzierung betrug in allen Varianten mindestens 20 %, in den Varianten V2, V5 und V12 bis V17 über 40 %.

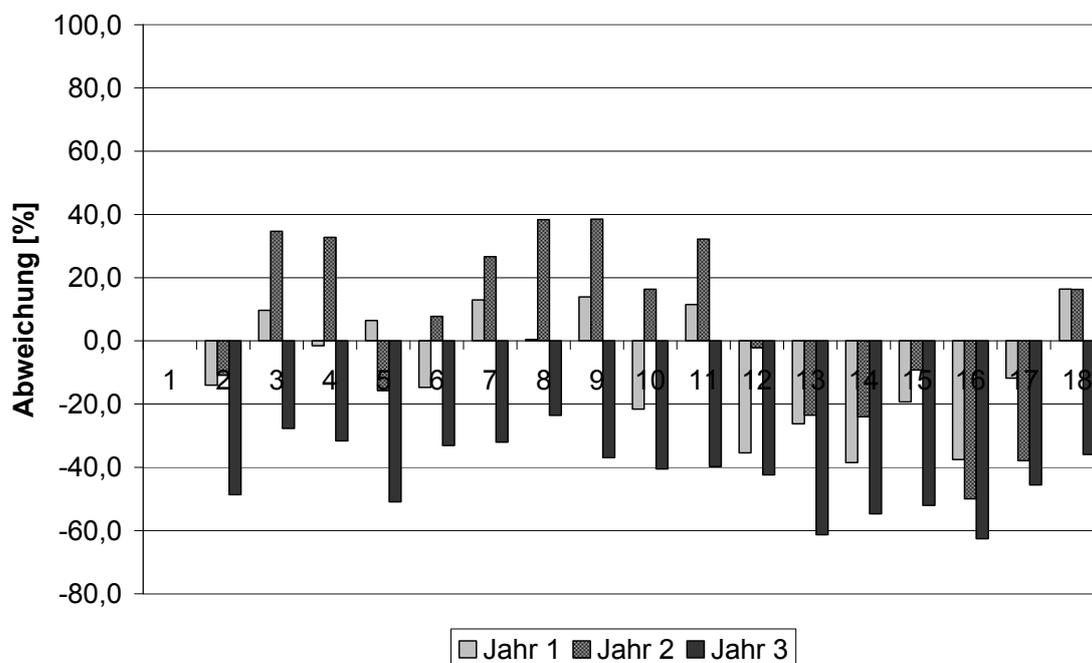


Abbildung 44: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von Caprinsäureethylester

5.8.3 Veränderung der Konzentration höherer Alkohole

5.8.3.1 2- Phenylethanol

Die Abweichungen für den Aromastoff 2-Phenylethanol sind in Abb. 45 dargestellt. In den meisten Varianten wurde der Aromastoff deutlich reduziert. Wobei die prozentuale Reduzierung in den Jahren 1 und 3 deutlich über den Werten des Jahres 2 lag. Im ersten und dritten Jahr liegt die Veränderung in den Varianten V2, V3, V4, V9, V12 und V14 bei über 40 %, in den Varianten V5, V7, V8, V10, V13, V16 und V17 bei deutlich unter 40 %. Die Werte des Jahres 2 fielen insgesamt durch eine geringere Reduzierung von maximal 30 % auf (Ausnahme V9 mit <40%). Die Varianten V6, V10, V11, V15 und V18 zeigten nur minimale Veränderungen in allen drei Jahren.

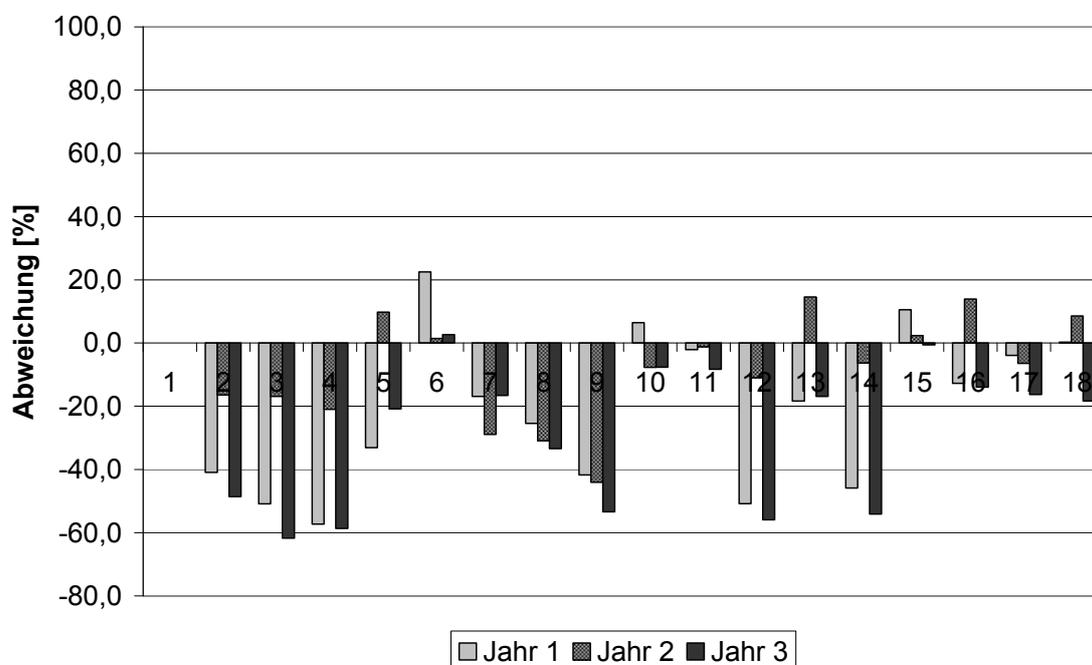


Abbildung 45: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von 2-Phenylethanol

5.8.3.2 i-Butanol

Die Abweichungen für den Aromastoff i-Butanol sind in Abb. 46 dargestellt. Für die Varianten V2, V3, V5, V6, V12, V13, V14, V16, V17 und V18 konnte im Jahr 1 und 3 eine deutliche Reduzierung im Vergleich zur Kontrollvariante V1 festgestellt werden. Sie betrug mindestens 10 %, in den Varianten V12, V13, V14, V17 und V18 sogar mindestens 30 % im ersten Jahr. Im zweiten Jahr kam es in den Varianten V3, V4, V7 bis V11 und V13 bis V15 und V18 zu einer leichten Erhöhung, die mit Ausnahme von Variante 13 bei unter 20 % lag. Die Verringerung in den übrigen Varianten betrug maximal 10 %.

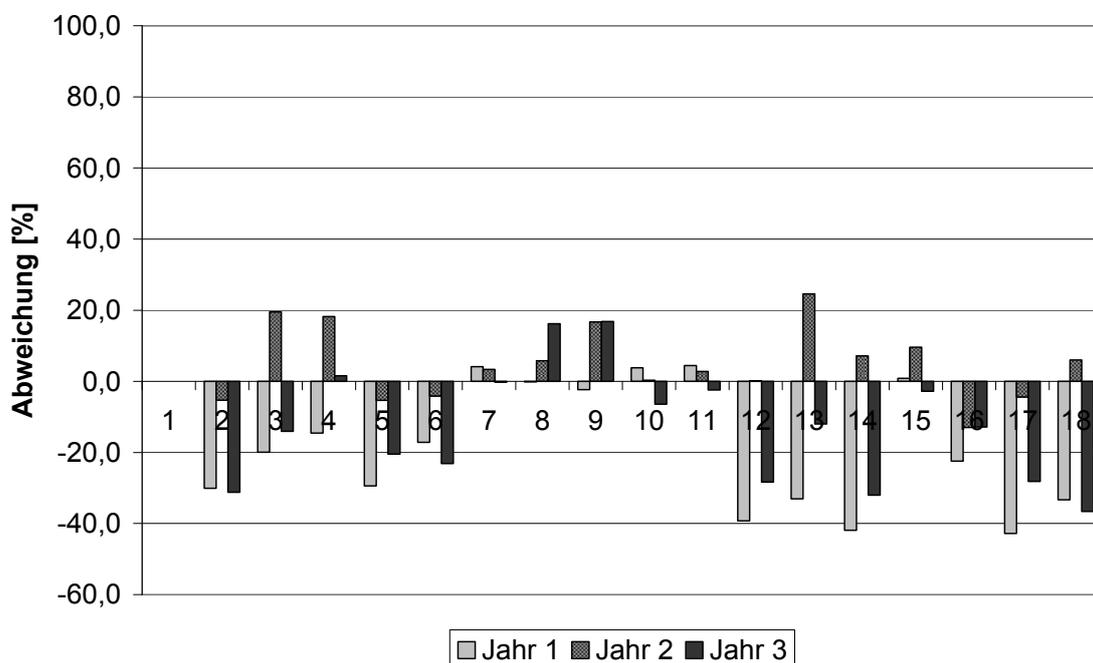


Abbildung 46: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von i-Butanol

5.8.3.3 2- Methylbutanol

Die Abweichungen für den Aromastoff 2-Methylbutanol sind in Abb. 47 dargestellt. Die Werte von 2-Methylbutanol waren in einigen Varianten von sehr starken Beeinflussungen geprägt, sowohl ins Negative als auch ins Positive. In den Jahren 1 und 3 fielen die Varianten V2, V3, V4 mit starken Reduzierungen um mindestens 20 bis zu 50 % auf. Im Jahr 2 betrug die Steigerungen in den Varianten V2, V3, V5, V12, V13, V14, V16 und V18 über 20 %, in den Varianten V13, V14 und V16 sogar weit über 60 %. Die Varianten V6 bis V11, V15 und V17 waren insgesamt mit Werten, die meistens unter 20 % lagen nur gering beeinflusst.

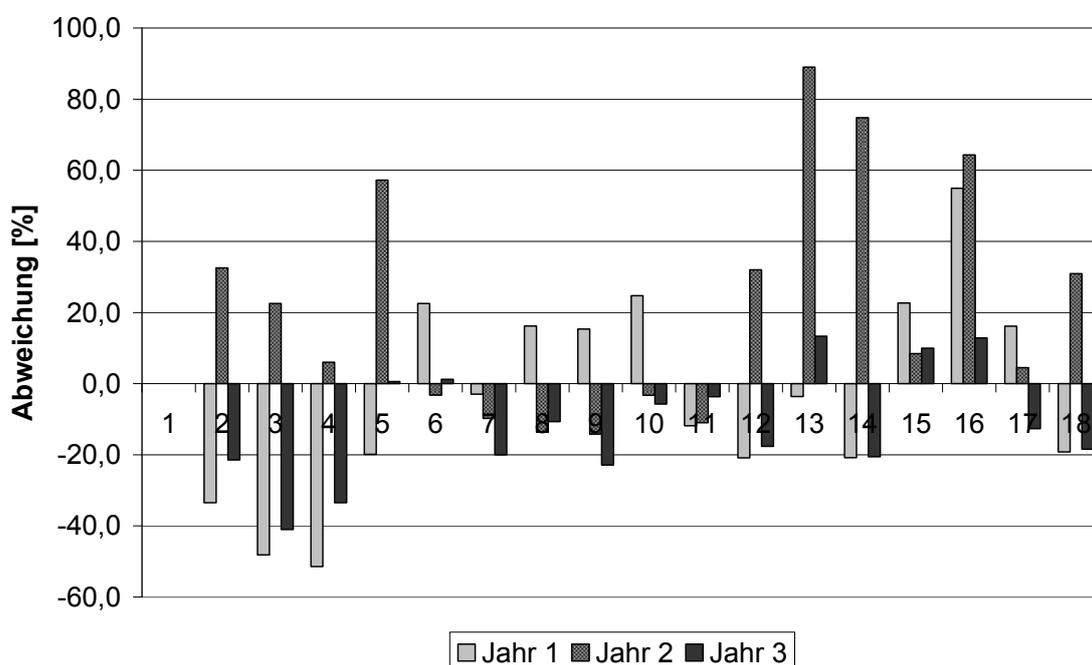


Abbildung 47: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von 2-Methylbutanol

5.8.3.4 3- Methylbutanol

Die Abweichungen für den Aromastoff 3-Methylbutanol sind in Abb. 48 dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollvariante V1 kam es im Jahr 1 bei den Varianten V2, V3, V4, V12 und V14 zu einer deutlichen Verminderung um über 20 %, in den Varianten V7, V11, V13 und V18 betrug die Reduzierung weniger als 20 %. Bei den Varianten V6, V8, V9, V10, V15, V16 und V17 erfolgte eine Erhöhung der Konzentration um mindestens 15 %, im Fall von Variante V16 um 55 %. Das zweite Jahr war von Erhöhungen bis 20 % bei den Varianten V 2, V3, V4, V12, V15, V16, V17 und V18 geprägt, die Werte von Variante V5, V13, V14 und V16 lagen um mindestens 20 % höher als die Kontrollvariante V1. Die Daten des dritten Versuchsjahres waren nur in Variante V3 um mehr als 20 % erhöht und in den Varianten V13 und V16 um mindestens 20 % erhöht. Alle anderen Varianten wiesen nur leichte Veränderungen mit deutlich weniger als 20 % auf (ins Negative oder Positive).

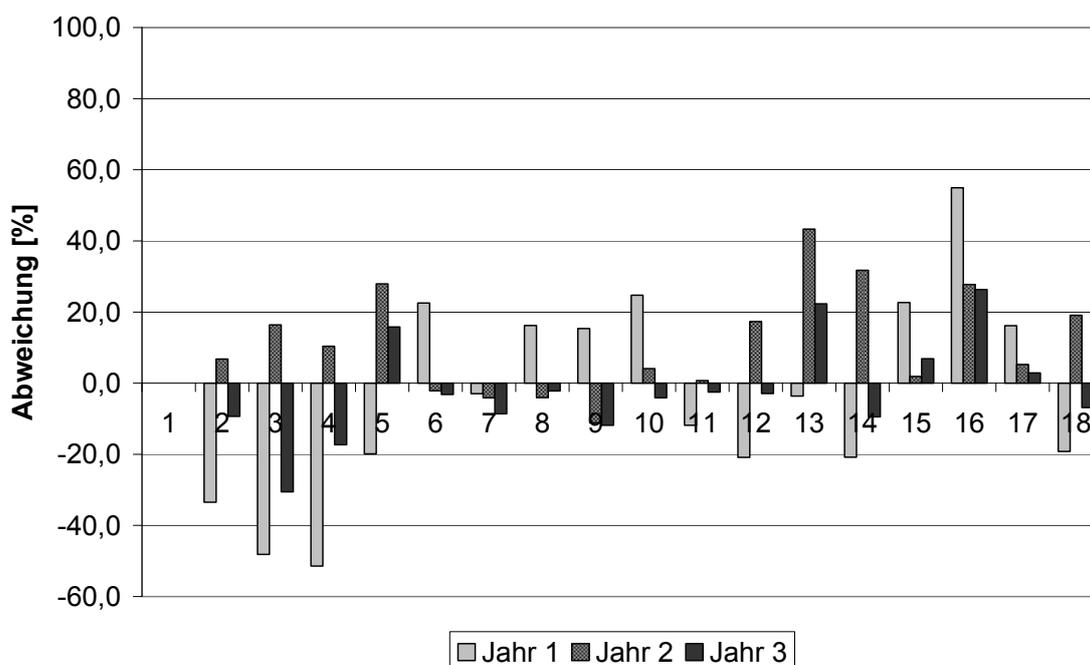


Abbildung 48: Versuch 1: Beeinflussung der Konzentration von 3-Methylbutanol

5.8.4 Gehalt Flüchtige Fettsäuren

Die Ergebnisse von Caprinsäure, Capronsäure und Caprylsäure zeigten insgesamt sehr geringe Werte und keine Unterschiede zwischen den Varianten. Auf die Darstellung dieser Ergebnisse wird an dieser Stelle verzichtet.

5.8.5 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) diente bei der Auswertung von Versuch 1 dazu, die Vielzahl an Aromaanalysen auf wenige Kernaussagen zu reduzieren. In Abbildung 49 ist die Analyse für die Durchschnittswerte aller 3 Versuchsjahre dargestellt. Die Abbildungen 82-84 im Anhang zeigen die Ergebnisse der PCA in gleicher Form für alle drei Jahre einzeln. Grundsätzliche Erläuterungen zur Hauptkomponentenanalyse wurden bereits in Kapitel 4.1.2 gegeben. Zur Auswertung der Daten mittels PCA wurden nur die Aromastoffe verwendet, die sich signifikant unterschieden, also eine statistisch gesicherte Information enthielten. Wie in Abbildung 49 zu sehen ist, erklären die beiden ersten Hauptkomponenten (Principal Components) PC 1 und PC 2 die Gesamtvarianz der Daten zu 78,6 %. Im Diagramm A der Abbildung 49 werden die Vektoren (Ladungen) dargestellt. Je länger der Vektor, desto höher ist die Beteiligung dieses Vektors an der Definition der Hauptkomponenten PC 1 oder PC 2. Entlang der ersten Hauptkomponente (PC1), die 50,8 % der Gesamtvarianz erklärt, lässt sich auf der linken Seite die Gruppe der Aromastoffe 2-Phenylethanol, i-Buttersäureethylester und Essigsäure-2-phenylethylester erkennen. Der kleine Winkel zwischen diesen Aromastoffen lässt auf einen hohen Verwandtschaftsgrad in dieser Analyse schließen. Auf der rechten Seite entlang der PC 1 bildet sich eine Gruppe aus den Aromastoffen Caprinsäureethylester, Caprinsäure, Caprylsäureester, Caprylsäure, Essigsäureethylester und Capronsäureester. Komponente PC 2 besitzt mit 27,7 % einen wesentlich geringeren Erklärungsgrad. Im Diagramm B sind die Scores der Versuchsvarianten dargestellt. Über diese Koordinaten kann der einzelnen Versuchsvariante eine Position in dem durch PC 1 und PC 2 definierten Koordinatensystem zugewiesen werden.

Es ist die Ausbildung von 4 verschiedenen Gruppen zu erkennen: Gruppe 1 (Variante V13 und V16), Gruppe 2 (Varianten V1, V6, V7, V10, V11, V17, V18), Gruppe 3 (Variante V3, V4, V8, V9) und Gruppe 4 (Variante V2, V5, V12, V14). Entsprechend der Vektoren aus Diagramm A lässt sich sagen, dass Gruppe 1 durch die Aromastoffe 3-Methylbutanol und Propionsäureethylester geprägt wurde. Die Gruppe 2 ließ sich durch i-Butanol prägen, und steht Gruppe 1 somit deutlich entgegen. Gruppe 3 wurde deutlich geprägt durch die Gruppe der Aromastoffe auf der rechten Seite entlang der PC 1 (Caprinsäureethylester, Caprinsäure, Caprylsäureester, Caprylsäure, Essigsäureethylester und Capronsäureester). Gruppe 4 wurde wesentlich durch den Aromastoff Essigsäure-3-methylbutylester charakterisiert. Die in Diagramm B durch Kreise markierten Variantengruppen lassen sich somit deutlich voneinander abgrenzen.

5.8.5.1 PCA für die Durchschnittswerte der 3 Versuchsjahre

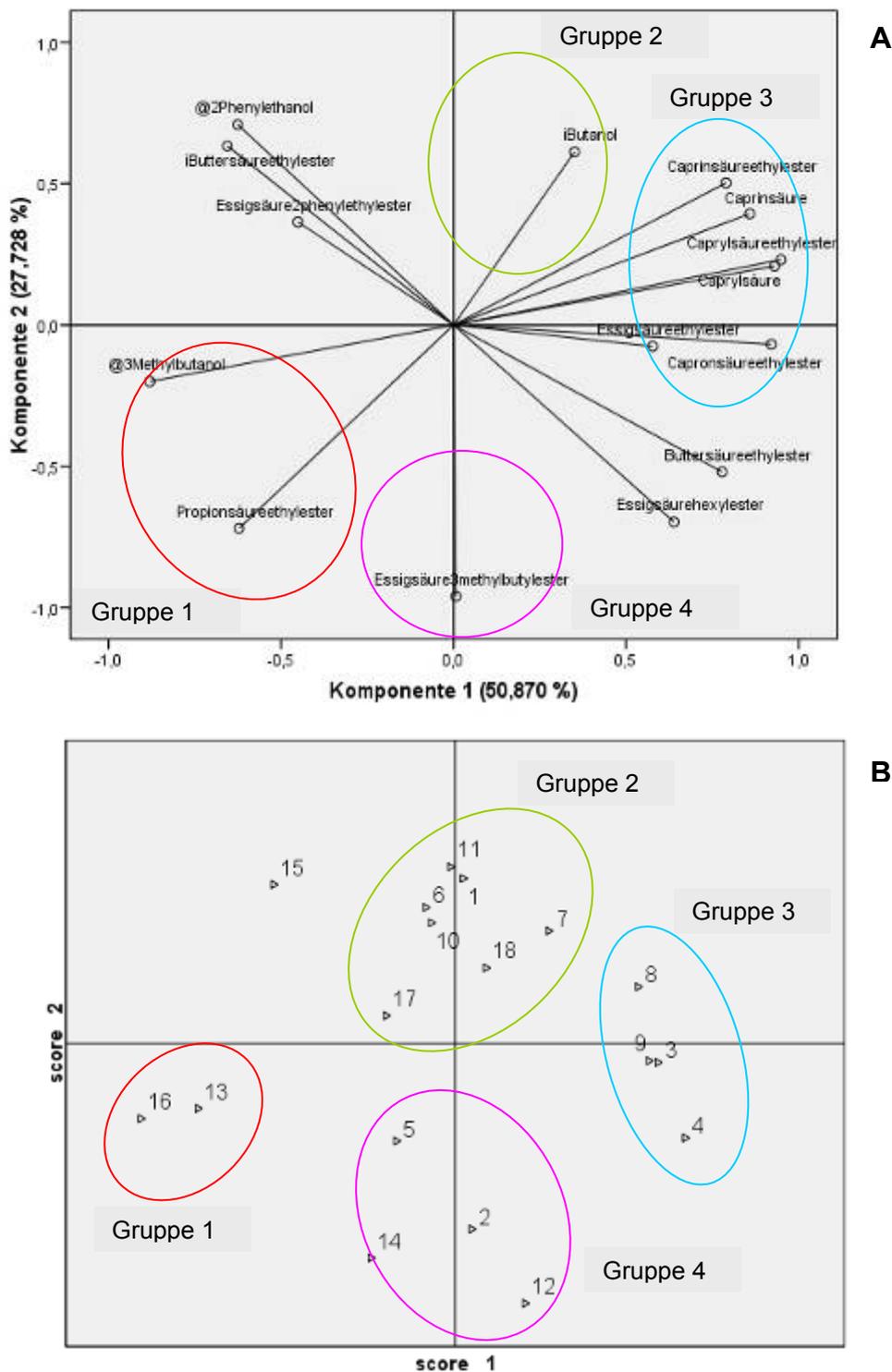


Abbildung 49: Versuch 1: Diagramme der Hauptkomponentenanalyse für die Durchschnittswerte der 3 Versuchsjahre

Im Diagramm A werden die Vektoren (Ladungen) dargestellt. Je länger der Vektor, desto höher ist die Beteiligung dieses Vektors an der Definition der Hauptkomponenten PC 1 oder PC 2. Im Diagramm B sind die Scores der Versuchsvarianten dargestellt. Über diese Koordinaten kann der einzelnen Versuchsvariante eine Position in dem Koordinatensystem zugewiesen werden. Die Varianten können in 4 Gruppen eingeteilt werden.

Tabelle 19 zeigt, ob sich die einzelnen Varianten gegenüber der Kontrollvariante V1 signifikant unterscheiden. Als Signifikanztest wurde die Varianzanalyse mit dem post hoc-Test nach Dunnett für jedes Jahr einzeln und für den Durchschnittswert über alle 3 Versuchsjahre durchgeführt. Um die Analyse über 3 Jahre zu realisieren, wurde der Datensatz vorher transformiert (\log_{10}). Signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede sind mit der Abkürzung n.s. bezeichnet.

Tabelle 19: Versuch 1: Übersicht über die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsvarianten und der Kontrollvariante V1.
 ANOVA mit Test nach Dunnett ; * bedeutet signifikant unterschiedlich bei $\alpha = 0,05$; n.s. bedeutet nicht signifikant. $\bar{\varnothing}$ tr = Durchschnittswerte aus 3 Jahren, der Datensatz wurde vorher transformiert.

Kontrolle	Variante	Essigsäure-ethylester				Kontrolle	Variante	Essigsäure-2-phenylethylester				Kontrolle	Variante	Essigsäure-3-methylbutylester				Kontrolle	Variante	Essigsäure-hexylester			
		Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	$\bar{\varnothing}$ tr			Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	$\bar{\varnothing}$ tr			Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	$\bar{\varnothing}$ tr			Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	$\bar{\varnothing}$ tr
1	2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	2	*	n.s.	n.s.	n.s.	1	2	*	*	*	*	1	2	n.s.	n.s.	*	n.s.
1	3	n.s.	*	n.s.	n.s.	1	3	*	n.s.	*	n.s.	1	3	n.s.	*	n.s.	*	1	3	n.s.	*	*	*
1	4	n.s.	*	n.s.	n.s.	1	4	*	n.s.	n.s.	n.s.	1	4	*	*	*	*	1	4	*	n.s.	*	*
1	5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	5	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	5	*	*	*	*	1	5	*	n.s.	*	n.s.
1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	7	*	n.s.	*	n.s.
1	8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	8	*	*	*	*	1	8	*	n.s.	*	*
1	9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	9	*	n.s.	n.s.	*	1	9	n.s.	*	*	*	1	9	*	*	*	*
1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	12	*	*	*	n.s.	1	12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	12	*	*	*	*	1	12	*	*	*	*
1	13	n.s.	*	n.s.	*	1	13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	13	*	*	*	*	1	13	n.s.	*	n.s.	n.s.
1	14	n.s.	*	n.s.	*	1	14	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	14	*	*	*	*	1	14	*	n.s.	*	*
1	15	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	15	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	15	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	15	n.s.	n.s.	*	n.s.
1	16	n.s.	*	n.s.	*	1	16	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	16	*	*	*	*	1	16	n.s.	*	n.s.	n.s.
1	17	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	17	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	17	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	17	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	18	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	18	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	18	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	18	n.s.	n.s.	*	n.s.

Kontrolle	Variante	Propionsäure-ethylester				Kontrolle	Variante	i-Buttersäure-ethylester				Kontrolle	Variante	Buttersäure-ethylester				Kontrolle	Variante	Capronsäure-ethylester			
		Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	Ø ^{tr}			Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	Ø ^{tr}			Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	Ø ^{tr}			Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	Ø ^{tr}
1	2	*	*	*	*	1	2	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	2	*	n.s.	*	*	1	2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	3	*	n.s.	n.s.	n.s.	1	3	*	*	*	*	1	3	n.s.	*	n.s.	n.s.
1	4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	4	*	n.s.	*	*	1	4	*	*	*	*	1	4	*	*	n.s.	*
1	5	n.s.	*	*	*	1	5	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	8	*	n.s.	*	*	1	8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	9	*	n.s.	n.s.	*	1	9	*	*	*	*	1	9	n.s.	*	n.s.	n.s.
1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	12	n.s.	*	*	*	1	12	*	n.s.	*	*	1	12	*	*	*	*	1	12	n.s.	n.s.	*	n.s.
1	13	n.s.	*	*	*	1	13	*	*	n.s.	n.s.	1	13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	13	n.s.	*	*	*
1	14	n.s.	*	*	*	1	14	*	n.s.	n.s.	*	1	14	n.s.	*	*	*	1	14	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	15	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	15	n.s.	*	*	*	1	15	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	15	n.s.	n.s.	*	n.s.
1	16	*	*	*	*	1	16	n.s.	*	n.s.	n.s.	1	16	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	16	n.s.	*	*	*
1	17	n.s.	*	n.s.	n.s.	1	17	n.s.	*	n.s.	n.s.	1	17	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	17	n.s.	*	n.s.	n.s.
1	18	n.s.	*	*	*	1	18	n.s.	*	n.s.	n.s.	1	18	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	18	n.s.	n.s.	*	n.s.

Kontrolle	Variante	Caprylsäure-ethylester				Kontrolle	Variante	Caprinsäure-ethylester				Kontrolle	Variante	2-Phenylethanol				Kontrolle	Variante	i-Butanol				Kontrolle	Variante	3-Methylbutanol			
		Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	Ø ^{tr}			Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	Ø ^{tr}			Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	Ø ^{tr}			Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	Ø ^{tr}			Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3	Ø ^{tr}
1	2	n.s.	*	n.s.	n.s.	1	2	n.s.	n.s.	*	*	1	2	*	n.s.	*	*	1	2	n.s.	n.s.	*	*	1	2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	3	*	n.s.	*	*	1	3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	3	n.s.	n.s.	*	n.s.
1	4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	4	*	n.s.	*	*	1	4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	5	n.s.	*	n.s.	n.s.	1	5	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	5	*	n.s.	*	n.s.	1	5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	7	n.s.	*	*	n.s.	1	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	8	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	8	*	*	*	*	1	8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	9	*	*	*	*	1	9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	12	*	n.s.	n.s.	*	1	12	*	n.s.	*	*	1	12	*	n.s.	*	*	1	12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	13	*	*	*	*	1	13	n.s.	n.s.	*	*	1	13	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	13	*	*	n.s.	n.s.	1	13	n.s.	n.s.	n.s.	*
1	14	n.s.	*	n.s.	*	1	14	*	n.s.	n.s.	*	1	14	*	n.s.	*	*	1	14	*	n.s.	*	*	1	14	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	15	n.s.	n.s.	*	*	1	15	n.s.	n.s.	n.s.	*	1	15	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	15	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	15	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	16	*	*	*	*	1	16	*	*	n.s.	*	1	16	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	16	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	16	n.s.	n.s.	*	*
1	17	n.s.	*	n.s.	n.s.	1	17	n.s.	n.s.	*	*	1	17	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	17	*	n.s.	*	*	1	17	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1	18	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	18	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	18	n.s.	n.s.	*	n.s.	1	18	*	n.s.	*	*	1	18	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

5.9 Versuch 2 : Hefevergleich

Der Versuch 2 diente der Untersuchung von 35 unterschiedlichen kommerziellen Reinzuchtheferen auf ihre Vielfalt in der Aromausprägung während der alkoholischen Gärung. Die Vergärung erfolgte in einem pasteurisierten Most unter konstanten Bedingungen. Die Aromastoffanalyse erfolgte nach Beendigung der alkoholischen Gärung. Alle Weine waren in den trockenen Bereich ($< 9 \text{ g L}^{-1}$ Restzucker) vergoren, ein biologischer Säureabbau konnte ausgeschlossen werden, da die Milchsäurewerte $< 0,5 \text{ g L}^{-1}$ betragen.

Zur Veranschaulichung der Unterschiede und der Gemeinsamkeiten wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. In Abbildung 50 ist das resultierende Dendrogramm auf Basis der gebildeten Aromastoffe dargestellt. Es lassen sich vier verschiedene Cluster erkennen, die als Gruppe durch eine gemeinsame Aromacharakteristik geprägt sind. Cluster 1 (rot) enthält 11 Hefestämme, Cluster 2 (blau) enthält 14 Hefestämme, Cluster 3 (grün) enthält 8 Hefestämme, Cluster 4 (orange) enthält 2 Hefestämme.

Um zu verdeutlichen, welche Unterschiede in den Aromastoffen einen wesentlichen Beitrag zur Charakterisierung der Clustergruppe beitragen, wurden die Durchschnittswerte je Aromastoff in einem weiteren Balkendiagramm (Abb. 51) zusammengefasst. Abbildung 51 zeigt die Ausprägung jedes Aromastoffes in den jeweiligen Clustern. Demnach grenzte sich Cluster 1 von Cluster 2 durch sehr geringe Werte bei den verschiedenen Essigsäureestern und höhere Werte von *i*-Buttersäureethylester und Bernsteinsäure ab. Cluster 3 besitzt im Vergleich zu Cluster 1 und 2 erhöhte Werte von Essigsäure-2-phenylethylester und Essigsäure-3-methylbutylester. Außerdem fielen die hohen Werte von Capronsäureethylester und Caprylsäureethylester auf. Im Vergleich zu den anderen Clustern fällt Cluster 4 durch sehr hohe Werte von Essigsäure-2-phenylethylester und Essigsäure-3-methylbutylester auf. Ferner wurde Cluster 4 durch einen sehr erhöhten Wert an Bernsteinsäurediethylester gekennzeichnet. Bernsteinsäure, normalerweise ein Indikator für die Alterung von Wein, wies in diesem Versuch große Unterschiede allein durch die Vergärung mit unterschiedlichen Hefestämmen auf. Die Weine wurden zum gleichen Zeitpunkt analysiert, der Faktor Zeit stellte somit keinen Unterschied dar.

5.9.1 Clusteranalyse auf Basis der Aromastoffe

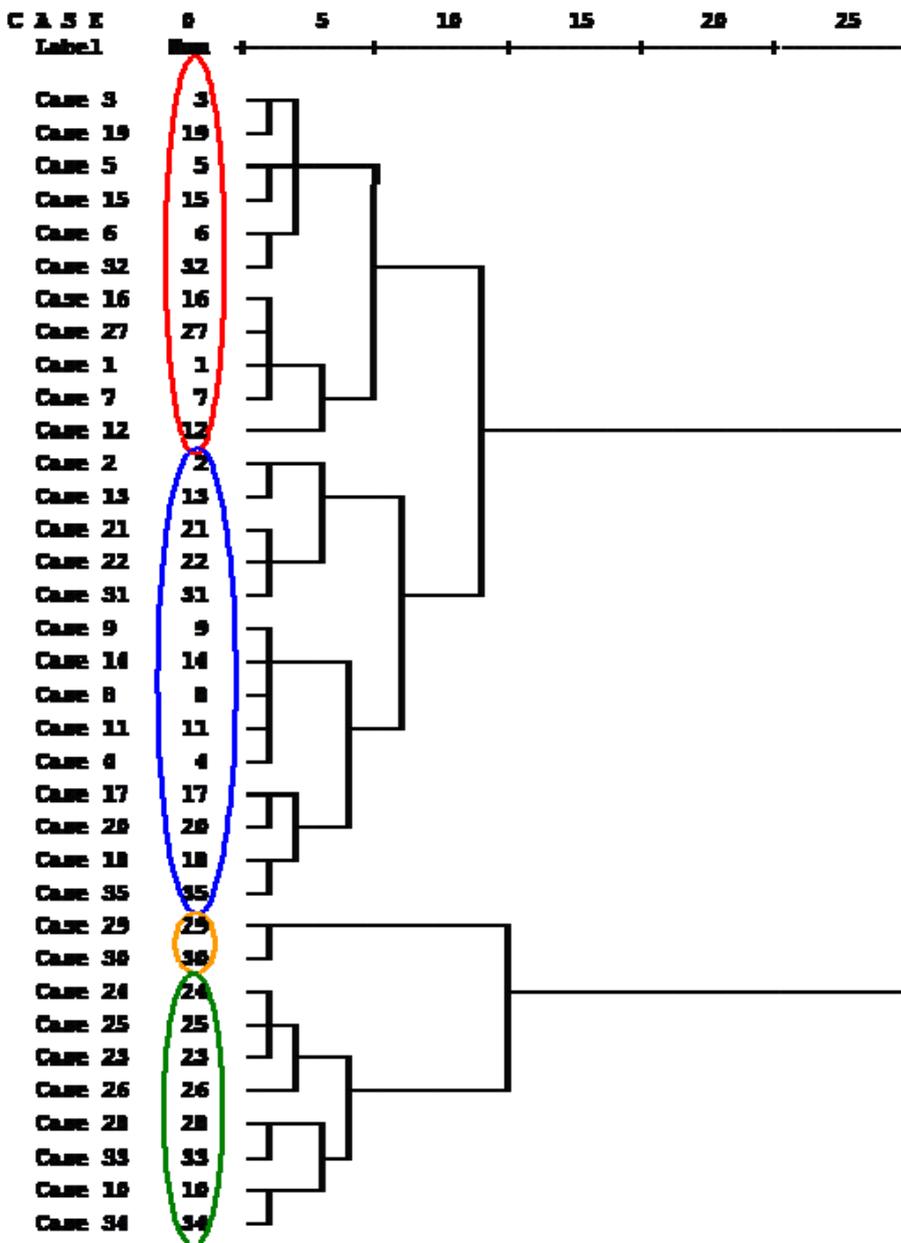


Abbildung 50: Versuch 1: Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse für Hefestamm 1-35.

Das Dendrogramm wurde auf Basis der gebildeten Aromastoffe anhand der Ward Methode errechnet. Es lassen sich vier verschiedene Cluster erkennen, die als Gruppe durch eine gemeinsame Aromacharakteristik geprägt sind. Num = Nummerierung der Hefestämme. Cluster 1 (rot), Cluster 2 (blau), Cluster 3 (grün), Cluster 4 (orange).

5.9.2 Aromacharakteristik der Cluster

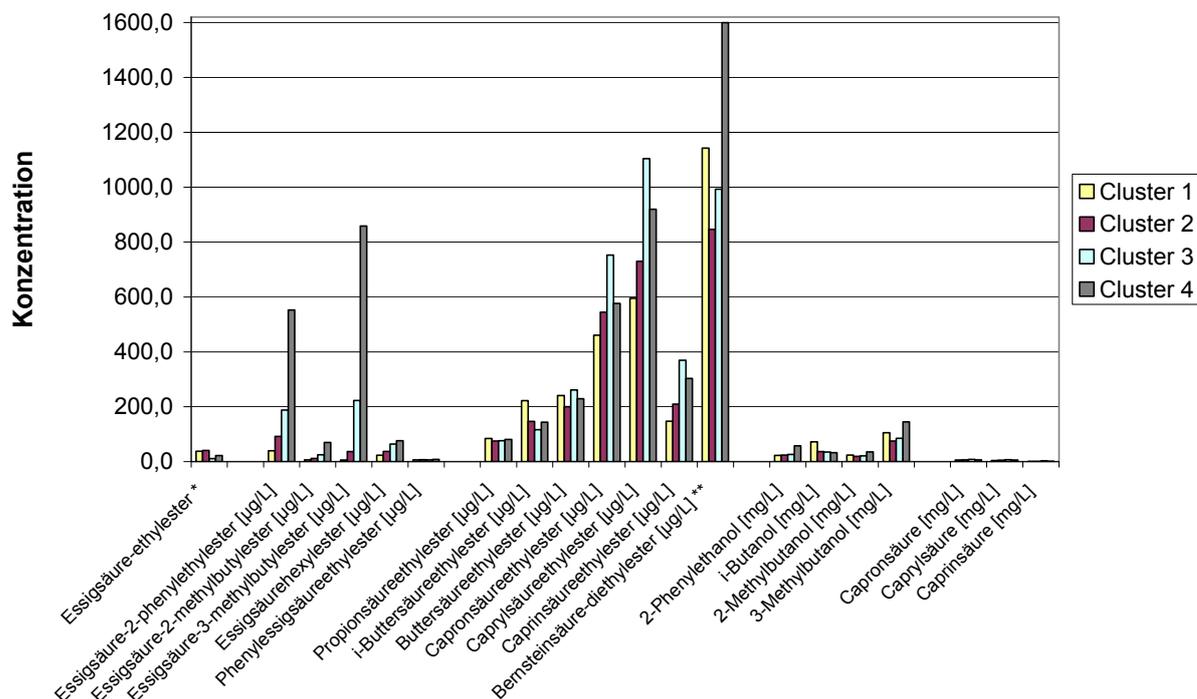


Abbildung 51: Versuch 1: Charakterisierung der Cluster 1 bis 4 anhand der einzelnen Aromastoffe.

Die Cluster unterscheiden sich durch die Konzentration der charakterisierenden Aromastoffe.

* = Werte stellen die relative Peakfläche dar; ** = Werte wurden multipliziert mit Faktor 0,5.

5.9.3 Bildung von SO₂ und seinen Bindungspartnern

Die Bildung von SO₂ während der alkoholischen Gärung ist in Abbildung 52 als Mittelwert dargestellt. Von 35 untersuchten Hefestämmen lag bei 15 Stämmen eine Konzentration von < 10 mg L⁻¹ Gesamt-SO₂ vor. In der Kategorie 10 – 20 mg L⁻¹ lagen weitere 15 Hefestämme und in der Kategorie > 20 mg L⁻¹ Gesamt SO₂ lagen 5 Hefestämme. Der Maximalwert lag bei 57 mg L⁻¹, der Minimalwert lag bei 2 mg L⁻¹ Gesamt-SO₂. Abbildung 53 zeigt den Mittelwert der Konzentration der SO₂ – Bindungspartner Acetaldehyd, Pyruvat und α-Ketoglutarat der 35 Hefestämme. Die Konzentration von Acetaldehyd schwankte zwischen 11 und 49 mg L⁻¹, wobei nur 2 Varianten oberhalb 30 mg L⁻¹ lagen. Die Konzentration von Pyruvat schwankte zwischen 8 und 249 mg L⁻¹, wobei 11 Varianten oberhalb 100 mg L⁻¹ lagen. Die Bandbreite der Konzentration von α-Ketoglutarat lag bei 18-232 mg L⁻¹, 16 Varianten lagen über 100 mg L⁻¹. Während 11 Hefestämme (z.B. 4, 14, 26, 28, 29, 30) bei allen drei Substanzen niedrige Werte aufwiesen, haben 18 Hefestämme sowohl bei Pyruvat als auch bei α-Ketoglutarat stark erhöhte Werte, während Acetaldehyd nur in geringer Konzentration vorlag. Zusätzlich sind sechs Hefestämme dadurch charakterisiert, dass

der Wert von α -Ketoglutarat noch einmal weit über der Konzentration von Pyruvat lag, so z. B. bei Hefestamm 1, 7 oder 17.

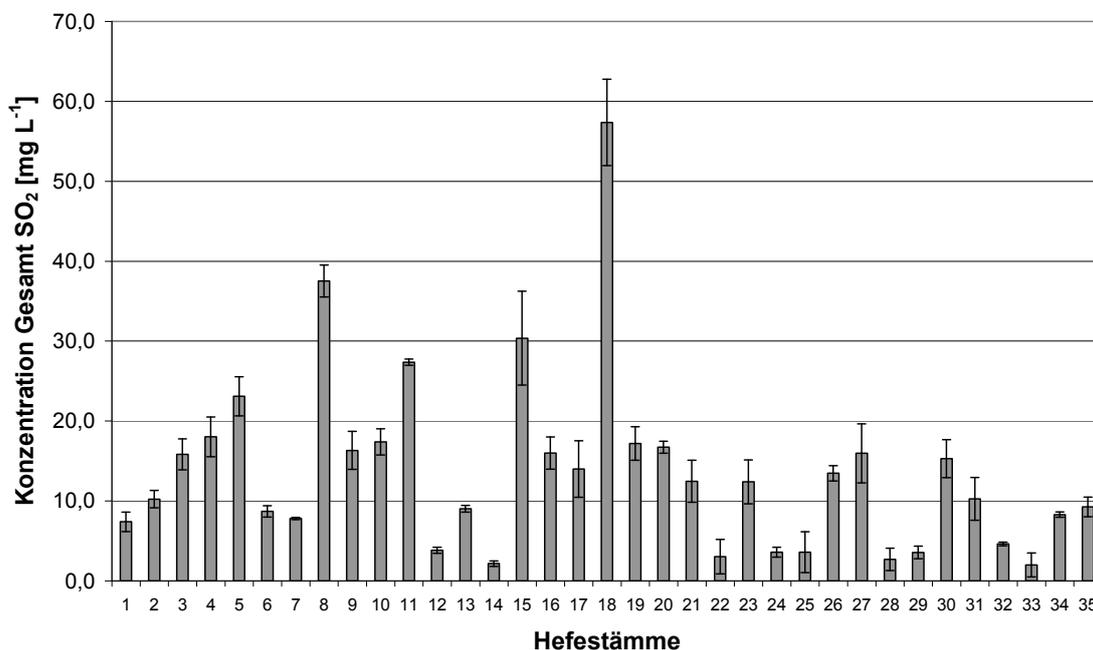


Abbildung 52: Versuch 2: SO₂-Bildung der verschiedenen kommerziellen Hefestämmen.

