**Universität für Bodenkultur Wien**
University of Natural Resources
and Life Sciences, Vienna

# Kumulative Dissertation

## Chemische Charakterisierung des pfeffrigen Aromas („Rotundon“) von Weinen der Sorte Grüner Veltliner sowie Untersuchung der technologischen Beeinflussbarkeit

verfasst von

DI Stefan NAUER, BEd.

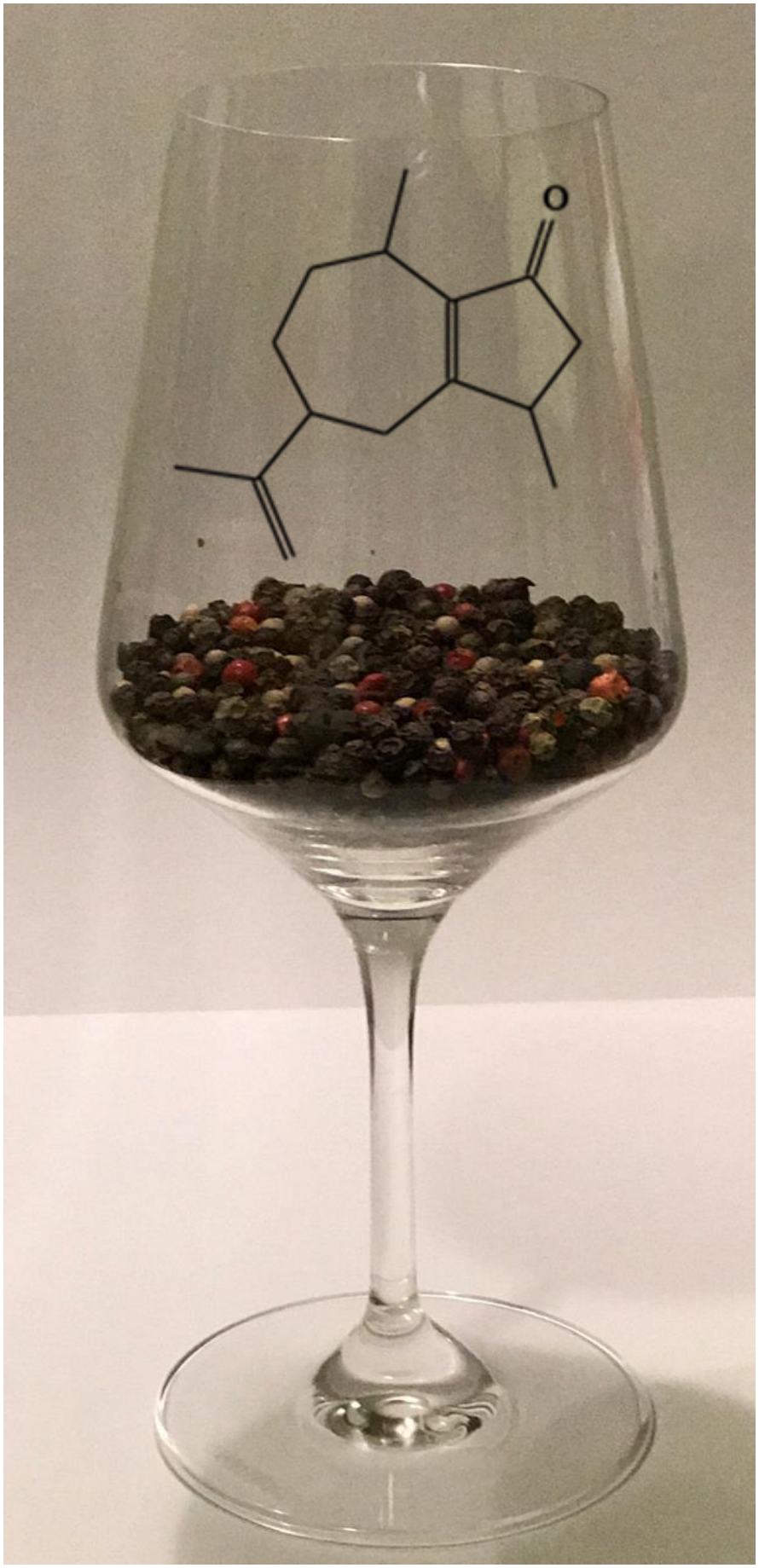
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Bodenkultur (Dr. nat. techn.)

Wien, Oktober 2021

Betreut von:

Univ.Prof. DI Dr. Stephan Hann
Institut für Analytische Chemie
Department für Chemie


O

# Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Gedanken, die im Wortlaut oder in grundlegenden Inhalten aus unveröffentlichten Texten oder aus veröffentlichter Literatur übernommen wurden, sind ordnungsgemäß gekennzeichnet, zitiert und mit genauer Quellenangabe versehen. Beiträge von Kollegen und Kolleginnen habe ich ausdrücklich in der Autorenerklärung der veröffentlichten Publikationen angegeben.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder ganz noch teilweise in gleicher oder ähnlicher Form an einer Bildungseinrichtung als Voraussetzung für den Erwerb eines akademischen Grades eingereicht. Sie entspricht vollumfänglich den Leitlinien der Wissenschaftlichen Integrität und den Richtlinien der Guten Wissenschaftlichen Praxis.

Wien, 27.10.2021 Stefan NAUER (eigenhändig)

*Diese Dissertation ist*

*meinen Eltern Alois und Erika Nauer,*

*meiner Schwester Eva-Maria Nauer*

*und meiner Großmutter Maria Nauer*

*gewidmet.*

*Geschmack ist die Kunst, sich auf Kleinigkeiten zu verstehen.*

Jean-Jacques Rousseau (1712 bis 1778)

# Beratungsteam und Gutachter

## Mitglieder des Beratungsteams

- Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Thomas Prohaska
  (Allgemeine und Analytische Chemie, Montanuniversität Leoben, AT)

- Dipl.-Ing. Dr. Reinhard Eder, BEd
  (Direktor, Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein-Obstbau Klosterneuburg, AT)

- Mag. Walter Brandes
  (Mitarbeiter Abteilung Chemie, Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein-Obstbau Klosterneuburg, AT)

## Dissertation begutachtet von

- Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Fischer
  (Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, Rheinland-Pfalz, DE)

- Univ.Prof. Dipl.-Chem. Dr. Rainer Schuhmacher
  (Institut für Bioanalytik und Agro-Metabolomics, Department für Agrabiotechnologie, IFA-Tulln/Universität für Bodenkultur Wien, AT)

# Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem geschätzten Betreuer Herrn Univ. Prof. DI Dr. Stephan Hann und meinem Mentor, Herrn DienstellenleiDirektor HR DI Dr. Reinhard Eder für ihren unschätzbaren Rat, ihre kontinuierliche Unterstützung und ihre Geduld während meiner Doktorarbeit danken. Ihr immenses Wissen und ihre reiche Erfahrung haben mich während meiner bisherigen Forschung an der Herausforderung Rotundon und im täglichen Leben ermutigt und persönlich sowie fachlich wachsen zu lassen.

Zudem danke ich Herrn Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Thomas Prohaska für seine Unterstützung und seine Bereitschaft im Beratungsteam mitzuwirken.

Für die Übernahme der Begutachtung im Doktoratsverfahren an der Universität für Bodenkultur Wien danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Fischer und Herrn Univ.Prof. Dipl.-Chem. Dr. Rainer Schuhmacher herzlich.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Mag. Walter Brandes für seine geschätzte Unterstützung danken, die meine Analysemethode sehr beeinflusst hat.

Ich möchte auch Frau Mag. Elsa Patzl-Fischerleitner und Herrn Dr. Christian Philipp für ihre nützlichen Vorschläge und Empfehlungen für meine Publikationen danken. Meinen Arbeitskollegen und -kolleginnen Frau Ing. Veronika Schober, Frau Monika Marek, Herrn Reinhard Baumann, Frau Karin Korntheuer und Frau Stefanie Berghold an der HBLA Klosterneuburg der Abteilung Chemie möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit danken. Durch eure freundliche Hilfe und Unterstützung wurde die gemeinsame Zeit im Labor zu einer wunderbaren Zeit.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Großmutter bedanken. Durch ihr Verständnis, ihre ständigen Ermutigungen und bedingungslose Unterstützung habe ich mein Doktorat abschließen können.

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung ..... i

Beratungsteam und Gutachter ..... iv

Danksagung ..... v

Inhaltsverzeichnis ..... vi

Liste der Publikationen ..... viii

Publikationen ..... viii

Zusätzliche Beiträge ..... ix

Kurzfassung ..... x

Abstract ..... xi

1 Einleitung ..... 1

1.1 Rotundon – Stand des Wissens ..... 6

1.1.1 Rotundon – Chemische Einordnung, besondere Eigenschaften und Vorkommen ..... 6

1.1.2 Lokalisation, Verteilung und Bildung des Rotundons in der Rebe bzw. Traube ..... 15

1.1.3 Überblick über Effekte und Einflüsse auf den Rotundongehalt ..... 20

1.1.3.1 Umweltfaktorenbedingte Effekte auf den Rotundongehalt ..... 20

1.1.3.2 Weinbaubedingte Effekte auf den Rotundongehalt ..... 24

1.1.3.3 Technologie bedingte Effekte auf den Rotundongehalt ..... 26

1.1.3.4 Fazit der Effekte und Einflüsse auf den Rotundongehalt ..... 29

1.2 Problem- und Aufgabenstellung bzw. Zielsetzung und zentrale Forschungsfragen ..... 30

1.3 Methoden ..... 32

1.3.1 Überblick genutzer Methoden bzw. Vorgangsweise in den Publikationen ..... 32

1.3.2 Ausgangslage Quantifizierungsmethoden für das Sequiterpen Rotundon ..... 32

1.3.3 Herausforderungen der Weinaromaanalyse an die Probenvorbereitung ..... 33

1.3.3.1 Vergleich der Probenvorbereitung SPE, SPME, SBSE, MASE ..... 34

1.3.4 Weinaromaanalyse – allgemeiner Vergleich Analysenmethodik GC-MS, GC-MS-MS, MDGC-MS, ..... 37

1.3.5 Illustration der genutzen Materialien und umgesetzter Methoden ..... 40

1.3.6 Genutzte Werkzeuge zur Auswertung der erstellten 2x2 faktoriellen Designs .....55

1.4 Beitrag zum Stand des Wissens .....56

1.4.1 Publikation I: Analyse von (-)-Rotundon mittels SPE-SPME-GC-MS in österreichischen Qualitätsweinen der Rebsorte Grüner Veltliner .....56

1.4.2 Publikation II: Untersuchungen über den Einfluss von kellertechnischen Maßnahmen auf den Rotundongehalt in Weinen der Sorte Grüner Veltliner .....62

1.5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen .....69

Literaturverzeichnis .....75

2 Publikation I: Analyse von (-)Rotundon mittels SPE-SPME-GC-MS in österreichischen Qualitätsweinen der Rebsorte Grüner Veltliner .....88

3 Publikation II: Untersuchungen über den Einfluss von kellertechnischen Maßnahmen auf den Rotundongehalt in Weinen der Sorte Grüner Veltliner .....102

4 Zusätzliche Beiträge .....121

4.1 Tagungsbeiträge .....121

4.1.1 Analyse von Rotundon mittels SPE-SPME-GC-MS in österreichischen Qualitätswein der Rebsorte Grüner Veltliner .....121

4.1.2 Auswirkungen von önologischen Maßnahmen auf die Rotundon Konzentration der österreichischen Sorte Grüner Veltliner – Eine Bestandsaufnahme und Vergleich von zwei Versuchsjahren .....125

Tabellenverzeichnis .....129

Abbildungsverzeichnis .....130

# Liste der Publikationen

## Publikationen

Die ausführlichen Ergebnisse der vorliegenden kumulativen Dissertation wurden bereits in einer Fachzeitschrift eingereicht und veröffentlicht.

| Nr. | Publikationen – Bibliografische Informationen | Verarbeitungsstatus |
|---|---|---|
| 1. | Analyse von (-)Rotundon mittels SPE-SPME-GC-MS in österreichischen Qualitätsweinen der Rebsorte Grüner Veltliner<br><br>Nauer, S; Brandes, W; Patzl-Fischerleitner, E; Hann, S; Eder, R (2018). Analysis of (-)-rotundone by means of SPE-SPME-GC-MS in Austrian quality wines of the'Grüner Veltliner' variety.<br><br>Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung, 68(2), 107-119.<br><br>https://www.weinobst.at/dam/jcr:dcf132b7-22be-4775-8736-63ebd1aba3dd/107-2018.pdf. | veröffentlicht |
| | *Erklärung der Autorenschaft:*<br><br>*Der Dissertant hat für die Realisierung einen Analyt Standard (Synthese) organisiert, überwiegend die Methodenentwicklung an die Rahmenbedingungen der Laborinfrastruktur konzipiert (beraten von W. Brandes bzw. Stephan Hann). Außerdem führte der Dissertant eigenständig alle praktischen Analysen sowie Auswertungen durch und fasste das Artikel-Rohmanuskript ab. Das Korrekturlesen wurde von den Co-Autoren Patzl-Fischerleitner, E., Hann, S. und Eder, R. übernommen.* | |
| 2. | Untersuchungen über den Einfluss von kellertechnischen Maßnahmen auf den Rotundongehalt in Weinen der Sorte Grüner Veltliner<br><br>Nauer, S; Patzl-Fischerleitner, E; Philipp, C; Hann, S; Eder, R (2021) Untersuchungen über den Einfluss von kellertechnischen Maßnahmen auf den Rotundongehalt in Weinen der Sorte Grüner Veltliner.<br><br>Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung, 71 (2021), S. 222-239. | veröffentlicht |
| | *Erklärung der Autorenschaft:*<br><br>*Der Dissertant hat maßgeblich mit Eder, R. am Versuchsdesign mitgearbeitet, war an allen praktischen Vinifinzierungsabläufen beteiligt, sowohl Analysen als auch Versuchsplan-Auswertung wurden ausschließlich vom Dissertanten realisiert. Das Korrekturlesen vom Artikel-Rohmanuskript wurde von den Co-Autoren Patzl-Fischerleitner, E; Philipp, C; Hann, S; und Eder, R übernommen.* | |

## Zusätzliche Beiträge

Neben den Artikeln einer Fachzeitschrift wurden die wesentlichen Erkenntnisse der Forschungsergebnisse auch in Form von Tagungsbeiträgen präsentiert. Dazu zählen:

Tagungsbeiträge:

- Bei der 72. ALVA – Tagung im Seminarhotel Wesenufer (2017):
  Nauer, S., Brandes, W., Patzl-Fischerleitner, E., Stephan Hann, S., Eder, R. (2019): Analyse von Rotundon mittels SPE-SPME-GC-MS im österreichischen Qualitätswein der Rebsorte Grüner Veltliner. 72. ALVA Tagung, Seminarhotel Wesenufer 2017.

- Bei der 74. ALVA – Tagung in Klosterneuburg (2019):
  Nauer, S; Patzl-Fischerleitner, E; Philipp, C; Eder, R (2019): Auswirkungen von önologischen Maßnahmen auf die Rotundon Konzentration der österreichischen Sorte Grüner Veltliner – Eine Bestandsaufnahme und Vergleich von zwei Versuchsjahren. ALVA 74. Tagung, Klosterneuburg, 2019.

# Kurzfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Sesquiterpen Rotundon, die derzeitige Leitverbindung der pfeffrigen Note der autochthonen österreichischen Rebsorte Grüner Veltliner, zu quantifizieren und Auswirkungen kellertechnischer Maßnahmen auf den Rotundongehalt von Wein zu untersuchen. Für die Quantifizierung wurde eine robuste SPE-SPME-GC-MS-Methode entwickelt, die eine Gehaltsfeststellung bis in den Schwellenwertbereich der Verbindung in ng/l in Weinen der Sorte Grüner Veltliner ermöglicht. Die Analyse von 108 Grüner Veltliner Proben ergab eine durchschnittliche Gehaltsverteilung von 31,7 ng/l. Es wurde eruiert, ob die ermittelten Gehalte hinsichtlich der Schwellenwertangaben von 16 ng/l relevant sind. Durch dieses Vorgehen konnten die Datenlage und das Verständnis für Effekte (z.B. Region, klimatische Bedingungen) deutlich verbessert werden. Im Grünen Veltliner zeigte sich eine höhere Rotundonkonzentration in kühleren, niederschlagsreicheren Jahrgängen als in heißen, trockenen Jahrgängen.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit werden etablierte önologische Maßnahmen thematisiert. Jede*r Winzer*in sollte bestrebt sein, den Rotundongehalt für das „Pfefferl“ der Weinsorte Grüner zu stabilisieren oder sogar zu optimieren. Zur Klärung der Effekte der Faktoren Gärtemperatur, Maischestandzeit, Maischeschwefelung, Jungweinschwefelung, Mostklärung, Hefenährsalzzugabe auf den Rotundongehalt wurden drei voneinander getrennte statistische 2x2-Versuchspläne im Versuchsmaßstab von 30 Litern realisiert. Die statistische Auswertung lieferte folgende Erkenntnis: Einflussfaktoren wie höhere Gärtemperatur, Verzicht auf Maischestandzeit, Maischeschwefelung und Mostklärung führten zu einem höheren Rotundongehalt. Dies ist überwiegend auf die hydrophoben Eigenschaften des Rotundons zurückzuführen. Der Rotundonengehalt von Weinen der Sorte Grüner Veltliner wird durch den Jahrgang (klimatische Bedingungen), die Region bestimmt und kann durch technologische Maßnahmen stabilisiert werden.

# Abstract

This study aims to quantify the sesquiterpene rotundone, the current key compound of the peppery note of the autochthonous Austrian grape variety Grüner Veltliner, and to investigate the impact of cellar-technical measures on the rotundone content. For quantification, a robust SPE-SPME-GC-MS method was developed, which enables a content determination up to the threshold range of the compound in ng/l in wines of the Grüner Veltliner variety. The analysis of 108 Grüner Veltliner samples showed an average content distribution of approx. 31.7 ng/l. It was determined whether the determined levels are relevant with regard to the threshold values (16 ng/l). This procedure enabled the data situation and the understanding of effects (e.g., region, climate) to be significantly improved. In Grüner Veltliner, there was a higher concentration of rotundone in cooler, more precipitation-rich vintages than in hot, dry vintages.

In the second part of the work, well-established oenological measures are discussed. Winegrowers should aim to stabilize or even optimize the rotundone content for the 'Pfefferl' in wines. To clarify the effects of the factors fermentation temperature, maceration time, maceration sulphurization, young wine sulphurization, must clarification and the addition of yeast salts on the rotundone content, three separate statistical 2 to the power of 2 experimental designs were carried out on an experimental scale of 30 litres. The evaluation through variance analysis, Pareto diagrams, main effect diagrams, and interaction diagrams provided the following findings: A higher fermentation temperature, the omission of a mash stand time, mash sulphurization, and must clarification have led to higher rotundone content. This finding is mainly due to the hydrophobic properties of the rotundone. The rotundone content of wine of the variety Grüner Veltliner is determined by the vintage (climatic conditions), region and can stabilize through technological measures.

.

# 1 Einleitung

Besonders in den 1980er-Jahren war die Forschung daran interessiert und darauf fokussiert, möglichst rasch viele Weinaromaverbindungen zu identifizieren. Dies trug dazu bei, den Weingeschmack als komplex zu erachten, weil diese Weinaromamatrix viele Hunderte von flüchtigen Molekülen umfasst. Die größte Herausforderung für Weingeschmackschemiker*innen besteht in der Erkenntnis, welche dieser Moleküle für den Geschmack verantwortlich sind. Dazu gibt es vom Aromaexperten Herrn Prof. Erich Leitner beim Weinforum Burgenland (2016) folgende Feststellung: Es können im Wein mehrere Hundert Verbindungen analytisch nachgewiesen werden, doch für die Geschmackserkennung des Menschen sind – so Leitner – aber lediglich rund 40 von Bedeutung (Gruber, 2016). Auch nach Ferreira et. al (2007) setzt sich das Aroma eines Weins aus einer bestimmten Reihe von geruchs- und geschmacksaktiven Molekülen zusammem.

Von den Hunderten Verbindungen werden nur 5 % als geruchsaktiv beschrieben. Laubenbacher et al. (2008) verweisen in ihrer Arbeit über die Aromatik bei den Sorten Blaufränkisch und Zweigelt, dass nur 30 bis 40 Weinaromastoffe als geruchsaktiv beschrieben werden und somit das Aroma des Weins prägen. Nicht nur Leitner und Laubenbacher vertreten diese Ansicht, auch Flak et al. (2007) berichten über das Vorliegen eines einheitlichen Aromagrundmusters in Grüner Veltliner Weinen des Weinviertels, bestätigt durch die GC/MS-Aromaanalytik. Die von Flak et al. (2007) begleitend durchgeführte statistische Auswertung von 37 quantifizierten Aromaverbindungen hat ebenfalls eindeutig gezeigt, dass die Sorte Grüner Veltliner im gesamten Weinviertel ein nahezu identisches Basisaroma aufweist.

Es stellte sich erst nach und nach heraus, dass ein charakteristisches Weinaroma nicht so sehr von den am häufigst vorkommenden Verbindungen (Fermentationsaromen) abhängt, sondern von Spurenkomponenten mit sehr starkem, potentem, unverkennbarem Geruch, so Francis und Newton (2005). Es handelt sich dabei um Verbindungen, die ihr (spezifisches) bzw. charakteristisches Aroma auf einige Weine übertragen. Sogenannte Leitaromaverbindungen, key odours (Schlüsselverbindungen), rufen eine charakteristische Aromanote hervor und werden mit bestimmten Rebsorten bzw. Reifungs- oder Lagerungsbedingungen direkt assoziiert. Deren Freisetzung und Wahrnehmung bewirken eine radikale Veränderung des Weinaromas

in eine bestimmte Richtung. Auch Laubenbacher et al. (2008) geben an, dass die Charakteristik einzelner Rebsorten von einzelnen Verbindungen hervorgerufen wird, deren Mengen nur im Nano- bis Mikrogramm-Bereich pro Liter vorliegen und zudem extrem flüchtig sind.

Wüst (2003) bringt es mit seinem Fachartikel „Qualiät entscheidet sich im Nanogramm“ auf den Punkt, nämlich, dass Weinaroma nur von einer kleinen Gruppe geruchsaktiver Substanzen wesentlich geprägt wird. Auch Polásková et al. (2008) verweisen darauf, dass eine Gruppe von Aromastoffen direkt mit bestimmten Sortenaromen (varietal flavors) in Weinen in Verbindung gebracht wurde. Unter diesen wurden nur wenige Moleküle identifiziert als wertvolle Beiträge zum Weinaroma wie Monoterpenoide (Rapp und Mandery, 1986), C13-Norisoprenoide (Winterhalter und Rouseff, 2002), flüchtige Schwefelverbindungen (Darriet et al., 1995; Tominaga et al., 1996, 1998a) und Methoxypyrazine (Allen et al., 1991).

Derzeit gibt es laut Ferreira (2010) rund 16 Einzelverbindungen, sogenannte impact odorants, die beim Erreichen einer bestimmten Konzentrationsschwelle diesen laut Ferreira existierenden „Aromapuffer“ des Weins überwinden können. Hinter dem von Ferreira kreierten Begriff Aromapuffer verbirgt sich Folgendes: Er stellt gleichermaßen eine gemeinsame aromatische Grundstruktur auf, welche alle Weine aufweisen. Sie setzt sich laut Ferreira (2007, 2009) aus Ethanol und 27 verschiedenen Aromastoffen zusammen, von denen die meisten Nebenprodukte der Fermentation sind. Die Mischung dieser Verbindungen hat das typische Weinaroma und übt eine sogenannte aromapuffernde Wirkung aus. Bei den 16 identifizierten Verbindungen, die diesen Aromapuffer brechen bzw. überwinden, handelt es sich um sogenannte impact compounds. Dazu zählt Ferreira et al., (2007) bzw Ferreira (2012) chemische Substanzen wie Linalool, Cis-rosenoxide & ß-Damascenone, 4-Methyl-4-mercaptopentanone, 3-Mercaptohexanol, 3-Mercaptohexylacetate, Isoamylacetate, Whiskylactone, Diacetyl, Sotolon, Methional, Phenylacetaldelyd, Dimethylsulfid, Furfurylthiol, Benzylmercaptan und Rotundon auf.

Eine weitere Kennzahl zur Beurteilung der relativen Bedeutung einer einzelnen Verbindung in komplexen Geruchsmischungen ist der sogenannte Geruchsaktivitätswert (odour activity value, OAV). Der Geruchsaktivitätswert ist allgemein definiert als das Verhältnis der Konzentration einer einzelnen Verbindung zur Geruchsschwelle für diese Verbindung (Friedrich und Acree, 1998; Trabue et al., 2006). Francis und Newton (2005) definieren den Geruchsaktivi-

tätswert (OAV) folgendermaßen: Der spezifische Beitrag jeder flüchtigen Verbindung zum gesamten Weinaroma wurde durch Berechnung des Geruchsaktivitätswerts (OAV) als Verhältnis der Konzentration jeder Verbindung zu ihrer Nachweisschwellenkonzentration bestimmt. Je größer der Geruchsaktivitätswert (OAV) ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass die Verbindung zum Gesamtgeruch einer komplexen Geruchsmischung beiträgt (OAVs > 1). Wenn dies für flüchtige Weinaromaverbindungen zutrifft, tragen sie somit wesentlich zu den Weinaromen bei.

Um sowohl die Relevanz von Schlüsselverbindungen (impact compounds) als auch die Bedeutung und den Nutzen der OAV zu verdeutlichen, folgt ein Beispiel: Laut Wood et al. (2008) bewegen sich die Geruchsaktivitätswerte von Rotundon im Pfeffer zwischen 50.000 bis 250.000. Das ist bis dato die potenteste Aromaverbindung, die in diesem Gewürz überhaupt gefunden wurde. Doch auch für das Produkt Wein und sein Aroma lässt sich die Beteilung von Rotundon mit-tels OAV demonstrieren. So analysierte Mattivi et al. (2011) Schioppettino -Weine (Rot-wein, Friaul Italien) bis zu einem Rotundongehalt von 561ng/l. Unter Berücksichtigung des Schwellenwertes für Rotwein von 16ng/l (Wood et al. 2008) wäre dies für Schioppettino -Weine ein OAV-Wert von 35. Wenn der OAV -Wert von 1 überschritten wird ist dies ein Hinweis für einen Beitrag der Verbindung zum Weinaroma.

Generell wäre dazu noch anzumerken, dass in der Literatur für jede Aromaverbindung ein breites Spektrum an Wahrnehmungsschwellen gefunden werden kann. Dies kann durch die Reinheit der getesteten Verbindungen, die Zusammensetzung der in den sensorischen Tests verwendeten Matrix (Wasser; hydroalkoholische Lösung und ihr Ethanolgehalt; Eigenschaften der Modellweinlösung; Weintyp) und die angewandte Verkostungsmethode – orthonasal, oder retronasal – erklärt werden.

*Tabelle 1* listet die zuvor erwähnten Schlüsselaromastoffe, die wesentlich zum Weinaroma bestimmter Rebsorten beitragen, übersichlich auf. Außerdem sind in *Tabelle 1* auch die jeweiligen Wahrnehmungschwellen und Deskriptoren dieser relevanten flüchtigen Verbindungen in Zusammenhang mit bestimmten Rebsorten dargestellt.

*Tabelle 1*: Überblick ausgewählter Schlüsselverbindungen (impact odours) bestimmteter Rebsorten; Quelle: eigene Darstellung.

| -Schlüsselaromastoffe Impact compounds Wirkstoffe oder AromaFamilien | | Wahrnehmungschwelle (engl. perception threshold, PT [a]/ (L-1) | | Deskriptor [b] | Verknüpfte Rebsorten | Referenz quellen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Linalool, | | 25.2 µg/l | Modelwein; orthonasal | Zitrone | Muscat, Gewürztraminer, Pedro Ximenez (sun dried) | [a] Ferreira et al., 2000; [b] Escudero et al., 2004 |
| c-rose oxide | | 0,2 µg/l | Wässrig-alkoholische Löusng; retronasal | grün, blumig | | [a] Guth, 1997; [b] Ong & Acree, 1999 |
| ß-damascenone | | 0.05 µg/l | wässrig-alkoholische Lösung; retronasal | süßer Apfel, gebackener Apfel | | [a] Guth, 1997; [b] Escudero et al., 2004 |
| 4-Methyl-4-mercaptopentanon, 4-Mercapto-4-Methyl-2- pentanon | | 0.0008 µg/l | Modelwein; orthonasal | Buchsbaum, Ginster | Sauvignon blanc | [a, b] Tominaga et al., 1998a |
| 3-mercapto-1-hexanol, | | 0.06 µg/l | Modelwein; orthonasal | Passionsfrucht, Grapefruit | | [a, b] Tominaga et al., 1998b |
| 3-Mercaptohexyl acetate 3-Mercaptohexyl acetate | | 0.0042 µg/l | Modelwein; orthonasal | Buchsbaum, Passionsfrucht | | [a] Tominaga et al., 1996; [b] Tominaga et al., 1998a |
| Isoamyl acetat | | 0,03 mg/l | 10 % Ethanol | wie Bananen oder „Birnendrops“ | | Swiegers et al., 2005 |
| Whiskylacton Gamma lacton (±)-5-Butyl-4-methyldihydro-2(3H)-furanon Isomere | Cic-4S,5S | 20 µg/l | Weßwein | Kokosnuss Eichengeschmack | Weine Eichenfass | Brown, R. C. et al., 2006 |
| | | 54 µg/l | Rotwein | | | |
| | Cis-4R,5R | 132 µg/l | Weißwein | | | |
| | | 170 µg/l | Rotwein | | | |
| | Trans-4S,5R | 140 µg/l | Weißwein | | | |
| | | 370 µg/l | Rotwein | | | |
| | Trans-4R,5S | 330 µg/l | Weißwein | | | |
| | | 305 µg/l | Rot Wein | | | |
| Diacetyl | | 50ppb | Model wine 10 % | Diacetyl, butterscotch | Einige Chardonnays | Selfridge TB, Amerine MA, 1978 |
| | | 100ppb | 10 % (w/w Ethanol) | Diacetyl, butterscotch | | Guth 1997 |
| Sotolon 3-Hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-on | | 2ppb | 12 % Ethanol | Curry, Walnuss verantwortlich für nussig, scharf, Curry Noten von Flor-Sherry oder botrytisiert Weine | Jérez, PX, Oporto, VDN, Sauternes | Pons et al., 2008 |
| | | 8 ppb | Weißwein | | | Pons et al., 2008 |
| | | 15 ppb | Wein | | | Martin et al., 1990 |
| | | 5 ppb | 10 % (w/w) Ethanol | | | Guth, 1997 |
| Methional | | 0,5µ/l | Synthetischer Wein, Kunstwein | Ofenkartoffel | Einige Chardonnays Sauternes | Escudero et al., 2000 |
| 2-Phenylacetaldelyd | | 1 µg/l | 10 % Modelwein | Honig, Blumen | | Mayr C.M. et al., 2015 |
| Dimethyl sulfid | | flavour threshold range from 25 - 75 µg / 10µg/l | | Schwarze Johannisbeere, gekochter Kohl, Spargel, Dosenmais, Melasse | Chat. Du Pape | 27 µg/l im Rotwein: Beloqui et al., 1996a+b |
| Furfurylthiol | | 5 ng/l | Rotwein | Gerösteter Kaffee, Fleisch, Popcorn | Einige alte Weine | Dubourdieu und Tominaga, 2004 Tominaga et al., 2003 |
| Benzylmercaptan Phenylmethanethiol | | 0,3 ng/l | model hydroalcoholic solution | „Empyreumatischer“ Rauch und verbranntes Holz | Sauvignon Blanc, Semillion, Chardonnay | |
| Rotundon | | 0,016 µg/l | Rotwein | Schwarzer Pfeffer | Australischer Shiraz österreichischer Grüner Veltliner | Wood et al., 2008 Mattivi, 2011 |
| | | 0,08 µg/l | Wasser | | | |

Laut der DAC-Verordnung Weinviertel müssen Weine der Sorte Grüner Vetliner folgende typische Eigenart aufweisen: Farbe: hellgelb, grüngelb; Geruch: typisches Sortenbukett; Geschmack: fruchtig, würzig, pfeffrig; kein Holzton; nicht einseitig alkoholhaltig; keine Botrytisnote. Für Konsument*innen, die bestrebt sind, diesen sortentypischen Grünen Veltliner zu identifizieren (sensorisch zuzuordnen), sollten sich hinsichtlichGeruch und Geschmack in Richtung würzig, pfeffrig und fruchtbetont – Fruchtnoten nach Steinobst – orientieren. Selbst ein 15-sekündiger Werbespot des Weinviertel DAC im österreichischen Fernsehen wirbt mit der für diese Rebsorte so typische pfeffrige Aromatik. Neben dem idyllischen Bild von Weingärten vor einer Kellergasse wird mit dem Satz geworben: „Fruchtig, pfeffrig, frisch, das muss der echte Grüne Veltliner aus dem Weinviertel sein“ (Weinviertel DAC-Werbung).

Dennoch ist gerade aus Forschungssicht über die oder den chemischen Verursacher der wiederholt beschriebenen pfeffrigen Aromatik von Weinen der Rebsorte Grüner Veltliner sehr wenig bekannt. Für die pfeffrige Note im Wein gab es bis zum Jahr 2007 bzw. 2008 nicht die eine zuordenbare Leitsubstanz.

Erst australische Forscher und Forscherinnen rund um Wood et al. (2008) identifizierten mittels olfaktorischer Gaschromatografie GC-O-Analyse im Rotwein Shiraz das Sequiterpene Rotundon als eine Leitsubstanz für die pfeffrige, würzige Note. Siebert et al. (2008) quantifizierten diese Verbindung später.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich ausschließlich mit dem Sequiterpen Rotundon, denn kaum eine Weißweinsorte ist so sehr mit diesem sensorischen Attribut behaftet wie der österreichische Grüne Veltliner. Zusätzlich kristallisiert sich im Zuge des Klimawandels immer stärker heraus, dass nachhaltige Auswirkungen auf die würzige, pfeffrige Aromatik des Grünen Veltliners drohen könnten. Daher wird das Vorkommen dieser Leitsubstanz für die pfeffrige Typizität in der Sorte Grüner Veltliner Weine untersucht und ermittelt, wie klassische etablierte technologische Maßnahmen diese Leitsubstanz beeinflussen können. Das dabei generierte Wissen hinsichtlich der Konzentration im heimischen Grünen Veltliner Wein sowie Effekte durch kellerwirtschaftliche Handlungen sollen erste Beiträge zur Erhaltung der Substanz im GV sein. Sie sind anderseits Ausgangspunkt für weitere Strategien zur Stabilisierung und Verbesserung der pfeffrigen Typizität dieser wichtigen österreichischen Weißweinsorte.

## 1.1 Rotundon – Stand des Wissens

### 1.1.1 Rotundon – Chemische Einordnung, besondere Eigenschaften und Vorkommen

Rotundon ist der Trivalname von

(3S,5R,8S)-3,4,5,6,7,8-Hexahydro-3α,8α-dimethyl-5α-(1-methylethenyl)azulen-1(2H)-on mit der Summenformel $C_{15}H_{22}O$ und einem Molekulargewicht von 218,33 g/mol. Aus stereochemischer Sicht handelt es sich um (-)-Rotundon. Im Vergleich zu Monoterpenen wie beispielsweise Linalool (154,25 g/mol), Geraniol (154,25 g/mol) ist Rotundon eine schwere Aromaverbindung. Eine reine Betrachtung der Summenformel ($C_{15}H_{22}O$) lässt den Rückschluss zu, dass Rotundon zu der Stoffklasse der Sequiterpene-C15 zählt. Aus der Struktur (*Abbildung 1*: Rotundon Struktur) wird ersichtlich, dass es sich um ein sauerstoffhaltiges bizyklisches Sesquiterpen-Keton aus der Familie der Guaiane handelt. Als Mitglied der Stoffklasse Sequiterpene gehört Rotundon damit zur größten Untergruppe der Terpene.

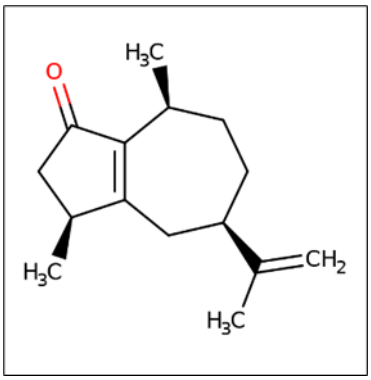



*Abbildung 1*: (-)-Rotundon Struktur; Quelle: https://static.cymit-quimica.com/products/3D/img/XR175543.gif.

Wie andere Sesquiterpene ist Rotundon damit ein sekundärer Pflanzenstoff, welcher in Weinreben, Traubenbeeren, Wein und Trester enthalten ist (Li et al., 2019). Seit einigen Jahren gelten neben den Monoterpenen auch die Sequiterpene als chemische Vertreter des sogenannten Primäraromas. Rotundon ist also eine Verbindung, die direkt von der Traube stammt. Damit handelt es sich um einen sogenannten originären bzw. primären Traubenaromastoff. Die beiden Unterklassen der Terpene, die eine maßgebliche Rolle im Weinaroma spielen, sind die Monoterpene bzw. die der Sequiterpene.

*Abbildung 2* versucht, die Verbindung Rotundon in eine Übersicht von Trauben und weinrelevanten Terpene zuzuordnen. Generell wird über Sesquiterpene berichtet, dass diese potenziell zu den gesundheitlichen Vorteilen von Wein beitragen (Rocha et al., 2006). So verfügen einige Verbindungen offenbar über entzündungshemmende Eigenschaften (Fernandes et al., 2007), antibakterielle Eigenschaften, einschließlich einer Erhöhung der bakteriellen Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika (Gonçalves-Pereira und Póvoa, 2011), vantikarzinogene (Tatman und Mo., 2002) und antioxidative Wirkungen (Ruberto und Baratta, 2000). Auch

D‘Onofrio et al. (2017) berichten, dass der Sesquiterpengehalt in einer Rebsorte für die organoleptischen und nutrazeutischen Eigenschaften von Traubenprodukten mitverantwortlich ist. Li et al. (2019) fassen in einer Studie 97 Sequiterpene zusammen. Als Hauptbestandteile von Sesquiterpenen in Trauben und Weinen wurden vor allem α-Ylangene, β-Caryophyllen, α-Caryophyllen und Germacren D sowie sauerstoffhaltige Sesquiterpene, einschließlich Farnesol und Nerolidol, identifiziert (Luo et al., 2019; May und Wüst, 2012; Zhang et al., 2016a). Die meisten in Trauben häufig vorkommenden Sesquiterpenkohlenwasserstoffe fehlen im Wein. Dimming (2015) zeigt durch ihre Untersuchung von Grünen Veltliner Beeren das Vorhandensein von sieben Sesquiterpenen bei verschiedenen Grüner Veltliner Klonen. Dabei handelt es sich um gamma-Cadinen, delta-Cadinen, alpha-Muurolen/Germacren D, Ylangen, Valencen, (+) -Aromadendren, beta-Caryophyllen, beta-Cyclocitral, Geranylaceton, Linalool und R (+) -Limonen. Dimming (2015) konnte diese Sequiterpene später im Wein der Sorte Grüner Veltliner nicht wiederfinden; eine Erklärung, warum viele Sequiterpene in Trauben als Vorläufer zu finden sind, aber später im Wein nicht mehr existent sind. Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese Verbindungen nicht in weinähnliche hydroalkoholische Lösungen extrahiert werden und stattdessen aus dem Saft entfernt werden, weil sie an Feststoffe aus Trauben zurückbinden. Dies bedeutet, dass Sesquiterpenkohlenwasserstoffe in Trauben als Geschmacksvorläufer wirken können, nicht jedoch im Wein. Eine der Ausnahme bildet das Rotundon. Für die Weinaromaforschung ist dieses Sequiterpen aufgrund dieser Attribute so spannend. Die erste Besonderheit ist, dass es als sogenanntes Primäraroma sowohl in den Trauben als auch später noch im Wein vorkommt, wobei normalerweise viele Sequiterpene nur in Trauben, aber später nicht mehr im Wein gefunden werden.

Die zweite Besonderheit ist seine niedrige Wahrnehmungsschwelle und seine starke charakteristische pfeffrige Note, die im Wasser bei 8 ng/l und im Rotwein bei 16 ng/l liegt. Ferreira (2012) zählt Rotundon zu den geruchsintensiven Aromastoffen im Wein. Um die Potenz dieser Verbindung und dessen Geruchsschwelle zu veranschaulichen: 5 ml Rotundon würden ausreichen, damit alle jährlich produzierten australischen Weine (ca. 12,9 Mio. Hektoliter) deutlich nach Pfeffer schmecken.

Anosmie – Spezifische Anosmie und Bedeutung

Obwohl es eine Leitsubstanz, also ein sogenannter impact odour ist, gibt es bei der Verbindung Rotundon eine sogenannte spezifische Anosmie. Laut der australischen Forschungsgruppe rund um Wood et al. (2008) und Siebert et al. (2008) können ungefähr 20 % der Verkostungsteilnehmer diese Verbindung selbst bei der höchsten getesteten Konzentration (4000 ng/l) auch in Wasser nicht wahrnehmen. Daher können die sensorischen Erfahrungen zweier Verbraucher bzw. Verbraucherinnen, die dasselbe Glas Shiraz Wein genießen, sehr unterschiedlich sein. Trotz der Anosmie kann Rotundon von Konsument*innen in anderen Produkten wahrgenommen werden. So wurde Rotundon in viel höheren Konzentrationen als im Wein in bekannten und gängigen Kräutern und Gewürzen wie Thymian gefunden, insbesondere aber in schwarzen und weißen Pfefferkörnern, wo ungefähr 10.000-mal so viel vorhanden ist wie in sehr „pfefferigem“ Wein.

Die Einmaligkeit des Rotundons liegt darin, dass Rotundon die erste bekannte Schlüsselverbindung in schwarzen oder weißen Pfefferkörnern ist, die ein charakteristisches Pfefferaroma aufweist. Außerdem hat Rotundon einen Geruchsaktivitätswert in Pfeffer in der Größenordnung von 50.000 bis 250.000 und ist nach diesem Kriterium die mit Abstand stärkste Aromastoffverbindung, die bisher in diesem wichtigsten Gewürz gefunden wurde.

Dieses Phänomen der spezifischen Anosmie wird gerade in Zusammenhang mit dem analysierten Rotundon von mehreren Quellen (Wood et al., 2008; Gaby et al., 2020) beschrieben. Für Rotundon kann eine spezifische Anosmie vorliegen, da einige Personen es trotz normalem Geruchssinn – selbst bei hohen Konzentrationen – nicht wahrnehmen können. Dies kann die Wahrnehmung der Pfeffrigkeit und somit die Präferenz für rotundonhaltige Weine beeinträchtigen. Gerade in Zusammenhang mit einer so geruchsaktiven Verbindung wirkt dies zweifelsohne kurios. Die Person, die die Pfeffernote nicht wahrnimmt, ist von der sogenannten spezifischen Anosmie betroffen. Dabei handelt es sich um eine deutlich verminderte Sensibilität gegenüber einer Duftstoffgruppe (Croy et al., 2015). Spezifische Anosmie ist die Unfähigkeit, einen bestimmten Geruch wahrzunehmen, während die allgemeine Riechverarbeitung unbeeinträchtigt ist (Croy et al., 2016).

Laut Studien von Croy et al. (2016) zur spezifischen Anosmie von über 20 verschiedenen Geruchsstoffen mit 1600 Probanden zeigte sich, dass spezifische Anosmien keineswegs ein seltenes Phänomen sind, wie bis dato angenommen wird. Croy et al. (2016) fanden heraus, dass

die Wahrscheinlichkeit, eine spezifische Anosmie auf irgendeinen Geruchsstoff zu haben, quasi 1 beträgt. Außerdem stellten sie fest, dass spezifische Anosmien durch dauerhafte und wiederholte Exposition von Düften behebbar sind. Die Forscher*innen weisen darauf hin, dass spezifische Anosmien keine Ausnahme, sondern die Regel olfaktorischer Verarbeitung sind und einen flexiblen Filtermechanismus für die Riechreize darstellen.

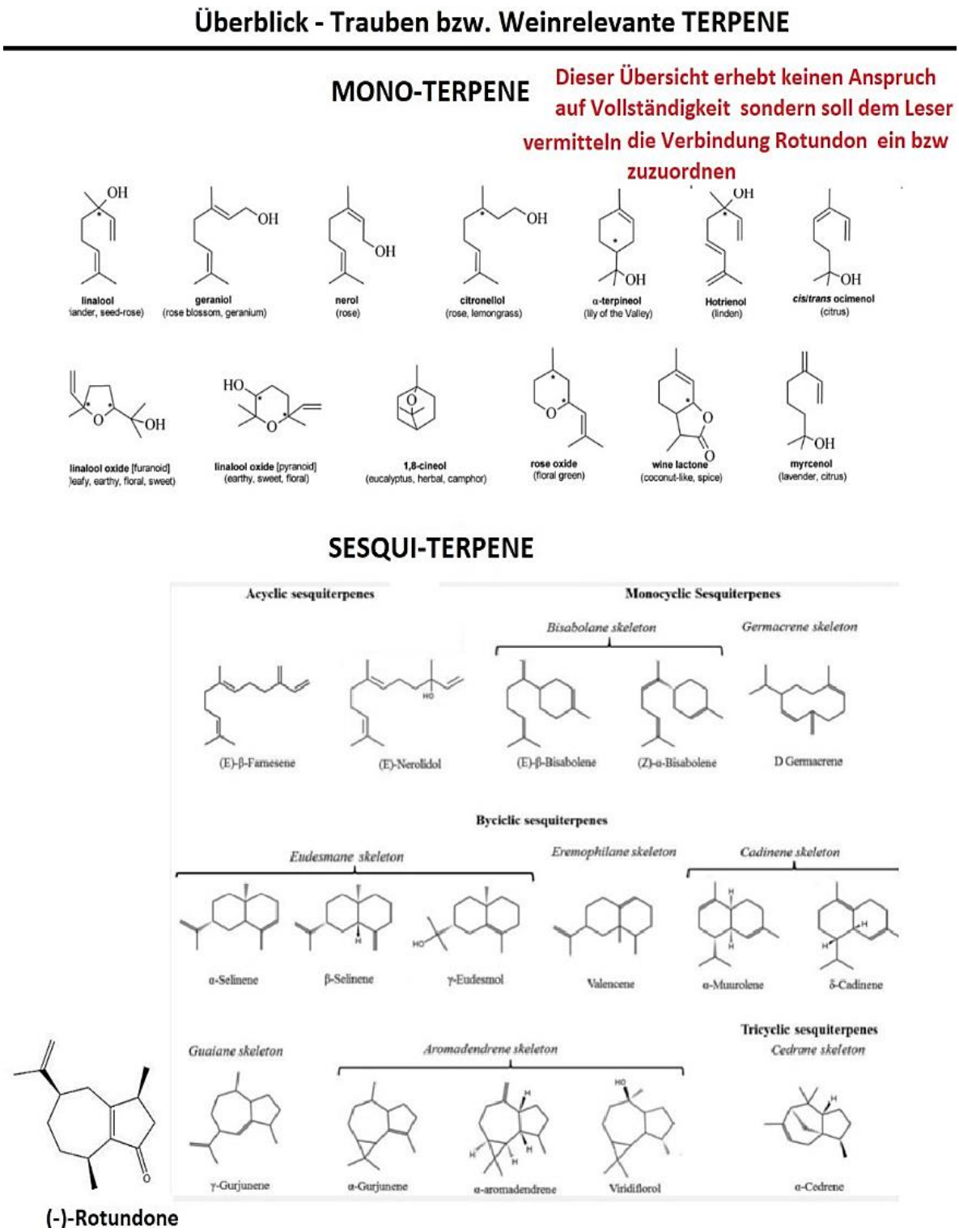



*Abbildung 2*: Überblick/Auszug Trauben bzw. weinrelevante Terpene, um Rotundon zuzuordnen; Quellen: Grafik der Trauben-Monoterpene aus Panighel und Flamini (2015); Grafik der Sesquiterpene aus Cincotta et al. (2015).

Vorkommen von Rotundon

Diese Verbindung wurde in den 1960er-Jahren aus knolligem Zypergras (*Cyperus rotundus*) isoliert, dem es letztendlich auch seinen Trivalnamen zu verdanken hat (https://ives-technicalreviews.eu/article/download/4483/13222?inline=1). Als Rotundon als pfeffrige Leitsubstanz im Shiraz durch Wood, Siebert im Jahr 2008 identifiziert wurde, erlebte das Molekül seine Wiederauferstehung und rückte nach beinahe 48-jähriger Abwesenheit wieder in den Fokus der Forschung. Es handelt es sich bei Rotundon um ein ziemlich allgegenwärtiges, weitverbreitetes Molekül. So konnte es neben dem Zyperngrass in Pfeffer mit 1.200 bis 2.025 µg/kg (Wood et al., 2010) sowie einer Vielzahl an anderen mediterranen Kräutern wie Basilikum, Thymian, Majoran identifiziert und quantifiziert werden. Die folgende *Tabelle 2* sowie die *Abbildung 3* zeigen eine Konzentrationsverteilung zwischen Trauben (0,62 µg/kg), Wein (0,150 µg/kg) und Kräutern.

*Tabelle 2*: Vergleich der Rotundon Gehalte von Kräutern, Wein, Trauben in µg/kg; Quelle: Wood et al. (2010).

| Tabelle Konzentration von Rotundon in verschiedenen Pflanzen und Pflanzenprodukten | |
|---|---|
| Beispiel | Rotundonkonzentration (µg/kg, Mittelwert einer doppelten Extraktion und Analyse) |
| Weißer Pfeffer (***Piper nigrum***) | 2025 |
| Black Pfeffer (***Piper nigrum***) | 1200 |
| Wein (***Vitis vinifera***) | 0,15 |
| Trauben (***Vitis vinifera***) | 0,62 |
| Majoran (***Origanum majorana***) | 208 |
| Geranie, Pelargonie (***Pelargonium alchemilloides***) | 25 |
| Knolliges Zypergras (***Cyperus rotundus***), Nussgras | 920 |
| Rosmarin (***Rosmarinus officinalis***) | 86 |
| grauer Salzbüschel, Küstensalzbüschel (***Atriplex cinerea***) | 37 |
| Basilikum (***Ocimum basilicum***) | 4 |
| Thymian (***Thymnus vulgaris***) | 5 |
| Oregano (***Origanum vulgare***) | 1 |

Neben Kräutern trägt dieses Sequiterpen laut Wu und Cadwaller (2019) auch zum Aroma von geröstetem Chicoree bei. Arbeiten von Nakanishi et al. (2017a, 2017b) weisen den Beitrag von Rotundon in Mango, Apfel, Orange, Grapefruit und Fruchtsäften nach.

Vorkommen von Rotundon in bisher analysierter Rebsorten

Bei Geffroy et al. (2020) findet sich eine *Tabelle 3* (unten), welche die Rotundongehalte bisher analysierter Rebsorten gegenüberstellt. Bei Betrachtung dieser Rotundongehalte von Handelsproben in dieser Tabelle fällt sofort die Dominaz der roten Rebsorten auf. Weißweine sind in dieser Zusammenstellung von Geffroy et al. (2020) kaum vertreten. Die Ausnahme stellt derzeit der Grüne Veltliner dar. Außerdem zeigt sich, wie schon bei den Kräutern zuvor, wie weitverbreitet das Molekül Rotundon in vielen Rebsorten ist.

Wie bei Genthner (2014) nachzulesen ist, findet sich Rotundon auch in Spirituosen bzw. Destillaten wie Whisky, Tequila, Rum, Brandy. In diesen Destillaten wurden Konzentrationen bis zu 1.345 ng/l gefunden. Diese Konzentrationen resultieren einerseits aus Fasslagerung, anderseits aus der Lagerungsdauer.

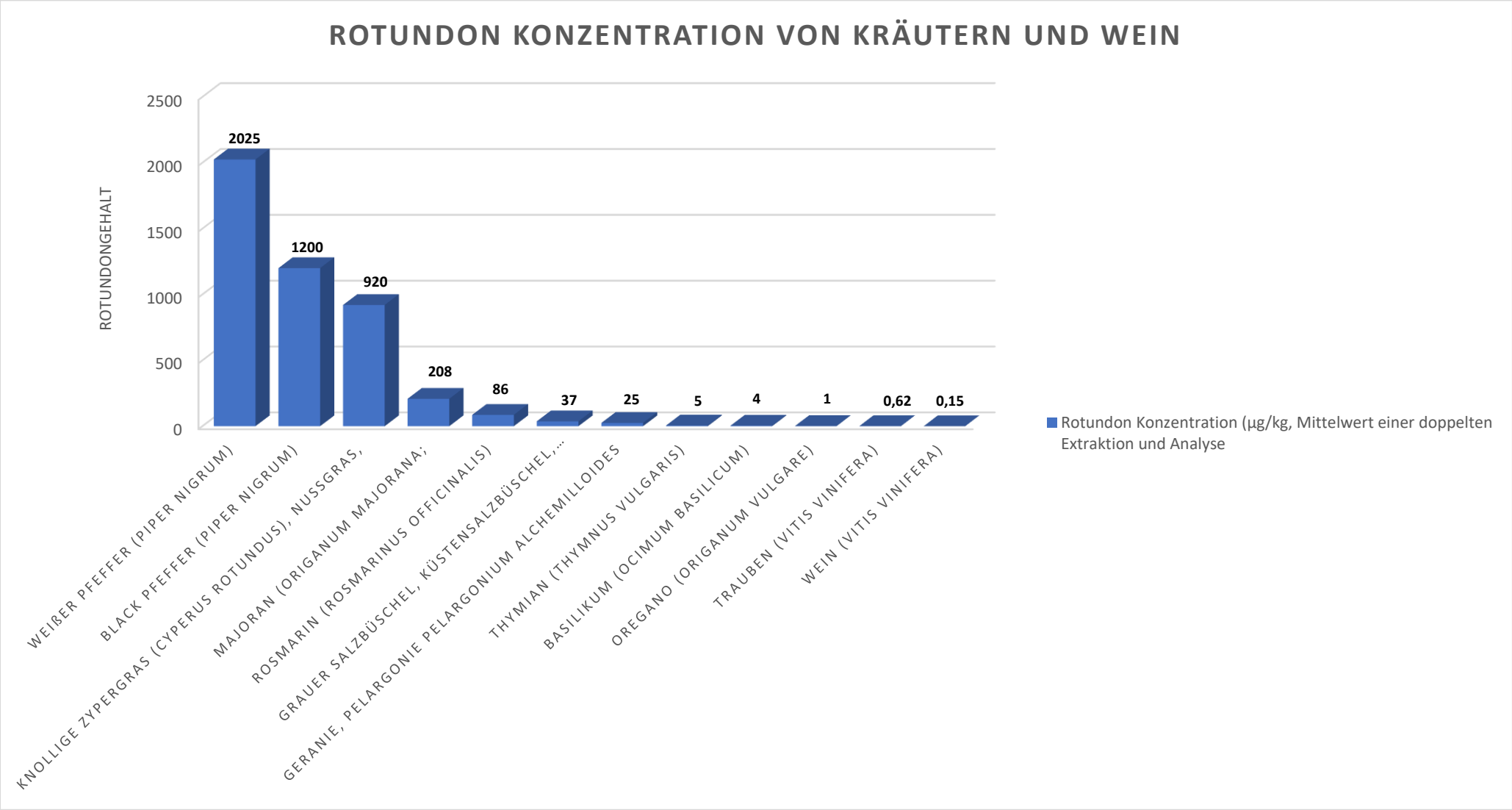



*Abbildung 3*: Visueller Vergleich der Rotundongehalte von Kräutern, Wein, Trauben in µg/kg; Quelle: Wood et al. (2010).

*Tabelle 3*: Vorkommen bzw. Vergleich von Rotundongehalten bisher analysierter Rebsorten (Handelsproben); Quelle: In Anlehung an Geffroy et al. (2020).

| ***Rebsorte*** | ***Rotundonkonzentration ng/l*** | ***Rotwein oder Weißwein*** | ***Region, aus der die Trauben/Weine stammen*** | ***Referenz*** |
|---|---|---|---|---|
| Areni | 68 | Rotwein | Armenien | Geffroy (2018) |
| Abouriou | 58 | Rotwein | Côtes du Marmandais, Frankreich | Cullere et al. (2016) |
| Castets (Maturana Tinta) | 8-112 | Rotwein | La Rioja, Spain | Cullere et al. (2016) |
| Castets (Maturana Tinta) | 50 | Rotwein | La Rioja, Spanien | Geffroy et al. (2017b) |
| Durif | 2-35 | Rotwein | Mehrere Regionen von Australien | Herderich et al. (2012) |
| Gamay | 19-85 | Rotwein | Zentral-Frankreich | Cullere et al. (2016) |
| Graciano | 0,6-17 | Rotwein | La Rioja, Spanien | Cullere et al. (2016) |
| Graciano | 38 | Rotwein | Bezirk Canberra, Australien | Herderich et al. (2012) |
| Grüner Veltliner | 63-266 | Weißwein | Mehrere Regionen von Österreich | Mattivi et al. (2011) |
| Grüner Veltliner | 9-85 | Weißwein | Mehrere Regionen von Österreich | Nauer et al. (2018) |
| Mondeuse | 54-62 | Rotwein | Savoie, France | Geffroy et al. (2017b) |
| Mourvedre | 11 | Rotwein | Nicht bekannt | Cullere et al. (2016) |
| Mourvedre | 32 | Rotwein | Bandol, Frankreich | Geffroy et al. (2017b) |
| Pineau d'Aunis | 66-200 | Rotwein | Loiretal, France | Geffroy (2018) |
| Pinot noir | 3-11 | Rotwein | Mehrere Regionen von Australia | Herderich et al. (2012) |
| Pinot noir | 38 | Rotwein | Zentral-Frankreich | Geffroy (2018) |
| Riesling | 9 | Weißwein | Frankland River, Australien | Herderich et al. (2012) |
| Schioppettino | 19-35 | Rotwein | Friaul, Italien | Cullere et al. (2016) |
| Schioppettino | 457-561 | Rotwein | Friaul, Italien | Mattivi et al. (2011) |
| Syrah | 150 | Rotwein | Mehrere Regionen von Australia | Wood et al. (2008) |
| Syrah | 7-161 | Rotwein | Mehrere Regionen von Australia | Herderich et al. (2012) |
| Syrah | 2-116 | Rotwein | Grampians, Australia | Zhang et al. (2015b) |
| Syrah | 17-90 | Rotwein | Hawke's Bay, New Zealand | Logan (2015) |
| Syrah | 39-142 | Rotwein | Northern Rhone Valley | Takase et al. (2015) |
| Syrah | 152-232 | Rotwein | Mehrere Regionen von Japan | Takase et al. (2015) |
| Syrah | 2-18 | Rotwein | Südfrankreich, Australia | Cullere et al. (2016) |
| Touriga Nacional | 9 | Rotwein | Douro, Portugal | Geffroy (2018) |
| Vespolina | 278-560 | Rotwein | Nord Italien | Mattivi et al. (2011) |

### 1.1.2 Lokalisation, Verteilung und Bildung des Rotundons in der Rebe bzw. Traube

Über das Vorkommen bzw. speziell die Lokalisation in Trauben berichtet Caputi (2011), dass sich 96 bis 99 % des Rotundons im Exokarp der Beerenhaut befinden. Ebenso berichten Zhang et al. (2016), dass das Vorkommen von Rotundon im Wein hauptsächlich von der Traubenschale stammt. Laut Zhang et al. (2016) kann es auch in Nicht-Traubengeweben wie Blättern und Stielen gefunden werden. Vor diesem Forschungsergebnis war unklar, ob Rotundon unabhängig in verschiedenen Weinrebengeweben produziert oder zwischen Nicht-Traubengewebe und Traubenbeeren transportiert werden kann. Des Weiteren untersuchten Zhang et al. (2016) die Verteilung von Rotundon und mögliche Translokation in Weinrebengewebe bei Shiraz. Die Studie ermittelte die Verteilung dieser Verbindung in verschiedenen Rebengeweben während der Entwicklung. Es wurde mittels isotopenmakiertem Rotundon versucht, den wahrscheinlichsten Weg der Rotundontranslokation – über das Phloem – herauszufinden. Darüber hinaus wurde bewertet, ob die lokale Produktion von Rotundon durch Fraßschädlinge induziert wurde. Durch Zhangs (2016) Ergebnisse konnte erstmals gezeigt werden, dass Rotundon im Rahmen der Entwicklung von Vitis vinifera L. cv. in den Blattstielen und Stielen bzw. Rachisen vorhanden ist. Ebenfalls zeigte sich, dass verschiedene Weinrebengewebe ein ähnliches Muster der Rotundonproduktion in verschiedenen Traubenentwicklungsstadien aufwiesen. In den einzelnen Rebentrieben enthielten Nicht-Traubengewebe im Vergleich zu Beeren höhere Konzentrationen an Rotundon.

Zhang et al. (2016) bestätigten die lokale Produktion von Rotundon in einzelnen Geweben und schlossen die Möglichkeit einer Phloem-Translokation von Rotundon zwischen verschiedenen Geweben aus. Im Gegensatz zu anderen durch Pflanzenschädlinge induzierte Terpene hatte diese Schutzaktivität einen begrenzten Einfluss auf die Konzentration von Rotundon in Weinblättern.

Laut Caputi et al. (2011) reichert sich die Verbindung Rotundon von der Veraison bis zur Ernte fast ausschließlich in Beerenexokarp an. Geffroy et al. (2014) verwiesen darauf, dass die Anreicherung dieser Verbindung in Shiraz-Weinen von den Jahrgangsbedingungen und dem Reifegrad abhängig war, sodass 44 Tage nach der mittleren Reife eine höhere Rotundonkonzentration erreicht wurde. Sowohl Studien wie jene von Geffroy et al. (2014) und Zhang, et al.

(2015), die die Rotundonakkumulation in Trauben nach der Veraison untersucht haben, zeigten, dass sie sich hauptsächlich nach mittlerer Reife akkumuliert. Informationen zur Sesquiterpenakkumulation während der Beerenentwicklung, insbesondere vor der Veraison, fehlen derzeit noch.

Um die Biosynthese des Rotundons in die Terpenebildung einzuordnen, liefern Wedler et al. (2015) einen wichtigen Ansatz zum Verständnis hinsichtlich des Ausgangsprodukts: dass Monoterpene (10 Kohlenstoffe) aus Geranyldiphosphat (GPP) hergestellt werden, während Sesquiterpene (15 Kohlenstoffe) hingegen aus Farnesyldiphosphat (FPP) und Diterpene (20 Kohlenstoffe) aus Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) synthetisiert werden. Die nachfolgende *Abbildung 4* zeigt übersichtlich die Basis beziehungsweise Schlüsselausgangsverbindung für die jeweilige Terpenklasse.

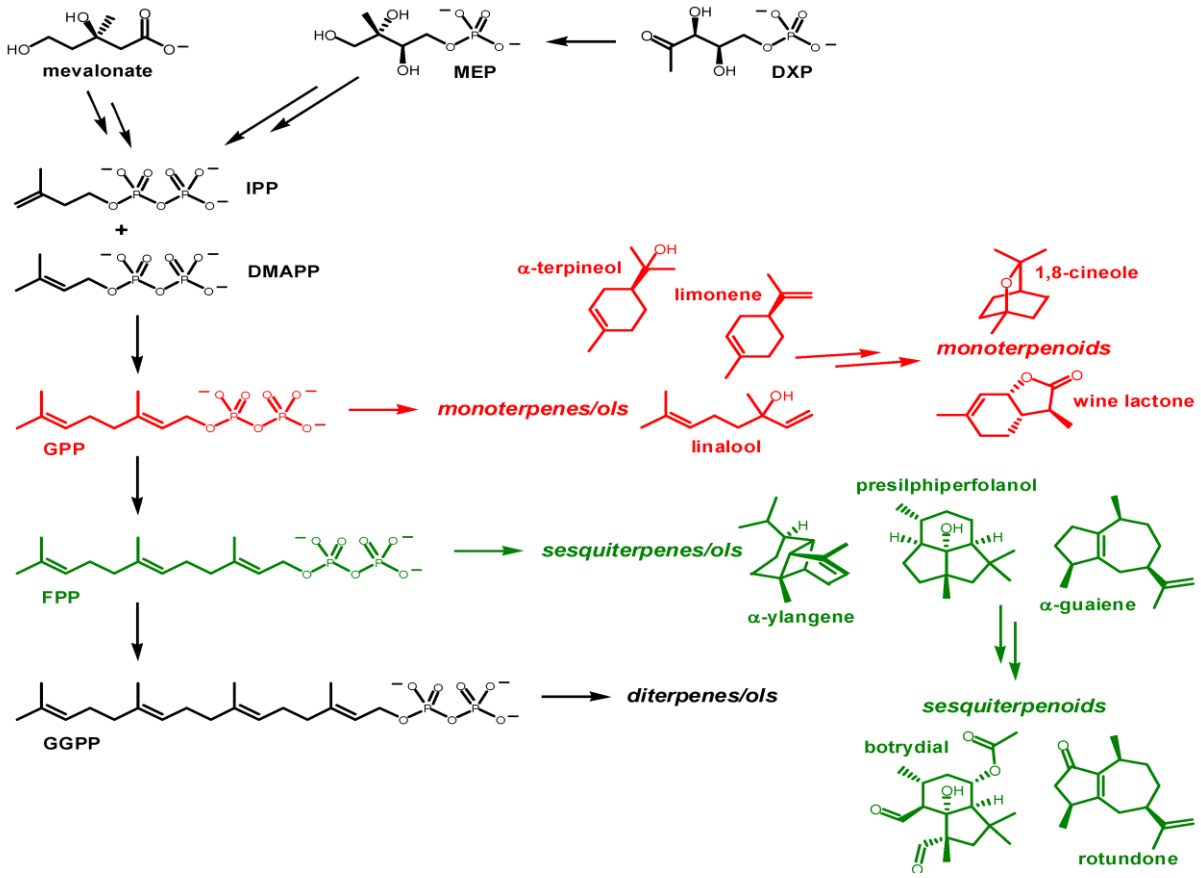



*Abbildung 4*: Überblick der chemischen Umwandlung in der Terpenbiosynthesebildung der Ausgangsprodukte; Quelle: Wedler et al. (2015).

Lange und Croteau et al. (1999), Eisenreich et al. (1998), Lange et al. (2000) und Sallaud et al. (2009) verweisen auf zwei Stoffwechselwege, die GPP, FPP und GGPP erzeugen: erstens der sogenannte Mevalonat (MVA)-Weg und zweitens der 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat/1-

Desoxy-D-xylulose-5-phosphat/DXP)-Weg (siehe *Abbildung 4*). Jeder Weg verwendet eine eigene Weise zur Erzeugung von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), die anschließend durch Geranyldiphosphatsynthase zu GPP kombiniert werden. GPP selbst ist ein Substrat für die Farnesyldiphosphat-Synthase. Nagegowda (2010) verweist darauf, dass in Weintrauben Vitis vinifera, GPP und FPP über den EP/DOXP-Weg in den Mitochondrien bzw. den MVA-Weg im Zytosol biosynthetisiert werden.

Die vorher genannte Schlüsselverbindung bzw. Wege der Terpenebildung wie Farnesyldiphosphat (FPP) der Mevalonat (MVA)-Weg bzw. der MEP/DXP = 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat/1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat/DXP) -Weg sollen bei nachfolgender Beschreibung helfen, die bisherigen Feststellungen über die Biosynthese des Sequiterpens Rotundon einzuordnen. So heben Schwab und Wuest (2015) zur Herkunft terpenoider Geruchsstoffe (Monoterpene und Sesquiterpene) in Wein hervor, dass diese gemischten Bildungsmechanismen wie enzymatische und nicht-enzymatische Schritte umfassen. Dies trifft zum Beispiel auf Rotundon zu. Es ist bekannt, dass die Bildung von Rotundon die enzymatische Bildung des Vorläufers α-Guaien erfordert, gefolgt von der nicht-enzymatischen Bildung von Rotundon durch Luftoxidation von α-Guaien (Huang et al, 2014). Rotundon wird also durch Luftoxidation und Biosynthese aus einer Vorläuferverbindung, α-Guaien, gebildet (Huang et al., 2014; Takase et al., 2015) (siehe *Abbildungen 5* und *6*). Dies stimmt mit der Beobachtung übereinstimmt, dass das pfeffrige Aroma oft zunimmt, wenn Wein im Laufe der Zeit zur Oxidation in einem Glas belassen wird (Petrozziello et al., 2021).

Hinsichtlich des Rotundonstoffwechselwegs sind weitere Details bekannt. So stellten Takase et al. (2016) bei Vergleich und Untersuchung zweier Syrah-Trauben verschiedener japanischer Weinberge fest, dass FPPS (farnesyl diphosphate synthase gen) eine Schlüsselrolle bei der Bestimmung des Akkumulationsniveaus von Rotundon spielen könnte, dass reichlich Substrate für die VvTPS24-Katalyse bereitstellen kann, um α-Guaien als Vorläufer von Rotundon zu produzieren. Darüber hinaus könnte das DXPS(1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase-Gens) unter dem MEP-Weg-Genen (2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat) eine regulatorische Rolle für eine Vorläuferversorgung von den Plastiden zur Rotundonbiosynthese spielen. Eine weitere, ebenfalls von Takase et al. (2016) durchgeführte Arbeit identifizierte VvSTO2 als α-Guaien-2-Oxidase, die α-Guaiene in Rotundon in der Rebsorte Syrah umwandeln kann. Die funktionelle Charakterisierung ergab, dass VvSTO2 eine Guaien-2-Oxidase ist, die in der Lage ist,

die C2-Position von α-Guaien zu oxidieren, was zur Biosynthese von Rotundon als Hauptreaktionsprodukt führt. Die Arbeit von Takase et al. (2016) legt nahe, dass die Akkumulation von Rotundon sowohl von der Biosynthese von α-Guaien als auch von der Expression des Schlüsselenzyms VvSTO2 abhängen (siehe *Abbildungen 5* und *6*).

Zusätzlich kann DXPs(1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase-Gen) unter den MEP-Pathway-Genen (ME P= 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat) eine regulatorische Rolle für eine Vorläuferversorgung der Plastiden zur Rotundon-Biosynthese spielen (siehe *Abbildungen 5* und *6*). Darüber hinaus zeigte sich auch, dass CYP71BE5 die Rotundon-Biosynthese zusammen mit der Verfügbarkeit von α-Guaien regulierte. FPPS kann zusammen mit VvTPS24 und CYP71BE5 als entscheidendes Zielgen für die Verbesserung der Rotundon-Biosynthese in Weinreben dienen, abhängig von verschiedenen Umweltfaktoren. Diese Ergebnisse legen nahe, dass FPPS eine Schlüsselrolle bei der Bestimmung des Akkumulationsniveaus von Rotundon spielen könnte, welches reichlich Substrate für die VvTPS24-Katalyse liefern kann, um ein Guaien als Vorläufer von Rotundon herzustellen. Zusätzlich kann DXPs(1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase-Gens) unter den MEP-Pathway-Genen eine regulatorische Rolle für eine Vorläuferversorgung der Plastiden zur Rotundon-Biosynthese spielen (siehe *Abbildungen 5* und *6*). Die biochemische Frage zu beantworten, warum bestimmte Traubensorten wie Syrah den direkten Vorläufer von Rotundon, Sesquiterpen α-Guaiene, anreichern, ist eine schwierige Aufgabe, wenn bedacht wird, dass bis zu 69 Terpen-Synthasen (TPSs) identifiziert wurden (Schwab und Wuest, 2015).

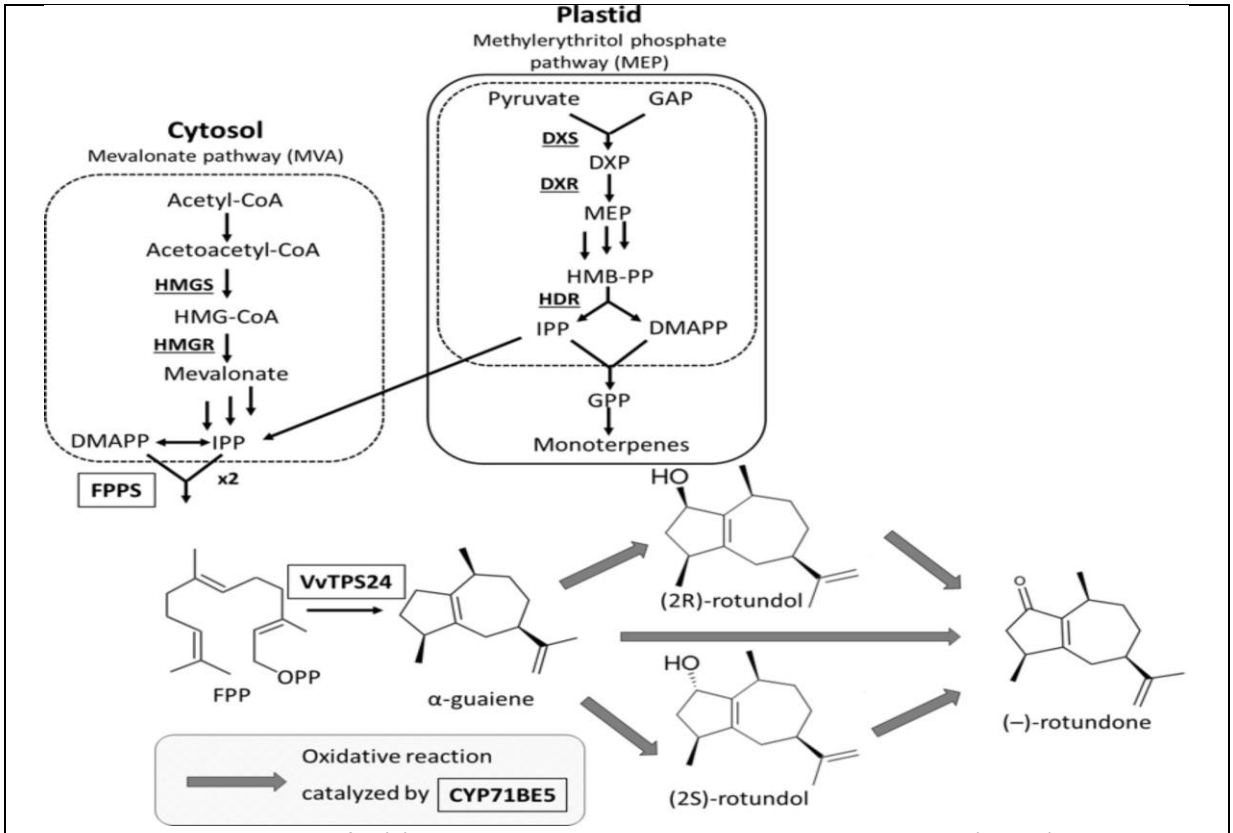



*Abbildung 5*: Biosyntheseweg für (−)-Rotundon; Quelle: vorgeschlagen von Takase et al. (2016a).

Biosyntheseweg für (-)-Rotundon; vorgeschlagen von Takase et al. (2016a).

➢Rotundon wird produziert durch die enzymatische Oxidation von α-Guaien.

Vorgeschlagene biosynthetische Bildung von Rotundon:
α-Guaien-bildende Carbokationskaskade gefolgt von radikalisch initiierter Oxidation; Wedler et al. (2015)

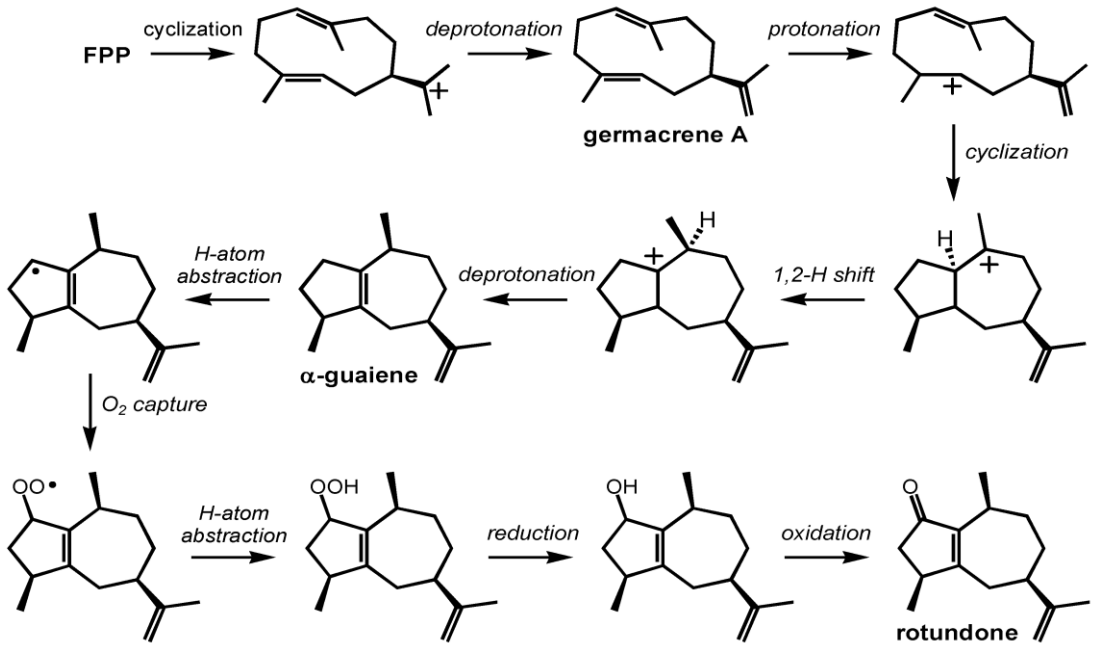



*Abbildung 6*: Vorgeschlagene biosynthetische Bildung von Rotundon: α-Guaien-bildende Carbokationskaskade gefolgt von radikalisch initiierter Oxidation; Quelle: Wedler et al. (2015).

Das Schema in *Abbildung 6* zeigt den mutmaßlichen Cyclisierungs-/Umlagerungsmechanismus von Carbokationen. In diesem Mechanismus wird ein Deprotonierungs-/Reprotonierungs-Prozess über eine Germacren-Zwischenstufe gezeigt. Es ist unbekannt, ob dieser Prozess durch einen konzertierten intramolekularen Protonentransfer ersetzt werden könnte (Hong und Tantillo, 2014). Dieser Protonentransferprozess – sei er konzertiert oder schrittweise – würde zu einer sekundären Carbokation führen (siehe *Abbildung 6*, oben rechts). Sekundäre Carbokationen werden häufig als Intermediate vermieden (Tantillo, 2011; Tantillo, 2008; Tantillo, 2010; Hong und Tanillo, 2014), sodass es möglich ist, dass der Protonentransfer mit einer Cyclisierung kombiniert wird. Ob die Bildung eines bestimmten Diastereomers bei der Cyclisierung energetisch bevorzugt wird oder nicht, ist ebenfalls nicht klar. Quantenchemische Berechnungen der oben beschriebenen Art könnten diese Rätsel lösen. Sobald α-Guaien gebildet ist, kann es durch nicht-enzymatische Oxidation in Rotundon umgewandelt werden (Huang et al., 2014). Ein mutmaßlicher Mechanismus für diesen Prozess, analog zu einem Mechanismus für die Lipidperoxidation, ist auch in Schema *Abbildung 6* untengezeigt. Bei diesem Vorgang ist nicht klar, warum die Abstraktion eines allylischen Wasserstoffatoms zu dem gezeigten spezifischen Allylradikal vorherrscht; auch eine Abstraktion von drei anderen allylischen Positionen ist möglich. Sobald das Allylradikal gebildet ist, ist weder klar, warum der $O_2$-Einfang an der gezeigten spezifischen Stelle bevorzugt wird, noch ist klar, ob der Einfangschritt eine Diastereoselektivität aufweist. Auch hier könnten quantenchemische Berechnungen Licht ins Dunkel bringen.

### 1.1.3 Überblick über Effekte und Einflüsse auf den Rotundongehalt

Seit der Entdeckung von Rotundon im Wein im Jahr 2008 durch Forscher*innen des Australischen Weinforschungsinstituts (Wood et al., 2008) beschäftigen sich weltweit australische, französische, italienische und spanische Forschungsgruppen damit (neben der Messung des Rotundonsgehalts), wie sich Umweltfaktoren, weinbauliche Faktoren und technologische Maßnahmen auf den Rotundongehalt auswirkten. Diese Einflussfaktoren auf das Rotundon werden in den nachfolgenden Abschnitten basierend auf der derzeitigen Literatur näher vorgestellt.

#### *1.1.3.1 Umweltfaktorenbedingte Effekte auf den Rotundongehalt*

Australische Forschungsergebnisse von Zhang et al. (2015) haben gezeigt, dass der Anbau von Weinreben in einem kühlen Klima ein entscheidender Faktor ist, der die Ansammlung von Rotundon in Traubenbeeren und Wein fördert. Zhang et al. (2015) konnten durch die Analyse der Rotundonenkonzentration von 15 Jahrgängen (1996 bis 2014) eines Weines desselben Weinbergs in Shiraz und durch Verwendung bzw. Vergleich historischer Datensätze nachweisen, welche Wetterparameter die Rotundonkonzentration in Traubenbeeren und Wein am meisten beeinflussen. Die Ergebnisse von Zhang et al. (2015) zeigten, dass die höchsten Konzentrationen von Rotundon durchwegs in Weinen aus kühleren und feuchteren Jahrgängen gefunden wurden. Die Schwankungsbreite dieser Jahrgänge (1996 bis 2014) bewegte sich für die Verbindung Rotundon in Shiraz zwischen 2 ng/l bis 116 ng/l (Zhang et al., 2015).

Zusätzlich konnten die australischen Forscher*innen zeigen, dass die Konzentration von Rotundon im Wein negativ mit der täglichen Sonneneinstrahlung und der Temperatur der Traubenzone sowie positiv mit dem Wasserhaushalt des Weinbergs korrelierte.

Die von Zhang et al. (2015) beschriebene Modellierungstechnik war in der Lage, dass Verhalten der Rotundonkonzentration basierend auf saisonalen Wetterbedingungen und phänologischen Stadien der Weinrebe zu beschreiben und könnte möglicherweise dazu verwendet werden, um die endgültige Rotundonkonzentration in zukünftigen Vegetationsperioden vorherzusagen. Dies könnte die Einführung von Präzisionsbewässerungs- und Laubmanagementstrategien ermöglichen, um negative Auswirkungen im Kontext mit dem Klimawandel und mikroklimatische Schwankungen, wie beispielsweise Hitzewellen, innerhalb eines Weinbergs auf die Weinqualität wirksam abzuschwächen.

Laut Scarlett et al. (2014) wurde festgestellt, dass die Konzentration von Beerenrotundon räumlich deutlich variabel ist. Diese Schwankung der Rotundonkonzentration innerhalb der Weinberge dürfte mit der Variation der Bodeneigenschaften und der Topografie verbunden sein. Gerade diese lokalen Gegebenheiten haben Einfluss auf die Umgebungstemparatur als wahrscheinlichster Hauptgrund für diese Variation.

Zhang et al. (2015) führten eine Studie zu Umweltfaktoren, die die Variabilität der Rotundonenkonzentration in Beeren von Vitis vinifera L. cv. Shiraz untersuchten, durch. Dazu zählten die Umweltfaktoren, die die Rotundonkonzentrationen in Traubenbeeren antreiben, indem die Rotundonvariabilität quantifiziert und mit weinbaulichen Parametern korreliert wird. Die Einteilung des Weinbergs in verschiedene Zonen (auf Grundlage von Wuchsstärke, elektrischer Bodenleitfähigkeit und Hanglage), Weinreben in Sonnenorientierungen (schattiert bzw. unschattig) und Trauben in Sektoren (oben und unten sowie vorne und hinten) zeigt den Einfluss von Rebenkraftvitalität, Sonnenlicht und Temperatur. Das Vorkommen der höchsten Rotundonenkonzentration wurde in schattigen Traubensektoren und Reben und bei höherwüchsigen Reben in den südlich ausgerichteten Bereichen des Weinbergs beobachtet. Die höchste Konzentration an Rotundon findet sich durchweg an der Spitze und in den schattigen Sektoren der Trauben, was mit niedrigeren Oberflächentemperaturen der Trauben korreliert. Die Modellierung zeigte, dass eine Beerentemperatur von über 25° C die Rotundonkonzentration in Shiraz negativ beeinflusst. Sowohl die natürliche als auch die künstliche Schattierung moduliert die Traubenoberfläche und die Lufttemperatur in der Traubenzone und erhöht die

Rotundonkonzentration, ohne andere Qualitätsparameter der Traubenbeere zu beeinträchtigen. Daher sind die Temperatur und möglicherweise der Grad der Beschattung die Hauptdeterminanten von Rotundon in Weinbeeren. Die Weinbergtopografie, die Rebenvitalität, die Rebzeile und die Traubenorientierung beeinflussen den Grad der Beerenabschattung und können daher die Traubenoberflächen- und Zonentemperaturen anpassen und somit die Beerenrotundonkonzentration beeinflussen.

Neben der Sonneneinstrahlung, die in Weinbergen unterschiedlich ist, gibt es einen weiteren Faktor, der ebenfalls unterschiedlich ist, nämlich das Weinbergbodenmikrobiom. Deshalb untersuchten Gupta et al. (2019) die Zusammensetzung des Weinbergbodenmikrobioms im Zusammenhang mit der Rotundonkonzentration in australischen „pfeffrigen“ Shiraz-Trauben im kühlen Klima. Es ist jedoch wenig über die Rolle von Bodenmikroben, außer mikrobiellen Krankheitserregern, auf die Traubenzusammensetzung oder ihre Rolle bei den Auswirkungen des Jahrgangs oder des Standorts (Terroir) auf die Traubenzusammensetzung bekannt.

Gupta et al. (2019) nutzten einen Amplikon-Sequenzierungsansatz, um die potenziellen Beziehungen zwischen Bodenmikroben und der inhärenten räumlichen Variation der Zusammensetzung der Traubenmetaboliten sowie insbesondere die Konzentration des „Impact Aroma Compound“ Rotundon in Shiraz-Trauben zu untersuchen (Vitis vinifera L.). 16S-rRNA- und ist-Region-Amplikon-Sequenzierungsanalysen von mikrobiellen Gemeinschaften in den Oberflächenböden, die aus diesen Zonen (definierte Zonen mit inhärent niedriger oder hoher Konzentration des Traubenmetaboliten Rotundon) gesammelt wurden, zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Zonen in der genetischen Vielfalt und Zusammensetzung des bakteriellen und pilzlichen Mikrobioms des Bodens. Böden in der Zone mit hohem Rotundon zeigten eine höhere Diversität an Bakterien, aber eine geringere Diversität an Pilzen im Vergleich zu Böden in der Zone mit niedrigem Rotundon. Gupta et al. (2019) konnten darüber hinaus mit Netzwerkanalysen feststellen, dass die mikrobielle Zusammensetzung in den Böden der Zone mit hohem Rotundon gut strukturiert ist, insbesondere in Bezug auf die Bakteriengemeinschaft, verglichen mit der in Böden der Zone mit niedrigem Rotundongehalt. Die Hauptunterschiede zwischen den Rotundonzonen in der mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur waren gerade für Bakterien und Pilze offensichtlich, insbesondere hinsichtlich Bakterien, die zu den Acidobacteria-GP4 und GP7, Rhizobiales, Gaiellaceae, Alphaproteobakteria und den Nectriaceae- und Tremellaceae-Pilzfamilien gehören. Obwohl das Mulchen in einigen Teilen des

Weinbergs Veränderungen in der Bakterien- und Pilzzusammensetzung und der gesamten mikrobiellen katabolen Diversität und Aktivität verursachte, maskierten diese Auswirkungen nicht die auf der rotundonzonebasierende Variation. Basierend auf Guptas Feststellungen bzw. Guptas Befund über die Variation in Bodenmikrobiomen in den Rotundonzonen wird verdeutlicht, wie entscheidend das Verständnis der mikrobiellen Ökologie, der Pflanzenbiochemie und des Weinbaumanagements für ein verbessertes Management des Traubenstoffwechsels und der Zusammensetzung sowie des Weingeschmacks sind.

Harner et al. (2019) haben in einer Studie klimatische und weinbauliche Faktoren gemeinsam bewertet, um herauszufinden, welche Variablen den stärksten Einfluss auf die Akkumulation von Rotundon haben. Der Beweggrund für Harner et al. (2019) war es, zu verstehen, wie einzelne klimatische oder kulturelle Faktoren die Bildung von Rotundon in Trauben und anschließend den Grad der Pfeffrigkeit des Weins beeinflussen. Harner et al. (2019) entwickelten ein Vorhersagemodell, das Faktoren (Auswirkungen von Wetter und weinbaukulturelle Faktoren) identifizierte, die die Rotundonkonzentrationen in Noiret-Trauben (Vitis sp.) bei der Ernte erklären. Das amerikanische Forschungsteam hat 21 weinbauliche, meso- und mikroklimatische Variablen und Konzentrationen von Rotundon in Noiret-Weintrauben in sieben Weinbergen im Nordosten der USA der Jahrgänge 2016 und 2017 gemessen. Laut Harner et al. (2019) waren die Wachstumsgradtage während der Fruchtreifung (=growing degree days (GDDv)) und die Menge der Sonnenstrahlung (kumulative Sonnenexposition, cumulative solar exposure; CSE), für die Rotundonkonzentration entscheidend. Harner et al. (2019) konnten eine postive Rotundonkorelation bei niedrigen (< 15 °C) und eine negative Korelation bei hohen (> 30 °C) Beerentemperaturen feststellen. Die Forscher und Forscherinnen entwickelten unter Verwendung eines 2-Jahres-Datensatzes ein Vier-Variablen-Modell, das mehr als 80 % der Variationen der Rotundonkonzentration bei der Ernte erklärt. Das Modell umfasste das Wetter (Wachstumsgradtage während der Fruchtreifung (growing degree days (GDD) und pflanzenbezogene Variablen (Phosphor- und Kalziumkonzentration im Blattstiel und Erntemenge). Das von Harner et al. (2019) entwickelte Modell könnte von Weinproduzenten verwendet werden, um Standorte oder kulturelle Praktiken zu identifizieren, die die Akkumulation von Rotundon begünstigen.

#### *1.1.3.2 Weinbaubedingte Effekte auf den Rotundongehalt*

Die nun nachfolgend präsentierten Ergebnisse aus weinbaulich relevanten Arbeiten (Geffroy et al., 2014; Davies et al., 2015; Geffroy et al., 2016; Geffroy et al., 2019) liefern wichtige Erkenntnisse und Rückschlüsse, wie sich weinbauinduzierte Maßnahmen bzw. Handlungen auf Rotundon auswirkten. Die erwähnten weinbaulichen Arbeiten beschäftigten sich aber ausschließlich mit Rotweinen bzw. fanden in Australien bzw. Frankreich statt (z. B. Shiraz, Fer).

Ergebnisse von Geffroy et al. (2014) zeigen, dass die Anreicherung dieser Verbindung in Weinen von den Jahrgangsbedingungen und dem Reifegrad abhängig waren, sodass 44 Tage nach der mittleren Reife eine höhere Rotundonkonzentration erreicht wurde. Aus praktischen Überlegungen bedeutet das, den idealen Erntezeitpunkt hinsichtlich des maximalen Rotundongehalts zu finden. Des Weiteren zeigte sich nach Geffroy et al. (2014), dass die Anwendung von exogener Jasmonsäure bzw. das Ausdünnen der Trauben die Rotundonkonzentration nicht signifikant beeinflussten, während das Entfernen der Blätter die Rotundonkonzentration stark reduzierte. Die Verringerung der Rotundonkonzentration in den Beeren durch die Entlaubung wurde auch von Logan (2015) nachgewiesen. Gerade die Blattentfernung führt zu höheren Beerentemperaturen. Die Arbeiten von Zhang et al. (2015a, 2015b) zeigten, wie bereits erwähnt, dass bei Beerentemperaturen über 25 °C eine deutliche Reduktion der Rotundonproduktion feststellbar war; dasselbe bewiesen die Arbeiten von Harner et al. (2019) bei Beerentemperaturen über 30 °C.

Außerdem wies der Wein aus bewässerten Behandlungen eine höhere Rotundonkonzentration auf. Damit wurde der Wasserzustand der Reben während der Erntezeit als eine weitere-Schlüsselvariable identifiziert, die gut mit der beobachteten Variabilität des Rotundons innerhalb der Parzelle korrelierte.

Zur gezielten Beeinflussung des Erntezeitpunkts gibt es eine Studie von Davies et al. (2015). Diese demonstrierte, dass Shiraz-Weine – aus Traubenbeeren (Vitis vinifera), die durch Behandlung mit Pflanzenwachstumsregulatoren wie 1-Naphthalenessigsäure (NAA) oder 2-Chlorethylphosphorsäure (Ethrel) in der Reifung verzögert worden waren – erhöhte Rotundonkonzentrationen und somit mehr Pfeffergeschmack und -aroma aufwiesen. Davies et al. (2015) stellten fest, dass 1-Naphthalenessigsäure wirksamer als Ethrel ist. NAA verzögerte die

Ernte um 23 Tage im Vergleich zu sechs Tagen für Ethrel. Es zeigte sich, dass die Rotundongehalte in NAA-Weinen (29 ng/l) um ein Vielfaches höher waren als in Ethrel-Weinen (2 ng/l). Somit kann die Behandlung von Trauben mit NAA und in geringerem Maße mit Ethrel die Reifung verzögern und die Rotundonkonzentration in Shiraz-Frucht erhöhen, wodurch die pfeffrigen Eigenschaften des Weins verstärkt werden. Auch eine sensorische Analyse von Weinen aus NAA-behandelten Früchten zeigte einen höheren Pfeffergeschmack und -aroma im Vergleich zu denen der Kontrollweine oder Ethrel-behandelten Beeren.

Geffroy et al. (2016) konnten in ihrer Studie durch Traubentrocknung am Rebstock mit Hilfe der Anwendung sogenannter „Passerillage Éclaircissage sur Souche“ (PES) in Kombination mit Bewässerung bei Rotweinen eine erhöhte Phenol- und Rotundonkonzentration belegen. Bei PES handelt es sich um eine Technik, bei der einige Wochen vor der Ernte ein Teil des Fruchtzweigs abgeschnitten wird. Dadurch wird eine Austrocknung der Beeren erreicht, welche zu einer Erhöhung der Gesamtsäure, des Zuckergehalts und der phenolischen Verbindungen führt. Es ist bekannt, dass Wassermangel während der Reifung problematisch ist, um Weine mit höheren Rotundongehalt bzw. höherem Gehalt an phenolischen Verbindungen herzustellen. Es zeigte sich, dass PES einen begrenzten Einfluss auf Rotundon in Wein hatte. Da die PES-Technik zu einer Unterbrechung des Saftflusses führt, legen die Ergebnisse nahe, dass Rotundon in den Beeren synthetisiert und nicht verlagert wird. Ein Weinbausystem, das Bewässerung und dann PES kombinierte, führte – so Geffroy et al. (2016) – zu signifikanten Zuwächsen bei Rotundon, Zuckerkonzentration, Anthocyanen und Gesamtphenolindex in Wein sowie beim Verhältnis von Schale zu Saft. Messungen der Oberflächentemperatur der Trauben zeigen, dass die durch Bewässerung induzierte Steigerung der Rotundonproduktion wahrscheinlich eher auf einen direkten als auf einen indirekten Effekt durch eine Zunahme der Blattfläche zurückzuführen ist, die zu einem kühleren Mikroklima der Trauben führt.

Geffroy et al. (2019) untersuchten die Verwendung von drei gängigen Weinbaupraktiken (Blattentfernung zehn Tage nach Beerenansatz, Entfernung der Seitentriebe und verzögerte Ernte sieben Tage nach der Kontrolle) zur Modulation der Rotundon- und 3-Iso-Butyl-2-Methoxypyrazin-Zusammensetzung von Rotweinen der französischen Rebsorte Fer aus einer klimatisch gemäßigten Weinregion mit sehr kühlen Nächten. Die Erkenntnis von Geffroys et al. (2019) Untersuchung einer verzögerten Ernte beobachtete einen Anstieg der Rotundonkonzentration, während das Entfernen von Blättern und das Entfernen von Seitentrieben keinen

signifikanten Einfluss auf die Rotundonenkonzentration hatten. Eine verzögerte Ernte und das Entfernen von Seitentrieben waren die effizientesten Methoden, um die IBMP-Konzentration in Weinen zu senken. Die drei Techniken ermöglichten es, das Verhältnis der Geruchsaktivitätswerte (OAV) Rotundon zu IBMP zu erhöhen, wobei die größte Auswirkung bei einer verzögerten Ernte beobachtet wurde. Nach Ergebnissen von Geffroy et al. (2019) scheint eine verzögerte Ernte die beste Methode zu sein, um die flüchtige Zusammensetzung von Fer-Weinen in Richtung einer Erhöhung des OAV Rotundone zu OAV IBMP-Verhältnisses zu modulieren.

#### *1.1.3.3 Technologie bedingte Effekte auf den Rotundongehalt*

Die nun nachfolgend präsentierten Ergebnisse aus önologisch relevanten Arbeiten (Caputi et al., 2011; Zhang et al., 2017; Geffroy et al., 2017; Petrozziello et al., 2021) liefern wichtige Erkenntnisse hinsichtlich Maßnahmen zur Manipulation des pfeffrigen Charakters. Die erwähnten technologischen Arbeiten zu Modellierung dieses charakteristischen pfeffrigen Weinaromas beschäftigten sich ausschließlich mit Rotweinen (z. B. Shiraz, Duras).

So ist laut Caputi et al. (2011) aus technologischer Sichtweise von entscheidender Bedeutung zu wissen, dass sich das Rotundon fast ausschließlich in Beerenexokarp anreichert, was darauf hindeutet, dass der Schalenkontakt während der Weinbereitung verwendet werden könnte bzw. sollte, um den pfeffrigen Charakter von Wein zu modulieren. Doch in diesem Zusammenhang machten Caputi et al. (2011) eine technologisch relevante Beobachtung hinsichtlich Rotundonausbeute, und zwar, dass diese nach dem Weinzubereitungsprozess geringer ausfiel. Tatsächlich wurden – wie Caputi et al. (2011) belegten – nur 10 % des in den Trauben enthaltenen Rotundons während der Gärung extrahiert und nur 6 % in Flaschenweinen wiedergewonnen. Dies ist anhand mehrerer Punkte erklärbar, weil es sich bei Rotundon um eine hydrodophobe Verbindung handelt, wie dessen Octanol-Koeffizient belegt. Aufgrund der somit starken Affinität zur Bindung an Partikel während der Traubenverarbeitung, speziell während der Gärung, wurden nur geringe Mengen (ca. 10 %) aus der Traube extrahiert, die sich im Wein wiederfinden. Caputi et al. (2011) sind der Meinung, dass durch Filtrationsmaßnahmen dieser Wert zusätzlich reduziert werden könnte.

Diese geringe Extraktion bzw. Abnahme nach dem Füllen des Rotundon lässt sich dadurch erklären, dass Rotundon eine sehr hydrophobe Verbindung ist, die schlecht löslich ist, wie die

meisten (viele) Sesquiterpene, und dass diese dazu neigt, sich an Partikel zu binden. Forscher und Forscherinnen verweisen darauf, dass die meisten in Trauben häufig vorkommenden Sesquiterpenkohlenwasserstoffe im Wein fehlen. Es wurde gezeigt, dass dies darauf zurückzuführen ist, dass diese Verbindungen nicht in weinähnliche hydroalkoholische Lösungen extrahiert werden und stattdessen aus dem Saft entfernt werden, wenn sie sich an Feststoffe aus Trauben binden. Dies bedeutet, dass Sesquiterpenkohlenwasserstoffe in Trauben als Geschmacksvorläufer wirken können, nicht jedoch im fertigen Wein.