Dargestellt ist der Mittelwert. Die Balken zeigen die Standardabweichung (n=3). Quelle: modifiziert nach Werner & Rauhut (2009)

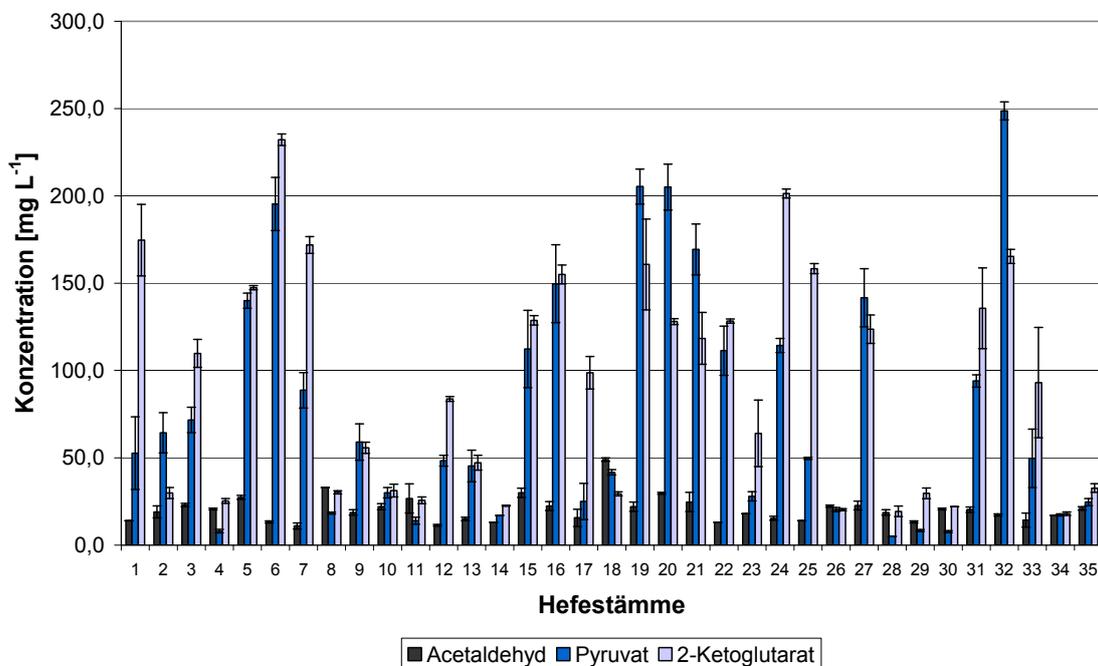


Abbildung 53: Versuch 2: Konzentration der SO₂-Bindungspartner.

Dargestellt ist der Mittelwert. Die Balken zeigen die Standardabweichung (n=3).

5.9.4 Korrelation von SO₂-Gehalt mit den Bindungspartnern

Bei der Analyse der Korrelation in diesem Datensatz zeigte sich, dass rein statistisch eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an Gesamt-SO₂ und dem Gehalt an Acetaldehyd vorliegt. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) der linearen Regression betrug 0,85. Für Pyruvat und α -Ketoglutarat ließ sich keine positive Korrelation feststellen (Abb. 54).

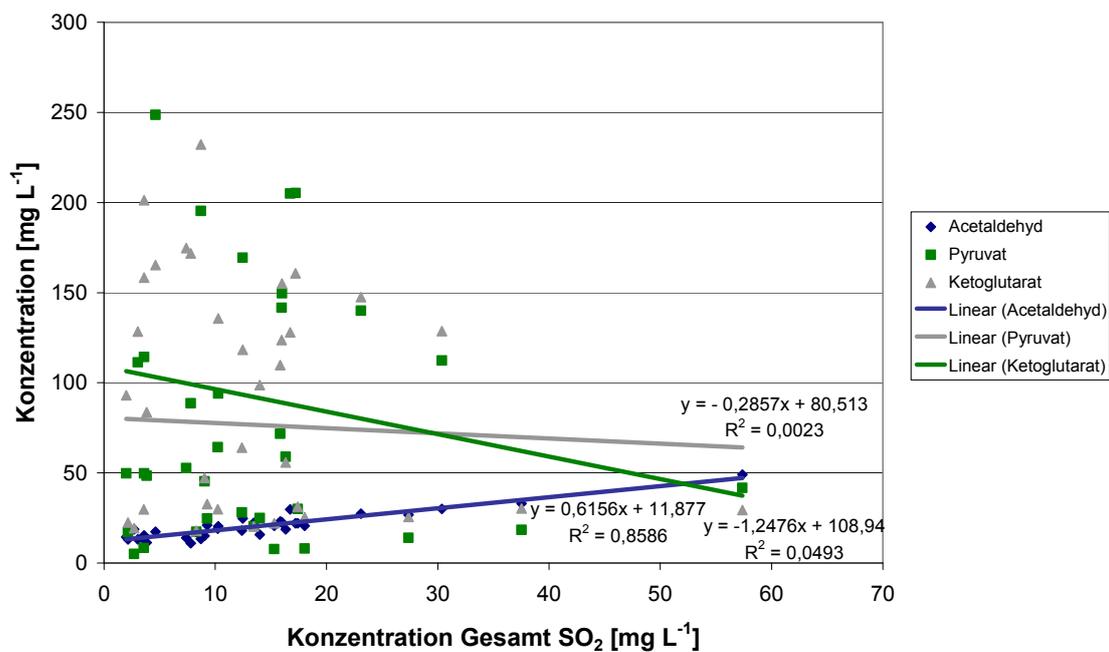


Abbildung 54: Versuch 2: Korrelativer Zusammenhang zwischen SO₂-Gehalt und den Bindungspartnern.

Die Grafik zeigt 35 Messwerte je SO₂-Bindungspartner und setzt diese mit den Werten der Gesamt SO₂ in Relation. Die Regressionsgerade verdeutlicht die Beziehung. R^2 = Bestimmtheitsmaß der Regression.

Themenbereich „Schwefel“

5.9.5 Vorversuche

Bevor es zur Durchführung der Feldversuche kam, wurden Vorversuche im Labor angesetzt, welche die jeweiligen Einzeleffekte der Versuchsanstellung überprüfen sollten.

5.9.5.1 Vorversuch 1 : Effekt von Netzschwefel

Im ersten Vorversuch wurde der Effekt von Netzschwefel (Anteil elementarer Schwefel: 80 %) auf die Bildung von niedrig-siedenden Schwefelverbindungen untersucht. Wie in Abbildung 55 zu erkennen ist, wurden unterschiedliche Konzentrationen von elementarem Schwefel in den Most dosiert.

Eine leichte Bildung von Schwefelwasserstoff (H_2S) setzte bei Hefe A bereits ab einer Dosage von $2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}_{\text{elementar}}$ ein. Je höher die Dosage, desto höher auch die Konzentration von H_2S im Jungwein. Die Beziehung unterlag einer positiven Korrelation (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,84$), bei einer Dosage von 20 mg L^{-1} betrug die Konzentration $45 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$.

Die Analyse weiterer niedrig-siedender Schwefelverbindungen brachte das Ergebnis, dass Methylmercaptan (MeSH) bei der Dosage von 20 mg L^{-1} nachgewiesen werden konnte und Ethylmercaptan schon ab $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}_{\text{elementar}}$. In der Variante mit $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}_{\text{elementar}}$ konnte auch eine deutliche Konzentration an Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) von $13 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ und bei $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}_{\text{elementar}}$ eine Konzentration von $39 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ nachgewiesen werden. Die Konzentration an Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc) fiel dagegen etwas geringer aus: $10 \text{ mg S}_{\text{elementar}}$: $4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; $20 \text{ mg S}_{\text{elementar}}$: $24 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Diese Werte liegen bereits im Bereich der Geruchsschwellenwerte dieser Substanzen. Der gleiche Versuch mit Hefe B (Abb. 56) zeigte noch wesentlich höhere Konzentrationen an Schwefelwasserstoff (H_2S). Bei einer Dosage von $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}_{\text{elementar}}$ wurde eine Konzentration von $148 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$ gemessen. Die Konzentration zeigte eine hohe Korrelation ($R^2: 0,97$) zur Netzschwefeldosage innerhalb der Versuchsanstellung. Die Gehalte an Ethylmercaptan (EtSH), Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) und Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc) wiesen ebenfalls eine deutliche positive Korrelation zur Dosage von Netzschwefel auf. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Netzschwefelrückstände, die im gärenden Most vorliegen, zur Bildung des unangenehm riechenden Schwefelböckers führen.

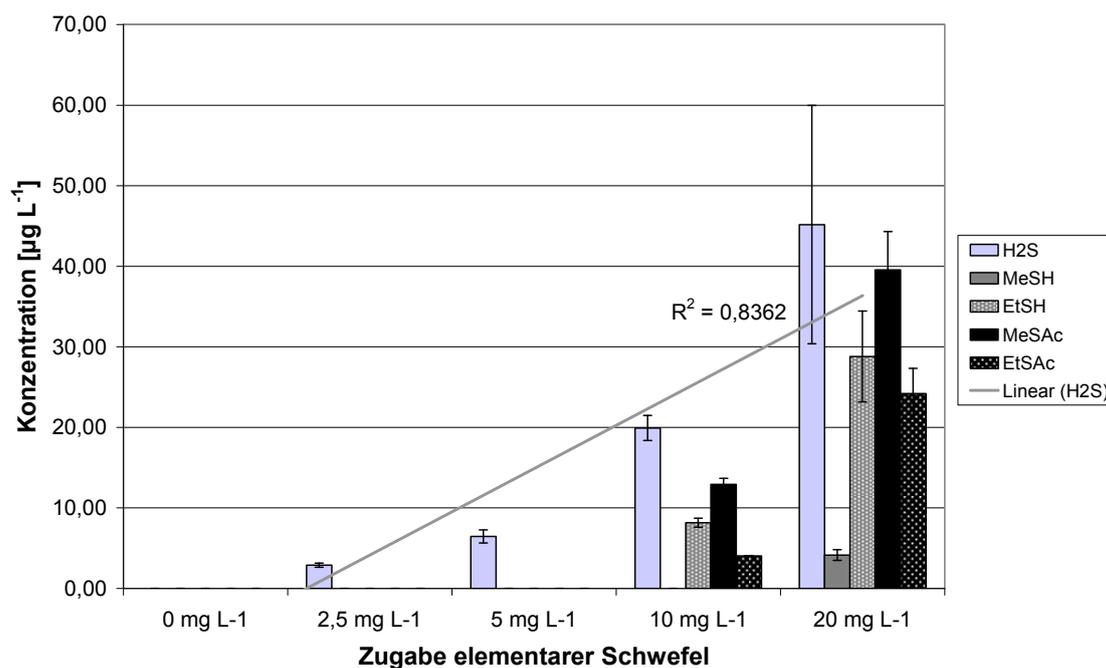


Abbildung 55: Effekt von Netzschwefel auf die Bildung flüchtiger S-Verbindungen:Hefe A

Die Abbildung zeigt die Konzentration von Schwefelwasserstoff (H₂S), Methanthiol (MeSH), Ethanthiol (EtSH), Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) und Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc) nach der Gärung. Elementarer Schwefel wurde dem Most in Form von Netzschwefel (80%) zugegeben. $R^2 =$ Bestimmtheitsmaß. Die Balken zeigen die Standardabweichung (n=5).

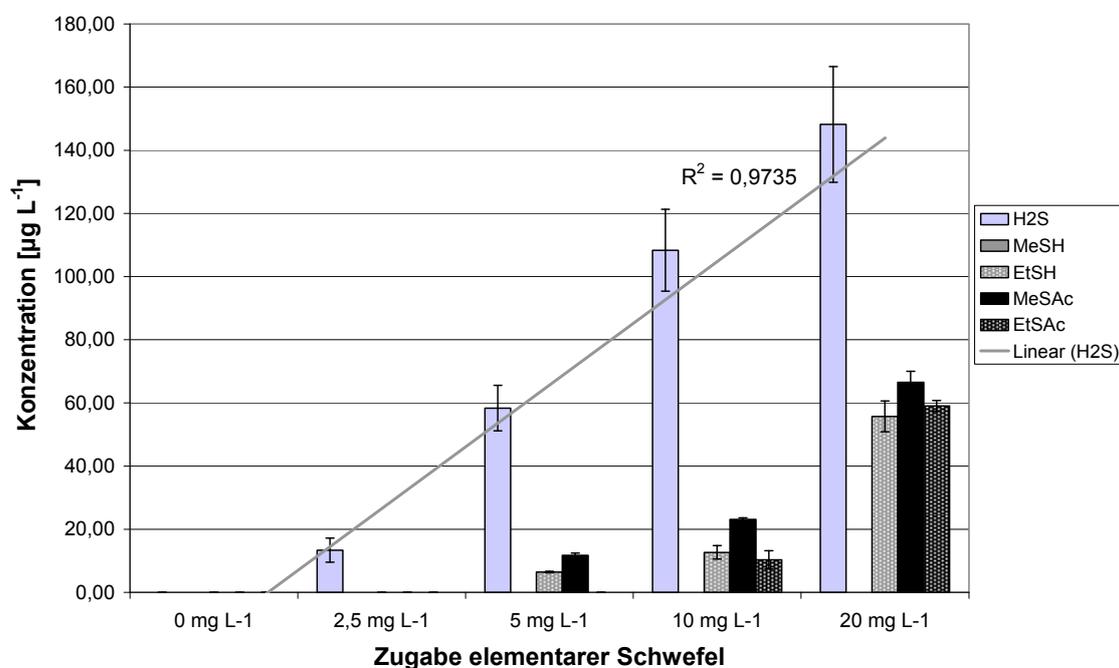


Abbildung 56: Effekt von Netzschwefel auf die Bildung flüchtiger S-Verbindungen:Hefe B

Die Abbildung zeigt die Konzentration von Schwefelwasserstoff (H₂S), Methanthiol (MeSH), Ethanthiol (EtSH), Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) und Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc) nach der Gärung. Elementarer Schwefel wurde dem Most in Form von Netzschwefel (80%) zugegeben. $R^2 =$ Bestimmtheitsmaß. Die Balken zeigen die Standardabweichung (n=5).

5.9.5.2 Vorversuch 2 : Effekt von Glutathion

Abbildung 57 zeigt den Effekt, den eine hohe Konzentration des Tripeptids Glutathion (GSH) auf die Bildung der niedrig-siedenden Schwefelverbindungen haben kann.

Die Kontrolle (ohne Zugabe) wies eine Konzentration von $13 \mu\text{g L}^{-1}$ H_2S auf, die Variante "Nährstoffpräparat" nur $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$ H_2S . Die Konzentrationen in den beiden Varianten GSH 50 mg L^{-1} und GSH 100 mg L^{-1} lagen bei $57 \mu\text{g L}^{-1}$ und $116 \mu\text{g L}^{-1}$ H_2S . Es handelt sich dabei um Konzentrationen, die einen deutlichen Geruchsfehler im Wein auslösen. Die Bildung der beiden Esterverbindungen Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) und Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc) war auch bei der Glutathion Zugabe festzustellen, die Konzentrationen lagen aber deutlich unter dem Niveau der Zugabe von Netzschwefel. In der Variante GSH 50 mg L^{-1} lagen die Konzentrationen der beiden Ester unter $20 \mu\text{g L}^{-1}$, bei der Variante GSH 100 mg L^{-1} lagen die Konzentrationen der Ester unter $30 \mu\text{g L}^{-1}$.

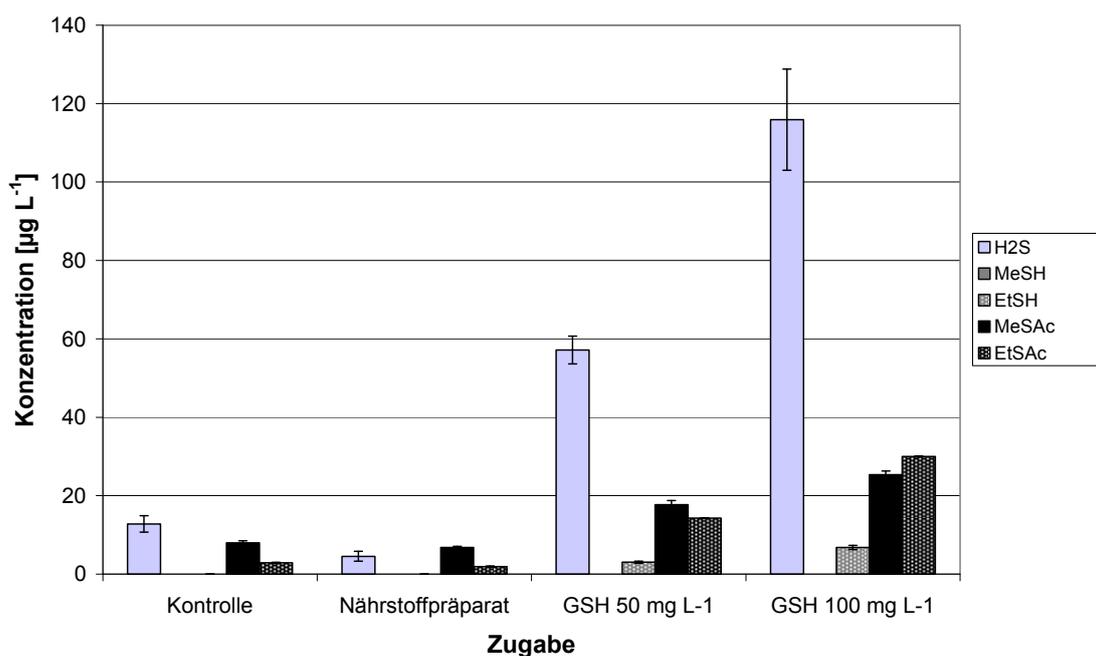


Abbildung 57: Effekt von Glutathion (GSH) auf die Bildung flüchtiger S-Verbindungen.

Die Abbildung zeigt die Konzentration von Schwefelwasserstoff (H_2S), Methanthiol (MeSH), Ethanthiol (EtSH), Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) und Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc) nach der Gärung. Kontrolle = ohne Zugabe, Nährstoffpräparat bestehend aus inaktiven Hefen, Thiamin, DAHP, Ammoniumsulfat, GSH = Glutathionzugabe in den Most. Die Balken zeigen die Standardabweichung ($n=5$).

5.9.5.3 Vorversuch 3 : SO_2 und Bindungspartner

In einem weiteren Vorversuch (Abbildung 58) wurden die Bildung von SO_2 und SO_2 -Bindungspartnern im Verlauf der Gärung bei zwei unterschiedlichen Hefestämmen (A

und B, wie auch in Abb. 55 und 56) untersucht. Die Gärung mit Hefe A unterlag einem üblichen Gärverlauf mit einer exponentiellen Phase zwischen dem 3. und 7. Tag der Gärung. Noch bevor diese Phase begann, wurde bereits ein Anstieg der Konzentration an Gesamt SO_2 festgestellt. Am 5. Tag der Gärung lagen bereits über 60 mg L^{-1} Gesamt- SO_2 vor, dieses Niveau wurde während der gesamten Gärdauer nicht mehr unterschritten. Bei der Bildung von Acetaldehyd und Pyruvat konnte ebenfalls innerhalb der ersten 7 Tage ein Maximum erreicht werden. Für Acetaldehyd wurde am Tag 5 ein Maximalwert von 101 mg L^{-1} gemessen, am Tag 7 lag der Gehalt von Pyruvat bei 116 mg L^{-1} . Beide Substanzen konnten im Verlauf der Gärung von Hefe A auf unter 50 mg L^{-1} reduziert werden. Die Konzentration von α -Ketoglutarat stieg nur langsam an und pendelte sich bei einem Wert um 30 mg L^{-1} ein. Der Gehalt wurde auch bis zum Ende der Gärung nicht weiter reduziert.

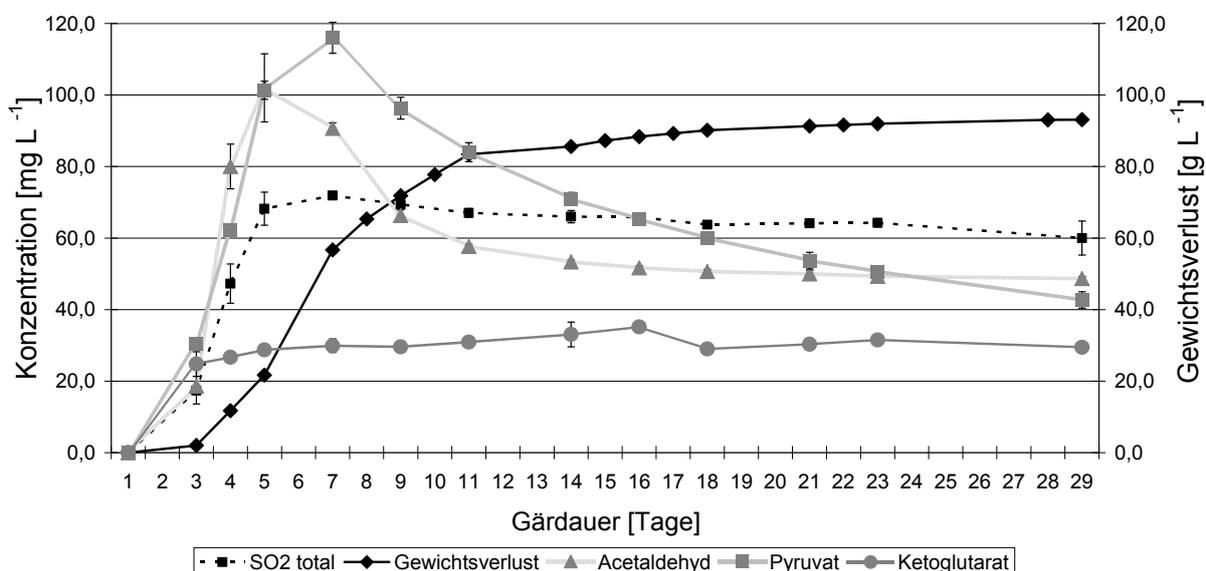


Abbildung 58: Bildung von SO_2 und seinen Bindungspartnern im Gärverlauf: Hefe A

Die Abbildung zeigt die Konzentration der Gesamt SO_2 und seiner Bindungspartner zu bestimmten Zeitpunkten im Verlauf der alkoholischen Gärung (dargestellt als kumulierter Gewichtsverlust). Die Balken zeigen die Standardabweichung ($n=3$).

Die Vergärung mit Hefe B (Abb. 59) zeigte einen etwas gemäßigteren Verlauf der alkoholischen Gärung und nur einen sehr geringen Anstieg der SO_2 Konzentration auf einen Wert um 5 mg L^{-1} . Die Konzentration von Acetaldehyd erreichte am 7. Tag ihr Maximum (183 mg L^{-1}), fiel daraufhin aber innerhalb von 2 Tagen auf einen Wert von 14 mg , der im Verlauf der Gärung gehalten wurde. Die Konzentration von Pyruvat erreichte bereits am 5. Tag ein Niveau über 250 mg L^{-1} , welches über einen Zeitraum von 12 Tagen gehalten wurde.

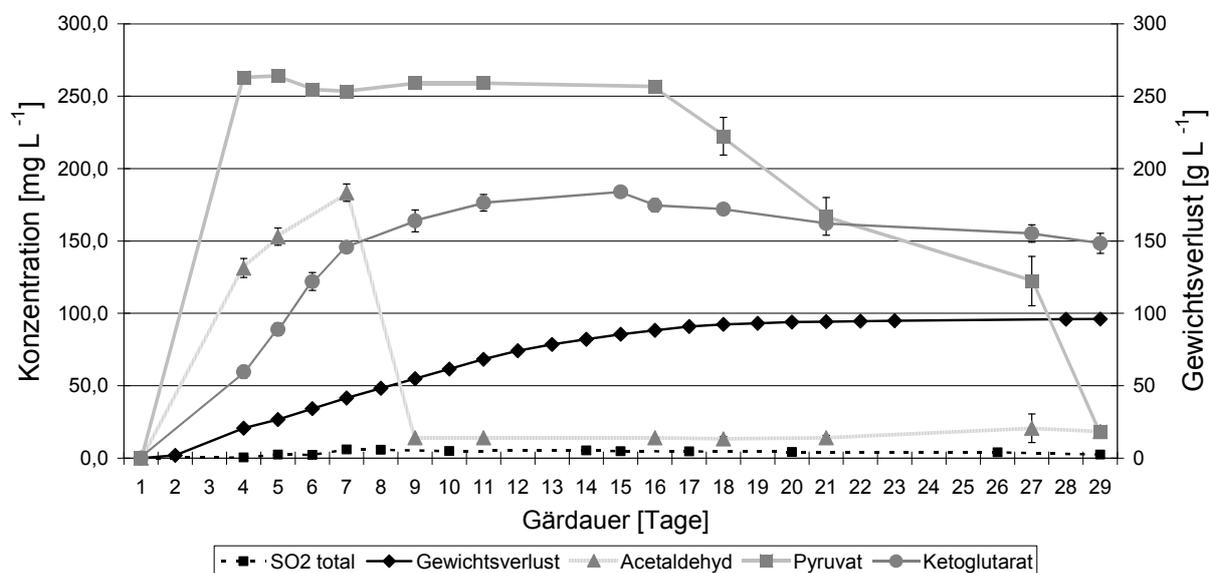


Abbildung 59: Bildung von SO₂ und seinen Bindungspartnern im Gärverlauf: Hefe B

Die Abbildung zeigt die Konzentration der Gesamt-SO₂ und seiner Bindungspartner zu bestimmten Zeitpunkten im Verlauf der alkoholischen Gärung (dargestellt als kumulierter Gewichtsverlust). Die Balken zeigen die Standardabweichung (n=3).

Anschließend folgte ein permanenter Abbau bis unter 20 mg L⁻¹ am Ende der Gärung. Die Konzentration von α-Ketoglutarat stieg bereits am 7. Tag auf ein Niveau von über 150 mg L⁻¹ an, dieses Niveau wurde bis zum Ende der Gärung nicht mehr unterschritten.

5.9.5.4 Vorversuch 4 : SO₂-Bildung durch die Hefe

Die Bildung von SO₂ während der Gärung in Abhängigkeit vom eingesetzten Hefestamm wurde in Abbildung 58 und 59 demonstriert. Die Abhängigkeit von der Rebsorte wurde im Vorversuch 4 (Abbildung 60) verdeutlicht. Im Jahrgang 2007 und 2008 wurde Most aus unterschiedlichen Parzellen aus dem Rheingau und Rheinhessen unter gleichen Bedingungen mit der gleichen Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*) vergoren. Wie in Abbildung 60 zu erkennen ist, unterschieden sich die Konzentrationen des gebildeten Gesamt-SO₂ wesentlich von Rebsorte zu Rebsorte. Die Konzentrationen schwankten zwischen 15 mg L⁻¹ und 60 mg L⁻¹. Es wird also deutlich, dass auch der Faktor Rebsorte mit seiner spezifischen Mostzusammensetzung einen großen Einfluss auf die Bildung von SO₂ hat. Verschiedene Schwefelquellen und deren Einfluss auf die SO₂-Bildung wurden in einem weiteren Hauptversuch (Versuch 3) vertieft und später diskutiert.

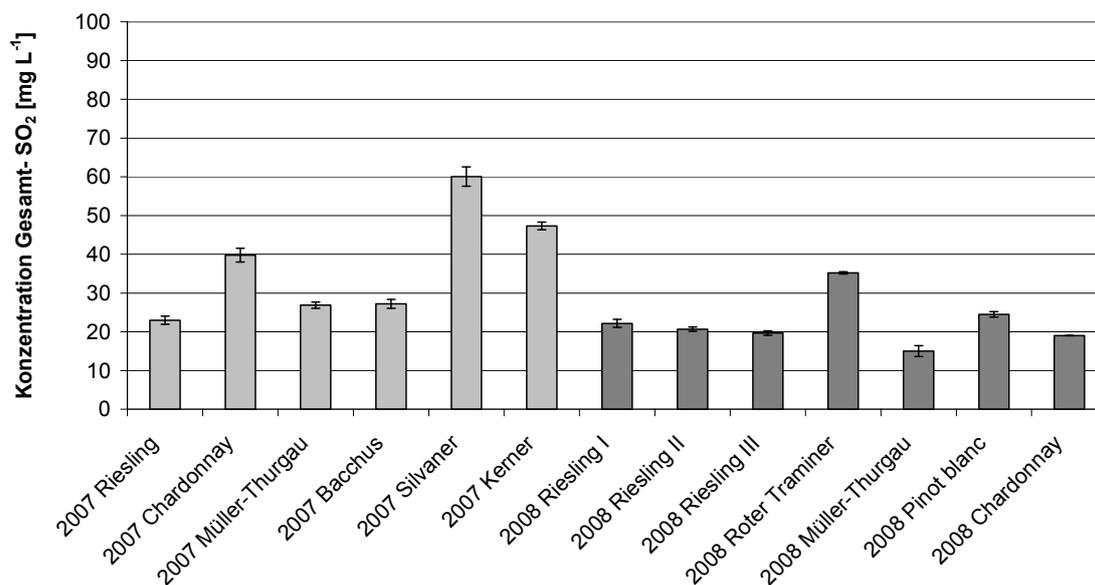


Abbildung 60: SO₂-Bildung des gleichen kommerziellen Hefestammes bei unterschiedlichen Rebsorten.

Die Abbildung zeigt die Konzentration der Gesamt-SO₂ nach der alkoholischen Gärung. Die Balken zeigen die Standardabweichung (n=3). Quelle: Werner & Rauhut (2009)

5.9.6 Versuch 3 : Flüchtige und nicht-flüchtige Schwefelverbindungen

Wie in Abbildung 9 verdeutlicht wurde, gibt es unterschiedlichste Quellen für den Eintrag von schwefelhaltigen Komponenten in die Gärung. Im Versuch 3 wurde der Einfluss verschiedener Schwefelquellen, die dem Gärmedium Most zugegeben wurden, auf die Bildung S-haltiger Substanzen durch die Hefe untersucht. Die Hefe ist in der Lage diese Substanzen während der alkoholischen Gärung aufzunehmen und sowohl flüchtige als auch nicht-flüchtige Schwefelverbindungen daraus zu bilden. Versuch 3 untersuchte die Reaktion von drei verschiedenen Hefestämmen auf die Anreicherung des Mostes mit vier unterschiedlichen S-Quellen: Ammoniumsulfat, Netzschwefel, Glutathion und Cystein. Zum Vergleich gab es eine Kontrollvariante und das Hefenährsalz Diammoniumhydrogenphosphat, das besonders im Vergleich zur Zugabe von Ammoniumsulfat betrachtet wurde.

Auch der Einfluss auf die Gärförderung wurde untersucht. Wie in Abbildung 61 zu sehen ist, hatten alle Zusätze einen Einfluss auf das Gärverhalten von Hefe 1 (Y1). Besonders deutlich wurde dies am sechsten Tag der Gärung. Die Kontrollvariante (Y1K) wies den geringsten Gewichtsverlust auf. Die Varianten Y1N, Y1G und Y1C wiesen einen geringen Unterschied von bis zu 3 g L⁻¹ Gewichtsverlust auf. Die Varianten Y1A und Y1D wiesen am sechsten Tag einen Unterschied von 8 bzw. 9 g L⁻¹

im Vergleich zur Kontrollvariante auf. Alle Varianten konnten den Zucker fast vollständig vergären, so dass die Gärung am 13. Tag beendet wurde.

5.9.6.1 Gärkurven

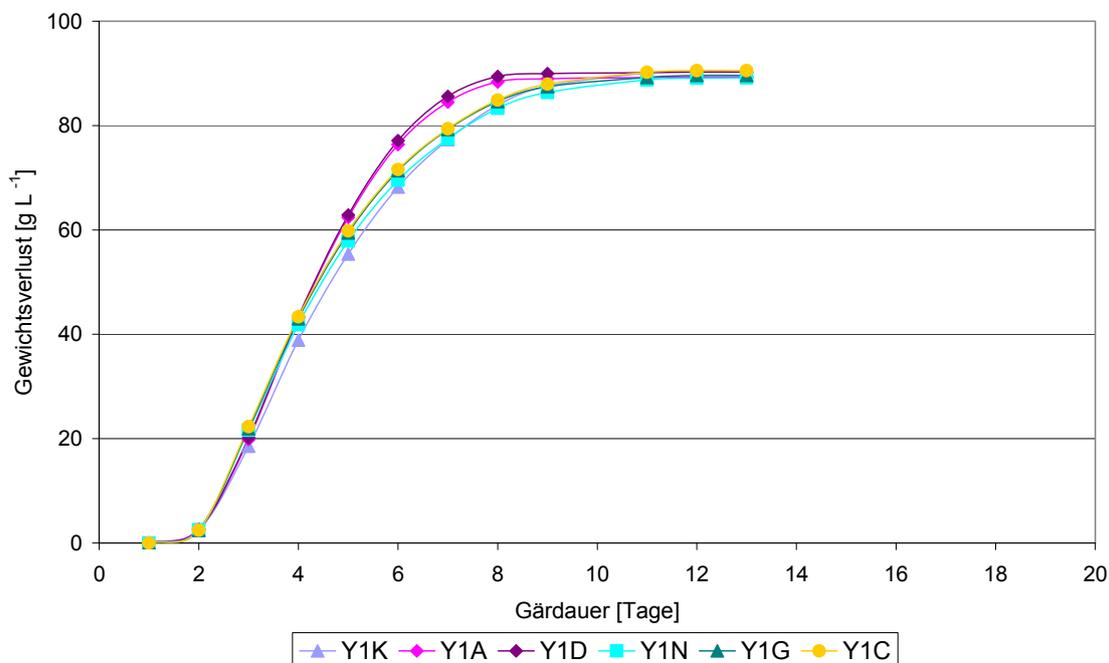


Abbildung 61: Versuch 3: Gärverlauf Hefe 1

Die Abbildung zeigt den kumulierten Gewichtsverlust während der alkoholischen Gärung von Hefe 1 (Y1). K= Kontrolle, A = Ammoniumsulfat, D= Diammoniumhydrogenphosphat, N= Netzschwefel, G= Glutathion und C= Cystein.

Abbildung 62 zeigt das Gärverhalten von Hefe 2 (Y2). Insgesamt verlief die Gärung etwas schleppender, der Versuchsansatz konnte erst nach 16 Tagen beendet werden. Es zeigten sich sehr ähnliche Ergebnisse wie bei Hefe 1. Die Varianten Y2N, Y2G, Y2C zeigten nur einen sehr geringen Unterschied (bis 3 g L⁻¹ Gewichtsverlust) zur Kontrollvariante, während die Varianten Y2A und Y2D einen größeren Unterschied (7 bzw. 9 g L⁻¹ Gewichtsverlust) zeigten. Abbildung 63 zeigt den Gärverlauf von Hefe 3. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrollvariante (Y3K) und den Hefenährsalzen (Variante Y3A, Y3D), alle anderen Varianten lagen aber am sechsten Tag auf genau dem gleichen Niveau.

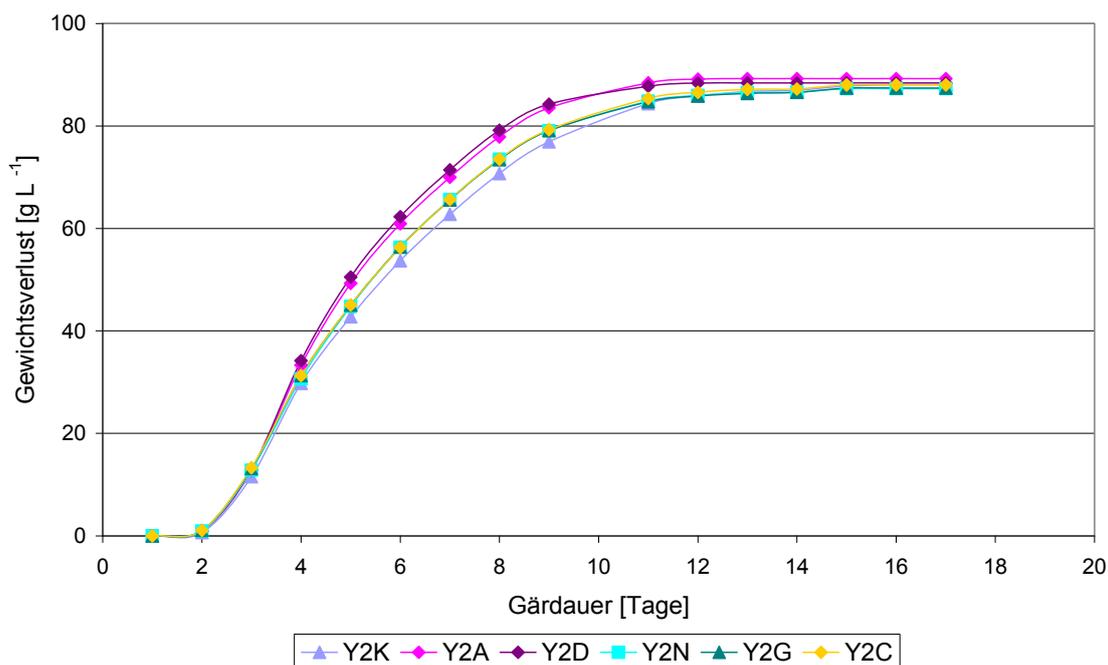


Abbildung 62: Versuch 3: Gärverlauf Hefe 2

Die Abbildung zeigt den kumulierten Gewichtsverlust während der alkoholischen Gärung von Hefe 2 (Y2). K= Kontrolle, A = Ammoniumsulfat, D= Diammoniumhydrogenphosphat, N= Netzschwefel, G= Glutathion und C= Cystein.

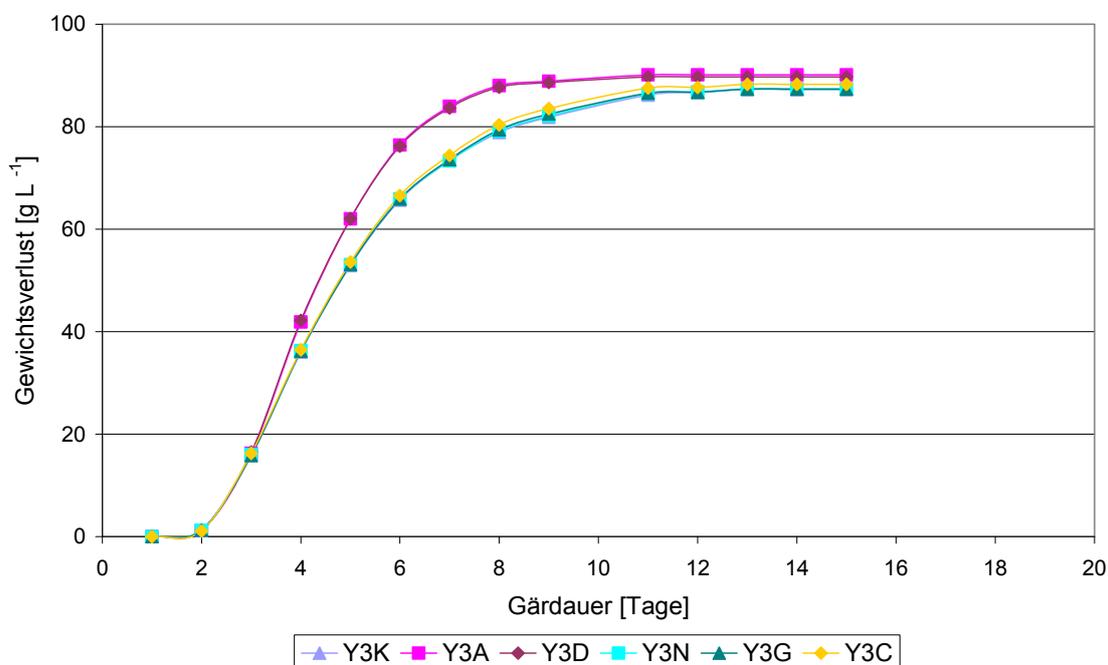


Abbildung 63: Versuch 3: Gärverlauf Hefe 3

Die Abbildung zeigt den kumulierten Gewichtsverlust während der alkoholischen Gärung von Hefe 3 (Y3). K= Kontrolle, A = Ammoniumsulfat, D= Diammoniumhydrogenphosphat, N= Netzschwefel, G= Glutathion und C= Cystein.

5.9.6.2 Sulfatgehalt in Most und Wein

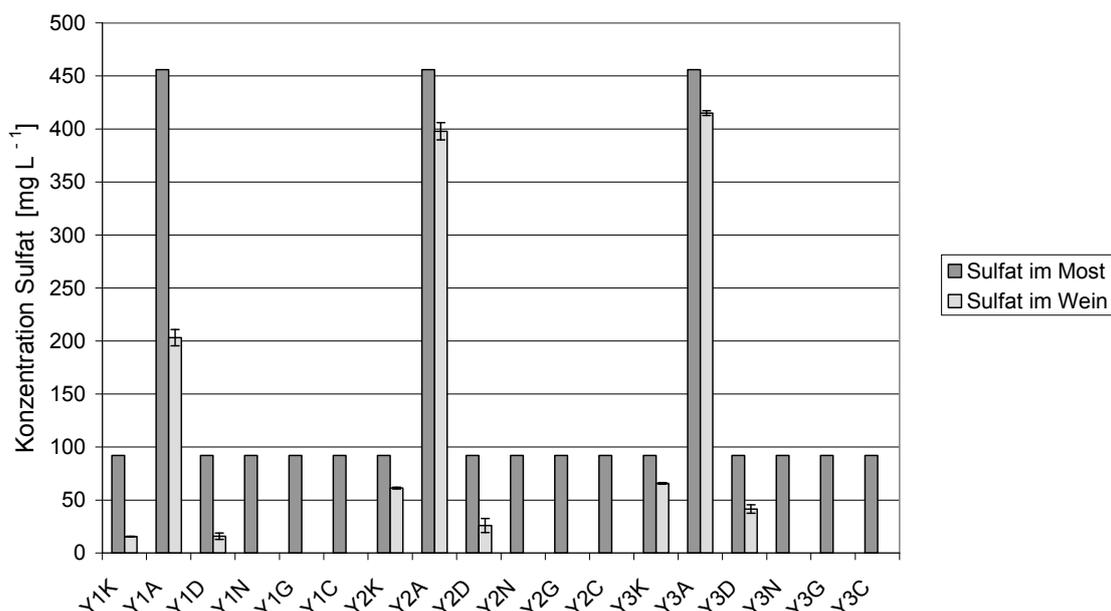


Abbildung 64: Versuch 3: Sulfatgehalt im Most und nach der alkoholischen Gärung im Wein.

Die Abbildung zeigt die Sulfatkonzentration vor und nach der Gärung für die Hefen 1, 2 und 3. K= Kontrolle, A = Ammoniumsulfat, D= Diammoniumhydrogenphosphat, N= Netzschwefel, G= Glutathion und C= Cystein. Die Balken zeigen die Standardabweichung (n=3).

Der Sulfatgehalt im Most und Wein wird in Abbildung 64 dargestellt. Der natürliche Sulfatgehalt im Most lag bei 92 mg L^{-1} . Durch die Zugabe von Ammoniumsulfat wurde dem Most eine zusätzliche Menge von 364 mg L^{-1} zugeführt, so dass am Anfang der alkoholischen Gärung eine Konzentration von 456 mg L^{-1} Sulfat vorlag. Insgesamt ist in Abbildung 64 zu erkennen, dass die Sulfatkonzentration im Wein, also nach der alkoholischen Gärung, bei allen Varianten im Vergleich zur Konzentration vor der alkoholischen Gärung abgenommen hat. In den Kontrollvarianten der drei Hefen konnten die Sulfatgehalte auf 15 mg L^{-1} von Hefe 1, auf 61 mg L^{-1} von Hefe 2 und auf 65 mg L^{-1} von Hefe 3 gesenkt werden. Hefe 1 war also in der Lage die Sulfatkonzentration im Most besonders stark abzureichern.

Die Variante Ammoniumsulfat (Y1A, Y2A, Y3A) ist durch ihren hohen Ausgangswert von Sulfat besonders auffällig. Der Wert fiel bei Hefe 1 auf 203 mg L^{-1} , bei Hefe 2 auf 398 mg L^{-1} , und bei Hefe 3 auf 415 mg L^{-1} Sulfat nach der Gärung. Hefe 1 hat die Sulfatkonzentration also um mehr als 250 mg L^{-1} verringert. In der Variante Diammoniumhydrogenphosphat (Y1D, Y2D, Y3D) wurde der natürliche Sulfatgehalt ebenfalls reduziert, wobei Hefe 1 den Gehalt am stärksten verringerte (auf 16 mg L^{-1})

Hefe 2 lag mit 26 mg L^{-1} etwas höher und Hefe 3 mit 42 mg L^{-1} am höchsten. Für die Varianten N, G, C wurde der Sulfatgehalt im Jungwein nicht bestimmt.