Eine andere durchgeführte Technologiestudie von Zhang et al. (2017) fokussierte sich ausschließlich auf die zuvor erwähnte Extraktionsproblematik dieser Verbindung aus den Schalen von Weinbeeren während der Gärung in Wein. Dafür wurde, so Zhang et al. (2017), der Most am ersten und fünften Tag der Gärung mit Ethanol und Saccharose angereichert und der resultierende Wein hinsichtlich Rotundon, flüchtigen Aromastoffen und Farbe bewertet. Zhang et al. (2017) konnten damit ebenfalls den Zusammenhang zwischen der Konzentration von Rotundon und dem Alkoholgehalt während des Fermentationsprozesses beweisen. Der Alkoholgehalt von Wein und die Schale-Wein-Kontaktzeit waren laut Zhang et al. (2017) zwei Faktoren, die die Rotundonextraktionsrate aus Trauben in Wein beeinflussten. Die Anreicherung erhöhte die Rotundonextraktionsrate erheblich und verbesserte nebenbei die Weinfarbe und Phenolkonzentration, sowie beeinflusste durch die Alkoholzugabe bzw. starke Alkoholbildung die Konzentration an Esterverbindungen wie Ethylacetat, 3-Methylbutylacetat, Ethylbutanoat, Ethylhexanoat, Ethyloctanoat, Methylnonanoat, Isopentanol und Phenylethylalkohol im resultierenden Wein. Dieses Ergebnis von Zhang et al. (2017) ist sehr kritisch zu betrachten, weil eine Zugabe von technischen Alkoholen in dieser Konzentration sowie Saccharose vor Beginn der Gärung in unseren Breiten nicht erlaubt ist.

Während Zhang et al. (2017) Varianten der Ethanolanreicherung zur Extraktionsverbesserung testen, untersuchten Geffroy et al. (2017) mit der Rebsorte Duras (Rotwein) im Labormaßstab von nur zwei Litern (!!!) den Einfluss von klassischen önologischen Fermentationsvariablen (wie Dauer und Temperatur der Mazeration, die Hefespezies, die Zugabe von pektolytischen Enzymen) und speziellen Weinzubereitungstechniken (z. B. Cold Soak, Thermovinifizierung, Kohlensäuremazeration und Roséweinbereitung) auf Rotundon. Auch Geffroy et al. (2017) – wie bereits sechs Jahre davor Caputi et al. (2011) – machten die Feststellung, dass Rotundon

schlecht extrahierbar war. Geffroy et al. (2017) nutzten einen Korrelationsvergleich mit Anthocyanen und dem Gesamtphenolindex. Dies sind Variablen, welche die Extraktion von Schalenverbindungen widerspiegeln. Außerdem schlossen Geffroy et al. (2017) daraus, dass sich die Löslichkeit von Rotundon, von Anthocyanen und den meisten Trauben-Proanthocyanidinen deshalb unterschied, weil Rotundon sich an andere Feststoffe bindet.

Aus der Arbeit von Geffroy et al. (2017) konnte weiters noch festgestellt werden, dass Weine, die im Herstellungsprozess eine bevorzugte Entfernung der Schalen beinhalteten (z. B. Roséweine), niedrige Rotundonkonzentrationen von ca. 20 % bzw. 13 % aufwiesen. Hingegen bei Erhöhung der Temperatur oder der Mazerationszeit führte dies zu erhöhten Rotundonkonzentrationen. Längerer Schalenkontakt während der Mazeration nach der Fermentation führte zu einer signifikanten Abnahme der Rotundonkonzentration um ca. 20 % im Wein, was auf praktische Möglichkeiten zur Reduzierung des Pfefferaromas im Wein hindeutet (Geffroy et al., 2017).

Petrozziello et al. (2021) untersuchte den Einfluss bestimmter önologischer Faktoren wie $SO_2$-Dosierungen, Lagerungstemperatur und Sauerstoffmenge auf die Rotundonkonzentration in Pelaverga-Weinen, einen Rotwein namens Pelaverga piccolo (eine autochthone Rebsorte, die im Piemont angebaut wird). Es wurde gezeigt, dass mäßige Sauerstoffmengen zu einem signifikanten Anstieg der Rotundonkonzentration in fertigen Weinen führen kann. Umgekehrt hatten offenbar unterschiedliche Dosierungen von Schwefeldioxid oder Lagertemperatur der Weine keinen Einfluss auf diese Verbindung. Dass es durch mäßige Sauerstoffgaben zu einem Anstieg kommt, könnte wie schon erwähnt daran liegen, dass Rotundon durch die Oxidation von α-Guaien gebildet wird Huang et al. (2014).

### *1.1.3.4 Fazit der Effekte und Einflüsse auf den Rotundongehalt*

Anhand der folgenden *Abbildung 7* werden die zuvor beschriebenen Effekte und Einflüsse, wie Umweltfaktoren, Weinbau, Klima und Technologie auf den Rotundongehalt von Trauben und Wein hinsichtlich dessen positiver oder negativer Auswirkungen überblicksartig zusammengefasst.

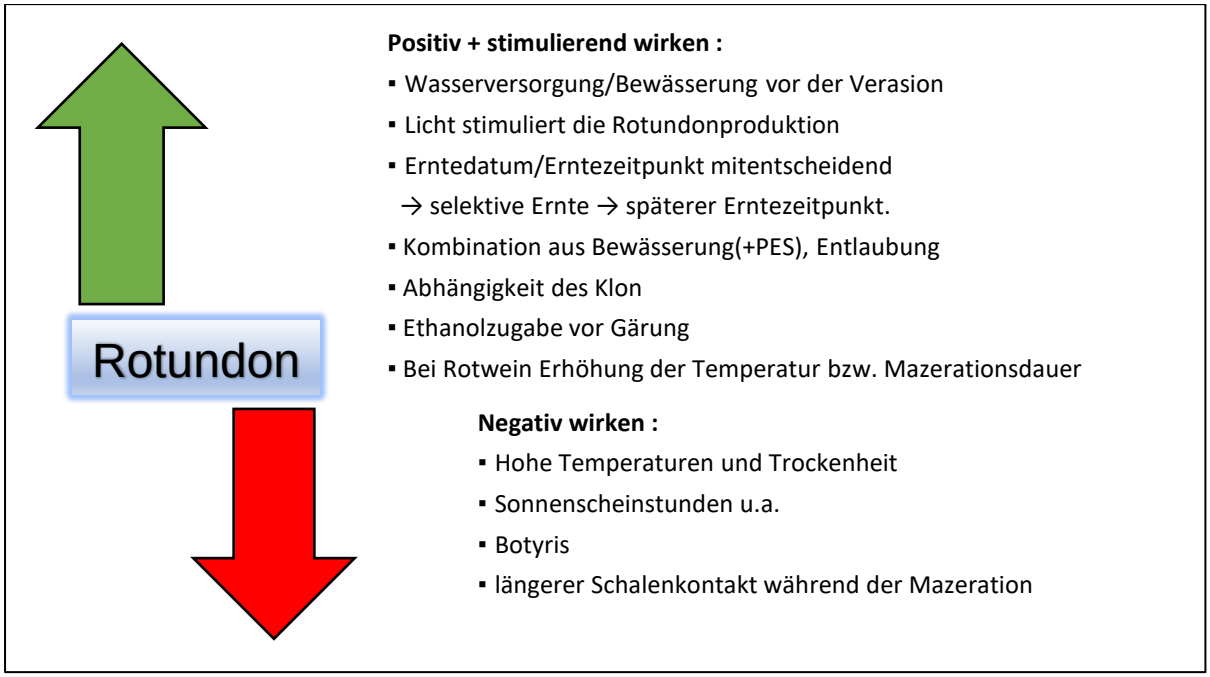



*Abbildung 7*: Zusammenfassender Überblick – Positive und negative Einflüsse auf den Rotundongehalt von Trauben und Wein.

## 1.2 Problem- und Aufgabenstellung bzw. Zielsetzung und zentrale Forschungsfragen

Im Folgenden wird ein Überblick über die Ziele und Herausforderungen der vorliegenden Arbeit beschrieben:

- Das Vorkommen der derzeit bekannten Leitsubstanz für die pfeffrige Note, das Rotundon, im Grünen Veltliner nach Resultaten von Mattivi et al. (2011) zu bestätigen sowie eine durchschnittliche Gehaltsverteilung in einer repräsentativen Zahl an österreichischen Handelsproben (> 100) erschienener Jahrgänge innerhalb von Österreich zu erheben. Dazu soll und wurde eine entsprechende analytische Methode an der HBLA Klosterneuburg entwickelt.

  Neben dem reinen Nachweis dieser Verbindung wurde eine Quantifizierungsgrenze bis zum Schwellenwert im unteren ng/l Bereich angestrebt.

  Die SPE-SPME-GC-MS-Methode wurde nach der damaligen (2010 bis 2016) vorhandenen instrumentellen Ausstattung konzipiert und musste aufgrund dessen, ausgehend von der in der Literatur genutzten Methodenbandbreite angepasst bzw. modifiziert werden. Die genutzten Analysenmethoden für Rotundon basieren auf SPE-GC-MS (Cullere et al., 2016), SPE-SPME-GC-MS (Siebert et al., 2008; Mattivi et al., 2011; Geffroy et al. ,2014;) oder SBSE-GC-MS (Takase et al., 2015) und verwenden überwiegend stabile Isotopenverdünnungsanalyse (SIDA) also einen deuterierten Rotundonstandard.

  Vielen staatlichen oder privaten Weinlaboren stehen vorrangig nur GC-MS-Systeme zur Verfügung. In den seltenen Fällen verfügen diese über teure GC-MS/MS-Systeme. Die genutzte GC-MS an der HBLA Klosterneuburg verfügt über einen Autosampler, mit dem eine Mikrofestphasenextraktion (SPME) durchgeführt werden kann.

  Zusätzlich war zu Beginn der Methodenentwicklungsarbeiten 2011/2012 ein Rotundonstandard kommerziell nicht verfügbar. Es musste also auch noch ein geeignetes und erfahrenes Syntheselabor gefunden werden, das in der Lage war, diese Verbindung in entsprechender Reinheit und Qualität zu synthetisieren. Die im Rahmen der Arbeit genutzte GC-MS-Methode orientierte sich im Wesentlichen an der von Siebert et al. (2008) entwickelten Analysenmethode für Rotundon. Der leicht nachvollziehbare Hauptgrund war, dass dessen genutzte instrumentelle Ausstattung für die Quantifizierung ähnlich wie jene

an der HBLA Klosterneuburg war. Der gravierendste Unterschied war, dass die Forschungsgruppe des AWRI Australian Wine Research Institute rund um Siebert aufgrund deren einmaliger Kooperation mit dem weltweit zweitgrößten Aromahersteller Symrise sowohl über einen Rotundonstandard als auch über einen deuterierten Standard verfügten.

- Neben dem ersten Schwerpunkt, mittels hauseigener entwickelter Labormethoden das Vorkommen und die Verteilung des Rotundons im Grünen Veltliner zu bestimmen, war der zweite Schwerpunkt, aus technologischer und Winzersicht, Erkenntnisse zu generieren sowie den Einfluss von kellertechnischen Maßnahmen auf den Rotundongehalt in Weinen der Sorte Grüner Veltliner zu untersuchen und zu bewerten. Um die Auswirkungen von klassischen genutzten Maßnahmen in Weinbaubetrieben wie Gärtemperatur, Standzeit, Maischeschwefelung, Jungweinschwefelung, Mostklärung und Hefenährsalzzugabe festzustellen, werden statistische Versuchspläne genutzt, um diese Effekte auf den Rotundongehalt zu bewerten. Dieser Technologieversuch wird als Versuchsplan konzipiert und in zwei aufeinander folgenden Erntejahren (2011, 2012) durchgeführt, um somit eine entsprechende Aussagekraft der Ergebnisse für die Praxis zu generieren.
- Um neben diesen beiden Aufgabenschwerpunkten das Vorkommen und die Verteilung des Rotundons im österreichischen Grünen Veltliner abzubilden und önolgische Effekte zu ermitteln, die sich als förderlich bzw. abträglich für den Rotundongehalt auswirken, wurden auch einige Projektpartner sowie betreute Schülerdiplomarbeiten mit Rotundonanalysendaten zu technologischen bzw. weinbaulichen Versuchen versorgt.

## 1.3 Methoden

### 1.3.1 Überblick genutzer Methoden bzw. Vorgangsweise in den Publikationen

Die nachfolgende *Abbildung 8* liefert eine stark vereinfachte Übersicht über die in den beiden Publikation I und II konkret durchgeführten Analysen.

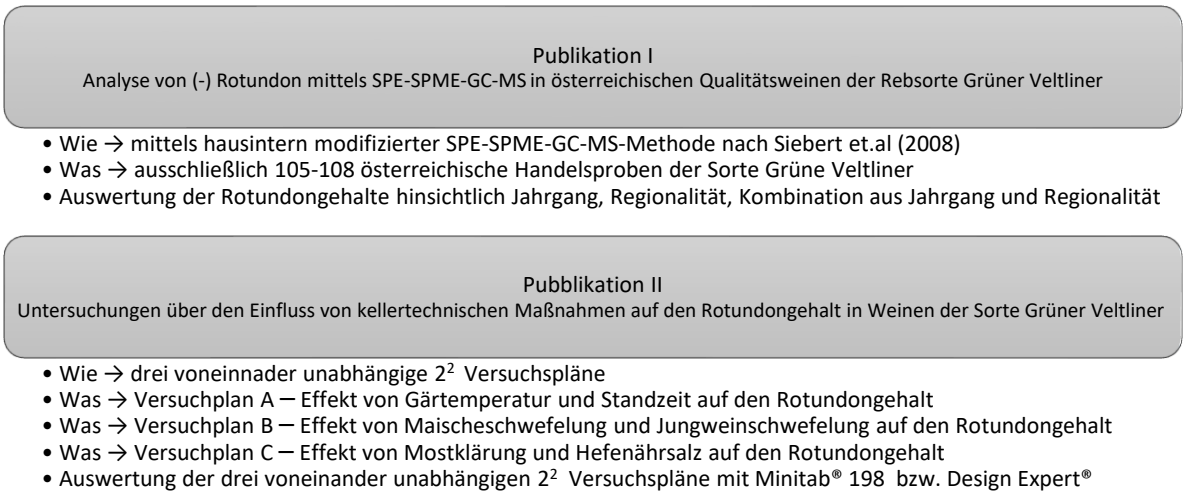



*Abbildung 8*: Allgemeine Übersicht genutzter Methoden und Vorgangsweise in den Publikationen.

### 1.3.2 Ausgangslage Quantifizierungsmethoden für das Sequiterpen Rotundon

*Tabelle 4* zeigt eine Übersicht der derzeit genutzten Methoden zur Quantifizierung des Sequiterpenketons Rotundon. Aus dieser wird die Bandbreite der Strategien zur Probenanreicherung, Probenaufgabe ersichtlich; diese erstrecken sich von Festphasenextraktion (SPE) über Immersion-Microfestphasenextraktion (SPME) und Twister (SBSE), wobei festzuhalten ist, dass die Festphasenextraktion (SPE) überwiegend zur Aufkonzentrierung der Zielanalyten eingesetzt wird. Die Art der Probenaufgabe reicht von Mikrofestphasenextraktion (SPME), über Large Volume bis hin zu einem speziellen thermalen Aufgabesystem für die Twister-Desorption. Als genutzte Analyseninstrumente werden drei Systeme verwendet: GC-MS, GC-MS-MS, MDGC-MS. Ein Vergleich der Analysenkenndaten (z. B. LOQ) zwischen der ersten publizierten Methode von Siebert et al. (2008), die eine SPE-SPME-GC-MS verwendet, mit jener von Mattivi et al. (2010), der eine SPE-SPME-GC-MS-MS nutzte, zeigt, dass eine GC-MS/MS-Methode höhere LOQs liefert als ein GC-MS. Es scheint, als würde für die Quantifizierung eines Spurenanalyts wie Rotundon in einer komplexen, herausfordernden Matrix wie Wein, bereits ein GC-MS-Instrument ausreichend sein.

*Tabelle 4*: Übersicht Methoden zur Quantifizierung des Sequiterpenketons Rotundon.

| AUTOR*IN | Siebert et al. (2008) | Mattivi et al. (2011) | Siebert & Barter (2013) Gerstel | Takase et al. (2015) | Culleré et al. (2016) |
|---|---|---|---|---|---|
| LAND | Australien | Italien | Australien | Japan | Spanien |
| Probenmenge | 100ml | 100ml | 15ml | 5ml | 50ml |
| Probenanrei-cherung | SPE-SPME | SPE-SPME | MASE/LVI | SBSE Twister | SPE/LVI |
| Proben-aufgabe | SPME | SPME | LVI | Twister | LVI |
| Analyseinstru-ment | GC-MS | GC-MS/MS | MDGC-MS | Heart-Cutting Two-Di-mensional GC-MS | GC-MS |
| Standard Deuteriert J/N | Ja $d_5$-Rotun-don | Ja $d_5$-Rotundon | Ja $d_5$-Rotundon | Ja $d_5$-Rotundon | Nein ß-Damascone |
| Matrix | Wein, Most | Wein | Wein, Most | Wein, Trauben | Wein |
| LOQ | 0,5 ng/l | 5,0 0 ng/lOQ Weißwein 6,70 ng/LOQ Rotwein | 5,0 ng/l | 6,5 ng/l (Trauben), 7,2 ng/l (Wein) | 2,0 ng/l Rotwein |

Petronilho et al. (2014) weisen bzgl. der Sequiterpeneanalyse darauf hin, dass die meisten dieser Verbindungen in sehr geringen Konzentrationen (µg/l, ng/l) in Trauben und Weinen vorkommen. Ihre Quantifizierung ist somit recht schwierig und herausfordernd.

### 1.3.3 Herausforderungen der Weinaromaanalyse an die Probenvorbereitung

Sowohl Ortega-Heras et al. (2002) als auch Castro et al. (2008) verdeutlichen, warum gerade die Analyse von Aromaverbindungen in der Matrix Wein – und anderen önologischen Produkten – eine solche Herausforderung darstellen. Beide Autoren wie auch Rebiere et al. (2010) erklären, dass die große Komplexität dieser Matrix einerseits aufgrund der Vielzahl an identifizierbaren Verbindungen in der flüchtigen Weinfraktion (ca. 800 bis 1000 Aromakomponenten) und andererseits, dass diese mehrere hundert Verbindungen auch noch in unterschiedlicher Konzentrationsvariabilität zwischen $10^{-4}$ bis $10^{-11}$ g/l vorkommen können. Diese flüchtigen Komponenten weisen eine unterschiedlichste chemische Natur auf, weil diese sehr heterogene Gruppen wie Alkohole, Aldehyde, Ketone, Ester etc. umfassen. Gerade aufgrund dieser chemischen Vielfalt verfügen diese Verbindungen über unterschiedlichste Polaritäten, unterschiedlichste Löslichkeiten und unterschiedlichste Flüchtigkeit und pH-Bedingungen (Camara et al., 2006). Außerdem sollte ein Aromaanalytiker bei önologischen Produkten die geringe chemische Stabilität der Verbindungen (aromatische Komponenten) berücksichtigen, weil diese sehr leicht oxidiert werden (Ortega-Heras et al., 2002; Castro et al., 2008). Castro et al. (2008) verweist auf die begrenzte Spezifikation der Nachweissysteme. Ortega-Heras et

al. (2002) merken an, dass gerade entscheidende flüchtiger Bestandteile von Wein, sogenante Schlüsselaromastoffe, nur in sehr geringer Konzentration gefunden werden können. Die Analyse solcher aromarelevanten Substanzen muss im Bereich der sensorischen Wahrnehmungsschwelle liegen. Castro et al. (2008) unterstreicht die Notwendigkeit der Probenvorbereitung, insbesondere wenn Zielanalyten von Interesse in niedrigen Konzentrationen vorliegen. Auch Ortega-Heras et al. (2002) sind der Ansicht, dass diese Proben hoch konzentriert sein müssen, damit die Analyten genau quantifiziert werden können

#### *1.3.3.1 Vergleich der Probenvorbereitung SPE, SPME, SBSE, MASE*

Eines der Hauptprobleme, mit denen Forscher und Forscherinnen bei der Untersuchung der für das Weinaroma verantwortlichen Verbindungen konfrontiert sind, besteht in der Wahl eines geeigneten Extraktionsverfahrens zur qualitativen und quantitativen Darstellung des ursprünglichen Weinaromas (Blanch et al., 1991; Etievant et al., 1996). Dies bedeutet es sollte ein Extrakt erhalten werden, welches alle ursprünglich im Wein enthaltenen flüchtigen Verbindungen enthält, ohne dass Umbauprodukte enstehen oder die Analyten abgebaut werden. Gerade aufgrund der großen chemischen Vielfalt und Konzentrationbandbreite (mg/l, µg/l, ng/l) der Weinaromenverbindungen wurden im Laufe der Zeit unterschiedliche Methoden entwickelt, um dieses Ziel zu erreichen. Doch alle diese Isolierungs- und Konzentrationsmethodetechniken wie Festphasenmikroextraktion SPE, Festphasenmikroextraktion, SPME, Sorptive Rührstabextraktion engl. StirBarSorptive Extraktion weisen jeweils Vor- und Nachteile auf. Die nachfolgende *Tabelle 5* liefert für jede dieser Probenvorbereitungsanreichungstechniken zur Isolierung und Anreicherung von flüchtigen Bestandteilen von Weinaromen eine kurze Beschreibung (Prinzip, Ablauf, Ausstattung). Es wird neben den Vor- und Nachteilen der Probenvorbereitungstechniken auch auf die Eigung bzw. Tauglichkeit hinsichtlich der Analyse des Zielanalyten Rotundon eingegangen.

*Tabelle 5*: Übersicht und Beschreibung derzeit genutzter Probenvorbereitungsmethoden für den Spuren-Analyt Rotundon.

**Probenvorbereitung ist mitentscheidend, da damit eine Rotundonquantifizierung im Wahrnehmungsschwellenwert von 8-16ng/l erzielt werden sollte.**

| ***Proben-vorbe-reitunsgs-methode*** | ***Festphasenextraktion engl. Solid Phase Extraction = SPE*** | ***Festphasenmikroextraktion Eng.l Solid Phase Micro Extraction = SPME*** | ***Sorptive Rührstabextraktion engl. Stirbar Sorptive Extraction = SBSE*** | ***Membranassozierte Lösungsmittelextraktion Engl. Membran Associated Solvent Extraction = MASE*** |
|---|---|---|---|---|
| **Prinzip und Ablauf** | Selektive Analyt-Rückhaltung in einem Adsorbensmaterial (stationäre Phase) und anschließende Elution mit einem Lösungsmittel, welches eine größere Affinität zum Analyt aufweist als zum Adsorbens (Frago-Ramos, 2016; Serrano de la Hoz, 2014).<br>Der SPE-Ablauf umfasst vier Schritte: Konditionierung, Adsorption, Waschen, Elution. | Exposition immobilisierter stationärer Phase (= dünne Fused-Silica-Faser, die mit dünnem Polymerfilm beschichtet ist), durch das Eintauchen in die flüssige Probe (Immersions-SPME) oder durch Faserexposition im Dampfraum über einer flüssigen Probe (HS-SPME). Frago-Ramos, 2016; SPME-Ablauf kombiniert so Whiton und Zoecklein (2000) Extraktion, Konzentration und chromatografische Injektion in einem Schritt. | Flüchtige und schwerflüchtige Verbindungen werden in PDMS-Schicht auf einen Magnetrührstab sorbiert, Baltussen et al. (1999).<br>Die SBSE ist der SPME sehr ähnlich. | Es handelt sich um verkleinerte und automatisierte Art der Flüssig-Flüssig-Extraktion, die auf Verwendung einer semipermeablen Membran als Phasengrenze basiert, die Partikel und andere Matrixkomponenten vom Extraktionslösungsmittel fernhält. |
| **Erforderliche Ausstattung** | ▪ SPE-Manifold<br>▪ Vakuumpumpe<br>▪ Lösungsmittel (z. B. MeOH, Pentan etc.)<br>▪ SPE Kartuschen | ▪ SPME-Fasern<br>▪ SPME-Halter<br>▪ SPME-tauglicher Autosampler | ▪ „Twister“ SBSE-Rührstäbchen<br>▪ spezielles Desorptionssystem für die „Twister“ SBSE-Rührstäbchen | ▪ Polyethylenmembran niedriger Dichte (LDPE)<br>▪ GC-System, Autosampler<br>▪ Kaltaufgabesystem für LargeVolume (LVI) |
| **Vorteile** | Die Technik ist ideal für gezielte Isolierung bzw. hohe Anreicherung von Spurenanalyten aus einer komplexen wässrigen Matrix.<br><br>Wahl des Sorbens bzw. der Sorbensmenge und des Elutionsmittels beeinflusst gezielt, welche Fraktion (polare, unpolare) gewonnen werden möchte. | Schnelle lösungsmittelfreie Probenvorbereitung, Arthur und Pawliszyn (1990); Pawliszyn (2012). geringes Probenvolumen,<br>Bandbreite an erhältlichen SPME-Fasern (polar, unpolar) ermöglicht breite Erfassung einer Variation der Matrixzusammensetzung, z. B: Weimatrix Vielzahl und chemische Vielfalt von Verbindungen 800-1000 VB | Die Vergrößerung verfügbarer Sorbtionsfläche an PDMS in SBSE im Vergleich zu SPME bietet so höhere Probenanreichungskapazität (50- bis 250-mal höher), Baltussen et al. (1999). Gerstel spricht sogar von 1000-facher Empfindlichkeit gegenüber SPME. | Ein Vorteil ist, dass weitere Schritte zur Probenreinigung wie Filtration und Zentrifugation nicht mehr erforderlich sind. MASE-Extrakte – selbst stark matrixbeladene Proben sind sauber und können zur Analyse direkt in die GC/MS- injiziert werden. |
| **Nachteile** | Hoher Lösungsmittelverbrauch.<br>Lange Analysendauer h. | Viele Einflussfaktoren zu berücksichtigen:<br>SPME-Faserwahl, SPME-Probenahmezeit (Faser-Expositionsdauer), SPME-Extraktionstemperatur, NaCl/Salzugabe, Ethanolkonzentration, Probenvolumen, pH-Wert. | Speziell abgestimmte thermische Aufgabesystemen für die SBSE-Rührstäbchen notwendig. | Einflussfaktoren wie bei SPME sind zu berücksichtigen: Mischgeschwindigkeit, Extraktionszeit, Extraktionstemperatur, Salzkonzentration, Methanolzugabe, Lösungsmittel und pH-Einfluss. |
| **Anmerkungen bzgl. der Tauglichkeit Zielanalyt Rotundon anzureichern und zu** | Siebert et al. (2008); Mattivi et al. (2011); Culleré et al. (2016) setzten bei der Rotundon-Analyse auf SPE als Probenanreicherungstechnik aufgrund gezielter Kombination aus Isolierung und Anreicherung aus einer wässrigen Matrix. Siebert et al. (2008) nutzten als Sorbens eine SDB-Phase, welche laut Piñeiro und Barroso (2004) geeignet für die Analyse von Terpenoidverbindungen in Wein geeignet ist. Die anderen Sorbens waren laut Siebert et al. 2008 mit Rotundon-Verlust (bis zu 50 %) im Probenladeschritt verbunden. Ursache ist wahrscheinlich eine zu frühe Sättigung der SPE-Säule. | Alleiniger HS-SPME-Einsatz ist laut Siebert et al. (2008) aufgrund geringer Analytkonzentration des Rotundon im Wein nicht möglich. Laut Siebert et al. (2008) ist damit nur eine 100-200 ng/l LOQ !! erreichbar. Der Extraktions- bzw. Anreichungseffekt wäre zu gering. Verdrängungseffekte mit anderen Analyten würden stattfinden. Die Immersion-SPME ist daher vorzuziehen. Rotundon-Wiederfindung bei Immersions-SPME im Allgemeinen um ein Vielfaches höher als bei Headspace-SPME (Siebert). Dies steht im Einklang mit einer erwarteten relativ geringen Flüchtigkeit von Rotundon, wie aus seiner langen GC-Retentionszeit ersichtlich (Wood et. al, 2008). Im Fall des Spurenanalyts Rotundon (ng/l) ist sogar eine Kopplung von SPE- | Manche Schlüsselaromastoffe wie Trichloranisol (Korkton), Pestizide etc. kommen im Spurenbereich vor. Gerade die SBSE kann für die Spuren- und Ultraspurenanalyse sehr nützlich sein. Für einen Spurenanalyten wie Rotundon ist diese Art der Anreichung gegenüber der SPME klar von Vorteil. Denn die Extraktionseffizienz ist proportional zur Schichtdicke, was zu niedrigeren Nachweisgrenzen führt. Nachteil ist, dass ein Analyseinstrument erforderlich ist, welches mit einem thermischen Aufgabesystemen für die Twister-Desorption ausgestattet ist. Takase et al. (2015) | Für eine automatische sowie effizientere Bestimmung von Rotundon in Wein und Trauben setzten die Forscher Siebert und Barter (2013) membrangestützten Lösungsmittelextraktion (MASE) in Kombination mit Heart-Cut-GC/MS ein. Denn bei den Ursprungsmethoden von Siebert et al. (2008) oder Mattivi et. al. (2011) mussten für Rotundon große Probenvolumina (100 ml) gehandhabt werden, und eine umfangreiche Probenvorbereitung (SPE-SPME) Dies war für die Matrixelimination und Analytkonzentration erforderlich, da Rotundon nur in |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **isolieren** | Bei Wahl der Sorbensmenge, Resovoirvolumen der SPE-Säulchen und der Lösung/Elutionsmittel gab es Unterschiede zwischen Siebert et al. (2008), Mattivi et al. (2011) und Culleré et al. (2016). Die Probenmenge betrug bei Siebert et al. 2008, Mattivi et al. (2011) 100 ml bzw. 50 ml bei Culleré et al. (2016). Die Sorbensmenge bei Culleré (2016) 200 mg, bei Siebert et al. 500 mg, Mattivi et al. (2011) 1000 mg. Unterschiede auch beim SPE-Ablauf. | SPME, Siebert el. al. (2008), erforderlich. Hinsichtlich Wahl der Beschichtung der genutzten Faser und Typ der SPME (Immersion oder Headspace) gab es für den Analyt Rotundon bereits Literaturerkenntnisse von (Siebert et al. (2008) und Mattivi et al. (2011), auf die aufgebaut werden konnte. Dank der Immersion-SPME konnte somit eine gezielte selektive Sorptive Anreicherung des Rotundon erzielt werden. Dies bedeutet aber auch eine Einschränkung (Reduzierung) der Nutzungsdauer der Faser. Der Zustand (Qualität) der Faser ist zu überwachen. | verwenden die SBSE für die Rotundonanalyse, außerdem wird eine Heart-Cutting Two-Dimensional GC-MS benützt. Beide Systeme erfordern eine speziellen Ausstattung und die entsprechende Erfahrung auf dem Gebiet der Heart-Cutting Two-Dimensional GC-MS. | sehr geringen Konzentrationen vorhanden ist. Der kritische Faktor, der den analytischen Erfolg oder Misserfolg sicherstellt, ist die Qualität des Extraktionsschrittes. Die Kombination aus MASE und LVI ist eine Alternative, wenn auch aus instrumenteller Sicht sehr kostspielig sowie anwenderabhängig (Quelle: https://www.gerstel.com/en/GSW14_Rotundone.html). |

### 1.3.4 Weinaromaanalyse – allgemeiner Vergleich Analysenmethodik GC-MS, GC-MS-MS, MDGC-MS,

Die Weinaromaforschung ist aus der Sichtweise der Analysemethodik ein anspruchsvoller Bereich, gerade in Bezug auf Schlüsselgeruchsstoffe, die normalerweise nur in Spuren, Mikrogramm (µg) bis Nanogramm (ng) vorkommen, oft eingebettet in komplexe Matrix wie Wein, der Hunderte flüchtige Verbindungen in viel höheren Konzentrationen enthält (Fay et al., 2001). 1955 realisierten Gohlke und McLafferty (1993) die erste Kopplung zwischen einem Gaschromatografen und einem Massenspektrometer, die dem/der Chemiker*in eine leistungsstarke Analysetechnik bietet. Die Gaschromatografie/Massenspektrometrie (GC-MS) war bzw. ist bis heute die Methode der Wahl zur Analyse flüchtiger Verbindungen in komplexen Gemischen, insbesondere zu Identifizierungszwecken wie dem Weinaroma. GC-MS ist seither ein wichtiges und unentbehrliches Aufklärungswerkzeug in Aromalabors, das die Charakterisierung der Tausenden flüchtigen Komponenten in Lebensmittelprodukten und Getränken wie dem Wein ermöglicht. Die Gaschromatografie GC-MS hat für das Weinaroma von Rebsorten die gleiche Relevanz wie die PCR in der Molekularbiologie; die GC-MS gilt noch immer als Goldstandard für die routinemäßige Analyse von flüchtigen Geschmacks- und Duftstoffen und wird trotz unzähliger, innovativer Weiterentwicklungen und Verbesserungen wie (GC-MS/MS, GC-TOFMS, GCxGC-MS, GCxGC-TOFMS) verwendet.

Die stetige wachsende Zahl an Analyten erfordert jedoch neue Techniken, die schnelle Messungen mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit ermöglichen. Aromastoffe gehören zu einer Vielzahl chemischer Klassen, von denen einige instabil sind. All dies stellt einen sehr hohen Anspruch an Analysetechniken. Für Aromachemiker und -chemikerinnen sind Genauigkeit, Selektivität, Empfindlichkeit, Schnelligkeit und Vielseitigkeit ihrer instrumentellen Techniken von größter Bedeutung. Da diese jedoch tiefer in das Verständnis der Aromaerzeugung und -abgabe eintauchen, besteht ein Bedarf an immer leistungsfähigeren Methoden, die an ihre spezifischen Bedürfnisse angepasst sind.

Diese Bedürfnisse erklären die rasante Entwicklung der MS in Aromalabors, da sie viele dieser Funktionen bietet. Die privilegierte Position der MS für die analytische Gemeinschaft ergibt sich hauptsächlich aus der Tatsache, dass sehr aufschlussreiche Informationen über die Masse

erhalten werden können, die direkt mit einer genau definierten Eigenschaft der Verbindung in Zusammenhang stehen, ohne Bezug auf spezifische Apparateparameter.

Heutzutage ist eine Reihe hochwertiger Instrumente im Handel erhältlich, von denen einige mit robuster Massenkalibrierung eine sehr hohe Auflösung erreichen können. Auch die Möglichkeit, MS mit verschiedenen chromatografischen Techniken zu kombinieren, ermöglicht die Analyse komplexer Mischungen, die in der Aromaforschung eher typisch sind. Zudem ermöglichen fortschrittliche MS-Techniken (z. B. hochauflösende MS oder Tandem-MS) eine erhebliche Reduzierung der Probenanreicherung und damit die Reduktion von Verlusten und Verzerrungen der Probenmatrix.

Im Folgenden werden vorrangig jene Techniken mit spezifischer Anwendung wie die der Aromaanalyse wie GC-MS/MS oder MDGC-MS im Vergleich zu klassischen GC-MS diskutiert, die eine Trennung und Charakterisierung sowie Quantifizierung von Aromastoffen ermöglichen.

Welke et al. (2021) betonen, dass bei der eindimensionalen Gaschromatografie (1DGC) auch bei langen GC-Läufen (zur Verbesserung der Trennleistung) viele koeluierende Verbindungen aufgrund der Weinkomplexität beobachtet werden. Dies ist besonders schwerwiegend, wenn Verbindungen Spuren von aromaaktiven Verbindungen verbergen. Zweidimensionale Systeme sind hier eindeutig im Vorteil. Ebeler (2015) darauf hin, dass gerade die Gaschromatografie kombiniert mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) signifikante Vorteile für die Spurenquantifizierung wichtiger aromaaktiver flüchtiger Stoffe und Geschmacksstoffe bietet. Beispielsweise haben verbesserte Trennungen mit GC x GC und gezielte Spurenanalyse mit Tandem-MS-Ansätzen zur Identifizierung neuer Verbindungen und zur Quantifizierung von Spurenverbindungen in Trauben und Weinen geführt.

Bei Autoren bzw. Autorinnen wie Ebeler (2012), Robinson et al. (2014) und Robinson et al. (2014) ist nachzulesen, dass Selected Ion Monitoring und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS oder MSn) zunehmend zur gezielten Analyse von Spurenanalyten, insbesondere solchen mit wichtigen sensorischen Eigenschaften, eingesetzt werden.
*Tabelle 6* fasst Besonderheiten beziehungsweise Vorzüge als auch Nachteile der Analysentechniken GC-MS, GC-MS/MS, MDGC-MS etc. zusammen:

*Tabelle 6*: Allgemeine Gegenüberstellung der Analysentechniken GC-MS, GC-MS/MS, MDGC-MS, GCxGC – Vorteile und Nachteile.

| Analy-sen-Technik | Merkmal, Eigenschaft | Vorteile | Nachteile |
|---|---|---|---|
| **GC-MS** | GC wird zur Analyse flüchtiger organischer Stoffe und im Allgemeinen zur Trennung nach Siedepunkten verwendet.<br>MS zeigt an, dass ein Massenspektrometer als Detektor für den GC verwendet wird. | Empfindlichkeit millimolar bis nanomolar<br>Hochauflösende Trennung<br>Große Sammlung an Elektronenstoßionisation (engl. electron impact, EI) EI-Spekten-MS-Bibliothek verfügbar | Der Hauptnachteil ist die Notwendigkeit einer beträchtlichen Probenverarbeitung vor der Analyse- Signifikante Probenvorbereitung mit chemischer Modifikation, langsame Analysezeit, harte Ionisierung und eine begrenzte Anzahl von Molekülen kann analysiert werden. |
| **GC-MS/MS** | Ein Tandem-Massenspektrometer, auch als MS/MS bezeichnet, ist eine zweistufige Technik, mit der eine Probe entweder mithilfe von zwei oder mehr miteinander verbundenen Massenspektrometern oder einem einzelnen Massenspektrometer durch mehrere hintereinander angeordnete Analysatoren analysiert wird. (MS/MS) enthält zwei oder drei Quadrupole oder einen TOF-Analysator (Broek et al., 2013).<br><br>MS/MS ist besonders nützlich für die Analyse komplexer Gemische und umfasst zwei MS-Stadien. In der ersten Stufe von MS/MS wird ein vorbestimmter Satz von m/z-Ionen von den restlichen Ionen, die von der Ionenquelle kommen, isoliert und durch eine chemische Reaktion fragmentiert. In der zweiten Stufe werden Massenspektren der Fragmente erstellt. | Optional besteht auch die Möglichkeit, die Gaschromatografie-Tandem-Massenspektrometrie (GC/MS-MS) einzusetzen, die die einzelnen Moleküle aufspaltet, um eine noch höhere Selektivität zu erreichen.<br>Dazu gehören die Analyse komplexer Gemische ohne chromatografische Trennung, die Erzeugung charakteristischer Fragmentionen aus Molekülionen und die Verbesserung der Selektivität quantitativer Messungen.<br>Die Fähigkeit von MS/MS, komplexe organische Moleküle zu fragmentieren und Fragmentionenmassen zu bestimmen, hilft nicht nur, molekulare Strukturen aufzudecken, sondern auch zwischen sehr ähnlichen organischen Molekülen zu unterscheiden und quantitative Analysen durchzuführen. | • Deutlich Weniger MS/MS-Bibliotheken im Vergleich zu EI-Sprektren -MS Bioblotheken verfügbar<br>• Teurer sowohl in Anschaffung und Wartung<br>• Anwender Schulung ist umfangreicher<br>• Das Tuning vom Massenspektrometer erfordert mehr Zeit und Know-how |
| **Multi dimensionale GC-MS** | ▪ Zielanalyse (Herzschnitt;heart-cut H/C).<br>▪ Zielpeaks/-regionen werden gemäß Retentionszeiten in 1D übertragen und in 2D analysiert, 2D-Säulen haben normalerweise ähnliche Abmessungen wie die 1D.<br>▪ Eine Kryofalle kann verwendet werden, um die übertragenen Analysepeaks/-regionen zu fokussieren. | ▪ Analysen oder Fraktionen durch Mehrfachinjektionen.<br>▪ Bietet eine erhöhte Auflösung auf der 2D-Säule und kann die Erkennungsspezifität und -empfindlichkeit verbessern.<br>▪ Die Stereoisomerenauflösung verwendet eine chirale 2D-Säule und verbessert die Auflösung bei störenden Peaks. | ▪ Erfordert eine kryogene Falle, um die $^{1}$D-Dispersion zu reduzieren.<br>▪ Erfordert ein Umschaltventil für die Online-H/C-Programmierung.<br>▪ Nicht dafür ausgelegt, die gesamte Stichprobe aufzulösen.<br>▪ Erfordert ein zusätzliches GC-Programm, um die 2D-Säule zu eluieren, es sei denn, der On-the-fly-Betrieb wird verwendet. |
| **GCxGC** | ▪ Nicht-Zielanalyse/Non-target analysis; angewandt auf alle Probenverbindungen.<br>▪ Modulator subsampelt Peaks als kleine Slices in 2D, wodurch ein 2D-Plot entsteht - 2D trennt idealerweise überlappte 1D-Peaks.<br>▪ 2D-Säule ist kürzer, um übertragene Verbindungen vor der nächsten Modulation zu trennen.<br>▪ Ermöglicht die Anreicherung/Konzentrierung/Fokusierung des Zielanalyten. | ▪ Volle 2D-Probenauflösung kann erreicht werden.<br>▪ Stereoisomerenauflösung verwendet eine ‘D-chirale Säule.<br>▪ Das erzeugte 2D-Bild bietet eine hervorragende Profilierung/Differenzierung von Proben.<br>▪ Kryogene Modulation führt zu einer Steigerung des Response. | ▪ Erfordert einen Modulator; manche können teuer werden.<br>▪ Der Methodenaufbau kann komplexer sein.<br>▪ Software und Interpretation können komplizierter sein.<br>▪ Personal braucht eine spezielle Ausbildung. |

### 1.3.5 Illustration der genutzen Materialien und umgesetzter Methoden

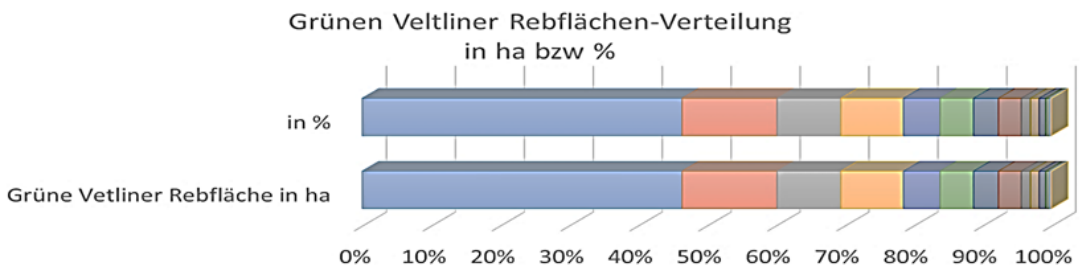
Im Folgenden werden neben den verwendten Handelsproben auch der Ablauf der Analyse sowie die drei durchgeführten faktoriellen Versuchspläne anschaulich illustriert und kurz erläutert.

Für die erste Publikation „Vorkommen von Rotundon in der österreichischen Rebsorte Grüner Veltliner“ wurden mehr als 100 österreichische Handelsproben (107 Handelsproben und Regelweine) für die SPE-SPME-GC-MS-Analyse herangezogen.

Die Herkunft der analysierten Proben verteilte sich, wie anhand der unten folgenden *Abbildung 10* ersichtlich wird, überwiegend auf das Bundesland Niederösterreich. Niederösterreich ist das unumstritte Kernland des Grünen Veltliners.

Ein detaillierter Blick auf die Rebsortenverteilung innerhalb von Österreich zeichnet folgendes Bild: Die Hauptanbaufläche des Grünen Veltliners ist das Bundesland Niederösterreich mit einem Schwerpunkt auf die Regionen Kamptal, Kremstal, Weinviertel, Wagram und Wachau (https://info.bmlrt.gv.at/themen/lebensmittel/trad-lebensmittel/getraenke/gruener_veltliner.html).

In Bezug auf die Rebsortenverteilung in den einzelnen Bundesländern liegt der Weißwein im Burgenland (1.258 ha), Niederösterreich (12.920 ha) und Wien (171 ha) mit dem Grünen Veltliner deutlich voran. Das Weinviertel ist das größte Anbaugebiet des Grünen Veltliners, die Rebsorte nimmt dort eine Fläche von rund 8.500 ha (Stand 2008) im Vergleich zu 6.671 ha (2015) ein. Auf die Gesamtfläche betrachtet finden sich 46 % des Grünen Veltliners im Weinviertel. Die folgende *Abbildung 9* veranschaulicht die Rebflächenverteilung bzw. den Anteil des Grünen Veltliners in den einzelnen Weinbaugebieten im Jahr 2015 im Detail.

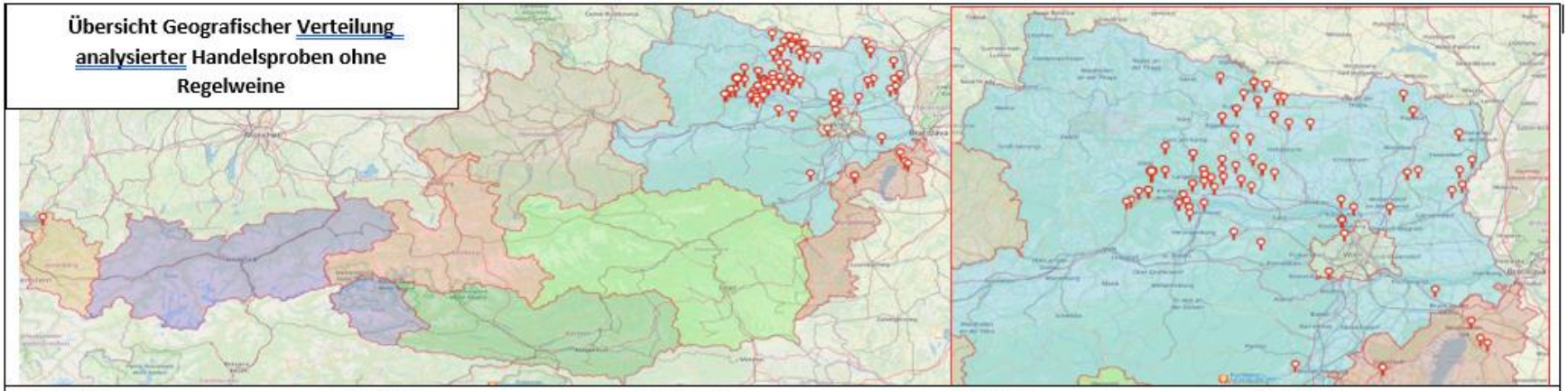



| | Grüne Vetliner Rebfläche in ha | in % |
|---|---|---|
| Weinviertel | 6671,68 | 46,42 |
| Kamptal | 1982,08 | 13,79 |
| Wagram | 1330,29 | 9,26 |
| Kremstal | 1302,98 | 9,07 |
| Wachau | 765,53 | 5,33 |
| Neusiedler See | 696,2 | 4,84 |
| Leithaberg | 519,77 | 3,62 |
| Traisental | 477,42 | 3,32 |
| Carnuntum | 192,5 | 1,34 |
| Thermenregion | 178,99 | 1,25 |
| Wien | 137,2 | 0,95 |
| Mittelburgenland | 86,27 | 0,60 |
| Eisenberg | 28,32 | 0,20 |
| Vulkanland Steiermark | 2,77 | 0,02 |
| Südsteiermark | 0,86 | 0,01 |
| Weststeiermark | 0 | 0,00 |

*Abbildung 9*: Grafische Darstellung Rebflächenverteilung – Grüner Veltliner bzgl. Weinbaugebiete; Quelle: Dokumentation Österreich Wein. Österreichische Weinmarketingserviceges.m.b.H. (ÖWM), Wien 2017, S. 14 ff. (oesterreichwein.at, Weingartengrunderhebung, 2015).

Einige Handelsproben stammten auch aus dem Burgenland (4) bzw. Bergland (Vorarlberg) (1).

*Tabelle 7* veranschaulicht neben der jahrgangsmäßigen Verteilung der untersuchten Proben auch das Klima (Temperatur in °C und Niederschlag in mm) in den analysierten Jahrgängen 2009 bis 2015, um eine Ausage treffen zu können, ob es sich um einen kühlen oder warmen Jahrgang handelt.




| Weinbaugebiet Kürzel | PLZ der Probe | Jahrgang | Weinbaugebiet Kürzel | PLZ der Probe | Jahrgang | Weinbaugebiet Kürzel | PLZ der Probe | Jahrgang | Weinbaugebiet Kürzel | PLZ der Probe | Jahr-gang | Weinbaugebiet Kürzel | PLZ der Probe | Jahrgang |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BLXX | 6900 | 2014 | WLWA | 3602 | 2010 | WLWG | 3484 | 2014 | WLWV | 2211 | 2013 | WLWV | 3721 | 2014 |
| WLKA | 3485 | 2014 | WLWA | 3621 | 2010 | WLWG | 3483 | 2014 | WLWV | 2222 | 2014 | WLWV | 2100 | 2015 |
| WLKA | 3562 | 2013 | WLWA | 3610 | 2009 | WLWG | 3701 | 2014 | WLWV | 3730 | 2014 | WLWV | 3472 | 2009 |
| WLKA | 3562 | 2013 | WLCA | 2464 | 2010 | WLWG | 3701 | 2014 | WLWV | 3743 | 2013 | WLWV | 3743 | 2013 |
| WLKA | 3491 | 2010 | WLKT | 3494 | 2013 | WLWG | 3701 | 2014 | WLWV | 2042 | 2014 | WLWV | 3702 | 2014 |
| WLKA | 3492 | 2014 | WLKT | 3508 | 2014 | WLWG | 3483 | 2014 | WLWV | 2023 | 2010 | WLWV | 2170 | 2015 |
| WLKA | 3492 | 2013 | WLKT | 3494 | 2013 | WLWG | 3465 | 2014 | WLWV | 2181 | 2014 | WLWV | 3743 | 2015 |
| WLKA | 3492 | 2014 | WLKT | 3508 | 2009 | WLWG | 3484 | 2013 | WLWV | 2264 | 2013 | WLWV | 2102 | 2014 |
| WLKA | 3553 | 2010 | WLKT | 3508 | 2010 | WLWG | 3470 | 2013 | WLWV | 2084 | 2010 | WLWV | 2252 | 2009 |
| WLKA | 3562 | 2013 | WLKT | 3511 | 2009 | WLWG | 3701 | 2014 | WLWV | 2170 | 2014 | WLWV | 2053 | 2011 |
| WLKA | 3492 | 2009 | WLKT | 3508 | 2013 | WLWG | 3443 | 2014 | WLWV | 2054 | 2014 | WLWV | 2222 | 2009 |
| WLKA | 3491 | 2014 | WLKT | 3506 | 2013 | WLWG | 3481 | 2013 | WLWV | 2162 | 2014 | WLWV | 2053 | 2015 |
| WLKA | 3553 | 2009 | WLKT | 3541 | 2012 | WLWG | 3481 | 2013 | WLWV | 3472 | 2014 | WLWV | 3704 | 2013 |
| WLLB | 7041 | 2014 | WLKT | 3552 | 2012 | WLWG | 3701 | 2014 | WLWV | 3710 | 2013 | WLWV | 2262 | 2015 |
| WLLB | 7041 | 2015 | WLKT | 3552 | 2012 | WLWG | 3701 | 2014 | WLWV | 2041 | 2013 | WLWV | 2051 | 2015 |
| WLTH | 2380 | 2015 | WLNS | 7100 | 2014 | WLWG | 3470 | 2010 | WLWV | 2263 | 2013 | WLWV | 2042 | 2015 |
| WLTH | 2722 | 2015 | WLNS | 7122 | 2013 | WLWG | 3400 | 2015 | WLWV | 2073 | 2013 | WLWV | 2223 | 2009 |
| WLWA | 3620 | 2014 | WLNS | 7123 | 2015 | WLWG | 3400 | 2011 | WLWV | 2074 | 2013 | WLWV | 3730 | 2015 |
| WLWA | 3602 | 2013 | WLTT | 3134 | 2014 | WLWG | 3471 | 2009 | WLWV | 3743 | 2009 | | | |
| WLWA | 3602 | 2013 | WLTT | 3134 | 2010 | WLWG | 3042 | 2009 | WLWV | 2070 | 2014 | | | |
| WLWA | 3610 | 2014 | WLTT | 3131 | 2010 | WLWV | 2222 | 2014 | WLWV | 2970 | 2009 | | | |
| WLWA | 3602 | 2009 | WLTT | 3133 | 2010 | WLWV | 2181 | 2013 | WLWV | 2051 | 2014 | | | |

| Weinbaugebiet Kürzel | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Bergland BLXX | Kamptal WLKA | Leithaberg WLLB | Thermenregion WLTH | Wachau WLWA |
| Carnuntum WLCA | Kremstal WLKT | Neusiedlersee WLNS | Traisental WLTT | Wagram WLWG |
| Weinviertel WLWV | Wien WIEN | | | |

*Abbildung 10*: Geografische Verteilung der 108 analysierten Handelsproben der Sorte Grüner Veltliner; Quelle: eigene Darstellung, Kartenmarterial aus Google Maps.

*Tabelle 7*: Jahrgangsmäßige Verteilung der Proben unter Berücksichtigung des Klimas 2009 bis 2015; Quelle: siehe Tabelle.

| *JAHRGANG* | *Blick auf die Durchschnittliche Temperatur in °C bzw. Niederschlagsmenge in mm der Jahre2009-2015 in der Version (Reifebeginn der Beeren, Juli/August/September Ernte)* *Stellvertretend wird* | *Anmerkung des ÖWM * betreffend Klimas auf den Jahrgang* | *Anzahl analysierter Proben aus dem Jahrgang* |
|---|---|---|---|
| 2009 | Krems, Lower Austria, Austria<br>48.409N, 15.614E \| Elevation: 195 m \| Climate Class: Cfb \| Years: 2009-2015 | **2009** Warmer Jahrgang, kraftvolle Weine | 14 |
| 2010 | Availability of Climate Data | **2010** Kühler Jahrgang, wenig Ertrag, frische Weine | 12 |
| 2011 | | **2011** Hohe Reife, guter Ertrag, runde Weine | 2 |
| 2012 | | **2012** Hohe Reife, viel Frucht und Fülle | 3 |
| 2013 | | **2013** Hervorragender Weißwein-Jahrgang mit Frische | 25 |
| 2014 | | **2014** Schwieriges Jahr, viel Regen, sehr resche Weine | 36 |
| 2015 | | **2015** Exzellenter Jahrgang mit herrlicher Fruchttiefe | 13 |
| 7 Jahrgänge | Quelle: Laura Zepner, Pierre Karrasch, Felix Wiemann & Lars Bernard (2020) ClimateCharts.net – an interactive climate analysis web platform, International Journal of Digital Earth, DOI: 10.1080/17538947.2020.1829112 | *Klimatische Betrachtung des Jahrgangs aus Sicht der Österreichischen Wein Marketing ÖWM https://www.oesterreichwein.at/unser-wein/oesterreichs-jahrgaenge | 105 ohne Regelweine |

| | Jan | | Feb | | Mar | | Apr | | May | | Jun | | Jul | | Aug | | Sep | | Oct | | Nov | | Dec | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Temp | Prec | Temp | Prec | Temp | Prec | Temp | Prec | Temp | Prec | Temp | Prec | Temp | Prec | Temp | Prec | Temp | Prec | Temp | Prec | Temp | Prec | Temp | Prec |
| 2009 | -2.1 | 29.8 | 0.5 | 65.9 | 5.0 | 86.3 | 13.5 | 10.7 | 15.8 | 70.0 | 17.0 | 161.0 | 20.3 | 119.8 | 20.8 | 80.4 | 16.9 | 40.2 | 9.4 | 38.7 | 6.2 | 49.5 | 0.6 | 39.5 |
| 2010 | -2.6 | 39.7 | 0.0 | 22.8 | 5.1 | 21.4 | 10.3 | 67.4 | 13.9 | 128.6 | 18.5 | 121.0 | 21.7 | 111.7 | 19.2 | 134.0 | 13.9 | 69.8 | 8.1 | 27.4 | 6.1 | 40.7 | -2.3 | 35.7 |
| 2011 | -0.2 | 27.4 | 0.6 | 11.0 | 6.0 | 45.9 | 12.5 | 34.8 | 15.4 | 64.2 | 18.7 | 93.8 | 18.6 | 99.8 | 20.7 | 53.9 | 17.4 | 44.8 | 9.5 | 50.9 | 3.9 | 0.8 | 2.4 | 29.2 |
| 2012 | 0.8 | 57.8 | -3.4 | 24.2 | 7.8 | 14.2 | 10.4 | 42.1 | 16.1 | 63.0 | 19.4 | 96.7 | 20.6 | 118.9 | 21.1 | 69.5 | 16.0 | 53.7 | 10.0 | 48.0 | 6.2 | 28.2 | 0.2 | 48.1 |
| 2013 | 0.2 | 64.4 | -0.3 | 60.6 | 2.7 | 44.2 | 10.9 | 21.9 | 14.0 | 112.0 | 17.8 | 123.3 | 22.0 | 23.8 | 20.8 | 99.9 | 14.8 | 75.9 | 11.0 | 33.1 | 5.1 | 57.2 | 2.2 | 13.7 |
| 2014 | 1.8 | 40.3 | 3.9 | 49.4 | 8.3 | 21.1 | 11.8 | 50.1 | 14.0 | 110.1 | 18.4 | 67.2 | 20.7 | 118.6 | 18.2 | 125.3 | 15.9 | 118.0 | 12.0 | 47.9 | 7.5 | 41.5 | 2.4 | 45.5 |
| 2015 | 1.7 | 44.1 | 1.3 | 21.1 | 6.1 | 48.5 | 10.3 | 35.6 | 14.7 | 105.8 | 18.7 | 67.8 | 22.7 | 74.2 | 22.6 | 75.4 | 15.4 | 70.8 | 9.7 | 84.3 | 6.9 | 35.2 | 3.4 | 15.8 |

< 5.3 … > 19.2 Temperature Scale [°C]

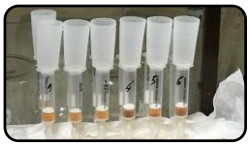
< 66.9 … > 142.2 Precipitation Scale [mm]

No data available

Data Source: CRU Time Series v4.04
https://catalogue.ceda.ac.uk/uuid/89e1e34ec3554dc98594a5732622bce9

ClimateCharts.net

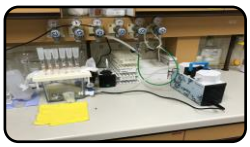
Für die Analyse der Handelsproben erfolgt anhand *Abbildung 11* die Kurzbeschreibung des Ablaufs der SPE-SPME-GC-MS-Methode inklusive der notwendigen Probenaufarbeitung.



Konditionieren der SPE-Säulchen (LiChrolut EN-500 mg/6 ml) mit Pentan/Dichlormethan
SPE-Säulchen (LiChrolut EN-500 mg/6 ml) mit METHANOL waschen
SPE-Säulchen (LiChrolut EN-500 mg/6 ml) mit KUNSTWEIN vorspülen

WASCHEN der SPE-Säulchen(LiChrolut EN 500 mg/6 ml) mit destillierten Wasser

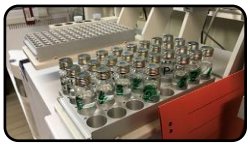
Probe-Aufgabe von 100 ml Weinprobe + 100 µl ISTD 5,7 Dimethyltetralon in SPE-Säulchen (LiChrolut EN-500 mg/6 ml)



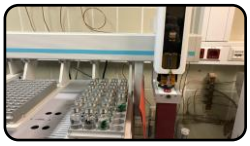
TROCKNEN der SPE-Säulchen (LiChrolut EN 500 mg/6 ml)

ELUIEREN der SPE Säulchen (LiChrolut EN 500 mg/6 ml) mit dem PENTAN/DICHLOMETHAN in graduiertes Reagenzglas

Eluat mittels Rotorvapor auf Trockene einengen



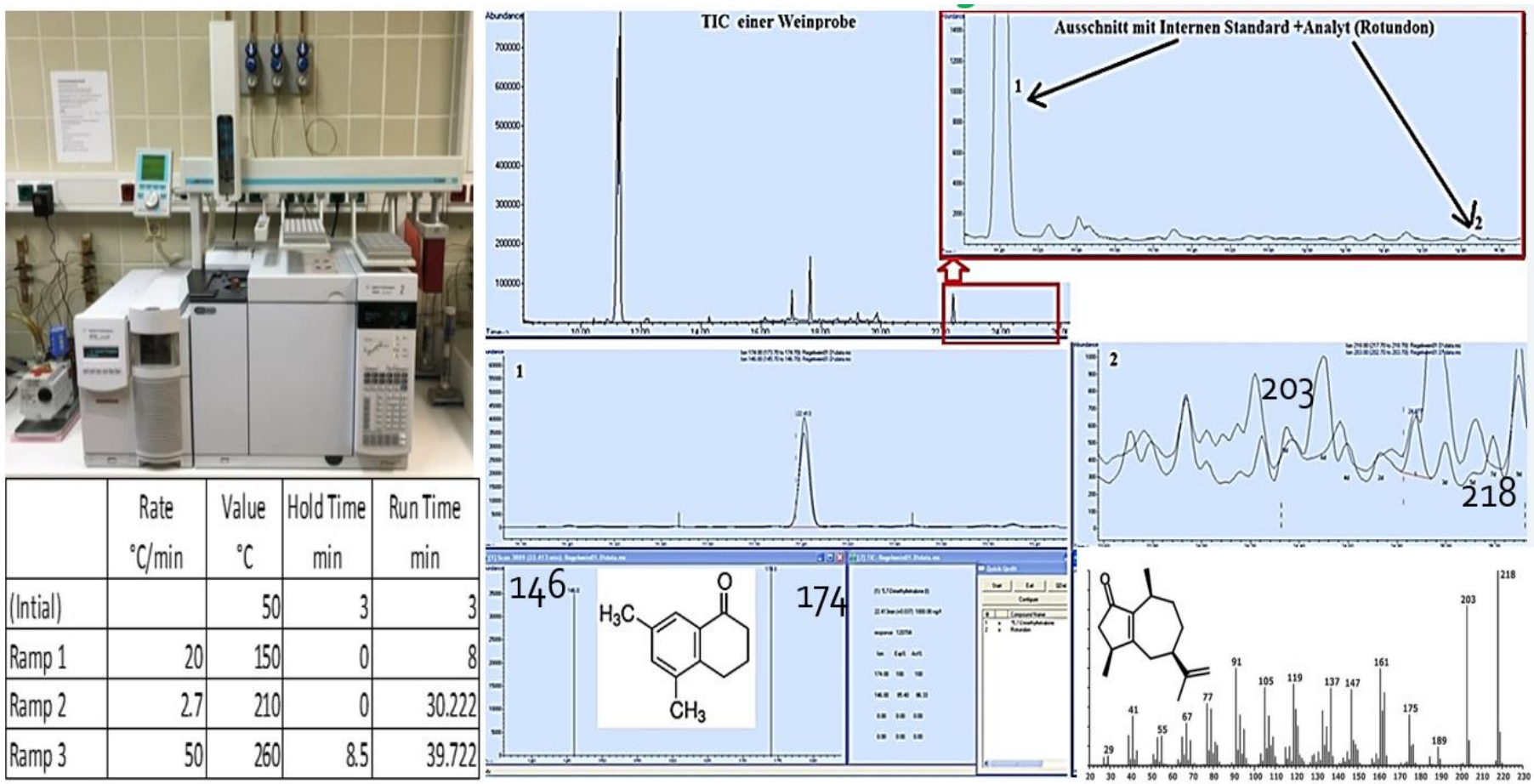
Rückstand-Aufnahme in 1 ml 50 % ETOH IN ETOH gelösten Rückstand mit 14 ml dH2O versetzen Überführen in 20 ml Vial



Immersion--SPME-GC-MS-Analyse

*Abbildung 11*: Überblick des Ablaufs der Probenaufarbeitung für die Rotundonanalyse; Quelle: eigene Darstellung, Bildmaterial aus eigenem Fundus.

Die *Abbildungen 12, 13, 14, 15* und *16* liefern Beispiele von Chromatogrammen, Auswertung, Kalibrationskurven der SPE-SPME-GC-MS Analyse-methode.




| | Rate °C/min | Value °C | Hold Time min | Run Time min |
|---|---|---|---|---|
| (Intial) | | 50 | 3 | 3 |
| Ramp 1 | 20 | 150 | 0 | 8 |
| Ramp 2 | 2.7 | 210 | 0 | 30.222 |
| Ramp 3 | 50 | 260 | 8.5 | 39.722 |

*Abbildung 12*: Zusammenfassung Überblick von Chromatogrammen bzw. Auswertung der umgesetzten SPE-SPME-GC-MS Analysemethode.

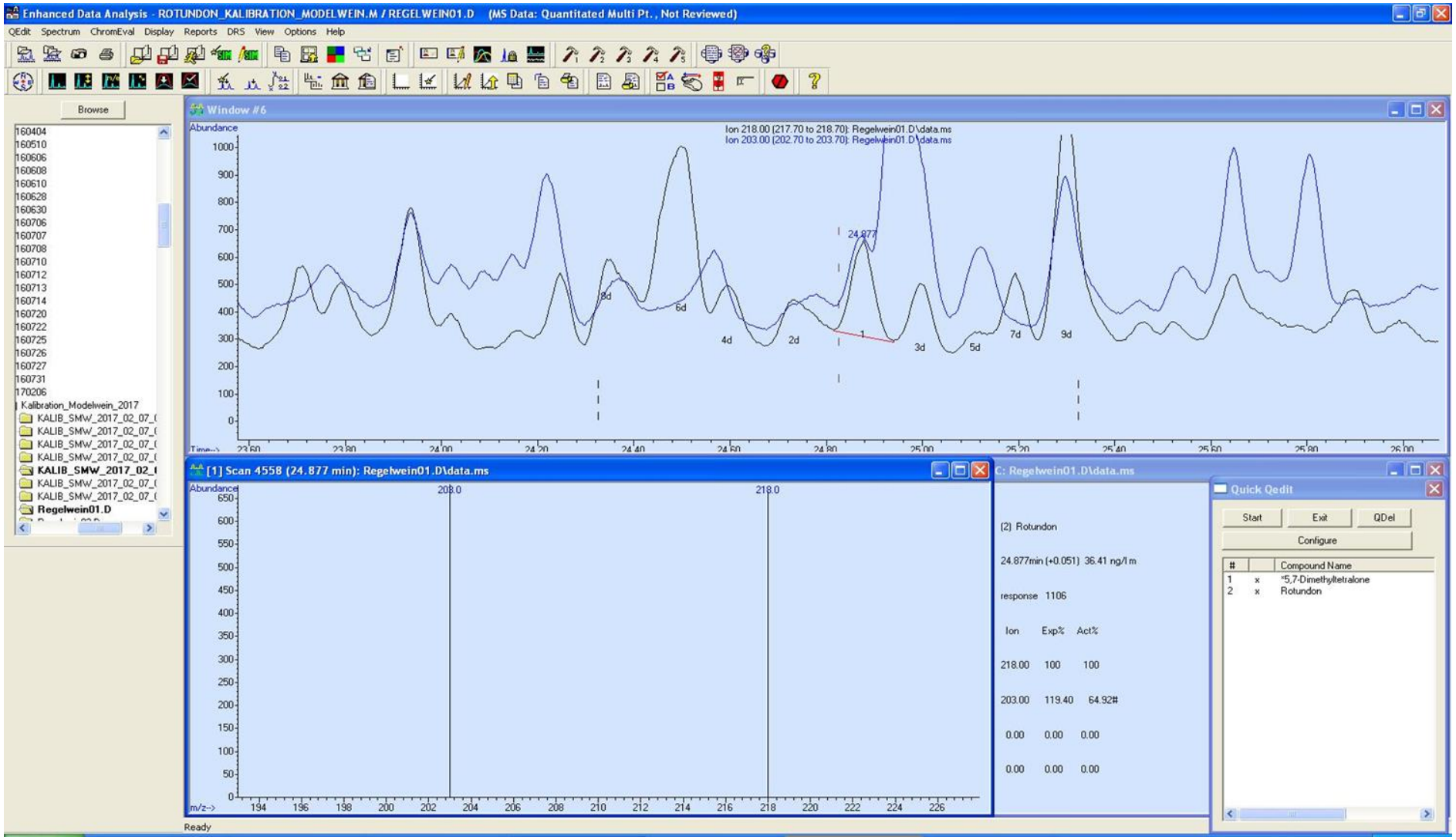



*Abbildung 13*: Chromatogramm von Rotundon (c= ca 36ng/l) im Regelwein.

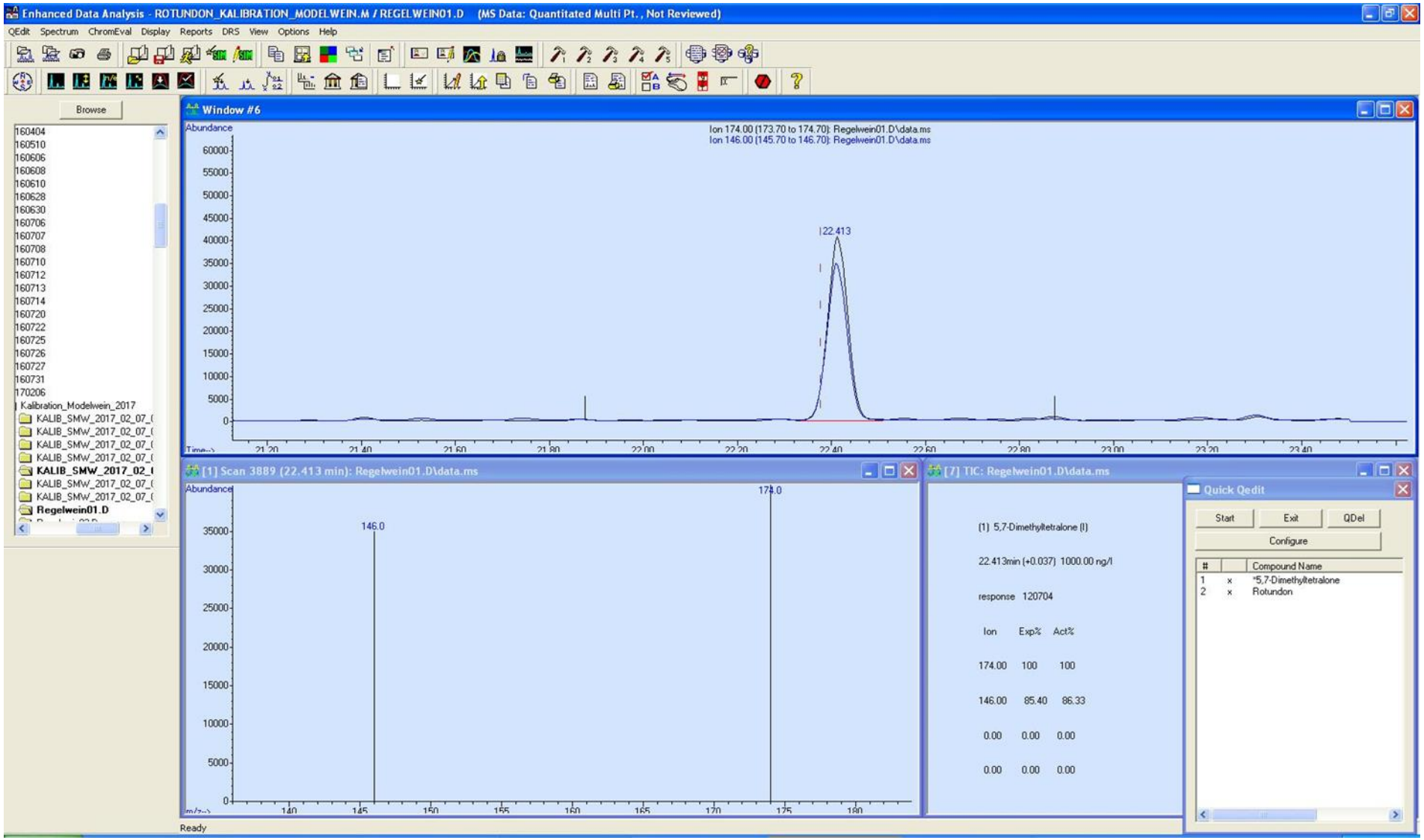
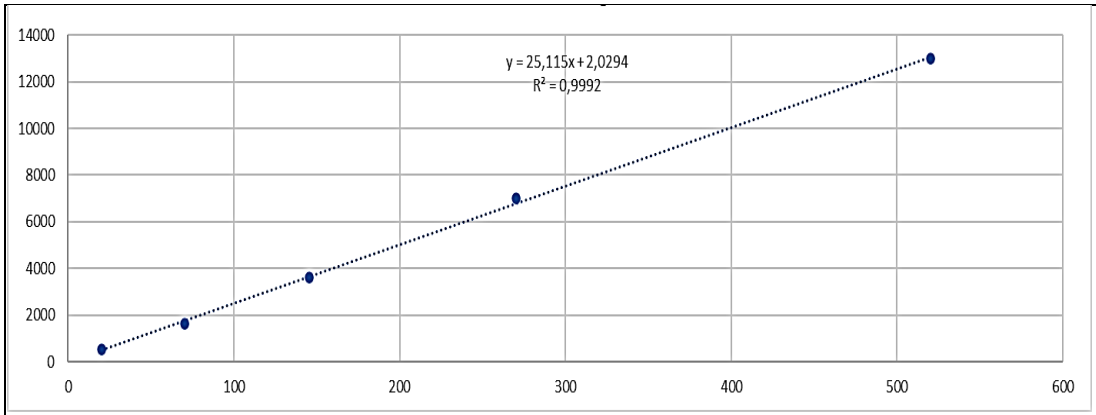
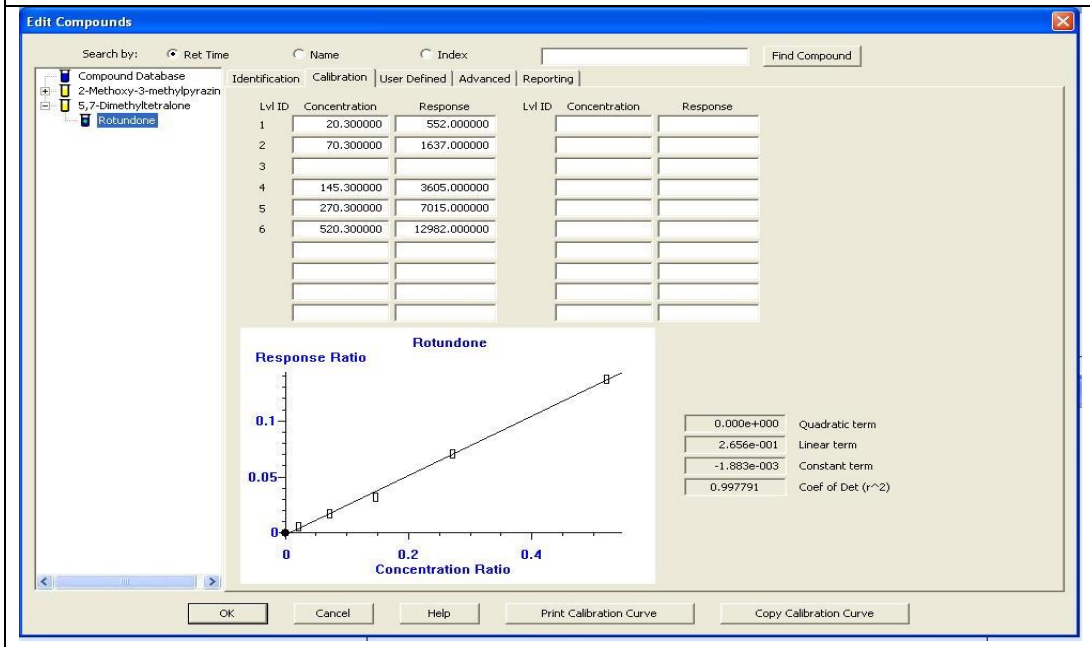



*Abbildung 14*: Chromatogramm des Internen Standards 5,7-Dimethyltetralon (c=1000ng/l) im Regelwein.




| Standard Konz ng/l | Peak Area | Found concentra-tion | Recovery % |
|---|---|---|---|
| 20,3 | 552 | 21,89809277 | 107,872378 |
| 70,3 | 1637 | 65,09936691 | 92,6022289 |
| 145,3 | 3605 | 143,458913 | 98,7329064 |
| 270,3 | 7015 | 279,234346 | 103,305344 |
| 520,3 | 12982 | 516,8214454 | 99,3314329 |
| Mean n = 5 | | | 100,368858 |
| SD | | | 5,67888378 |



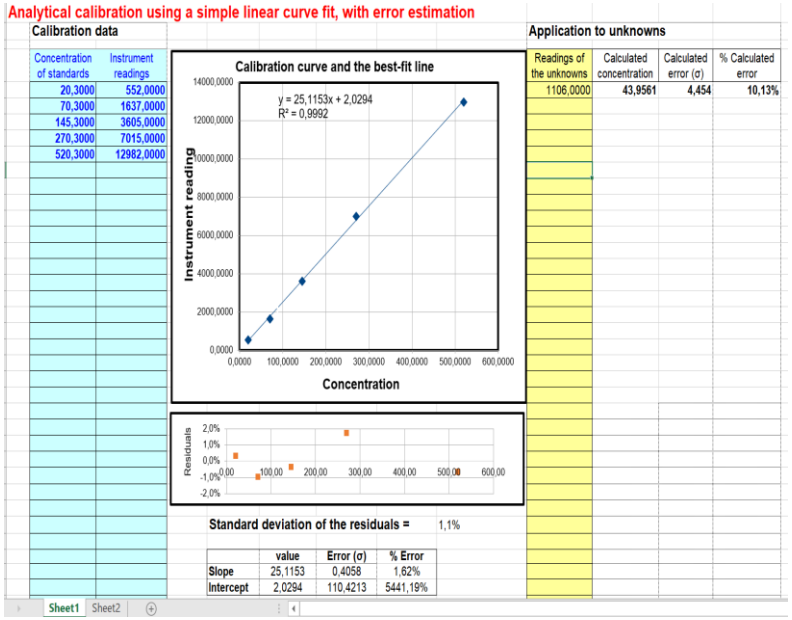




*Abbildung 15*: Kalibrationskurve Rotundon in einer Weinmatrix mittels Standardaddition.

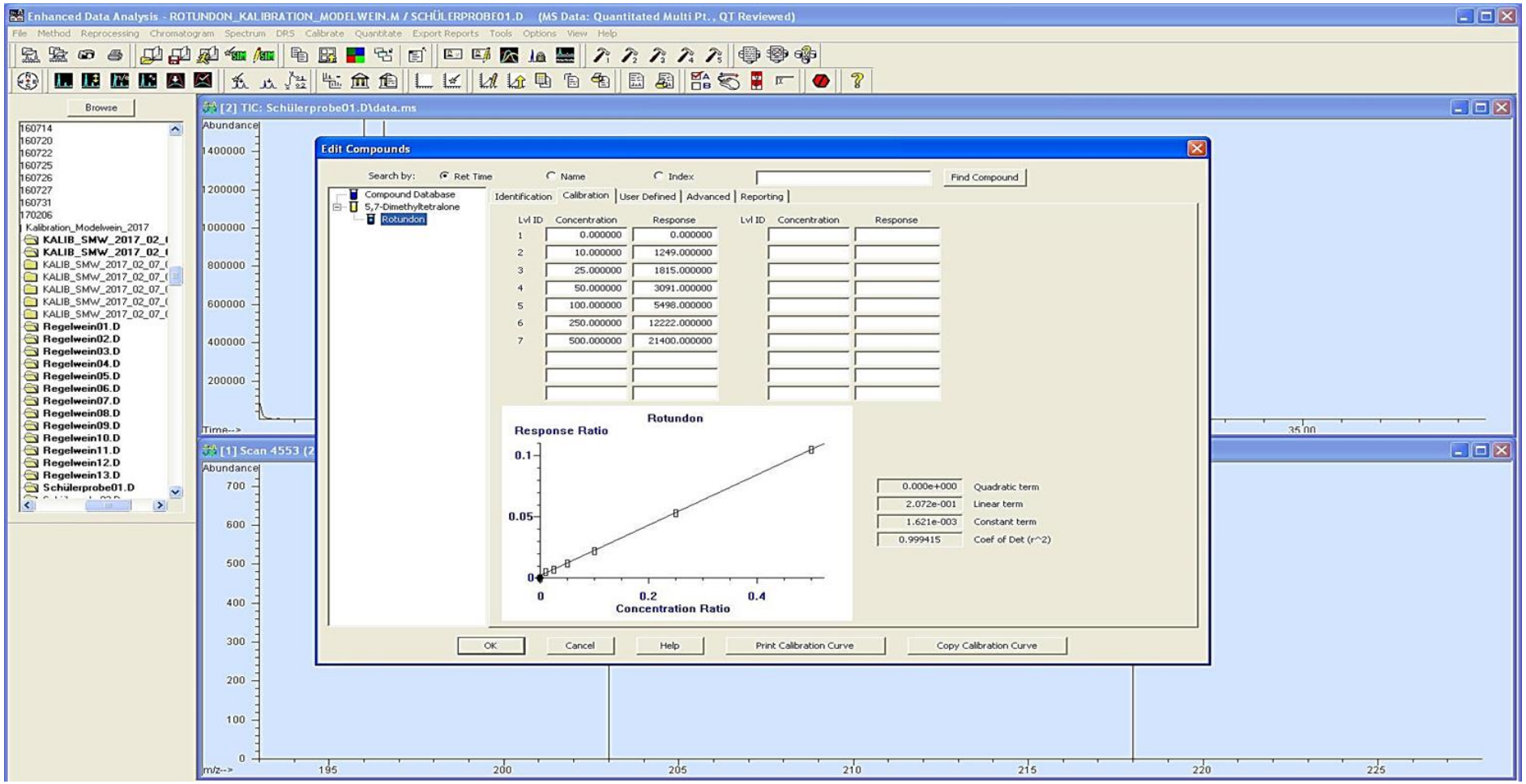



*Abbildung 16*: Kalibrationskurve von Rotundon in einem Modelwein (sogenannter „Kunstwein“).

Die *Abbildungen 17* und *18* veranschaulichen die Versuchspläne für die drei durchgeführten 2x2-Pläne inkl. Faktoren und Levels als Designmatrix bzw. aus geometrischer Sicht. Die folgenden faktoriellen Versuchpläne wurden im Rahmen der Evaluierung von önologischen Parametern im Rahmen der zweiten Publikation in zwei aufeinanderfolgenden Erntejahren (2011, 2012) realisiert. Zusätzlich wurde ein sogenannter Zentralpunkt hinzugefügt, um die Schätzung der Krümmung zu ermöglichen.

**Vorstellung + grober Überblick der umgesetzten $2^2$ -Versuchspläne**

3 unabhängigen Versuchspläne mit $2^2$ vollfaktoriellen Design
(14 Versuchsvarianten (5 Varianten A, 5 Varianten B, 4 Varianten C)) in 2facherWiederholung
in 2 aufeinander folgenden Versuchs-Jahren (2011/2012)

- Versuchsplan A
  - 10 Versuchsläufe

| S/N | Faktoren | Einheit | Levels | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | -1 | 0 | +1 |
| 1 | Gärtemperaturen | °C | 15 | 19 | 23 |
| 2 | Standzeit | h | 0 | 3 | 6 |

- Versuchsplan B
  - 10 Versuchsläufe

| S/N | Faktoren | Einheit | Levels | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | -1 | 0 | +1 |
| 1 | Maischeschwefelung | mg/l | 0 | 30 | 60 |
| 2 | Jungweinschwefelung | mg/l | 40 | 60 | 80 |

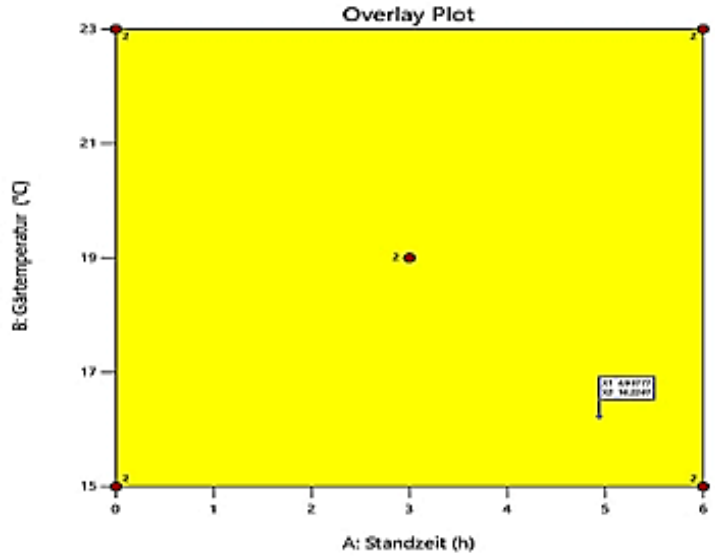
- Versuchsplan C
  - 8 Versuchsläufe

| S/N | Faktoren | Einheit | Levels | |
|---|---|---|---|---|
| | | | -1 | +1 |
| 1 | Mostklärung | - | NEIN | JA |
| 2 | Hefenährsalzzugabe | . | NEIN | JA |

*Abbildung 17*: Veranschaulichung der drei durchgeführten $2^2$-Pläne inkl. Faktoren und Levels dargestellt als Designmatrix.

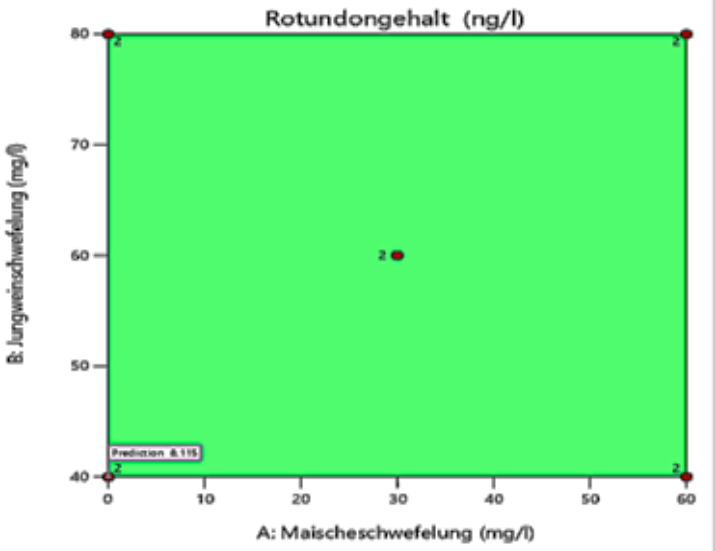
Übersicht der drei durchgeführten $2^2$-Pläne inkl. Faktoren + Levels inkl. des entsprechenden Test-Matrix-Design

Versuchplan A - Design/Test-Matrix mit Zentralpunkt



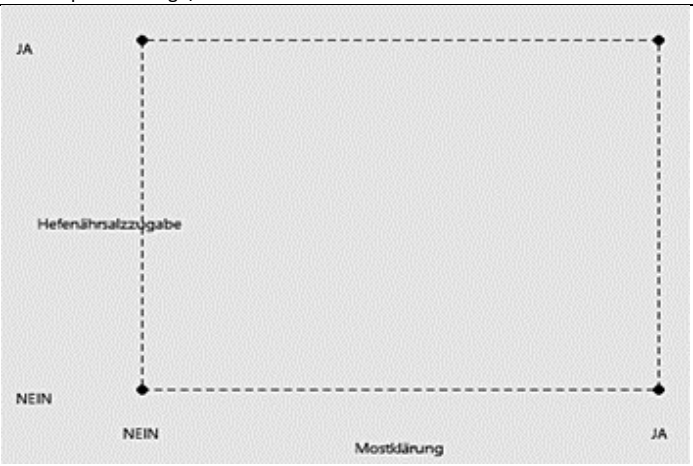

| Syst. Nr. | Faktoren | | Faktoren | |
|---|---|---|---|---|
| | A | B | Standzeit | Gärtemperatur |
| 1 | - | - | 0 h | 15° C |
| 2 | + | - | 6 h | 15° C |
| 3 | - | + | 0 h | 23° C |
| 4 | + | + | 6 h | 23° C |
| 5 | 0 | 0 | 3 h | 19° C |
| Syst. Nr. | Faktoren | | Faktoren | |
| | A | B | Standzeit | Gärtemperatur |
| 6 | - | - | 0 h | 15° C |
| 7 | + | - | 6 h | 15° C |
| 8 | - | + | 6 h | 23° C |
| 9 | + | + | 6 h | 23° C |
| 10 | 0 | 0 | 3 h | 19° C |

Versuchplan B-Design/Test-Matrix mit Zentralpunkt




| Syst. Nr. | Fakto-ren | | Faktoren | |
|---|---|---|---|---|
| | A | B | Maische-schwefelung | Jungwein-schwefelung |
| 1 | - | - | 0 mg/l | 40 mg/l |
| 2 | - | + | 0 mg/l | 80 mg/l |
| 3 | + | - | 60 mg/l | 40 mg/l |
| 4 | + | + | 60 mg/l | 80 mg/l |
| 5 | 0 | 0 | 30 mg/l | 60 mg/l |
| Syst. Nr. | Fakto-ren | | Faktoren | |
| | A | B | Maische-schwefelung | Jungwein-schwefelung |
| 1 | - | - | 0 mg/l | 40 mg/l |
| 2 | - | + | 0 mg/l | 80 mg/l |
| 3 | + | - | 60 mg/l | 40 mg/l |
| 4 | + | + | 60 mg/l | 80 mg/l |
| 5 | 0 | 0 | 30 mg/l | 60 mg/l |

Versuchplan C-Design/Test-Matrix




| Syst. Nr. | Fakto-ren | | Faktoren | |
|---|---|---|---|---|
| | A | B | Most-klä-rung | Hefenähr-salz-zugabe |
| 1 | + | + | Ja | Ja |
| 2 | + | - | Ja | Nein |
| 3 | - | + | Nein | Ja |
| 4 | - | - | Nein | Nein |
| Syst. Nr. | Fakto-ren | | Faktoren | |
| | A | B | Most-klä-rung | Hefenähr-salz-zugabe |
| 5 | + | + | Ja | Ja |
| 6 | + | - | Ja | Nein |
| 7 | - | + | Nein | Ja |
| 8 | - | - | Nein | Nein |

*Abbildung 18*: Veranschaulichung der drei durchgeführten 2x2-Pläne, Darstellung der Faktoren + Levels aus geometrischer Sicht bzw. als Designmatrix.

Als Ausgangsmaterial für die Weine der drei unabhängigen Versuchspläne mit einem vollfaktoriellen Design (14 Versuchsvarianten [5 Varianten A, 5 Varianten B, 4 Varianten C]) in 2-facher Wiederholung in zwei Jahren (2011 und 2012) dienten ca. 900 kg Trauben der Sorte Grüner Veltliner, die an der HBLA Klosterneuburg mikrovinifiziert wurden. Die nachfolgende *Abbildung 19* stellt eine Übersicht der technologischen Rahmenbedingungen sowie eine Übersicht des praktischen Ablaufschemas der drei durchgeführten faktoriellen Versuchspläne von 2011 und 2012 dar (*Abbildung 20*).

| Überblick+Zsfg. der technologischen Rahmenbedingungen der 3 unabhängigen Versuchspläne mit $2^2$ vollfaktoriellen Design | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Versuchsbezeichnung | KLEINVERSUCH A | | | KLEINVERSUCH B | | | KLEINVERSUCH C |
| Erforderliche Mostmenge | 250 Liter Most | | | 250 Liter Most | | | 200Liter Most |
| Anzahl der Varianten | 10 Varianten | | | 10 Varianten | | | 8 Varianten |
| Maischeschwefelung | 50mg/l | | | 4 Varianten 0 mg/l | 2Varianten 30mg/l | 4 Varianten 60mg/l | 50mg/l |
| Maischestandzeit | 4 Varianten 0h | 2 Varianten 3h | 4 Varianten 6h | 0h | 0h | 0h | 0h |
| Gärtemperatur | 15°C<br>23°C | 19°C | 15°C<br>23°C | 19°c | 19°C | 19°C | 19°C |

*Abbildung 19*: Überblick technologische Rahmenbedingungen der drei unabhängigen Versuchspläne mit $2^2$ faktoriellem Design.

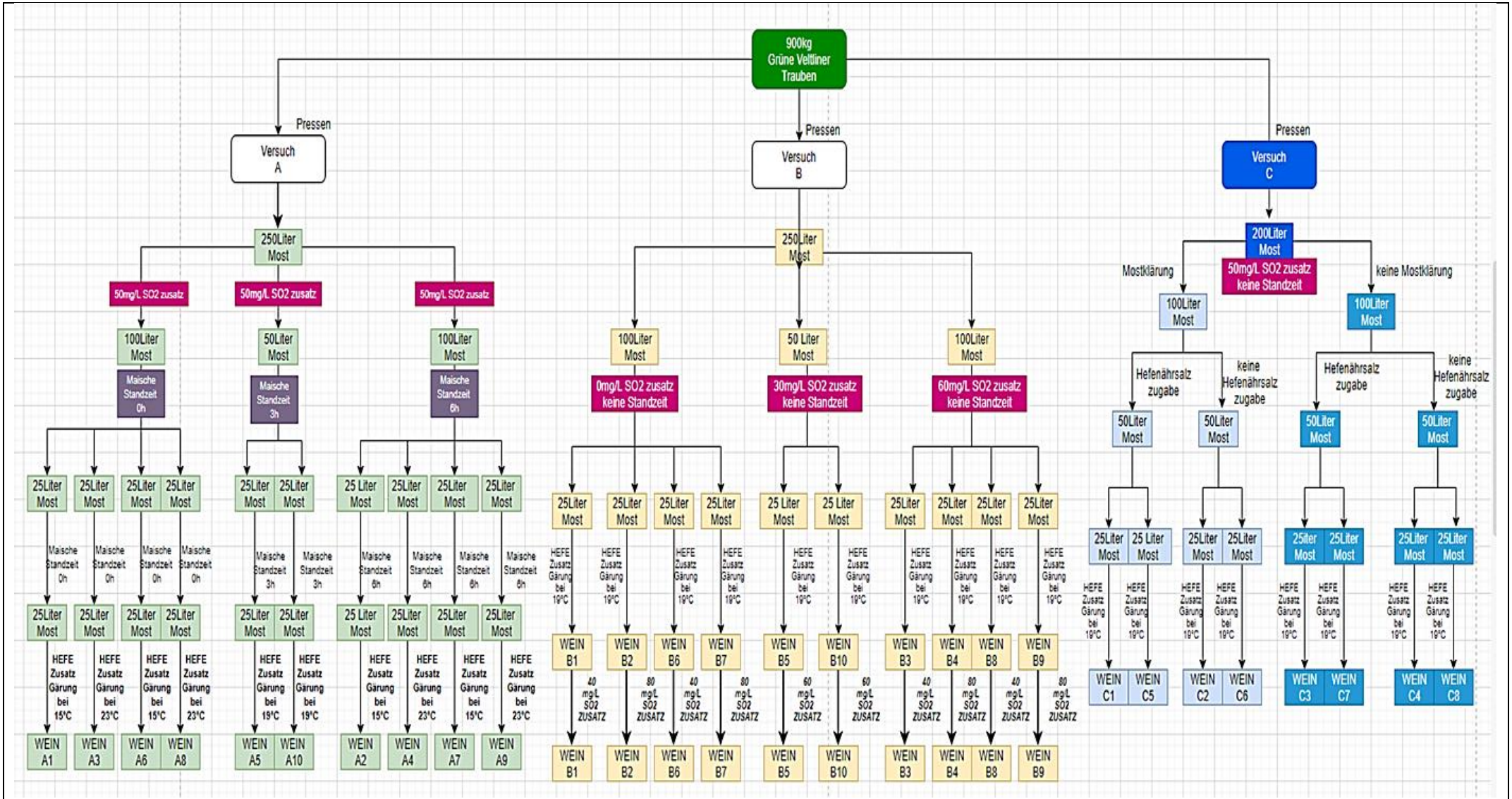



*Abbildung 20*: Übersicht des Praktischen Ablaufschemas der drei durchgeführten faktoriellen Versuchspläne sowohl von 2011 bzw. 2012.

Die folgende *Abbildung 21* zeigt Impressionen zur praktischen Realisierung der Vinifizierung der 28 Versuchsvarianten im 30-Liter-Maßstab (A1-A10, B1-B10, C1-C8).

*Abbildung 21*: Impressionen praktische Realisierung –Technologieversuch/faktorielle Versuchspläne.

### 1.3.6 Genutzte Werkzeuge zur Auswertung der erstellten 2x2 faktoriellen Designs

Spezielle Softwareprogramme wie Minitab® 18, 19 bzw. Design Experts® 11, 12 adaptiert für die Erstellung und Visualisierung der Auswertung von Versuchsplänen, wurden für die drei durchgeführten statistischen Versuchspläne im Rahmen der vorgelegten Arbeit genutzt. Anhand *Tabelle 8* soll vermittelt werden, welche statistischen „Tools“ im Rahmen dieser vorgelegten Arbeit eingesetzt und zur Beurteilung und Interpretation der Ergebnisse der drei durchgeführten $2^2$-Versuchspläne verwendet wurden.