5.9.6.3 Produktion von SO_2

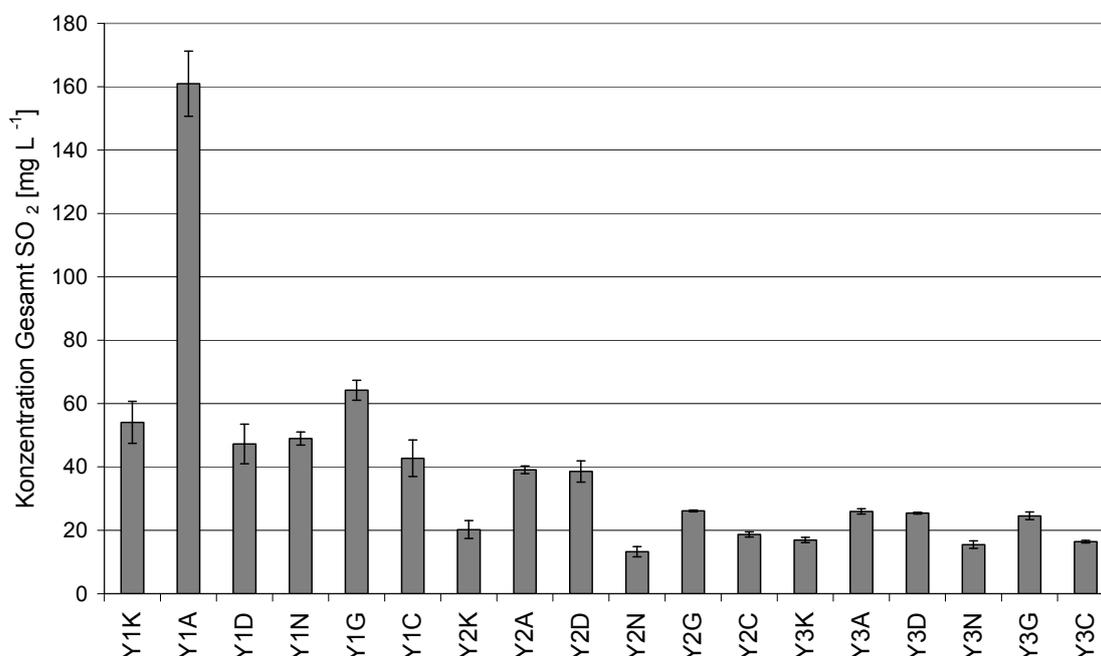


Abbildung 65: Versuch 3: SO_2 Gehalt im Wein

Die Abbildung zeigt die Gesamt- SO_2 Konzentration nach der Gärung für die Hefen 1, 2 und 3. K= Kontrolle, A = Ammoniumsulfat, D= Diammoniumhydrogenphosphat, N= Netzschwefel, G= Glutathion und C= Cystein. Die Balken zeigen die Standardabweichung ($n=3$).

Wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, können Weinhefen während der alkoholischen Gärung Sulfite bilden, die nach der Gärung als Gesamt- SO_2 messbar sind. Die Konzentration von Gesamt- SO_2 im Versuch 3 wird in Abbildung 65 dargestellt. Hefe 1 wies durchschnittlich in allen Varianten einen Wert größer 40 mg L^{-1} Gesamt- SO_2 auf. Für die Variante Glutathion (Y1G) lag der Mittelwert bei über 60 mg L^{-1} , für Variante Y1A (Ammoniumsulfat) lag der Gesamt- SO_2 Gehalt sogar über 160 mg L^{-1} . Bei Hefe 2 lagen für die Kontrollvariante Y2K und für die Varianten Y2N und Y2C Werte unter 20 mg L^{-1} vor. Oberhalb 20 mg L^{-1} lagen die Variante Y2G (26 mg L^{-1}) und die Varianten mit Nährsalzzugabe Y2A (39 mg L^{-1}) und Y2D (39 mg L^{-1}). Bei Hefe 3 zeigte sich die gleiche Abstufung. Die Varianten Y3K, Y3N und Y3C lagen unter 20 mg L^{-1} , die Varianten Y3A, Y3D und Y3G lagen mit durchschnittlich ca. 25 mg L^{-1} leicht oberhalb der Marke von 20 mg . Im Vergleich der drei Hefestämme zeigten sich also durchaus Parallelen bezüglich des Einflusses der Versuchsvariante. Die auffälligste Bildung von SO_2 während der alkoholischen Gärung konnte eindeutig für Hefe 1 und die Variante Ammoniumsulfat (Y1A) mit 161 mg L^{-1} Gesamt- SO_2 verzeichnet werden.

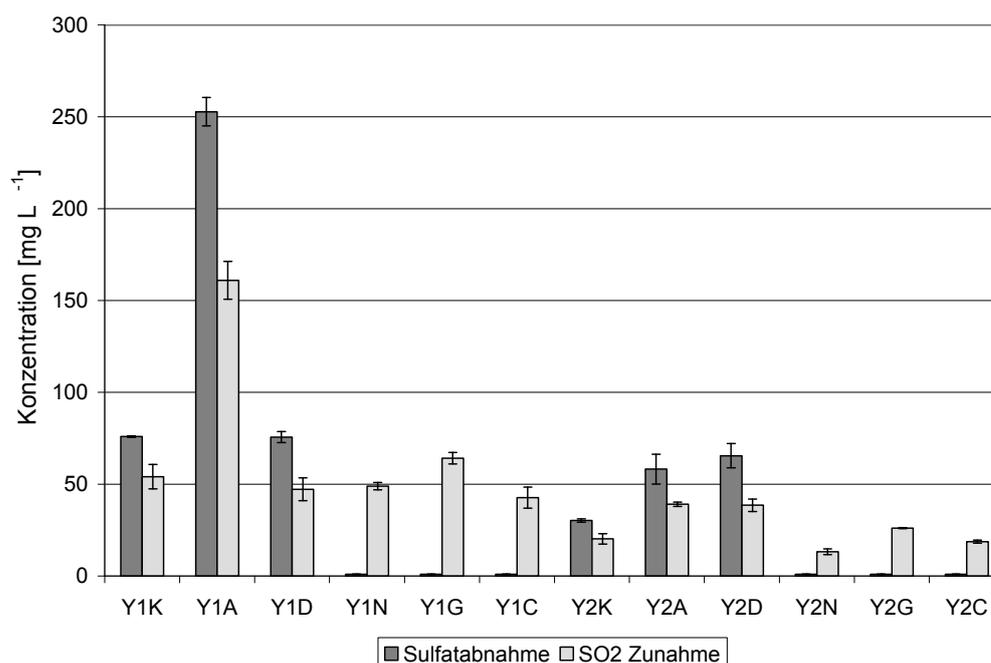


Abbildung 66: Versuch 3: Sulfatabbau und SO₂ Zunahme.

Die Abbildung stellt den Umfang der Sulfatabnahme und den Umfang der SO₂ Zunahme während der Gärung für die Hefen 1, 2 und 3 gegenüber. K= Kontrolle, A = Ammoniumsulfat, D= Diammoniumhydrogenphosphat, N= Netzschwefel, G= Glutathion und C= Cystein. Die Balken zeigen die Standardabweichung (n=3).

Abbildung 66 zeigt den Umfang der Sulfatabnahme als Betrag und stellt ihn der Zunahme von SO₂ gegenüber. Die Gegenüberstellung des Betrages der Sulfatabnahme und der SO₂ Zunahme macht deutlich, dass ein direkter Zusammenhang besteht. Es bestehen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Hefestämmen. Hefestamm 1 war durch eine starke Sulfatabnahme im Verlauf der Gärung geprägt, wobei Variante Y1A (Ammoniumsulfat) mit einem Betrag von 253 mg L⁻¹ besonders auffällig war. Diese Variante erreichte auch mit 161 mg L⁻¹ SO₂ den höchsten Wert der Gesamt-SO₂ nach der Gärung.

Der Anteil „S_{elementar}“ betrug im abgenommenen Sulfat 83,4 mg L⁻¹, im gebildeten SO₂ betrug er 80,5 mg L⁻¹.

Bei Hefe 2 lag ebenfalls der Sulfatabbau der Varianten Y2A und Y2D am höchsten, mit 58 mg L⁻¹ und 66 mg L⁻¹ aber auf einem wesentlich geringeren Niveau. Hefe 3 zeigte parallel dazu ebenfalls eine höhere Abnahme bei den Varianten Y3A und Y3D als bei der Kontrollvariante.

5.9.6.4 Niedrig-siedende Schwefelverbindungen

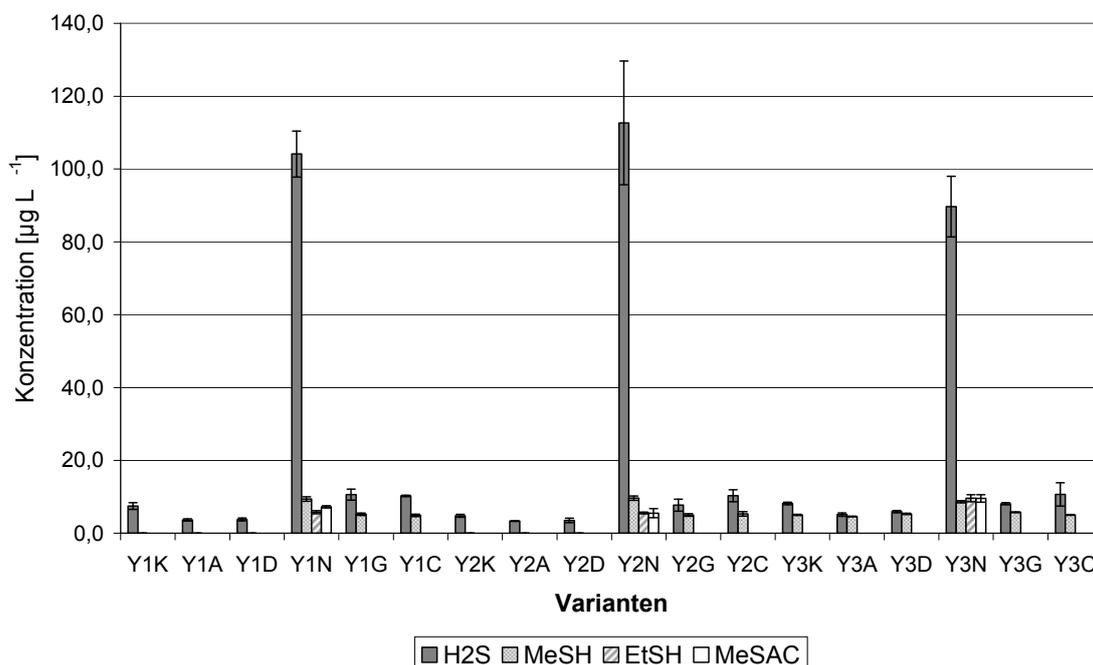


Abbildung 67: Versuch 3: Konzentration niedrig-siedende Schwefelverbindungen.

Die Abbildung zeigt die Konzentration von Schwefelwasserstoff (H₂S), Methanthiol (MeSH), Ethanthiol (EtSH) und Thioessigsäure-S-methylester (MeSAC) für die Hefen 1, 2 und 3. K= Kontrolle, A = Ammoniumsulfat, D= Diammoniumhydrogenphosphat, N= Netzschwefel, G= Glutathion und C= Cystein. Die Balken zeigen die Standardabweichung (n=3).

Die Bildung von niedrig-siedenden Schwefelverbindungen wird in Abbildung 67 dargestellt. Gemessen wurden die Konzentrationen von Schwefelwasserstoff (H₂S), Methylmercaptan (MeSH), Ethylmercaptan (EtSH) und Thioessigsäure-S-methylester (MeSAC). Für Hefestamm 1 und 2 konnten die gleichen Beobachtungen verzeichnet werden. Die Varianten Kontrolle, Ammoniumsulfat und Diammoniumhydrogenphosphat wiesen lediglich Spuren von H₂S unter 10 µg L⁻¹ auf. Die Varianten Y3K, Y1G, Y1C, Y2G, Y2C, Y3G und Y3C wiesen zusätzlich Spuren von Methylmercaptan auf, die aber ebenfalls unter 10 µg L⁻¹ lagen. Die einzigen auffälligen Varianten waren die Varianten mit Netzschwefelzugabe. Der Gehalt von Schwefelwasserstoff (H₂S) lag bei Hefe 1 im Mittel bei 104 µg L⁻¹, bei Hefe 2 bei 113 µg L⁻¹ und bei Hefe 3 bei 90 µg L⁻¹. Die drei Varianten haben ferner gemein, dass auch die drei anderen Substanzen Methylmercaptan (MeSH), Ethylmercaptan (EtSH) und Thioessigsäure-S-methylester (MeSAC) in Konzentrationen über 10 µg L⁻¹ nachgewiesen werden konnten.

5.9.7 Versuch 4 : Bildung niedrig-siedender Schwefelverbindungen durch Netzschwefel

Versuch 4 untersuchte die Bildung leicht-flüchtiger Schwefelverbindungen in Mostvarianten, die aus Weinbergszeilen stammten, die gezielt mit unterschiedlichen Mengen Netzschwefel gespritzt wurden. Der Hypothese folgend, dass Netzschwefelrückstände über Trub in den Most eingetragen werden können, wurden zwei unterschiedliche Mostvarianten kreiert. Eine klare Mostvariante (k) und eine trübe Mostvariante (t), bei der der jeweilige Sedimentationsstrub teilweise zurück geführt wurde. Beide Varianten wurden mit zwei unterschiedlichen Hefen, der Hefe 1 (Y1) und der Hefe 2 (Y2) vergoren. Außerdem wurde eine Spontangärung (ohne Wiederholung) durchgeführt. Vorläufige Ergebnisse dieses Versuches wurden bereits von Werner *et al.* (2008) veröffentlicht.

5.9.7.1 Gärkurven

Die Abbildungen 68, 69 und 70 zeigen die Gärkurven im Most aus den drei Applikationsniveaus des Netzschwefels. Einerseits lässt sich ein deutlicher Unterschied in der Gärleistung der Hefestämme erkennen, andererseits wird der gärfördernde Effekt der erhöhten Trübung deutlich. Die Gärkurve der trüben Variante (Y1t) verlief deutlich oberhalb der klaren Variante von Hefe 1 (Y1k). Der Gewichtsunterschied am achten Gärungstag belief sich auf 12 g L^{-1} für Applikation 1 (Abbildung 68).

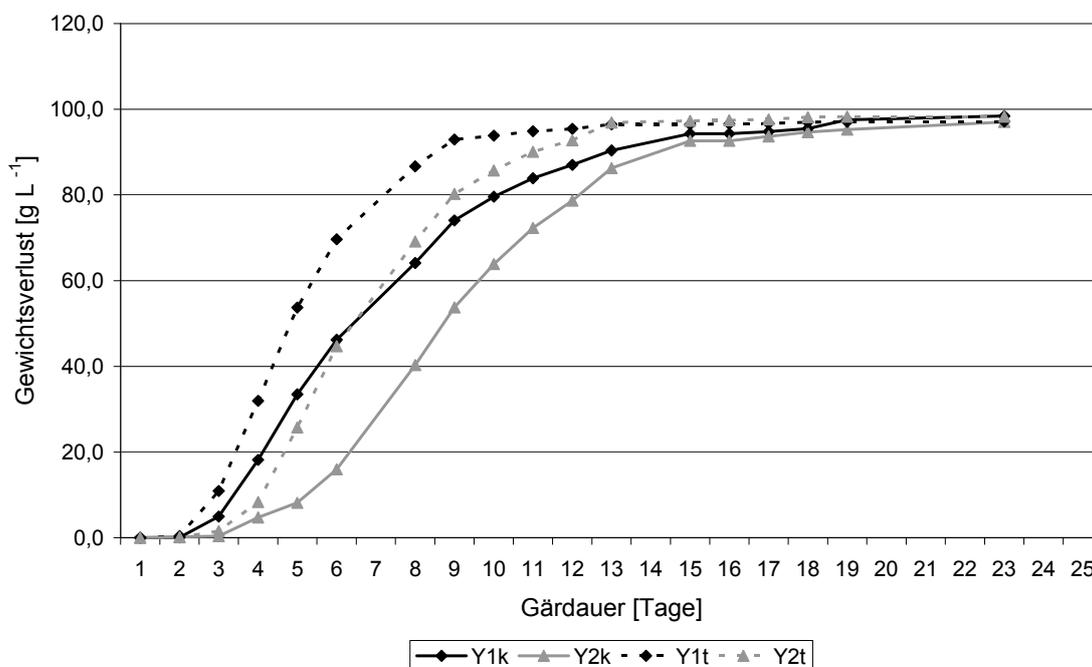


Abbildung 68: Versuch 4: Gärkurven Applikation 1

Gärkurve dargestellt als kumulierter Gewichtsverlust. Y1 = Hefe 1, Y2 = Hefe 2, k = klare Mostvariante, t = trübe Mostvariante.

Für Hefe 2 ließ sich der gleiche relative Unterschied beobachten. Die Gärkurven verliefen aber insgesamt auf einem niedrigeren Niveau. Alle Varianten erreichten die vollständige Endvergärung.

In Abbildung 69 und 70 zeigt sich, dass die klare Variante in den Mostvarianten Applikation 2 und 3 näher an die Gärkurve der trüben Varianten heranrückte. Der Unterschied in der Gäraktivität verringerte sich also in den Varianten der höheren Netzschwefelapplikationen.

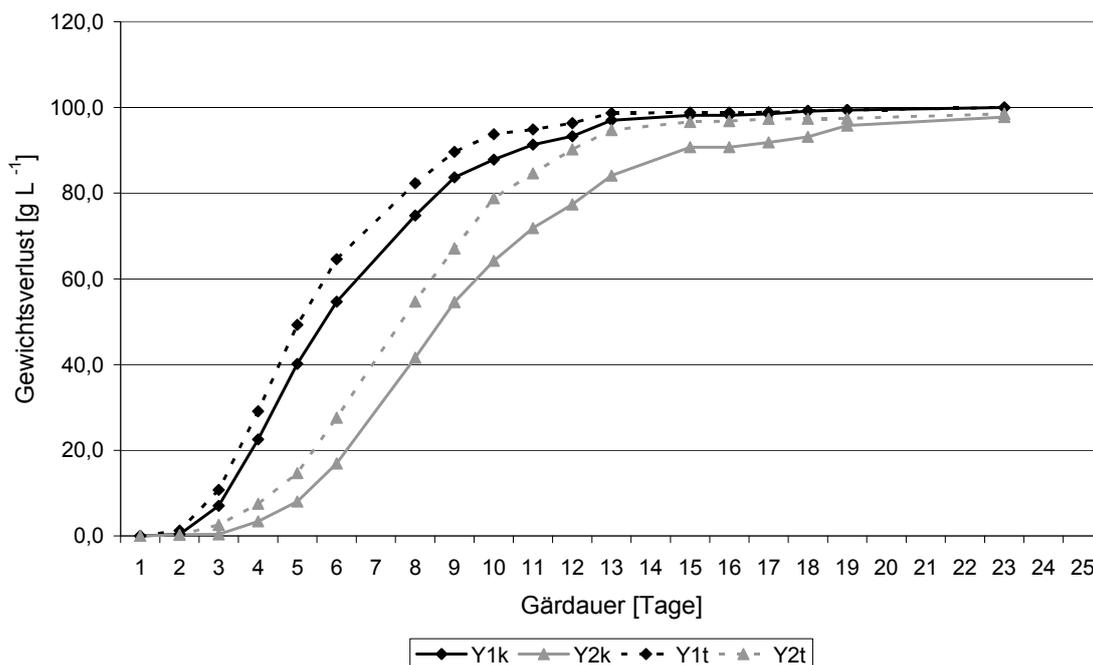


Abbildung 69: Versuch 4: Gärkurven Applikation 2

Gärkurve dargestellt als kumulierter Gewichtsverlust. Y1 = Hefe 1, Y2 = Hefe 2, k = klare Mostvariante, t = trübe Mostvariante.

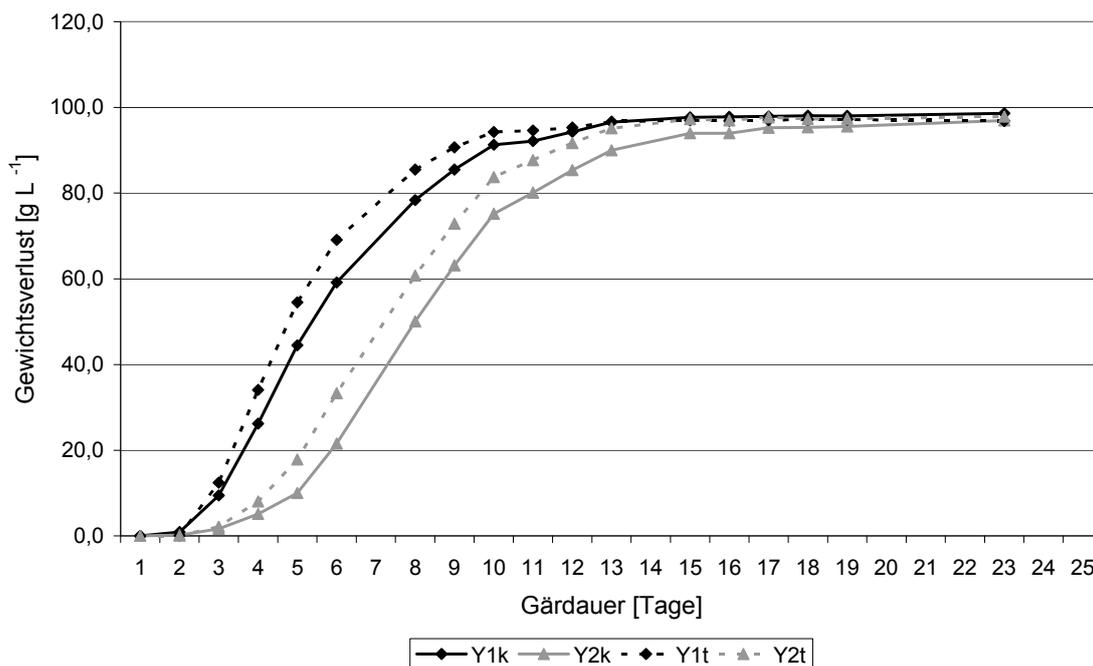


Abbildung 70: Versuch 4: Gärkurven Applikation 3

Gärkurve dargestellt als kumulierter Gewichtsverlust. Y1 = Hefe 1, Y2 = Hefe 2, k = klare Mostvariante, t = trübe Mostvariante.

Die relative Lage der Gärkurven zueinander zeigt in allen drei Diagrammen den gleichen Effekt, sowohl hinsichtlich der Trübung, als auch hinsichtlich der Gärstärke des Hefestammes. Es wurde auch eine weitere Variante mit Spontangärung (ohne Zugabe von Reinzuchthefer) angesetzt, die Gärkurven sind jedoch aufgrund der langen Gärzeit nicht in den Diagrammen der Abbildungen 68-70 abgebildet.

5.9.7.2 Flüchtige Schwefelverbindungen

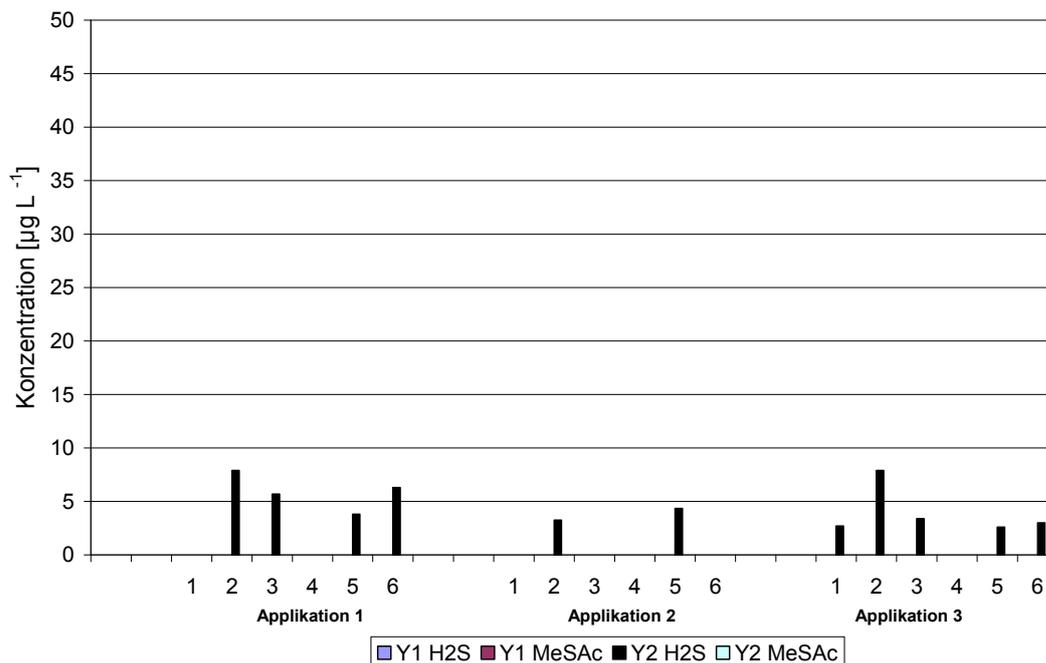


Abbildung 71: Versuch 4: Bildung flüchtiger Schwefelverbindungen

Die Abbildung zeigt die Konzentration von Schwefelwasserstoff (H₂S) und Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) für die Variante 1-6 und die drei unterschiedlichen Applikationsniveaus des Netzschwefels im Weinberg. Variante 1+4 = Hefe 1, Variante 2+5 = Hefe 2, Variante 3+6 = Spontangärung.

Die Analyse der niedrig-siedenden Schwefelverbindungen ergab sehr geringe Konzentrationen von Schwefelwasserstoff (H₂S), die sich unterhalb des Geruchsschwellenwertes (10 µg L⁻¹) befanden. Keine der Schwefelapplikationen hat also zu einem wesentlichen Anstieg der Produktion von Schwefelwasserstoff (H₂S) geführt. Auch die Varianten 3 und 6 (Spontangärung) fielen nicht durch eine solche Entwicklung auf (Abb.71).

5.9.7.3 Konzentration Gesamt-SO₂

Die Konzentration der Gesamt-SO₂ zeigte ansteigende Werte für die Hefe 1, die allgemein als SO₂ Bildner bezeichnet werden kann. Bei Hefe 1, die im Diagramm 72 als Variante 1 und 4 zu finden ist, stieg der durchschnittliche Gehalt von Applikation zu Applikation an. In Applikation 1 betrug der Mittelwert 46 mg L⁻¹, in Applikation 2 betrug der Mittelwert 57 mg L⁻¹ und in Applikation 3 betrug der Mittelwert 73 mg L⁻¹. Dieser Effekt war nicht für die Hefe 2 (Variante 2 und 5) und auch nicht für die Spontangärung (Variante 3 und 6) zu beobachten. Die Werte bewegten sich zwischen 14 und 20,5 mg L⁻¹, also im üblichen Bereich. Eine Tendenz von Applikation zu Applikation war bei diesen Varianten nicht zu erkennen.

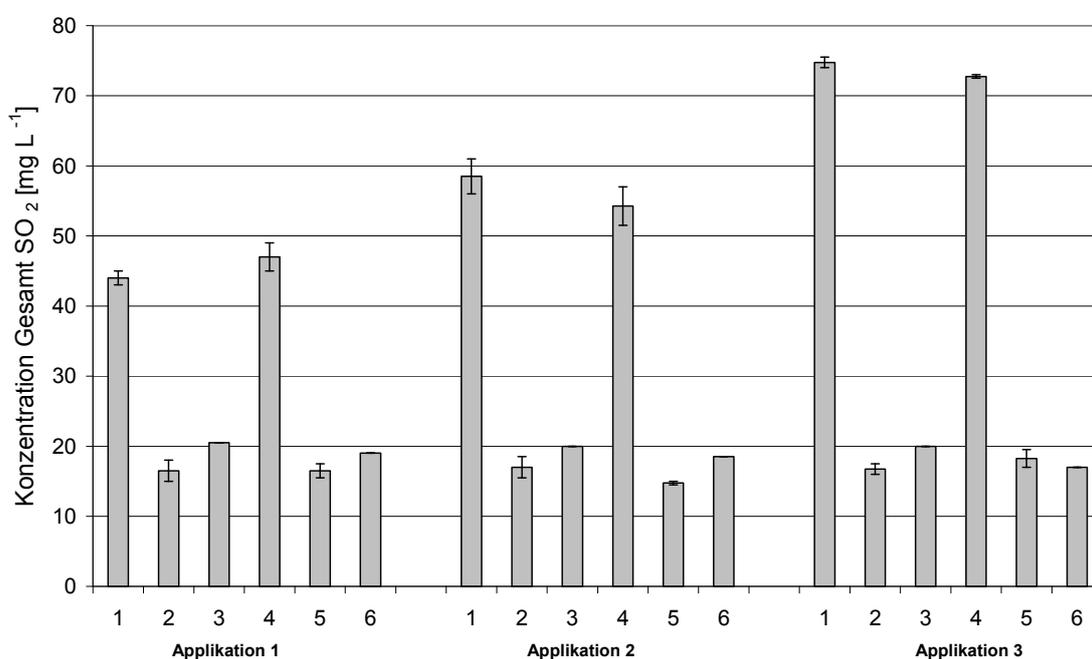


Abbildung 72: Versuch 4: Konzentration Gesamt-SO₂ bei verschiedenen Applikationsniveaus

Die Abbildung zeigt die Konzentration der Gesamt-SO₂ für die Varianten 1-6 und die drei unterschiedlichen Applikationsniveaus des Netzschwefels im Weinberg. Variante 1+4 = Hefe 1, Variante 2+5 = Hefe 2, Variante 3+6 = Spontangärung. Die Balken zeigen die Abweichung vom Mittelwert (n=2).

5.9.7.4 SO₂-Bindungspartner

Die Konzentration der SO₂-Bindungspartner ist in den Abbildungen 73 bis 75 abzulesen. Acetaldehyd wies parallel zu den SO₂ Werten (Abbildung 73) erhöhte Werte bei Hefe 1 (Variante 1 und 4) auf, während die Hefe 2 (Variante 2 und 5) und die Spontangärung (Variante 3 und 6) normale Werte unter 20 mg mg L⁻¹ aufwiesen. Insgesamt zeigte auch der Gehalt an Acetaldehyd eine steigende Tendenz von Applikation 1 (Mittelwert 38 mg L⁻¹), über Applikation 2 (Mittelwert 42 mg L⁻¹) bis zu Applikation 3 (Mittelwert 53 mg L⁻¹). Diese Beobachtung zeigte sich auch bei den Werten der Gesamt-SO₂.

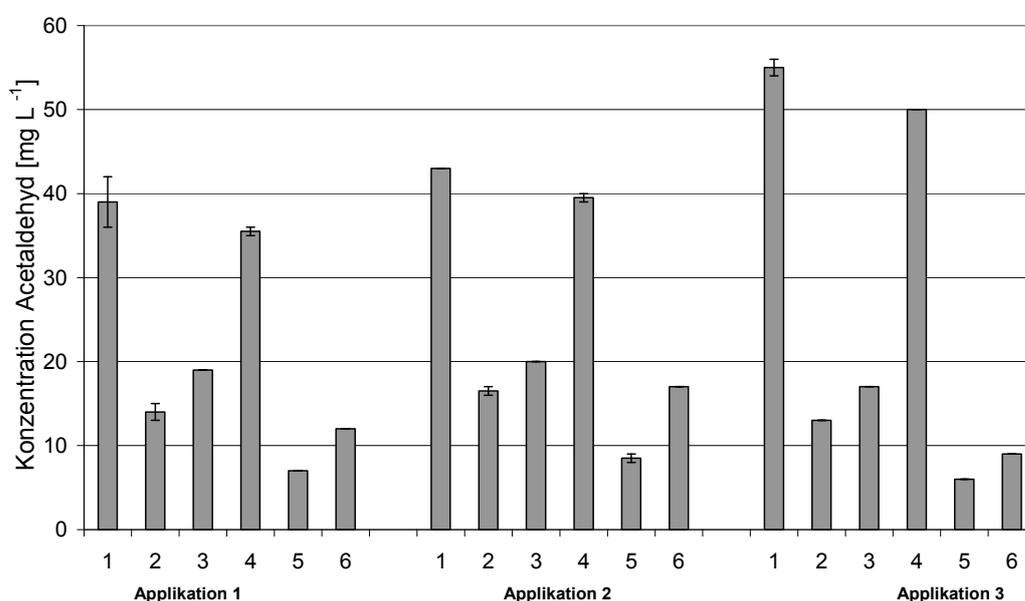


Abbildung 73: Versuch 4: Konzentration Acetaldehyd

Die Abbildung zeigt die Konzentration des Acetaldehyd für die Varianten 1-6 und die drei unterschiedlichen Applikationsniveaus des Netzschwefels im Weinberg. Variante 1+4 = Hefe 1, Variante 2+5 = Hefe 2, Variante 3+6 = Spontangärung. Die Balken zeigen die Abweichung vom Mittelwert (n=2).

Die Konzentration von Pyruvat zeigte kein ganz homogenes Bild (Abbildung 74). Allgemein lagen die Werte von Pyruvat bei Hefe 1 (Variante 1 und 4) immer höher als bei Hefe 2 und der Spontangärung. Während die Werte von Hefe 1 zwischen 15 und 28 mg L⁻¹ schwankten, lagen sie für Hefe 2 und die Spontangärung immer unterhalb 10 mg L⁻¹. Eine Ausnahme stellte Variante 3 in Applikation 1 mit 16 mg L⁻¹ dar. Die Werte des α-Ketoglutarat (Abbildung 75) lagen alle unterhalb 30 mg L⁻¹. Es lässt sich eine leichte Tendenz erkennen, dass die Werte der Hefe 1 höher als die Werte der Hefe 2 und der Spontangärung lagen. Insgesamt sind die Werte aber als niedrig zu betrachten.

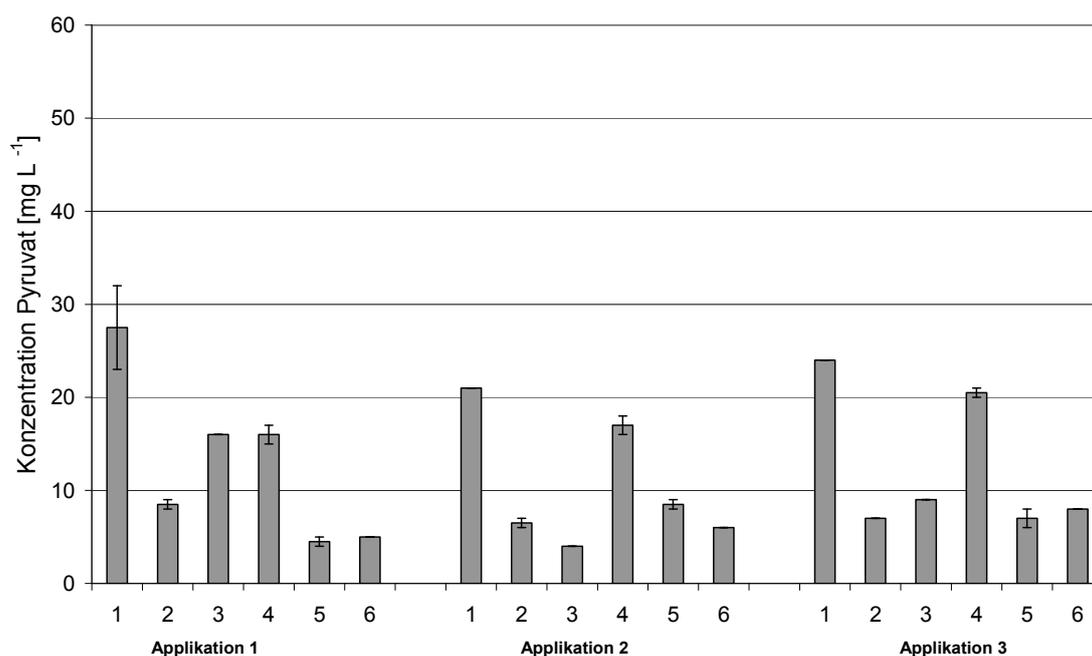


Abbildung 74: Versuch 4: Konzentration Pyruvat

Die Abbildung zeigt die Konzentration des Pyruvat für die Varianten 1-6 und die drei unterschiedlichen Applikationsniveaus des Netzschwefels im Weinberg. Variante 1+4 = Hefe 1, Variante 2+5 = Hefe 2, Variante 3+6 = Spontangärung. Die Balken zeigen die Abweichung vom Mittelwert (n=2).

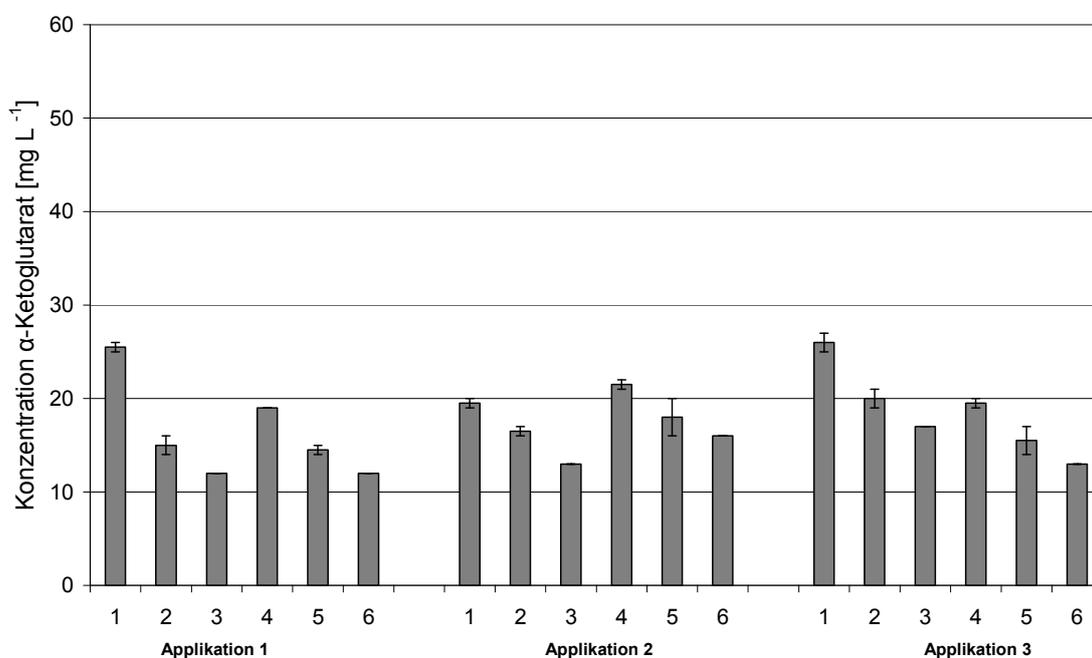


Abbildung 75: Versuch 4: Konzentration α-Ketoglutarat

Die Abbildung zeigt die Konzentration des α-Ketoglutarat für die Varianten 1-6 und die drei unterschiedlichen Applikationsniveaus des Netzschwefels im Weinberg. Variante 1+4 = Hefe 1, Variante 2+5 = Hefe 2, Variante 3+6 = Spontangärung. Die Balken zeigen die Abweichung vom Mittelwert (n=2).

5.9.8 Versuch 5 : Niedrig-siedende Schwefelverbindungen

Dieser Versuch beschäftigte sich mit den Auswirkungen von niedrigen Konzentrationen an hefeverwertbarem Stickstoff im Most auf die Bildung niedrig-siedender Schwefelverbindungen. Natürlicher Rieslingmost aus Geisenheimer Lagen wurde in zwei sehr verschiedenen Jahrgängen genutzt, um die Bildung unerwünschter Schwefelverbindungen zu untersuchen. Die Jahrgänge 2006 und 2007 stellten hinsichtlich ihrer Wetterereignisse zwei sehr unterschiedliche Jahrgänge dar. Zur besseren Einordnung der beiden Jahrgänge können die genauen Wetterdaten der Jahre 2001 bis 2009 dem Anhang (Abb. 78-81) entnommen werden.

5.9.8.1 Mostqualität im Versuchsjahr 1 und 2

Tabelle 20 zeigt die Analysenwerte der Stickstoffversorgung als NOPA Wert (α -amino Stickstoff der Aminosäuren) und einige Werte der FTIR-Analyse im Most aus acht verschiedenen Rieslingvarianten im Rheingau. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die beiden Jahrgänge in ihrer Mostzusammensetzung stark unterschieden. Im Jahr 2006 gab es um den 1. Oktober starke Regenfälle und relativ hohe Temperaturen (siehe Abb. 80 im Anhang), so dass ideale Bedingungen für die Verbreitung des Pilzes *Botrytis cinerea* gegeben waren. Die Folgen waren aufgeplatzte Beeren, erhöhter mikrobieller Druck und hoher Zuckergehalt in Kombination mit geringen Stickstoffkonzentrationen.

Tabelle 20: Analysenwerte des Mostes im Versuchsjahr 1 (2006) und 2 (2007)

Jahrgang		1	2	3	4	5	6	7	8	Ø
1 (2006)										
NOPA	[mg N l ⁻¹]	100	127	92	113	97	88	79	87	98
Reduzierende Zucker	[g l ⁻¹]	248	263	259	260	254	225	239	240	249
Flüchtige Säure	[g l ⁻¹]	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,2	0,1	0,1	0,3
Gluconsäure	[g l ⁻¹]	3,7	2,2	3,0	2,4	3,5	1,2	0,1	0,3	2,0
1 (2007)										
NOPA	[mg N l ⁻¹]	158	182	163	148	152	158	134	135	153
Reduzierende Zucker	[g l ⁻¹]	221	228	212	214	217	209	207	208	215
Flüchtige Säure	[g l ⁻¹]	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2
Gluconsäure	[g l ⁻¹]	n.d.	n.d.							

n.d. = nicht detektierbar

Als Folge der Entwicklung von Mikroorganismen auf den Trauben nahmen die Stickstoffkonzentrationen stark ab und der Gehalt an Gluconsäure zu. Somit war die

Stickstoffversorgung im Jahrgang 2006 mit einem durchschnittlichen NOPA Wert von nur 98 mg N l⁻¹ gering, der durchschnittliche Zuckergehalt mit 249 g l⁻¹ in den Versuchsmosten sehr hoch. Gluconsäure konnte in Konzentrationen bis zu 3,7 g l⁻¹ gefunden werden.

Der Jahrgang 2007 wies hinsichtlich der Stickstoffversorgung normale Werte auf (Mittelwert NOPA = 153 mg N l⁻¹). Der Zuckergehalt lag mit durchschnittlich 215 g l⁻¹ ebenfalls im normalen Bereich und Gluconsäure konnte in diesen Mosten nicht detektiert werden.

5.9.8.2 Niedrig-siedende Schwefelverbindungen

Die Abbildung 68 zeigt die Konzentrationen der niedrig-siedenden Schwefelverbindungen, die im Jungwein gemessen werden konnten. In den Varianten konnte sowohl Schwefelwasserstoff (H₂S) als auch Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) oberhalb des Geruchsschwellenwertes nachgewiesen werden.

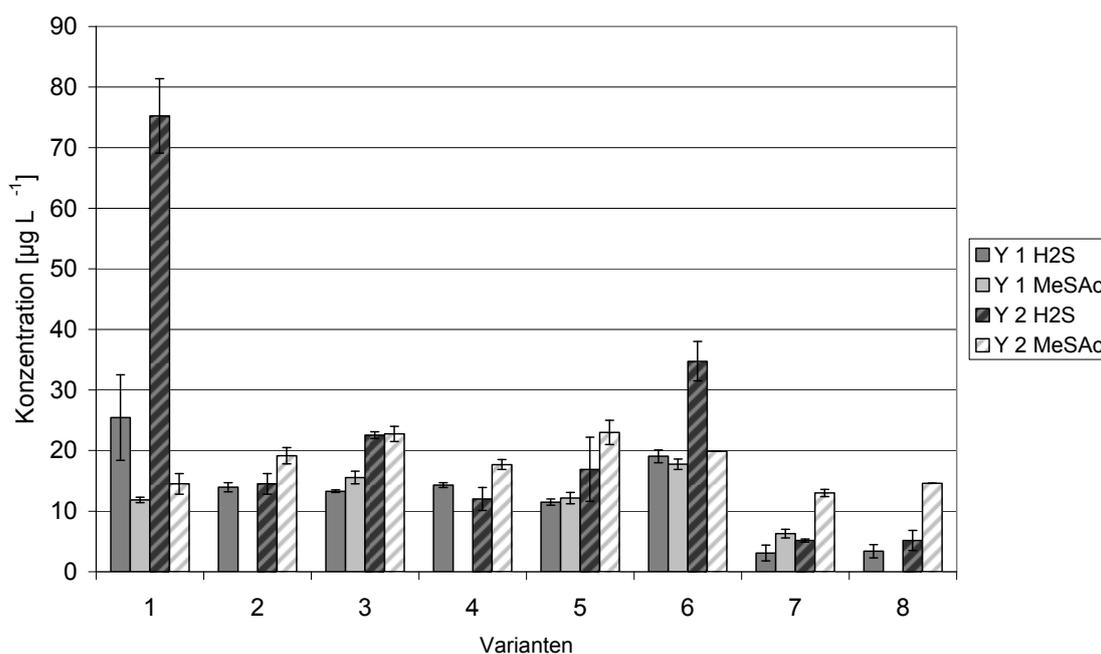


Abbildung 76: Versuch 5: Konzentration niedrig-siedende Schwefelverbindungen

Versuchsjahr 1

Die Abbildung zeigt die Konzentration von Schwefelwasserstoff (H₂S) und Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc). Y1 = Hefe 1, Y 2 = Hefe 2. Die Varianten 1-8 bezeichnen acht verschiedene natürliche Moste aus verschiedenen Weinbergszeilen.