*Tabelle 8*: Überblick statistischer Werkzeuge zur Auswertung der drei durchgeführten statistischen 2x2-Versuchspläne.

| **Überblick/Erklärung eingesetzter statistischer „Tools“, die bei Auswertung der Versuchspläne sowie Bewertung der Ergebnisse eingesetzt wurden** | | |
|---|---|---|
| **Statistische „Tools“** | **Minitab® 18, 19**<br>(Minitab, LLC. State College, Pennsylvania, USA) | **Design Expert® 11, 12**<br>(Stat-Ease, Inc. 1300 Godward St NE Suite 6400 Minneapolis, MN 55413-2561) |
| **Varianz-Analyse ANOVA** | Die bewährteste Methode in der Versuchsplanung zur Feststellung der Signifikanz ist die Varianzanalyse (engl. Analysis of Variance [ANOVA]). Ziel der Varianzanalyse ist es, ***Mittelwerte in verschiedenen Gruppen auf signifikante Unterschiede zu vergleichen***. Die Gruppen sind in diesem Fall die Faktoren auf ihren jeweiligen Faktorstufen. Dazu wird die gesamte in den Versuchsdaten vorhandene Variation in zwei Teile zerlegt, in die Variation zwischen den Gruppen, verursacht durch die Effekte und die Variation innerhalb der Gruppen. Die Variation innerhalb der Gruppen wird nicht durch die Effekte beschrieben. Diese beiden Varianzen werden verglichen und mittels F-Test auf Signifikanz geprüft. Die Nullhypothese lautet hierbei, dass alle Gruppen den gleichen Mittelwert haben. Ein Effekt ist dann signifikant, wenn die Alternativhypothese, dass die Gruppen nicht den gleichen Mittelwert haben, zutrifft.[1] | |
| **Paretodiagramm** | Das Paretodiagramm soll helfen, Wichtiges von Unwichtigerem zu trennen.[2] Aus Faktoren wird diejenige herausgefiltert, die den größten Einfluss hat, um ***die relative Größe und die statistische Signifikanz von Haupt- und Wechselwirkungseffekten zu vergleichen***. Im Paretodiagramm werden die Absolutwerte der standardisierten Effekte geordnet vom größten zum kleinsten Effekt angezeigt. Die standardisierten Effekte sind t-Statistiken, mit denen die Nullhypothese geprüft wird, dass der Effekt gleich 0 ist.[3] Außerdem wird im Diagramm eine Referenzlinie angezeigt, anhand derer ersichtlich ist, welche Effekte statistisch signifikant sind.[4] | |
| **Normal-Plot** | Der Normal-Plot wird verwendet, um ***Größe, Richtung und Bedeutung der Effekte (positiv bzw. negativ)*** zu ermitteln. Das Wahrscheinlichkeitsnetz (Normal) für Effekte zeigt die standardisierten Effekte in Bezug auf eine Verteilungsanpassungslinie für den Fall, bei dem alle Effekte gleich 0 sind. Die standardisierten Effekte sind t-Statistiken, mit denen die Nullhypothese getestet wird, die besagt, dass der Effekt gleich 0 ist.[5] | |
| **Haupteffektdiagramm** | Dient dazu, um ***Differenzen zwischen den Mittelwerten der Stufen für einen oder mehrere Faktoren*** zu untersuchen. Ein Haupteffekt ist vorhanden, wenn sich verschiedene Faktorstufen unterschiedlich auf die Antwortvariable auswirken. In einem Haupteffektediagramm werden die Mittelwerte der Antwortvariablen für jede Faktorstufe durch eine Linie verbunden dargestellt.[6] | |
| **Wechselwirkungsdiagramm** | Eine Wechselwirkung liegt vor, wenn der ***Effekt eines Faktors von der Stufe eines anderen Faktors*** abhängt. [7]<br>Mögliche Wechselwirkungen können mithilfe eines Wechselwirkungsdiagramms veranschaulicht werden.<br>Parallel verlaufende Linien in einem Wechselwirkungsdiagramm verweisen darauf, dass keine Wechselwirkung vorliegt.<br>Je größer die Differenz der Steigung zwischen den Linien ausfällt, desto größer ist der Grad der Wechselwirkung.<br>In einem Wechselwirkungsdiagramm kann abgelesen werden, ob die Wechselwirkung statistisch signifikant ist. | |

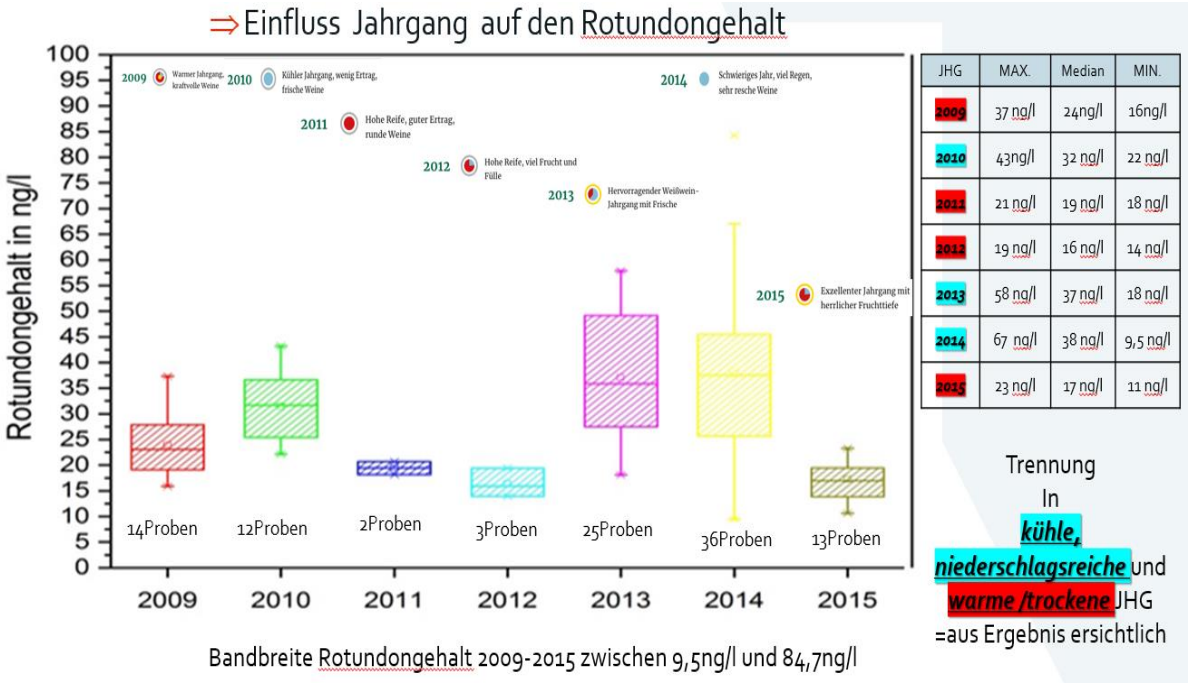
[1] https://docplayer.org/74736024-Masterarbeit-untersuchung-des-spritzgiessprozesses-mittels-design-of-experiment-doe-marc-lingenhoff.html.
[2] https://www.quality.de/wp-content/uploads/2019/06/Methodenblatt-Pareto-Diagramm.pdf.
[3] https://support.minitab.com/de-de/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/effects-plots/#:~:text=Im%20Pareto%2DDiagramm%20werden%20die,der%20Effekt%20gleich%200%20ist.
[4] https://support.minitab.com/de-de/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/effects-plots/#:~:text=Im Pareto-Diagramm werden die,der Effekt gleich 0 ist.
[5] https://support.minitab.com/de-de/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/how-to/factorial/analyze-variability/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/effects-plots/#:~:text=Das%20Wahrscheinlichkeitsnetz%20(Normal)%20f%C3%BCr%20Effekte,der%20Effekt%20g.
[6] https://support.minitab.com/de-de/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/basics/what-is-a-main-effects-plot/.
[7] https://support.minitab.com/de-de/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/anova-models/what-is-an-interaction/.

## 1.4 Beitrag zum Stand des Wissens

### 1.4.1 Publikation I: Analyse von (-)-Rotundon mittels SPE-SPME-GC-MS in österreichischen Qualitätsweinen der Rebsorte Grüner Veltliner

In Anlehnung an der bereits von Mattivi et al. (2011) durchgeführten Arbeit war es möglich, das Vorkommen des Sequiterpenketons Rotundon in den 108 analysierten kommerziellen Proben von Grüner Veltliner zu bestätigen. Aufbauend auf bereits durchgeführte Arbeiten von Mattivi et al. (2011) konnte ebenfalls das Vorkommen des Sequiterpenketons Rotundon in allen 108 analysierten Grünen Veltliner Handelsproben (2009 bis2015) bestätigt werden. Die erhobene Datenmenge von Mattivi et al. (2011) betrug im Vergleich zu jener in der vorgelegten Publikation nur rund 17,6 % 17(19) zu 108, also ein 1/6. Von den 19 analysierten Grüner Veltliner Proben in der Mattivi Studie stammten 17 aus Österreich, eine Probe aus Italien, eine aus der Slowakei. Laut Mattivi et al. (2011) enthielten von den 17 in dieser Studie analysierten österreichischen Grüner Veltliner Weinen 16 Rotundon in Konzentrationen, die über der für Rotweine angegebenen sensorischen Schwelle (16 ng/l) lagen. Des Weiteren ging eine durchschnittliche Rotundonkonzentration von 53 ± 16 ng/l hervor, wobei er eine Probe mit einem sehr hohen Wert von 264 ng/l feststellte, was ca. dem 17-fachen der sensorischen Schwelle entspricht.

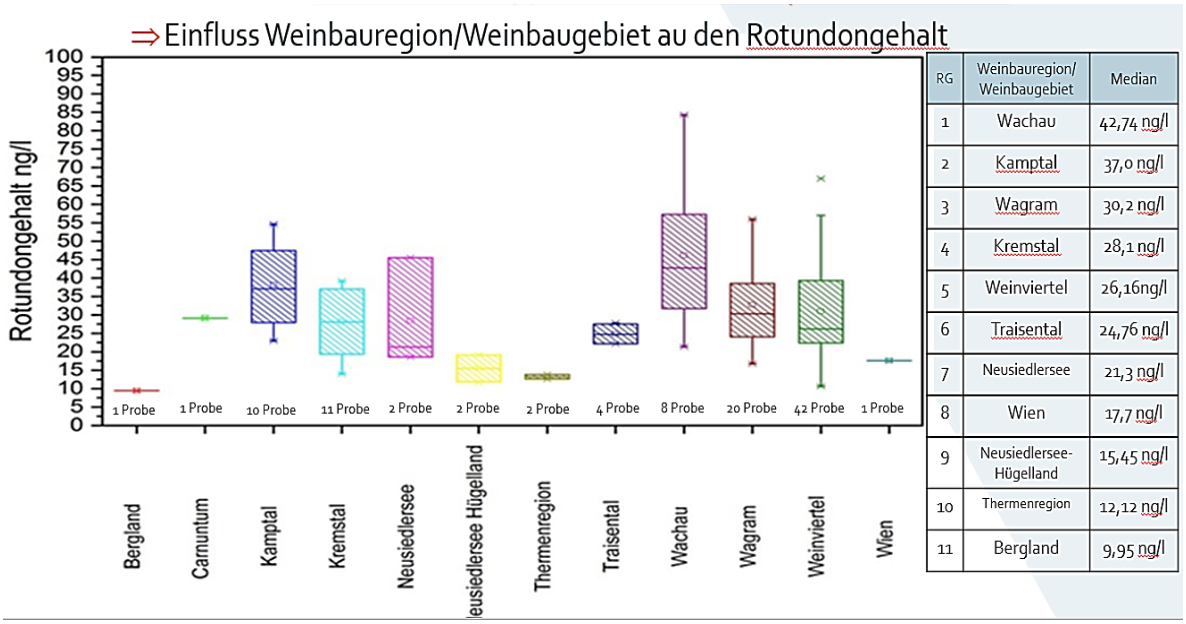
In der ersten vorgelegten Publikation betrug der durchschnittliche Rotundonkonzentrationswert 31,7 ng/l. Des Weiteren konnten in der ersten Publikation erstmals Effekte des Jahrgangs bzw. der Einfluss der Weinanbaugebiete auf den Rotundongehalt im Grünen Veltliner präsentiert und dokumentiert werden. Die folgende *Abbildung 22* veranschaulicht den klimatischen Einfluss des Jahrgangs auf den Rotundongehalt.




| JHG | MAX. | Median | MIN. |
|---|---|---|---|
| 2009 | 37 ng/l | 24ng/l | 16ng/l |
| 2010 | 43ng/l | 32 ng/l | 22 ng/l |
| 2011 | 21 ng/l | 19 ng/l | 18 ng/l |
| 2012 | 19 ng/l | 16 ng/l | 14 ng/l |
| 2013 | 58 ng/l | 37 ng/l | 18 ng/l |
| 2014 | 67 ng/l | 38 ng/l | 9,5 ng/l |
| 2015 | 23 ng/l | 17 ng/l | 11 ng/l |

*Abbildung 22*: Einfluss des Jahrgangs auf den Rotundongehalt.

Für die Rebsorte Grüner Veltliner konnte also bestätigt werden, wie es bereits in australischen Arbeiten für die Rotweinsorte Shiraz (Zhang et al., 2015) nachgewiesen wurde, das kühle und niederschlagsreiche Jahre die Akkumulation von Rotundon unterstützen, während trockene und warme Jahrgänge sich eher dämpfend nachteilig auf den Gehalt dieser pfeffrigen Leitsubstanz auswirkten. Besonders der Effekt des Anbaugebiets führte zu einem überraschenden Ergebnis bzgl. des Rotundongehalts. Hierbei wurde erwartet, dass das größte Anbaugebiet des Grünen Veltliner, das Weinviertel, die höchsten Rotundongehalte aufweisen würde. Auch Flak et al. (2009) kamen bei ihren sensorischen Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass Weine dieser Region pfeffriger sind als jene anderer Anbaugebiete. In der vorliegenden Arbeit – basierend auf den analysierten Proben – war es das Weinbaugebiet Wachau. Anhand der folgenden *Abbildung 23* wird der Einfluss der Weinbauregion auf den Rotundongehalt veranschauchlicht.




| RG | Weinbauregion/ Weinbaugebiet | Median |
|---|---|---|
| 1 | Wachau | 42,74 ng/l |
| 2 | Kamptal | 37,0 ng/l |
| 3 | Wagram | 30,2 ng/l |
| 4 | Kremstal | 28,1 ng/l |
| 5 | Weinviertel | 26,16ng/l |
| 6 | Traisental | 24,76 ng/l |
| 7 | Neusiedlersee | 21,3 ng/l |
| 8 | Wien | 17,7 ng/l |
| 9 | Neusiedlersee-Hügelland | 15,45 ng/l |
| 10 | Thermenregion | 12,12 ng/l |
| 11 | Bergland | 9,95 ng/l |

*Abbildung 23*: Einfluss Weinbauregion bzw. Weinbaugebiet auf den Rotundongehalt.

Mögliche Gründe bzw. Ursachen, warum die Wachau durchschnittlich höhere Rotundongehalte aufwies, könnten beispielsweise in bestimmten geografischen Gegebenheiten (z. B. Hanglagen), dem speziellen Mikroklima oder dem Bodenmikrobiom und der dort häufig eingesetzten Tröpfchenbewässerung begründet liegen. Der Wasserhaushalt der Rebe ist einer der förderlichsten Effekte auf die Akkumulation des Rotundons und ist in der Wachau gegeben. Zwei von Mattivi et al. (2011) erwähnte Aspekte decken sich mit dem in der ersten Publikation festgestellten Effekt des regionalen Einflusses auf den Rotundongehalt. Des Weiteren fanden Mattivi et al. (2011) heraus, dass der Rotundongehalt in Grüner Veltliner Weinen, die aus italienischen Weingütern entnommen wurden, eine geringere Rotundonkonzentration aufwiesen als Proben aus der Slowakei. Australische Studien zeigen im Vergleich, dass in südlichen und entsprechend vermutlich trockeneren Gebieten niedrigere Gehälter zu finden sind als in nördlichen, also kühleren, feuchteren Gebieten.

Auch in der ersten Publikation geht dieser Trend bei Vergleich der einzelnen Weinbaugebiete bzw. Regionen untereinander hervor. Bei den analysierten Proben aus der Wachau wurden durchschnittlich dreimal höhere Rotundongehalte als in der Thermenregion gefunden.

Die folgende *Abbildung 24* zeigt den kombinierten Einfluss des Jahrgangs auf den Rotundongehalt:

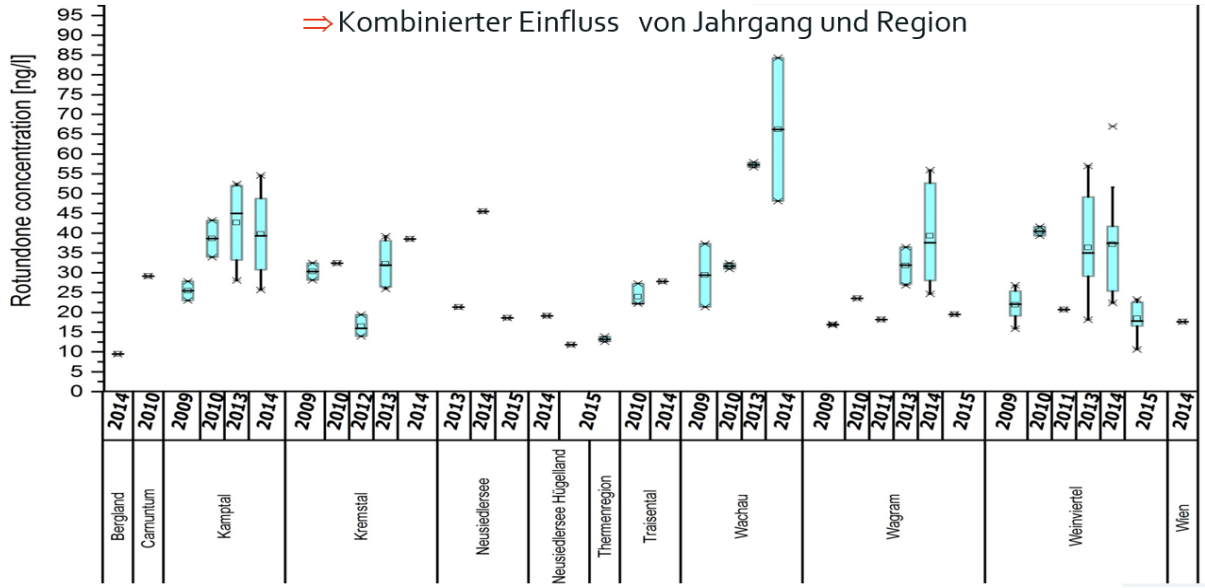


*Abbildung 24*: Kombinierter Einfluss von Jahrgang und Region.

Die Daten basieren auf der Tatsache, dass die gefundene Rotundonkonzentration im Grünen Veltliner deutlich über dem Schwellenwert lag und dass der berechnete Geruchsschwellenwert (OAV) je nach herangezogenen Durchschnittsgehalt zwischen 2 und 3 liegt. Es ist anzunehmen, dass Rotundon das Pfefferaroma dieser wichtigen Sorte verursacht, da der Schwellenwert bei Weißweinen normalerweise ähnlich oder niedriger als bei Rotweinen ist. Nur wenige Proben liegen unter diesem angegebenen Schwellenwert von 16 ng/l bzw. 8 ng/l für Wasser.

Gravierende Unterschiede zwischen der Arbeit von Mattivi et al. (2011) und der ersten Publikation waren, dass für die Analyse eine GC-MS/MS und ein deuterierter Rotundonstandard benutzt wurden, auch wenn unbestritten durch eine GC-MS-MS eine höhere Selektivität als bei GC-MS zu erreichen wäre. Dies kann erklären, warum durchschnittlich 53 ng/l und bei einer Probe sogar 264 ng/l gefunden wurden. Besonders dieser von Mattivi et al. 2011 gefundene Rotundonspitzenwert in einem Grünen Veltliner mit über 264 ng/l Rotundon sticht besonders hervor. Solche Werte sind teilweise nicht einmal für Rotweinsorten, wie beispielsweise Shiraz, zu erwarten. Eine GC-MS/MS ist unbestritten präziser und selektiver, aber nicht ausschlaggebend, um diese Tatsache zu erklären. In der hier vorgelegten Publikation mit über 100 analysierten Grüner Veltliner Proben waren Werte von über 80 ng/l bereits eine Besonderheit. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete SPE-SPME-GC-MS-Methode kann damit verteidigt werden, dass die erste genutzte Methode zur quantitativen Messung des Rotundon ebenfalls auf diesem Prinzip basierte. Denn die Forscher und Forscherinnen rund um Siebert

(2008) des AWRI setzten auf eine SPE-SPME-GC-MS-Methode und erachteten diese Form der instrumentellen Technik als ausreichend zur Quantifizierung dieses Sequiterpenes. Die in der Literatur vorgeschlagene Methodik basiert auf einer SPE, gefolgt von einer SPME-GC-MS-Strategie (Caputi et al., 2011; Geffroy et al., 2014; Mattivi et al., 2011; Siebert et al., 2008) und verwendet eine stabile Isotopenverdünnungsanalyse mit d5-Rotundon als internen Standard. Diese Methoden ergaben eine Nachweisgrenze unterhalb der sensorischen Schwelle von Rotundon in Wasser (8 ng/l) (Wood et al., 2008). Die Kritik von Culleré et al. (2016) daran ist, dass diese eine Vielzahl von Schritten umfasste, was die Analyse sehr umfangreich machte. Dieser Vorwurf von Culleré et al. (2016), dass die gewählte Vorgangsweise der Anreicherung und Isolierung zeitaufwendig ist, trifft zweifelsohne zu. Der Aufwand der Analyse für die Analyse der 107 bis 108 Proben plus Klone betrug mehrere hundert Arbeitsstunden. Mit ausreichend budgetären Mitteln und Instrumenten (PTV, Kaltaufgabesystem, Large Volume, MASE, Twister) wäre eine SIDA-Analyse (Stabilisotopenverdünnungsanalyse = engl. Stable isotope dilution assay) anstrebenswert. Dabei handelt es sich um eine ähnliche Methodik wie von Culleré et al. (2016). Dieser Zeitgewinn erhöht zum einen den Probendurchsatz sowie den Informationsgewinn.

Die große Bandbreite von 10 bis 85 ng/l bei den analysierten Rotundongehalten in der ersten Publikation kommt vorrangig durch äußere saisonal bedingte klimatische Witterungsbedingungen und sehr wahrscheinlich durch unterschiedliche Erntezeitpunkte und regionale Lagen zustande. Dieses Phänomen konnte im Rahmen einer Schülerdiplomarbeit an der HBLA Klosterneuburg beobachtet werden.

Für einen Konferenzbeitrag bei der OIV (2016) wurden für den österreichischen Rebsortenexperten Regner auch 26 verschiedene Grüner Veltliner Klone analysiert. Der Unterschied der verschiedensten Grüner Veltliner Klone hinsichtlich Rotundongehalt ist zwar gegeben, wenn auch nicht sehr gravierend. Durch die Analyse der Grüner Veltliner Klone konnte trotzdem ein Beitrag zur Aufklärung geleistet werden, welche Klone bzw. Chromosomen beim Rotundongehalt mitentscheidend sind. Der analysierte Rotundongehalt der Grüner Veltliner Referenzprobe lag bei ca. 35 ng/l, während der Seyval Blanc nur die Hälfte dieses Wertes erreichen konnte. Keiner der Sämlinge zeigte höhere Konzentrationen von Rotundonen als der Grüne Veltliner. Nur ein Nachkomme der Population von 1929 konnte einen ähnlichen Wert wie der Grüne Veltliner erreichen. Regner et al. (2016) begründet die Unterschiede bei den Grünen

Veltliner Klonen wie folgt: Die durchgeführte Segregationsanalyse von Weinen aus dem Jahr 1929 zeigt eine Korrelation hauptsächlich mit Chromosom 5. Laut Battilana (2011) ist dies nicht überraschend, da das Chromosom 5 als jene Stelle im Genom identifiziert wurde, an der die Terpene codiert sind. Durch die Analyse der Grüner Veltliner Klone für Regner konnte festgestellt werden, dass das Seyval Blanc Chromosom 9 signifikant mit der Rotundonkonzentration verbunden ist. Regner et al. (2016) stellte fest, dass der Beitrag für Rotundon aus einem konstanten Teil von Grüner Veltliner Chromosom 5 und einem segregierenden Teil von Seyval Blanc Chromosom 9 besteht. Rotundonkonzentrationen unterhalb des Seyval-Gehalts könnten durch die Segregation von zwei Allelen mit unterschiedlicher Rotundonbildung erklärt werden.

Obwohl Klone in einem gewissen Maß zu dem Rotundongehalt beitragen können, kann dies trotzdem nicht erklären, warum ein von Mattivi et al. (2011) gemessener Grüner Veltliner bei über 264 ng/l den 8-fachen Unterschied zu anderen analysierten Grünen Veltliner Proben hatte. Denn diese Werte erreichen teilweise nicht einmal maischevergorene Rotweine.

### 1.4.2 Publikation II: Untersuchungen über den Einfluss von kellertechnischen Maßnahmen auf den Rotundongehalt in Weinen der Sorte Grüner Veltliner

Önologische Arbeiten, die sich mit Rotundon beschäftigten, waren zu dem Zeitpunkt der praktischen Versuchsrealisierung 2011 und 2012 noch kaum vorhanden. Die bis dato veröffentlichen Arbeiten über önologische Effekte auf die Rotundonkonzentration existierten ausschließlich für Rotweine wie Duras (Geffroy et al., 2017) und Pelaverga di Verduno (Petrozziello et al., 2021). Es lagen damals keine Erkenntnisse auf die Rotundonkonzentration im Weißweinbereich vor.

Die zweite Publikation dieser Arbeit im Bereich Rotundon und Weißwein und die technologischen Effekte können als Vorlage für spätere Versuche herangezogen werden. Die im Rahmen der Weißweinbereitung am häufigsten genutzten, etablierten und gängigsten kellerwirtschaftlichen Maßnahmen wie Maischestandzeit, Gärtemperatur, Maischeschwefelung, Jungweinschwefelung, Hefenährsalz und Mostklärung wurden als Einflussfaktoren für 2-stufige faktorielle Versuchspläne herangezogen und im 30-Liter-Maßstab realisiert, um zu eruieren, ob diese einen positiven oder negativen Beitrag zum Rotundongehalt im Grünen Veltliner leisten. Mit drei voneinander getrennten, 2-stufig faktoriellen Versuchsplänen sowie mit dem vom gleichen Standort geernteten Traubenmaterial und mit einer relativ niedrigen Versuchsanzahl von nur 28 war es somit möglich, einen hohen Informationsgehalt zu generieren sowie positive und negative Haupteffekte sowie eine Wechselwirkung festzustellen. Die Versuche wurden außerdem in zwei aufeinanderfolgenden Erntejahren (2010, 2011) durchgeführt, um Zufälligkeiten großteils auszuschließen und damit eine gute Aussagekraft zu gewährleisten.

Das Datenmaterial für getestete Einflussfaktoren (Maischestandzeit, Gärtemperatur, Maischeschwefelung, Jungweinschwefelung, Hefenährsalz, Mostklärung) auf den Rotundongehalt im Rahmen der zweiten Publikation stammt aus 46 Versuchsdurchläufen. Durch Nutzung eines bewährten Auswertungsprogramms für statistische Versuchsplanung wie Minitab® wurde aus den analysierten Rotundongehalten der Versuchsweine dieser 46 Versuchsdurchläufe (28 pro Versuchsjahr) neben einer ANOVA auch Effektdiagramme Pareto, Haupteffekt, Wechselwirkungs-, Wahrscheinlichkeitsnetz für jeden Versuchsplan A, B und C generiert. Bei der Betrachtung der Resultate der Varianzanalyse des Versuchsplans A des Versuchsjahrs 2011 fällt auf, dass die Effekte für den Rotundongehalt statistisch signifikant ($\alpha = 0{,}05$), für

den Faktor Gärtemperatur (p = 0,024) bzw. für den Faktor Standzeit (p-Wert = 0,014) sind. Die Wechselwirkung beider Faktorenen (p-Wert = 0,143) ist nicht signifikant. Für das Versuchsjahr 2012 sind diese Effekte statistisch nicht signifikant (Gärtemperatur p-Wert = 0,876; Standzeit p-Wert = 0,393; Gärtemperatur/Standzeit p-Wert = 0,889).

Bei Versuchsplan A im Versuchsjahr 2011 lässt sich aus dem Paretodiagramm folgende Reihenfolge und Bedeutung der Einflussfaktoren feststellen: Standzeit, gefolgt von Gärtemperatur, zum Schluss die Wechselwirkung aus Gärtemperatur und Standzeit. Die Referenzlinie für die statische Signifikanz überschreiten nur Standzeit und Gärtemperatur. Die Wechselwirkung aus Standzeit und Gärtemperatur erreicht die Referenzlinie für statische Signifikanz nicht. Für das Versuchsjahr 2012 liefert das Paretodiagramm folgende Effektreihenfolge: Standzeit, Wechselwirkung, Wechselwirkung Gärtemperatur/Standzeit und zum Schluss Gärtemperatur. Hinsichtlich statistischer Signifikanz zeigt sich, dass somit keiner der Einflussfaktoren die Referenzlinie übertrifft. Mittels Wahrscheinlichkeitsnetz (Normal) für Effekte kann für Versuchsvariante A abgeleitet werden, dass Standzeit und Gärtemperatur im Versuchsjahr 2011 signifikant, hingegen 2012 nicht signifikant sind. Zusätzlich lässt sich daraus ableiten, dass sich die Gärtemperatur offenbar positiv, die Standzeit hingegen negativ auf den Rotundongehalt auswirkt. Dieser Trend ist sowohl für das Jahr 2011 und 2012 erkennbar.

Aus dem Haupteffektdiagramm gehen weitere Erkenntnisse für 2011 bzw. 2012 hervor. Bei einer Gärtemperatur von 23° C sind die Rotundongehalte am höchsten (MW = 11,8 ng/l), bei einer Gärtemperatur von 15° C am niedrigsten (MW = 9,4 ng/l). Eine kurze Standzeit (0 h) bewirkt höhere Rotundongehalte (= 11,9 ng/l) im Gegensatz zu einer langen Maischestandzeit (6 h => 9,2 ng/l). Sowohl 2011 als auch 2012 zeigte sich dieser Zusammenhang.

Die Aussagen des Versuchplan A der Jahre 2011 bzw. 2012 (keine Standzeit bzw. höhere Gärtemperatur) deckten sich mit Erkenntnissen australischer, französischer und italienischer Arbeiten (Geffroy et. al, 2014; Caputi et al., 2011; Zhang et. al, 2017). Caputi et al. (2011) die vertreten einerseits die These, dass die ausschließliche Anreicherung des Rotundon im Beerenexokarp stattfindet, was darauf hindeuten würde, dass ein längerer Schalenkontakt während der Weinbereitung den pfeffrigen Charakter von Rotwein auch modulieren würde. Allerdings stellte Caputi dann fest, dass die Rotundonausbeute nach dem Weinbereitungsprozess sehr gering war. Tatsächlich wurden nur 10 % des in den Trauben enthalten Rotundons

während der Gärung extrahiert und sogar nur 6 % fanden sich später in Flaschenweinen wieder.

Eine längere Maischestandzeit vor der Gärung ist deshalb nachteilig, weil durch die Hydrophobizität des Moleküls vermutlich in einer leicht wässrigen Umgebung kein Auslegungseffekt auftreten wird, sondern eher ein Abbinden des schalenlokalisierten Rotundons an feste Bestandteile stattfindet. Dies bestätigen auch die Wechselwirkungsdiagramme, die zeigen, dass hohe Gärtemperaturen und kurze Standzeiten förderlich für höhere Rotundongehalte sind. Sowohl Reynolds et al. (2001) als auch Masneuf-Pomarède et al. (2006) bestätigen indirekt den positiv linearen Zusammenhang von höherer Gärtemperatur und höheren Rotundongehalten, wonach eine Temperatursteigerung bei der Gärung einen Anstieg an 4-Mercapto-4-methylpentan-2-on (4 MMP, schalenlolalikiserter Inhaltsstoff, für tropische Aromen) bewirkt. Auch die bereits von Marais (1983) erwähnten gesteigerten Terpengehalte bei höheren Mazerationstemperaturen könnten bereits als indirektes Indiz für einen (Temperatur-)Effekt auf Rotundon verstanden werden.

Der Versuchsplan B fokussierte sich im Unterschied zu Versuchsplan A (Maischestandzeit und Fermenationstemperatur) ausschließlich auf die Wirkung des $SO_2$ auf die Maische bzw. den Jungwein. So zeigte sich bei Betrachtung der Resultate der Varianzanalyse des Versuchsplan B des Versuchsjahrs (2011) für den Einflussfaktor Maischeschwefelung bzw. für den Einflussfaktor Dosis der Jungweinschwefelung, dass der Parameter Maischeschwefelung (p-Wert = 0,045) für den Rotundongehalt statistisch signifikant ist ($\alpha = 0,05$). Auf die Jungweinschwefelung (p-Wert = 0,282) trifft dies hingegen nicht zu. Die Wechselwirkung beider Faktoren (p-Wert = 0,556) ist nicht signifikant. Für das Versuchsjahr 2012 sind diese Effekte nicht signifikant. Bei Variante B im Versuchsjahr 2011 lässt sich aus dem Paretodiagramm folgende Reihenfolge und Bedeutung der Einflussfaktoren feststellen: Maischeschwefelung, gefolgt von Jungweinschwefelung und zum Schluss die Wechselwirkung aus Maischeschwefelung und Jungweinschwefelung. Die Referenzlinie für die statistische Signifikanz erreicht nur der Parameter Maischeschwefelung. Die Jungweinschwefelung und die Wechselwirkung aus Maischeschwefelung und Jungweinschwefelung erreicht die Referenzlinie für statistische Signifikanz nicht. Für das Versuchsjahr 2012 liefert das Paretodiagramm folgende Effektreihenfolge: Maischeschwefelung, Wechselwirkung Maischeschwefelung/Jungweinschwefelung und zum Schluss Jungweinschwefelung. Hinsichtlich statistischer Signifikanz muss hier festgehalten

werden, dass keiner der Einflussfaktoren die Referenzlinie übertrifft. Mittels Wahrscheinlichkeitsnetz (Normal) für Effekte kann für Variante B abgeleitet werden, dass Maischeschwefelung und Jungweinschwefelung in den Versuchsjahren 2011 und 2012 nicht signifikant waren. Zusätzlich lässt sich für 2011 ableiten, dass sich Maischeschwefelung, Jungweinschwefelung bzw. eine Kombination der beiden negativ auf den Rotundongehalt auswirken. Für Jahrgang 2012 lässt sich ableiten, dass sich diese Parameter (Maischeschwefelung, Jungweinschwefelung bzw. eine Kombination der beiden) offenbar positiv auf den Rotundongehalt auswirken. Aus dem Haupteffektdiagramm wird für 2011 ersichtlich, dass nicht geschwefelte Maische (0 mg/l) bzw. niedrige Jungweinschwefelung (40 mg/l) offenbar zu höheren Rotundongehalten (9,4 ng/l bzw. 8,8 ng/l) führt als Maischeschwefelung bei 60 mg/l bzw. Jungweinschwefelung bei 80 mg/l (6,9 ng/l bzw. 7,4 ng/l). Das generierte Haupteffektdiagramm für Versuchsplan B von 2012 hingegen zeigte auf den ersten Blick offenbar den gegenteiligen Effekt. Auch die Minitab® Wechselwirkungsdiagramme für 2011 bzw. 2012 scheinen dieses Phänomen für die beiden Versuchsjahre zu untermauern. Doch die teilweise geringen Rotundongehaltsunterschiede zwischen einigen Varianten 2012 könnten auch zu diesem Ergebnis führen.

Der Grund, den Effekt der Schwefelung von Maische und Jungwein auf den Rotundongehalt näher zu betrachten, lässt sich auf die folgenden zwei existierenden Arbeiten (Daniel et al., 2004; Azevedo et al., 2007) zurückführen. Es konnte nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden, dass die Carbonylfunktion von Rotundon mit dem in der Maische vorhandenen freien $SO_2$ reagieren könnte. Eine $SO_2$-bindende Carbonylverbindung könnte folglich zu einer Abnahme des freien Sesquiterpens führen, ähnlich wie bei Norisoprenoiden β-Damascenon in einem Modellwein laut einer Arbeit von Daniel et al. (2004). Es gibt Feststellungen von Azevdo et al. (2007), wonach Carbonylverbindungen mit Bisulfit stabile sogenannte Hydroxyalkylsulfonsäuren bilden.

Vor den Versuchen war vorstellbar und nicht auszuschließen, dass Rotundon, bedingt durch die Ketogruppe und durch zu viel $SO_2$-Zugabe, in einer möglichen Rotundonreduktion resultieren könnte. Wobei aufgrund der von Azevedo et al. (2007) erwähnten Tatsache, dass aliphatische Verbindungen wie Formaldehyd und Acetaldehyd bevorzugt und rascher Verbindungen mit Bisulfit eingehen als Verbindungen wie Rotundon mit cyclischer Struktur. In der Chemie erklärt die sterische Hinderung diesen Effekt. Außerdem erwähnten dies auch Daniel et al. (2004) in ihrer Arbeit, dass aufgrund der Vielzahl an vorliegenden Carbonylverbindungen

im Wein es eher als unwahrscheinlich anzusehen ist, dass die Schwefelungen und ihre Dosierungen einen Effekt auf die endgültige Rotundonkonzentration zeigen.

Bedingt durch die relativ niedrige Rotundonkonzentration und die hohen Konzentrationen vieler anderer im Wein natürlich vorkommender Carbonylverbindungen, ist die Reaktion mit $SO_2$ unwahrscheinlich.

Der aus Literatur (Azevedo et al., 2007) bekannte Zusammenhang zwischen Bisulfit und Carbonylverbindungen (Rotundon enthält Ketogruppe) stellte fest, dass stabile Addukte, Hydroxyalkylsulfonsäuren entstehen können. Aliphatische Aldehyde werden im Unterschied zu Ketonen bevorzugt. Nur mit dieser These des Abbindens lassen sich die höheren Rotundongehalte von 2011 der nicht geschwefelten Maische bzw. der niedrigen Jungweinschwefelung (40 mg/l) nicht zu hundert Prozent erklären. Diese These kann nicht zum Interpretieren der Ergebnisse des Jahrgangs 2012 herangezogen werden, weil teilweise zu geringe Rotundongehaltsunterschiede zwischen einigen Varianten durch Schwankungen zu diesem Ergebnis führen könnten. Petrozziello et al. (2021) stellten hierzu fest, dass unterschiedliche Dosierungen von Schwefeldioxid der Weine keinen Einfluss auf diese Verbindung haben sollten, weil Rotundon aufgrund seiner Struktur nicht der bevorzugte Bindungspartner des $SO_2$ ist.

Bei der Betrachtung der Resultate der Varianzanalyse des Versuchsplans C des Versuchsjahrs 2011 wird für den Einflussfaktor Mostklärung bzw. für den Einflussfaktor Hefenährsalzzugabe ersichtlich, dass die Effekte Mostklärung/Hefenährsalzzugabe für den Rotundongehalt statistisch nicht signifikant sind ($\alpha = 0{,}05$). Die Wechselwirkung beider Faktoren ist nicht signifikant. Für das Jahr 2012 wirkt sich die Mostklärung signifikant auf den Rotundongehalt aus, die Hefenährsalzzugabe jedoch nicht.

Bei Versuchsplan C im Versuchsjahr 2011 lässt sich aus dem Paretodiagramm folgende Reihenfolge und Bedeutung der Einflussfaktoren feststellen: Mostklärung, gefolgt von Hefenährsalzzugabe zum Schluss die Wechselwirkung aus Mostklärung und Hefenährsalzzugabe. Die Referenzlinie für die statistische Signifikanz erreicht keiner dieser Effekte. Fürs Versuchsjahr 2012 liefert das Paretodiagramm folgende Effektreihenfolge: Mostklärung, Wechselwirkung Mostklärung/Hefenährsalzzugabe und zum Schluss Hefenährsalzzugabe. Hinsichtlich statistischer Signifikanz muss hier festgehalten werden, dass nur der Einflussfaktor Mostklärung die Referenzlinie knapp erreicht. Mittels Wahrscheinlichkeitsnetz (Normal) für Effekte kann für

Variante C abgeleitet werden, dass Mostklärung, Hefenährsalzzugabe und die Wechselwirkung der beiden im Versuchsjahr 2011 nicht signifikant sind. Hingegen ist im Jahr 2012 nur die Auswirkung der Mostklärung signifikant. Zusätzlich lässt sich aus dem Wahrscheinlichkeitsdiagramm für 2011 ableiten, dass sich die Mostklärung und die Wechselwirkung aus Mostklärung und Hefenährsalz offenbar positiv, das Hefenährsalz, hingegen negativ auf den Rotundongehalt auswirken. Aus dem Normal-Plot von 2012 lässt sich ableiten, dass sich sowohl Mostklärung, Hefenährsalz und die Wechselwirkung der beiden offenbar negativ auf Rotundon auswirken.

Aus einem generierten Haupteffektdiagramm für 2011 wird ersichtlich, dass Mostklärung bzw. fehlende Hefenährsalzzugabe zu höheren Rotundongehalten führt als bei Mosten ohne Klärung bzw. Hefenährsalzzugabe. Die teilweise geringen Rotundongehaltsunterschiede zwischen einigen Varianten könnten auch zu diesem Ergebnis führen. Das Haupteffektdiagramm von 2012 hingegen zeigt teilweise genau das Gegenteil. Auch die Wechselwirkungsdiagramme verdeutlichen offenbar diesen Zusammenhang bzgl. der Anwendung der Mostklärung und des Einsatzes der Hefenährsalzzugabe für 2011 bzw. 2012. Die Ergebnisse könnten einerseits darauf zurückzuführen sein, ob das hydrophobe Rotundon sich an Schalenbestandteile bindet und so im gärenden Wein verbleibt, abhängig von den Mostvorklärungstypen oder andererseits erklärbar durch die teilweise geringen Rotundongehaltsunterschiede zwischen einigen Varianten 2011 und somit zu diesem Ergebnis führen könnten.

Die Beeinflussung von Rotundon als Exocarp lokalisierter Inhaltsstoff durch Maßnahmen wie längere Maischestandzeit wäre naheliegend. Rotundon reichert sich fast ausschließlich in Beerenexokarp an, was darauf hindeutet, dass der Hautkontakt während der Weinbereitung ein technologischer Hebel ist, um Rotundon – also den pfeffrigen Charakter von Wein – zu modieren. Es existiert eine italienische Arbeit von Caputi et al. (2011), welche die These vertreten, dass die ausschließliche Anreicherung des Rotundon im Beerenexokarp erfolgt, was darauf hindeuten würde, dass ein längerer Hautkontakt während der Weinbereitung den pfeffrigen Charakter von Rotwein moduliert. Weiters untersuchten Geffroy et al. (2017) mit Versuchen im 2-Liter-Maßstab den Einfluss von Fermentationsvariablen (Zeit und Temperatur der Mazeration, Hefespezies, Zugabe von pektolytischen Enzymen) und Weinbereitungstechniken (Cold Soak, Thermovinifizierung, Kohlensäuremazeration und Roséweinbereitung) auf Rotundon, bei Rotwein Duras untersucht von Geffroy et al. (2017) im Labormaßstab. Geffroy

et al. (2017) stellten fest, dass der längere Hautkontakt während der Mazeration nach der Fermentation zu einer signifikanten Abnahme der Rotundonkonzentration um ca. 20 % im Wein führte, was auf die praktischen Möglichkeiten zur Reduzierung des Pfefferaromas im Wein hindeutet.

Allerdings stellten bereits Caputi et al. (2011) fest, dass die Rotundonausbeute nach dem Weinbereitungsprozess relativ klein war. Tatsächlich wurden nur 10 % des in den Trauben enthalten Rotundons während der Gärung extrahiert und nur 6 % in Flaschenweinen. Diese Feststellung wurde teilweise auch durch den Dissertanten betreute Schülerdiplomarbeiten Greil und Pröll 2018 festgestellt, und zwar für die Weißweinsorte Grüner Veltliner. Sowohl Maischestandzeit als auch Mostklärung sind aufgrund des hydrophoben und abbindenden Charakters des Rotundon als kritisch zu sehen. Als Winzer möchte man eine maximale Ausbeute eines qualitätsbestimmenden Inhaltsstoffes wie Rotundon forcieren, und eine längere Maischstandzeit würde keine Zunahme erreichen, sondern einen Verlust, also eine Abnahme des Rotundongehalt bedeuten. Bei einer Schlüsselverbindung wie Rotundon im unteren ng/l-Bereich kann dies in einem heißen, trockenen Jahr sensorisch in die Bedeutungslosigkeit führen.

## 1.5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die mit Abstand wichtigste Rebsorte für den österreichischen Weinbau ist der Grüne Veltliner (Regner et al., 2020). Die massive Abhängigkeit von dieser Rebsorte in Österreich und besonders einer ganzen Weinbauregion wie dem Weinviertel zeigt sich bei Betrachtung des wirtschaftlichen Absatzes. Rund 25 % des Umsatzes gehen allein auf den Grünen Veltliner zurück. Neben der flächenmäßigen Dominanz ist auch die Vermarktung auf diese Rebsorte ausgerichtet und im Speziellen auf deren sensorische Besonderheiten wie die der pfeffrigen Typizität. Trotz des unbestrittenen Beitrags zum Erfolg der österreichischen Weinwirtschaft bereitet gerade diese Rebsorte in Anbetracht des Klimawandel Sorge. Dass der Klimawandel zu immer heißeren und trockenen Jahren führt, ist unbestritten. Der beobachtete Trend aus der ersten Publikation zeigt, dass gerade trockene und warme Jahrgänge im Vergleich zu kühleren und feuchteren Jahrgängen das Vorkommen des Rotundon in Weinen reduzieren. Die Rotundongehalte von sieben analysierten Jahrgängen (2009 bis 2015) bewegten sich zwischen 8 ng und 85 ng/l. Saisonalität und Regionalität sind maßgeblich für diese Konzentrationsbandbreite.

Denn gerade durch die bekannte Empfindlichkeit des Grünen Veltliners gegenüber Trockenheit könnte das Szenario eintreten, dass Rotundongehalte unter die sensorisch relevante Geruchswahrungsschwelle absinken könnten oder sogar komplett verschwinden. Zwischenergebnisse aus einer betreuten Schülerdiplomarbeit Rieder 2018/2019 legen diese Tatsache nahe und werfen die Frage auf: Verschwindet durch das Rotundon ein wesentlicher Beitrag zum typischen „Pfefferl“ in Österreichs Hauptweinsorte?

Ziel dieser Arbeit war es, Ideen, Anregungen aus dieser Arbeit bzw. auch aus der Literatur zusammenfassend aufzugreifen und kombiniert zu erörtern: Welche zukünftige Maßnahmen und gezielte Strategien könnten ergriffen werden, um das Sequiterpen Rotundon und somit seinen Beitrag zur typischen pfeffrigen Note – also das legendäre bekannte „Pfefferl“ im Grünen Veltliner – für zukünftige Generationen zu erhalten.

Ein möglicher Schlüssel zur Erhöhung und Stabilisierung des Rotundon liegt in weinbaulichen Strategien: Erntezeitpunkt und -datum, Bewässerung in Kombination mit PES, Entlaubung und selektive Ernte sind gezielte einsetzbare Hebel, Rotundonwerte in Weinen zu manipulieren. Dies sind Erkenntnisse aus den Arbeiten von Geffroy et al. (2016).

Kühle und speziell feuchte Bedingungen fördern die Akkumulation. Ersichtlich wird dies in einer durch den Dissertanten betreuten Schülerdiplomarbeit Rieder, durchgeführt an der HBLA Klosterneuburg im Jahr 2018/2019. Ohne den Einsatz von modernen Bewässerungssystemen wie in Teilen der Wachau wird es eine fast unmögliche Herausforderung werden, Rotundon auch in extrem heißen und trockenen Jahrgängen wie 2018 zu erhalten.

Doch bedingt durch über 14.000 ha Grüner Veltliner bestockte Fläche und deren geografischen Gegebenheiten müssen neben einer modernen und nachhaltigen Bewässerungsstrategie auch noch andere weinbauliche und kellerwirtschaftliche Maßnahmenstrategien ins Auge gefasst werden, um die Bildung und somit die Erhaltung von Rotundon langfristig zu fördern.

Vom Stichwort Erntezeitpunkt ist immer wieder in Zusammenhang mit Rotundon die Rede. Deshalb muss über die Zulassungen und den vermehrten Einsatz von Pflanzenhormonen nachgedacht werden, wie eine australische Arbeit (Davies et al., 2015) nahelegt. So konnte durch die Behandlung bei Shiraz vor der Saison mittels Einsatz von Pflanzenhormonen (1-Naphthalinessigsäure [NAA]) oder 2-Chlorethylphosphorsäure (Ethrel) der Beginn der Reifung und Ernte verzögert werden. Durch die Verzögerung des Reifebeginns konnte damit eine gezielte Förderung von Rotundon erzielt werden. Das Pflanzenhormonen 1-Naphthalinessigsäure NAA war wirksamer als Ethrel und die Ernte konnte um 23 Tage im Vergleich zu sechs Tagen bei Ethrel verzögert werden.

Auch eine Verschiebung des Reife- und Erntefensters in eine kühlere und feuchtere Witterungsperiode wäre für den Grünen Veltliner eine denkbare Option bzw. Möglichkeit, um das Rotundon zu stabilisieren oder gezielt zu erhöhen. Daher könnte eine Behandlung von Trauben mit NAA 1-Naphthalinessigsäure und in geringerem Maße mit Ethrel während der Vorperiode die Reifung verzögern und die Rotundonkonzentration in Grüner Veltliner Trauben erhöhen, wodurch das Rotundonvorkommen und die Pfeffer-Typizität des Weins verbessert werden.

Neben dem Erntezeitpunkt sollten gezielte Grüner Veltliner Klone bei zukünftigen Neuauspflanzungen ausgewählt werden. In Bezug auf die Genotypsorte ist der Klon ein kleiner, aber ebenfalls zu berücksichtigender Hebel. So wurde bei Duras, Syrah und beim Grünen Veltliner eine klonale Variation hinsichtlich der Rotundonkonzentration belegt. Auch wenn der Effekt bedingt durch gezielte Klonauswahl im unteren 10 ng/l liegt, so zählt bei Rotundon jedes ng hinsichtlich der Pfeffrigkeit im Wein. Gezielte Klonauswahl beim Grünen Veltliner könnte also

auch einen kleinen unterstützenden Beitrag für dessen langfristige Erhaltung darstellen. Die Genschere CRISPR könnte den Rebzüchtern einen weiteren Weg in das Genom des Grüner Veltliners bieten, um die Rotundonproduktion zu forcieren.

Die Studie des Amerikaners Harner et al. (2019) thematisierte die Entwicklung eines Vorhersagemodells. Es zeigte sich, welche klimatischen und weinbaulichen Faktoren zusammen den stärksten Einfluss auf die Rotundonkonzentration in Noiret (Vitis sp.) Trauben bei der Ernte haben. Unter Verwendung eines 2-Jahres-Datensatzes (2015 und 2016) konnten Harner und seine Kollegen ein Modell mit vier Variablen entwickeln, das mehr als 80 % der Variation der Rotundonkonzentration bei der Ernte erklärte. Das Modell umfasste das Wetter (Tage mit ansteigender Temperatur während der Fruchtreife [GDDv]) und pflanzenbezogene Variablen (Konzentrationen von Phosphor und Kalzium im Blattstiel und Erntemenge). Das von Harner (2019) entwickelte Modell könnte von Weinproduzenten verwendet werden, um Standorte oder kulturelle Praktiken zu identifizieren, die eine Rotundonanreicherung in Noiret-Trauben begünstigen, nachdem eine Modellvalidierung mit einem zusätzlichen externen Datensatz durchgeführt wurde. Das Vorhersagemodell von Harner (2019) war auf die Anwendung durch den Erzeuger bzw. die Erzeugerin zugeschnitten und umfasste leicht messbare Variablen: Fruchtreife GDDv-, Ca- und P-Petiolarkonzentrationen bei Véraison (Beerenreife) und Erntemenge. Obwohl eine Modellvalidierung erforderlich ist, um die Vorhersagekraft des Modells zu verifizieren, legen die starken Korrelationen zwischen einigen der Regressorvariablen (z. B. GDDv und CSEv) und der Rotundonkonzentration nahe, dass die generierten Daten von Noiret-Züchtern verwendet werden könnten, um Standorte zu identifizieren, die für die optimale Rotundonproduktion geeignet sind.

Wenn diese Studie von Harner et al. (2019) eine Gültigkeit zeigt, dann könnten diese Ergebenisse für weitere Weine neben dem Grünen Veltliner Produzenten realisiert werden. Die Stichwörter gerade in Zeiten des Klimawandels dürften neben der Bewässerung, bestimmte Grüner Veltliner Klone, das Erschließen neuer Weinbaugebiete sowie neuer Produktionsgebiete sein, auch wenn es einerseits aufgrund der historisch gewachsenen Weinbaugebiete und der Gesetzgebung sehr radikal und drastisch erscheinen mag. Der Klimawandel dünnt gerade massiv durch extreme Wetterereignisse (Föhnwinde) bzw. durch den gesteigerten Befall mit Borkenkäfern die Waldbestände im Waldviertel aus bzw. verschiebt die Waldgrenze

nach oben. Auch wenn das Bundesland Niederösterreich unumstrittenes Heimatland des Grünen Veltliners ist, könnten andere Bundesländer wie Oberösterreich, Salzburg oder Tirol zwangsläufig in Jahrzehnten zu Weinanbaugebieten werden. Es sollte in den nächsten Jahren durch wissenschaftlich begleitete Versuchspflanzungen mit Grünem Veltliner in Kombination mit Modellrechnungen abgeklärt werden, ob andere Gebiete für die Produktion von Grüner Veltliner Weinen überhaupt geeignet erscheinen. Auch wenn es für den Moment undenkbar erscheint, wird früher oder später der Zeitpunkt kommen, wo die negativen Auswirkungen gerade in aromatischer Hinsicht für Weißweine und speziell für den dominierenden Grünen Veltliner in Erscheinung treten.