Hefe 1 (Y1) wies in Variante 1 einen Mittelwert von 25 µg l⁻¹ H₂S und in Variante 6 einen Mittelwert von 19 µg l⁻¹ H₂S auf. Die Werte der Varianten V2 bis V5 lagen zwischen 12 und 14 µg l⁻¹. Variante V7 und V8 wiesen die geringsten Werte auf

(< 5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) konnte bei Hefe 1 nur in den Varianten V1, V3, V5, V6 und V7 nachgewiesen werden. Das Minimum lag bei 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ und das Maximum bei 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeSAc.

Hefe 2 (Y2) fiel durch die Bildung von H_2S in Variante V1 (75 $\mu\text{g L}^{-1}$) und Variante V6 (35 $\mu\text{g L}^{-1}$) auf, aber auch Variante V3 lag mit durchschnittlich 23 $\mu\text{g L}^{-1}$ deutlich oberhalb des Geruchsschwellenwertes. Die Produktion von Thioessigsäure-S-methylester war in den Varianten V3 und V5 mit über 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ am höchsten, in Variante V7 mit 13 $\mu\text{g L}^{-1}$ am niedrigsten.

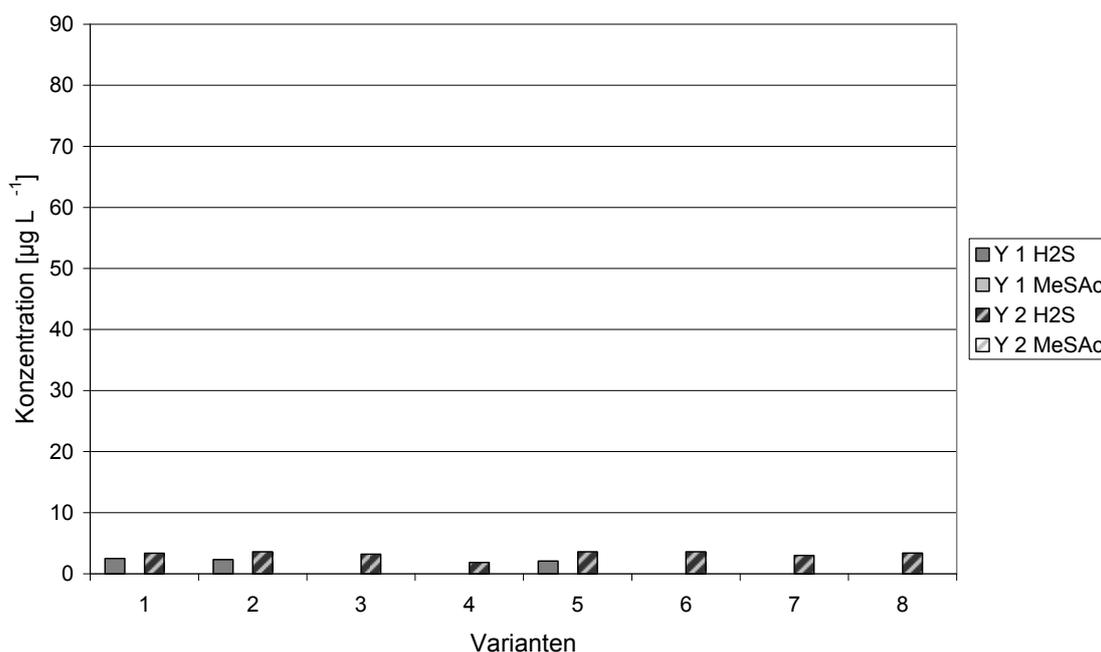


Abbildung 77: Versuch 5: Konzentration niedrig-siedende Schwefelverbindungen

Versuchsjahr 2

Die Abbildung zeigt die Konzentration von Schwefelwasserstoff (H_2S) und Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc). Y1 = Hefe 1, Y 2 = Hefe 2. Die Varianten 1-8 bezeichnen acht verschiedene natürliche Moste aus verschiedenen Weinbergszeilen.

Abbildung 77 zeigt die Ergebnisse der Analyse von niedrig-siedenden Schwefelverbindungen für das zweite Versuchsjahr im Versuch 5. Jegliche Analysenwerte lagen unterhalb 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, es konnten also keine relevanten Konzentrationen der Verbindungen niedrig-siedenden Schwefelverbindungen nachgewiesen werden.

6 Diskussion

Auf den folgenden Seiten werden die einzelnen Versuchsanstellungen übergreifend diskutiert. Neben der kritischen Diskussion der eigenen Ergebnisse werden an ausgewählten Punkten auch Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen aufgegriffen und den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen gegenübergestellt.

6.1 Einfluss der Hefeernährung auf die Bildung sekundärer Metabolite und die Aromabildung durch *Saccharomyces cerevisiae*

Die Vitalität der Hefe während der alkoholischen Gärung hängt wesentlich von der natürlichen Zusammensetzung des Mostes als Gärsubstrat bzw. von seiner Optimierung durch Gärhilfsmittel ab. Im Folgenden werden die einzelnen beeinflussenden Parameter und ihre Auswirkung auf die Qualität der Gärung und die Aromabildung diskutiert.

Verschiedene Autoren berichten, dass durch mikrobiellen Befall der Trauben oder die Pasteurisierung des Mostes ein Mangel an natürlichen Vitaminen auftritt. Dittrich & Großmann (2005) berichten von Thiaminkonzentrationen in gesunden Mosten von 318 ng mL^{-1} und in Mosten aus faulem Lesegut von 35 ng mL^{-1} . Die Analyse des Vitamingehaltes (Tabelle 15) des verwendeten natürlichen Riesling Mostes zeigte einen genauen Einblick in die Zusammensetzung des Gärsubstrates. Die vorliegenden Analysendaten ($0,1$ und $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$) deuten also auf einen Vitaminmangel im verwendeten Most hin. Hagen *et al.* (2008) untersuchten Riesling und Chardonnay Most in Washington State (USA) und fanden folgende Durchschnittswerte: Pantothenensäure $513 \pm 181 \text{ mg L}^{-1}$ und Biotin $<1 \mu\text{g L}^{-1}$. In Bezug auf den Pantothengehalt (ca. $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$) lag also im verwendeten Most ebenfalls ein Mangel vor, der Biotingehalt (11 bis 20 mg kg^{-1}) lag in einem Bereich, der auch in normalen Mosten vorkommt.

Auch der Gehalt in den verwendeten Hefenährstoffpräparaten (Tabelle 16) unterlag Schwankungen. Hefepräparat C fiel durch einen stark erhöhten Gehalt an Thiamin auf. Es handelte sich dabei um ein Thiamin-angereichertes Mischprodukt, das sich aus DAHP, Ammoniumsulfat, Hefezellwänden und Thiamin in unbekanntem Anteil zusammensetzt. Insgesamt ist festzustellen, dass die Hefepräparate eine effektive Quelle für Vitamine darstellen, besonders da die meisten *Saccharomyces*-Stämme

wachststoffheterotroph bezüglich D-Pantothensäure, D-Biotin und m-Inosit sind (Annemüller *et al.* 2008).

Im Versuch 1 dieser Arbeit zeigte sich deutlich, dass der Verlauf der alkoholischen Gärung für die einzelnen Versuchsvarianten im Jahresvergleich immer wieder zu vergleichbaren Ergebnissen führte. Wie aus Tabelle 17 ersichtlich, lassen sich die Versuchsvarianten in Abhängigkeit ihrer Gärleistung in 3 Gruppen einteilen. Gruppe 1 war stets durch eine schnelle Angärung und einen zügigen Gärverlauf gekennzeichnet. Speziell die schnellsten Varianten (V12, V14) hatten in allen drei Jahren bereits nach 8 Tagen die gesamte Zuckermenge vergoren. Gruppe 1 beinhaltete die Varianten V2 (DAHP 1 g L^{-1} , Hefezellwände, Thiamin) und V5 (DAHP $2 \times 0,5 \text{ g L}^{-1}$, Hefezellwände, Thiamin) und die sehr reich versorgten Varianten V12, V14 und V16. Dies zeigt deutlich, dass bereits die standardmäßige Zugabe von Diammoniumhydrogenphosphat, Hefezellwänden und Thiamin zu einer starken Förderung der Gärung führt. Die selbst kreierten Nährstoffmischungen der Varianten V12 und V14 haben trotz ihrer noch umfassenderen Mischung aus Einzelkomponenten den Gärungsverlauf nicht weiter steigern können. Die Förderung der Hefe unterlag also einer Sättigungskurve, die mit den Varianten V12 und V14 erreicht wurde. Gruppe 2 war von einer mittleren Förderung der alkoholischen Gärung geprägt. Varianten, die in allen drei Versuchsjahren in Gruppe 2 waren, sind die Varianten V4, V9, V17 und V18. Es handelt sich um die Varianten mit alleiniger Gabe von DAHP (V4), der Zugabe von Arginin und Glutamin als Kombination (V9), dem Mischpräparat C (bestehend aus DAHP, Ammoniumsulfat, Hefezellwänden und Thiamin (V17)) und einer Kombination aus dem Mischpräparat C mit einem Hefepräparat zur Rehydratation der Hefe (Präparat B). Das Ergebnis zeigt, dass die alleinige Zugabe von hohen Mengen DAHP (1 g hL^{-1}) in V4 nicht zu einer maximierten Gärförderung führte. Im Fall des Präparates C, hätte die Wirkung durchaus stärker ausfallen können, da es sich bereits um ein Mischpräparat handelte.

In der Gruppe 3 befand sich die Kontrollvariante V1 (ohne Zugabe), die allerdings nicht immer am schlechtesten abschnitt. Außerdem gehörten in diese Gruppe die Variante V6 (Thiamin $1,2 \text{ mg L}^{-1}$), Variante V7 (Glutamin), Variante V10 (Zink, Magnesium) und die Variante V11 (Pantothensäure, Biotin). Diese einzelne Zugabe von Vitaminen und Mineralstoffen konnte ohne Stickstoffzufuhr zu keiner wesentlichen Steigerung der Gärgeschwindigkeit führen. Erst die Zugabe von höheren Anteilen Stickstoff in Kombination mit z.B. Thiamin führten zu einer effektiven Förderung.

Im Gesamtbild zeigte sich in Tabelle 17, dass die Varianten V2, V5, V12, V14 und V16 in allen drei Jahren die führenden Varianten in Bezug auf die Gärleistung waren. Die Kontrollvariante V1 wies hingegen eine durchweg langsame Angärung und eine unvollständige Endvergärung mit 7- 8 g L⁻¹ Fructose im Jungwein auf.

Der Vergleich der maximalen Lebendzellzahlen (KBE mL⁻¹) zeigt deutlich, dass die oben erwähnte Gruppe (V2, V5, V12, V13, V14, V16) ebenfalls erhöhte Lebendzellzahlen im Verlauf der Gärung aufwies (ausgenommen V5). Eine intensive Gäraktivität ging im Versuch 1 also mit einer starken Zellteilung und einer hohen Zellpopulation einher. Dies war zu erwarten und entspricht der generellen Auffassung, dass Gärstockungen hauptsächlich auf Stickstoffmangel im Gärsubstrat zurückzuführen sind (Henschke & Jiranek 1993, Bell & Henschke 2005). Stickstoff dient zum Aufbau von Strukturproteinen, Transportproteinen und Enzymen, die wesentlich an der Vitalität und Leistung der Hefezellen beteiligt sind.

Die Konzentration von Acetaldehyd zeigte nur leichte Schwankungen zwischen den Varianten und kleine Jahrgangsunterschiede. Die nachgewiesenen Mengen können als normal angesehen werden. Die Konzentration von Pyruvat lag ebenfalls insgesamt auf einem niedrigen Niveau. Besonders niedrig war der Gehalt in Varianten, in denen Thiamin zugegeben wurde (z.B. V2 und V5). Diese Beobachtung ist durch die Funktion von Thiamin als Cofaktor der Pyruvat-Decarboxylase zu erklären und wurde bereits von Dittrich *et al.* (1975) sehr ausführlich beschrieben. Die Autoren verzeichneten bei der Zugabe von 0,5 mg L⁻¹ Thiamin in *Botrytis*-belasteten Most eine Reduzierung auf 50 % im Vergleich zur Kontrolle (ohne Thiaminzugabe), in thermisch behandelten Most eine Reduzierung auf 20 %.

Die Analyse von α -Ketoglutarat zeigte auffällig hohe Werte für diejenigen Varianten, die eine hohe Gäraktivität aufwiesen. Da auch in diesen Varianten eine Thiaminzugabe erfolgte, wäre eine Reduzierung der Werte zu erwarten gewesen. Pyruvat-Decarboxylase kann teilweise auch α -Ketoglutarat decarboxylieren.

Die Summe dieser drei Komponenten prägt maßgeblich die Abbindung der freien schwefeligen Säure, wobei ihre Bindungskapazitäten sehr verschieden sind. 1 mg Acetaldehyd bindet 1,45 mg SO₂, 1 mg Pyruvat bindet 0,5 mg SO₂, 1 mg α -Ketoglutarat bindet 0,2 mg SO₂ (Dittrich & Großmann 2005). Der SO₂ Bedarf dieser Weine ist also insgesamt als niedrig einzustufen, da sich der erhöhte Gehalt an α -Ketoglutarat nur mit dem Faktor 0,2 auswirkt.

Durch das Aussetzen der gestaffelten Zugabe von Ammonium im zweiten Versuchsjahr konnte auf die Frage eingegangen werden, ob hohe DAHP Dosagen zu

Problemen führen können. Die Konzentration von Ammonium im Jungwein in den Versuchsjahren 1 und 3 zeigte deutlich, dass eine gestaffelte Ammoniumzugabe zu erheblichen Restgehalten von Ammonium nach der alkoholischen Gärung führen kann. Lediglich in dem zweiten Versuchsjahr lagen die Ammoniumkonzentrationen unter 10 mg L^{-1} . Die Ergebnisse sind also konform mit denen von Köhler *et al.* (2011), die ebenfalls erhöhte Restmengen an NH_4 -Stickstoff im Jungwein fanden, wenn 1 g L^{-1} DAHP zugegeben wurde. Nach Würdig & Woller (1989) besteht bei erhöhten Phosphatgehalten (im Fall einer überhöhten Zugabe von Diammoniumhydrogenphosphat) das Risiko einer Reaktion mit Fe(III)-Ionen. Es kann Eisen-(III)-phosphat entstehen und sich als grau gefärbter Niederschlag ausfällen. Diese Reaktion ist unter dem Namen "Grauer Bruch" bekannt und auch aktuell ein immer wieder vorkommendes Problem (Dietrich *et al.* 2008). Die Erfahrungen aus den genannten Versuchen lassen also Zweifel aufkommen, ob die Erhöhung der zulässigen DAHP Dosage im Jahr 2003 von $0,3 \text{ g L}^{-1}$ auf 1 g L^{-1} die richtige Entscheidung war. Überhöhte Zugaben von Diammoniumhydrogenphosphat gilt es zu vermeiden.

Neben Ammonium gelten die Aminosäuren als wichtige Stickstoffquelle für die Hefe. Die Ergebnisse zeigten für einige Aminosäuren eine fast vollständige Aufnahme durch die Hefe, während andere Aminosäuren mit einer deutlichen Restkonzentration im Jungwein vorlagen. Bevorzugt aufgenommen wurden Arginin, Threonin, Serin, Glutamin, Isoleucin, Leucin und γ -Aminobuttersäure (GABA). Im Vergleich zu der Einteilung von Bisson (1991) (Tabelle 5) und Pierce (1987) (Tabelle 6) zeigte sich bei den erzielten Ergebnissen eine wesentlich differenziertere Bewertung, resultierend in einer sehr klaren Hervorhebung der Aminosäuren Glutamin, Threonin und Serin als besonders bevorzugte Stickstoffquelle der Hefe. Auffällig ist, dass Varianten, denen Ammonium zugesetzt wurde, einen höheren Restgehalt bei einigen Aminosäuren aufwiesen. Laut Beltran *et al.* (2005) führt die Anwesenheit von Ammonium im Anfangsstadium der Gärung zu einem hemmenden Effekt auf die Aminosäureaufnahme der Hefe. Ein solcher Effekt würde die erlangten Ergebnisse erklären. Die erhöhten Werte lagen für die Aminosäuren Glutaminsäure, Alanin und Leucin vor, wie den Tabellen 28 bis 30 im Anhang zu entnehmen ist. Auch in den Varianten, bei denen die Aminosäuren Glutamin oder Arginin zugegeben wurden (V8 und V9), ließ sich ein leicht erhöhter Restgehalt im Jungwein wiederfinden. Insgesamt ergab sich in allen 3 Jahren das gleiche Muster bezüglich der Restgehalte der Aminosäuren im Wein. Varianten, die insgesamt eine komplexe Nährstoffgabe bekommen haben, wiesen höhere Restgehalte auf, als Varianten, denen nur

Einzelsubstanzen zugesetzt wurden. In der Kontrollvariante konnte nur ein minimaler Wert gefunden werden, was bedeutet, dass der natürliche Aminosäuregehalt weitestgehend aufgebraucht wurde.

Bezüglich Prolin fielen besonders die Varianten V8, V9, V12 und V14 auf. Diese Varianten wiesen besonders im dritten Jahr eine Zunahme der Prolinkonzentration im Verlauf der alkoholischen Gärung auf. Prolin gilt unter anaeroben Bedingungen, wie sie während der alkoholischen Gärung herrschen, als nicht von der Hefe verwertbar. Eine Zunahme von Prolin während der alkoholischen Gärung wurde in einem Versuch von Takagi (2008) als Schutzmechanismus bei osmotischem Stress oder ungünstigen Temperaturen interpretiert. Im vorliegenden Versuch wurde im Gegensatz dazu ein Zusammenhang zur Zugabe der Aminosäuren Arginin oder Glutamin erkannt. Gemäß Kaino & Takagi (2009) kann die Hefe *S. cerevisiae* Prolin über verschiedene enzymatische Schritte sowohl aus L-Glutaminsäure, als auch aus L-Arginin bilden, was dieses Ergebnis erklären würde. Dem widerspricht jedoch, dass dieser Mechanismus wahrscheinlich einer Feedback-Hemmung unterliegt (Sekine *et al.* 2007) und somit kein Anlass zur verstärkten Bildung vorlag. Das entscheidende Enzym in der Prolinsynthese ist die gamma-Glutamyl-Kinase.

Der Gehalt der Aromastoffe fiel je nach Variante sehr unterschiedlich aus. Es sollte untersucht werden, wie durch die Veränderung der Zusammensetzung des Gärsubstrates die Bildung von Ethylestern, Fettsäureestern und höheren Alkoholen beeinflusst wird. Die Arbeiten wurden so ausgelegt, dass die Veränderungen im Vergleich zur Kontrollvariante beurteilt werden können.

Die Konzentration des Essigsäureethylester wurde im Jahr 1 und 2 besonders in den Varianten mit hoher Dosage von Diammoniumhydrogenphosphat und folglich einer starken Gäraktivität stark reduziert. Im dritten Jahr konnte dieser Effekt aber nicht bestätigt werden.

Die Beeinflussung des Aromastoffes Essigsäure-2-phenylethylester zeigte ein sehr heterogenes Bild, so dass keine Schlussfolgerungen möglich sind. Die Konzentration des Essigsäure-2-methylbutylesters wies ein auffällig hohes Niveau im Vergleich zur Kontrollvariante auf. Mit Ausnahme von Variante V9 läßt sich die starke Förderung der Synthese von Essigsäure-2-methylbutylester in den Varianten V2, V5, V12, V14 und V16 mit der starken Gäraktivität in Beziehung setzen. Insgesamt wurde auch die Bildung des Aromastoffes Essigsäure-3-methylbutylester durchweg sehr stark gefördert. Lediglich die Varianten ohne Stickstoffgabe, also V6 (Thiamin), V10, V11

(Mineralstoffe) und V15 (Hefepräparat B) zeigten keinen Effekt. Als besonders auffällig erwiesen sich die Varianten V12 und V14, die eine sehr komplexe Nährstoffmischung in den Most eingebracht haben. Bei dem Aromastoff Essigsäurehexylester zeigte sich neben einem sehr heterogenen Bild, dass die Varianten V6, V10, V11 einen durchweg sehr geringen Einfluss erfuhren. Vitamine und Mineralstoffe haben also alleine keine Auswirkung auf den Essigsäurehexylester. Hohe Stickstoffgaben in Form von Ammonium (DAHP) oder Aminosäuren zeigten hier einen stärkeren Einfluss. Zu diesem Ergebnis kamen auch (Winter *et al.* 2011), die in ihren Arbeiten eine starke Förderung der Gäraktivität durch DAHP feststellten, die sich positiv auf die Bildung von Essigsäureestern äußerte.

Bei dem Aromastoff Propionsäureethylester zeigte sich bei einer alleinigen Stickstoffgabe kein fördernder Effekt. Nur eine komplexe Mischung mit Hefezellwänden, Thiamin und Mineralstoffen bewirkte eine effektive Erhöhung der Bildung dieses Stoffes.

Bezüglich des i-Buttersäureethylesters konnte besonders für die Varianten mit Ammoniumzugabe ein Trend zur Reduzierung im Vergleich zur Kontrollvariante festgestellt werden. In den Varianten V13 und V15 bis V18 zeigte sich dagegen im Jahr 2 eine auffällige Förderung der Bildung von Fettsäureestern, die mit den Hefepräparaten A, B und C in Verbindung gebracht werden kann. In Bezug auf Buttersäureethylester ließ sich hingegen ein positiver Zusammenhang zu der Konzentration von Ammonium (V2, V3, V4, V12, V14) oder Aminosäuren (V8, V9) herleiten. Durch die Zugabe von Hefepräparaten wurde die Bildung dieses Esters stark gefördert.

Die Konzentration des Capronsäureethylesters wurde nur sehr gering beeinflusst. Die Konzentration des Caprylsäureethylesters wurde in erster Linie in Varianten mit Hefepräparaten reduziert (V12 bis V17). Die Beeinflussung des Caprinsäureethylesters erwies sich eher jahrgangsabhängig als variantenabhängig. Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass eine starke Förderung der Gäraktivität, bedingt durch komplexe Nährstoffgaben, immer auch zu einer deutlichen Erhöhung der Esterbildung führte.

Die Konzentration der höheren Alkohole wurde in folgender Weise beeinflusst. Die Konzentration von 2-Phenylethanol wurde in allen N-haltigen Varianten deutlich reduziert. Diese Beobachtung trifft sowohl auf Varianten mit Ammonium, als auch mit Aminosäurezugabe zu. Varianten mit Hefepräparaten zeigten im Vergleich nur minimale Effekte. Die Konzentration von i-Butanol wurde besonders durch komplexe Nährstoffzugaben effektiv reduziert. 2-Methylbutanol zeigte zwischen den Jahrgängen

sehr heterogene Ergebnisse. Der höhere Alkohol 3-Methylbutanol war ebenfalls durch ein heterogenes Bild charakterisiert, nur die Ammoniumzugabe in den Varianten V2, V3 und V4 konnte im Jahr 1 für eine deutliche Reduzierung sorgen. Diese Beobachtungen entsprechen den Ausführungen von Äyräpää (1968), der eine positive Korrelation zwischen Stickstoffarmut und der Bildung von höheren Alkoholen beschreibt. Auch in ihren Arbeiten zeigte sich eine deutliche Reduzierung der höheren Alkohole bei steigender Stickstoffkonzentration. Dabei ist sowohl Stickstoff aus Ammonium, als auch aus Aminosäuren wirkungsvoll. Winter *et al.* (2011) stellten in ihren bereits erwähnten Arbeiten ebenfalls eine Reduzierung der Bildung höherer Alkohole durch DAHP fest.

Durch die Methode der Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde eine große Vielzahl von Daten auf wenige zentrale Informationen reduziert. In Abbildung 49 A sind die einzelnen Aromakomponenten als Vektoren im Koordinatenkreuz abgetragen. Ein Winkel nahe 0° signalisiert eine hohe positive Korrelation zwischen den Aromastoffen. Ein Winkel nahe 180° eine hohe, aber negative Korrelation. Für die Beziehung zwischen den abhängigen Variablen bedeutet dies: Wenn die Konzentration des einen Aromastoffes ansteigt, nimmt die Konzentration des anderen ab. Ein Winkel nahe 90° zeigt eine sehr geringe Korrelation zwischen den Variablen. Bezugnehmend auf die vorliegenden Analyseergebnisse zeigte sich, dass die Fettsäuren und ihre Ethylester eine Gruppe bildeten und die Bildung dieser Stoffe miteinander korrelierte. Die Stoffe 2-Phenylethanol, i-Buttersäureethylester und Essigsäure-2-phenylethylester bildeten ebenfalls eine Gruppe. Je mehr von diesen Substanzen gebildet wurde, desto weniger entstanden die Substanzen Buttersäureethylester und Essigsäurehexylester. Je mehr Propionsäureethylester gebildet wurde, desto weniger wurde i-Butanol synthetisiert. 3-Methylbutanol stand in negativer Korrelation zur Gruppe der Fettsäuren und ihrer Ester.

Im Diagramm B lassen sich die gleichen Gruppierungen erkennen, die auch schon in Bezug auf die Gärleistung und Aromabildung beobachtet wurden. So bildeten die Varianten V13 und V16 eine Gruppe und die Varianten V2, V5, V12 und V14, die insgesamt durch eine hohe Gärleistung und eine erhöhte Bildung an Esterverbindungen, sowie eine verminderte Bildung von höheren Alkoholen, auffielen. Im Gegensatz dazu stand die Gruppe der Varianten V6, V7, V10, V11, V17 und V18, die durch eine geringe bis mittlere Gärleistung charakterisiert war. Sie unterschieden sich nur gering bezüglich ihrer Aromausprägung gegenüber der Kontrollvariante V1,

die sich ebenfalls in dieser Gruppe befand. Die Varianten V3, V4, V8 und V9 bildeten auch vorher eine Gruppe: sie zeigten eine mittlere Gärstärke mit mäßiger Beeinflussung der Aromastoffe im Vergleich zur Kontrollvariante.

Übergreifend kann gesagt werden, dass die Beziehungen zwischen erhöhter Gärintensität, Beeinflussung der Aromastoffbildung und der Verrechnung mittels PCA ein schlüssiges Gesamtbild ergaben. Die Einteilung der Varianten in Gruppen konnte durch die PCA effektiv visualisiert werden.

Tabelle 19 gibt eine Übersicht über die statistisch signifikante Unterscheidung der einzelnen Versuchsvarianten gegenüber der Kontrollvariante V1. Der Signifikanztest im Detail bestätigt das Gesamtbild. Varianten wie V2, V5, V12 und V14 erwiesen sich immer wieder als statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrolle. Die Modifikation der Mostzusammensetzung in diesen Varianten führte also zu einer signifikant unterschiedlichen Ausprägung des Aromabildes des Weines.

6.2 Untersuchungen zur Stammabhängigkeit bei der Bildung verschiedener sekundärer Metabolite

Die Differenzierung von 35 Reinzuchthefestämmen anhand ihrer Aromastoffbildung während der alkoholischen Gärung führte zu interessanten Ergebnissen. Das Dendrogramm der Clusteranalyse ergab eine Unterteilung in vier Gruppen (Cluster), die sich in bestimmten Merkmalen unterschieden. Um diese Merkmale (Aromastoffe) zu definieren, wurde in Abb. 51 der Durchschnittswert je Aromastoff dargestellt. Dieser Versuch zeigt einerseits die Vielfalt der gebildeten Aromen und demonstriert, dass der Hefestamm eine elementare Rolle bei der Ausprägung des Weinaromas spielt. Auch Huehn *et al.* (1998) bestätigen in ihren Versuchen eine starke Stamm- aber auch Temperaturabhängigkeit bei der Bildung von Fettsäuren und ihren Ethylestern während der alkoholischen Gärung. Der Faktor Temperatur wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht variiert. Andererseits lassen sich durchaus Gemeinsamkeiten bei Hefestämmen der gleichen Gruppe herausarbeiten. So traten die Hefestämme des Clusters 4 durch die erhöhte Bildung von Essigsäure-2-phenylethylester und Essigsäure-3-methylbutylester in Erscheinung. Gruppe 3 wurde durch eine höhere Bildung von Fettsäureethylestern charakterisiert. Auch bezüglich Bernsteinsäurediethylester wiesen die Gruppen starke Unterschiede auf. Diese Komponente gilt als ein Indikator für gealterte Weine. Die Literatur spricht in erster Linie von einer Zunahme des Bernsteinsäurediethylesters mit steigender Lagerdauer von Weißweinen (Rapp *et al.*

1985, Rapp 1998). Die Analyse der Varianten erfolgte zum gleichen Zeitpunkt nach der Gärung, der Faktor Zeit war also für alle Varianten gleich. Somit muss der Unterschied in Zusammenhang mit dem vergärenden Hefestamm gesetzt werden. Ein Hinweis, dass die Hefe *S. cerevisiae* in der Lage ist, geringe Mengen Bernsteinsäure zu bilden, ist bei Würdig & Woller (1989) zu finden. Sponholz & Dittrich (1977) berichten von Bernsteinsäuregehalten in deutschen Weißweinen zwischen 200 und 750 mg L⁻¹. Ausgehend von einem unterschiedlich hohen Gehalt an Bernsteinsäure aus dem Citronensäurecyclus könnte es also zu einer chemischen Veresterung kommen, die den Diethylester bildet. Ein weiterer Anstieg der Konzentration über die Zeit wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Die Stammabhängigkeit der SO₂-Bildung ist ein hochaktuelles Thema, da in der Weinbranche die Konzentration von SO₂ im Wein immer stärker im Fokus steht. Der Gesamt-SO₂ Gehalt im Wein ist u.a. entscheidend für die Erteilung der amtlichen Prüfungsnummer und entscheidet über die Marktfähigkeit. Die Höchstgrenzen sind über die Verordnung (EG) Nr. 606/2009 geregelt. Wenn ein Hefestamm während der Gärung hohe Mengen an SO₂ gebildet hat und der Wein zusätzlich einer hohen Dosage an schwefeliger Säure (SO₂) bedarf, um auf einen bestimmten Gehalt an freier SO₂ zu kommen, kann der Grenzwert leicht überschritten werden. Hefestämme, wie Stamm Nr. 8 und Nr. 18 sind unter diesem Blickwinkel kritisch zu bewerten. Die Abbindung der zugegebenen SO₂ ist von der Konzentration der Bindungspartner abhängig (siehe Kapitel 2.2.2.1). In der Praxis ist es wichtig, das Zusammenspiel dieser Faktoren zu berücksichtigen.

Die Hefe bildet während der alkoholischen Gärung und sogar schon während der Rehydratation der Trockenhefe (Cheraiti *et al.* 2010) Substanzen, die an schwefelige Säure binden und somit die zugegebene schwefelige Säure in inaktives gebundenes SO₂ überführen. In erster Linie sind die in Abb. 52 dargestellten Metabolite Acetaldehyd, Pyruvat und α -Ketoglutarat zu nennen. Aber auch andere Substanzen wie Glucose, Fructose und Galacturonsäure können mit der schwefeligen Säure reagieren. Aus diesem Grund haben restsüße Weine einen höheren SO₂ Bedarf als durchgegorene Weine. Wie in Abbildung 53 zu sehen ist, würde der unterschiedliche SO₂ Bedarf bei dieser Versuchsanstellung im Wesentlichen vom Gehalt der gebildeten SO₂-Bindungspartner abhängen. Dieser Gehalt ist extrem stammabhängig. Die Konzentrationen waren insgesamt höher als die durchschnittlichen Konzentrationen, die in der Literatur angegeben werden. Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass pasteurisierter Most verwendet wurde und dieser wahrscheinlich nur noch Spuren von

Thiamin enthielt. Thiamin dient als Cofaktor der Pyruvatdecarboxylase und bei Mangel kommt es zu einer Anhäufung von Pyruvat und α -Ketoglutarat, wie bereits in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben wurde. Es gab aber auch verschiedene Hefestämme, die für alle drei Substanzen niedrige Werte aufwiesen. Diese Hefestämme waren vermutlich besser in der Lage, den Thiaminmangel durch eine eigene Thiaminsynthese auszugleichen als andere.

In der Abbildung 53 zeigte sich, dass die Bildung von Acetaldehyd mit der Bildung von SO_2 korrelierte. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) der linearen Regression betrug 0,85. Eine aktuelle Arbeit von Cheraiti *et al.* (2010) beschäftigte sich auch mit der Bildung von Acetaldehyd bei verschiedenen kommerziellen Hefestämmen. Bei der Untersuchung von acht kommerziellen Hefestämmen konnte die Arbeitsgruppe feststellen, dass die Acetaldehydkonzentration am Anfang der Gärung weder mit der maximalen noch mit der finalen Acetaldehydkonzentration korrelierte. Im Gegensatz zu der anfänglichen Konzentration wiesen die Endkonzentrationen nur geringe Unterschiede zwischen den 8 Hefestämmen auf (Spannweite: 3,6 - 14 mg L⁻¹). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe stehen somit im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erlangten Resultaten, da sich im Versuch 2 deutlich stammabhängige Unterschiede in der Acetaldehydkonzentration am Ende der Gärung (Spannweite: 11,3 - 49 mg L⁻¹) zeigten.

Außerdem kamen Cheraiti *et al.* (2010) zu dem Ergebnis, dass die anfängliche Acetaldehydbildung signifikant mit der Toleranz des Hefestammes gegenüber schwefeliger Säure (SO_2) korrelierte. Diese Beobachtung erscheint plausibel, da Acetaldehyd zur Neutralisation der toxischen Wirkung der schwefeligen Säure führt.

Für die Bildung von Pyruvat und α -Ketoglutarat konnte in dieser Arbeit kein enger Zusammenhang mit der SO_2 -Konzentration festgestellt werden. Aus Abbildung 53 geht jedoch eine starke Stammabhängigkeit für die Synthese dieser beiden Substanzen hervor.

6.3 Einflussfaktoren auf den Gehalt von Sulfat, schwefeliger Säure und niedrig-siedenden Schwefelverbindungen

Die Versuche im Themenbereich „schwefelhaltige Metabolite“ untersuchten verschiedene Schwefelquellen in Bezug auf ihre Auswirkung auf die Bildung flüchtiger und nicht-flüchtiger S-haltiger Komponenten. In Vorversuchen konnte der Zusammenhang anschaulich demonstriert und in Praxisversuchen die Relevanz für die Praxis ermittelt werden.

In den Vorversuchen konnte eine direkte Korrelation zwischen der Bildung von Schwefelwasserstoff (H_2S) und der Anwesenheit von elementarem Schwefel im Most unter Laborbedingungen gezeigt werden (Abb. 54). Dieser Zusammenhang war auch schon in den 1970er Jahren Forschungsgegenstand und wurde von Wenzel & Dittrich 1978, Wenzel *et al.* 1980) beschrieben. In den nun durchgeführten Versuchen stieg die Konzentration von H_2S ab $2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}$ im gärenden Most an. Die Autoren Rauhut & Kürbel (1994) früherer Arbeiten wiesen aus, dass in der Variante mit 3 mg L^{-1} Netzschwefel bereits böckserartige Aromen im Wein zu verzeichnen waren. Die ausgewiesenen Varianten enthielten 3, 5 oder 10 mg L^{-1} elementaren Schwefel. In der jetzt verwendeten Variante lagen $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ elementarer Netzschwefel vor, wodurch ein noch geringerer Schwellenwert als bisher für Netzschwefelrückstände untermauert werden konnte. Mit steigender Dosage stieg der H_2S Gehalt in dieser Arbeit sogar linear an. Außerdem konnte eine gewisse Stammabhängigkeit belegt werden. Reaktionsprodukte von H_2S wie Ethylmercaptan (EtSH), Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) und Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc) konnten bei höherer Netzschwefeldosage (10 bzw. $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}$) ebenfalls nachgewiesen werden.

Für die Praxis bedeutet dies, dass bei Netzschwefelrückständen auf den Trauben eine effektive Mostvorklärung von enormer Wichtigkeit ist, damit keine Rückstände in den zu vergärenden Most gelangen. Andernfalls muss mit einem Schwefelböckser gerechnet werden. Laut Würdig & Woller (1989) liegen die Schwefelrückstände im trüben Most nach normaler Netzschwefel-Spritzung zwischen $0,3$ und $8,9 \text{ mg L}^{-1}$. Wenn es zur Bildung von Ethylestern kommt, kann ein solcher Weinfehler auch mithilfe einer Kupferschönung nicht mehr behoben werden. Die Ergebnisse in Abbildung 55 verdeutlichen, dass die Sensibilität gegenüber Netzschwefelrückständen stammabhängig ist. Hefestamm B hat weniger flüchtige S-Substanzen gebildet als Hefestamm A.

Auch Glutathion (GSH) kann als Substrat für die H_2S Bildung dienen, wenn es in großen Mengen im Most enthalten ist. Glutathion ist ein Tripeptid, das eine S-haltige Aminosäure (Cystein) enthält und bei dessen Abbau Schwefelwasserstoff entstehen kann. Die Abbildung 57 zeigt die Analysenergebnisse der leicht flüchtigen Schwefelverbindungen nach der alkoholischen Gärung. Der Most wurde mit einer Dosage von 50 und 100 mg L^{-1} exogenem GSH versehen. In den beiden Versuchsvarianten zeigten sich signifikante Mengen von H_2S , Ethylmercaptan (EtSH), Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) und Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc). Ähnlich wie bei der Zugabe von Netzschwefel zeichnete sich auch hier eine

proportionale Zunahme der flüchtigen Substanzen ab. Wahrscheinlich muss aber unterschieden werden zwischen natürlich vorkommendem und exogen zugegebenem Glutathion. Glutathion ist natürlicherweise im Most enthalten und steht in positiver Korrelation zum hefeverfügbaren Stickstoff in den Trauben, wie Choné *et al.* (2006) feststellten. Die Autoren konnten in ihren Versuchen bei einer Stickstoffdüngung (60 kg ha^{-1}) 10 Tage nach der Blüte einen Anstieg des hefeverfügbaren Stickstoffs in den Trauben feststellen. Außerdem stieg die Konzentration des Glutathions von $17,9 \text{ mg L}^{-1}$ (Kontrollvariante) auf 120 mg L^{-1} an. Sie folgerten daraus einen besseren Schutz der Thiolverbindungen im weiteren Weinausbau. Untersuchungen von Winter *et al.* (2011) zeigten deutlich, dass die Hefezelle GSH bereits während der Rehydratation aufnehmen kann. Im erwähnten Versuch wurde GSH durch die Beimischung eines Hefepräparates, das natürlicherweise GSH enthielt, zugeführt. Die so reaktivierten Hefezellen wiesen einen 1,8 - fach höheren Gehalt von GSH im Vergleich zur Kontrollvariante auf. Die Zugabe als Einzelsubstanz bei der Rehydrierung der Hefe führte jedoch auch bei den Arbeiten von Winter *et al.* zu einem signifikanten Anstieg der H_2S Bildung während der anschließenden Gärung. Diese Reaktion der Hefe wurde auch in Abbildung 57 der vorliegenden Arbeit dargestellt. Hier konnten darüber hinaus noch weitere Substanzen (EtSH, MeSAc und EtSAC) analytisch nachgewiesen werden. Ein Ungleichgewicht von organischen hefeverfügbaren Stickstoffverbindungen durch eine externe Zugabe von Glutathion könnte also zu einer unerwünschten Bockserbildung im Verlauf der Gärung führen. Die von der Internationalen Organisation der Rebe und des Weines (OIV) aktuell diskutierte Zulassung von Glutathion als oenologischen Hilfsstoff im Most oder Wein ist unter diesem Gesichtspunkt kritisch zu beurteilen. Je nach Zugabezeitpunkt und Zusammensetzung des Mostes könnte die Gefahr für eine Bockserbildung als Folge der GSH Zugabe gegeben sein.

Im Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob eine SO_2 -Bildung der Hefe auch automatisch zur Bildung von Acetaldehyd im Laufe der Gärung führt. Dass Acetaldehyd Teil einer Toleranzstrategie sein kann, wird von Pilkington & Rose (1988) und Casalone *et al.* (1992) für den Fall der Mostschwefelung beschrieben. Sie stellten fest, dass die angärende Hefe das freie SO_2 durch neu gebildetes Acetaldehyd abbinden und somit unschädlich machen kann. Nach Dittrich & Großmann (2005) beginnt die Gärung erst, wenn kein freies/aktives SO_2 mehr vorhanden ist, welches die Zellvermehrung hemmen kann. Ähnlich dieser Erklärung könnte es eine Wechselwirkung bei SO_2 -bildenden Hefen bezüglich der zeitgleichen Bildung von SO_2 und seinen Bindungspartnern geben. Die Bindungspartner besitzen ein spezifisches

Bindungsverhältnis zu SO_2 . Legt man die Daten aus Vorversuch 3 zugrunde ergeben sich am siebten Tag bei der SO_2 -bildenden Hefe 72 mg L^{-1} Gesamt- SO_2 und in der Summe 211 mg L^{-1} Bindungspartner (errechnet mit den entsprechenden Bindungsfaktoren). Das Potential der Bindungspartner überstieg die Konzentration an SO_2 also bei Weitem. Eine gegenseitige Wechselwirkung kann somit nur vermutet werden. Abbildung 59 zeigt, dass auch Hefestamm B hohe Mengen an SO_2 -Bindungspartnern gebildet hat. Das Bindungspotential der Bindungspartner betrug am siebten Tag der Gärung 420 mg L^{-1} . Die natürliche Bildung von SO_2 lag bei diesem Hefestamm aber bei unter 10 mg L^{-1} . Eine Wechselwirkung war bei Hefe B somit definitiv nicht zu erkennen. Besonders Acetaldehyd wurde später im Verlauf der Gärung wieder auf ein Minimum reduziert. Um diese sehr hohen Werte an Bindungspartnern richtig zu bewerten, muss in Erinnerung gerufen werden, dass es sich hier um pasteurisierten Most handelte, der vermutlich nur Spuren von Thiamin enthielt. Die Beobachtung der üblichen Abnahme der Acetaldehydkonzentration im Verlauf der Gärung wird auch von Cheraiti *et al.* (2010) bestätigt.

Schließlich bleibt noch die Frage, ob auch die Rebsorte einen Einfluss auf die SO_2 -Bildung der Hefe haben kann. Abbildung 59 zeigte anschaulich, dass der gleiche Hefestamm, eingesetzt in Mosten aus unterschiedlichen Rebsorten, sehr unterschiedliche Mengen an Gesamt SO_2 produzieren konnte. Es wird also deutlich, dass auch der Faktor Rebsorte, der in diesem Kontext durch eine spezifische Mostzusammensetzung charakterisiert wird, einen großen Einfluss auf die Bildung von SO_2 hat. Es kann vermutet werden, dass jeder Most einen unterschiedlichen Gehalt an Schwefelquellen mit sich gebracht hat (siehe Abb. 9), die im Laufe der alkoholischen Gärung von der Hefe verstoffwechselt wurden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Versuch 3 kann hier die Hypothese geäußert werden, dass im Wesentlichen unterschiedliche Sulfatgehalte zu einer unterschiedlichen SO_2 -Bildung geführt haben.

Wie der Literaturüberblick gezeigt hat, ist die Hefe *S. cerevisiae* in der Lage, verschiedene S-haltige Substrate aufzunehmen und sie zu verstoffwechseln. Unter bestimmten Bedingungen können dann flüchtige oder nicht flüchtige S-haltige Metabolite entstehen, die die Weinqualität negativ beeinflussen. Der Versuch 3 kombinierte verschiedene S-haltige Substrate mit drei Hefestämmen unterschiedlicher Charakteristik und führte somit die Erfahrungen aus den Vorversuchen 1-4 in einer gemeinsamen Versuchsanstellung zusammen.

Der natürliche Sulfatgehalt im verwendeten Most lag bei 92 mg L^{-1} Sulfat. Durch die Zugabe von Ammoniumsulfat wurde dem Most in den entsprechenden Varianten (Y1A,

Y2A, Y3A) eine zusätzliche Menge von 364 mg L^{-1} Sulfat zugeführt. Ammoniumsulfat ist ein in der EU zugelassener Hefenährstoff und kann anstelle von DAHP verwendet werden. Es sollte nun untersucht werden, wie die einzelnen Hefestämme mit diesem hohen Angebot an Sulfat umgehen. Es zeigte sich, dass die Hefestämme unterschiedlich viel des Sulfats aufnahmen. Hefe 1 nahm die größte Menge auf (250 mg L^{-1}), gefolgt von Hefe 2 (58 mg L^{-1}), und Hefe 3 (41 mg L^{-1}), wie Abbildung 64 zu entnehmen ist. Auffällig für Hefe 1 war die mengenmäßig umgerechnet äquivalente Menge SO_2 , die am Ende der Gärung vorlag. Es konnte an dieser Stelle gezeigt werden, dass der Hefestamm 1 sehr sensibel auf im Most enthaltenes Sulfat reagiert und daraus SO_2 metabolisiert. Der Hefestamm 1 kann eindeutig als SO_2 -Bildner bezeichnet werden. Bezüglich der Reduzierung von SO_2 -Grenzwerten ist dieser Hefestamm also mit Vorsicht einzusetzen. Die Beobachtung wurde auch bereits von Cottreau (2009) beschrieben und kritisch beleuchtet.

Die beiden Hefestämme Y2 und Y3 haben ebenfalls Sulfat aufgenommen und SO_2 produziert, aber in einem tolerierbaren geringen Ausmaß ($< 40 \text{ mg L}^{-1}$). Die Variante DAHP der Hefen Y2 und Y3 hat im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls eine etwas höhere Sulfatabnahme und SO_2 -Produktion, obwohl der Sulfatgehalt über den Nährstoff nicht erhöht wurde. Der Grund könnte eine allgemeine Erhöhung der Gäraktivität in Verbindung mit einer allgemein höheren Produktion von Metaboliten sein. Grundsätzlich liegen die Hefestämme Y2 und Y3 in ihrer SO_2 -Produktion weit unter dem Niveau des Hefestamms Y1 (Abb. 65).

Bezüglich der Produktion von niedrig-siedenden Schwefelverbindungen (Abb. 67) war die Variante mit Netzschwefelzugabe ($12,5 \text{ mg L}^{-1}$) sehr auffällig. In allen Varianten konnte eine minimale Konzentration Schwefelwasserstoff ($< 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) gemessen werden, was mit der Stickstoffarmut des verwendeten Mostes erklärt werden kann. Die Anwesenheit von Netzschwefel in den Varianten Y1N, Y2N und Y3N führte aber direkt zu einer extremen H_2S -Bildung zwischen 81 und $130 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ im Jungwein. Ein solcher Wein wäre wohl nicht mehr marktfähig. Nur in diesen drei Varianten kam es auch zur Bildung der weiteren Reaktionsprodukte Methylmercaptan (MeSH), Ethylmercaptan (EtSH), Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) und Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc), die Konzentration blieb jedoch unter $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Eine sensorische Beeinträchtigung wäre durch die Kombination denkbar, die Geruchsschwellenwerte der Einzelsubstanzen liegen jedoch höher.

Der Zusammenhang zwischen Netzschwefelrückständen und der Bildung von niedrig-siedenden Schwefelverbindungen konnte bereits eindrucksvoll demonstriert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass über Schwefelwasserstoff (H_2S) hinaus auch weitere Substanzen gebildet und im Wein nachgewiesen werden können, so z.B. Ethylmercaptan (EtSH), Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) und Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc). Die Frage, ob Netzschwefelrückstände unter Praxisbedingungen ebenfalls zu einer sensorischen Beeinträchtigung des Weines führen können, wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht. Die entscheidende Frage ist, welche Menge elementaren Schwefels sich zum Zeitpunkt der Angärung im Most befindet. Netzschwefelapplikationen sind fester Bestandteil bei der Bekämpfung von *Oidium tuckeri*. Es gibt jedoch eine vorgeschriebene Wartezeit zwischen der letzten Spritzung und der Weinlese, um Rückstände zu minimieren. Außerdem gibt es Mostvorklärungsmaßnahmen, die den Gehalt von Pflanzenschutzmittelrückständen weiter verringern können.

Durch Vorversuch 1 konnte aber gezeigt werden, dass die verwendete Hefe bereits ab einer Konzentration von $2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}_{\text{elementar}}$ eine leichte Bildung von Schwefelwasserstoff (H_2S) vollzog. Wie in Abbildung 71 zu sehen ist, konnte im Jungwein des Versuches 4 keine erhöhte Konzentration von H_2S festgestellt werden. Alle Werte von H_2S lagen unter $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Im Rückschluss könnte nun formuliert werden, dass der Gehalt von Schwefelrückständen im Versuch 4 in allen Varianten unter $2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}_{\text{elementar}}$ gelegen haben muss. Sicherlich hat aber auch ein Austreiben durch Gärungsgase diese Beobachtung mit beeinflusst. Eine Analyse der Rückstände war aus technischen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Eine weitere Beobachtung konnte zum Gärverlauf der einzelnen Varianten gemacht werden (Abb. 68 – 70). Die trübe Variante führte in allen Versuchen zu einer Beschleunigung der Gärung, was durch die Vergrößerung der inneren Oberfläche zu erklären ist. Die Trubpartikel führen zu einer verbesserten Ausgasung des CO_2 und verbesserten somit die Umgebungsbedingungen für die gärende Hefe (Troost 1988).

Die SO_2 -Bildung durch die Hefe zeigte ebenfalls interessante Zusammenhänge. Einerseits zeigte sich der zu erwartende Unterschied bezüglich des verwendeten Hefestammes, dieses Phänomen wurde bereits in Kapitel 2.4.2 ausführlich dargestellt. Andererseits zeigte sich in dieser Versuchsanstellung eine Zunahme der SO_2 -Bildung während der Gärung in Abhängigkeit von der durchgeführten Netzschwefelapplikation im Weinberg. Dieser Zusammenhang wurde bei keiner der genannten Veröffentlichungen (Suzzi *et al.* 1985, Romano & Suzzi 1993, Hallinan *et al.* 1999) beschrieben. Dieser Effekt zeigte sich nur bei Hefe 1, die allgemein als SO_2 Bildner bezeichnet werden kann. Die Konzentration von Acetaldehyd wies parallel zu den SO_2

Werten ebenfalls eine ansteigende Konzentration auf. Diese Beobachtung deckt sich mit vorherigen Ergebnissen. Eine Korrelation zwischen diesen beiden Werten konnte ebenfalls in Versuch 2 (Abb. 54) gezeigt werden.

Wie zahlreiche Arbeiten bestätigen, gilt Stickstoffmangel im Most als der wichtigste Verursacher für die Bildung von flüchtigen Schwefelkomponenten (Henschke & Jiranek 1991, Jiranek *et al.* 1995, Rauhut 1996, Spiropoulos *et al.* 2000). Auch dieser Zusammenhang wurde mithilfe von natürlichen Mostproben aus Geisenheimer Weinbergen im Jahrgangsunterschied untersucht.

Wie in Abbildung 75 zu sehen ist, konnte in den Jungweinen dieses Versuches sowohl Schwefelwasserstoff (H_2S) als auch Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) nachgewiesen werden, dessen Entstehung in direkten Zusammenhang mit dem in 2006 vorliegenden Most aus belastetem Traubenmaterial gebracht werden kann (siehe Analysedaten in Tabelle 20). Die 2006er Moste waren eindeutig unterversorgt mit Stickstoff und vermutlich auch unterversorgt mit Vitaminen, da ein hoher Befallsgrad mit *Botrytis cinerea* vorlag. Thiamin und andere Vitamine werden von diesem Pilz verbraucht und standen der Hefe während der Gärung nicht mehr zur Verfügung, was sich ungünstig auf den Hefestoffwechsel auswirkte. Dittrich & Großmann (2005) beschreiben eine Thiaminabnahme um 90 % beim Vergleich von Most aus gesunden und *Botrytis*-infizierten Trauben. Durch den Stickstoffmangel standen der Hefe keine N-haltigen Bausteine zur Aminosäuresynthese zur Verfügung. Schwefel aus dem Sulfatreduktionsweg konnte somit nicht verbraucht werden und wurde als Sulfid aus der Hefe ausgeschleust. In der Folge der Ansammlung von Schwefelwasserstoff im Wein hat sich auch der Thioessigsäure-S-methylester gebildet.

Im Jahr 2007 konnten gesunde Trauben geerntet werden und dementsprechend auch die Mostzusammensetzung als normal und für eine problemlose Gärung geeignet bezeichnet werden. In Abbildung 76 ist zu sehen, dass lediglich Spuren dieser beiden S-haltigen Aromastoffe im Jungwein zu finden waren. Dies lässt den Rückschluss zu, dass zwar H_2S während der Gärung gebildet wurde, es jedoch vollständig durch Gärungsgase ausgetrieben wurde. Sie hatten keinerlei negativen Einfluss auf die Aromatik des Weines.

6.4 Abschlussbetrachtung

Durch vielfältige Versuchsansstellungen konnten Antworten auf die beiden zentralen Fragen der beiden Themenbereiche „Nährstoffversorgung der Hefe und Aromabildung“ und „schwefelhaltige Metabolite“ gefunden werden.

Im Themenbereich 1 konnte die Beeinflussung der Aromabildung durch Reinzuchthefen und Hefenährstoffe anschaulich dokumentiert werden. Die klassische Zugabe aus Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP), Hefezellwänden und Thiamin zeigte eine gleich starke Gärförderung wie eine neu zusammengesetzte komplexe Kombination aus Einzelnährstoffen, die teilweise aus nicht zugelassenen Einzelkomponenten bestand. Über alle Varianten hinweg konnte belegt werden, dass eine effektive Nährstoffversorgung des Mostes eine Reduzierung der Konzentration von höheren Alkoholen, eine Erhöhung diverser Ethylester und eine Reduzierung der Konzentration der Fettsäureethylester bewirkte. Auffällig war, dass auch das bekannte 2-Phenylethanol (sensorisches Attribut Rosenduft) bei N-haltigen Varianten deutlich reduziert vorlag. Die von *Saccharomyces cerevisiae* bevorzugt aufgenommenen Aminosäuren waren Glutamin, Threonin und Serin. Im Rahmen der Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Aromastoffe bestätigte sich die Gruppierung der Varianten, die anfangs in Bezug auf den Gärverlauf zu erkennen war. Ferner konnte der starke Einfluss des Reinzuchthefestammes auf das Gärbukett gezeigt werden.

Im zweiten Themenbereich wurde der Einfluss von verschiedenen schwefelhaltigen Substanzen auf die Bildung sekundärer S-haltiger Metabolite untersucht. Es zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Netzschwefel und Glutathion (GSH) auf die Bildung von Schwefelwasserstoff (H_2S), Ethylmercaptan (EtSH), Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) und Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc) während der Gärung. Es konnte somit eindeutig bestätigt werden, dass über Schwefelwasserstoff hinaus weitere Substanzen entstehen können. Auch konnte deutlich gemacht werden, dass die Zugabe von Glutathion als Einzelsubstanz in die alkoholische Gärung zu böckserartigen Aromastoffen führen kann, während Glutathion, das in der Hefezelle eingelagert ist, wohl weniger kritisch zu beurteilen ist.

Außerdem wurde thematisiert, dass die SO_2 -Bildung während der Gärung sehr stark von der spezifischen Mostzusammensetzung (z.B. Sulfatkonzentration) und dem Hefestamm abhängt. Da in den letzten Jahren die Grenzwerte für schwefelige Säure (SO_2) sowohl im konventionellen (Verordnung (EG) 606/2009), als auch im biologisch zertifizierten Wein (Verordnung (EG) 203/2012) immer stärker gesenkt wurden, lassen sich aus diesen Arbeiten wichtige Hinweise für die Praxis der Weinherstellung ableiten.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Der Klimawandel, der seit einigen Jahrzehnten beobachtet werden kann, hat einen direkten Einfluss auf die Weinbereitung. Neben einer Erhöhung der Durchschnittstemperatur ist damit zu rechnen, dass die zunehmende Variabilität von Wetterereignissen das größte Problem für die Kultivierung von landwirtschaftlichen Produkten darstellen wird. Im Fall des Weinbaus kommt es zunehmend zu heterogenen Reifeszuständen der Weintrauben und heterogenen Mostqualitäten als Folge von Trockenheit oder starken Niederschlagsereignissen. Das Weinbaugebiet Rheingau, das auf dem 50. Breitengrad liegt und klimatisch als „Cool Climate Region“ einzustufen ist, ist bereits heute mit jährlich veränderten Bedingungen hinsichtlich Trockenstress, mikrobiellem Befall der Trauben und Nährstoffversorgung der Moste konfrontiert. Entsprechend dieser Heterogenität sind Oenologen zukünftig immer mehr aufgerufen unterschiedliche Strategien zur Optimierung der alkoholischen Gärung einzuleiten, um dauerhaft die höchst mögliche Weinqualität zu produzieren.

Die vorliegende Arbeit umfasst zwei Teile. Der Teil 1 beschäftigt sich mit dem Thema der Beeinflussung der Aromabildung durch Reinzuchthefen und Hefenährstoffe im Verlauf der Gärung. Der Teil 2 behandelt flüchtige und nicht-flüchtige schwefelhaltige Komponenten, die als Folge einer unterschiedlichen Mostzusammensetzung von der Hefe im Laufe der alkoholischen Gärung gebildet werden. Beide Themenbereiche werden durch eine Kombination aus verschiedenen Versuchsanstellungen beleuchtet.

Im Teil 1 konnte deutlich gezeigt werden, dass Hefenährstoffe einen starken Einfluss auf die Gärleistung, die Hefezellzahl und die Aromabildung haben. Die klassische Zugabe aus Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP), Hefezellwänden und Thiamin zeigte dabei die gleiche hohe Gärförderung wie eine neu zusammengesetzte komplexe Kombination aus Einzelnährstoffen, die teilweise nicht laut Verordnung (EG) 606/2009 zugelassen ist. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass eine effektive Nährstoffgabe eine Reduzierung der höheren Alkohole, eine Erhöhung diverser Ethylester und eine Reduzierung der Fettsäureethylester bewirkt. Das bekannte 2-Phenylethanol, das als sensorisches Attribut an Rosen erinnert lag bei N-haltigen Varianten deutlich reduziert vor. Die Varianten konnten anhand der Stärke der Beeinflussung in Gruppen eingeteilt werden und deutlich zwischen Nährstoffvarianten ohne nennenswerten Einfluss und Nährstoffvarianten mit hohem Einfluss

unterschieden werden. Die von der Hefe bevorzugt aufgenommenen Aminosäuren waren Glutamin, Threonin und Serin. In einigen Varianten wurde Prolin im Jungwein in höheren Konzentrationen gefunden, als im Most. Im Rahmen einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Aromastoffe konnte die Gruppierung, die sich in den verschiedenen anderen Ergebnissen bereits abzeichnete, bestätigt werden.

Im Teil 1 wurde außerdem in einem Vergleich von 35 kommerziellen Reinzuchthefestämmen demonstriert, wie variationsreich die Vergärung mit Reinzuchthefer sein kann. Die verwendeten Hefestämme unterschieden sich sehr stark in ihrer Bildung von Sulfiten (Streuung von 3 bis 57 mg L⁻¹ Gesamt-SO₂) und SO₂-Bindungspartnern, wobei eine positive Korrelation zwischen der Bildung von SO₂ und Acetaldehyd gefunden werden konnte. Hohe Unterschiede gab es auch bei der Bildung von Aromastoffen. Mittels einer Clusteranalyse konnten anhand der Aromastoffe vier verschiedene Gruppen identifiziert und charakterisiert werden.

Im Teil 2 konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Anwesenheit im Gärmedium sowohl von Netzschwefel, als auch von Glutathion (GSH) und der Bildung von Schwefelwasserstoff (H₂S), und darüber hinaus von Ethylmercaptan (EtSH), Thioessigsäure-S-methylester (MeSAc) und Thioessigsäure-S-ethylester (EtSAc) gezeigt werden. Außerdem wurde deutlich, dass die SO₂-Bildung auch von der Rebsorte mit ihrer spezifischen Mostzusammensetzung abhängt. Sulfat, das natürlicherweise im Most enthalten ist, kann z.B. als Vorstufe von der Hefe aufgenommen und stammspezifisch in SO₂ umgewandelt werden. Wenn GSH einem stickstoffunterversorgten Most zudosiert wird, kann es von der Hefe als N-Quelle genutzt werden und dabei erhöhte Mengen an unerwünschten flüchtigen S-haltigen Verbindungen bilden.

Die Bildung von Schwefelwasserstoff (H₂S) unter bestimmten Bedingungen konnte anhand verschiedener Feldversuche auf ihre Praxisrelevanz getestet werden. Ein Versuch behandelte dabei die Ursache der Netzschwefelrückstände, die Ergebnisse erlaubten aber keinen Rückschluss auf relevante Restmengen an Netzschwefel im Most. Stickstoffarmut im Most konnten jedoch in einem Versuch als Ursache für die Bildung von niedrig-siedenden Schwefelverbindungen unter Praxisbedingungen bestätigt werden. Zusätzlich zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen Netzschwefelapplikationen im Weinberg und der Bildung von SO₂ im Laufe der Gärung, dieser Zusammenhang wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

8 SUMMARY

Global climate change can be observed for decades now and it can be stated that it has a direct influence on viticulture and winemaking. Besides the increase of the average temperature, the greatest challenge for cultivating agricultural products will be the increased variability in weather events. In the case of viticulture this might result in heterogeneous states of ripeness and in the consequence heterogeneous qualities of must as a consequence of either long dryness periods or strong rainfalls. Rheingau grape growing region is located on the 50th parallel and can be allocated to “Cool Climate Viticulture”. But during the last years it was confronted to significant yearly changes in regard to dryness, microbial infections and the nutritional level of the grape must. As a consequence to heterogeneous conditions oenologists will be challenged more and more to adopt winemaking strategies in order to optimize alcoholic fermentation and continuously produce high quality wines.

This thesis includes two parts. Part 1 is about the influence of different yeast strains and different yeast nutrition on aroma formation in the course of alcoholic fermentation. Part 2 deals with volatile and non-volatile sulphur containing compounds produced by yeast as a consequence of different must composition during alcoholic fermentation. Both topics were investigated by a combination of different trials

In part 1 it could be shown, that yeast nutrients have a strong impact on fermentation performance, yeast growth and aroma formation. The classical additions of DAHP, yeast cell walls and thiamine showed the same effect as a designed combination of various single compounds, which are not yet allowed by Regulation (EC) 606/2009. Basically it could be demonstrated that an effective nutrient addition can reduce the concentration of higher alcohols, decrease the concentration of various ethyl esters and reduce the concentration of fatty acid esters, significantly. The well-known 2-phenylethanol, which is supposed to remind the smell of roses, was reduced by N-containing nutrient additions. The variants could be grouped according to the strength of their impact, distinguishing clearly between nutrient additions with low and strong impact. The preferred amino acids assimilated by the fermenting yeast were glutamate, threonine and serine. Some variants showed an increase in proline concentration in the young wine compared to the concentration in the must. Performing a Principal Component Analysis (PCA) on the produced aroma compounds, the specific grouping of variants, which was established according to former results could be confirmed.

Part 1 included also a comparison of 35 commercial yeast strains demonstrating how various the application of selected yeast strains can be. The applied yeast strains showed huge differences in their formation of sulfites (range from 3 to 57 mg L⁻¹ total SO₂) and SO₂-binding compounds, whereas there was a positive correlation between the formation of SO₂ and acetaldehyde found in these samples. Major differences could also be found in the formation of aroma compounds using cluster analysis. Four different groups could be created and characterized.

In part 2 it could be concluded that there was a direct relation between the presence of wettable sulfur (S) and glutathione (GSH) in the must and the formation of hydrogen sulfide (H₂S), ethanethiol (EtSH), thioacetic acid -S- methyl ester (MeSAc) and thioacetic acid -S- ethyl ester (EtSAc). In addition to that it was shown that the formation of SO₂ depends on the grape variety or the specific composition of the must. Sulfate was assimilated by yeast, resulting in the formation of SO₂. This observation was strongly strain dependant. If glutathione is added as exogenous substance, it could disturb the natural balance between nitrogen and GSH concentration, resulting in the formation of sulphur off-flavours. The formation of hydrogen sulfide (H₂S) under certain conditions could be tested in field trials for practical relevance. One trial investigated the aspect of sulfur residues in the must. The results showed that relevant residues of wettable sulfur, causing an unpleasant reduced S off-flavour, could not be found. Whereas nitrogen starvation in the must could be confirmed in another trial as the reason for increased amounts of low volatile sulfur compounds during fermentation. Additionally, a positive correlation between the amount of applied wettable sulphur in the vineyard and the formation of SO₂ by yeast in the course of fermentation could be found. This aspect is not described in recent according literature.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Acree T E, Sonoff E P und Splittstoesser D F. 1972.** Effect of yeast strain and type of sulfur compound on hydrogen sulfide production. *American Journal of Enology and Viticulture*, **23**:6-9.
- Agenbach W A. 1977.** A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. In *Proceedings of the South African Society for Enology and Viticulture*, pp. 66–88.
- Alexandre H, Berlot J und Charpentier C. 1994.** Effect of ethanol on membrane fluidity of protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* grown with or without ethanol, measured by fluorescence anisotropy. *Biotechnology Techniques*, **8**:295-300.
- Amerine M A, Berg H W, Kunkee R E, Ough C S, Singleton V L und Webb A D 1980.** The composition of grapes. *The Technology of Wine Making* 77-139.
- Annemüller G, Manger H J und Lietz P. 2008.** *Die Hefe in der Brauerei*, Berlin: VLB Versuchs- u. Lehranstalt für Brauerei.
- Argüelles J C. 2000.** Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Archives of Microbiology*, **174**:217-224.
- Aslund F, Berndt K D und Holmgren A. 1997.** Redox Potential of Glutaredoxins and Other Thiol-Disulfide Oxireductases of the Thioredoxin Superfamily Determined by Direct Protein-Protein Redox Equilibria. *The Journal of Microbiological Chemistry* **272**, No. 49: 30780-30786.
- Äyräpää T. 1968.** Formation of higher alcohols by various yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*, **74**:169–178.
- Bataillon M, Rico A, Sablayrolles J-M, Salmon J-M und Barre P. 1996.** Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **82**:145-150.
- Baumgartner D, Bill R und Roth I. 2001.** Traubenmostanalyse mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie. *Schweizerische Zeitung für Obst- und Weinbau*, **137**:46–48.
- Baurhuber H und Knull H. 1989.** *Linder Biologie*, Hannover: Schroedel Schulbuchverlag.
- Baus O, Reineke A und Berkelmann-Löhnertz B. 2010.** Fäulnisprävention beim Riesling durch Regalis. *Der Deutsche Weinbau*, **6**:30-32.
- Bell S-J und Henschke P A. 2005.** Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11**:242-295.
- Beltran G, Esteve-Zarzoso B, Rozes N, Mas A und Guillamon J M. 2005.** Influence of the Timing of Nitrogen Additions during Synthetic Grape Must Fermentations on Fermentation Kinetics and Nitrogen Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**:996-1002.
- Beltran G, Rozès N, Mas A und Guillamón J. 2007.** Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**:809-815.
- Bely M, Rinaldi A und Dubourdieu D. 2003.** Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96**:507-512.

- Bely M, Sablayrolles J-M und Barre P. 1990.** Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **70**:246-252.
- Birch R M, Ciani M und Walker G M. 2003.** Magnesium, Calcium and Fermentative Metabolism in Wine Yeasts. *Journal of Wine Research*, **14**:3-15.
- Bisson L F. 1991.** Influence of Nitrogen on Yeast and Fermentation of Grapes. In *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, pp. 78-89.
- Bisson L F und Butzke C E. 2000.** Diagnosis and Rectification of Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, **51**:168-177.
- Boehringer. 1989.** Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik.
- Bohlscheid J, Fellman J, Wang X, Ansen D und Edwards C. 2006.** The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, **102**:390-400.
- Brady D und Duncan J R. 1994.** Binding of Heavy-Metals by the Cell-Walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **16**:633-638.
- Breton A und Surdin-Kerjan Y. 1977.** Sulfate Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Biochemical and Genetic Study. *Journal of Bacteriology*, **132**:224-232.
- Buettner G R. 1993.** The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**, No.2: 535-543.
- Butzke C E und Park S K. 2011.** Impact of Fermentation Rate Changes on Potential Hydrogen Sulfide Concentrations in Wine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**:519-524.
- Butzke C E und Park S K. 2011.** Impact of fermentation rate changes on potential hydrogen sulfide concentrations in wine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**:519-524.
- Caridi A. 2007.** New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. *International Journal of Food Microbiology*, **120**:167-172.
- Casalone E, Colella C M, Daly S, Gallori E, Moriani L und Polsinelli M. 1992.** Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, **22**:435-440.
- Chauncey T R und Westley J. 1983.** The Catalytic Mechanism of Yeast Thiosulfate Reductase. *Journal of Biological Chemistry*, **258**:15037-15045.
- Cheraiti N, Guezenc S und Salmon J-M. 2010.** Very early acetaldehyde production by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains: a new intrinsic character. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **86**:693-700.
- Cherest H, Eichler F und de Robichon-Szulmajster H. 1969.** Genetic and Regulatory Aspects of Methionine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **97**:328-336.
- Cherest H und Surdin-Kerjan Y. 1992.** Genetic Analysis of a New Mutation Conferring Cysteine Auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: Updating of the Sulfur Metabolism Pathway. *Genetics*, **130**:51-58.
- Cherest H, Surdin-Kerjan Y, Antoniewski J und de Robichon-Szulmajster H. 1973.** S-Adenosyl Methionine-mediated Repression of Methionine Biosynthetic Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **114**:928-933.
- Cheyrier V, Owe C und Rigaud J. 1988.** Oxidation of Grape Juice Phenolic Compounds in Model Solutions. *Journal of Food Science*, **53**:1729-1732.
- Cheyrier V, Souquet J M und Moutounet M. 1989.** Glutathione Content and Glutathione to Hydroxycinnamic Acid Ratio in *Vitis vinifera* Grapes and Musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, **40**:320-324.
- Choné X, Lavigne-Cruege V, Tominaga T, Van Leeuwen C, Castagnède C, Saucier C und Dubourdiou D. 2006.** Effect of vine nitrogen status on grape aromatic

- potential: Flavour precursors (S-cysteine conjugates), Glutathion and Phenolic content in *vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grape juice *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, **40**:1-6.
- Ciesarova Z, Smogrovikova D und Domeny Z. 1996.** Enhancement of Yeast Ethanol Tolerance by Calcium and Magnesium. *Folia Microbiologica*, **41**:485-488.
- Conway E J und Beary M E. 1957.** Active Transport of Magnesium Across the Yeast Cell Membrane. *Biochemical Journal*, **69**:275-280.
- Cooper. 1982.** in Bisson, L.F. (1991): Influence of Nitrogen on Yeast and Fermentation. *International Symposium on Nitrogen in Grapes an Wine*.
- Cottureau P. 2009.** Natural production of sulphite (SO₂) by yeast during alcoholic fermentation. *ORWINE: Code of good organic viticulture and wine-making*, pp. 203-205.
- Cowey G. 2008.** Excessive copper fining of wines sealed under screwcaps – identifying and treating reductive winemaking characters. *Australian & New Zealand Grapegrower and Winemaker*, **545**:49-56.
- Darriet P, Bouchilloux P, Poupot C, Bugaret Y, Clerjeau M, Sauris P, Medina B und Dubourdiou D. 2001.** Effects of copper fungicide spraying on volatile thiols of the varietal aroma od Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *Vitis*, **40**:93-99.
- Delfini C und Costa A. 1993.** Effects of the Grape Must Lees and Insoluble Materials on the Alcoholic Fermentation Rate and the Production of Acetic Acid, Pyruvic Acid, and Acetaldehyde. *American Journal of Enology and Viticulture*, **44**:86-92.
- des Gachons C P, Leeuwen C V, Tominaga T, Soyer J-P, Gaudillère J-P und Dubourdiou D. 2005.** Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc in field conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**:73-85.
- Deytieux C, Mussard L, Biron M-J und Salmon J-M. 2005.** Fine measurement of ergosterol requirements for growth of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**:266-271.
- Dietrich H, Will F und Zacharias J. 2008.** Renaissance des Weißen oder Grauen Bruchs. *Der Deutsche Weinbau*, **22**:38.
- Dittrich G m. 2005.** Handbuch der Lebensmitteltechnologie: Mikrobiologie des Weines. **3. Auflage**:85 ff.
- Dittrich H, Sponholz W R und Göbel H G. 1975.** Vergleichende Untersuchungen von Mosten und Weinen aus gesunden und *Botrytis*-infizierten Traubenbeeren *Vitis*, **13**:336-347.
- Dittrich H H. 1983.** Der Einfluß von Thiamin und Ammoniumsalzen auf die Wein-Qualität. *Der Deutsche Weinbau*, **38**:1366-1372.
- Dittrich H H. 1987.** *Mikrobiologie des Weines*, Stuttgart: Ulmer Verlag.
- Dittrich H H und Großmann M. 2005.** *Mikrobiologie des Weines*, Stuttgart: Ulmer Verlag.
- du Toit W J, Lisjak K, Stander M und Prevoo D. 2007.** Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juice and wines made with different levels of oxygen. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **55**:2765-2769.
- Dubernet M und Grasset F. 1998.** Méthode automatisée de dosage colométrique du diode de soufre total dans les vins. *Feuille vert OIV*, **1068**.
- Dubourdiou D. 2002.** Einfluss des Glutathions auf die fehlerhafte aromatische Evolution der trockenen Weissweine. *13 ème Symposium International d'Oenologie*.
- Dukes B C und Butzke C E. 1998.** Rapid Determination of Primary Amino Acids in Must Using an OPA/NAC Spectrophotometric Assay. *American Journal of Enology and Viticulture*, **49**:125-133.

- Duteurtre B, Bourgeois C und Chollot B. 1971.** Study of the assimilation of proline by brewing. *The Journal of the Institute of Brewing*, **77**.
- Edwards C G und Bohlscheid J C. 2007.** Impact of pantothenic acid addition on H₂S production by *Saccharomyces* under fermentative conditions *Enzyme and Microbial Technology*, **41**:1-4.
- Eide D J. 2003.** Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Nutrition*, **133**:1532-1535.
- Elskens M T, Jaspers C J und Penninckx M J. 1991.** Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Genetical Microbiology*, **137**:637-644.
- Emmett R. 2003.** Strategic use of sulphur in integrated pest and disease management (IMP) programs for grapevines *Final Report CRVC 2003 Project Number: DAV 98/1*.
- Entian K D und Barnett J A. 1992.** Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Biochemical Sciences*, **17**:506-510.
- Eschenbruch R und Bonish P. 1976.** The influence of pH on sulphite formation by yeasts. *Archives of Microbiology*, **107**:229-231.
- Ferreras J M, Iglesias R und Gibrés T. 1989.** Effect of the chronic ethanol action on the activity of the general amino-acid permease from *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **979**:375-377.
- Fischer S und Rauhut D. 2009.** Methode zur Analyse von Aromastoffen - Gärungsnebenprodukte mittels Kaltron. *aktualisiert am 17.6.2009, unveröffentlicht*.
- Fischer U. 1991.** Wenn Statistik spannend wird. *Weinwirtschaft*:21-25.
- Fornairon-Bonnefond C, Demaretz V, Eacute, Ronique, Rosenfeld E und Salmon J-M. 2002.** Oxygen Addition and Sterol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during Enological Fermentation. *The Society for Biotechnology, Japan*, **93**:176-182.
- Foyer C.H. und Noctor G. 2005.** Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling : A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiologic Responses. *The Plant Cell*. **17**:1866-1875.
- Francis I L und Newton J L. 2005.** Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11**:114-126.
- Fugelsang K C und Edwards C G. 2007.** Managing Microbial Growth. In *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures*, pp. 65-81.
- Funk E. 2001.** Der Böckser, ein abstoßender Weinfehler. Ursache, Vermeidung und Beseitigung. *Rebe und Wein*, **54**:10-12.
- Garrett J M. 2008.** Amino acid transport through the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1 permease is controlled by the Ras/cAMP pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **40**:496-502.
- Geneix C, Lafon-Lafourcade S und Ribereau-Gayon P. 1983.** Effets des acides gras sur la viabilité des populations de *Saccharomyces cerevisiae*. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, **296**.
- Giovanelli G, Peri C und Parravicini E. 1996.** Kinetics of Grape Juice Fermentation Under Aerobic and Anaerobic Conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47**:429-434.
- Giudici P, Romano P und Zambonelli C. 1990.** A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, **36**:61-64.
- Giudici P, Zambonelli C und Kunkee R E. 1993.** Increased Production of n-Propanol in Wine by Yeast Strains Having an Impaired Ability to Form Hydrogen Sulfide. *American Journal of Enology and Viticulture*, **44**:17-21.

- Görtges S. 1976.** Erfahrungen bei der Anwendung von Trocken-Reinzuchthefen zur Vergärung von Traubenmost. *Sonderdruck aus: Der Deutsche Weinbau*, **26**.
- Görtges S. 2009.** Böckserbeseitigung mit Kupfercitrat. *Der Deutsche Weinbau*, **20**:24-25.
- Grenson M. 1992.** Amino acid transporters in yeast: structure, function and regulation. In *Molecular Aspects of Transport Proteins* pp. 219–245.
- Groat M und Ough C S. 1978.** Effects of Insoluble Solids Added to Clarified Musts on Fermentation Rate, Wine Composition, and Wine Quality. *American Journal of Enology and Viticulture*, **29**:112-119.
- Gyllang H, Winge M und Korch C. 1989.** Regulation of SO₂ formation during fermentation. In *European Brewery Convention Congress*, pp. 347-354.
- Hagen K M, Keller M und Edwards C G. 2008.** Survey of Biotin, Pantothenic Acid, and Assimilable Nitrogen in Winegrapes from the Pacific Northwest. *American Journal of Enology and Viticulture*, **59**:432-436.
- Hall A P, Brinner L, Amerine M A und Morgan A F. 1956.** The B Vitamin Content of Grapes, Musts and Wines. *Journal of Food Science*, **21**:362-371.
- Hallinan C P, Saul D J und Jiranek V. 1999.** Differential utilisation of sulfur compounds for H₂S liberation by nitrogen-starved wine yeasts. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **5**:82-90.
- Hammond J R M. 1993.** Interrelationships between the main metabolic pathways contributing towards flavour-active compounds in beer brewing yeast. *The Yeasts*, pp. 5–67.
- Hansen J und Kielland-Brandt M C. 1996.** Inactivation of MET2 in brewer's yeast increases the level of sulfite in beer. *Journal of Biotechnology*, **50**:75-87.
- Hébert A, Casaregola S und Beckerich J-M. 2011.** Biodiversity in sulfur metabolism in hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research*, **11**:366-378.
- Henschke P A und Jiranek V. 1991.** Hydrogen Sulfide Formation During Fermentation: Effects of Nitrogen Composition in Model Grape Must. In *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, pp. 172-184.
- Henschke P A und Jiranek V. 1993.** *Yeast- metabolism of nitrogen compounds*, Chur: Harwood Academic Publishers.
- Hess D C, Lu W, Rabinowitz J D und Botstein D. 2006.** Ammonium Toxicity und Potassium Limitation in Yeast. *PLoS Biol*, **4**:e351.
- Hill G K, Ludwig L und Spies S. 2010.** Wie lange wirkt Netzschwefel ? *Der Deutsche Weinbau*, **9**:20-24.
- Hofmann M und Schultz H R. 2011.** Simulating the effects of climate change on vineyard water budget using different regionalised high resolution climate models. In *Proceedings of the 17th International Symposium of the group of International Experts of viticultural Systems for CoOperation (GiESCO)* pp. 279-282.
- Horák J, Ríhová L und Kotyk A. 1981.** Energization of sulfate transport in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **649**:436-440.
- Huber-Wälchli V und Wiemken A. 1979.** Differential extraction of soluble pools from the cytosol and the vacuoles of yeast (*Candida utilis*) using DEAE-dextran. *Archives of Microbiology*, **120**:141-149.
- Huehn T, Munro H, Hermes M, Witte L, Wiederkehr M und Grossmann M 1998.** Variabilität von Hefestämmen: Einfluss von Temperatur, Nährstoffversorgung und Prozesstechnik auf die Bildung von Gärungsaromen. *Intervitis Innovationen in der Kellerwirtschaft, Mikroorganismen und Weinbereitung*, pp. 163-173.
- Jackowetz J N, Dierschke S und Mira de Orduña R. 2011.** Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, **44**:310-316.

- Jiranek V, Langridge P und Henschke P A. 1995.** Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and environmental microbiology*, **61**:461-467.
- Jones G, White M, Cooper O und Storchmann K. 2005.** Climate Change and Global Wine Quality. *Climatic Change*, **73**:319-343.
- Jones G V und Davis R E. 2000.** Climate Influences on Grapevine Phenology, Grape Composition, and Wine Production and Quality for Bordeaux, France. *Am. J. Enol. Vitic.*, **51**:249-261.
- Jones R P und Greenfield P F. 1984.** A review of yeast ionic nutrition: 1. Growth and Fermentative Requirements. *Process Biochemistry*, **4**:48-59.
- Jordan B und Slaughter J C. 1986.** Sulphate availability and cysteine desulphydration activity as influences on production of hydrogen sulphide by *Saccharomyces cerevisiae* during growth in a defined glucose-salts medium. *Transactions of the British Mycological Society*, **87**:525-531.
- Jörger V, Schrieck P, Litteck T und Doye E. 2010.** Einfluss auf *Botrytis*- und Essigbefall. *Das Deutsche Weinmagazin*, **April**:16-21.
- Kaino T und Takagi H. 2009.** Proline as a Stress Protectant in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Effects of Trehalose and PRO1 Gene Expression on Stress Tolerance. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **73**:2131-2135.
- Karlson P. 1989.** *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag,.
- Kikuchi T. 1965.** Production of hydrogen sulfide from sulfite by a copper-adapted yeast *Plant and Cell Physiology*, **6**:37-46.
- Kockova-Kratochvilova A. 1990.** *Yeasts and Yeast-Like Organisms*, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Kocková-Kratochvilová A. 1990.** *Yeasts and yeast-like Organisms*, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft
- Köhler H J, Burkert J und Geßner M. 2011.** Böckser - vermeiden oder beseitigen ? *Rebe & Wein*, **10**:19-23.
- Koji U. 2000.** Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, **28**:1685-1696.
- Korch C, Mountain H A, Gyllang H, Winge M und Brehmer P 1991.** A mechanism for sulfite production in beer and how to increase sulfite levels by recombinant genetics. *European Brewery Convention Congress*, pp. 201-208.
- Kreuz R. 1995.** Die Herstellung von Trockenreinzuchtheffen für die Weinbereitung. Tagungsband *100 Jahre Hefereinzucht in Geisenheim*, pp. 70-74.
- Kumar G R, Ramakrishnan V und Bisson L F. 2010.** Survey of Hydrogen Sulfide Production in Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture*, **61**:365-371.
- Kunkee R E. 1991.** Relationship Between Nitrogen Content of Must and Sluggish Fermentation. *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, pp. 148-155.
- Kunkee R E und Ough C S. 1966.** Multiplication and Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* Under Carbon Dioxide Pressure in Wine. *Applied Microbiology*, **14**:643-648.
- Lafon-Lafourcade S, Larue F und Ribereau-Gayon P. 1979.** Evidence for the existence of "survival factors" as an explanation for some peculiarities of yeast growth, especially in grape must of high sugar concentration. *Applied and environmental microbiology*, **38**:1069-1073.
- Lambrechts M G und Pretorius I S. 2000.** Yeast and its importance to wine aroma - a Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **21**:97-129.

- Leao. 1984.** In: Bisson, L.F. (1991): Influence of Nitrogen on Yeast and Fermentation, International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine.
- Lemperle E und Lay H. 1989.** Zusammensetzung und Beurteilung der Weine. In *Chemie des Weines*, pp. 568–571.
- Limmer A. 2005.** The Chemistry of Post-bottling Sulfides in Wine. *Chemistry in New Zealand*:2-5.
- Linderholm A L, Findleton C L, Kumar G, Hong Y und Bisson L F. 2008.** Identification of Genes Affecting Hydrogen Sulfide Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, **74**:1418-1427.
- Ling L, Seifert R M, Guadagni D G und Ling L. 1969.** Characterization of some volatile constituents of bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **17**:1322-1327.
- Linsenmeier A. 2007.** Einfluss der Stickstoffversorgung der Rebe (*Vitis vinifera* L.cv. Riesling) auf den untypischen Alterungston. *Geisenheimer Berichte*, **60**.
- Linsenmeier A und Pflieghinger M. 2009.** Wirkungskette Stress: Das ungelöste UTA-Rätsel. *Der Deutsche Weinbau*, **24**:18-21.
- Linsenmeier A, Rauhut D und Sponholz W R. 2010.** Ageing and flavour deterioration in wine. *Managing wine quality*, pp. 459 - 494
- Linsenmeier A W, Loos U und Löhnertz O. 2008.** Must Composition and Nitrogen Uptake in a Long-term Trial as Affected by Timing of Nitrogen Fertilization in a Cool-Climate Riesling Vineyard. *American Journal of Enology and Viticulture*, **59**:255-264.
- Lodolo E J, Kock J L F, Axcell B C und Brooks M. 2008.** The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, **8**:1018-1036.
- Löhnertz O und Prior B. 1995.** Relationship between soil nitrogen supply and the forming of N-containing components in berries. In *Oenologie* 95, pp. 77-80.
- Lund C M, Thompson M K, Benkwitz F, Wohler M W, Triggs C M, Gardner R, Heymann H und Nicolau L. 2009.** New Zealand Sauvignon blanc Distinct Flavor Characteristics: Sensory, Chemical, and Consumer Aspects. *American Journal of Enology and Viticulture*, **60**:1-12.
- Lynen F, Engeser H, Foerster E-C, Fox J L, Hess S, Kresze G-B, Schmitt T, Schreckenbach T, Siess E, Wieland F und Winnewisser W. 1980.** On the Structure of Fatty Acid Synthetase of Yeast. *European Journal of Biochemistry*, **112**:431-442.
- Maeva S, Rémy S, Jean-Michel S und Eric D. 2008.** Nitrogen catabolite repression modulates the production of aromatic thiols characteristic of Sauvignon blanc at the level of precursor transport. *FEMS Yeast Research*, **8**:771-780.
- Mason A B und Dufour J-P. 2000.** Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, **16**:1287-1298.
- Materne R. 2008.** Einfluss ausgewählter önologischer Verfahren zur Reduzierung des Bedarfs an schwefeliger Säure bei Weinen aus ökologischer Erzeugung. Diplomarbeit an der Fachhochschule Wiesbaden, Fachbereich Geisenheim.
- Matthews T M und Webb C 1991.** Culture systems. *Biotechnology Handbooks* 4, pp. 249–282.
- Maw G. 1963.** The uptake of inorganic sulphate by a brewer's yeast. *Folia Microbiologica*, **8**:325-332.
- Maw G A. 1963.** Sulphur utilization by yeast. *Pure and Applied Chemistry*, **7**:655-668.
- Mehdi K und Penninckx M J. 1997.** An important role for glutathione and gamma-glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **143**:1885-1889.