Das Erschließen von klimatisch kühleren und feuchteren Gebieten wird, wenn der Klimawandel mit diesem Tempo fortschreitet, zwangsläufig erforderlich werden, um die typische Pfeffrigkeit – mitverursacht von Rotundon – im Grünen Veltliner zu erhalten. Anhand der ersten Publikation über das Vorkommen und die Verteilung von Rotundongehalte im Grünen Veltliner werden neben den saisonalen auch regionale Effekte ersichtlich. Entsprechendes Mikroklima könnte ein entscheidender Faktor für den Erhalt des Rotundon sein.

Kühlere und feuchtere Reifebedingungen der Trauben begünstigen die Synthese von Rotundon in Grüner Veltliner Trauben. Diese Faktoren (saisonale Bedingungen, Temperatur) können das Ausmaß hinsichtlich der beobachteten ortsspezifischen Unterschiede in der Rotundonkonzentration ausschließlich nicht erklären. Daher müssen zukünftige Projekte der Forschung darauf abzielen, genetische und/oder Umweltfaktoren zu identifizieren, die allein oder in Kombination die Traubenzusammensetzung und den Weingeschmack im Grünen Veltliner beeinflussen können.

Aufbauend auf bisherigen Forschungen sollten dafür

- gezielte Rotundon- und α-Guaiene-Karten für Grüne Veltliner Weinberge in der Wachau, Weinviertel, Kremstal, Kamptal und Wagram erstellt werden und eine Charakterisierung der Rebleistung bzw. des Alters des Weingartens und des Effekts des Bodentyps erfolgen.
- Des Weiteren sollten unter Verwendung von wechselseitigen Knospentransplantaten und Topfreben in Gewächshäusern die Untersuchung und Bestimmung möglicher genetischer Determinanten für die Rotundonkonzentration angestrebt werden.

- Neben dem in dieser Arbeit untersuchten sensorisch relevanten Rotundon ist der Beitrag anderer Sesquiterpene zum Weinaromaprofil möglicherweise wichtiger und erfordert unbedingt weitere Untersuchungen. Die Suche sollte dabei gezielt auf Schlüsselaromastoffe im Grünen Veltliner Wein aus Terroirs (Anbaugebieten) mit kühlem Klima erweitert werden. Derzeit gibt es eine sehr begrenzte Forschung zur Sesquiterpenproduktion in Trauben wie eben dem Grünen Veltliner. So zeigt eine an der Universität für Bodenkultur Wien durchgeführte Diplomarbeit von Dimming (2015) das Vorhandensein von sieben Sesquiterpenen bei verschiedenen Grüner Veltliner Klone. Bei den sieben Sequiterpenen handelt es sich um γ-Cadinen, δ-Cadinen, α-Muurolen/Germacren D, Ylangen, Valencen, (+)-Aromadendren, β-Caryophyllen, β-Cyclocitral, Geranylaceton, Linalool und R(+)-Limonen. Sie wurden später aber nicht im Wein gefunden. Doch für ein umfassendes Verständnis der Sesquiterpene in Trauben und Weinen sollte unbedingt durch weitere Studien mit Untersuchungen begonnen und diese vorangetrieben werden. Neben der Identifizierung neuartiger Sesquiterpene soll der Einfluss der Weinherstellung auf die Extraktion von Sesquiterpenen aus Trauben zu Wein verstärkt betrachtet werden. Die Aromawichtigkeit einzelner Sesquiterpene ist noch völlig unklar. Auch die Rolle der fotochemischen Oxidation bei der Bildung von Aromastoffen aus Sesquiterpenen und der Kinetik der Akkumulation bzw. des Abbaus von Guaien und Rotundon sollte näher betrachtet werden.

Ein Bereich, der kaum Beachtung findet, ist die mögliche Beziehung zwischen Bodenmikroben und der inhärenten räumlichen Variation der Traubenzusammensetzung und der Rotundonkonzentration bei der Sorte Grüner Veltliner.

Auch wenn der Schwerpunkt des steuerbaren Einflusses auf den endgültigen Rotundongehalt überwiegend durch weinbauliche Maßnahmen liegen mag, sollte dennoch auf die technologische Kellerwirtschaft bzw. auf den önologischen Einflussfaktor hinsichtlich Rotundon und andere Sequiterpene geachtet werden. Denn dieser technologische Effekt ist gerade bei Weißweinen kaum erforscht. Die zweite Publikation stellt ein erstes Herantasten dar, was aus kellerwirtschaftlicher Sicht überhaupt möglich ist. Das durch önologische Maßnahmen stabilisierend auf die Verbindung eingewirkt werden kann, ist sicher, wie auch die zweite Publikation verdeutlicht.

Weitere önologische Versuche zum Herausfiltern von gezielten Maßnahmen zur Steigerung der Rotundonextraktion sind trotzdem erforderlich, da über die Beeinflussung von Sequiterpen kaum Forschungen bestehen.

Australische Forschungseinrichtungen forschen in Kooperation mit Winzern und Winzerinnenunermüdlich daran, Rotundon im Shiraz zu erforschen, zu erhalten bzw. sogar zu fördern. Daher sollte dies in Österreich für die Hauptrebsorte Grüner Veltliner ebenfalls angestrebt werden. Zur optimalen und intensiven Herausarbeitung sogenannter Leitaromen wie Rotundon sind daher unterschiedliche weinbauliche Strategien und önologische Maßnahmen notwendig. Es sind weitere Forschungen nötig, damit die Sorte Grüner Veltliner und seine pfeffrige Typizität auch in Zukunft mit Österreich gleichgesetzt werden kann, gerade aufgrund der Entwicklung von Grüner Veltliner, der zunehmend in den Fokus der internationalen Weinwelt rückt. Auch der Verbreitungsgrad in der sogenannten neuen Welt wie USA, Neuseeland nimmt stetig zu. Damit das Marketing weiterhin bei der Sorte Grüner Veltliner mit der pfeffrigen Typizität werben kann und das „Pfefferl“ nicht durch den Klimawandel zu einem Mythos wird, liegt es auf der Hand, dass durch die zuvor angeführten Punkte ein Maßnahmenpaket durch Forscher und Forscherinnen gefunden und erarbeitet werden muss, welches es Produzenten und Produzentinnen gezielt ermöglicht, den Grünen Veltliner auch in Zukunft mit dieser Pfeffrigkeit zu vinifinzieren.

# Literaturverzeichnis


(3S,5R,8S) -5-Isopropenyl-3,8-dimethyl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1 (2H) -azulenon – besser bekannt unter dem Namen Rotundon. (o. J.). Abgerufen 20. Oktober 2021, von https://i-ves-technicalreviews.eu/article/download/4483/13222?inline=1.

Allen, MS; Lacey, MJ; Harris, RLN; Brown, WV (1991). Contribution of methoxypyrazines to Sauvignon blanc wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, Nr. 2: 109–112.

Arthur, CL; Pawliszyn, J (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical chemistry* 62, Nr. 19: 2145–2148.

Azevedo, LC de; Reis, MM; Motta, LF; Rocha GO. Da; Silva, LA; Andrade, JB de (2007). Evaluation of the Formation and Stability of Hydroxyalkylsulfonic Acids in Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, Nr. 21: 8670–8680. https://doi.org/10.1021/jf0709653.

Baltussen, E; Sandra, P; David, F; Cramers, C (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, *11*(10), 737–747.

Battilana, J; Emanuelli, F; Gambino, G; Gribaudo, I; Gasperi, F; Boss, PK; Grando, MS (2011). Functional effect of grapevine 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase substitution K284N on Muscat flavour formation. *Journal of experimental botany* 62, Nr. 15: 5497–5508.

Beloqui, AA; Kotseridis, Y; Bertrand, A (1996). Détermination de la teneur en sulfure de diméthyle dans quelques vins rouges. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 30, Nr. 3: 167–170.

Beloqui, AA; Kotseridis, Y; Bertrand, A (1996). Determination of the content of dimethyl sulphide in some red wines. *OENO One* 30, Nr. 3: 167. https://doi.org/10.20870/oeno-one.1996.30.3.1100.

Blanch, GP; Reglero, G; Herraiz, M; Tabera, J (1991). A Comparison of Different Extraction Methods for the Volatile Components of Grape Juice. *Journal of Chromatographic Science* 29, Nr. 1: 11–15. https://doi.org/10.1093/chromsci/29.1.11.

Broek, TAB; Walker, BD; Andreasen, DH; McCarthy, MD (2013). High-precision measurement of phenylalanine δ15N values for environmental samples: A new approach coupling high-pressure liquid chromatography purification and elemental analyzer isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 27, Nr. 21: 2327–2337.

Brown, RC; Sefton, MA; Taylor, DK; Elsey, GM (2006). An odour detection threshold determination of all four possible stereoisomers of oak lactone in a white and a red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, Nr. 2: 115–118.

Brown, RC; Taylor, DK; Elsey, GM (2006). Utilization of a 1, 2-dioxine for the synthesis of the four possible stereoisomers of oak lactone. *Organic letters* 8, Nr. 3: 463–466.

Camara, J; Alves, M; Marques, J (2006). Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties. *Talanta* 68, Nr. 5: 1512–1521. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.012.

Caputi, L; Carlin, S; Ghiglieno, I; Stefanini, M; Valenti, L; Vrhovsek, U; Mattivi, F (2011). Relationship of Changes in Rotundone Content during Grape Ripening and Winemaking to Manipulation of the `Peppery' Character of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 59*, Nr. 10: 5565–5571. https://doi.org/10.1021/jf200786u.

———. (2011) Relationship of changes in rotundone content during grape ripening and winemaking to manipulation of the 'peppery'character of wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, Nr. 10: 5565–5571.

Castro, R; Natera, R; Durán, E; García-Barroso, C (2008). Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products. *European Food Research and Technology* 228, Nr. 1: 1–18. https://doi.org/10.1007/s00217-008-0900-4.

Cincotta, F; Verzera, A; Tripodi, G; Condurso, C (2015). Determination of sesquiterpenes in wines by HS-SPME coupled with GC-MS. Chromatography, 2(3), 410–421.

Croy, I; Olgun, S; Mueller, L; Schmidt, A; Muench, M; Gisselmann, G; Hatt, H; Hummel, T (2016). Spezifische Anosmie als Prinzip olfaktorischer Wahrnehmung. *HNO* 64, Nr. 5: 292–295. https://doi.org/DOI: 10.1007/s00106-016-0119-9.

Croy, I; Olgun, S; Mueller, L; Schmidt, A; Muench, M; Hummel, C; Gisselmann, G; Hatt, H; Hummel, T (2015). Peripheral adaptive filtering in human olfaction? Three studies on prevalence and effects of olfactory training in specific anosmia in more than 1600 participants. *Cortex* 73: 180–187.

Culleré, L; Ontañón, I; Escudero, A; Ferreira, V (2016). Straightforward strategy for quantifying rotundone in wine at ngL-1 level using solid-phase extraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. Occurrence in different varieties of spicy wines. *Food Chemistry* 206: 267–273. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.039.

Daniel, MA; Elsey, GM; Capone, DL; Perkins, MV; Sefton, MA (2004). Fate of damascenone in wine: the role of SO2. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, Nr. 26: 8127–8131. https://doi.org/10.1021/jf048582h.

Darriet, P; Tominaga, T; Lavigne, V; Boidron, JN; Dubourdieu, D (1995). Identification of a powerful aromatic component of Vitis vinifera L. var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance Journal*, 10(6), 385–392.

Davies, C; Nicholson, EL; Böttcher, C; Burbidge, CA; Bastian, SEP; Harvey, KE; Huang, AC; Taylor, DK; Boss, Paul K (2015). Shiraz wines made from grape berries (Vitis vinifera) delayed in ripening by plant growth regulator treatment have elevated rotundone concentrations and 'pepper' flavor and aroma. *Journal of agricultural and food chemistry* 63, Nr. 8: 2137–2144.

Dimming, K (2015). Analyse von Aromastoffen in Klonen der Rebsorte Grüner Veltliner. D*iplomarbeit* Universität für Bodenkultur Wien.

D'Onofrio, C; Matarese, F; Cuzzola, A (2016). Study of the terpene profile at harvest and during berry development of Vitis vinifera L. aromatic varieties Aleatico, Brachetto, Malvasia di Candia aromatica and Moscato bianco. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97, Nr. 9: 2898–2907. https://doi.org/10.1002/jsfa.8126.

Ebeler, SE (2015). Analysis of Grapes and Wines: An Overview of New Approaches and Analytical Tools. *ACS Symposium Series*, 3–12. https://doi.org/10.1021/bk-2015-1203.ch001.

———. (2012) Gas Chromatographic Analysis of Wines. Gas Chromatography, 689–710. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00030-4.

Eisenreich, W; Schwarz, M; Cartayrade, A; Arigoni, D; Zenk, MH; Bacher, A (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry & biology* 5, Nr. 9: R221–233.

Escudero, A; Gogorza, B; Melus, MA; Ortin, N; Cacho, J; Ferreira, V (2004). Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, Nr. 11: 3516–3524.

Escudero, A; Hernández-Orte, P; Cacho, J; Ferreira, V (2000). Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, Nr. 9: 4268–4272.

Etiévant, PX (1996). Artifacts and contaminants in the analysis of food flavor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36, Nr. 7: 733–745. https://doi.org/10.1080/10408399609527746.

Fay, L; Yeretzian, C; Blank, I (2001). Novel Mass Spectrometry Methods in Flavour Analysis. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 55: 429–434.

Fernandes, ES; Passos, GF; Medeiros, R; Cunha, FM da; Ferreira, J; Campos, MM; Pianowski, LF; Calixto, JB (2007). Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of Cordia verbenacea. *European Journal of Pharmacology* 569, Nr. 3: 228–236. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.059.

Ferreira, V; López, R; Cacho, JF (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(11), 1659–1667. https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000901)80:11<1659::AID-JSFA693>3.0.CO;2-6.

Ferreira, V; Escudero, A; Campo, E; Cacho, J (2007). The chemical foundations of wine aroma–A role game aiming at wine quality, personality and varietal expression. *Proceedings of the Thirteenth Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, South Australia: Australian Wine Industry Technical Conference*, Inc, 142.

Ferreira, V (2010). Volatile aroma compounds and wine sensory attributes. *In Managing wine quality*, 3–28. Elsevier.

Ferreira, V (2012). Bases moléculaires de l'arôme du vin. *In Proceedings of the International Symposium on Wine Aromas* (VINAROMAS project), 5–6.

Ferreira, V; Herrero, P; Zapata, J; Escudero, A (2015). Coping with matrix effects in headspace solid phase microextraction gas chromatography using multivariate calibration strategies. *Journal of Chromatography* A 1407: 30–41. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.058.

Flak, W; Krizan, R; Passmann, G; Tscheik, G; Wallner, E (2009). Charakterisierung von Leitweinen Des Weinbaugebietes Wagram. *Mittelungen Klosterneuburg* 1: 227–236.

Flak, W; Krizan, R; Kutscher, W; Tscheik, G; Wallner, E (2007). Charakterisierung von Weinen Der Sorte Grüner Veltliner Aus Verschiedenen Herkünften Im Weinbaugebiet Weinviertel. *Mitteilungen Klosterneuburg* 57: 131–139.

Frago Ramos, S (2016). Extracción y determinación de aromas en orujos de uva.

Francis, IL; Newton, JL (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, Nr. 2: 114–126.

Friedrich, JE; Acree, TE (1998). Gas chromatography olfactometry (GC/O) of dairy products. *International Dairy Journal* 8, Nr. 3: 235–241.

Gaby, JM; Bakke, AJ; Baker, AN; Hopfer, H; Hayes JE (2020). Individual differences in thresholds and consumer preferences for rotundone added to red wine. *Nutrients 12*, Nr. 9: 2522.

Geffroy, O; Dufourcq, T; Carcenac, D; Siebert, T; Herderich, M; Serrano E (2014). Effect of ripeness and viticultural techniques on the rotundone concentration in red wine made fromVitis vinifera\hspace0.25emL. cv. Duras. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20, Nr. 3: 401–408. https://doi.org/10.1111/ajgw.12084.

Geffroy, O; Dufourcq, T; Carcenac, D; Siebert, T; Herderich, M; Serrano, E (2014). Effect of ripeness and viticultural techniques on the rotundone concentration in red wine made from V it is vinifera L. cv. D uras. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20, Nr. 3: 401–408.

Geffroy, O; Siebert, T; Herderich, M; Mille, B Serrano, E (2016). On-vine grape drying combined with irrigation allows to produce red wines with enhanced phenolic and rotundone concentrations. *Scientia horticulturae* 207: 208–217.

Geffroy, O; Descôtes, J (2017). Rotundone et arômes poivrés des vins: ce que l'on sait aujourd'hui, *Revue des oenologues*, 47–52.

Geffroy, O; Siebert, T; Silvano, A; Herderich, A (2017). Impact of winemaking techniques on classical enological parameters and rotundone in red wine at the laboratory scale. *American Journal of Enology and Viticulture* 68, Nr. 1: 141–146.

Geffroy, O; Ibfelt, K; Feilhès, C; Dufourcq T (2018). Manipulating the rotundone and 2-methoxy-3-isobutylpyrazine composition of Vitis vinifera L. cv. Fer red wines from cool-climate vineyards. *In Proceedings of th^e 12th International Terroir Congress*, 18–22.

Geffroy, O; Calzi, ML; Ibpfelt K; Yobregat, O; Feilhes, C; Dufourcq, T (2019). Using common viticultural practices to modulate the rotundone and 3-isobutyl-2-methoxypyrazine composition of Vitis vinifera L. cv. Fer N red wines from a temperate climate wine region with very cool nights. *OENO One* 53, Nr. 4. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2019.53.4.2459.

Geffroy, O; Calzi, ML; Ibpfelt, K; Yobrégat, O; Feilhes, C; Dufourcq, T (2019). Using common viticultural practices to modulate the rotundone and 3-isobutyl-2-methoxypyrazine composition of Vitis vinifera L. cv. Fer red wines from a temperate climate wine region with very cool nights. *OENO One* 53, Nr. 4.

Geffroy, O; Descôtes, J; Levasseur-Garcia, C; Debord, C; Denux, J; Dufourcq, T (2019). A 2-year multisite study of viticultural and environmental factors affecting rotundone concentration in Duras red wine. *OENO One* 53, Nr. 3.

Geffroy, O; Kleiber, D; Jacques, A (2020). May peppery wines be the spice of life? A review of research on the 'pepper' aroma and the sesquiterpenoid rotundone. *OENO One* 54, Nr. 2. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2020.54.2.2947.

Genthner, ER (2014). Identification of rotundone as an important contributor to the flavor of oak aged spirits. *University of Illinois at Urbana-Champaign*.

Gerstel Aktuell, Nr. 48 - Rotundon in Wein und komplexen Matrices effizient nachweisen. Zugegriffen 15. Oktober 2021. https://www.gerstel.com/de/GA48_Rotundon.htm.

GmbH, Ö.W.M. (2017). Dokumentation Österreich Wein, 123. https://www.oesterreich-wein.at/fileadmin/user_upload/PDF/Doku/Dokumentation_OEsterreich_Wein_2017.pdf.

Gohlke, RS; McLafferty, FW (1993). Early gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 4, Nr. 5: 367–371. https://doi.org/10.1016/1044-0305(93)85001-E.

Gonçalves-Pereira, J; Póvoa, P (2011). Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of $\upbeta$-lactams. *Critical Care* 15, Nr. 5: R206. https://doi.org/10.1186/cc10441.

Gruber, L (2016). Wackelt der österreichische Weinstil? Abgerufen 20. Oktober 2021, von https://www.der-winzer.at/content/wein-und-obst/der-winzer/de/news/2016/04/wackelt_der_oesterreichischeweinstil.html.

Gruber, L (2016). Wackelt der österreichische Weinstil? Abgerufen 20. Oktober 2021, von https://www.der-winzer.at/content/wein-und-obst/der-winzer/de/news/2016/04/wackelt_der_oesterreichischeweinstil.html.

Grüner Veltliner. (o. J.). Abgerufen 30. September 2021, von https://info.bmlrt.gv.at/themen/lebensmittel/trad-lebensmittel/getraenke/gruener_veltliner.html.

Gupta, VVSR, Bramley, RGV; Greenfield, P; Yu, J; Herderich, MJ (2019). Vineyard Soil Microbiome Composition Related to Rotundone Concentration in Australian Cool Climate 'Peppery' Shiraz Grapes. *Frontiers in Microbiology* 10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01607.

Gupta, VVSR; Bramley, RGV; Greenfield, P; Yu, J; Herderich, MJ (2019). Vineyard soil microbiome composition related to rotundone concentration in Australian cool climate 'peppery'Shiraz grapes. *Frontiers in microbiology* 10: 1607.

Gupta, VVSR; Bramley, RGV (2019). Greenfield P, Yu J, Herderich MJ. Vineyard Soil Microbiome Composition Related to Rotundone Concentration in Australian Cool Climate 'Peppery'Shiraz Grapes. *Front Microbiol* 10: 1607.

Guth, H (1997). Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, Nr. 8: 3022–3026.

——— (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, Nr. 8: 3027–3032.

Guth, H (1996). Determination of the Configuration of Wine Lactone. *Helvetica Chimica Acta* 79, Nr. 6: 1559–1571. https://doi.org/10.1002/hlca.19960790606.

Harner, AD; Vanden Heuvel, JE; Marini, RP; Elias, RJ; Centinari, M (2019). Modeling the impacts of weather and cultural factors on rotundone concentration in cool-climate Noiret wine grapes. *Frontiers in plant science* 10: 1255.

Herderich, MJ; Siebert, TE; Parker, M; Capone, DL; Jeffery, DW; Osidacz, P; Francis, IL (2012). Spice up your life: analysis of key aroma compounds in Shiraz. *Flavor chemistry of wine and other alcoholic beverages*, 3–13. ACS Publications.

Herderich, M; Siebert, T; Parker, M; Capone, D; Zhang, P; Geffroy, O; Williamson, PO; Francis, I (2013). Synthesis of the ongoing works on rotundone, an aromatic compound responsible of the peppery notes in wines. *Internet Journal of enology and Viticulture* 6: 1–6.

Herderich, MJ; Siebert, TE; Parker, M; Capone, DL; Mayr, C; Zhang, P; Geffroy, O; Williamson, P; Francis, IL (2013). Synthesis of the ongoing works on Rotundone, an aromatic compound responsible for the peppery notes in wines. *Internet J. Enol. Vitic* 6, Nr. 1: 1–6.

Hong, YJ; Tantillo, DJ (2014). How cyclobutanes are assembled in nature – insights from quantum chemistry. *Chemical Society Reviews*, *43*(14), 5042–5050. https://doi.org/10.1039/C3CS60452G.

Huang, AC; Burrett, S; Sefton, MA; Taylor, DK (2014). Production of the pepper aroma compound, (-)-rotundone, by aerial oxidation of α-guaiene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, Nr. 44: 10809–10815.

Lange, BM; Croteau, R (1999). Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: Isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, Nr. 24: 13714–13719. https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13714.

Lange, BM; Rujan, T; Martin, W; Croteau, R (2000). Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, Nr. 24: 13172–13177. https://doi.org/DOI: 10.1073/PNAS.240454797.

Laubenbacher, S; Hintz, B; Leitner E (2008). Analytische Methoden zur Bestimmung flüchtiger Verbindungen in Wein. *In Tagungsband LMCH-Tage 2008*, 328–333.

Li, Z; Howell, K; Fang, Z; Zhang, P (2019). Sesquiterpenes in grapes and wines: Occurrence, biosynthesis, functionality, and influence of winemaking processes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19, Nr. 1: 247–281. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12516.

Logan, G (2015). Rotundone in New Zealand Vitis vinifera L. Syrah: Fruit, Fermentation and Functional Food Chemistry.

Luo, J; Brotchie, J; Pang, M; Marriott, PJ; Howell, K; Zhang, P (2019). Free terpene evolution during the berry maturation of five Vitis vinifera L. cultivars. *Food Chemistry* 299: 125101. https://doi.org/DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2019.125101.

Marais, J (1983). Terpenes in the aroma of grapes and wines: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 4, Nr. 2: 49–58.

Martin, B; Etiévant, P; Henry, N (1990). The chemistry of sotolon: a key parameter for the study of a key component of flor sherry wines.

Masneuf-Pomarède, I; Mansour, C; Murat, ML; Tominaga, T; Dubourdieu, D (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *International journal of food microbiology* 108, Nr. 3: 385–390.

Mattivi, F; Caputi, L.; Carlin, S; Lanza, T; Minozzi, M; Nanni, D; Valenti, L; Vrhovsek, U (2011). Effective analysis of rotundone at below-threshold levels in red and white wines using

solid-phase microextraction gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25, Nr. 4: 483–488. https://doi.org/DOI: 10.1002/rcm.4881.

Mattivi, F; Caputi, L; Carlin, S; Nanni, D; Valenti, L; Eder, R; Vrhovsek, U (2011). The sesquiterpene rotundone is an impact aroma in Grüner Veltliner and other peppery wines. *16th International Enology Symposium*, 63–66. DE.

May, B; Wüst, M (2012). Temporal development of sesquiterpene hydrocarbon profiles of different grape varieties during ripening. *Flavour and Fragrance Journal* 27, Nr. 4: 280–285. https://doi.org/10.1002/ffj.3096.

Mayr, CM; Capone, DL; Pardon, KH; Black, CA; Pomeroy, D; Leigh Francis, I (2015). Quantitative analysis by GC-MS/MS of 18 aroma compounds related to oxidative off-flavor in wines. *Journal of agricultural and food chemistry* 63, Nr. 13: 3394–3401.

Nagegowda, DA (2010). Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS letters* 584, Nr. 14: 2965–2973.

Nakanishi, A; Fukushima, Y; Miyazawa, N; Yoshikawa, K; Maeda, T; Kurobayashi, Y (2017). Identification of Rotundone as a Potent Odor-Active Compound of Several Kinds of Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, Nr. 22: 4464–4471. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00929.

———. (2017) Quantitation of Rotundone in Grapefruit (Citrus Paradisi) Peel and Juice by Stable Isotope Dilution Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, Nr. 24: 5026–33. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01319.

Nauer, S; Brandes, W; Patzl-Fischerleitner, E; Hann, S; Eder, R (2018). Analyse von (-)-Rotundon mittels SPE-SPME-GC-MS in Österreichischen Qualitätsweinen der Rebsorte 'Grüner Veltliner'. *Mitteilungen Klosterneuburg* 68: 107–119.

Ong, PKC; Acree, TE (1999). Similarities in the aroma chemistry of Gewürztraminer variety wines and lychee (Litchi chinesis Sonn.) fruit. *Journal of agricultural and food chemistry* 47, Nr. 2: 665–670.

Ortega-Heras, M; González-SanJosé, ML; Beltrán, S (2002). Aroma composition of wine studied by different extraction methods. *Analytica Chimica Acta* 458, Nr. 1: 85–93. https://doi.org/DOI:10.1016/S0003-2670(01)01526-4.

Panighel, A; Flamini, R (2015). Solid Phase Extraction and Solid Phase Microextraction in grape and wine volatile compounds analysis. *Sample Preparation*, *2*(1).

Pawliszyn, J (2012). Theory of Solid-Phase Microextraction. *Handbook of Solid Phase Microextraction*, 13–59. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416017-0.00002-4.

———. (2012) Theory of solid-phase microextraction. *Handbook of solid phase microextraction*, 13–59. Elsevier.

Petronilho, S; Coimbra, MA; Rocha, SM (2014). A critical review on extraction techniques and gas chromatography based determination of grapevine derived sesquiterpenes. *Analytica Chimica Acta* 846: 8–35. https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.049.

Petrozziello, M; Espada-Rodríguez, L; Bonello, F; Asproudi, A; Cravero, MC; Motta, S; Panero, L; Lopez, R (2021). Effect of some winemaking factors on rotundone levels of Pelaverga di Verduno wines. *European Food Research and Technology* 247, Nr. 7: 1645–1653. https://doi.org/10.1007/s00217-021-03735-9.

Piñeiro, Z; Barroso, C (2004). Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, *513*, 209–214. https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.12.044.

Polášková, P; Herszage, J; Ebeler, SE (2008). Wine flavor: chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews* 37, Nr. 11: 2478. https://doi.org/10.1039/B714455P.

Pons, A; Lavigne, V; Landais, Y; Darriet, P; Dubourdieu, D (2008). Distribution and organoleptic impact of sotolon enantiomers in dry white wines. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, Nr. 5: 1606–1610.

Presseinformation_WeinforumBurgenland.pdf. Zugegriffen 15. Oktober 2021. http://weinburgenland.at/fileadmin/user_upload/Download/Anhaenge/Presseinformation_WeinforumBurgenland.pdf.

Rapp, A; Mandery, H (1986). Wine aroma. *Experientia* 42, Nr. 8: 873–884.

Rebière, L; Clark, AC; Schmidtke, LM; Prenzler, PD; Scollary, GR (2010). A robust method for quantification of volatile compounds within and between vintages using headspace-solid-phase micro-extraction coupled with GC–MS – Application on Semillon wines. *Analytica Chimica Acta* 660, Nr. 1–2: 149–157. https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.029.

Regner, F; Hack, R; Nauer, S; Zöch, B (2016). Breeding of fungal resistant varieties derived from Grüner Veltliner by chromosomal selection. *In BIO Web of Conferences*, 7:01014. EDP Sciences.

Regner, F; Trimmel, N; Eisenheld, C; Hack, R; Rockenbauer, A; Philipp, C; Eitler, C (2021). Charakterisierung der neuen Rebsorte „Donauveltliner“ ('KLBG. 1979'). *Mitteilungen Klosterneuburg*, *70*, 44–61.

Reynolds, A; Cliff, M; Girard, B; Kopp TG (2001). Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, Nr. 3: 235–240.

Rieder, A; Greil, A; Pröll, M (2018/2019). Ausgewählte weinbauliche und technologische Maßnahmen zur Beeinflussung des Rotundongehaltes bei der Sorte Grüner Veltliner *Diplomarbeit* an der HBLA Klosterneuburg.

RIS – DAC Verordnung „Weinviertel“. *Bundesrecht* konsolidiert, Fassung vom 20.10.2021. (o. J.). Abgerufen 20. Oktober 2021, von https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=20006693.

Rocha, S; Coelho, E; Vinholes, J; Coimbra, M (2006). Grapes and wine from Vitis vinifera L. as a potential source of sesquiterpenoids. In *Recent Progress in Medicinal Plants.* Bd. 15, 253–272.

Robinson, AL; Boss, PK; Solomon, PS; Trengove, RD; Heymann, H; Ebeler, SE (2014). Origins of Grape and Wine Aroma. Part 2. Chemical and Sensory Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* 65, Nr. 1: 25–42. https://doi.org/DOI: 10.5344/ajev.2013.13106.

Ruberto, G; Baratta, MT (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* 69, Nr. 2: 167–174. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00247-2.

Sallaud, C; Rontein, D; Onillon, S; Jabès, F; Duffé, P; Giacalone, C; Thoraval, S u. a. (2009). A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato Solanum habrochaites. *The Plant Cell* 21, Nr. 1: 301–317.

Scarlett, NJ; Bramley, RGV; Siebert, TE (2014). Within-vineyard variation in the ‘pepper’compound rotundone is spatially structured and related to variation in the land underlying the vineyard. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20, Nr. 2: 214–222.

Schellin, M; Popp, P (2003). Membrane-assisted solvent extraction of polychlorinated biphenyls in river water and other matrices combined with large volume injection–gas chromatography–mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography* A 1020, Nr. 2: 153–160.

Schwab, W; Wüst, M (2015). Understanding the constitutive and induced biosynthesis of mono-and sesquiterpenes in grapes (Vitis vinifera): a key to unlocking the biochemical secrets of unique grape aroma profiles. *Journal of agricultural and food chemistry* 63, Nr. 49: 10591–10603.

Selfridge, TB; Amerine, MA (1978). Odor thresholds and interactions of ethyl acetate and diacetyl in an artificial wine medium. *American Journal of Enology and Viticulture* 29, Nr. 1: 1–6.

Serrano de la Hoz, MC (2014). Determinación de precuersores aromáticos glicosídicos de uvas, mostos y vinos, blancos y tintos. Aplicación en bodega. Abgerufen von https://ruidera.uclm.es/xmlui/handle/10578/5457.

Siebert, TE; Wood, C; Elsey, GM; Pollnitz; AP (2008). Determination of rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, Nr. 10: 3745–3748.

Siebert, TE; Barter, SR (2013). Determination of the potent flavour compound rotundone in grapes and wine using MDGC-MS and membrane assisted solvent extraction. *Poster-präsentation*, 37th International Symposium for Capillary Chromatography Palm Springs, USA.

Swiegers, JH; Bartowsky; EJ; HENSCHKE, PA; Pretorius, IS (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, Nr. 2: 139–73. https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x.

Swiegers, JH; Pretorius, IS (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Advances in applied microbiology* 57: 131–175.

Takase, H; Sasaki, K; Shinmori, H; Shinohara, A; Mochizuki, C; Kobayashi, H; Saito, H; Matsuo, H; Suzuki, S; Takata, R (2015). Analysis of Rotundone in Japanese Syrah Grapes and Wines using Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) with Heart-Cutting Two-Dimensional GC-MS. *American Journal of Enology and Viticulture* 66, Nr. 3: 398–402. https://doi.org/10.5344/ajev.2015.14118.

Takase, H; Sasaki, K; Ikoma, G; Kobayashi, Hironori; Matsuo, H; Suzuki, Shunji; Takata, R u. a. (2016). Farnesyl diphosphate synthase may determine the accumulation level of (-)-rotundone in'Syrah'grapes. *Vitis 55*, Nr. 3: 99–106.

Takase, H; Sasaki, K; Shinmori, H; Shinohara, A; Mochizuki, C; Kobayashi, H; Ikoma, G u. a. (2016) Cytochrome P450 CYP71BE5 in grapevine (Vitis vinifera) catalyzes the formation of the spicy aroma compound (-)-rotundone. *Journal of experimental botany* 67, Nr. 3: 787–798.

Tantillo, D (2008). Recent excursions to the borderlands between the realms of concerted and stepwise: Carbocation cascades in natural products biosynthesis. *Journal of Physical Organic Chemistry*, *21*, 561–570. https://doi.org/10.1002/poc.1320.

Tantillo, DJ (2010). The carbocation continuum in terpene biosynthesis—where are the secondary cations? *Chemical Society Reviews*, *39*(8), 2847–2854. https://doi.org/10.1039/B917107J.

Tantillo, DJ (2011). Biosynthesis via carbocations: Theoretical studies on terpene formation. *Natural Product Reports*, *28*(6), 1035–1053. https://doi.org/10.1039/C1NP00006C.

Tatman, D; Mo, H (2002). Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer letters* 175, Nr. 2: 129–139. https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00723-6.

Tominaga, T; Darriet, P; Dubourdieu, D (1996). Identification de l'acétate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon. *Vitis 35*, Nr. 4: 207–210.

———. (1996) Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. *Vitis-Geilweilerhof* 35, Nr. 4: 207–210.

Tominaga, T; Furrer, A; Henry, R; Dubourdieu, D (1998). Identification of new volatile thiols in the aroma of Vitis vinifera L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal* 13, Nr. 3: 159–162.

Tominaga, T; Guimbertau, G; Dubourdieu, D (2003). Contribution of benzenemethanethiol to smoky aroma of certain Vitis vinifera L. wines. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, Nr. 5: 1373–1376.

———. (2003) Contribution of Benzenemethanethiol to Smoky Aroma of CertainVitis viniferaL. Wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, Nr. 5: 1373–1376. https://doi.org/10.1021/jf020756c.

Tominaga, T; Peyrot des Gachons, C; Dubourdieu (1998). A new type of flavor precursors in Vitis v inifera L. cv. Sauvignon blanc: S-cysteine conjugates. *Journal of agricultural and food chemistry* 46, Nr. 12: 5215–5219.

Trabue, SL; Anhalt, JC; Zahn, JA (2006). Bias of Tedlar bags in the measurement of agricultural odorants.

Wedler, H; Pemberton, R; Tantillo, D (2015). Carbocations and the Complex Flavor and Bouquet of Wine: Mechanistic Aspects of Terpene Biosynthesis in Wine Grapes. *Molecules* 20, Nr. 6: 10781–10792. https://doi.org/10.3390/molecules200610781.

Welke, JE; Hernandes, KC; Nicolli, KP; Barbará, JA; Biasoto, ACT; Zini, CA (2021). Role of gas chromatography and olfactometry to understand the wine aroma: Achievements denoted by multidimensional analysis. *Journal of Separation Science*, 44(1), 135–168. https://doi.org/10.1002/jssc.202000813.

Weinviertel DAC lädt mit neuem optischen Auftritt und einer Werbekampagne zum Weinviertler Gaumenkino ein. (2016, August 1). Abgerufen von https://www.weinviertel-dac.at/weinviertel-dac-laedt-mit-neuem-optischen-auftritt-und-einer-werbekampagne-zum-weinviertler-gaumenkino-ein/.

Whiton, RS; Zoecklein, B (2000). Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction for Analysis of Wine Aroma Compounds. *American Journal of Enology and Viticulture* 51: 379–382.

Winterhalter, P; Rouseff, R 2002. Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. *ACS Publications*.

Wood, C; Siebert, TE; Parker, M; Capone, DL; Elsey, GM; Pollnitz, AP; Eggers, M u. a. (2008). Spice up your life–The Rotundone story. *Expression of Multidisciplinary Flavour Science*, 483.

Wood, C; Siebert, TE; Parker, M; Capone, DL; Elsey, GM; Pollnitz, AP; Eggers, M u. a. (2008). From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, Nr. 10: 3738–3744.

Wu, T; Cadwallader, KR (2019). Identification of Characterizing Aroma Components of Roasted Chicory 'Coffee' Brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67, Nr. 50: 13848–13859. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00776.

Wüst, M (2003). Wein – Qualität entscheidet sich in Nanogramm: Zur Biochemie des sortentypischen Weinaromas. *Chemie in unserer Zeit*, 37, 8–17. https://doi.org/10.1002/ciuz.200390020.

Zepner, L; Karrasch, P; Wiemann, F; Bernard, L (2021). ClimateCharts.net – an interactive climate analysis web platform. *International Journal of Digital Earth*, 14(3), 338–356. https://doi.org/10.1080/17538947.2020.1829112.

Zhang, P (2015). The influence of climate factors and plant physiological responses on the accumulation of rotundone in Vitis vinifera cv. Shiraz grapevines.

Zhang, P; Barlow, S; Krstic, M; Herderich, M; Fuentes, S; Howell, K (2015). Within-vineyard, within-vine, and within-bunch variability of the rotundone concentration in berries of Vitis vinifera L. cv. Shiraz. *Journal of agricultural and food chemistry* 63, Nr. 17: 4276–4283.

Zhang, P; Fuentes, S; Wang, Y; Deng, R, Krstic, M; Herderich, M; Barlow, EWR; Howell, K (2016). Distribution of rotundone and possible translocation of related compounds amongst grapevine tissues in Vitis vinifera L. cv. Shiraz. *Frontiers in plant science* 7: 859.

Zhang, P; Howell, K; Krstic, M; Herderich, M; Barlow, EWR; Fuentes, S (2015). Environmental factors and seasonality affect the concentration of rotundone in Vitis vinifera L. cv. Shiraz wine. *PloS one* 10, Nr. 7: e0133137.

Zhang, P; Luo, F; Howell, K (2017). Fortification and elevated alcohol concentration affect the concentration of rotundone and volatiles in Vitis vinifera cv. Shiraz wine. *Fermentation* 3, Nr. 3: 29.

# 2 Publikation I: Analyse von (-)Rotundon mittels SPE-SPME-GC-MS in österreichischen Qualitätsweinen der Rebsorte Grüner Veltliner

## Journal: Mitteilungen Klosterneuburg

### Impact Factor: 0,545→ ca. 0,6

Diese Publikation wurde in den Mitteilungen Klosterneuburg 68 (2018) S. 107-119 veröffentlicht. Dabei wurde eine SPE-SPME-GC-MS-Methode zur Quantifizierung des Sesquiterpens Rotundon erarbeitet bzw. an die instrumentellen Gegebenheiten angepasst, um dabei in erster Linie das Vorkommen sowie die Verteilung vom Sequiterpene Rotundone in der Rebsorte Grüner Veltliner festzustellen. Regionale bzw. jahrgangsabhängige Unterschiede wurden darin ebenfalls aufgezeigt.

Die Publikation wird der ersten großen Fragestellung *Aufklärung hinsichtlich des relevanten Vorkommens und Verteilung der Schlüsselverbindung Rotundon als wesentlicher Bestandteil der Pfefferaromatik* zugeordnet.

**Autoren und Autorinnen**: Nauer, S; Brandes, W; Patzl-Fischerleitner, E; Hann, S; Eder, R (2018).

# ANALYSE VON (-)-ROTUNDON MITTELS SPE-SPME-GC-MS IN ÖSTERREICHISCHEN QUALITÄTSWEINEN DER REBSORTE 'GRÜNER VELTLINER'

Stefan Nauer[1], Walter Brandes[1], Elsa –Patzl-Fischerleitner[1], Stephan Hann[2] und Reinhard Eder[1]

[1] Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
[2] Universität für Bodenkultur, Department für Chemie
A-1190 Wien, Muthgasse 18
E-Mail: Stefan.Nauer@weinobst.at

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit einer modifizierten Festphasen-Festphasenmikroextraktion Gaschromatografie-Massenspektrometrie-Methode (SPE-SPME-GC-MS) das Vorkommen des Sesquiterpenketons (-)-Rotundon in österreichischen Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner', der Hauptsorte Österreichs, zu verifizieren. Da diese Verbindung ebenso wie 'Grüner Veltliner' mit Pfeffrigkeit assoziiert wird, war es von großem Interesse, die (-)-Rotundon-Gehalte in Weinen verschiedener Weinbaugebiete und Jahrgänge (2009 bis 2015) zu bestimmen und zu beurteilen, ob die gefundenen Gehalte eine sensorische Relevanz haben können. Zu diesem Zweck wurden 105 authentische Weinproben aus verschiedenen Weinbauregionen und Gebieten (Wachau, Weinviertel, Kamptal, Wagram, Kremstal, Traisental, Thermenregion, Carnuntum, Neusiedlersee, Neusiedlersee-Hügelland, Bergland, Wien) analysiert. Die Bandbreite der Konzentration des (-)-Rotundons bewegte sich zwischen einem Minimum von 9,50 ng/l und einem Maximum von 84,7 ng/l. Die ermittelte Schwankungsbreite lässt sich auf klimatische und weinbauliche Einflüsse in Abhängigkeit von Jahrgang und Anbauregion zurückführen. Der durchschnittliche Gehalt berücksichtigte alle untersuchten Jahrgänge und lag bei rund 31,7 ng/l. Vom sensorischen Standpunkt aus bedeutet dieser Wert eine doppelte Überschreitung des angegebenen Schwellenwertes für Rotwein, welcher laut Literatur bei 16 ng/l liegt (Siebert et al., 2008). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Verbindung (-)-Rotundon in vielen österreichischen Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' in aromarelevanten Konzentrationen vorliegt, wobei die effektiven Gehalte in den Weinen aber in Abhängigkeit von Region, Jahrgang und den jeweiligen weinbaulichen Maßnahmen stark schwanken. So waren beispielsweise die (-)-Rotundon-Gehalte in den Weinen der Jahrgänge 2013 und 2014 durchschnittlich höher als jene der Jahrgänge 2009 und 2010, was einen klimabedingten Einfluss des Jahrgangs auf diese Gehalte und somit die Pfeffrigkeit der Weine belegt.
**Schlagwörter:** Rotundon, Grüner Veltliner, SPME, SPE, GC-MS, Pfeffrigkeit, Pfefferl

**Analysis of (-)-rotundone by means of SPE-SPME-GC-MS in Austrian quality wines of the 'Grüner Veltliner' variety.** The objective of the present work was to verify the presence of the sesquiterpeneketone (-)-rotundone in Austrian wines of the 'Grüner Veltliner' variety, the main variety of Austria, using a modified solid-phase solid-phase micro-extraction gas chromatography-mass spectrometry method (SPE-SPME-GC-MS). Since this compound, like 'Grüner Veltliner', is associated with pepperiness, it was of great interest to determine (-)-rotundone levels in wines from different vineyards and vintages (2009 to 2015) and to assess whether the levels found may have sensory relevance. For this purpose, 105 authentic wine samples from various winegrowing regions and areas (Wachau, Weinviertel, Kamptal, Wagram, Kremstal, Traisental, Thermenregion, Carnuntum, Neusiedlersee, Neusiedlersee-Hügelland, Bergland, Vienna) were analyzed. Concentrations of (-)-rotundone ranged from a minimum of 9.50 ng/l to a maximum of 84.7 ng/l. The determined variability can be attributed to climatic and viticultural influences depending

on vintage and region. Average content was calculated for all tested years and was about 31.7 ng/l. From the sensory point of view, this value exceeds the specified threshold for red wine, which according to literature is 16 ng/l (Siebert et al., 2008) by the twofold,. In summary it can be stated that the compound (-)-rotundone is present in many Austrian wines of the variety 'Grüner Veltliner' in aroma-relevant concentrations, but effective contents in the wines vary strongly depending on region, vintage and the specific viticultural measures. For example, the (-)-rotundone contents in wines from the vintages 2013 and 2014 were on average higher than those from the vintages 2009 and 2010, demonstrating a climate-dependant influence of the vintage on these levels and thus the pepperiness of the wines.
**Keywords:** Rotundon, Grüner Veltliner, SPME, SPE, GC-MS, pepperiness, 'Pfefferl'

Die Aromatik von Weinen wird durch eine Vielzahl (800 bis 1500) von Verbindungen verschiedenster Stoffklassen (Ester, Alkohole, Terpene, Thiole …) geprägt (Maarse et al., 1992; Guth et al., 1997). Dennoch existiert nur eine Handvoll von Verbindungen (ca. 100) sogenannter impact odours, also Leitaromen, mit geringer Wahrnehmungsschwelle, die direkt mit bestimmten und unverwechselbaren geruchlichen Assoziationen verknüpft werden (Ferreira et al., 2000; Polaskova et al., 2008). Bei diesen Verbindungen handelt es sich in erster Linie um solche, welche Weinfehler, wie zum Beispiel Trichloranisol, Tribromanisol (Kork), Geosmin (Schimmel, muffige Note), 2-Aminoacetophenon (UTA), 4-Ethylphenol, Ethylguajakol (Pferdeschweiß, Brett) und TDN (1,1,6,-Trimethyl-1,2-dihydronapthalene, Petrolnote) verursachen. Als Beispiele für positiv assoziierte Geruchskomponenten wären hier die Stoffgruppe der Pyrazine und Thiole für Weine der Sorte 'Sauvignon Blanc' zu nennen. Bei zahlreichen anderen Aromasorten spielen Terpene eine wesentliche Rolle. Terpene, speziell Monoterpene, sind primär prägend für Muskatsorten (wie 'Muskat Ottonel', 'Muskateller', 'Gewürztraminer', 'Riesling'), und bekannte Vertreter sind beispielsweise Linalool, Geraniol, Nerol, Linalooloxid, Citronellol, alpha-Terpeniol, Ho-Trienol und Myrcenol. Anhand der Verteilung und Gehalte an Monoterpenen können Aussagen über Authentizität und Typizität von Weinen getroffen werden. So ist laut Strauss et al. (1986) eine Unterscheidung der Rebsorten anhand der Monoterpengehalte möglich, weil die Gesamtgehalte an Monoterpenen bei Muskat-Rebsorten über 6 mg/l, bei nicht-Muskat-aromatischen Sorten bei 1 bis 4 mg/l und bei Rebsorten, deren Aroma unabhängig von Monoterpenen zusammengesetzt ist, bei weniger als 1 mg/l liegen. Inwieweit man die Typizität bzw. Authentizität der österreichischen Leitsorte 'Grüner Veltliner' anhand des Aromaspektrums charakterisieren kann, ist noch nicht ausreichend erforscht. In einer früheren Arbeit (Schreiner et al., 2007) wurden mit einer sensitiven GC-Methode 176 Aromasubstanzen detektiert, und es konnte durch die Anwendung von modernsten statistischen Methoden (neurale Netze) eine zu 80 % richtige Zuordnung von österreichischen Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' zu ihrer Herkunft erreicht werden.

Die Sorte 'Grüner Veltliner' ist die wichtigste autochthone Sorte Österreichs mit einer Anbaufläche von rund 13.518 ha, was rund 30 % der gesamten österreichischen Rebfläche darstellt und diese Weißweinsorte somit zum Aushängeschild für österreichischen Wein macht (http://www.oesterreichwein.at/unser-wein/oesterreichs-rebsorten/weisswein/gruener-veltliner/; 04. 12. 2017). Sie wird außerhalb von Österreich ebenfalls in den östlichen Nachbarländern, von Norditalien bis in die USA, Neuseeland, Australien und Südafrika mit stetigem Verbreitungsgrad und wachsender Beliebtheit kultiviert. Kaum eine andere Weißweinsorte wird derartig häufig mit dem Attribut der würzigen, pfeffrigen Note belegt wie der 'Grüner Veltliner' (Synonym 'Weißgipfler'). Der in Österreich häufig benutzte Begriff des sogenannten "Pfefferls" stellt neben dem Steinobstaroma das Markenzeichen des echten typischen Grüner Veltliner-Weins dar. Diese hohe sensorische Erwartungshaltung rückt zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses, da Konsumenten von regionalen Produkten Authentizität und unverwechselbare charakteristische Eigenschaften erwarten. Klimek (2011) zeigte auf, dass die verkosteten Grüne Veltliner-Weine eher an 'Sauvignon Blanc' erinnerten als an einen pfeffrigen und wür-

zigen 'Grüner Veltliner'. Nach Flak (2007) ist die Aromatik der Sorte 'Grüner Veltliner' von Fruchtaromen (z. B. Zitrus, Grapefruit, grüner bzw. reifer Apfel, Birne, Quitte, Melone, Dörrobst, Bratapfel), vegetabilen Noten (z. B. Pfeffer, Wiesenblumen, Akazienblüte, frisches Gras, Heu, Stroh, gekochte Fisolen, Spargel, Nuss) sowie bodenassoziierten Eindrücken (z. B. mineralisch, erdig, lössartig) geprägt. Anhand der Aromatik lassen sich nach Flak (2007, 2009) und Schreiner et al. (2007) auch geografische Unterschiede innerhalb der gleichen Sorte festmachen. So sind laut Flak et. al (2009) die Pfeffrigkeit von der Region und die Weinqualität vom Alter des Weingartens abhängig. Diesen Untersuchungen zufolge sind die Veltliner-Weine des Weinbaugebietes Weinviertel sensorisch stärker in Richtung "Pfefferl" geprägt als die des Weinbaugebietes Wagram. Ebenso postuliert diese Arbeitsgruppe, dass Bodentöne (Löss, Mineralik) und der sortentypische "Pfefferton" stärker durch den Standort beeinflusst werden als apfelartige und florale Aromen.

Neben der Regionalität trägt auch die genetische Variabilität der 'Grüner Veltliner'-Klone zu Unterschieden hinsichtlich der Aromatik bei. So gliedern Regner et al. (2009) die Zugehörigkeit von Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' in drei "flavour types": a) Sauvignon-Typ, b) würzig-pfeffriger Typ, c) Steinfrucht-Aprikose-Typ. Bei gebietstypischen DAC-Weinen wird der würzig-pfeffrige Typ favorisiert. Laut DAC-Verordnung Weinviertel BGBl.II Nr.58/2010 sollen die DAC-Weine folgende typische Eigenart aufweisen: Farbe: hellgelb, reingelb; Geruch: typisches Sortenbukett; Geschmack: fruchtig, würzig, pfeffrig, kein Holzton, nicht einseitig alkohollastig, keine Botrytisnote.

Im Zusammenhang mit der Pfeffernote ist es sehr interessant, dass Wood et al. (2008) mittels Gaschromatographie und olfaktorischer Detektion (GC-O-Analyse) in australischen Weinen der Rotweinsorte 'Shiraz' die Verbindung (-)-Rotundon fanden, welche maßgeblich für die Pfeffrigkeit der Weine verantwortlich sein sollte.

Beim (-)-Rotundon ($C_{15}H_{22}O$) handelt es sich um ein bicyclyisches sauerstoffhaltiges Sesquiterpenketon der Guaiane-Familie (Abb. 1), dessen Struktur starke hydrophobe und schwach polare Bereiche aufweist (Wood et al., 2008; Siebert et al., 2008; Mattivi et al., 2011).

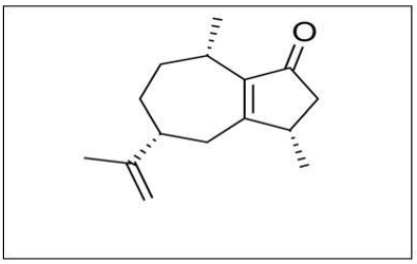


Abb. 1: Strukturformel (-)-Rotundon; (3S,5R,8S)-3,8-Dimethyl-5-prop-1-en-2-yl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-2H-azulen-1-on

Die verwendeten Analysenmethoden zur Gehaltsbestimmung von Rotundon im ng/l-Bereich in Wein reichen von der einer gekoppelten SPE-SPME-GC-MS bei Siebert et al.(2008) bzw. einer SPE-SPME-GC-MS/MS-Variante bei Mattivi et al. (2011) über eine einfach gehaltene SPE mit nachgeschalteter large volume-Injektion bei Cullere et al (2016) bis hin zu einer stir bar-Extraktion mit multidimensionaler GC-MS bei Takase et. al. (2015). Ohne entsprechende Anreicherung/Isolierung (z. B. mittels SPE-SPME, SBSE) oder selektive Chromatografie (z. B. multidimensionale GCxGC) bzw. Massenspektrometrie (GC-MS, GC-MS/MS) ist eine Detektion/Quantifizierung im ng-Bereich in der Probenmatrix Wein unmöglich.

Bei (-)-Rotundon handelt es sich um die erste Sesquiterpenverbindung, zu welcher herausgefunden wurde, dass sie zu Trauben- und Weinaroma in 'Shiraz' beiträgt (Siebert et al., 2008; Wood et al., 2008). Außer in 'Shiraz' wurde (-)-Rotundon mittlerweile in verschiedenen anderen Weinsorten rund um den Globus, wie 'Vespolina', 'Schioppettino', 'Grüner Veltliner', 'Graciano', 'Maturana tinta',' Duras', 'Pineau d´Aunis', 'Gamay', 'Pinot Noir', 'Durif' und 'Riesling' identifiziert und in einem Konzentrationsbereich von wenigen ng/l bis zu 300 ng/l quantifiziert. (Caputi et al., 2011; Mattivi et al., 2011; Herderich et al., 2012; Cullere et al., 2016).

Einen Überblick über die gefundenen Konzentrationen an Rotundon in verschiedenen Rebsorten liefert die folgende tabellarische Übersicht (Tab. 1).

Tab. 1: Rotundon-Konzentrationen in verschiedenen Rebsorten (GEFFROY und DESCÔTES, 2017)

| Rebsorten | Rotundongehalt (ng/) | Rebsorten | Rotundongehalt (ng/l) | Rebsorten | Rotundongehalt (ng/l) |
|---|---|---|---|---|---|
| Duras | 0--340ng/l* | Malbec | 0-51ng/l* | Pineau dÁunis | 0-200ng/l* |
| Prunelard | 0-85ng/l* | Syrah | 3-231ng/l* | Castets | 0-50ng/l* |
| Fer | 0-18-50ng/l* | Pinot noir | 0-38ng/l* | Mondeuse | 0-62ng/l* |
| Abouriou | 0-117ng/l* | Gamay | 0-140ng/l* | Arani | 0-68* |
| Négrette | 0-38ng/l* | Mourvédre | 0-32ng/l* | | |

In Pflanzen wird (-)-Rotundon aus der Sesquiterpen-Vorläufersubstanz α-Guaien durch Luftoxidation und biosynthetische Transformation gebildet (HUANG et al., 2014; DREW et al., 2015; TAKASE et al., 2016; ZHANG et al., 2016). MATTIVI (2016), welcher sich in einem Artikel mit den Schlüsselenzymen hinter dem Pfefferaroma beschäftigte, bemerkte bezüglich der Bildung von (-)-Rotundon, dass zuerst die enzymatische Bildung der Vorläufersubstanz α-Guaien erforderlich ist, gefolgt von der nicht-enzymatischen Bildung von (-)-Rotundon durch Luftautooxidation von α-Guaien. Auch in der Rebe sind für die Bildung von terpenoiden Geruchsinhaltsstoffen gemischte Formationsmechanismen aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Schritten verantwortlich.

CAPUTI et. al. (2011) haben festgestellt, dass (-)-Rotundon während der Reife im Exocarp der Traube akkumuliert wird. Daraus kann man schließen, dass der (-)-Rotundongehalt im Wein auch von der Maischestandzeit und dem Kontakt mit der Beerenhaut abhängig ist. Während der (-)-Rotundongehalt in den Beeren durch die Blattentfernung stark reduziert wird, verbessert eine Bewässerung die Akkumulation in den Beeren (GEFFROY et al., 2014). Dies ist plausibel, da (-)-Rotundon in Traubenblättern und Stielen (CAPONE et al., 2012) und sogar in den Blütenkappen von Reben der Sorte 'Shiraz' in der pre-veraison-Phase (ZHANG et al., 2016) nachgewiesen wurde. Eine weitere Studie (CAPONE et al., 2012) hat gezeigt, dass die Anwesenheit von zusätzlichen Traubenblättern und -stielen während der Gärung eine Erhöhung des (-)-Rotundongehalts bewirkt. So wurde die Konzentration an (-)-Rotundon in Wein durch die Anwesenheit von zusätzlichen Traubenblättern und -stielen um das Sechsfache gegenüber der reinen Vergärung von Trauben gesteigert.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Konzentration an (-)-Rotundon in Trauben der Sorte 'Shiraz' innerhalb eines Weinguts räumlich deutlichen Schwankungen unterliegt. (GEOFFROY et al., 2014; SCARLETT et al., 2014; ZHANG et al., 2015a). So wurde das Sesquiterpen (-)-Rotundon nur in einem australischen Wein der Sorte 'Shiraz' aus einem kühleren Klima und nicht in einem Wein aus einem wärmeren Klima nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass seine Bildung und Stabilität in kälteren Umgebungen höher sein kann (MAYR et al., 2014).

Hinsichtlich Sensorik wird von (-)-Rotundon erwartet, dass dieses relativ schwere Aroma (monoisotopische Masse 218.167065 und vorhergesagter Siedepunkt über 300 °C) das olfaktorische Epithel entweder direkt (orthonasal) oder hinter der Kehle (retronasal) erreicht (MATTIVI et al., 2011). Bemerkenswert sind die niedrige Wahrnehmungsschwelle von 8 ng/l in Wasser und 16 ng/l in Wein (SIEBERT et al., 2008), weshalb (-)-Rotundon von FERREIRA et al. (2012) als eine der 16 wichtigsten Aromakomponenten in Wein bezeichnet wurde. Eine Besonderheit dieser Verbindung ist eine spezifische Anosmie, wonach etwa 20 % der Panelisten diese Verbindung während der ersten sensorischen Versuche bei der höchsten getesteten Konzentration (4000 ng/l) auch im Wasser nicht nachweisen (WOOD et al., 2008).

## MATERIAL UND METHODEN

### WEINE

Untersucht wurden 105 österreichische Weine der Sorte 'Grüner Veltliner' der Jahrgänge 2009 bis 2015. Die Aufteilung auf die Weinbaugebiete bzw. Regionen war wie folgt (Probenanzahl): Bergland (1), Carnuntum (1), Kamptal (10), Kremstal (11), Neusiedlersee (2), Neusiedlersee-Hügelland (2), Thermenregion (2), Traisental (4), Wachau (8), Wagram (20), Weinviertel (42), Wien (1).

Die Verteilung der Proben auf die verschiedenen Jahrgänge ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Jahrgangsmäßige Aufteilung der untersuchten Weinproben

| Jahrgang | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gesamtprobenanzahl | 14 | 12 | 2 | 3 | 25 | 36 | 13 |

## CHEMISCHE ANALYSEN

### CHEMIKALIEN UND MATERIAL

Folgende Lösungsmittel waren für die schrittweise Abfolge und Umsetzung der SPE notwendig:
n-Pentan 99,5 % p.A. (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Methanol HiPerSolv CHROMANORM®., gradient grade for HPLC (VWR Chemicals, Radnor, USA)
Dichlormethan ROTISOLV® ≥99,8 %, (Roth, Ort, Land).
Der verwendete (-)-Rotundonstandard wies eine Reinheit von 95 % auf und wurde von der Firma Chiroblock (Bitterfeld-Wolfen, Deutschland) synthetisiert.
Als interner Standard wurde 5,7-Dimethyl-1-tetralon (CAS: 13621-25-5 Reinheit von 97 % von Sigma Aldrich, St. Louis, USA) eingesetzt, da diese Verbindung sich ähnlich wie der Zielanalyt (-)-Rotundon verhielt. Dies bedeutet, dass sich durch die Verwendung dieser Verbindung sowohl Verluste bei der Festphasenextraktion als auch matrixabhängige Suppressionseffekte des GC-Signals korrigieren lassen.

### SPE-PROBENVORBEREITUNG

Es wurde eine Festphasenextraktion (Solid Phase Extraktion, SPE) mittels Schwerkraft auf LiChrolut EN-Säulchen mit 500 mg Festphase (Merck, Wien, Österreich) und 6 ml Gesamtvolumen durchgeführt. Die Säulchen wurden vorher mit 10 ml n-Pentan, 10 ml Methanol und schließlich mit 20 ml Modellwein (12 % EtOH (Ethanol absolut AnalaR NORMAPUR® ACS, VWR Chemicals, Radnor, USA) gepuffert auf pH 3,2) gereinigt und konditioniert (Abb. 2). 100 ml Weinprobe wurden nach Versetzen und Homogenisieren mit 100 µl internem Standard (5,7-Dimethyltetralon; Konzentration 1 mg/l) durch das Säulchen perkoliert. Das Säulchen wurde dann mit entionisiertem Wasser gewaschen und das (-)-Rotundon mit 10 ml N-Pentan/Dichlormethan (Verhältnis 4:1) eluiert. Das organische Lösungsmittel wurde unter Vakuum und unter Verwendung eines Rotovapors (Büchi R-200, Flawil, Schweiz) entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde in 1 ml 50%igem Ethanol gelöst. Dieser aufgenommene Rückstand wurde zu 14 ml entionisiertem $H_2O$ in ein 20 ml "headspace vial" überführt. Diese Lösung wurde mit der SPME-GC/MS-Methode analysiert.

### ANALYSE MITTELS IMMERSION-SPME-GC-MS

Für die Immersions-SPME-GC-MS-Analyse wurde ein Gaschromatograf (Agilent Technologies, Typ 7890A, Santa Clara, USA) mit einem Autosampler (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und gekoppelt an ein Massenspektrometer (Agilent Technologies, Typ 5975C, Santa Clara, USA) verwendet. Eine Polydimethylsiloxan/Divinylbenzol-65µm-Faser (Supelco, Bellefonte, PA, USA) wurde für 60 min bei 35 °C unter Rühren in die Probe eingetaucht und dann im Injektor bei 250 °C für 5 min im Splitless-Modus desorbiert.
Die GC-Trennung erfolgte auf einer 60 m ZB-5MS Kapillarsäule mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 µm (Zebron ZB-5MS, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Ultrareines Helium (5.0, AIR LIQUIDE AUSTRIA GmbH, Schwechat, Österreich) wurde als Trägergas mit einer konstanten Flussrate von 1,1 ml/min verwendet. Die Ofentemperatur wurde anfänglich für 3 min bei 50 °C gehalten und dann mit einer Geschwindigkeit von 20 °C/min auf 150 °C erhöht, anschließend mit einer Rate von 2,7 °C auf 210 °C gesteigert, bevor sie mit einer Geschwindigkeit von 50 °C/min auf 260 °C gesteigert und dann diese Endtemperatur für 8,5 min gehalten wurde. In Summe ergab dies eine Gesamtlaufzeit von 39,722 min.
Das Massenspektrometer wurde im Elektronenionisierungsmodus (EI) bei 70 eV betrieben. Die Überleitungstemperatur/Transferlinie des Massenspektrometers wurde bei 250 °C gehalten. Die Retentionszeiten für (-)-Rotundon bzw. den internen Standard 5,7-Di-

methyl-1-tetralon betrugen 24,880 min bzw. 22,420 min. (Abb. 3). Im selektierten Ionenüberwachungsmodus (SIM) wurden zur Quantifizierung von (-)-Rotundon die charakteristischen Massenfragmente bei m/z 203 und 218 und für den internen Standard 5,7-Dimethyl-1-tetralon die Ionen bei m/z 146 und 174 verwendet.

Die Datenerfassung und -analyse erfolgte mit der Software Agilent G1701CA-ChemStation (Santa Clara, USA).

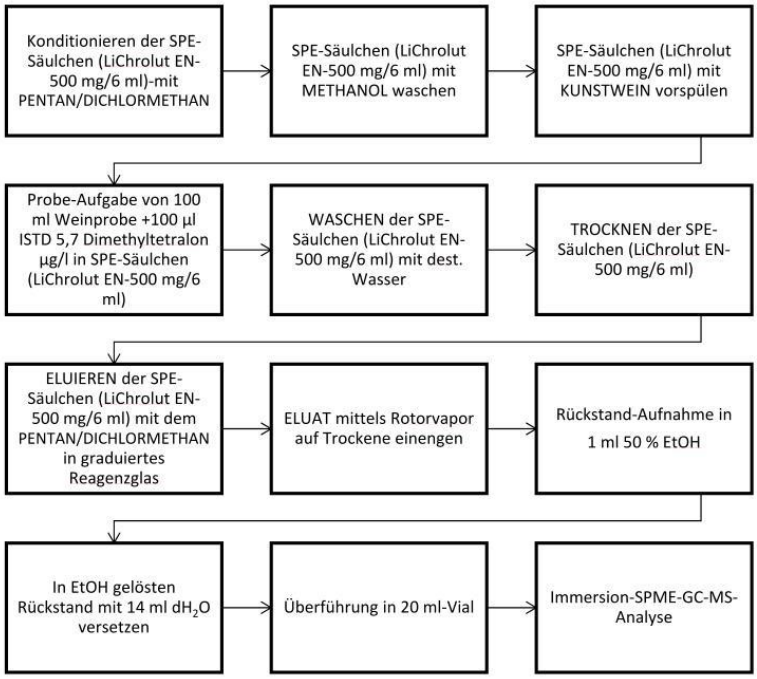



Abb. 2: Probenaufarbeitung für die Analyse von (-)-Rotundon

## ANALYTISCHE KENNZAHLEN ZU DER IMMERSED SPME-GC-MS-ANALYSE

Die Validierung der Analytik erfolgte durch Untersuchung der Parameter Linearität, Wiederholbarkeit, Wiederfindung und Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ).

Die Linearität der Methode wurde sowohl in synthetischem Modellwein wie auch in einem realen Wein der Sorte 'Grüner Veltliner' mittels Standardaddition bis zu 500 ng/l evaluiert. Der lineare Korrelationskoeffizient beträgt für den gesamten Konzentrationsbereich im synthetischen Modelwein 0,999792 und in realer Weinmatrix 0,997791. Für die Bestimmung der Wein-

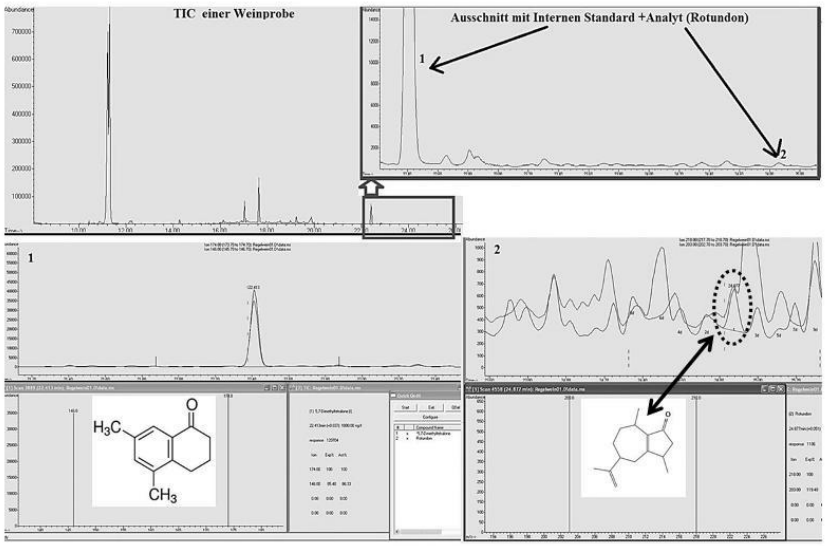



Abb. 3: Chromatogramm Weinprobe mit internem Standard ( 5,7-Dimethyltetralon) und dem Zielanalyten (-)-Rotundon

proben wurde die Kalibration über die Standardaddition (5 Konzentrationslevel durch Zugabe von 50 ng, 100 ng, 125 ng, 250 ng und 500 ng Rotundon) in realer Weinmatrix herangezogen. Da für die Bestimmung von Rotundon kein Referenzmaterial (= deuteriertes Rotundon) verfügbar war, wurde als interner Standard die Verbindung 5,7-Dimethyltetralon herangezogen, da diese ähnliche Stoffeigenschaften wie der Zielanalyt aufweist. Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Analysenverfahrens wurde die gesamte Analyse mit derselben Probe innerhalb einer Serie (9- bzw. 14-mal) durchgeführt. Die relative Standardabweichung der Methodenpräzision (RSD) betrug 10,5 % mit der Modelweinkalibration. Die Wiederfindung bei verschiedenen mit 100 ng/l gespikten Weinproben bewegte sich zwischen 102 und 124 %. Die Nachweisgrenze (LOD) von 3 ng/l und die Bestimmungsgrenzen (LOQ) von 10 ng/l wurden als diejenigen Konzentrationen definiert, bei denen die Signal-Rausch-Verhältnisse 3:1 bzw. 10:1 betragen. Für die Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden die Chromatogramme von Weinen mit geringen Mengen (<15 ng/l Rotundon) und die Signalhöhe eines 10 ng/l Standards als Grundlage herangezogen und Signalrauschen über das Retentionszeitfenster des Zielanalyten mit der Agilent Software Data Analysis (Santa Clara, USA) berechnet.

Für die Erfassung und statistische Auswertung wurden Software-Programme wie MS EXCEL, IBM SPSS 24.0 und OriginPro 2017 genutzt.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Rahmen der Studie wurden 105 österreichische Handelsproben der Sorte 'Grüner Veltliner' hinsichtlich ihres Gehalts an (-)-Rotundon untersucht. Die Gehalte liegen zwischen 9,5 ng/l und 87,5 ng/l. Um den Einfluss des Jahrgangs bzw. der Weinherkunft abzuleiten, werden nachfolgend dementsprechende Darstellungen präsentiert.

## EINFLUSS DES JAHRGANGS AUF DIE (-)-ROTUNDONGEHALTE

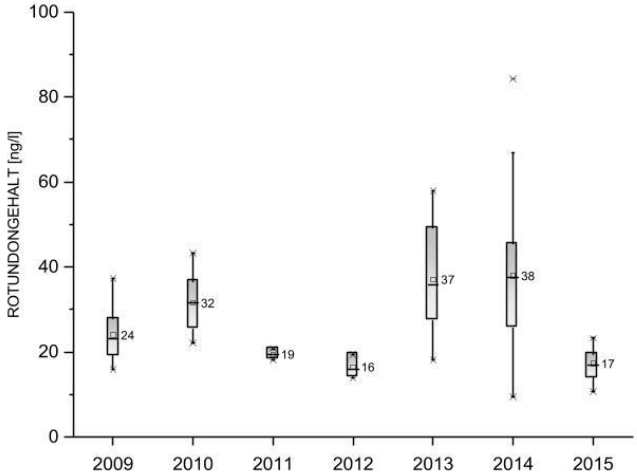



Abb. 4: Boxplot-Darstellung Einfluss des Jahrgang (2009 bis 2015) auf den (-)-Rotundongehalt

Für die Untersuchung wurden 105 österreichische Qualitätsweine herangezogen, die Proben verteilten sich auf folgende sieben Jahrgänge: 2009 (14 Proben), 2010 (12 Proben), 2011 (2 Proben), 2012 (3 Proben), 2013 (25 Proben), 2014 (36 Proben) und 2015 (13 Proben). Betrachtet man die Boxplots der Analysenresultate aller Jahrgänge von 2009 bis 2015, bewegt sich die ermittelte Konzentration zwischen 9,5 und 84,3 ng/l. Der durchschnittliche gefundene (-)-Rotundongehalt der 105 Proben liegt zwischen 32 und 33 ng/l. Im Detail lassen sich von jeder Kastengrafik für jedes Jahr folgende Kennwerte festhalten bzw. ablesen. Das Maximum von 2009 liegt bei 37 ng/l, 2010 bei 43 ng/l, 2011 bei 21 ng/l, 2012 bei 19 ng/l, 2013 bei 58 ng/l, 2014 bei 67 ng/l und 2015 bei 23 ng/l. Folgende jahrgangsbedingten Minima wurden gefunden: 2009: 16 ng/l; 2010: 22 ng/l; 2011: 18 ng/l, 2012: 14 ng/l, 2013: 18 ng/l, 2014: 9,5 ng/l, 2015: 11 ng/l .Der Median weist 2009 einen Wert von 24 ng/l auf, 2010 betrug er 32 ng/l, 2011 19 ng/l, 2012 16 ng/l, 2013 37 ng/l, 2014 38 ng/l und 2015 17 ng/l.

Um die Jahrgangsunterschiede erklären zu können, sollte man die förderlichen äußeren Verhältnisse für die Akkumulation von (-)-Rotundon beachten. Laut Zhang et al. (2015) sind dies kühle klimatische Bedingungen. Dies würde somit erklären, warum die durchschnittliche Rotundonkonzentration in kühleren Jahrgängen wie 2010 und 2014 höher ist als in wärmeren Jahrgängen wie 2009, 2011, 2012 und 2015. Die für diese Aussage zugrundeliegenden Klima-Informationen bezüglich Einteilung in wärmere, trockenere Jahrgänge beziehungsweise feuchtere, kühlere Jahrgänge stammen einerseits von der Webseite der österreichischen Weinmarketing (http://www.oesterreichwein.at/daten-fakten/oesterreichs-jahrgaenge-1986-2015/; 04. 12. 2017) bzw. der Webseite der Zentralanstalt für Meterologie (Monatsrückblick Juli/August 2009 bis 2015, https://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick; 04.12. 2017). Im Jahr 2013 mit eher warmen Sommermonaten wurden durchschnittlich höhere (-)-Rotundongehalte gefunden als in den anderen

warmen Jahrgängen. Dies könnte unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass das Klima in den einzelnen Regionen unterschiedlich sein kann und auch die künstliche Bewässerung eventuell eine Rolle spielt (z. B. Wachau-Bewässerung bzw. Donauraum-Mikroklima). Neben dem Einfluss von niedrigen Temperaturen ist auch erwiesen, dass die Wasserversorgung der Reben (feuchtere Jahrgänge) für die vermehrte Bildung von Rotundon entscheidend ist (Geffroy et al., 2014). Speziell das Jahr 2014 war ein kühles, niederschlagsreiches Jahr, und hier ist auch der durchschnittliche Rotundongehalt mit fast 85 ng am höchsten, was die Beobachtung von Zhang et al. (2015) bestätigt. Sie definierten, dass der Wert Traubentemperatur/Anzahl der täglichen Sonnenstunden negativ mit der Rotundonkonzentration korreliert. Demzufolge führen heiße und trockene Jahre wie 2015, 2012, 2011 zu geringeren Menge an vorhandenem (-)-Rotundon gegenüber kühlen Jahren.

## EINFLUSS DES WEINBAUGEBIETES AUF DIE (-)-ROTUNDONGEHALTE

Die Auswirkungen des Weinbaugebietes auf den (-)-Rotundongehalt werden in Abbildung 5 veranschaulicht. Schon ein Blick auf die Mittelwerte belegt, dass der Faktor Region eine nicht zu unterschätzende Rolle in Bezug auf den Rotundongehalt spielen dürfte, da die Werte von 9,95 bis 42,74 ng/l variieren. Eine Reihung der Gebiete nach dem durchschnittlichen Rotundongehalt wird von der Wachau angeführt, gefolgt von Kamptal, Wagram, Kremstal und Weinviertel. Aus den Boxplot Darstellungen lassen sich folgende Medianwerte, geordnet nach der Größe, ablesen: Wachau: 42,74 ng/l; Kamptal: 37,0 ng/l; Wagram: 30,2 ng/l; Kremstal: 28,1 ng/l; Weinviertel: 26,16 ng/l; Traisental: 24,76 ng/l; Neusiedlersee: 21,3 ng/l; Wien: 17,7 ng/l; Neusiedlersee-Hügelland: 15,45 ng/l; Thermenregion: 12,12 ng/l und Bergland:

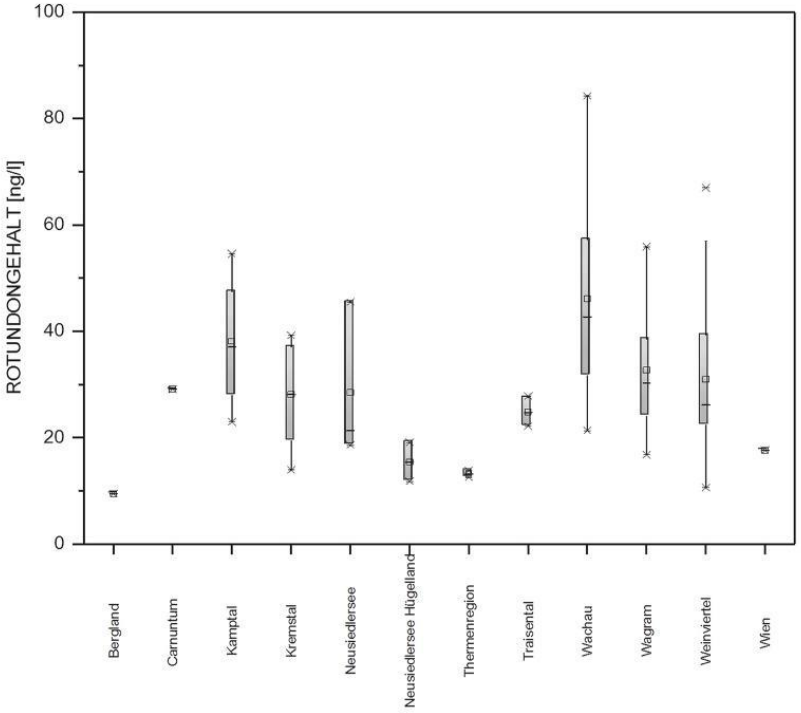



Abb. 5: Einfluss des Weinbaugebietes/der Weinbauregion auf den Rotundongehalt

9,95 ng/l. Eine eindeutige Interpretation der Daten bezüglich des Einflusses der klimatischen Verhältnisse auf die Unterschiede zwischen den Gebieten ist nicht möglich, da beispielsweise im kühleren Bergland die Gehalte niedriger als im wärmeren Burgenland sind. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die Unterschiede zwischen den Gebieten auf verschiedene Einflussfaktoren und deren Kombination (z. B. Klima, Boden, Klon, Erntetermin, Weingartenmanagement) zurückzuführen sind. Klarerweise sollte deren Erforschung den Inhalt weiterer Studien darstellen.

## KOMBINIERTER EINFLUSS VON WEINBAUGEBIET UND JAHRGANG AUF DIE (-)-ROTUNDONGEHALTE

Wie schon bereits zuvor angemerkt, liegt ein Einfluss von Jahrgang und Weinbaugebiet auf die (-)-Rotundongehalte vor, und zusätzlich sind auch Wechselwirkungen von Jahrgang und Region aus den Daten ersichtlich (Abb. 6). Besonders auffällig sind die Unterschiede bei den Jahrgängen 2014 und 2013 in der Wachau, aber der klimatische bedingte Einfluss wird auch in den anderen Gebieten, wie Wagram, Weinviertel, Kremstal, Kamptal, sichtbar. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen des Australian Wine Research Institute (Geoffrey et al., 2015), wonach eine große Variabilität der (-)-Rotundongehalte in verschiedenen Weingärten und zwischen verschiedenen Jahrgängen besteht.

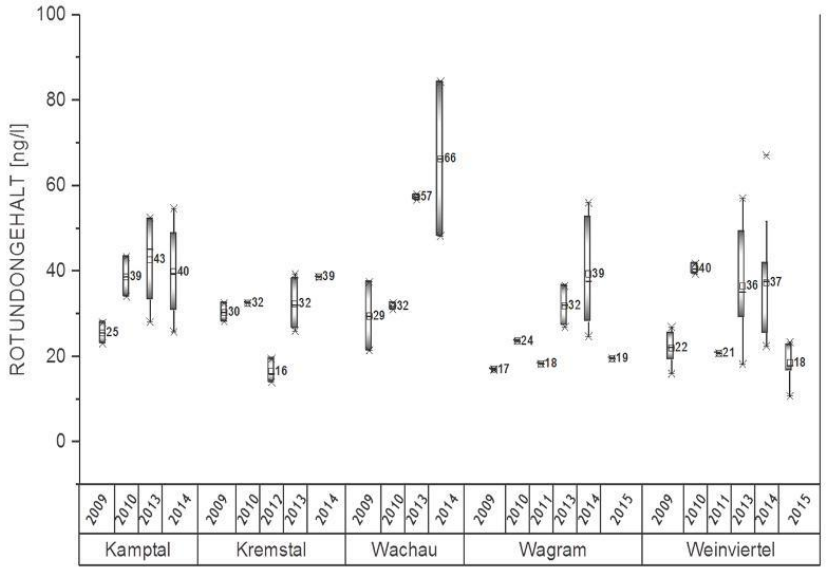



Abb. 6: Kombinierter Einfluss des Weinbaugebietes und der Region auf den Rotundongehalt

## SCHLUSSFOLGERUNG

Da die analysierten Gehalte an (-)-Rotundon in den meisten untersuchten Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' den von Siebert et al. (2008) beschriebenen Schwellenwert von 16 ng/l überschreiten, kann postuliert werden, dass (-)-Rotundon eine Markersubstanz für das Pfefferaroma ist, welches wiederum ein geruchsprägender Bestandteil in österreichischen Grüner Veltliner-Weinen darstellt. Angesichts dieser direkten Verknüpfung von (-)-Rotundon mit dem pfeffrigen Aroma des Weins eröffnen sich Möglichkeiten (z. B. Bewässerung, Laubwandmanagement, Klonenwahl) und önologische Maßnahmen (z. B. Maischestandzeit, Schwefelung, Hefewahl) exakter zu bestimmen, wodurch es möglich sein sollte, die Ausprägung des "Pfefferl"-Potenzials eines Weines gezielter zu fördern. Denn gerade die künftig absehbaren klimatischen Veränderungen, wie beispielsweise eine höhere Temperatur und veränderte Niederschlagsmuster, könnten für die Synthese bzw. Akkumulation dieser Verbindung in Trauben ungünstig sein. Da die Pfefferaromatik ein wesentlicher Bestandteil des regionalen Profils österreichischer Weine der Sorte 'Grüner Veltliner' darstellt, werden diese Veränderungen noch eine große Herausforderung darstellen. Bezüglich der sensorischen Relevanz von (-)-Rotundon muss aber einschränkend nochmals betont werden, dass rund 20 % der Personen eine Anosmie aufweisen und sogar 4000 ng/l im Wein nicht erkennen können (Wood et. al., 2008). Deswegen sollte die subjektive sensorische Beschreibung von Weinen nicht geringgeschätzt werden, da die Sensorik auf einem Zusammenspiel vieler Komponenten (z. B. Fruchtaromen, Vegetabilitätsaromen und bodenassoziierter Aromen) beruht und sich nicht nur auf eine einzelne Aromasubstanz bezieht. Unabhängig von der analytischen oder sensorischen Sichtweise ist österreichischer 'Grüner Veltliner' mit seiner Pfeffer-Note ein einmaliges und unverkennbares sensorisches Stück Heimat.

## LITERATUR

Bramley, R. G. V., Siebert, T. E., Herderich, M. J. and Krstic, M. P. 2017: Patterns of within-vineyard spatial variation in the 'pepper'compound rotundone are temporally stable from year to year. Australian Journal of Grape and Wine Research 23(1): 42-47.

Capone, D. L., Jeffery, D. W. and Sefton, M. A. 2012: Vineyard and fermentation studies to elucidate the origin of 1, 8-cineole in Australian red wine. Journal of agricultural and food chemistry 60(9): 2281-2287.

Caputi, L., Carlin, S., Ghiglieno, I., Stefanini, M., Valenti, L., Vrhovsek, U. and Mattivi, F.2011: Relationship of changes in rotundone content during grape ripening and winemaking to manipulation of the 'peppery' character of wine.J Agric Food Chem. 2011 May 25;59(10):5565-71. doi: 10.1021/jf200786u. Epub 2011 May 2.

Culleré, L., Ontañón, I., Escudero, A. and Ferreira, V. 2016: Straightforward strategy for quantifying rotundone in wine at ngL(-1) level using solid-phase extraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. Occurrence in different varieties of spicy wines.Food Chem. 2016 Sep 1;206:267-73. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.03.039. Epub 2016 Mar 15.

Drew, D. P., Andersen, T. B., Sweetman, C., Møller, B. L., Ford, C. and Simonsen, H. T. 2015: Two key polymorphisms in a newly discovered allele of the *Vitis vinifera* TPS24 gene are responsible for the production of the rotundone precursor α-guaiene. Journal of experimental botany, erv491.

Geffroy, O., Dufourcq, T., Carcenac, D., Siebert, T., Herderich, M. and Serrano, E. 2014: Effect of ripeness and viticultural techniques on the rotundone

concentration in red wine made from *Vitis vinifera* L. cv. Duras. Australian Journal of Grape and Wine Research 20(3): 401-408.

Geffroy, O., Yobrégat, O., Dufourcq, T., Siebert, T. and Serrano, E. 2015:. Certified clone and powdery mildew impact rotundone in red wine from *Vitis vinifera* L. cv. Duras N. OENO One 49(4): 231-240.

Geffroy, O., Scholasch, T., Dufourcq, T. and Serrano, E. 2015: Understanding and mapping rotundone spatial variability in *Vitis vinifera* L. cv Duras. In 19th International Meeting GiESCO (Vol. 2, pp. 589-592). , (2015, May).

Geffroy, O., Buissière, C., Lempereur, V. and Chatelet, B. 2016:. A sensory, chemical and consumer study of the peppery typicality of French gamay wines from cool-climate vineyards. OENO One 50(1): 35-47.

Geffroy, O., Siebert, T., Herderich, M., Mille, B. and Serrano, E. 2016:. On-vine grape drying combined with irrigation allows to produce red wines with enhanced phenolic and rotundone concentrations. Scientia Horticulturae 207: 208-217.

Guth, H. 1997: Identification of character impact odorants of different white wine varieties. J. Agric. Food Chem. 45: 3022 – 3026.

Herderich, M., Siebert, T., Parker, M., Capone, D., Jeffery, D., Osidacz, P. and Francis, I. 2012: Spice up your life: Analysis of key aroma compounds in Shiraz ACS Symposium Series 2012

Huang, A. C., Burrett, S., Sefton, M. A. and Taylor, D. K. 2014:. Production of the pepper aroma compound,(−)-rotundone, by aerial oxidation of α-guaiene. Journal of agricultural and food chemistry 62(44): 10809-10815.

Ferreira, V.; Lopez, R. and Cacho, J. F. 2000: Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. J. Sci.Food. Agric. 1667: 1659 – 1667.

Ferreira, V. 2012, November: Bases moléculaires de l'arôme du vin. In Proceedings of the International Symposium on Wine Aromas (VINAROMAS project, pp. 5-6

Flak, W.; Krizan, R.; Kutscher, W.; Tscheik, G. und Wallner, E. 2007: Charakterisierung von Weinen der Sorte „Grüner Veltliner" aus verschiedenen Herkünften im Weinbaugebiet Weinviertel. Mitt. Klosterneuburg 57: 131-139.

Flak, W., Krizan, R., Passmann, G., Tscheik, G. und Wallner, E. 2009: Charakterisierung von Leitweinen des Weinbaugebietes Wagram. Teil 1: ‚Grüner Veltliner'. Mitteilungen Klosterneuburg 59: 227-236.

Geffroy,O.; Descôtes, J. 2017: Rotundone et arômes poivrés des vins. Ce que l'on sait aujourd'hui; Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologicques: magazine trimestriel d'information professionnelle, Vol. 44, Nº.162, 2017, págs. 47-52

Klimek 2011 - Weinkolumne / Wein und Wahrheit:Ist Veltliner noch Veltliner? Eine Kolumne von Manfred Klimek http://www.zeit.de/lebensart/essen-trinken/2011-05/weinkolumne-veltliner/seite-2

Maarse, H.; Visscher, C. A.; Willemsens, L. C. and Boelens, M. H. 1992: Volatile Compounds in Food: Qualitative and Quantitative Data, Suppl.4; TNO-CIVO Food Analysis Institute: The Netherlands, 1992.

Mattivi, F., Caputi, L., Carlin, S., Lanza, T., Minozzi, M., Nanni, D., Valenti, L. and Vrhovsek, U. 2011: Effective analysis of rotundone at below-threshold levels in red and white wines using solid-phase microextraction gas chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. Feb 28;25(4):483-8. doi: 10.1002/rcm.4881

Mattivi, F. 2016: Key enzymes behind black pepper aroma in wines. Journal of experimental botany 67(3): 555-557.

Mayr, C. M.; Geue, J. P.; Holt, H. E.; Pearson, W. P.; Jeffery, D. W. and Francis, I.L. 2014: :Characterization of the key aroma compounds in Shiraz wine by quantitation, aroma reconstitution, and omission studies J. Agric. Food Chem. 2014 62: 4528– 4536.

Polaskov a, P.; Herszage, J. and Ebeler, S. E. 2008: Wine flavour: chemistry in a glass. Chem. Soc. Rev. 37: 2478 – 2489.
http://www.oesterreichwein.at/unser-wein/oesterreichs-rebsorten/weisswein/gruener-veltliner/

REGNER, F.; HACK, R.; HANAK, K. and SANTIAGO, J.L. 2009: The variability within the cultivar Grüner Veltliner under different aspects. Acta Horticulturae. 827: 245-252.

Scarlett, N. J., Bramley, R. G. V. and Siebert, T. E. 2014: Within-vineyard variation in the 'pepper'compound rotundone is spatially structured and related to variation in the land underlying the vineyard. Australian Journal of Grape and Wine Research 20(2): 214-222.

Schreiner , A., Brandes, W., Versini ,G., Berghofer, E. und Eder, R. 2007: Herkunftsunterscheidung von Weinen der Sorte ‚Grüner Veltliner' anhand ihrer Aromaprofile mit Hilfe von Data Mining-Techniken und Neuronalen Netzwerken. Mitteilungen Klosterneuburg 57: 2-22.

Siebert, Tracey E., Claudia Wood, Gordon M. Elsey, und Alan P. Pollnitz. 2008: "Determination of rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine." Journal of agricultural and food chemistry 56, no. 10 (2008): 3745-3748;

Strauss, C.R., Wilson, Gooley, P.R. and Williams, P.J. 1986: Role of Monoterpenes in Grape and Wine Flavor. Reprinted Symposium Series No 317, Biogenerations of Aromas.

Takase, H., Sasaki, K., Shinmori, H., Shinohara, A., Mochizuki, C., Kobayashi, H. and Takata, R. 2016:. Cytochrome P450 CYP71BE5 in grapevine (Vitis vinifera) catalyzes the formation of the spicy aroma compound (−)-rotundone. Journal of experimental botany 67(3): 787-798.

Wood, C., Siebert, T. E., Parker, M., Capone, D. L., Elsey, G. M., Pollnitz, A. P., Eggers M., Meier, M., Vössing, T., Widder, S. S. and G. Krammer. 2008: "Spice up your life–The Rotundone story." Expression of Multideisciplinary flavour science, Proceedings of the 12th Weurman Symposium, 2008: 483-485.

Wood, C, Tracey E. Siebert, Mango Parker, Dimitra L. Capone, Gordon M. Elsey, Alan P. Pollnitz, Marcus Eggers et al.2008: "From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound." Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, no. 10 (2008): 3738-3744.

Zhang, P., Barlow, S., Krstic, M., Herderich, M., Fuentes, S. and Howell, K. 2015: Within-vineyard, within-vine, and within-bunch variability of the rotundone concentration in berries of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. Journal of agricultural and food chemistry 63(17): 4276-4283.

Zhang, P., Howell, K., Krstic, M., Herderich, M., Barlow, E. W. R. and Fuentes, S. 2015: Environmental factors and seasonality affect the concentration of rotundone in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz wine. PloS one, 10(7), e0133137.

Zhang, P., Fuentes, S., Wang, Y., Deng, R., Krstic, M., Herderich, M. and Howell, K. 2016: Distribution of Rotundone and Possible Translocation of Related Compounds Amongst Grapevine Tissues in Vitis vinifera L. cv. Shiraz. Frontiers in Plant Science, 7.

Eingelangt am 5. Dezember 2017

# 3 Publikation II: Untersuchungen über den Einfluss von kellertechnischen Maßnahmen auf den Rotundongehalt in Weinen der Sorte Grüner Veltliner

Journal: Mitteilungen Klosterneuburg

Impact Factor: 0,545 → ca. 0,6

Diese Publikation wurde in den Mitteilungen Klosterneuburg veröffentlicht. Dabei wurden mit dem Werkzeug der statistischen Versuchsplanung die Auswirkungen und Wechselwirkungen von klassischen önologischen Prozessparametern wie Gärtemperatur, Maischestandzeit, Maischeschwefelung, Jungweinschwefelung, Mostklärung und Hefenährsalzzugabe auf die Konzentration des Sesquiterpens Rotundon untersucht. Aus Anwendersicht sollte herausgearbeitet, welche technologischen Schritte förderlich und welche hinderlich sind. Diese Publikation wird der zweiten großen Fragestellung *Aufklärung von den Kellerwirtschaftlichen Maßnahmen auf das Schlüsselaroma Rotundon* zugeordnet.

**Autoren und Autorinnen:** Nauer, S; Patzl-Fischerleitner, E; Philipp, C; Hann, S; Eder, R (2021).

# Untersuchungen über den Einfluss von kellertechnischen Maßnahmen auf den Rotundongehalt in Weinen der Sorte Grüner Veltliner

Stefan Nauer[1], Elsa Patzl-Fischerleitner[1], Christian Philipp[1], Stephan Hann[2] und Reinhard Eder[1]

[1] HBLA und BA für Wein- und Obstbau Klosterneuburg
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
[2] Universität für Bodenkultur, Institut für Analytische Chemie
A-1190 Wien, Muthgasse 18
E-Mail: stefan.nauer@weinobst.at

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von klassischen önologischen Parametern und Maßnahmen, wie Gärtemperatur, Maischestandzeit, Schwefelung (Maische/Jungwein), Mostklärung und Hefenährsalzzugabe, auf die Konzentration an Rotundon mittels statistischer Versuchsplanung überprüft. Dabei wurden über zwei Jahre (2011, 2012) drei voneinander unabhängige Versuchsreihen (A, B, C) basierend auf einem vollfaktoriellen $2^2$ Versuchsplan im Maßstab von je 25 Liter durchgeführt. Im Rahmen der statistischen Auswertung der Rotundongehalte wurden eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt und die Daten mittels Pareto-Diagramm, Halb-Normal-Plot, Haupteffektdiagramm und Wechselwirkungsdiagramm ausgewertet. Bei den im Rahmen des Versuchsplans A getesteten Parametern Maischestandzeit und Gärtemperatur konnten für 2011 signifikante Effekte auf den Rotundongehalt festgestellt werden, für das Jahr 2012 ist der gleiche Trend erkennbar, doch waren die Unterschiede auf dem Signifikanzniveau 0,05 nicht signifikant. Eine höhere Gärtemperatur bewirkte höhere Rotundongehalte, während eine Maischestandzeit sowohl 2011 wie auch 2012 zu einer Verringerung führte. Bei den im Versuchsplan B getesteten Parametern Maischeschwefelung und Jungweinschwefelung zeigten sich in den beiden Jahrgängen kontroverse Effekt, im Versuchsjahr 2011 ergaben sowohl die höhere Maische- wie auch die höhere Jungweinschwefelung niedrigere Rotundonwerte, während im Versuchsjahr 2012 gegenteilige Wirkungen festgestellt wurden. Im Zuge des Versuchsplans C wurde festgestellt, dass die Zugabe von Hefenährsalzen in beiden Jahren zu einer leichten Verringerung der Rotundongehalte führte, während hingegen die Auswirkungen der Mostklärung in den beiden Jahren gegensätzlich waren, wobei im Jahr 2012 eine signifikante Verringerung der Rotundonwerte, im Jahr 2011 aber eine nicht signifikante, geringe Zunahme festgestellt wurden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine höhere Gärtemperatur (23 °C), keine Standzeit, keine Maischeschwefelung sowie Verzicht auf Mostklärung zu höheren Rotundongehalten führen. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Literatur und unter anderem durch den hydrophoben Charakter von Rotundon erklärbar. Somit ist evident, dass durch Auswahl geeigneter önologischer Maßnahmen die Ausprägung der pfeffrigen Aromatik von Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' verstärkt werden kann.

**Schlagwörter:** faktorielles Design, Rotundon, Maischestandzeit, Gärtemperatur, Maischeschwefelung, Jungweinschwefelung, Mostklärung, Hefenährsalzzugabe, Aromaanalyse

**Investigation of the influence of enological factors on the Rotundone concentration of wines of the variety Grüner Veltliner.** In the present work, the effects of classical oenological parameters and measures such as fermentation temperature, maceration time, sulphurisation (mash/young wine), must clarification and addition of yeast nutrient salt on the concentration of rotundone were examined by means of statistical experimental design. Three independent test series (A, B, C) based on a full factorial

$2^2$ experimental design in a scale of 25 liters each were carried out over two years (2011, 2012). An analysis of variance (ANOVA) was carried out as part of the statistical evaluation of the rotundone content and data were evaluated using a Pareto diagram, half-normal plot, main effect diagram and interaction diagram. For the parameters mash standing time and fermentation temperature tested in the context of experimental plan A, significant effects on the rotundone content could be determined for 2011, the same trend can be seen for 2012, but the differences at significance level 0.05 were not significant. A higher fermentation temperature resulted in higher rotundone contents, while a maceration period led to a reduction in both 2011 and 2012. The parameters mash sulphurisation and young wine sulphurisation tested in experimental plan B showed controversial effects in the two vintages. In the experimental year 2011, both higher mash and young wine sulphurisation resulted in lower rotundone contents, while in the experimental year 2012 opposite effects were observed. In the course of test plan C it was found that the addition of yeast nutrient salts led to a slight reduction in the rotundone content in both years, while the effect of must clarification in the two years was the opposite, with a significant reduction in the rotundone values analyzed in 2012 while in 2011 a non-significant, small increase was noted. In summary, it can be said that a higher fermentation temperature (23 ° C), no maceration time, no mash sulphurisation and no need to clarify the must lead to higher rotundone contents. These results can be explained in agreement with literature and, among other things, by the hydrophobic character of rotundone. It is thus evident that the development of the peppery aroma of wines of the 'Grüner Veltliner' variety can be enhanced by the selection of suitable oenological measures.