- Mendes-Ferreira A, Mendes-Faia A und Leão C. 2004.** Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology*, **97**:540-545.
- Messenguy F. 1987.** Multiplicity of regulatory mechanisms controlling amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Sciences*, **4**:150-153.
- Murat M-L, Masneuf I, Darriet P, Lavigne V, Tominaga T und Dubourdieu D. 2001.** Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains on the Liberation of Volatile Thiols in Sauvignon blanc Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **52**:136-139.
- Muskat S, Loehnertz O und Pfliehinger M 2011.** Untersuchungen zum Einsatz von Blattapplikationen mit Harnstoff auf die Qualität und Inhaltsstoffbildung bei der Sorte Riesling. In *17. Kolloquium Internationaler Arbeitskreis für Bodenbewirtschaftung und Qualitätsmanagement im Weinbau*.
- Nicola R D, Hall N, Bollag T, Thermogiannis G und Walker G M. 2003.** Zinc accumulation and utilization by wine yeasts. *International Journal of Wine Research*, **1**:85-94.
- Nordström K. 1963.** Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. IV. Metabolism of acetyl-CoA. *Journal of the Institute of Brewing*, **69**:142-153.
- Nowak A, Kusewicz D, Kalinowska H, Turkiewicz M and Patelski P. 2004.** Production of H₂S and properties of sulfite reductase from selected strains of wine-producing yeasts. *European Food Research and Technology*, **219**:84-89.
- O'Brien P J, Siraki A G und Shangari N. 2005.** Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:609-662.
- Ohtake Y und Yabuuchi S 1991.** Molecular Cloning of the Glutamylcysteine Synthetase Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **7**:953-961
- Ortiz-Julien A, Theodore D, Silvano A, Dumont A und Specht G. 2011.** Constituants des moûts et fermentation alcoolique. *Revue des Oenologues*, **141**:45-49.
- Ough C F, Davenport M und Joseph K. 1989.** Effects of certain vitamins on growth and fermentation rate of several commercial active dry wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, **40**:208-213.
- Ough C S. 1992.** Nonorganic compounds. In *Winemaking Basics*.
- Ough C S, Crowell E A und Mooney L A. 1988.** Formation of Ethyl Carbamate Precursors During Grape Juice (Chardonnay) Fermentation. I. Addition of Amino Acids, Urea, and Ammonia: Effects of Fortification on Intracellular and Extracellular Precursors. *American Journal of Enology and Viticulture*, **39**:243-249.
- Ozcan S und Johnston M. 1999.** Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**:554-569.
- Paltauf F, Kohlwein S W und Henry S A 1992.** Regulation and compartmentation of lipid synthesis in yeast. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Gen expression.*, pp. 415-500.
- Patel P, Herbst-Johnstone M, Lee S A, Gardner R C, Weaver R, Nicolau L und Kilmartin P A. 2010.** Influence of Juice Pressing Conditions on Polyphenols, Antioxidants, and Varietal Aroma of Sauvignon blanc Microferments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**:7280-7288.
- Patz C-D e a. 1999.** Wine Analysis with FTIR spectrometry. *Viticulture and Enology Science*, **54**:80-87.
- Peyrot des Gachons C, Tominaga T und Dubourdieu D. 2000.** Measuring the Aromatic Potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc Grapes by Assaying

- S-Cysteine Conjugates, Precursors of the Volatile Thiols Responsible for Their Varietal Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**:3387-3391.
- Pierce J S. 1987.** The role of nitrogen in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, **93**:378–381.
- Pilkington B J und Rose A H. 1988.** Reactions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* to Sulphite. *Journal of General Microbiology*, **134**:2823-2830.
- Plaschke A 2010.** Bestimmung des H₂S- und SO₂-Bildungsvermögens durch Hefen der Gattung *Saccharomyces* während der alkoholischen Gärung. Diplomarbeit an der Hochschule RheinMain Standort Geisenheim.
- Prior B. 1997.** Einfluß der Stickstoffdüngung auf die löslichen Aminosäuren in den Organen von *Vitis vinifera* L. (cf. Riesling) und auf die Qualität des Mostes und des Weines. *Geisenheimer Berichte*. Gesellschaft zur Förderung der Forschungsanstalt Geisenheim.
- Rankine B C. 1963.** Nature, origin and prevention of hydrogen sulphide aroma in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **14**:79-91.
- Rankine B C und Pocock K F. 1969.** Influence of yeast strain on binding of sulphur dioxide in wines, and on its formation during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **20**:104-109.
- Rapp A. 1992.** Aromastoffe des Weines. *Chemie in unserer Zeit*, **26**:273–284.
- Rapp A. 1998.** Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Die Nahrung*, **42**:351-363.
- Rapp A, Güntert M und Ullemeyer H. 1985.** Über Veränderungen der Aromastoffe während der Flaschenlagerung von Weißweinen der Rebsorte Riesling. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung*, **180**:109-116.
- Rapp A und Mandery H. 1986.** Wine aroma. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **42**:873-884.
- Rapp A, Yavas I und Hastrich H. 1994.** Einfache und schnelle Anreicherung („Kaltronmethode“) von Aromastoffen des Weines und deren quantitative Bestimmung mittels Kapillargaschromatographie. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **90**:171-174.
- Ratledge C und Evans C T 1989.** Lipids and their metabolism. *The yeasts*, pp. 367-455.
- Rauhut D. 1996.** Qualitätsmindernde schwefelhaltige Stoffe im Wein - Vorkommen, Bildung, Beseitigung. *Geisenheimer Berichte*. Gesellschaft zur Förderung der Forschungsanstalt Geisenheim.
- Rauhut D. 2006.** Zusatz von Hefenährstoffen zu Traubenmosten. In *Schlußbericht des Forschungsprojektes 99HS050*; <http://download.ble.de/99HS050.pdf>, pp. 1-95.
- Rauhut D. 2009.** Usage and Formation of Sulphur Compounds. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, pp. 181-209.
- Rauhut D, Beisert B, Berres M und Kürbel H 2005.** Pulse flame phytometric detection: an innovative technique to analyse volatile sulphur compounds in wine and other beverages. In *State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology*, pp. 363-367.
- Rauhut D, Beisert B, Muskat S, Werner M, Gawron-Scibek M, Löhnertz O und Großmann M. 2005.** Zusatz von Hefenährstoffen zu Traubenmosten (BMVEL-Projekt 99HS050). *Jahresbericht 2005 der Forschungsanstalt Geisenheim*.
- Rauhut D, Beisert B, Muskat S, Werner M, Lambrich C, Gawron-Scibek M, Löhnertz O und Großmann M. 2004.** Zusatz von Hefenährstoffen zu Traubenmosten (BMVEL-Projekt 99HS050). *Jahresbericht 2004 der Forschungsanstalt Geisenheim*.
- Rauhut D und Kürbel H. 1994.** Die Entstehung von H₂S aus Netzschwefel-Rückständen während der Gärung und dessen Einfluß auf die Bildung von

- böckserverursachenden schwefelhaltigen Metaboliten in Wein. *Viticultural and Enological Sciences*, **49**:27-36.
- Rauhut D, Kürbel H, Dittrich H, Prior B and Großmann M 1995.** Einfluß von Hefestämmen und deren Ernährung auf die Böckserbildung. Tagungsband *100 Jahre Hefereinzucht in Geisenheim*, pp. 38-55.
- Rauhut D, Kürbel H, Dittrich H H und Grossmann M. 1996.** Properties and differences of commercial yeast strains with respect to their formation of sulfur compounds. *Viticultural and Enological Sciences*, **51**:187-192.
- Ravaglia S und Delfini C. 1993.** Production of medium chain fatty acids and their ethyl esters by yeast strains isolated from musts and wines. *Italian Journal of Food Science*, **5**:21-36.
- Reazin G, Scales H und Andreasen A. 1973.** Production of higher alcohols from threonine and isoleucine in alcoholic fermentations of different types of grain mash. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **21**:50-54.
- Rees E M R und Stewart G G. 1997.** The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. *The Journal of the The Institute of Brewing & Distilling*, **103**:287-291.
- Reifenberger E, Boles E und Ciriacy M. 1997.** Kinetic Characterization of Individual Hexose Transporters of *Saccharomyces Cerevisiae* and their Relation to the Triggering Mechanisms of Glucose Repression. *European Journal of Biochemistry*, **245**:324-333.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B und Lonvaud A 2006.** The Microbiology of Wine and Vinifications. In *Handbook of Enology*, pp. 294.
- Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A und Dubourdieu D. 1999.** *Handbook of Enology*, West Sussex: John Wiley. & Sons Ltd.
- Rojas V, Gil J V, Pinaga F und Manzanares P. 2003.** Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, **88**:181–188.
- Romano P und Suzzi G. 1993.** Sulfur Dioxide and Wine Microorganisms. in: *Fleet, G.H. (ed.) Wine Microbiology and Biotechnology*, Harward Publishers:373-393.
- Römpf. 1999.** Lexikon Chemie, CD-Rom Version 2.0.
- Rosenfeld E, Beauvoit B, Blondin B und Salmon J-M. 2003.** Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics. *Applied Environment and Microbiology*, **69**:113-121.
- Sablayrolles J-M, Dubois C, Manginot C, Roustan J-L und Barre P. 1996.** Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **82**:377-381.
- Saito K. 2003.** Molecular and Metabolic Regulation of Sulfur Assimilation: Initial Approach by Post-genomics Strategy. In *Sulfur transport and Assimilation in Plants*, pp. 11-20.
- Salmon J M. 1989.** Effect of Sugar Transport Inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on Sluggish and Stuck Enological Fermentations. *Applied Environment and Microbiology*, **55**:953-958.
- Salmon J M. 1996.** Sluggish and stuck fermentations: some actual trends on their physiological basis. *Viticulture and Enology Science*, **51**:137-140.
- Salmon J M, Vincent O, Mauricio J C, Bely M und Barre P. 1993.** Sugar Transport Inhibition and Apparent Loss of Activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a Major Limiting Factor of Enological Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, **44**:56-64.
- Sandermann H. 1992.** Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences*. **17**. 82-84.

- Schertel M E, Boehne J W und Libby D A. 1965.** Folic Acid Derivatives in Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, **240**:3154-3158.
- Schildberger B, Nittaus A und Eder R. 2011.** Bewertung von Maßnahmen zur Förderung von Edelfäule anhand der Zusammensetzung der Moste. *Mitteilungen Klosterneuburg*, **61**:142-150.
- Schlegel H G. 1992.** *Allgemeine Mikrobiologie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Schmidt S A, Tran T, Chambers P J, Herderich M J und Pretorius I S. 2006.** Developing indicators of wine yeast performance: an overview of the impact of ethanol stress. *Wine Industry Journal*, **21**:24-30.
- Schulthess D und Ettlinger L. 1978.** Influence of the concentration of branched chain amino acids on the formation of fusel alcohols. *Journal of the Institute of Brewing*, **84**:240-243.
- Schultz H R, Hofmann M und Jones G. 2009.** Weinbau im Klimawandel: Regionen im Umbruch. *Klimastatusbericht 2009*:12-20.
- Schutz M und Kunkee R. 1977.** Formation of hydrogen sulfide from elemental sulfur during fermentation by wine yeast. *American Journal of Enology and Viticulture*, **28**:133-144.
- Sekine T, Kawaguchi A, Hamano Y und Takagi H. 2007.** Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* gamma-glutamyl kinase enhances proline accumulation and freezing tolerance. *Applied and environmental microbiology*, **73**:4011-4019.
- Sommer S. 2011.** Mögliche Ursachen von Gärstörungen. *Das Deutsche Weinmagazin*, **8**:30-33.
- Sonni F, Clark A C, Prenzler P D, Riponi C und Scollary G R. 2011.** Antioxidant Action of Glutathion and the Ascorbic Acid/Glutathione Pair in a Model White wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **59**: 3940-3949
- Spayd S E, Nagel C W und Edwards C G. 1995.** Yeast Growth in Riesling Juice as Affected by Vineyard Nitrogen Fertilization. *American Journal of Enology and Viticulture*, **46**:49-55.
- Spiropoulos A, Tanaka J, Flerianos I und Bisson L F. 2000.** Characterization of Hydrogen Sulfide Formation in Commercial and Natural Wine Isolates of *Saccharomyces*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **51**:233-248.
- Sponholz W-R, Dittrich H H, Haas F und Wünsch B. 1981.** Die Bildung von flüchtigen Fettsäuren durch *Saccharomyces*-Hefen während der Vergärung von Traubenmost. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung*, **173**:297-300.
- Sponholz W R and Dittrich H. 1977.** Enzymatische Bestimmung von Bernsteinsäure in Mosten und Weinen. *Wein Wissenschaft*, **32**:38-47.
- Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers P J und Stanley G A. 2010.** The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, **109**:13-24.
- Stratford M und Rose A H. 1985.** Hydrogen Sulphide Production from Sulphite by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, **131**:1417-1424.
- Stratford M und Rose H. 1986.** Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, **132**:1-6.
- Sturm J. 2009.** Wertebereiche qualitätsrelevanter Parameter in Mosten der zehn in Deutschland am häufigsten angebauten Rebsorten (*Vitis vinifera* L.). *Mitteilungen Klosterneuburg*, **59**:152-158.
- Suzzi G, Romano P und Zambonelli C. 1985.** *Saccharomyces* Strain Selection in Minimizing SO₂ Requirement During Vinification. *American Journal of Enology and Viticulture*, **36**:199-202.

- Swiegers J H, Bartowsky E J, Henschke P A und Pretorius I S. 2005.** Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11**:139-173.
- Swiegers J H, Kievita R L, Sieberta T, Latteya K A, Bramleya B R, Francisa L, Kinga E S und Pretorius I S. 2009.** The influence of yeast on the aroma of Sauvignon blanc wine *Food Microbiology*, **26**:204-211.
- Takagi H. 2008.** Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **81**:211-223.
- Tanner H und Brunner H R. 1979.** *Getränkeanalytik - Untersuchungsmethoden für die Labor-und Betriebspraxis*, Schwäbisch Hall: Verlag Heller Chemie-und Verwaltungsgesellschaft mbH.
- ter Schure E G, van Riel N A W und Verrips C T. 2000.** The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**:67-83.
- Thomas C S, Boulton R B, Silacci M W und Gubler W D. 1993.** The Effect of Elemental Sulfur, Yeast Strain, and Fermentation Medium on Hydrogen Sulfide Production During Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, **44**:211-216.
- Thomas D, Barbey R, Henry D und Surdin-Kerjan Y. 1992.** Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation. *Journal of Genetical Microbiology*, **138**:2021-2028.
- Thomas D, Barbey R, Henry D und Surdin-Kerjan Y. 1992.** Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation. *Journal of General Microbiology*, **138**:2021-2028.
- Thomas D, Kuras L, Barbey R, Cherest H, Blaiseau P und Surdin-Kerjan Y. 1995.** Met30p, a yeast transcriptional inhibitor that responds to S Adenosylmethionine, is an essential protein with WD40 repeats. *Molecular and Cellular Biology*, **15**:6526-6534.
- Thomas D und Surdin-Kerjan Y. 1997.** Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61**:503-532.
- Tominaga T, Anton F, Robert H und Denis D. 1998.** Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*, **13**:159-162.
- Tominaga T, Baltenweck-Guyot R, Gachons C P D und Dubourdiou D. 2000.** Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, **51**:178-181.
- Torija M J, Rozes N, Poblet M, Guillamon J M und Mas A. 2003.** Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, **80**:47-53.
- Troost G. 1988.** *Technologie des Weines*, Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.
- Ugliano M, Fedrizzi B, Siebert T, Travis B, Magno F, Versini G und Henschke P A. 2009.** Effect of Nitrogen Supplementation and *Saccharomyces* Species on Hydrogen Sulfide and Other Volatile Sulfur Compounds in Shiraz Fermentation and Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**:4948-4955.
- Ugliano M, Henschke P A, Herderich M J und Pretorius I S. 2007.** Nitrogen management is critical for wine flavour and style. *Wine Industry Journal*, **22**:24-30.
- Ugliano M, Kolouchova R und Henschke P. 2010.** Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast

- available nitrogen. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **38**:423-429.
- Ugliano M, Kwiatkowski M J, Travis B, Francis I L, Waters E J, Herderich M J und Pretorius I S. 2009.** Post-bottling management of oxygen to reduce off-flavour formation and optimise wine style. *Wine Industry Journal*, **2**:24-28.
- Valero E, Millán C, Ortega J M und Mauricio J C. 2003.** Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**:830-835.
- Van Uden N. 1989.** *Effect of alcohols on the temperature relations of growth and deaths in yeasts*: Boca Raton CRC Press Inc.
- Viegas C A, Rosa M F, Correia I S und Novais J M. 1989.** Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanol fermentation. *Applied Environment and Microbiology*, **55**:21-28.
- Vollbrecht D und Radler F. 1973.** Die Bildung höherer Alkohole bei Aminosäuremangelmутanten von *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, **94**:351-358.
- Walker G M. 1994.** The role of magnesium in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, **14**:311-354.
- Walker G M. 1998.** Magnesium as a stress-protectant for industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **56**:109-113.
- Walker G M. 1998.** Yeast Nutrition. In *Yeast Physiology and Biotechnology*, pp. 51-100.
- Walker G M und Maynard A I. 1996.** Magnesium-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **18**:455-459.
- Waller J R. 1970.** Amino acid-induced inhibition and stimulation of *Saccharomyces carlsbergensis*. 1. Variations in the response to pantothenic acid induced by casein hydrolysate. *Applied Microbiology*, **20**:857-860.
- Wang X D, Bohlscheid J C und Edwards C G. 2003.** Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology*, **94**:349-359.
- Watson T G. 1976.** Amino-acid Pool Composition of *Saccharomyces cerevisiae* as a Function of Growth Rate and Amino-acid Nitrogen Source. *J Gen Microbiol*, **96**:263-268.
- Watson T G. 1976.** Amino-acid Pool Composition of *Saccharomyces cerevisiae* as a Function of Growth Rate and Amino-acid Nitrogen Source. *Journal of General Microbiology*, **96**:263-268.
- Weeks C. 1969.** Production of sulfur dioxide binding compounds and of sulfur dioxide by two *Saccharomyces* yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, **20**:32-39.
- Weiss J. 1985.** *Handbuch der Ionenchromatographie*: Wiley-VCH
- Wenzel K und Dittrich H H. 1978.** Zur Beeinflussung der Schwefelwasserstoff-Bildung der Hefe durch Trub, Stickstoffgehalt, molekularen Schwefel und Kupfer bei der Vergärung von Traubenmost *Wein-Wissenschaft*, **33**:200-213.
- Wenzel K, Dittrich H H, Seyffardt P und Bohnert J. 1980.** Schwefelrückstände auf Trauben und im Most und ihr Einfluß auf die H₂S-Bildung. *Jahrbuch 1980*:414-420.
- Werner M. 2005.** Analytische und organoleptische Bewertung eines Rieslingweines nach Zugabe unterschiedlicher Hefenährstoffe zur alkoholischen Gärung. *Masterarbeit Justus-Liebig-Universität Gießen*.
- Werner M. 2010.** Einfluss verschiedener Hefenährstoffe wie z.B. anorganischer und organischer Stickstoff auf die Population der Hefezellen und die Bildung

- ausgewählter Aromakomponenten bei Cool Climate Riesling Weinen vergoren mit *Saccharomyces cerevisiae*. *Internationaler IVIF-Kongress 2010*.
- Werner M, Lebrun R und Fröhlich J. 2011.** La levure oenologique "bio" fiable et durable. *Revue des Oenologues*, **140**:33-34.
- Werner M, Materne R, Beisert M, Fischer S, Kauer R und Rauhut D. 2008.** Impact of different application rates of wettable sulphur and selected oenological practices on SO₂-levels and aroma active compounds in organic Riesling wine. *16th IFOAM Organic World Congress*.
- Werner M und Rauhut D. 2009.** Natural production of sulphite (SO₂) by yeast during alcoholic fermentation. In: *ORWINE: Code of good organic viticulture and wine-making*, pp. 203-205.
- Wiame J M, Grenson M und Arst H N. 1985.** Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Advances in microbial physiology*, **26**:1-88.
- Wiemken A. 1990.** Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek*, **58**:209-217.
- Wiemken A und Dürr M. 1974.** Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, **101**:45-57.
- Wightwick A M, Mollah M R, Partington D L und Allinson G. 2008.** Copper fungicide residues in Australian vineyard soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**:2457-2464.
- Winter G, Henschke P A, Higgins V J, Ugliano M und Curtin C D. 2011.** Effects of rehydration nutrients on H₂S metabolism and formation of volatile sulfur compounds by the wine yeast VL3. *AMB Express*, **1**:1-11.
- Würdig G und Schlotter H A. 1970.** SO₂-Bildung durch Sulfatreduktion während der Gärung. *Weinwissenschaft*, **25**:283-297.
- Würdig G und Woller R. 1989.** *Chemie des Weines*, Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.
- Yamagata S. 1980.** Occurrence of low molecular weight O-acetylserine sulfhydrylase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biochemistry*, **88**:1419-1427.
- Zenk M H. 1996.** Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene*, **179**:21-30.
- Zoecklein B W, Fugelsang K C, Gump B H und Nury F S. 1995.** *Alcohol and Extract: The Chapman and Hall Enology Library*.

10 ANHANG

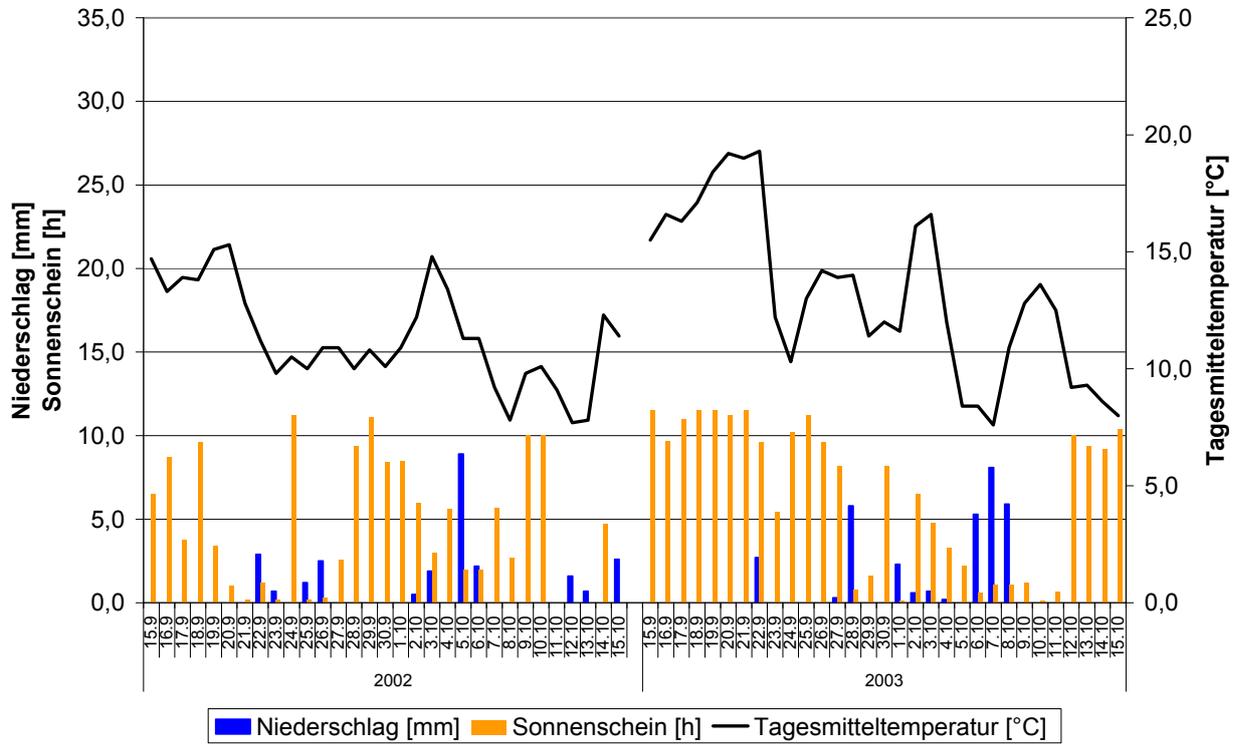


Abbildung 78: Wetterdaten im Jahrgang 2002 und 2003

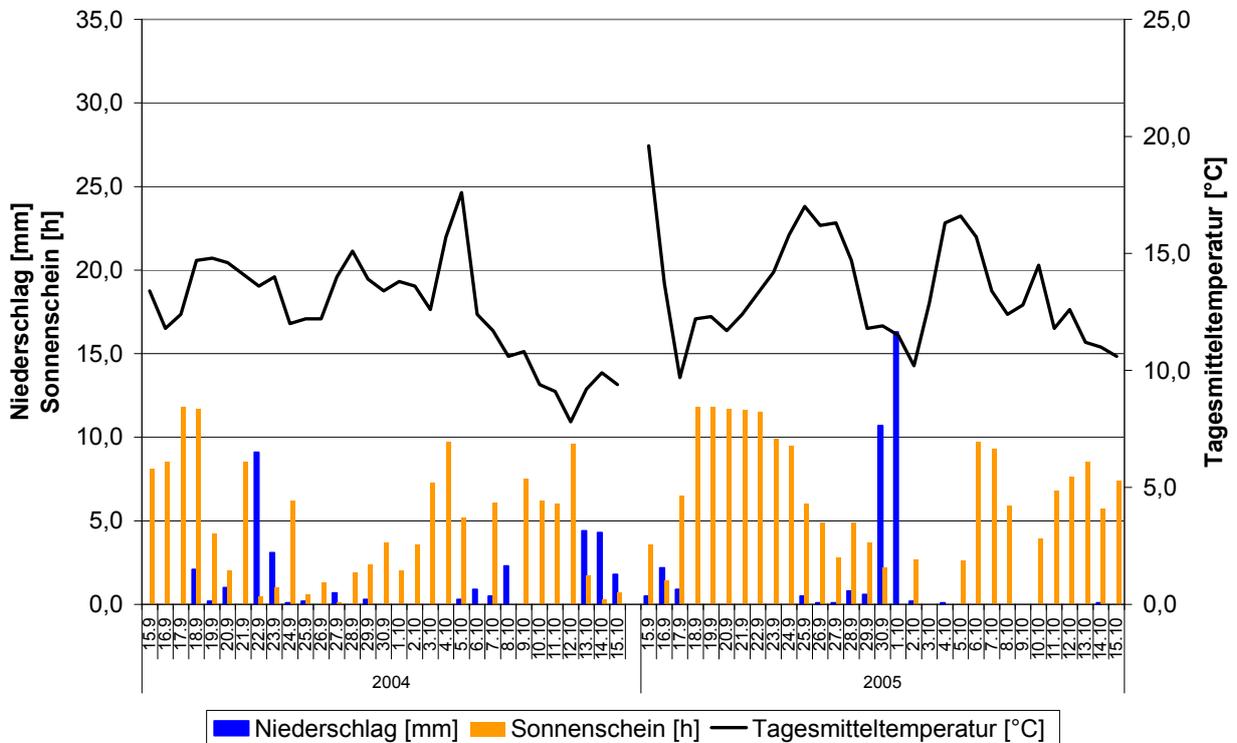


Abbildung 79: Wetterdaten im Jahrgang 2004 und 2005

Quelle Tabelle 78-81: Deutscher Wetterdienst; Standort Geisenheim

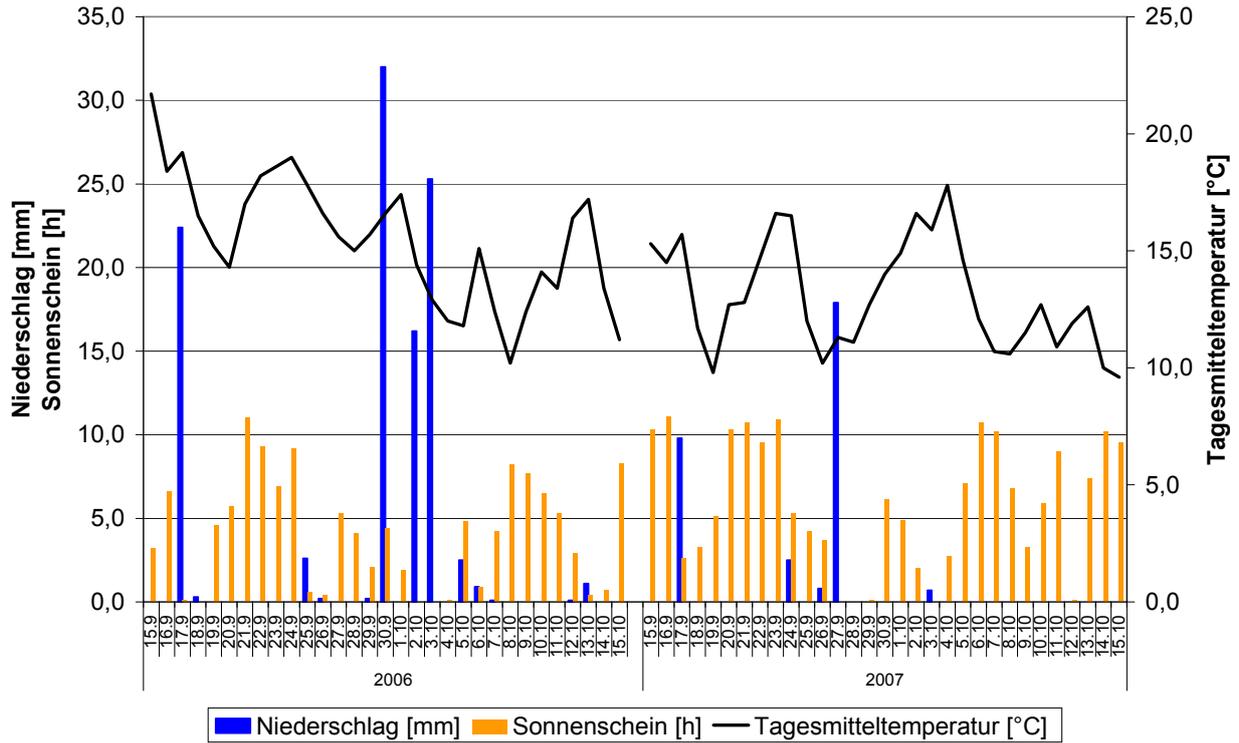


Abbildung 80: Wetterdaten im Jahrgang 2006 und 2007

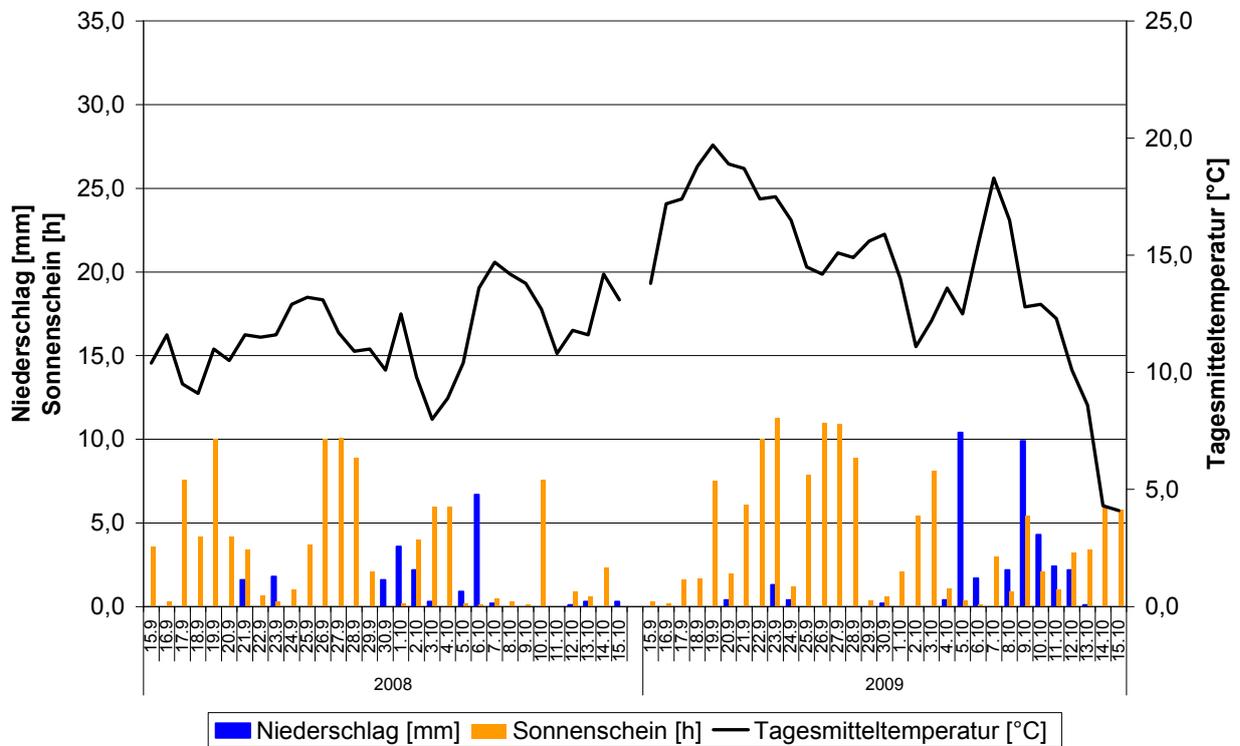


Abbildung 81: Wetterdaten im Jahrgang 2008 und 2009

Quelle Tabelle 78-81: Deutscher Wetterdienst; Standort Geisenheim

Tabelle 21: Daten der Mostanalyse Versuch 2 und Vorversuch 1 - 3

Parameter	Versuch 2	Vorversuch 1 Vorversuch 2 Vorversuch 3	Versuch 3		
Reduzierende Zucker [g L ⁻¹]	210,2	210,2	195,2		
pH-Wert	3,3	3,3	3,3		
Gesamtsäure [g L ⁻¹]	7,5	7,5	5,8		
Weinsäure [g L ⁻¹]	4,4	4,4	n.a.		
Äpfelsäure [g L ⁻¹]	2,1	2,1	n.a.		
Milchsäure [g L ⁻¹]	n.a.	n.a.	n.a.		
Flüchtige Säure [g L ⁻¹]	0,3	0,3	0,2		
Ethanol [g L ⁻¹]	2,4	2,4	0,3		
Glycerin [g L ⁻¹]	0,1	0,1	0,6		
Gluconsäure [g L ⁻¹]	1,4	1,4	0,2		
Freies Ammonium [g L ⁻¹]	n.a.	n.a.	n.a.		
NOPA [mg L ⁻¹]	n.a.	n.a.	n.a.		

Tabelle 22: Daten der Mostanalyse Versuch 4

Parameter	Versuch 4							
	Variante 1		Variante 2		Variante 3			
	klar	trüb	klar	trüb	klar	trüb		
Reduzierende Zucker [g L ⁻¹]	207,5	209,4	210,8	213,1	209,0	210,5		
Gesamtsäure [g L ⁻¹]	10,7	10,9	11,2	10,9	10,9	10,6		
Weinsäure [g L ⁻¹]	7,4	7,5	7,5	7,1	7,4	6,9		
Äpfelsäure [g L ⁻¹]	3,8	3,9	4,2	4,2	4,3	4,2		
Milchsäure [g L ⁻¹]	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Flüchtige Säure [g L ⁻¹]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		
pH-Wert	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1		
Ethanol [g L ⁻¹]	1,3	1,4	1,4	1,7	1,6	1,7		
Glycerin [g L ⁻¹]	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.		
Gluconsäure [g L ⁻¹]	0,2	0,1	0,2	0,2	n.n.	n.n.		

Tabelle 23: Daten der Mostanalyse Versuch 5

Parameter	Jahr	Versuch 5							
		Variante 1	Variante 2	Variante 3	Variante 4	Variante 5	Variante 6	Variante 7	Variante 8
Gesamtzucker [g/L]	1	248	263	259	260	254	225	239	240
	2	221	228	212	214	217	209	207	208
Gesamtsäure [g/L]	1	10,6	9,9	9,5	9,6	9,9	8,3	8,0	8,0
	2	7,3	6,4	9,1	9,5	9,6	10,9	10,9	10,8
Weinsäure [g/L]	1	6,6	6,1	6,0	5,8	6,2	5,1	4,7	4,7
	2	3,5	4,6	5,9	6,3	6,2	7,1	7,5	7,4
Äpfelsäure [g/L]	1	3,5	3,5	3,0	3,4	2,7	2,9	2,9	2,8
	2	4,3	2,7	3,7	3,7	3,9	4,5	4,1	3,9
Flüchtige Säure [g/L]	1	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,2	0,1	0,1
	2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1
pH-Wert	1	3,1	3,1	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
	2	3,4	3,5	3,1	3,2	3,1	3,2	3,2	3,2
Ethanol [g/L]	1	1,7	1,4	2,6	1,5	2,0	1,4	0,9	1,0
	2	1,3	1,4	1,2	0,8	0,8	1,4	1,3	1,2
Glycerin [g/L]	1	6,9	6,2	7,3	6,6	7,0	4,6	3,5	3,5
	2	0,5	1,3	1,1	1,3	1,3	n.d.	n.d.	n.d.
Gluconsäure [g/L]	1	3,7	2,2	3,0	2,4	3,5	1,2	0,1	0,3
	2	n.d.							
NOPA [mg/L]	1	100	127	92	113	97	88	79	87
	2	158	182	163	148	152	158	134	135

Tabelle 24: Aminosäurekonzentration Most Versuch 3

Aminosäuren [mg L ⁻¹]:	Versuch 3 Riesling 2009	Vergleichsmost Riesling 2006	Vergleichsmost Chardonnay 2008
Phenylalanin	15,4	n.n.	45,1
Asparaginsäure	22,4	0,3	29,6
Threonin	45,1	n.n.	100
Serin	43,9	0,3	140,8
Asparagin	5,7	0,4	30,9
Glutaminsäure	45,8	0,6	95
Glutamin	33,4	0,9	367,2
alpha-Amoniadipinsäure	n.a.	n.a.	n.a.
Prolin	287,7	n.n.	1031,8
Glycin	3,5	0,3	6,9
Alanin	68,6	0,9	276,4
alpha-Aminobuttersäure	n.a.	n.a.	n.a.
Valin	16	n.n.	41,9
Cystin	0,4	1,3	0,5
Methionin	n.a.	0,3	4,4
Isoleucin	8,6	0,2	27,8
Leucin	11,4	0,1	31,9
β-Alanin	n.a.	n.a.	n.a.
Tyrosin	4,9	n.n.	18,6
Phenylalanin	15,4	n.n.	45,1
γ-Aminobuttersäure	90,4	0,6	129
Ornithin	1,1	0,2	1,9
Lysin	3,0	0,6	2,4
Tryptophan	4,0	n.n.	16,5
Histidin	11,4	0,2	22,4
Arginin	180,9	n.n.	322,4
Summe Aminosäuren:	919	7	2789
Ammonium:	66,5	1,4	65

Termin	Variante 1		Variante 2		Variante 3	
	Mittel	Menge	Mittel	Menge	Mittel	Menge
11.05.	F S	4 l/ha 3,6 kg/ha	F S	4 l/ha 3,6 kg/ha	F S	4 l/ha 3,6 kg/ha
24.05.	F S	5 l/ha 3,6 kg/ha	F S	5 l/ha 3,6 kg/ha	F S	5 l/ha 3,6 kg/ha
04.06.	Cu S	400 g/ha 4,8 kg/ha	Cu S	400 g/ha 4,8 kg/ha	Cu S	400 g/ha 4,8 kg/ha
14.06.	Cu S V	400 g/ha 2,4 kg/ha 5 kg/ha	Cu S V	400 g/ha 2,4 kg/ha 5 kg/ha	Cu S V	400 g/ha 2,4 kg/ha 5 kg/ha
26.06.	M Cu	16 kg/ha 750 g/ha				
27.06.			Cu S V	750 g/ha 2,8 kg/ha 5 kg/ha	Cu S V	750 g/ha 2,8 kg/ha 5 kg/ha
04.07.	M Cu	16 kg/ha 500 g/ha				
06.07.			Cu S V	500 g/ha 2,8 kg/ha 5 kg/ha	Cu S V	500 g/ha 2,8 kg/ha 5 kg/ha
13.07.	M Cu	16 kg/ha 500 g/ha				
17.07.					Cu S V	400 g/ha 3,2 kg/ha 12 kg/ha
18.07.			Cu V	400 g/ha 12 kg/ha		
25.07.	M Cu	16 kg/ha 500 g/ha				
27.07.			Cu V	400 g/ha 12 kg/ha	Cu S V	400 g/ha 3,2 kg/ha 12 kg/ha

Abbildung 82: Versuch 4: Applikationsplan im Weinberg

Der Applikationsplan zeigt die verschiedenen Varianten im Weinberg. Aus jeder Variante Trauben wurde ein Most gepresst (Mostvariante 1, 2, 3). F = Frutogard, S = Netzschwefel, Cu = Kupfer, V = VitiSan, M = Molke. Die Netzschwefelapplikation betrug folgende Gesamtmengen: Variante 1: 14,4 kg, Variante 2: 20 kg, Variante 3: 26,4 kg. Quelle: modifiziert nach Materne (2008).

Tabelle 25: Versuch 1: Gärverlauf [g L⁻¹] reduzierende Zucker Jahr 1

Tage	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Variante:																												
1	230,4	220	190,5		157	140		107	47			25		24		20			17,3		12,3		13			12,6		10,8
2	230,4	200	162		148	99		30	4,9			1,2		0,7		1			1,5		1,3		1			1,6		1
3	230,4	220	191,5		157	123		64	35			21		15,1		12,6			9,8		9,5		8			7,6		7,5
4	230,4	218	188		146	124,5		67	31			13		8		3			2,9		2,5		2,2			2		2,4
5	230,4	215	175,5		146	108,5		37,5	9			1,1		1,2		1,2			1,3		1,3		1			1,1		1,6
6	230,4	205	172		149	143		95	65,5			27		27,2		20,5			15,1		15,3		11,1			10,3		10
7	230,4	225	205		142	126		73	40,5			29		22,5		15			12,9		11		10,2			10,5		9,3
8	230,4	220	190		154	118,5		99	58			25,3		20,5		14			10,9		10,6		8,4			8,8		8,1
9	230,4	219	189,5		134	125,5		73	35			20,5		13,4		8,5			7,2		7,1		6,1			5,8		5,7
10	230,4	223	197,5		157	137		84,5	72			41		28,2		20,5			14,2		11,5		11,5			8,6		7,4
11	230,4	222	196,5		171,5	140,5		76	60			32		21		18			13,4		10,5		9,7			7,8		10
12	230,4	223	197,5		152	103		19,5	1			1,3		3,1		1,5			1,2		1		0,9			1,2		1,2
13	230,4	223	198,5		162	91		27	5			1,5		1,4		1,5			0,8		1,4		1,5			1,4		1,7
14	230,4	221	193,5		136	90		14,5	1			1		1,2		2			1,3		1,2		0,7			1,1		1
15	230,4	224	203,5		142	140,5		73	57,5			20,3		15,1		11,6			7,8		7,2		6,2			5,3		4,9
16	230,4	213	170,5		144,5	86		25	1			1,3		1,4		1,4			1,4		1,3		0,9			0,8		1,4
17	230,4	216	177,5		152	118,5		65	40			20,3		16,4		14			14,2		13,1		12,7			11,4		10,4
18	230,4	220	192,5		140	95		58	28			12,3		10		10			6,2		5,4		5,8			5,6		5,6

Tabelle 26: Versuch 1: Gärverlauf [kumulierter Dichteverlust] Jahr 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
V 1	0,0	0,008	0,024	0,038	0,050			0,074	0,081		0,090		0,093			0,098				0,101				0,102			0,102		
V 2	0,0	0,008	0,042	0,070	0,086			0,103	0,103		0,103		0,103			0,103				0,103				0,103			0,103		
V 3	0,0	0,007	0,032	0,053	0,067			0,090	0,095		0,101		0,101			0,102				0,103				0,104			0,103		
V 4	0,0	0,007	0,031	0,052	0,066			0,090	0,095		0,100		0,101			0,102				0,103				0,103			0,103		
V 5	0,0	0,007	0,031	0,056	0,071			0,097	0,101		0,104		0,104			0,104				0,104				0,104			0,104		
V 6	0,0	0,006	0,024	0,039	0,048			0,072	0,081		0,088		0,092			0,096				0,100				0,101			0,101		
V 7	0,0	0,006	0,027	0,044	0,056			0,079	0,086		0,093		0,095			0,099				0,101				0,101			0,102		
V 8	0,0	0,005	0,025	0,044	0,056			0,080	0,088		0,092		0,094			0,097				0,100				0,100			0,100		
V 9	0,0	0,005	0,028	0,049	0,062			0,085	0,090		0,096		0,098			0,099				0,101				0,101			0,101		
V 10	0,0	0,005	0,020	0,034	0,045			0,069	0,076		0,085		0,088			0,093				0,097				0,098			0,099		
V 11	0,0	0,006	0,022	0,036	0,047			0,070	0,077		0,086		0,090			0,095				0,099				0,100			0,101		
V 12	0,0	0,006	0,035	0,065	0,081			0,103	0,103		0,103		0,103			0,103				0,103				0,103			0,103		
V 13	0,0	0,007	0,035	0,058	0,073			0,097	0,102		0,104		0,104			0,104				0,104				0,104			0,104		
V 14	0,0	0,006	0,037	0,067	0,082			0,103	0,103		0,103		0,103			0,103				0,103				0,103			0,103		
V 15	0,0	0,007	0,024	0,039	0,051			0,075	0,081		0,090		0,094			0,098				0,102				0,103			0,103		
V 16	0,0	0,007	0,032	0,059	0,074			0,099	0,103		0,103		0,103			0,104				0,104				0,104			0,104		
V 17	0,0	0,008	0,031	0,049	0,062			0,088	0,095		0,101		0,102			0,104				0,104				0,104			0,104		
V 18	0,0	0,007	0,030	0,050	0,063			0,089	0,096		0,102		0,102			0,104				0,104				0,104			0,104		

Tabelle 27: Versuch 1: Gärverlauf [kumulierter Gewichtsverlust in g L⁻¹] Jahr3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
V 1	0	0,7	12,7	26,5	36,5	45,8	56,6	65,3	72,1	76,2			82,5		87,0					89,2	89,8
V 2	0	0,2	10,2	32,3	46,3	56,4	65,6	71,5	75,6	77,9			81,5		84,9					86,2	86,7
V 3	0	0,2	15,8	36,3	48,8	57,5	65,8	71,2	75,2	77,6			81,2		84,6					86,7	87,4
V 4	0	0,6	16,6	36,8	49,4	58,5	66,9	70,2	75,1	77,7			80,9		84,1					85,7	86,2
V 5	0	0,5	18,1	40,5	55,2	67,1	77,1	78,7	81,3	82,5			83,2		85,5					85,7	85,9
V 6	0	0,9	14,3	30,2	41,8	49,7	60,2	67,9	74,0	77,4			82,7		86,3					88,2	88,7
V 7	0	0,4	13,9	29,3	41,5	50,7	60,5	67,8	73,7	77,1			82,5		85,8					87,8	88,4
V 8	0	0,2	16,1	36,1	47,2	56,0	65,0	71,2	75,6	78,2			81,5		84,5					86,3	86,8
V 9	0	0,2	17,0	36,7	49,2	57,9	66,7	72,7	77,1	79,4			82,5		85,4					86,8	87,2
V 10	0	1,7	14,4	29,6	40,8	50,1	59,9	68,1	74,3	78,0			83,8		87,5					89,8	90,2
V 11	0	0,5	13,7	29,0	38,1	46,9	56,7	64,6	70,5	74,0			79,9		83,4					85,8	86,3
V 12	0	1,5	25,4	53,2	68,0	77,2	82,8	83,2	84,6	85,2			85,4		87,1					87,2	87,7
V 13	0	1,1	21,8	46,1	62,5	73,8	82,8	83,6	85,5	86,1			86,5		87,8					88,2	88,4
V 14	0	2,0	28,3	56,3	72,0	81,1	85,5	85,8	86,1	86,2			86,4		88,2					88,5	88,7
V 15	0	0,8	16,0	31,4	42,6	51,9	62,2	71,6	78,3	82,0			87,5		90,5					91,6	91,8
V 16	0	0,7	21,2	45,4	60,7	72,5	81,5	83,5	84,6	84,8			85,5		87,3					87,5	88,2
V 17	0	1,1	18,3	36,1	48,1	57,5	66,3	72,2	76,8	79,2			83,0		85,8					87,5	87,8
V 18	0	1,2	18,9	37,9	50,6	60,4	70,6	76,6	81,0	83,2			86,2		89,2					90,2	90,5

Tabelle 28: Versuch 1: Hefezellzahl [KBE mL⁻¹] im Versuchsjahr 1

Variante		1	3	4	6	8	11	13	15	18	20	22	27
1	lebend	5,00E+06	2,00E+07	3,75E+07	4,38E+07	3,88E+07	2,25E+07	2,25E+07	1,06E+07	6,50E+06	6,63E+06	2,50E+06	1,13E+06
	tot	1,25E+06	3,75E+06	6,25E+06	5,00E+06	8,75E+06	2,13E+07	1,63E+07	8,50E+06	7,38E+06	4,13E+06	7,63E+06	3,75E+06
	gesamt	6,25E+06	2,38E+07	4,38E+07	4,88E+07	4,75E+07	4,38E+07	3,88E+07	1,91E+07	1,39E+07	1,08E+07	1,01E+07	4,88E+06
2	lebend	2,50E+06	2,50E+07	5,25E+07	4,63E+07	5,88E+07	5,00E+06	1,25E+06	1,25E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	tot	1,25E+06	2,50E+06	2,50E+06	5,00E+06	1,25E+07	6,25E+06	0,00E+00	3,75E+05	0,00E+00	1,25E+05	0,00E+00	0,00E+00
	gesamt	3,75E+06	2,75E+07	5,50E+07	5,13E+07	7,13E+07	1,13E+07	1,25E+06	5,00E+05	0,00E+00	1,25E+05	0,00E+00	0,00E+00
3	lebend	1,25E+06	3,00E+07	3,38E+07	2,75E+07	1,50E+07	1,88E+07	1,13E+07	6,38E+06	1,25E+06	3,50E+06	2,25E+06	2,00E+06
	tot	0,00E+00	6,25E+06	3,75E+06	5,00E+06	2,00E+07	2,00E+07	2,88E+07	5,88E+06	4,75E+06	4,88E+06	3,00E+06	8,75E+05
	gesamt	1,25E+06	3,63E+07	3,75E+07	3,25E+07	3,50E+07	3,88E+07	4,00E+07	1,23E+07	6,00E+06	8,38E+06	5,25E+06	2,88E+06
4	lebend	1,25E+06	2,25E+07	3,50E+07	3,88E+07	2,88E+07	2,25E+07	1,25E+07	1,48E+07	2,38E+06	4,50E+06	1,75E+06	0,00E+00
	tot	0,00E+00	1,25E+06	1,25E+06	1,00E+07	2,38E+07	1,88E+07	1,50E+07	1,46E+07	5,25E+06	5,13E+06	3,00E+06	0,00E+00
	gesamt	1,25E+06	2,38E+07	3,63E+07	4,88E+07	5,25E+07	4,13E+07	2,75E+07	2,94E+07	7,63E+06	9,63E+06	4,75E+06	0,00E+00
5	lebend	1,25E+06	8,75E+06	3,63E+07	3,63E+07	3,75E+07	2,25E+07	1,38E+07	1,40E+07	0,00E+00	2,50E+06	0,00E+00	0,00E+00
	tot	1,25E+06	2,50E+06	3,75E+06	6,25E+06	1,13E+07	1,13E+07	7,50E+06	9,38E+06	8,75E+06	2,50E+06	0,00E+00	0,00E+00
	gesamt	2,50E+06	1,13E+07	4,00E+07	4,25E+07	4,88E+07	3,38E+07	2,13E+07	2,34E+07	8,75E+06	5,00E+06	0,00E+00	0,00E+00
6	lebend	2,50E+06	7,50E+06	2,50E+07	3,00E+07	2,50E+07	1,75E+07	1,13E+07	7,50E+06	2,63E+06	3,50E+06	3,00E+06	1,25E+05
	tot	5,00E+06	2,50E+06	3,75E+06	1,50E+07	8,75E+06	1,50E+07	1,13E+07	8,75E+06	4,75E+06	5,75E+06	3,00E+06	2,25E+06
	gesamt	7,50E+06	1,00E+07	2,88E+07	4,50E+07	3,38E+07	3,25E+07	2,25E+07	1,63E+07	7,38E+06	9,25E+06	6,00E+06	2,38E+06
7	lebend	0,00E+00	8,75E+06	3,25E+07	2,13E+07	2,13E+07	1,50E+07	1,38E+07	7,50E+06	4,75E+06	4,75E+06	3,00E+06	2,25E+06
	tot	0,00E+00	1,25E+06	1,00E+07	7,50E+06	1,25E+07	1,50E+07	1,00E+07	1,50E+07	5,25E+06	3,75E+06	3,13E+06	2,75E+06
	gesamt	0,00E+00	1,00E+07	4,25E+07	2,88E+07	3,38E+07	3,00E+07	2,38E+07	2,25E+07	1,00E+07	8,50E+06	6,13E+06	5,00E+06
8	lebend	0,00E+00	1,88E+07	5,13E+07	3,00E+07	2,50E+07	1,63E+07	1,38E+07	1,39E+07	4,75E+06	3,75E+06	2,88E+06	7,50E+05
	tot	1,25E+06	0,00E+00	6,25E+06	1,13E+07	1,25E+07	2,00E+07	2,00E+07	1,55E+07	4,38E+06	6,00E+06	3,50E+06	2,63E+06
	gesamt	1,25E+06	1,88E+07	5,75E+07	4,13E+07	3,75E+07	3,63E+07	3,38E+07	2,94E+07	9,13E+06	9,75E+06	6,38E+06	3,38E+06
9	lebend	0,00E+00	1,50E+07	3,00E+07	4,25E+07	3,00E+07	3,13E+07	8,75E+06	1,50E+06	4,63E+06	5,25E+06	2,50E+06	1,00E+06
	tot	0,00E+00	0,00E+00	2,50E+06	7,50E+06	2,25E+07	3,88E+07	1,13E+07	1,75E+06	3,88E+06	4,00E+06	2,88E+06	3,00E+06
	gesamt	0,00E+00	1,50E+07	3,25E+07	5,00E+07	5,25E+07	7,00E+07	2,00E+07	3,25E+06	8,50E+06	9,25E+06	5,38E+06	4,00E+06
10	lebend	1,25E+06	1,88E+07	2,50E+07	3,13E+07	3,38E+07	3,25E+07	3,50E+07	1,13E+07	4,50E+06	8,00E+06	2,75E+06	2,13E+06
	tot	1,25E+06	5,00E+06	0,00E+00	8,75E+06	1,50E+07	1,25E+07	1,38E+07	1,00E+07	3,13E+06	6,88E+06	3,13E+06	2,25E+06
	gesamt	2,50E+06	2,38E+07	2,50E+07	4,00E+07	4,88E+07	4,50E+07	4,88E+07	2,13E+07	7,63E+06	1,49E+07	5,88E+06	4,38E+06
11	lebend	1,25E+06	2,00E+07	4,00E+07	3,63E+07	2,38E+07	2,88E+07	2,25E+07	1,05E+07	5,50E+06	5,75E+06	0,00E+00	1,13E+06
	tot	1,25E+06	2,50E+06	1,25E+06	1,00E+07	2,00E+07	2,00E+07	8,75E+06	1,44E+07	2,50E+06	8,50E+06	0,00E+00	3,00E+06
	gesamt	2,50E+06	2,25E+07	4,13E+07	4,63E+07	4,38E+07	4,88E+07	3,13E+07	2,49E+07	8,00E+06	1,43E+07	0,00E+00	4,13E+06
12	lebend	1,25E+06	2,50E+07	7,25E+07	4,88E+07	3,13E+07	1,75E+07	0,00E+00	2,50E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	tot	0,00E+00	1,25E+06	3,75E+06	5,00E+06	7,50E+06	1,38E+07	1,25E+07	1,13E+06	1,25E+05	3,75E+05	1,25E+05	0,00E+00
	gesamt	1,25E+06	2,63E+07	7,63E+07	5,38E+07	3,88E+07	3,13E+07	1,25E+07	1,38E+06	1,25E+05	3,75E+05	1,25E+05	0,00E+00
13	lebend	3,75E+06	4,25E+07	6,75E+07	6,63E+07	6,25E+07	1,25E+07	7,50E+06	3,00E+06	5,00E+05	1,25E+05	0,00E+00	0,00E+00
	tot	0,00E+00	6,25E+06	6,25E+06	1,13E+07	1,13E+07	1,13E+07	2,50E+06	1,38E+06	6,25E+05	3,75E+05	0,00E+00	0,00E+00
	gesamt	3,75E+06	4,88E+07	7,38E+07	7,75E+07	7,38E+07	2,38E+07	1,00E+07	4,38E+06	1,13E+06	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
14	lebend	1,25E+06	5,75E+07	8,13E+07	5,00E+07	2,50E+07	1,00E+07	0,00E+00	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	tot	0,00E+00	5,00E+06	1,25E+06	1,00E+07	1,13E+07	1,25E+06	7,50E+06	6,25E+05	0,00E+00	1,25E+05	0,00E+00	0,00E+00
	gesamt	1,25E+06	6,25E+07	8,25E+07	6,00E+07	3,63E+07	1,13E+07	7,50E+06	1,13E+06	0,00E+00	1,25E+05	0,00E+00	0,00E+00
15	lebend	5,00E+06	2,25E+07	3,88E+07	3,00E+07	3,00E+07	7,50E+06	7,50E+06	6,25E+06	4,38E+06	3,50E+06	0,00E+00	7,50E+05
	tot	7,50E+06	5,00E+06	6,25E+06	8,75E+06	8,75E+06	6,25E+06	1,25E+07	5,63E+06	1,25E+06	4,25E+06	1,25E+05	1,25E+06
	gesamt	1,25E+07	2,75E+07	4,50E+07	3,88E+07	3,88E+07	1,38E+07	2,00E+07	1,19E+07	5,63E+06	7,75E+06	1,25E+05	2,00E+06
16	lebend	1,25E+06	4,25E+07	6,38E+07	5,75E+07	4,00E+07	3,00E+07	3,75E+06	2,50E+06	1,00E+06	6,25E+05	1,25E+05	0,00E+00
	tot	6,25E+06	1,25E+07	7,50E+06	2,50E+06	1,00E+07	2,00E+07	2,50E+06	4,00E+06	8,75E+05	1,25E+05	2,50E+05	0,00E+00
	gesamt	7,50E+06	5,50E+07	7,13E+07	6,00E+07	5,00E+07	5,00E+07	6,25E+06	6,50E+06	1,88E+06	7,50E+05	3,75E+05	0,00E+00
17	lebend	0,00E+00	2,50E+07	3,00E+07	2,38E+07	1,25E+07	7,50E+06	8,75E+06	2,50E+06	4,38E+06	3,00E+06	0,00E+00	2,25E+06
	tot	0,00E+00	5,00E+06	5,00E+06	6,25E+06	2,00E+07	1,63E+07	7,00E+06	3,00E+06	6,00E+06	1,25E+05	1,38E+06	
	gesamt	0,00E+00	3,00E+07	3,50E+07	3,00E+07	3,25E+07	2,38E+07	2,63E+07	9,50E+06	7,38E+06	9,00E+06	1,25E+05	3,63E+06
18	lebend	3,75E+06	3,50E+07	3,50E+07	5,00E+07	2,13E+07	1,25E+07	1,13E+07	8,13E+06	3,50E+06	2,25E+06	2,25E+06	7,50E+05
	tot	1,25E+06	5,00E+06	1,25E+07	8,75E+06	2,00E+07	2,13E+07	1,63E+07	8,13E+06	2,75E+06	3,88E+06	2,75E+06	1,00E+06
	gesamt	5,00E+06	4,00E+07	4,75E+07	5,88E+07	4,13E+07	3,38E+07	2,75E+07	1,63E+07	6,25E+06	6,13E+06	5,00E+06	1,75E+06

Tabelle 29: Versuch 1: Hefezellzahl [KBE ml⁻¹] im Versuchsjahr 2

Variante		1	3	4	5	6	8	9	15	18	20	22	24	27
1	lebend	1,00E+06	2,92E+07	3,75E+07	4,38E+07	3,25E+07	3,00E+07	1,42E+07	2,60E+07	3,45E+07	5,00E+06	7,50E+06	7,50E+06	1,08E+07
	tot	2,50E+05	8,33E+05	6,25E+06	5,00E+06	7,50E+06	1,67E+06	1,08E+07	1,35E+07	2,50E+06	9,17E+06	5,83E+06	5,83E+06	0,00E+00
	gesamt	1,25E+06	3,00E+07	4,38E+07	4,88E+07	4,00E+07	3,17E+07	2,50E+07	3,95E+07	3,70E+07	1,42E+07	1,33E+07	1,33E+07	1,08E+07
2	lebend	1,00E+06	9,17E+07	5,25E+07	4,63E+07	7,50E+07	5,00E+07	3,33E+07	2,50E+06	1,55E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	tot	2,50E+05	8,33E+05	2,50E+06	5,00E+06	5,83E+06	6,67E+06	1,17E+07	2,80E+07	1,00E+06	0,00E+00	8,33E+05	8,33E+05	8,33E+05
	gesamt	1,25E+06	9,25E+07	5,50E+07	5,13E+07	8,08E+07	5,67E+07	4,50E+07	3,05E+07	1,65E+07	0,00E+00	8,33E+05	8,33E+05	8,33E+05
3	lebend	1,00E+06	3,50E+07	3,38E+07	2,75E+07	3,50E+07	3,17E+07	1,83E+07	2,45E+07	3,60E+07	1,17E+07	5,00E+06	5,00E+06	5,00E+06
	tot	2,50E+05	3,33E+06	3,75E+06	5,00E+06	1,75E+07	1,33E+07	1,42E+07	2,20E+07	1,50E+06	5,00E+06	4,17E+06	4,17E+06	4,17E+06
	gesamt	1,25E+06	3,83E+07	3,75E+07	3,25E+07	5,25E+07	4,50E+07	3,25E+07	4,65E+07	3,75E+07	1,67E+07	9,17E+06	9,17E+06	9,17E+06
4	lebend	1,00E+06	4,08E+07	3,50E+07	3,88E+07	3,67E+07	3,00E+07	1,58E+07	2,95E+07	2,80E+07	1,08E+07	5,00E+06	5,00E+06	5,00E+06
	tot	2,50E+05	1,67E+06	1,25E+06	1,00E+07	1,25E+07	1,58E+07	1,58E+07	1,90E+07	4,50E+06	9,17E+06	4,17E+06	4,17E+06	4,17E+06
	gesamt	1,25E+06	4,25E+07	3,63E+07	4,88E+07	4,92E+07	4,50E+07	3,17E+07	4,85E+07	3,25E+07	2,00E+07	9,17E+06	9,17E+06	9,17E+06
5	lebend	1,00E+06	5,33E+07	3,63E+07	3,63E+07	5,50E+07	5,75E+07	3,83E+07	3,00E+07	1,50E+07	3,33E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	tot	2,50E+05	2,50E+06	3,75E+06	6,25E+06	5,83E+06	0,00E+00	5,00E+06	7,00E+06	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	gesamt	1,25E+06	5,58E+07	4,00E+07	4,25E+07	6,08E+07	5,75E+07	4,33E+07	3,70E+07	1,55E+07	5,83E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
6	lebend	1,00E+06	1,92E+07	2,50E+07	3,00E+07	3,08E+07	2,83E+07	2,42E+07	1,95E+07	2,85E+07	5,83E+06	9,17E+06	9,17E+06	9,17E+06
	tot	2,50E+05	3,33E+06	3,75E+06	1,50E+07	9,17E+06	1,00E+07	5,83E+06	1,35E+07	1,50E+06	1,17E+07	6,67E+06	6,67E+06	6,67E+06
	gesamt	1,25E+06	2,25E+07	2,88E+07	4,50E+07	4,00E+07	3,83E+07	3,00E+07	3,30E+07	3,00E+07	1,75E+07	1,58E+07	1,58E+07	1,58E+07
7	lebend	1,00E+06	3,33E+07	3,25E+07	2,13E+07	2,83E+07	2,17E+07	1,17E+07	0,00E+00	2,90E+07	1,33E+07	2,50E+06	2,50E+06	2,50E+06
	tot	2,50E+05	4,17E+06	1,00E+07	7,50E+06	1,00E+07	1,50E+07	6,67E+06	1,40E+07	4,00E+06	6,67E+06	3,33E+06	3,33E+06	3,33E+06
	gesamt	1,25E+06	3,75E+07	4,25E+07	2,88E+07	3,83E+07	3,67E+07	1,83E+07	1,40E+07	3,30E+07	2,00E+07	5,83E+06	5,83E+06	5,83E+06
8	lebend	1,00E+06	3,00E+07	5,13E+07	3,00E+07	3,17E+07	1,92E+07	1,50E+07	1,20E+07	3,20E+07	1,33E+07	6,67E+06	6,67E+06	6,67E+06
	tot	2,50E+05	2,50E+06	6,25E+06	1,13E+07	1,00E+07	1,08E+07	1,33E+07	1,95E+07	3,00E+06	9,17E+06	8,33E+06	8,33E+06	8,33E+06
	gesamt	1,25E+06	3,25E+07	5,75E+07	4,13E+07	4,17E+07	3,00E+07	2,83E+07	3,15E+07	3,50E+07	2,25E+07	1,50E+07	1,50E+07	1,50E+07
9	lebend	1,00E+06	4,58E+07	3,00E+07	4,25E+07	2,83E+07	2,67E+07	2,00E+07	2,25E+07	3,90E+07	9,17E+06	4,17E+06	4,17E+06	4,17E+06
	tot	2,50E+05	1,67E+06	2,50E+06	7,50E+06	1,17E+07	1,75E+07	9,17E+06	2,15E+07	3,00E+06	3,33E+06	6,67E+06	6,67E+06	6,67E+06
	gesamt	1,25E+06	4,75E+07	3,25E+07	5,00E+07	4,00E+07	4,42E+07	2,92E+07	4,40E+07	4,20E+07	1,25E+07	1,08E+07	1,08E+07	1,08E+07
10	lebend	1,00E+06	3,42E+07	2,50E+07	3,13E+07	2,92E+07	3,17E+07	2,25E+07	2,50E+07	2,90E+07	1,33E+07	6,67E+06	6,67E+06	6,67E+06
	tot	2,50E+05	1,67E+06	0,00E+00	8,75E+06	4,17E+06	2,50E+06	6,67E+06	1,30E+07	3,00E+06	5,83E+06	8,33E+06	8,33E+06	8,33E+06
	gesamt	1,25E+06	3,58E+07	2,50E+07	4,00E+07	3,33E+07	3,42E+07	2,92E+07	3,80E+07	3,20E+07	1,92E+07	1,50E+07	1,50E+07	1,50E+07
11	lebend	1,00E+06	4,25E+07	4,00E+07	3,63E+07	4,08E+07	2,17E+07	2,50E+07	2,30E+07	3,90E+07	1,00E+07	9,17E+06	9,17E+06	9,17E+06
	tot	2,50E+05	2,50E+06	1,25E+06	1,00E+07	7,50E+06	3,33E+06	4,17E+06	1,15E+07	1,50E+06	9,17E+06	4,17E+06	4,17E+06	4,17E+06
	gesamt	1,25E+06	4,50E+07	4,13E+07	4,63E+07	4,83E+07	2,50E+07	2,92E+07	3,45E+07	4,05E+07	1,92E+07	1,33E+07	1,33E+07	1,33E+07
12	lebend	1,00E+06	6,33E+07	7,25E+07	4,88E+07	8,17E+07	3,58E+07	1,83E+07	8,00E+06	1,45E+07	1,75E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	tot	2,50E+05	8,33E+05	3,75E+06	5,00E+06	4,17E+06	9,17E+06	6,67E+06	2,10E+07	0,00E+00	4,17E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	gesamt	1,25E+06	6,42E+07	7,63E+07	5,38E+07	8,58E+07	4,50E+07	2,50E+07	2,90E+07	1,45E+07	2,17E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
13	lebend	1,00E+06	7,92E+07	6,75E+07	6,63E+07	6,08E+07	4,75E+07	2,83E+07	2,05E+07	2,95E+07	8,33E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	tot	2,50E+05	2,50E+06	6,25E+06	1,13E+07	5,83E+06	5,83E+06	2,50E+06	3,00E+06	5,00E+05	2,50E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	gesamt	1,25E+06	8,17E+07	7,38E+07	7,75E+07	6,67E+07	5,33E+07	3,08E+07	2,35E+07	3,00E+07	3,33E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
14	lebend	1,00E+06	7,83E+07	8,13E+07	5,00E+07	6,75E+07	3,50E+07	3,08E+07	1,05E+07	2,60E+07	1,17E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	tot	2,50E+05	2,50E+06	1,25E+06	1,00E+07	5,00E+06	4,17E+06	2,50E+06	1,85E+07	0,00E+00	4,17E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	gesamt	1,25E+06	8,08E+07	8,25E+07	6,00E+07	7,25E+07	3,92E+07	3,33E+07	2,90E+07	2,60E+07	1,58E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
15	lebend	1,00E+06	5,42E+07	3,88E+07	3,00E+07	3,92E+07	4,50E+07	4,17E+07	3,45E+07	4,00E+07	1,75E+07	7,50E+06	7,50E+06	7,50E+06
	tot	2,50E+05	0,00E+00	6,25E+06	8,75E+06	8,33E+06	1,67E+06	3,33E+06	3,50E+06	5,00E+05	4,17E+06	6,67E+06	6,67E+06	6,67E+06
	gesamt	1,25E+06	5,42E+07	4,50E+07	3,88E+07	4,75E+07	4,67E+07	4,50E+07	3,80E+07	4,05E+07	2,17E+07	1,42E+07	1,42E+07	1,42E+07
16	lebend	1,00E+06	5,83E+07	6,38E+07	5,75E+07	5,83E+07	5,83E+07	4,08E+07	4,00E+07	2,55E+07	1,00E+07	2,50E+06	2,50E+06	2,50E+06
	tot	2,50E+05	1,67E+06	7,50E+06	2,50E+06	7,50E+06	8,33E+05	8,33E+05	1,00E+06	5,50E+06	5,00E+06	1,67E+06	1,67E+06	1,67E+06
	gesamt	1,25E+06	6,00E+07	7,13E+07	6,00E+07	6,58E+07	5,92E+07	4,17E+07	4,10E+07	3,10E+07	1,50E+07	4,17E+06	4,17E+06	4,17E+06
17	lebend	1,00E+06	4,67E+07	3,00E+07	2,38E+07	4,25E+07	3,58E+07	3,67E+07	2,55E+07	4,70E+07	1,75E+07	2,50E+06	2,50E+06	2,50E+06
	tot	2,50E+05	4,17E+06	5,00E+06	6,25E+06	8,33E+06	4,17E+06	5,00E+06	8,00E+06	1,00E+06	4,17E+06	8,33E+05	8,33E+05	8,33E+05
	gesamt	1,25E+06	5,08E+07	3,50E+07	3,00E+07	5,08E+07	4,00E+07	4,17E+07	3,35E+07	4,80E+07	2,17E+07	3,33E+06	3,33E+06	3,33E+06
18	lebend	1,00E+06	3,67E+07	3,50E+07	5,00E+07	4,58E+07	3,42E+07	2,50E+07	4,75E+07	3,95E+07	2,83E+07	8,33E+05	8,33E+05	8,33E+05
	tot	2,50E+05	1,67E+06	1,25E+07	8,75E+06	7,50E+06	5,00E+06	5,00E+06	8,00E+06	4,00E+06	3,33E+06	8,33E+05	8,33E+05	8,33E+05
	gesamt	1,25E+06	3,83E+07	4,75E+07	5,88E+07	5,33E+07	3,92E+07	3,00E+07	5,55E+07	4,35E+07	3,17E+07	1,67E+06	1,67E+06	1,67E+06

Tabelle 30: Versuch 1: Konzentration Aminosäuren nach der Gärung [mg L⁻¹] Jahr 1

Jahr 1	Most	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Arginin	122,5	10,7	16,9	27,7	27,0	18,3	13,8	17,6	22,6	26,8	13,1	12,8	28,1	21,1	23,2	13,0	15,7	18,9	16,2
		± 2,1	0,6	0,0	3,0	2,3	6,7	0,4	8,0	3,6	0,5	1,0	3,8	7,0	3,1	0,2	0,8	0,7	1,4
Asparaginsäure	15,7	6,8	11,6	14,8	15,4	13,0	9,0	11,7	14,4	15,2	8,2	8,7	15,5	14,4	14,5	9,0	14,2	14,7	11,5
		± 1,1	1,1	0,9	0,8	0,8	4,1	0,2	5,1	2,4	0,1	1,0	0,5	0,9	0,1	1,9	0,1	0,4	0,1
Threonin	49,1	3,6	6,2	8,1	7,8	6,9	4,9	6,5	8,0	8,2	4,9	4,9	7,4	7,8	7,5	4,0	7,2	6,6	5,5
		± 0,2	0,8	0,2	0,6	1,1	2,2	0,0	2,8	1,5	0,2	0,7	0,3	0,3	0,0	1,2	0,6	0,0	0,2
Serin	42,4	4,8	7,6	10,0	10,6	8,2	6,7	8,0	10,2	10,7	6,4	6,2	9,1	11,4	8,7	5,0	8,1	8,2	7,4
		± 0,7	1,1	0,3	0,6	0,8	3,3	0,1	3,2	2,9	0,5	0,6	0,1	3,4	0,5	0,2	0,7	0,8	0,6
Asparagin	6,9	8,9	13,4	17,0	28,4	47,5	14,5	15,4	20,6	21,1	11,9	12,7	38,9	42,8	32,6	14,8	64,0	26,5	20,1
		± 1,3	1,2	1,3	1,1	2,7	6,6	1,8	5,8	5,2	0,2	0,3	5,1	16,0	5,6	1,8	2,4	1,7	1,2
Glutaminsäure	35,6	25,5	36,2	48,1	50,9	34,6	29,4	39,1	45,2	45,4	26,0	30,4	36,2	35,0	32,9	32,0	32,3	37,0	30,3
		± 2,0	3,3	1,1	4,5	0,8	11,3	1,3	17,8	5,4	1,5	2,8	0,7	5,9	0,3	1,5	1,8	0,1	1,6
Glutamin	111,4	0,7	1,3	1,4	1,6	1,4	1,3	1,5	1,9	1,5	1,5	1,7	2,7	2,6	2,7	1,7	3,4	1,9	3,0
		± 0,2	0,6	0,6	0,3	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,5	0,3	0,1	0,1	0,3	0,2
Glycerin	2,4	4,2	10,3	11,0	13,4	10,5	5,0	6,7	8,2	9,5	4,9	4,8	11,2	11,5	10,2	5,1	9,2	5,5	5,4
		± 0,6	1,5	0,5	0,1	0,7	2,3	0,0	2,6	2,0	0,5	0,4	0,7	2,2	0,7	0,9	0,1	0,6	0,0
Alanin	39,1	18,9	25,8	33,8	52,5	39,0	20,3	28,8	34,1	33,6	22,4	23,0	35,8	36,5	30,4	29,2	36,6	30,7	27,6
		± 3,6	3,6	1,6	0,1	0,3	9,0	0,7	10,6	5,1	0,2	1,5	1,9	10,0	3,2	3,3	1,8	2,0	0,5
Valin	58,3	2,1	5,7	6,6	6,0	7,8	2,8	5,2	5,7	5,8	4,5	2,5	6,2	6,8	6,8	1,7	3,8	4,1	1,6
		± 0,2	0,6	2,4	2,2	0,8	0,7	0,7	1,0	0,0	3,3	0,4	0,4	0,1	0,3	0,4	0,2	0,4	0,4
Methionin	5,9	2,8	3,5	5,7	5,0	3,6	3,2	4,6	5,5	5,3	2,8	3,0	3,8	3,7	3,6	2,7	2,9	3,4	3,1
		± 0,5	0,1	0,1	0,6	0,2	0,6	0,1	2,2	0,8	0,5	0,2	0,4	1,1	0,2	0,2	0,4	0,3	0,4
Isoleucin	65,9	2,3	4,9	5,0	5,2	5,1	3,2	4,2	5,2	5,4	2,8	3,1	5,9	6,1	6,3	2,2	5,0	3,8	3,7
		± 0,3	1,3	0,1	0,1	0,2	1,4	0,2	1,7	0,7	0,5	0,4	0,3	0,8	0,1	0,0	0,7	0,4	0,5
Leucin	97,1	12,4	22,2	29,3	27,0	22,0	16,1	22,2	27,2	28,5	15,3	15,5	25,3	22,6	23,8	11,9	17,7	19,2	20,1
		± 1,3	1,8	0,3	1,5	1,1	7,1	0,0	9,5	4,2	1,2	1,9	2,5	3,1	0,5	0,9	0,8	1,2	1,2
Tyrosin	11,0	7,1	10,4	13,6	14,3	11,4	10,0	12,3	14,8	14,6	9,6	9,9	12,8	12,5	11,9	9,7	10,3	10,0	5,8
		± 0,9	1,1	0,5	0,9	0,2	4,2	0,3	4,9	1,9	0,5	1,0	0,9	0,0	0,3	1,9	2,7	1,2	0,8
Phenylalanin	69,7	8,0	13,0	17,7	16,3	13,4	10,2	13,7	16,7	17,4	9,5	9,5	14,6	13,7	14,1	7,3	9,7	10,4	13,1
		± 1,4	1,0	0,0	1,1	0,6	4,3	0,3	5,9	3,1	0,7	1,4	1,3	1,4	1,3	2,4	0,9	2,0	0,4
GABA	67,3	3,7	6,3	4,3	10,8	17,3	3,6	3,9	5,5	5,4	4,7	4,2	14,3	22,0	16,7	7,3	30,7	7,1	5,9
		± 0,8	0,8	0,1	0,0	0,2	0,9	0,3	1,8	1,0	0,3	0,3	0,0	8,7	1,9	1,5	0,5	0,8	1,1
Histidin	21,7	7,0	10,3	14,7	14,8	11,7	8,3	13,0	15,3	15,7	9,4	8,6	13,6	9,1	9,5	4,0	4,8	4,5	5,2
		± 1,3	1,5	0,4	3,2	1,2	3,7	1,8	4,7	3,0	1,7	2,3	1,6	0,6	3,6	0,7	0,8	0,6	0,1
Tryptophan	15,1	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		± 0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ornithin	0,4	0,3	0,5	2,1	1,6	1,5	0,5	0,5	1,0	2,4	0,3	0,3	8,1	5,3	6,3	1,3	3,4	1,7	0,5
		± 0,1	0,1	0,1	0,2	0,7	0,4	0,1	0,1	1,1	0,0	0,0	0,3	2,8	1,0	0,4	0,2	0,2	0,1
Lysin	2,0	14,9	27,5	38,8	35,2	26,9	20,4	29,3	35,4	39,7	19,8	20,2	33,2	28,4	32,5	20,9	30,0	39,4	26,7
		± 1,9	1,5	2,6	1,6	2,3	8,8	0,3	11,7	1,0	0,2	3,0	2,9	5,8	1,2	8,5	1,2	1,5	0,7
Summe ohne Prolin	839,4	144,7	233,7	309,8	343,8	301,2	183,3	244,2	297,4	312,5	177,8	182,0	322,6	313,3	294,3	182,5	308,9	253,8	212,7
Ammonium	20,5	4,7	3,2	3,1	39,8	34,9	3,3	3,1	6,9	3,9	2,8	2,8	54,0	52,8	58,1	5,2	72,4	7,1	4,6
		± 3,5	0,5	0,1	1,3	11,0	0,2	0,1	1,6	0,9	0,3	0,3	0,4	5,3	0,3	2,1	2,3	0,5	0,5
Prolin	288,5	392,0	324,5	360,5	351,0	307,5	354,1	336,2	478,7	460,7	341,0	342,6	426,3	368,8	436,3	348,6	303,9	333,5	271,0
		± 58,0	29,0	1,0	4,0	0,5	86,7	10,6	26,7	15,3	23,3	30,0	1,9	157,1	16,3	8,0	0,6	11,9	4,0

± gibt die Spannweite der Streuung an (n=2)

Tabelle 31: Versuch 1: Konzentration Aminosäuren nach der Gärung [mg L⁻¹] Jahr 2

Jahr 2	Most	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Arginin	118,2		7,9	12,8	14,9	17,3	7,6	8,7	11,5	12,4	16,4	10,9	7,7	11,9	5,7	11,8	5,8	7,6	8,6	8,3
		±	0,1	0,1	0,5	0,5	0,6	1,1	0,2	0,7	0,4	4,4	0,3	0,1	0,9	0,1	0,1	0,4	0,3	0,1
Asparaginsäure	24,3		4,0	8,3	7,9	8,6	4,4	5,0	6,4	7,0	9,3	6,1	5,0	7,4	3,6	7,2	4,3	5,4	5,2	5,2
		±	0,0	0,1	0,4	0,4	0,1	0,7	0,3	0,4	0,1	1,5	0,1	0,2	0,6	0,7	0,7	0,1	0,2	0,4
Threonin	36,1		2,8	4,0	4,4	4,7	3,0	2,4	3,3	3,6	4,7	3,3	2,5	4,0	2,3	3,6	2,2	3,1	2,7	3,2
		±	0,0	0,1	0,7	0,9	0,3	0,5	0,4	0,3	0,3	1,2	0,2	0,5	0,5	0,4	0,3	0,0	0,1	0,2
Serin	36,0		3,5	5,1	5,7	5,9	3,8	3,7	4,7	5,5	6,1	4,5	3,7	4,8	3,4	4,1	3,2	3,3	3,5	3,7
		±	0,4	0,0	0,0	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	1,1	0,0	0,1	0,5	1,3	0,1	0,2	0,0	0,3
Asparagin	3,2		9,6	12,7	13,0	16,3	9,5	10,4	12,7	13,7	14,5	13,0	9,8	14,2	11,0	15,6	7,4	7,5	8,0	7,5
		±	0,3	0,1	1,2	0,8	0,9	0,7	0,7	0,9	0,9	0,2	0,4	0,1	0,9	1,5	0,6	0,7	0,4	0,1
Glutaminsäure	39,9		17,7	19,7	26,4	31,7	16,7	19,2	23,7	25,5	29,1	20,4	18,4	17,3	15,0	15,2	17,7	14,5	17,4	18,5
		±	1,2	0,3	0,9	3,4	1,8	0,1	0,9	0,6	0,8	8,6	0,4	0,9	1,5	1,9	0,8	0,0	0,1	0,7
Glutamin	49,9		1,2	6,0	5,8	7,5	4,8	4,3	5,0	4,8	4,9	4,5	3,3	4,6	4,2	5,0	3,4	4,0	4,5	4,4
		±	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1	0,2	2,0	0,6	0,2	0,0	0,9	0,6	0,3	1,3	0,3
Glycerin	1,3		4,0	7,6	7,0	7,3	4,7	4,0	5,2	5,9	6,8	5,1	3,8	6,8	3,7	6,5	3,9	4,7	4,7	4,7
		±	0,5	0,4	0,3	0,7	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1	1,2	0,0	0,1	0,5	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0
Alanin	55,5		22,8	25,7	36,8	38,4	21,7	19,1	26,2	29,0	33,8	24,2	20,0	25,6	16,6	23,4	21,8	20,3	25,3	24,7
		±	1,3	0,8	1,2	2,5	1,4	0,1	0,7	1,0	0,1	9,4	0,5	1,0	1,8	0,6	0,9	0,1	0,6	0,5
Valin	50,6		12,0	12,4	13,3	14,7	10,5	10,2	11,1	12,0	12,1	10,0	9,6	11,7	8,7	12,1	12,9	12,5	9,9	9,2
		±	0,1	0,7	0,2	0,4	0,3	0,8	0,1	0,3	0,3	0,9	0,2	0,6	0,1	0,9	0,6	0,4	1,1	0,1
Methionin	5,9		1,6	2,5	2,9	3,2	1,7	1,6	2,2	2,6	3,2	2,0	1,6	2,6	1,6	2,3	2,6	2,4	2,2	1,8
		±	0,0	0,2	0,0	0,6	0,3	0,2	0,0	0,1	0,1	0,7	0,0	0,1	0,5	0,3	1,8	0,2	0,1	0,4
Isoleucin	29,9		1,7	3,1	3,0	3,5	1,7	1,6	2,2	2,9	3,5	2,1	1,5	3,0	1,3	3,0	1,5	1,9	1,5	1,6
		±	0,4	0,3	0,4	0,2	0,1	0,0	0,3	0,2	0,1	0,5	0,0	0,3	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1
Leucin	38,7		8,0	13,5	14,4	15,7	8,1	7,8	11,2	13,2	15,9	10,2	7,6	12,8	6,1	12,3	7,0	8,4	8,0	8,2
		±	0,7	0,9	1,2	0,7	0,9	0,1	0,3	0,9	0,4	3,1	0,1	0,6	0,9	0,2	1,0	0,1	0,0	0,3
Tyrosin	6,1		5,0	6,5	7,5	8,2	4,7	4,7	6,5	7,3	8,7	5,8	4,5	6,2	3,8	6,9	4,7	5,2	5,1	5,1
		±	0,2	0,0	0,0	0,6	0,8	0,8	0,4	0,2	0,4	1,6	0,2	0,2	0,9	1,3	0,6	0,0	0,2	0,2
Phenylalanin	30,4		5,6	8,3	8,5	8,9	5,8	6,1	7,8	9,2	10,5	7,8	5,9	8,9	4,8	9,3	5,4	6,9	6,1	6,4
		±	0,5	0,4	1,2	1,5	1,2	0,4	0,1	1,0	0,4	2,5	0,3	0,4	1,6	0,0	0,4	0,0	1,0	0,5
GABA	63,5		3,8	7,2	6,6	6,7	8,1	2,9	3,5	3,6	4,3	3,9	2,9	6,5	6,9	7,5	4,4	9,4	7,4	6,8
		±	0,1	0,1	0,6	0,7	0,8	0,1	0,0	0,0	0,2	1,5	0,3	0,1	0,6	0,0	0,8	0,1	0,5	0,7
Histidin	14,0		4,4	6,4	8,0	8,7	4,3	4,7	6,3	7,3	8,6	5,9	4,4	6,3	3,5	6,5	4,0	4,7	4,9	5,1
		±	0,8	0,7	0,5	0,6	0,4	0,3	0,2	0,5	0,3	2,2	0,1	0,1	0,4	0,6	0,1	0,1	0,2	0,3
Tryptophan	5,4		n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.								
		±																		
Ornithin	0,6		0,4	0,5	0,6	0,6	0,4	0,4	0,5	0,6	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4
		±	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0
Lysin	2,8		10,1	22,4	19,0	21,0	11,4	10,3	14,9	17,1	21,2	14,8	10,4	19,3	8,8	18,7	8,4	12,3	9,8	10,4
		±	0,5	0,5	0,6	1,3	0,8	0,5	0,4	0,7	0,4	4,9	0,4	0,7	1,2	0,2	1,2	0,0	0,2	0,7
Summe ohne Prolin	612,4		126,2	184,7	205,6	229,0	132,7	127,0	164,8	183,4	214,0	154,8	123,1	174,3	111,3	171,5	121,2	134,4	135,2	135,2
Ammonium	17,7		1,4	1,8	1,7	1,6	1,7	1,3	1,5	1,4	1,5	1,5	1,3	1,7	1,4	1,6	1,5	1,7	1,5	1,6
		±	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0
Prolin	202,9		200,1	168,5	181,2	182,2	164,9	200,6	197,1	251,9	251,4	196,1	202,2	241,9	147,2	222,3	179,7	153,6	177,0	190,1
		±	8,0	0,6	1,3	8,2	3,0	3,2	7,6	5,1	2,2	2,1	2,2	1,5	3,6	3,4	1,7	0,2	1,8	5,1

± gibt die Spannweite der Streuung an (n=2)

Tabelle 32: Versuch 1: Konzentration Aminosäuren nach der Gärung [mg L⁻¹] Jahr 3

Jahr 3	Most	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Arginin	92,8		8,6	18,1	24,9	26,9	11,6	9,3	11,1	13,8	18,2	7,6	7,2	15,9	15,5	16,1	6,6	20,3	11,8	8,2
		±	0,0	0,2	0,1	0,0	0,4	0,3	2,5	2,6	3,0	0,4	0,9	3,4	0,9	0,9	1,1	0,6	2,1	1,1
Asparaginsäure	27,8		8,0	16,1	20,1	26,3	15,0	8,0	9,4	11,7	16,2	6,0	6,7	18,8	21,6	17,0	5,1	23,1	10,4	8,0
		±	0,4	3,2	0,6	0,4	1,6	0,4	4,8	4,4	5,7	0,3	2,6	12,5	3,2	2,7	0,3	2,0	4,4	0,2
Threonin	40,6		2,4	4,3	5,2	6,9	3,6	2,8	3,2	4,0	5,2	2,0	2,3	6,0	5,9	5,7	2,1	6,8	3,4	3,0
		±	0,2	0,8	0,8	0,2	0,0	0,1	1,3	1,5	2,1	0,3	0,8	4,5	1,0	0,6	0,3	0,5	1,3	0,2
Serin	31,6		3,1	5,5	7,4	8,2	3,5	3,7	4,0	4,8	6,2	2,6	3,1	6,2	6,0	5,5	2,7	7,1	4,3	3,5
		±	0,1	0,9	0,4	0,2	0,1	0,1	1,5	1,7	2,5	0,3	0,9	4,7	1,1	0,5	0,3	0,8	1,5	0,1
Asparagin	4,4		4,2	6,9	10,0	18,8	21,2	4,3	4,5	5,7	7,2	3,3	3,6	11,9	28,3	13,0	3,5	35,3	5,3	4,4
		±	0,4	0,5	1,5	0,7	0,2	0,5	1,6	1,6	3,1	0,3	1,3	8,1	2,0	2,1	0,3	1,2	1,3	0,3
Glutaminsäure	39,4		16,7	21,9	31,2	32,1	17,6	17,2	18,9	23,0	27,0	14,0	16,7	17,6	25,6	17,0	15,5	28,5	20,7	20,0
		±	0,6	1,5	0,2	0,0	1,8	1,0	3,8	4,6	8,8	0,2	3,2	10,6	2,3	2,4	1,2	1,6	5,1	2,3
Glutamin	94,2		2,3	4,2	4,8	2,1	1,4	2,7	3,2	3,1	3,3	2,2	2,3	3,6	3,7	7,0	4,9	7,4	3,4	3,8
		±	0,6	0,7	0,1	0,3	0,5	1,1	0,5	0,1	1,8	0,3	0,4	1,8	0,1	0,0	0,6	0,1	0,2	0,5
Glycerin	2,0		3,8	8,8	8,6	10,3	7,4	3,7	4,5	5,5	7,2	3,1	3,3	8,4	8,6	8,9	2,9	9,6	4,6	4,1
		±	0,3	1,0	0,6	0,2	0,5	0,1	1,4	1,3	1,8	0,2	0,9	4,8	0,9	1,0	0,2	0,4	1,5	0,1
Alanin	24,9		13,5	19,0	25,5	41,7	23,4	15,0	18,4	21,7	24,8	13,7	14,9	19,0	26,8	18,0	13,8	29,7	17,1	16,0
		±	0,1	0,8	0,9	0,3	1,8	0,1	4,4	4,2	4,1	0,6	2,3	11,2	2,5	2,6	1,5	0,6	3,8	0,4
Valin	56,1		3,6	7,3	8,7	11,7	4,4	4,2	4,7	6,3	8,1	2,6	3,1	10,2	8,7	8,0	2,7	11,0	4,3	4,2
		±	0,0	0,7	0,4	0,7	0,4	0,1	1,9	4,1	3,7	0,5	0,2	9,1	2,8	2,0	0,1	0,4	1,1	0,2
Methionin	6,1		3,5	5,5	6,7	7,4	3,8	4,1	4,3	4,9	6,4	2,8	3,5	6,2	6,1	6,0	3,2	7,4	4,3	4,1
		±	0,2	0,9	0,6	0,2	0,0	0,1	2,2	1,4	1,9	0,6	0,9	4,0	1,9	1,2	0,2	0,2	0,3	0,1
Isoleucin	58,5		2,7	4,3	6,4	7,6	3,6	2,5	3,4	3,9	5,7	2,2	2,3	6,1	6,0	5,0	2,1	6,9	2,6	2,6
		±	0,4	0,4	0,0	0,0	0,2	0,4	1,7	1,3	2,2	0,9	0,8	5,8	1,7	1,7	0,4	1,1	0,3	0,5
Leucin	88,0		8,7	18,0	24,2	29,7	12,5	9,1	11,0	14,6	19,2	6,5	7,5	20,4	19,5	18,2	6,4	23,5	11,1	8,5
		±	2,0	2,9	1,3	0,3	0,7	1,0	7,2	7,2	7,9	2,4	3,7	18,4	4,7	4,7	1,4	2,9	4,8	2,0
Tyrosin	9,3		4,7	8,8	12,0	13,3	5,8	5,2	5,6	7,3	9,5	3,4	3,7	8,4	8,5	8,4	3,2	9,9	5,6	4,2
		±	1,1	0,5	0,9	0,5	0,1	0,6	3,5	2,9	5,3	1,3	1,0	5,4	1,7	2,1	0,8	1,6	2,2	1,0
Phenylalanin	62,8		5,1	9,0	12,0	14,3	6,3	5,6	6,2	8,2	10,9	3,8	4,1	11,5	11,2	10,6	3,8	14,5	6,5	5,2
		±	0,9	1,4	0,4	0,1	0,8	0,1	3,8	3,5	3,9	0,9	1,7	10,4	3,9	1,6	0,5	1,3	2,5	0,5
GABA	38,2		3,7	5,5	5,1	13,5	21,4	6,3	6,1	6,9	8,1	5,5	5,9	10,6	28,9	12,0	8,8	29,5	7,5	9,2
		±	0,1	0,0	1,7	0,6	0,5	0,5	0,4	1,6	0,9	0,1	0,4	5,0	1,0	0,4	0,1	1,2	0,7	0,1
Histidin	18,0		2,6	5,9	7,8	9,8	4,1	2,9	3,4	4,4	6,3	2,2	2,4	5,9	6,1	5,6	2,0	7,3	4,3	3,4
		±	0,2	1,1	0,1	0,3	0,5	0,1	1,7	1,6	2,1	0,1	0,9	4,0	0,7	1,0	0,2	0,3	1,6	0,1
Tryptophan	16,4		1,2	2,6	3,6	4,1	1,7	1,4	0,9	1,8	1,8	0,7	1,0	2,2	2,6	2,4	0,5	0,9	0,8	1,4
		±	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,4	0,9	0,6	0,3	1,1	0,3	0,7	0,2	0,1	0,6	0,4
Ornithin	0,6		0,3	0,3	0,7	1,1	1,1	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	1,2	2,5	0,5	0,4	2,1	0,6	0,4
		±	0,0	0,1	0,3	0,2	0,0	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1	1,6	0,4	0,0	0,1	0,4	0,1	0,0
Lysin	3,5		11,5	28,2	31,6	36,9	16,8	11,7	14,3	18,3	24,1	8,5	9,7	26,3	23,8	27,9	7,6	28,5	16,1	10,9
		±	1,3	2,8	1,4	0,3	1,7	0,7	7,9	8,0	8,2	0,1	3,4	19,2	2,3	5,6	1,5	4,3	7,4	0,4
Summe ohne Prolin	715,2		110,2	200,3	256,4	322,6	186,2	119,9	137,4	170,2	215,6	92,9	103,6	216,5	265,9	212,8	97,6	309,2	144,6	125,0
Ammonium	17,0		1,5	2,7	2,9	55,7	51,6	2,2	2,7	2,7	3,4	1,6	2,1	67,9	50,5	70,2	1,9	46,1	2,4	2,1
		±	0,6	0,3	1,2	0,4	0,9	0,3	1,1	0,5	1,1	0,6	0,7	4,1	3,7	0,6	0,1	0,2	0,5	0,2
Prolin	134,3		129,1	99,4	115,3	107,8	104,3	127,2	124,3	264,9	260,7	129,2	125,6	213,3	100,7	226,8	115,4	104,3	123,7	134,4
		±	3,6	0,2	0,0	0,1	1,8	6,5	4,0	10,7	4,9	1,6	6,0	2,4	2,9	2,0	0,3	1,1	5,3	1,0

± gibt die Spannweite der Streuung an (n=2)

Tabelle 33: Versuch 1: Konzentration Aromastoffe nach der Gärung Jahr 1

Jahr 1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Essigsäureethylester [mg L ⁻¹]		56,6	30,1	46,5	40,4	25,7	60,9	53,1	51,7	52,2	53,6	42,6	13,4	26,8	25,9	33,1	27,5	44,3	35,6
	±	5,4	0,8	1,2	2,3	5,1	29,7	15,1	5,8	8,5	9,6	15,0	10,0	1,6	2,2	27,2	0,1	9,0	1,7
Essigsäure-2-phenylethylester [µg L ⁻¹]		296,8	203,1	178,2	218,9	271,8	289,2	272,0	294,2	240,9	274,1	279,3	242,9	252,3	266,1	331,9	283,1	266,9	278,8
	±	19,4	10,1	9,2	21,9	32,5	10,0	3,9	4,9	5,1	22,8	9,3	16,1	10,7	8,5	42,2	9,9	2,3	13,0
Essigsäure-2-methylbutylester [µg L ⁻¹]		67,4	67,2	70,1	80,5	81,0	63,4	84,1	88,9	102,3	66,8	78,5	102,2	87,8	108,4	75,1	112,6	61,7	72,9
	±	15,4	32,9	7,0	1,9	11,7	9,3	3,2	6,5	9,6	4,0	1,2	33,3	29,3	4,3	4,5	29,8	0,1	4,3
Essigsäure-3-methylbutylester [µg L ⁻¹]		675,1	1054,0	751,5	1030,4	1244,5	656,5	839,4	1013,1	964,7	552,1	650,7	1571,3	1087,2	1591,8	872,6	1186,7	790,6	735,2
	±	27,4	2,9	45,4	81,6	133,8	60,1	10,3	139,4	115,5	99,9	41,4	267,1	24,4	63,2	173,3	65,8	76,4	74,8
Essigsäurehexylester [µg L ⁻¹]		66,6	67,5	76,9	85,3	84,7	64,6	81,8	85,5	88,3	66,0	71,0	87,3	72,5	89,1	68,5	74,9	70,7	69,2
	±	2,7	0,8	1,2	3,8	4,0	2,9	4,0	2,1	7,9	6,0	1,7	7,4	4,5	6,6	7,4	0,7	3,5	4,2
Propionsäureethylester [µg L ⁻¹]		87,2	130,4	90,6	90,6	107,5	98,6	82,4	82,4	81,7	80,8	83,7	102,1	105,2	98,4	88,5	127,0	92,2	84,6
	±	15,8	5,4	6,7	10,4	8,4	8,0	10,1	7,6	14,8	9,6	3,1	7,0	9,7	13,1	5,7	7,9	5,3	1,6
i-Buttersäureethylester [µg L ⁻¹]		138,3	112,9	108,5	103,2	111,7	129,5	121,1	113,2	99,3	119,7	137,5	84,4	105,9	95,5	145,7	132,3	111,1	106,0
	±	9,4	0,7	3,0	2,3	4,7	17,9	13,9	2,7	6,8	10,3	6,9	9,5	5,7	2,8	7,5	10,7	4,5	16,5
Buttersäureethylester [µg L ⁻¹]		774,7	962,1	1038,2	1225,9	905,8	747,4	940,1	994,1	1048,5	720,7	797,3	948,6	749,6	886,6	742,0	769,3	872,5	801,6
	±	12,0	18,8	27,7	106,1	43,6	41,6	52,9	103,2	63,0	34,2	34,0	24,1	1,9	10,8	13,1	41,8	64,7	87,3
Capronsäureethylester [µg L ⁻¹]		686,2	737,0	781,7	814,3	796,6	719,4	755,6	797,7	767,4	656,5	724,0	698,2	604,8	667,8	647,6	593,2	796,0	793,3
	±	34,4	7,6	26,0	25,6	1,1	14,0	31,0	59,3	101,9	52,2	12,7	20,3	35,8	10,2	20,8	20,2	60,6	18,7
Caprylsäureethylester [µg L ⁻¹]		722,6	696,1	815,9	753,7	763,3	678,1	792,3	804,3	819,5	642,6	730,1	603,7	531,4	591,3	625,8	525,5	716,7	780,1
	±	24,6	53,5	16,0	50,3	8,6	45,0	9,9	85,0	131,0	47,1	26,3	49,8	43,9	9,4	47,4	20,5	31,3	35,3
Caprinsäureethylester [µg L ⁻¹]		192,5	165,5	211,1	189,5	204,9	164,1	217,3	193,3	219,2	150,9	214,5	124,3	141,9	118,4	155,4	120,2	169,7	224,1
	±	9,8	13,9	3,5	15,5	17,6	16,1	4,9	31,9	28,9	24,1	19,1	27,0	21,6	43,3	2,5	15,0	20,7	5,9
2-Phenylethanol [mg L ⁻¹]		53,6	31,7	26,3	22,9	35,8	65,6	44,5	40,0	31,2	57,0	52,5	26,4	43,8	29,0	59,3	46,8	51,5	53,7
	±	1,0	1,9	1,6	0,9	0,8	10,3	2,3	4,7	4,0	3,7	1,6	0,3	1,9	1,5	6,5	0,7	5,9	5,1
i-Butanol [mg L ⁻¹]		41,1	28,7	32,9	35,1	29,0	34,0	42,8	41,0	40,1	42,6	42,9	24,9	27,5	23,9	41,4	31,8	23,5	27,4
	±	1,4	0,6	1,7	2,9	1,0	6,2	9,0	3,2	8,8	6,4	2,6	4,1	0,2	1,0	3,1	2,6	2,0	2,1
2-Methylbutanol [mg L ⁻¹]		27,5	18,3	14,3	13,4	22,1	33,7	26,7	32,0	31,8	34,3	24,3	21,8	26,5	21,8	33,8	42,7	32,0	22,2
	±	5,6	1,4	2,7	2,8	0,8	2,7	4,1	0,6	7,9	13,1	0,7	2,1	2,3	6,0	15,6	9,7	18,2	0,0
3-Methylbutanol [mg L ⁻¹]		27,5	18,3	14,3	13,4	22,1	33,7	26,7	32,0	31,8	34,3	24,3	21,8	26,5	21,8	33,8	42,7	32,0	22,2
	±	5,6	1,4	2,7	2,8	0,8	2,7	4,1	0,6	7,9	13,1	0,7	2,1	2,3	6,0	15,6	9,7	18,2	0,0
Hexanol [µg L ⁻¹]		535,8	544,4	570,1	527,3	557,9	643,1	615,9	603,9	617,5	598,6	566,5	502,4	573,7	479,4	565,3	607,8	667,0	572,5
	±	59,8	15,3	64,7	24,4	35,4	40,0	35,3	19,0	86,1	36,5	24,1	33,9	13,0	40,5	61,6	59,6	27,1	50,1
Milchsäureethylester [mg L ⁻¹]		5,3	17,7	12,7	13,2	11,7	4,3	7,7	8,5	11,9	5,9	4,8	15,3	11,8	12,7	5,5	11,6	8,3	7,9
	±	0,5	1,4	1,0	1,2	0,6	0,9	1,1	1,1	2,1	0,2	0,2	1,1	0,3	0,4	0,7	1,2	0,2	0,1
Bernsteinsäurediethylester [µg L ⁻¹]		1801,9	1975,2	1161,4	1011,8	1816,2	1646,1	1471,5	1276,5	1207,0	1669,4	1503,6	1433,9	2050,0	1780,8	1847,4	2330,4	1624,3	1903,0
	±	22,3	158,9	18,5	27,1	115,8	76,6	331,8	227,2	87,0	101,0	41,1	374,9	10,9	188,5	173,4	13,8	171,1	207,3
Capronsäure [mg L ⁻¹]		3,9	3,7	4,2	4,2	3,7	4,7	4,6	5,2	5,8	4,8	3,9	4,1	3,6	3,9	4,3	3,9	6,0	4,6
	±	0,3	0,1	0,6	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	0,9	1,0	0,1	0,2	0,2	0,5	0,7	0,3	2,4	0,2
Caprylsäure [mg L ⁻¹]		5,5	5,3	6,2	5,7	5,8	5,2	6,0	6,1	6,2	4,9	5,6	4,6	4,0	4,5	4,8	4,0	5,4	5,9
	±	0,2	0,4	0,1	0,4	0,1	0,3	0,1	0,7	1,0	0,4	0,2	0,4	0,3	0,1	0,4	0,2	0,2	0,3
Caprinsäure [mg L ⁻¹]		1,3	1,2	1,6	1,3	1,4	1,2	1,6	1,4	1,6	1,2	1,6	1,0	1,1	0,9	1,2	0,9	1,4	1,6
± gibt die Standardabweichung an (n=2)	±	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,0	0,1	0,2	0,3	0,1	0,0	0,2	0,0

Tabelle 34: Versuch 1: Konzentration Aromastoffe nach der Gärung Jahr 2

Jahr 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Essigsäureethylester [mg L ⁻¹]	19,7	23,5	7,8	7,8	20,6	20,1	16,6	13,6	13,8	18,8	21,5	5,1	2,7	5,0	20,0	2,2	17,2	18,1
±	6,3	2,6	5,5	4,4	0,8	3,1	5,7	4,8	4,5	0,0	1,3	0,0	1,9	0,4	3,1	1,1	0,6	5,1
Essigsäure-2-phenylethylester [µg L ⁻¹]	101,3	88,0	109,5	100,6	104,2	110,6	78,3	91,3	75,5	106,4	109,1	115,6	75,5	103,1	93,6	101,5	78,7	93,0
±	9,8	3,5	1,9	2,5	13,3	8,8	11,2	3,6	4,1	10,7	3,9	19,1	3,9	2,4	7,5	21,8	1,4	1,2
Essigsäure-2-methylbutylester [µg L ⁻¹]	20,8	39,2	34,0	27,0	34,1	30,0	28,8	29,3	35,8	29,8	25,8	35,1	36,1	47,3	27,4	37,6	27,4	32,8
±	5,4	7,0	5,9	3,3	0,2	4,4	3,2	1,4	3,6	7,2	1,8	6,2	8,4	6,8	5,2	6,3	6,9	0,6
Essigsäure-3-methylbutylester [µg L ⁻¹]	500,3	752,3	838,4	769,4	738,1	542,0	624,4	708,1	792,9	621,8	537,8	1028,0	676,0	1039,4	490,6	732,8	612,0	606,1
±	15,4	10,0	134,9	51,8	79,4	16,8	50,8	1,0	20,8	65,4	12,9	67,5	44,0	46,0	15,4	24,9	15,4	66,2
Essigsäurehexylester [µg L ⁻¹]	31,4	28,7	39,1	35,4	27,5	33,4	34,0	36,7	43,1	33,3	33,5	38,1	22,5	34,8	27,1	23,8	27,3	28,7
±	0,5	1,6	3,6	1,4	2,3	0,2	0,6	1,0	0,5	2,7	2,6	0,5	0,3	1,8	0,2	0,8	0,6	3,1
Propionsäureethylester [µg L ⁻¹]	57,3	92,9	68,9	69,2	85,5	57,8	56,1	55,4	59,0	62,4	58,0	93,7	91,6	97,2	62,8	86,9	75,5	79,9
±	5,0	9,3	11,9	8,9	8,7	0,2	6,0	2,9	0,1	0,5	0,4	2,4	2,2	3,3	0,5	3,6	3,7	3,0
i-Buttersäureethylester [µg L ⁻¹]	100,2	110,5	104,9	93,9	110,5	100,2	113,6	89,3	84,8	103,1	118,1	94,7	134,7	107,0	131,1	132,7	140,1	143,3
±	6,4	3,4	7,7	6,2	0,5	6,3	20,1	7,0	4,5	0,1	4,5	2,4	0,2	1,4	7,8	8,3	15,6	9,8
Buttersäureethylester [µg L ⁻¹]	102,0	121,1	147,2	149,7	108,1	103,7	109,7	124,7	146,8	117,6	109,6	141,7	105,9	137,2	100,1	92,4	102,2	111,4
±	7,7	3,8	21,9	12,9	8,2	4,8	14,6	2,4	4,1	5,4	5,3	0,3	0,3	8,4	0,8	1,8	5,0	9,4
Capronsäureethylester [µg L ⁻¹]	451,4	412,0	530,3	541,4	397,0	485,1	471,9	499,4	540,4	479,5	493,9	459,3	358,9	424,1	399,8	308,5	383,9	448,1
±	14,3	21,0	8,8	5,4	15,5	19,1	17,2	4,3	9,2	4,2	54,5	16,0	16,4	11,1	4,3	13,6	9,1	31,4
Caprylsäureethylester [µg L ⁻¹]	562,7	434,8	632,7	650,1	434,7	565,2	586,2	633,4	670,4	585,7	640,0	510,9	383,7	424,3	471,8	292,9	352,5	540,7
±	5,0	48,4	23,1	36,7	9,8	32,2	23,2	43,1	40,9	70,4	63,1	73,6	44,7	32,4	7,1	12,8	4,0	38,0
Caprinsäureethylester [µg L ⁻¹]	140,1	124,9	188,6	185,9	118,1	150,9	177,4	193,8	194,0	163,0	185,1	137,0	107,2	106,4	127,2	70,2	87,0	162,9
±	25,6	14,4	9,6	25,8	3,0	5,6	10,0	10,1	22,8	45,8	1,5	28,0	5,8	15,6	37,8	3,5	3,9	22,1
2-Phenylethanol [mg L ⁻¹]	37,9	31,7	31,5	30,0	41,7	38,5	27,0	26,2	21,2	35,0	37,5	33,8	43,5	35,5	38,8	43,2	35,5	41,2
±	4,3	2,0	6,4	2,9	0,3	5,4	1,4	2,3	0,7	1,1	1,5	1,6	1,3	4,3	3,1	4,5	2,0	1,8
i-Butanol [mg L ⁻¹]	15,5	14,7	18,6	18,4	14,7	14,9	16,1	16,4	18,1	15,6	16,0	15,6	19,4	16,7	17,0	13,5	14,9	16,5
±	0,5	1,0	2,3	1,1	1,1	1,0	0,9	0,2	0,6	0,3	0,0	2,4	1,0	0,3	1,7	1,9	0,0	0,3
2-Methylbutanol [mg L ⁻¹]	19,9	26,4	24,4	21,1	31,3	19,3	18,0	17,2	17,1	19,3	17,7	26,3	37,7	34,8	21,6	32,7	20,8	26,1
±	3,6	0,7	7,6	4,1	0,8	2,2	1,0	0,1	0,1	1,1	2,2	4,7	3,8	0,5	2,4	1,2	0,2	1,8
3-Methylbutanol [mg L ⁻¹]	88,4	94,4	102,9	97,6	113,1	86,6	84,8	84,9	78,6	92,1	89,1	103,7	126,8	116,5	90,1	113,0	93,1	105,3
±	19,0	8,5	33,3	18,8	7,2	6,3	2,9	2,8	1,7	7,7	10,0	12,4	11,9	0,6	9,5	5,7	0,0	9,5
Hexanol [µg L ⁻¹]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
±	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Milchsäureethylester [mg L ⁻¹]	6,0	15,8	12,4	13,0	11,6	5,5	6,2	8,5	9,6	8,3	6,2	15,0	13,2	16,1	6,4	10,9	6,8	9,8
±	0,8	0,1	3,1	2,5	1,0	0,9	0,8	0,8	0,6	0,4	0,4	2,1	1,0	0,4	0,7	0,6	0,4	1,1
Bernsteinsäurediethylester [µg L ⁻¹]	1684,9	2243,5	1668,9	1819,3	2138,7	1663,4	1647,4	1485,9	1529,4	1698,6	1688,2	2148,7	2408,5	2164,0	1938,7	2029,3	1701,4	2070,1
±	0,2	66,5	18,5	78,7	65,0	34,7	3,4	157,6	80,4	223,2	47,9	158,5	263,6	114,5	88,9	164,9	22,1	61,4
Capronsäure [mg L ⁻¹]	2,2	2,0	2,6	2,6	1,7	2,3	2,3	2,7	2,8	2,5	2,3	2,3	1,8	2,1	1,9	1,5	1,9	2,3
±	0,3	0,1	0,1	0,0	0,1	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2
Caprylsäure [mg L ⁻¹]	2,8	2,2	3,2	3,2	2,0	2,9	3,0	3,5	3,5	3,1	3,2	2,7	2,0	2,3	2,5	1,7	2,0	2,8
±	0,0	0,1	0,2	0,3	0,0	0,1	0,1	0,3	0,4	0,5	0,1	0,4	0,2	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0
Caprinsäure [mg L ⁻¹]	0,9	0,8	1,2	1,2	0,7	1,0	1,0	1,2	1,2	1,1	1,2	1,0	0,7	0,8	0,8	0,5	0,6	1,1
± gibt die Standardabweichung an (n=2)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0

Tabelle 35: Versuch 1: Konzentration Aromastoffe nach der Gärung Jahr 3

Jahr 3		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Essigsäureethylester [mg L ⁻¹]		50,0	76,6	25,0	70,6	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	112,4	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
	±	0,0	13,2	0,0	14,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Essigsäure-2-phenylethylester [µg L ⁻¹]		1033,4	1142,3	749,1	919,4	1356,1	1219,0	1192,9	1118,7	797,3	1213,8	1100,9	982,4	1148,9	882,2	1094,3	1128,2	1007,7	1330,7
	±	270,6	3,2	34,3	7,5	31,8	117,1	25,2	68,7	81,4	11,1	22,9	99,2	3,3	44,5	21,2	42,5	96,1	36,8
Essigsäure-2-methylbutylester [µg L ⁻¹]		145,8	213,5	129,7	145,0	196,4	153,1	152,9	160,1	129,7	142,1	137,8	226,6	175,0	184,2	133,7	170,2	115,2	171,3
	±	3,4	23,0	19,0	12,4	2,0	12,4	7,4	10,3	10,5	11,2	14,9	28,3	27,8	7,1	1,8	17,6	2,9	1,4
Essigsäure-3-methylbutylester [µg L ⁻¹]		2512,2	4351,5	2935,8	3665,1	4238,3	2401,6	2767,1	3376,0	3157,7	2621,6	2356,8	4824,9	3566,9	3997,6	2299,8	3621,3	2719,1	3175,5
	±	114,2	104,1	45,6	59,2	80,7	62,2	44,7	240,2	15,6	89,7	12,8	291,2	217,9	10,8	90,3	204,1	313,6	201,4
Essigsäurehexylester [µg L ⁻¹]		275,4	416,4	367,3	401,4	375,2	268,0	334,8	372,9	336,1	309,9	261,4	448,4	287,5	355,9	213,3	266,0	257,9	353,9
	±	6,9	13,2	16,3	5,0	4,2	20,8	16,6	26,0	21,0	40,4	1,5	19,7	1,1	12,9	9,5	10,3	30,4	1,4
Propionsäureethylester [µg L ⁻¹]		23,6	47,8	24,2	27,8	43,2	32,6	20,5	23,7	23,1	26,1	26,0	39,6	64,8	50,2	45,6	60,5	33,1	42,5
	±	1,4	3,4	2,5	1,4	3,1	3,4	1,4	0,7	2,2	1,0	0,4	1,8	5,0	0,6	6,2	1,9	5,9	5,2
i-Buttersäureethylester [µg L ⁻¹]		39,4	24,4	34,8	27,6	26,9	44,0	37,2	41,7	29,8	39,3	43,3	27,2	41,6	33,5	58,9	39,9	36,6	45,0
	±	3,9	3,3	4,4	0,8	1,0	2,0	5,7	4,9	2,3	0,2	1,9	1,9	2,5	3,0	2,5	3,7	1,5	2,8
Buttersäureethylester [µg L ⁻¹]		213,7	284,2	307,5	339,9	242,4	205,0	212,8	260,4	268,4	205,1	190,8	299,5	210,5	261,4	190,7	208,3	213,1	259,8
	±	4,0	0,2	10,1	2,6	12,8	7,7	18,4	9,8	7,0	16,8	3,5	4,0	3,7	1,7	7,1	0,8	15,2	30,7
Capronsäureethylester [µg L ⁻¹]		751,4	844,7	798,8	842,9	818,4	762,3	741,5	818,5	730,2	761,5	694,9	870,6	647,2	736,0	595,9	622,1	736,4	868,2
	±	6,4	39,4	7,8	8,1	9,2	27,8	62,9	25,4	4,3	68,7	20,2	10,2	4,4	15,8	20,9	12,0	54,9	25,2
Caprylsäureethylester [µg L ⁻¹]		1444,9	1482,9	1606,3	1629,9	1406,0	1544,1	1608,4	1793,0	1511,9	1423,0	1412,8	1589,0	1120,6	1254,2	1118,7	1059,2	1415,9	1566,7
	±	14,3	3,5	22,9	28,7	29,0	169,6	148,7	26,8	36,6	14,7	28,1	33,7	6,9	75,4	15,2	3,7	71,8	84,6
Caprinsäureethylester [µg L ⁻¹]		680,8	349,8	492,1	465,7	334,1	455,5	462,8	520,3	429,1	405,1	410,1	392,1	263,5	308,4	326,5	254,9	370,8	436,4
	±	396,2	17,3	19,4	21,1	14,6	44,0	51,6	3,8	27,7	13,9	1,9	7,5	18,4	23,4	3,4	19,5	28,0	19,1
2-Phenylethanol [mg L ⁻¹]		78,4	40,3	30,0	32,4	62,1	80,5	65,4	52,2	36,6	72,4	71,9	34,6	65,2	36,0	78,0	67,4	65,6	64,0
	±	1,3	1,9	2,6	1,6	1,0	6,9	2,4	0,3	1,9	6,2	1,2	0,4	10,1	2,7	0,1	3,4	1,5	1,7
i-Butanol [mg L ⁻¹]		27,1	18,7	23,3	27,6	21,6	20,9	27,1	31,5	31,7	25,4	26,5	19,5	23,9	18,5	26,4	23,7	19,5	17,2
	±	2,0	0,2	0,0	1,8	0,3	1,5	2,9	2,3	1,7	4,9	0,2	1,5	3,5	0,5	0,6	1,8	0,9	0,3
2-Methylbutanol [mg L ⁻¹]		50,2	39,4	29,6	33,4	50,5	50,8	40,1	44,8	38,7	47,3	48,3	41,3	56,9	39,9	55,2	56,6	43,8	40,9
	±	2,9	1,0	1,5	1,8	0,8	0,3	2,6	1,9	1,8	6,3	0,6	2,4	10,2	1,0	1,6	5,1	2,5	2,8
3-Methylbutanol [mg L ⁻¹]		173,1	156,9	120,1	143,1	200,4	167,6	158,1	169,2	152,6	166,0	168,7	168,1	211,7	156,7	184,9	218,6	178,0	161,2
	±	9,7	0,1	6,6	7,5	3,9	2,6	12,3	7,5	7,6	20,5	0,9	5,3	37,5	0,6	2,8	21,3	10,4	9,5
Hexanol [µg L ⁻¹]		1267,8	900,0	979,4	1013,6	1043,1	1237,5	1121,3	1099,6	981,5	1191,9	1167,3	873,0	1038,5	806,6	1193,9	1091,9	989,0	1010,1
	±	62,1	13,6	13,3	16,5	19,5	50,2	6,9	5,8	20,9	1,2	4,7	28,2	113,1	37,7	12,6	38,6	77,3	83,4
Milchsäureethylester [mg L ⁻¹]		1,1	5,0	3,2	3,9	3,2	0,6	1,2	2,1	2,4	1,1	0,9	4,2	4,2	3,8	1,4	4,8	2,0	1,9
	±	0,0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,7	0,7	0,1	0,0	0,5	0,1	0,5
Bernsteinsäurediethylester [µg L ⁻¹]		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	±	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Capronsäure [mg L ⁻¹]		9,8	10,2	9,7	10,2	9,1	8,3	8,5	9,4	8,5	7,7	7,4	9,1	7,3	7,4	7,1	7,9	8,5	8,5
	±	0,2	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,1	0,3	0,4	0,2	0,0	0,3	0,7	0,3	0,3	0,1	0,0	0,4
Caprylsäure [mg L ⁻¹]		10,0	10,0	10,8	10,6	10,0	9,8	10,4	11,6	10,4	9,6	9,1	10,8	8,4	9,5	8,8	8,2	10,5	11,3
	±	0,1	0,2	0,1	0,4	0,5	1,1	0,3	0,2	0,0	0,4	0,0	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,5	1,0
Caprinsäure [mg L ⁻¹]		2,0	1,9	3,0	2,8	2,0	2,6	2,6	3,0	2,4	2,3	2,1	2,0	1,6	1,8	1,9	1,4	2,3	2,7
± gibt die Standardabweichung an (n=2)	±	0,7	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,3	0,0

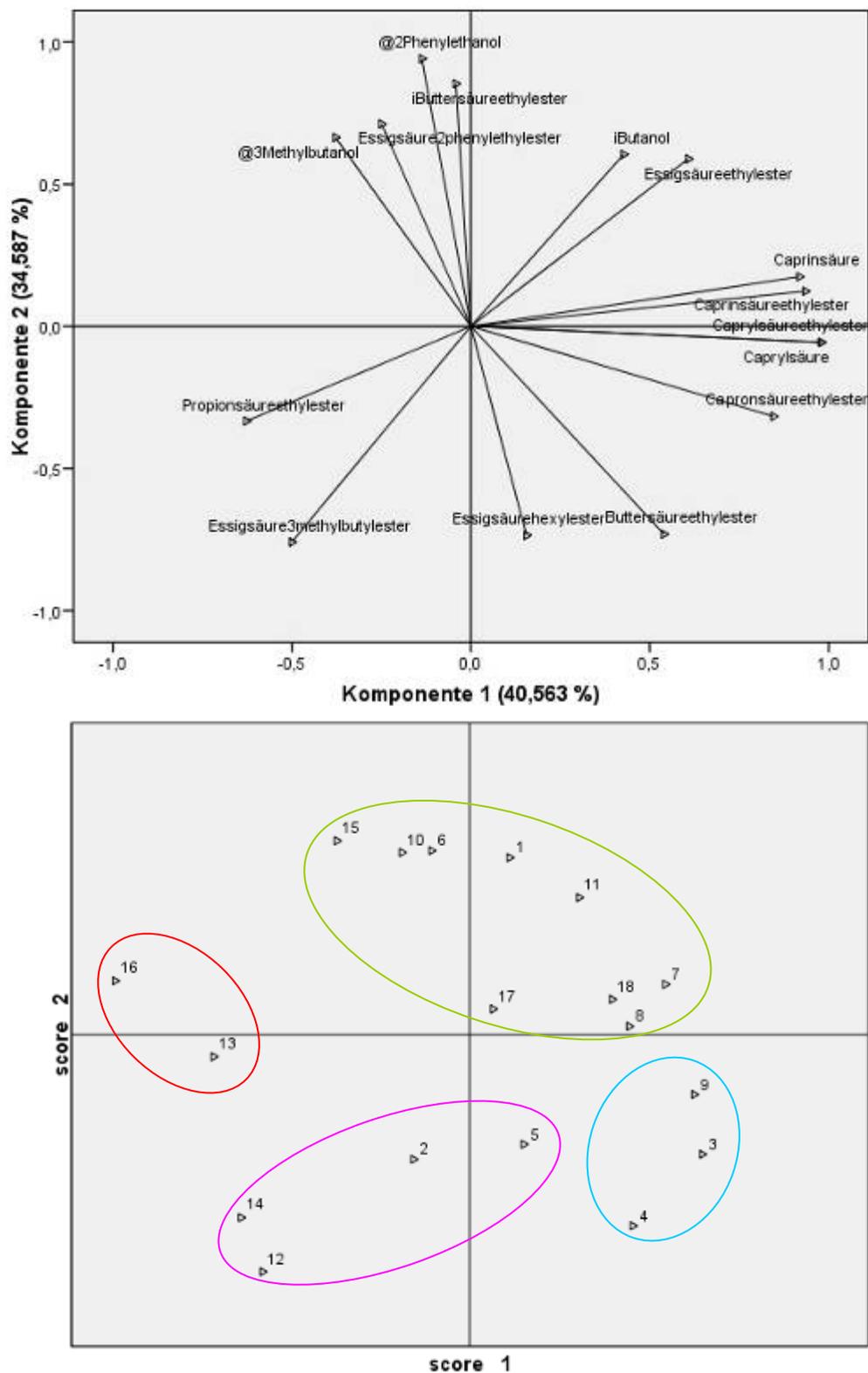


Abbildung 83: Diagramme der Hauptkomponentenanalyse Jahr 1

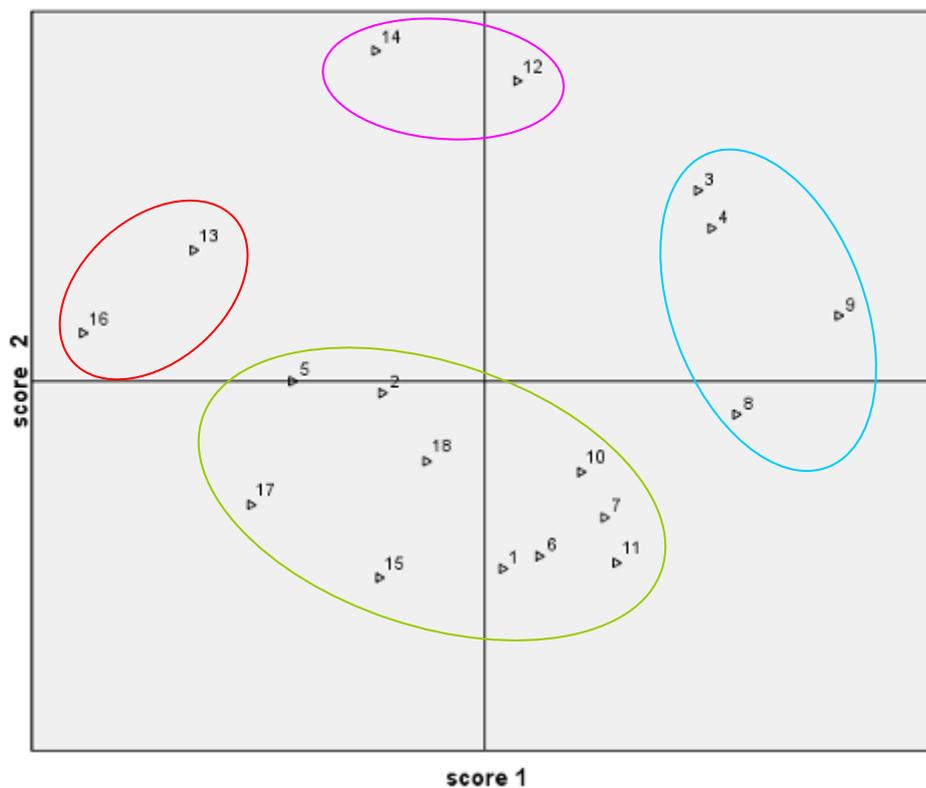
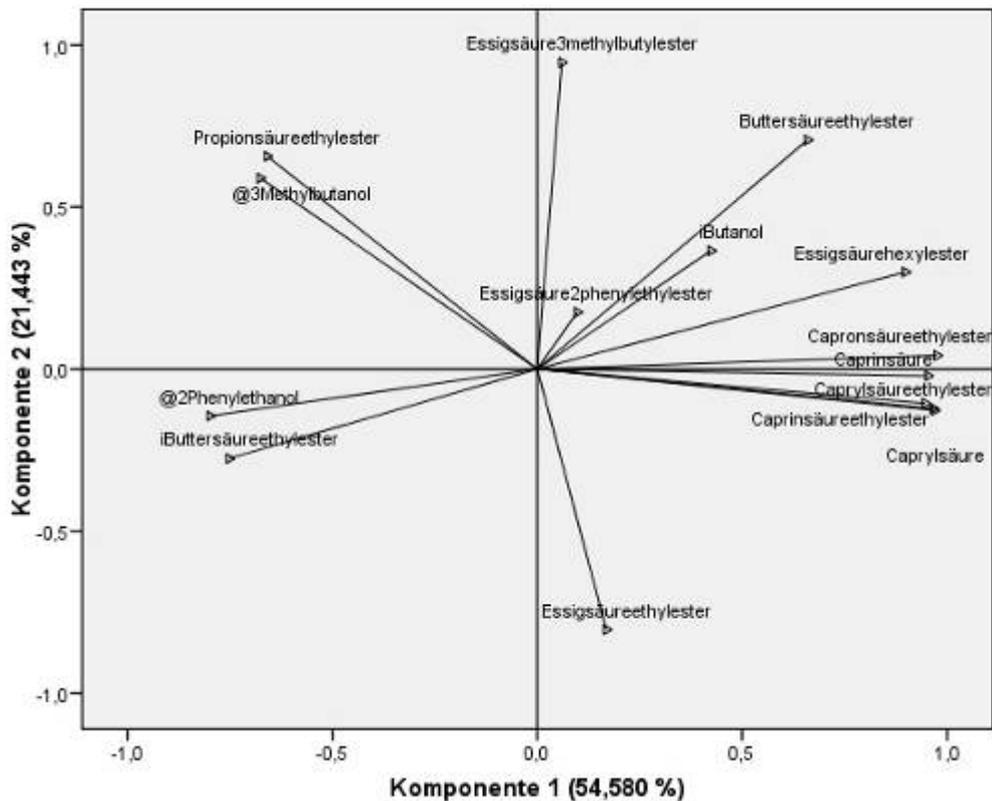


Abbildung 84: Diagramme der Hauptkomponentenanalyse Jahr 2

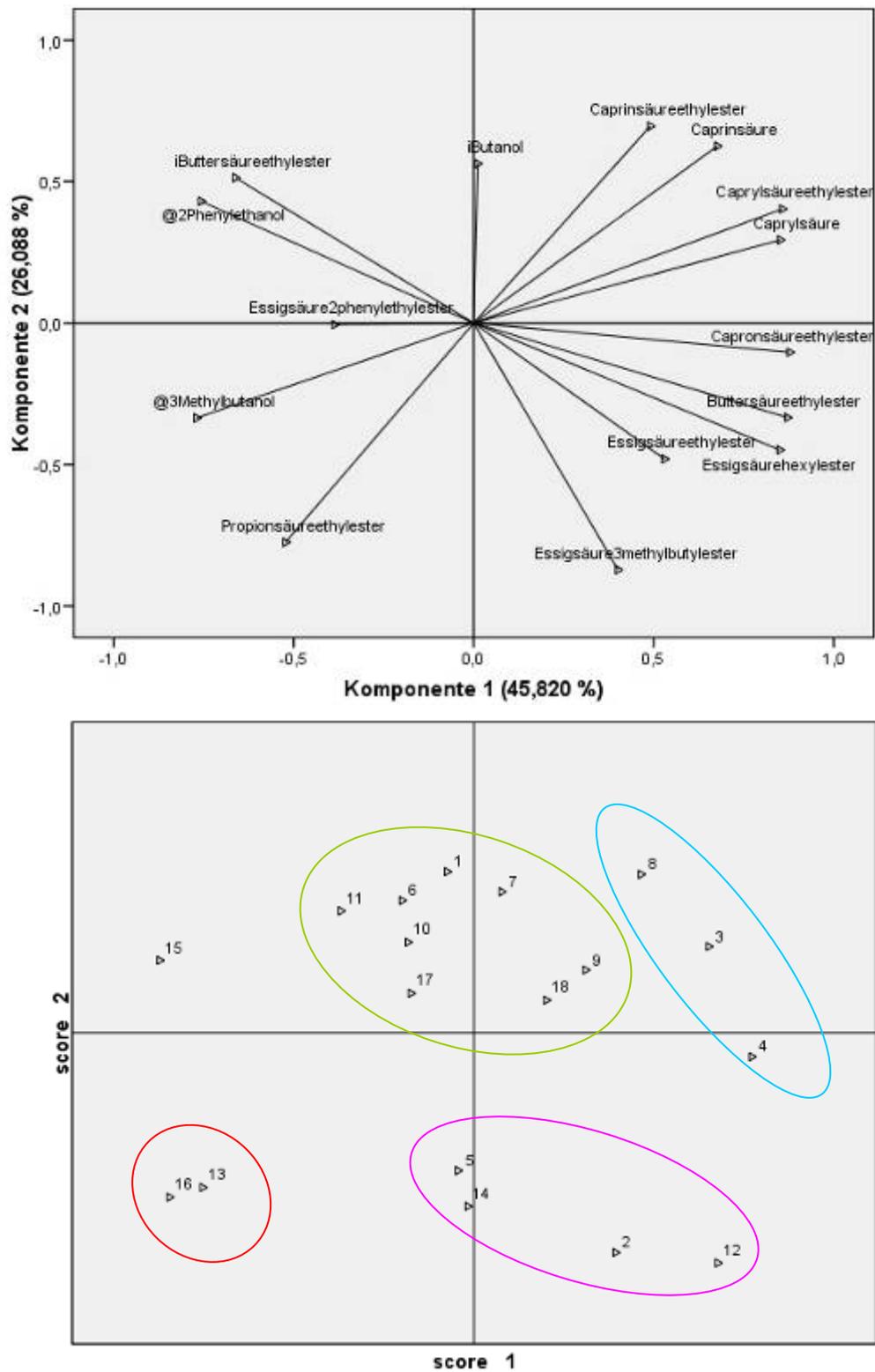


Abbildung 85: Diagramme der Hauptkomponentenanalyse Jahr 3

Tabelle 36: Versuch 2: Durchschnittswerte der Aromastoffe je Gruppe der Clusteranalyse

Ward Method		Essigsäureethylester *	Essigsäure-2-phenylethylester [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Essigsäure-2-methylbutylester [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Essigsäure-3-methylbutylester [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Essigsäurehexylester [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Phenyllessigsäureethylester [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Propionsäureethylester [$\mu\text{g L}^{-1}$]	i-Buttersäureethylester [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Buttersäureethylester [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Capronsäureethylester [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Caprylsäureethylester [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Caprinsäureethylester [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Bernsteinsäure-diethylester [$\mu\text{g L}^{-1}$] **	2-Phenylethanol [mg L^{-1}]	i-Butanol [mg L^{-1}]	2-Methylbutanol [mg L^{-1}]	3-Methylbutanol [mg L^{-1}]	Capronsäure [mg L^{-1}]	Caprylsäure [mg L^{-1}]	Caprinsäure [mg L^{-1}]
		1 (n=11)	Mittelwert	37,7	39,4	6,5	5,8	23,2	6,8	84,5	221,8	241,1	460,6	594,7	146,9	1142,6	22,3	71,9	24,3	105,6	5,6
	Standard-abweichung		20,2	6,7	19,2	8,7	0,5	22,7	79,0	50,5	146,5	202,5	75,3	497,5	3,8	18,1	4,5	11,5	0,9	1,0	0,3
2 (n=14)	Mittelwert	40,8	92,1	12,0	36,1	37,4	6,9	74,8	146,0	199,9	544,4	730,0	210,0	846,3	24,2	36,2	19,2	75,0	6,3	5,2	1,0
	Standard-abweichung		90,3	7,6	51,3	21,0	1,6	23,5	49,6	43,4	110,6	196,6	55,4	564,8	8,8	12,9	3,2	10,2	0,8	0,9	0,2
3 (n=8)	Mittelwert	10,8	187,8	25,0	223,1	63,9	6,4	76,4	116,7	261,5	752,7	1104,1	369,1	993,0	26,2	35,2	21,0	84,9	8,1	7,4	1,8
	Standard-abweichung		114,4	19,6	194,3	18,5	0,6	28,0	47,1	48,5	117,5	146,6	61,1	957,3	7,0	16,6	4,9	12,2	0,6	0,7	0,3
4 (n=2)	Mittelwert	22,0	552,5	70,0	858,7	76,8	8,1	80,9	143,7	229,4	576,8	919,4	303,1	1599,3	57,8	33,0	35,4	144,7	6,8	6,1	1,4
	Standard-abweichung		124,7	30,7	122,7	0,3	0,2	3,7	44,9	6,9	8,4	81,4	58,4	390,9	5,3	4,4	5,3	5,4	0,1	0,3	0,2
Insgesamt	Mittelwert		123,7	16,5	116,3	41,2	6,8	78,5	163,0	228,6	567,5	783,8	231,8	1016,0	26,0	47,0	22,1	90,9	6,5	5,5	1,1
	Standard-abweichung		144,5	19,2	225,9	23,8	1,1	23,3	71,1	51,0	160,7	263,5	104,7	732,6	10,5	22,6	5,6	21,5	1,2	1,4	0,5

- * relative Peakfläche
- ** multipliziert mit Faktor 0,5



Abbildung 86: Photos der Hefepräparate aus Versuch 1

Die Photos zeigen die Hefepräparate, die in Versuch 1 als Zusatz verwendet wurden. Oben links: Hefezellwände zur Adsorption von gärhemmenden Substanzen; Oben rechts: Hefepräparat A: Präparat auf Basis inaktiver Hefen reich an Polysacchariden und mit antioxidativem Potential; Unten links: Hefepräparat B: Präparat auf Basis inaktiver Hefen zur Rehydration der Trockenhefe; Unten rechts: Präparat C: Mischpräparat aus inaktiven Hefen, Thiamin, DAHP, Ammoniumsulfat.