**Keywords:** factorial design, rotundone, maceration time, fermentation temperature, mash sulphurisation, young wine sulphurisation, must clarification, yeast nutrient salt addition, aroma analysis

Aromaleitsubstanzen wie Methoxypyrazine, C13-Norisoprenoide, ß-Ionone undTerpene prägen die Aromatik von Weinen. All diesen Verbindungen ist gemein, dass diese Trauben-Metaboliten auf direktem Weg aus der Traube extrahiert werden. Die Technologie spielt bezüglich Ausbeute und Gehalt eine tragende Rolle. Eine Stoffgruppe, die hier an Bedeutung gewonnen hat, sind die Sesquiterpene, insbesondere Rotundon. Rotundon gilt derzeit als bekannteste Leitsubstanz für die pfeffrige Note in Rot- bzw. Weiß-Weinen, insbesondere in den Sorten 'Shiraz' und 'Grüner Veltliner' (Siebert und Solomon, 2011; Nauer et al., 2018). Das Vorkommen in der österreichischen Weißweinsorte 'Grüner Veltliner' wurde durch Messungen von Mattivi et al. (2011) und Nauer et al. (2018) in Konzentrationen jenseits der sensorisch relevanten Wahrnehmungsschwelle belegt. Generell sind für die Höhe der Rotundongehalte besonders klimatische als auch weinbauliche Effekte von Bedeutung. So ist bekannt, dass eine stärkere Akkumulation des Rotundons vorrangig in kühlen und feuchten Jahren stattfindet (Zhang et al., 2015). Über den Einfluss von weinbaulichen Maßnahmen auf Rotundon kann zusammengefasst werden, dass sich Bewässerung und späterer Lesezeitpunkt sehr positiv, Traubenausdünnung und Entblätterung zu Reifebeginn sich aber negativ auswirken (Geffroy et al., 2014). Auch wenn diese Jahrgangsabhängigkeit und auch weinbauliche Einflüsse den Rotundon-Basisgehalt maßgeblich prägen, ist jeder Winzer daran interessiert, das "Pfefferl" in Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' zu stabilisieren und jahrgangsbedingte Schwankungen zu kompensieren. Um dieses Ziel ausreichender Rotundonkonzentration zu erreichen, ist eine kellerwirtschaftliche Betrachtung unbedingt notwendig.

Rotundon befindet sich zu mindestens 98 % in der Schale der Weintraube (Caputi et al., 2011; Siebert und Solomon, 2011). Der Großteil des Rotundons wird nach Siebert und Solomon (2011) zwischen dem zweiten und fünften Gärungstag aus den Beeren extrahiert. In dieser Periode sind Enzyme sehr aktiv, und der Ethanolgehalt steigt an. Caputi et al. (2011) stellten fest, dass nur 10 % des in Trauben enthaltenen Rotundons während der Gärung extrahiert und nur 6 % in Flaschenwein wiedergefunden werden. Eine signifikante Menge Rotundon geht während der Weinbehandlung und Filtration verloren, wahrscheinlich aufgrund der hydrophoben Struktur und der Bindung an andere Materialien. Diesen hydrophoben Charakter bestätigten auch Geffroy et al.

(2017) im Rahmen eines Technologie-Vergleichs (wie Kaltmazeration, Thermovinifizierung, Kohlensäuremaischung und Rosé-Vinifizierung) im Labormaßstab. Geffroy et al. (2017) verwiesen hier besonders auf das unterschiedliche Extraktionsverhalten zwischen Anthocyanen und Rotundon, erklärbar durch die Löslichkeit von Rotundon bzw. dessen Fähigkeit, sich an andere Materialien zu binden.

Bei schalenassoziierten Aromastoffen, wie beispielsweise Terpenen, Monoterpenoiden und C13-Norisoprenoiden, kommt der Art der Mostbehandlung und dem Schalenkontakt (Maischestandzeit) eine entscheidende Bedeutung zu. Üblicherweise führt ein verlängerter Schalenkontakt zu einer effektiveren Extraktion von Terpenen, wodurch es zu einer Zunahme sortentypischer Aromen und zu einer Qualitätsverbesserung der Weine kommt. Arbeiten von Versini et al. (1981) und Marais (1987 und 1988) belegen, dass Maischestandzeit und Gärtemperatur wesentlich die Extraktion von wichtigen Traubeninhaltsstoffen beeinflussen. Eine Mazeration von zerkleinerten Trauben für 4 bis 12 Stunden bei 10 °C (Rodriguez-Bencomo et al., 2008) oder 6 bis 23 Stunden bei 15 bis 18 °C vor dem Pressen und Fermentieren (Cabaroglu et al., 1997; Cabaroglu et al., 2002; Cabaroglu et al., 2003; Selli et al., 2006; Palomo et. al., 2006) führte zu signifikanten Erhöhungen (insgesamt bis zum Doppelten) von flüchtigen Verbindungen wie Monoterpenoiden, Benzoloiden und C13-Norisoprenoiden. Auch Marais und Rapp (1988) kamen zur Erkenntnis, dass eine Maischestandzeit und Erhöhung der Gärtemperatur zu einer Steigerung des Terpengehalts führen. Auch Cabaroglu und Canbas (2002) fanden heraus, dass eine siebenstündige Maischestandzeit bei 15 °C die allgemeine und aromatische Zusammensetzung von Weinen der Sorte 'Muscat of Alexandria' nachhaltig beeinflusste, indem die Gesamtkonzentrationen an freien und gebundenen Aromastoffen erheblich anstiegen. Da die Maischestandzeit die Extraktion von Aromastoffen beeinflusst, war es von Interesse zu untersuchen, inwieweit die Rotundonkonzentration davon betroffen ist. Es ist aber auch zu bedenken, dass eine verlängerte Schalenkontaktzeit auch einen Anstieg der Trubmenge und eher unerwünschter Substanzen, wie beispielsweise Phenolen, bewirkt, was sich nachteilig auf die Weinqualität auswirken kann (Ramey et al., 1986).

Eine wichtige Maßnahme bei der Weinbereitung ist die Schwefelung, welche die am häufigsten angewendete Methode zur Stabilisierung von Weinen ist. Aus önologischer Sicht ist neben der Höhe des Zusatzes an Schwefeldioxid auch der Zeitpunkt der Zugabe (Maische, Jungwein, Füllung) von Bedeutung. Aufgrund der Feststellung von De Azevedo et al. (2007), wonach Carbonylverbindungen und Bisulfit stabile Additive, sogenannte Hydroxyalkylsulfonsäuren (HASAs), bilden, ist es vorstellbar, dass der Zusatz von Schwefeldioxid Auswirkungen auf den Rotundongehalt hat, da Rotundon eine Ketogruppe enthält. Bisulfit ist ein schwaches Nukleophil, das mit schwachen Elektrophilen leicht kovalente Addukte formt, um Sulfonate zu erzeugen. Diese Bisulfitaddition an Carbonylen kann entweder als direkte nukleophile Addition an die Carbonylgruppe (1,2-Addition) oder als Michael-Addition, beobachtet für ungesättigte konjugierte Carbonyle (1,4-Addition), zum Beispiel (E)-2-Alkenale und ß-Damascenon, stattfinden. Auch Rotundon könnte ein möglicher SO2-Binder sein, sodass die Bildung von Hydroxyalkylsulfonsäuren (HASAs) nicht von vornherein ausgeschlossen werden kann. In diesem Kontext ist unbedingt auf sterische Effekte hinzuweisen, weil mit zunehmender Anzahl und Größe der an den Carbonylkohlenstoff gebundenen Alkylgruppen der Angriff des Nucleophils auf die Carbonylgruppe immer schwieriger wird, wodurch die Reaktivität entsprechend abnimmt. Dieser Effekt wird sterische Hinderung oder Verdichtung genannt. Somit ist erklärbar, dass aliphatische Aldehyde wie Formaldehyd und Acetaldehyd mit S (IV) eher schneller und leichter Addukte bilden, während Ketone, cyclische Aldehyde und trans-Alkene schwach interagieren und überwiegend in ihrer freien Form zu finden sind. Da es sich bei Rotundon um ein cyclisches Keton handelt, ist es unwahrscheinlich, dass überhaupt eine Bisulfit-Rotundon-Bindung stattfindet, und selbst wenn diese nucelophile Addition stattfinden würde, ist kaum eine signifikante Erhöhung der Hydrophile zu erwarten. Interessanterweise zeigen Rotundon und Anthocyane dennoch ein unterschiedliches Extraktionsverhalten wie Geffroy et al. (2017) in ihrer Arbeit im Labormaßstab beschreiben. Eine Abklärung in größerem Maßstab, ob durch die Schwefelung von Most und Jungwein ein positiver oder negativer Effekt auf den Rotundongehalt feststellbar ist, wird als sinnvoll erachtet.

Neben Maischestandzeit, Gärtemperatur, Maische- und Jungweinschwefelung könnten auch Mostklärung und Hefenährsalzzugabe einen Einfluss auf die Rotundonkonzentration haben. Während es häufig ist, dass flüchtige Weinaromastoffe aus ihren geruchlosen Vorläufern (wie Glykosiden oder Cystein-S-Konjugaten) freigesetzt werden, wird Rotundon direkt aus den Trauben extrahiert. Die Extraktion erfolgt ohne weitere chemische oder biochemische Umwandlung während der Weinherstellung. Auch wenn ein Großteil der Monoterpen-Konzentrationen in Weinen aus der Freisetzung von glykosidisch- gebundenen Vorstufen stammt, kommt ein gewisser Teil aus direkter Extraktion. Die Gemeinsamkeit der direkten Extraktionen ist auch der Grund, weshalb der Vergleich mit Monoterpen in den folgenden Erläuterungen bewusst gewählt wird, um bereits technologische Erkenntnisse von Monoterpenen für das mögliche Verhalten von Rotundon abzuleiten (Herderich et al., 2012).

Wie Williams et al. (1978) erläuterten, wirkt sich die Mostklärung auf die sensorische Qualität von Weißwein unterschiedlich aus. Rasch geklärte Moste waren leicht und sehr fruchtig, während eine späte Mostklärung den Weinen einen würzigen und komplexen Eindruck verlieh. Dies bestätigten auch Moio et al. (2004), die beobachteten, dass die Konzentrationen von Terpenen und ihrer glykosylierten Vorläuferverbindungen in Weinen höher waren, die aus Most mit höherem Trubgehalt im Most gewonnen wurden. Andere Forscher wie Swiegers et al. (2005) haben hingegen gezeigt, dass die Trübungsreduktion durch Mostklärung zu einer Verringerung der Vorläufersubstanzen für das Sortenaroma führte. Die kellertechnische Maßnahme der Mostklärung könnte somit auch Auswirkungen auf das Rotundon haben, da dieses schalenassoziiert und hydrophob ist und sehr wahrscheinlich durch Filtrationsmaßnahmen und Klärungen abgetrennt werden kann. Ein Einfluss der Hefenährsalzzugabe auf die Aromatik wurde von Carrau et al. (2005) beschrieben, wobei sie höhere Konzentrationen an Terpenen in Weinen fanden, die aus Mosten mit höherem Stickstoffgehalt hergestellt wurden. Dies führten sie auf eine durch Stickstoff induzierte Veränderung der Terpenbiosynthese zurück. Auch Vilanova et al. (2012) schrieben, dass man den Weinstil durch Zugabe von Diammoniumphosphat (DAP) beeinflussen kann. Eine gemäßigte DAP-Zugabe (0,5 g/l) erzeugte im Vergleich zum Kontrollwein höhere Konzentrationen an sortentypischen Aromaverbindungen, insbesondere Monoterpenen wie Limonen (Zitronennote), Linalool (Blüten, Zitrusfrüchte), Terpineol (Flieder), C13-Norisoprenoide ß-Ionon (Tabak) und β-Damascenon (Apfel, Rose). Die DAP-Zugabe führte bei fünf von sechs ausgewählten Verbindungen zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentration und einer Überschreitung der Schwellenwerte. Dieses Ergebnis legt nahe, dass Hefenährsalze verwendet werden könnten, um den Sortencharakter moderat zu verstärken. Ob eine Hefenährsalzgabe auch im Fall des Sequiterpens Rotundon zu einer Zunahme der Gehalte führt, sollte daher überprüft werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von gängigen önologischen Maßnahmen, wie Maischestandzeit, Gärtemperatur, Maischeschwefelung, Jungweinschwefelung, Mostklärung und Hefenährsalzzugabe auf den Gehalt von Rotundon bei der Sorte 'Grüner Veltliner' mittels statistischer Versuchsplanung zu testen.

## Material und Methoden

### Material

Als Ausgangsmaterial dienten pro Versuchsjahr (2011, 2012) ca. 900 kg Trauben der Sorte 'Grüner Veltliner' vom Versuchsgut Agneshof der Höheren Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau Klosterneuburg aus der Weinbauregion Wagram (Riede Harrer). Die Trauben waren vollkommen gesund und vollreif, und die Mostgradation betrug im Lesejahr 2011 18,8 °KMW und im Jahr 2012 19,5 °KMW. Das Lesegut wurde auf drei Chargen entsprechend den drei Versuchsplänen aufgeteilt. In jedem Versuchsplan wurden zehn (Versuchplan A + B) bzw. acht (Versuchsplan C) Varianten durchgeführt, sodass in Summe 28 Vinifizierungen in 35 l-Glasballons erfolgten.

### Versuchsaufbau und Umsetzung

Mit Hilfe dreier voneinander unabhängiger Versuchspläne (A, B, C) mit $2^2$ vollfaktoriellem Design wurde untersucht, wie sich die gewählten kellerwirtschaftlichen Faktoren Maischestandzeit, Gärtemperatur, Maische-/Jungweinschwefelung Mostvorklärung und Hefenährsalzzugabe auf den Rotundongehalt der resultierenden Weine auswirken. In Tabelle 1 findet sich eine

Übersicht der drei durchgeführten Versuchspläne mit den untersuchten Faktoren inkl. Faktorstufen (Niveaus) und Zentralpunkte. Diese drei Versuchspläne wurden in zwei aufeinanderfolgenden Jahren (2011, 2012) wiederholt.

Versuchsplan A: Hierbei wurde die Gärtemperatur auf den beiden Niveaus (15 °C, 23 °C) und die Maischestandzeit (0 h, 6 h) variiert. Als Zentralpunkt wurde eine dreistünde Maischestandzeit und Vergärung bei 19 °C gewählt.

Versuchsplan B: Der Effekt der Schwefeldioxiddosierung zur Maische wurde auf den beiden Niveaus (0 mg/l, 60 mg/l) und die Schwefeldioxidzugabe zum Jungwein mit 40 mg/l bzw. 80 mg/l überprüft. Als Zentralpunkt wurde eine Maischeschwefelung mit 30 mg/l und eine Jungweinschwefelung mit 60 mg/l durchgeführt.

Versuchsplan C: Es wurde der Einfluss der Mostklärung (ohne bzw. mit) sowie einer Hefenährsalzzugabe (ohne bzw. mit 0,3 g/l DAP (Vitamon A, Erbslöh Geisenheim GmbH, Geisenheim, Deutschland) ohne Zentralpunkt getestet.

Die Varianten der Versuchspläne A und C erhielten eine Maischeschwefelung mit 50 mg/l Schwefeldioxid. Die Kontrolle der Gärtemperatur erfolgte mit dem System VinPilot (WFT Wein-Fruchtsaft-Technologie GmbH, Klosterneuburg, Österreich).

Tab. 1: Übersicht der drei durchgeführten $2^2$ Pläne inklusive Faktoren und Faktorenstufen (Niveaus)

| 3 unabhängige Versuchspläne mit $2^2$ vollfaktoriellem Design (in Summe 28 Versuchsvarianten (10 Varianten A, 10 Varianten B, 8 Varianten C)) in zweifacher Wiederholung und in zwei aufeinanderfolgenden Versuchsjahren (2011, 2012) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Einflussfaktor** | | **Versuchsplan A** | | | | |
| | | **Einheit** | **Faktorstufen** | | | **Durchgänge** |
| | | | -1 | 0 | +1 | |
| **A** | **Maischestandzeit** | h | 0 | 3 | 6 | 5 |
| **B** | **Gärtemperatur** | °C | 15 | 19 | 23 | 5 |
| **Einflussfaktor** | | **Versuchsplan B** | | | | |
| | | **Einheit** | **Faktorstufen** | | | **Durchgänge** |
| | | | -1 | 0 | +1 | |
| **A** | **Maischeschwefelung** | mg/l | 0 | 30 | 60 | 5 |
| **B** | **Jungweinschwefelung** | mg/l | 40 | 60 | 80 | 5 |
| **Einflussfaktor** | | **Versuchsplan C** | | | | |
| | | **Einheit** | **Faktorstufen** | | | **Durchgänge** |
| | | | -1 | +1 | | |
| **A** | **Mostvorklärung** | - | Nein | Ja | | 4 |
| **B** | **Hefenährsalzzugabe** | - | Nein | Ja | | 4 |

Die Vinifizierung von den Varianten erfolgte nach dem Standardprotokoll der Kellerwirtschaft HBLA Klosterneuburg (Scheiblhofer, persönliche Mitteilung, 2013). Die Weine wurden drei Monate nach der Vinifizierung in 0,5 l-Flaschen abgefüllt.

### Analyseverfahren und Chemikalien für die Analyse der Rotundongehalte

Die Grundparameter der Versuchsweine (relative Dichte, vorhandener Alkohol, Gesamtzucker (Glucose + Fructose), pH-Wert, titrierbare Säuren, flüchtige Säuren) wurden mittels FTIR (WINESCAN, Foss GmbH, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Die Methode zur Quantifizierung der Rotundongehalte der verschieden vinifizierten Varianten erfolgte basierend auf der SPE-SPME-GC-MS Methode nach Nauer et.al. (2018). Stark vereinfacht und überblicksartig wurde am Beginn als Probenvorbereitung eine Festphasenextraktion (= SPE) mit 100 ml Weinprobe versetzt mit 100 µl Internem Standard(5,7-Dimethyl-tetralone; Konzentration 1 mg/l)durchgeführt, gefolgt von einer Immersions-Festphasen-Mikroextraktion (IM-SPME) mit abschließender Gaschromotagraphie-Massenspektroskopie, abgekürzt SPE-SPME-GC-MS. Ein detaillierter Ablauf sowie eine Beschreibung der eingesetzten SPE-SPME-GC-MS-Methode ist bei Nauer et.al. (2018) zu entnehmen. Die relative Standardabweichung (RSD) der Methodenpräzision betrug 6,0 % (bei Kalibration mit Standardaddition in realer GV-Probe) bzw. 10,5 % (Modellweinkalibration) unter Wiederholbarkeitsbedingungen. Die Wiederfindung bei verschiedenen mit 100 ng/l gespikten Weinproben bewegte sich zwischen 102 und 124 % (bei Auswertung mit der Kalibration mit Standardaddition in realer GV-Probe). Für die Methode wurden als Grenze der Erkennung (LOD) und als Begrenzung der Quantifizierung (LOQ) die Konzentrationen definiert, die Signal-Rausch-Verhältnisse von 3:1 → 3 ng/l bzw.10:1 → 10 ng/l ergaben. Für die Berechnung wurden die S/N-Verhältnisse von Weinen mit geringen Mengen (<15 ng/l) bzw. Modellweinstandards versetzt mit geringen Konzentrationen dieser Verbindung(<10 ng/l) als Ausgangspunkt herangezogen und mit der Agilent Software Data Analysis ein Signal to Noise-Check durchgeführt.Anhand dieser Methoden-Kenndaten wurde auch die Schwankung der analysierten Rotundongehalte in Tabelle 2 berücksichtigt.

### Analyse der Ergebnisse der drei durchgeführten $2^2$ statistischen Versuchspläne

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Statistikprogrammen Minitab 18/19 (Minitab, LLC, Pennsylvania, USA) und DesignExpert 11/12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Es wurden neben einer Varianzanalyse auch die Darstellung im Haupteffektdiagramm und Wechselwirkungsdiagramm durchgeführt. Die Normalverteilung und Varianzhomogenität der Rotundongehalte wurde angenommen. Aus der Visualisierung mit Faktordiagrammen (Haupteffektdiagramm, Wechselwirkungsdiagramm) konnten die Zusammenhänge zwischen der Antwortvariablen (Rotundongehalt) und den Faktoren (z. B. Gärtemperatur, Standzeit) graphisch darstellt werden (Granato et al., 2014).

## Ergebnisse und Diskussion

### Weinzusammensetzung

Die Resultate der mittels FTIR ermittelten Grundweinparameter aus den beiden Versuchsjahrgängen (nicht präsentiert) zeigen, dass es in Bezug auf diese keine Besonderheiten gibt. Die Alkoholgehalte der Weine des Jahrgangs 2011 schwankten von 12,3 bis 12,8 %vol., jene des Jahrgangs 2012 von 13,5 bis 13,9 %vol., und alle Weine waren trocken (Jahrgang 2011 <3 g/l Zucker; bei Jahrgang 2012 <LOQ) vergoren.

### Rotundongehalte in den Versuchsvarianten

Eine Übersicht über die ermittelten Rotundongehalte ergibt sich aus Tabelle 2, wobei das Versuchsdesign in Form einer Matrix mit Faktoren und Zentralpunkten dargestellt wird. Für Variante A lag das Rotundongehaltsmaximum 2011 bei jener Variante ohne Maischestandzeit und einer Gärtemperatur von 23 °C, 2012 hingegen war dieses bei der Variante mit einer Maischestandzeit von 3 Stunden und einer Gärtemperatur von 19 °C. Bei den Varianten B lieferte die Variante 30 mg/l Maischeschwefelung und mit 60 mg/l Jungweinschwefelung 2011, und die Variante 60 mg/l Maischeschwefelung und mit 80 mg/l Jungweinschwefelung 2012 den Rotundonspitzenwert. Die höchsten Rotundongehalte sind bei Variante C im

Versuchsjahr 2011 bei der Variante mit Mostklärung zu finden, 2012 hingegen lag der Höchstwert bei der Variante ohne Mostklärung und ohne Hefenährsalzugabe.

Die niedrigsten Rotundongehalte sind 2011 bzw. 2012 bei folgenden Varianten zu finden - bei Variante A war es 2011 jene mit 6h Maischestandzeit und einer Gärtemperatur von 15° bzw. 2012 jene mit einer Maischestandzeit von 0h und einer Gärtemperatur von 23°. Bei Variante B 2011 hatte jene mit 60mg/l Maischeschwefelung und 80mg/l den niedrigsten Rotundongehalt bzw. 2012 jene mit 30mg/l Maischeschwefelung und 60mg/l Jungweinschwefelung 60mg/l. Von Variante C ergab 2011 jene ohne Mostklärung und mit Hefenährsalzzugabe das Minimum bzw. 2012 jene Variante mit Mostklärung und mit Hefenährsalzzugabe mit nur 20,7ng/l.

Diese Rohdaten wurden einer Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Im Zuge des Versuchsplans A wurde im Jahr 2011 für den Faktor Gärtemperatur (p-Wert=0,0243) sowie für den Faktor Standzeit (p-Wert=0,0137) ersichtlich, dass diese Effekte für den Rotundongehalt statistisch signifikant ($\alpha$=0,05) sind. Die Wechselwirkung beider Faktoren (p-Wert=0,143) ist nicht signifikant. Der ebenfalls ermittelte F-Wert von 9,01 (8,582) impliziert, dass das Modell signifikant ist. Es besteht nur eine Wahrscheinlichkeit von 1,85 (2,1 %), dass ein so großer F-Wert aufgrund von Rauschen auftritt. Für das Versuchsjahr 2012 sind diese Effekte statistisch nicht signifikant (Gärtemperatur p-Wert=0,9181; Standzeit p-Wert=0,4010; Wechselwirkung Gärtemperatur/Standzeit p-Wert=0,8459). Daneben impliziert der F-Wert von 0,30 (1,78), dass das Modell im Verhältnis zum Rauschen nicht signifikant ist. Es besteht eine Wahrscheinlichkeit von 82,58 % (26,9 %), dass ein solcher F-Wert aufgrund von zufälligen Schwankungen auftritt.

Im Zuge der Varianzanalyse der Resultate des Versuchsplans B vom Versuchsjahr 2011 wurde festgestellt, dass der Parameter Maischeschwefelung (p-Wert=0,049) für den Rotundongehalt statistisch signifikant ist ($\alpha$=0,05) Auf die Dosis der Jungweinschwefelung (p-Wert=0,207) trifft dies hingegen nicht zu. Auch die Wechselwirkung beider Faktoren (p-Wert=0,657) ist nicht signifikant. Der ebenfalls ermittelte Modell-F-Wert von 4,92 impliziert, dass das Modell nicht signifikant ist. Es besteht eine Wahrscheinlichkeit von 5,5 %, dass ein so großer F-Wert aufgrund von Rauschen auftritt. Fürs Versuchsjahr 2012 konnte weder für die Maischeschwefelung (p-Wert=0,411), die Dosis der Jungweinschwefelung (p-Wert=0,879) noch für deren Wechselwirkung (p-Wert=0,768) eine Signifikanz festgestellt werden. Auch der Modell-F-Wert von 0,41 impliziert, dass das Modell im Verhältnis zum statistischen Rauschen nicht signifikant ist. Es besteht eine Wahrscheinlichkeit von 90,8 %, dass ein solcher F-Wert aufgrund von zufälligen Schwankungen auftritt.

Bei der Betrachtung der Resultate der Varianzanalyse des Versuchsplans C des Jahres 2011 wird ersichtlich, dass die Effekte Mostklärung (p-Wert = 0,769) beziehungsweise Hefenährsalzzugabe (p-Wert = 0,799) für den Rotundongehalt statistisch nicht signifikant sind ($\alpha$=0,05). Die Wechselwirkung dieser beiden Faktoren ist ebenfalls nicht signifikant (p-Wert = 0,808). Der ermittelte Modell-F-Wert von 0,08 impliziert, dass das Modell nicht signifikant ist. Es besteht eine Wahrscheinlichkeit von 96,7 %, dass der F-Wert aufgrund zufälliger Variabilität auftritt. Im Jahr 2012 wirkt sich die Mostklärung signifikant auf den Rotundongehalt aus, da ein p-Wert von 0,028 vorlag. Hingegen zeigte der p-Wert von 0,713 für den Faktor Hefenährsalzzugabe, dass dieser nicht signifikant war. Auch für die Wechselwirkung beider Faktoren lag im Versuchsjahr 2021 keine Signifikanz (p-Wert = 0,478) vor. Der Modell-F-Wert von 4,02 impliziert, dass das Modell im Verhältnis zum Rauschen nicht signifikant ist. Es besteht eine Wahrscheinlichkeit von 10,6 %, dass der F-Wert durch zufällige Variabilitäten bestimmt wird.

Tab. 2: Übersicht der Rotundongehalte der 28 Versuchsweine – drei $2^2$ Versuchspläne A,B,C –2011, 2012

| | FAKTOREN | | Versuchsjahr 2011 | | Versuchsjahr 2012 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| VERSUCHSPLAN A | Maischestand-zeit (in h) | Gär-temperatur (in °C) | Rotundon-gehalt (ng/l) | Rotundon-gehalt (ng/l) | Rotundon-gehalt (ng/l) | Rotundon-gehalt (ng/l) |
| | Faktorstufe | Faktorstufe | | | | |
| | 0 | 15 | 9,9 | 10,4 | 15,5 | 15,7 |
| | 6 | 15 | 8,0 | 9,4 | 12,2 | 14,1 |
| | 0 | 23 | 12,3 | 15,2 | 11,8 | 19,0 |
| | 6 | 23 | 9,8 | 9,7 | 15,7 | 12,0 |
| | 3 | 19 | 8,9 | 8,5 | 18,1 | 23,1 |
| RSD dieser Messdaten liegt bei 6,0 % (Matrixkalibration) bei 10,5 % (Modellweinkalibration) | | | | | | |
| VERSUCHSPLAN B | FAKTOREN | | Versuchsjahr 2011 | | Versuchsjahr 2012 | |
| | Maische-schwefelung (mg $SO_2$/l) | Jungwein-schwefelung (mg $SO_2$/l) | Rotundon-gehalt (ng/l) | Rotundon-gehalt (ng/l) | Rotundon-gehalt (ng/l) | Rotundon-gehalt (ng/l) |
| | Faktorstufe | Faktorstufe | | | | |
| | 0 | 40 | 9,6 | 9,9 | 16,2 | 16,8 |
| | 0 | 80 | 9,2 | 8,5 | 16,1 | 16,6 |
| | 60 | 40 | 6,0 | 9,6 | 18,4 | 15,9 |
| | 60 | 80 | 5,3 | 6,8 | 19,0 | 16,3 |
| | 30 | 60 | 12,4 | 10,6 | 15,5 | 18,6 |
| RSD dieser Messdaten liegt bei 6,0 % (Matrixkalibration) bei 10,5 %(Modellweinkalibration) | | | | | | |
| VERSUCHSPLAN C | FAKTOREN | | Versuchsjahr 2011 | | Versuchsjahr 2012 | |
| | Most-klärung | Hefenährsalz-zugabe | Rotundon-gehalt (ng/l) | Rotundon-gehalt (ng/l) | Rotundon-gehalt (ng/l) | Rotundon-gehalt (ng/l) |
| | Faktorstufe | Faktorstufe | | | | |
| | + | + | 12,9 | 10,2 | 20,7 | 23,7 |
| | + | - | 10,2 | 12,9 | 26,7 | 22,6 |
| | - | + | 12,2 | 9,6 | 31,7 | 29,9 |
| | - | - | 11,9 | 11,0 | 26,9 | 33,2 |
| RSD dieser Messdaten liegt bei 6,0 % (Matrixkalibration) bei 10.5 % (Modellweinkalibration) | | | | | | |

## Statistische Beurteilung der untersuchten Effekte mittels Haupteffektdiagrammen

Haupteffektdiagramme werden verwendet, um die Beziehung zwischen der Antwortgröße (Rotundongehalt) und den einzelnen Variablen (Gärtemperatur, Standzeit, Maischeschwefelung, Jungweinschwefelung, Mostklärung, Hefenährsalzzugabe) anzuzeigen. Mittels Haupteffektdiagrammen kann man die relative Stärke der Effekte über Faktoren hinweg vergleichen. Aus den Haupteffektdiagrammen für den Versuchsplan A (Abb. 1) erkennt man, dass im Versuchsjahrs 2011 bei einer Gärtemperatur von 23 °C die Rotundongehalte am höchsten (Mittelwert = 11,8 ng/l) und bei einer Gärtemperatur von 15 °C am niedrigsten (Mittelwert = 9,4 ng/l) sind. Für die Variante keine Standzeit (0 Stunden) wurde ein höherer Rotundongehalt (11,9 ng/l) gemessen als in der Variante mit 6 h Maischestandzeit (9,2 ng/l). Im Versuchsjahr 2012 sind die Ergebnisse ähnlich, aber die Unterschiede tendenziell geringer als im Vorjahr. In beiden Versuchsjahren zeigten die Ergebnisse für die Zentralpunkte (19 °C Gärtemperatur,3 h Maischestandzeit) ein unerwartetes und kontroverses Bild. Im Jahr 2011 war es mit einem Rotundongehalt von 8,8 ng/l der niedrigste, im Versuchsjahr 2012 hingegen mit 20,6 ng/l Rotundon der höchste Wert.

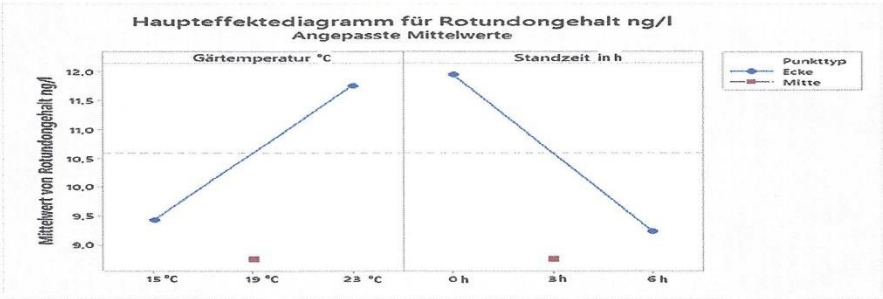
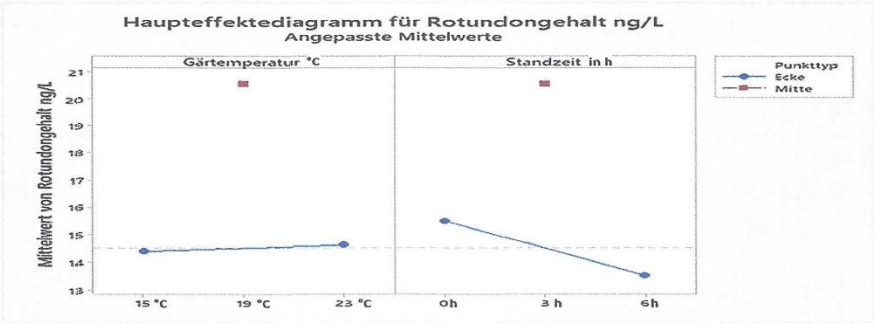
| JAHR | **Haupteffektdiagramme** Versuchsplan A |
|---|---|
| 2011 |  |
| 2012 |  |





Abb: 1: Haupteffektdiagramme für die Faktoren Gärtemperatur und Standzeit der Versuchsserie A der Jahre 2011 und 2012

Aus den Haupteffektdiagrammen des Versuchsplan B (Abb: 2) kann für das Jahr 2011 abgeleitet werden, dass nicht geschwefelte Maische (0 mg/l) bzw. eine niedrige Jungweinschwefelung (40 mg/l) offenbar zu höheren Rotundongehalten (9,4 ng/l bzw.8,8 ng/l) führt als eine Maischeschwefelung mit 60 mg/l bzw. eine Jungweinschwefelung mit 80 mg/l Schwefeldioxid (6,9 ng/l bzw. 7,4 ng/l Rotundon). Das Haupteffektdiagramm für das Jahr 2012 hingegen zeigt genau den gegenteiligen Effekt, so weist der Wein aus der nicht geschwefelten Maische (0 mg/l) bzw. mit der niedrigen Jungweinschwefelung (40 mg/l) niedrigere Rotundongehalte (16,4 ng/l bzw. 16,8 ng/l) auf als die Weine, die mit Maischeschwefelung von 60 mg/l bzw. Jungweinschwefelung mit 80 mg/l hergestellt wurden (17,4 ng/l bzw. 17,0 ng/l Rotundon). Doch aufgrund der geringen absoluten Unterschiede im Rotundongehalt im Versuchsjahr 2012 muss festgehalten werden, dass Zeitpunkt und Intensität der Schwefelung offenbar keinen bzw. nur einen sehr geringen Effekt auf die Rotundongehalte haben.

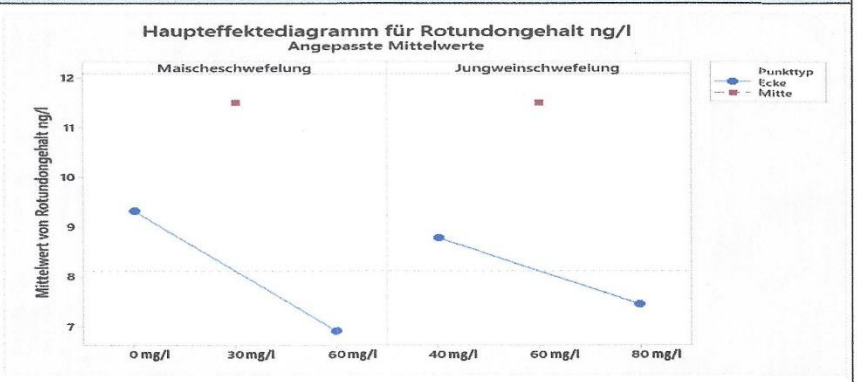
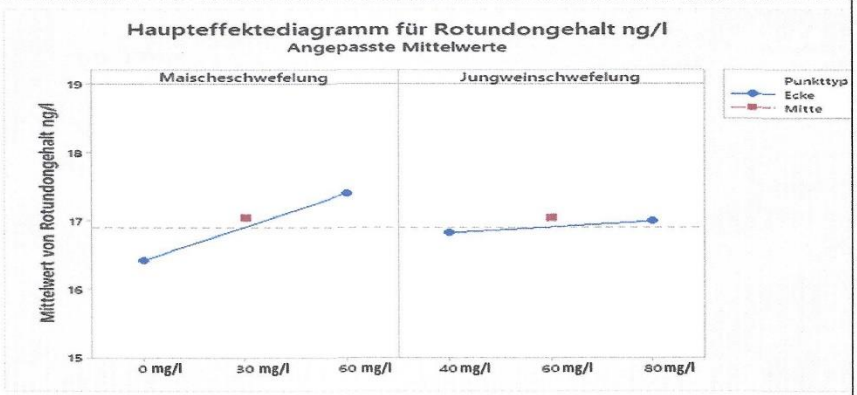
| JAHR | **Haupteffektdiagramme** Versuchsplan B |
|---|---|
| 2011 |  |
| 2012 |  |





Abb. 2: Haupteffektdiagramme für die Faktoren Maischeschwefelung und Dosis der Jungweinschwefelung der Versuchsserie B der Jahre 2011 und 2012

Aus dem Haupteffektdiagramm des Versuchsplan C (Abb. 3) ist für das Jahr 2011 gut ersichtlich, dass die Weine mit Mostklärung bzw. ohne Hefenährsalzzugabe höhere Rotundongehalte aufweisen (11,5 ng/l bzw. 11,5 ng/l ) als jene ohne Mostklärung bzw. mit Hefenährsalzzugabe (11,2 ng/l bzw. 11,2 ng/l Rotundon). Das Haupteffektdiagramm von 2012 hingegen zeigt teilweise genau das Gegenteil. So weisen Weine mit Mostklärung niedrigere Rotundongehalte (23,4 ng/l) auf als jene ohne Mostklärung (30,4 ng/l). Vergleichbare Effekte in beiden Versuchsjahre hat hingegen die Hefenährsalzzugabe, wobei Weine mit Hefenährsalzzugabe (26,5 ng/l) geringere Rotundongehalte hatten als jene ohne Hefenährsalzzugabe (27,3 ng/l).

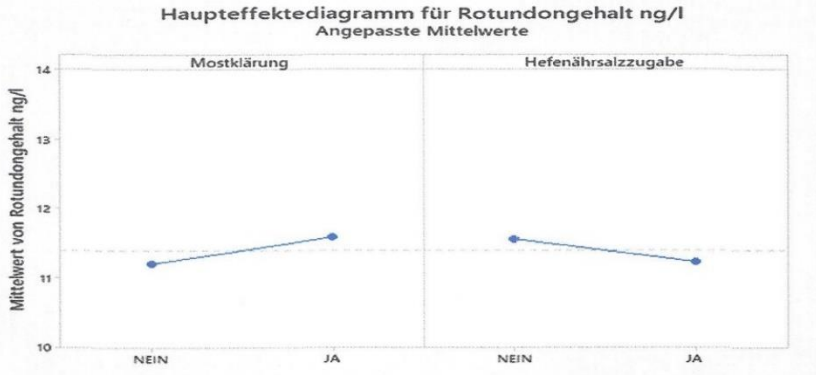
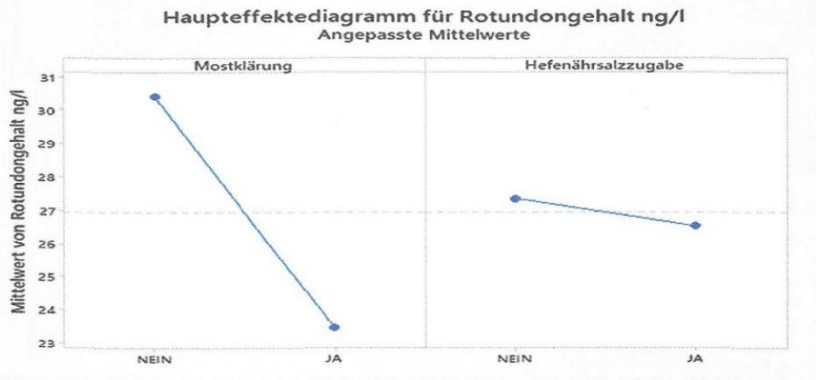
| JAHR | **Haupteffektdiagramme** Versuchsplan C |
|---|---|
| 2011 |  |
| 2012 |  |



Abb. 3: Haupteffektdiagramme für die Faktoren Mostklärung und Hefenährsalzzugabe der Versuchsserie C der Jahre 2011 und 2012

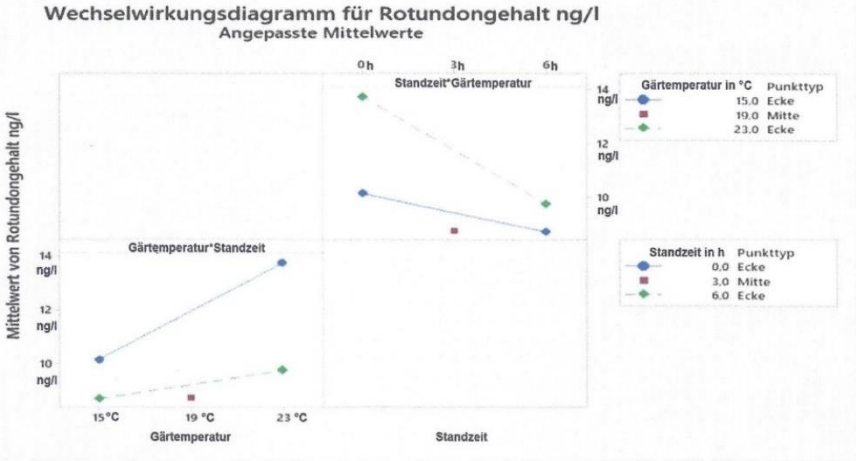
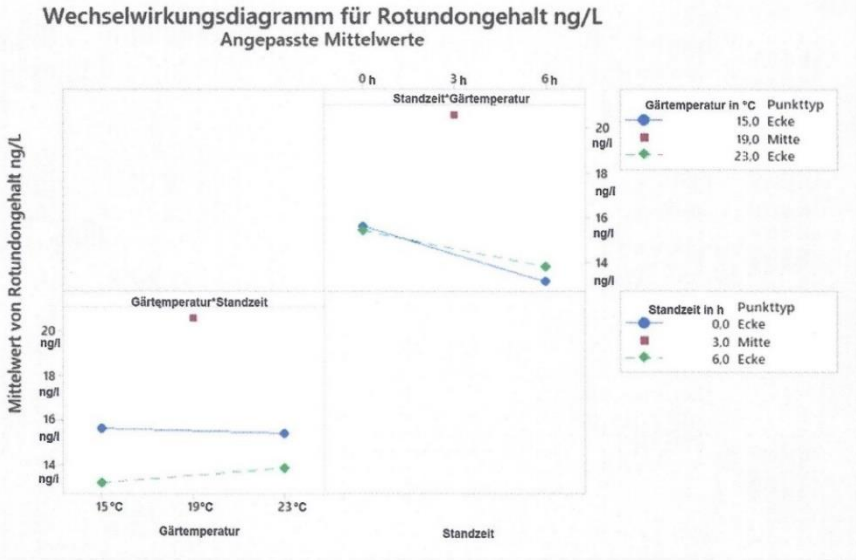
| JAHR | **Wechselwirkungsdiagramme** Versuchsplan A |
|---|---|
| 2011 |  |
| 2012 |  |



Abb. 4: Wechselwirkungsdiagramme für die Faktoren Gärtemperatur und Standzeit des Versuchs A der Jahre 2011und 2012

## Statistische Beurteilung der Wechselwirkungen

Da Weine ohne Maischestandzeit (0 Stunden) und mit hoher Gärtemperatur (23 °C) höhere Rotundongehalte (13,9 ng/l) aufwiesen als Weine mit langer Maischestandzeit (6 h) und niedriger Gärtemperatur (15 °C) (8,7 ng/l Rotundon), kann man aus dem Wechselwirkungsdiagramm des Versuchsplans A für das Untersuchungsjahr 2011 (Abb. 4) ableiten, dass hohe Gärtemperaturen gekoppelt mit kurzen Standzeiten für höhere Rotundongehalte förderlich sind. Das Wechselwirkungsdiagramm für 2012 bestätigt diese Aussage, da Weine mit hoher Gärtemperatur und kurzen Standzeiten (15,4 ng/ Rotundon) höhere Gehalte aufwiesen als Weine mit niedriger Gärtemperatur (15 °C) bzw. mit langer Maischestandzeit (6 h) (durchschnittlich 13,7 ng/l Rotundon). Von einer Wechselwirkung zwischen Gärtemperatur und Standzeit kann in beiden Versuchsjahren ausgegangen werden, wobei die Kombination aus kurzer/keiner Maischestandzeit und einer höheren Gärtemperatur höhere Rotundongehalte begünstigt.

Aus den Wechselwirkungsdiagrammen des Versuchsplans B (Abb. 5) wird für das Untersuchungsjahr 2011 ersichtlich, dass sich die Kombination aus keiner Maischeschwefelung und einer niedrigen Jungweinschwefelung (40 mg/l SO2) förderlich für höhere Rotundongehalte auswirkt. So wiesen die Weine ohne Maischeschwefelung und mit niedriger Jungweinschwefelung im Mittel 9,9 ng/l Rotundon auf, während die Weine mit hoher Maischeschwefelung und hoher Jungweinschwefelung (80 mg/l) nur einen mittleren Rotundongehalt von 6,4 ng/l erreichten.

Das Wechselwirkungsdiagramm für das Jahr 2012 liefert aber ein gegenläufiges Bild und bestätigt daher die Ergebnisse nicht. In diesem Jahr hatten die Weine mit hoher Maischeschwefelung und hoher Jungweinschwefelung mit durchschnittlich 17,8 ng/l höhere Werte als die Weine ohne Maischeschwefelung und mit niedriger Jungweinschwefelung (16,5 ng/l Rotundon). Der Grad der Wechselwirkung zwischen Maische und Jungweinschwefelung dürfte dementsprechend sehr gering und variabel sein.

Aus den Wechselwirkungsdiagrammen des Versuchsplans C (Abb. 6) erkennt man für das Untersuchungsjahr 2011, dass Mostklärung und Hefenährsalzzugabe förderlich für höhere Rotundongehalte sind. So wiesen die Weine mit Mostklärung und Hefenährsalzzugabe etwas höhere Rotundongehalte (11,6 ng/l) auf als die Weine ohne Mostklärung und Hefenährsalzzugabe (10,9 ng/l). Aufgrund der geringen Konzentrationsunterschiede (0,7 ng/l!!)) zwischen diesen Varianten ist von keiner nennenswerten Wechselwirkung auszugehen. Im Versuchsjahr 2012 war hingegen der Unterschied zwischen den Varianten deutlich größer (8,6 ng/l), da Weine ohne Mostklärung gekoppelt mit Hefenährsalzzugabe 30,8 ng/l Rotundon enthielten, während in Weinen mit Mostklärung und Hefenährsalzzugabe durchschnittlich nur 22,2 ng/l gefunden wurden. Man kann daher postulieren, dass zumindest im Jahr 2012 die Wechselwirkung Hefenährsalzzugabe, aber keine Mostklärung sich positiv auf die Rotundongehalte ausgewirkt hat.

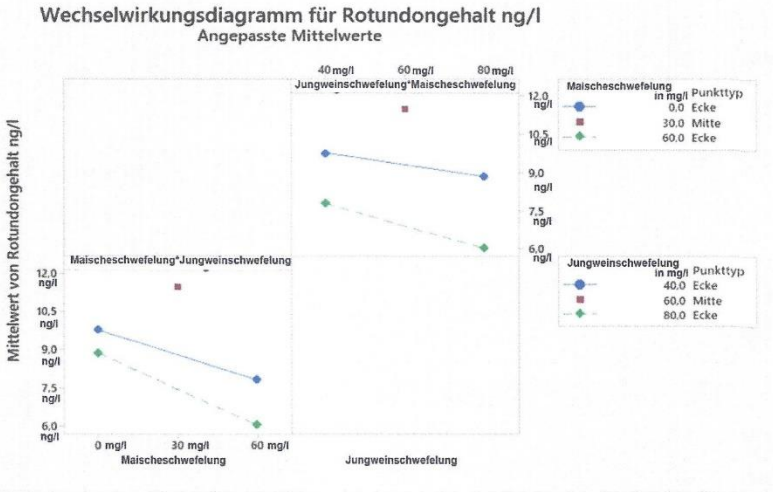
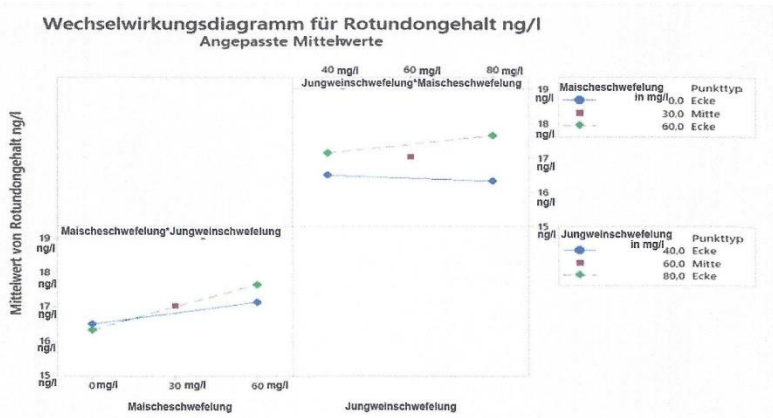
| JAHR | **Wechselwirkungsdiagramme** Versuchsplan B |
|---|---|
| 2011 |  |
| 2012 |  |



Abb. 5: Wechselwirkungsdiagramme für die Faktoren Maische- und Jungweinschwefelung des Versuchs B der Jahre 2011und 2012

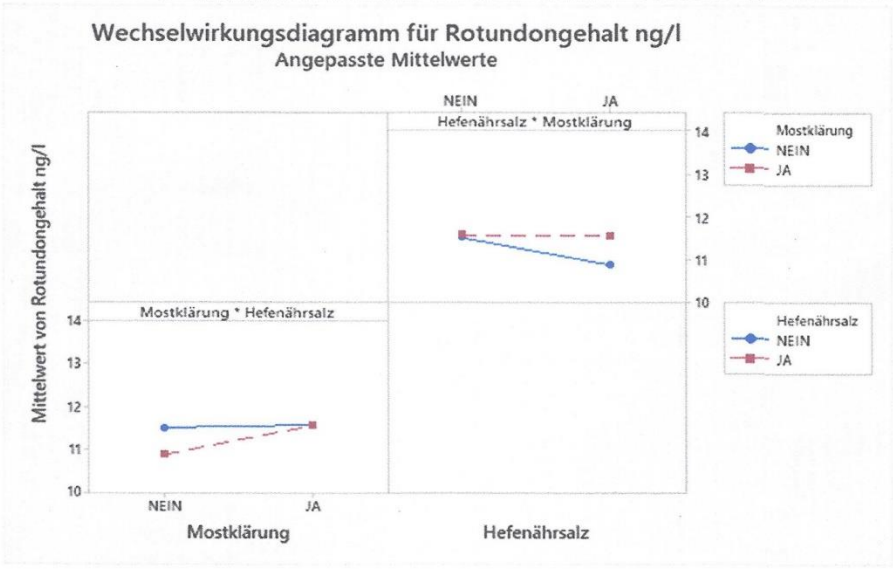
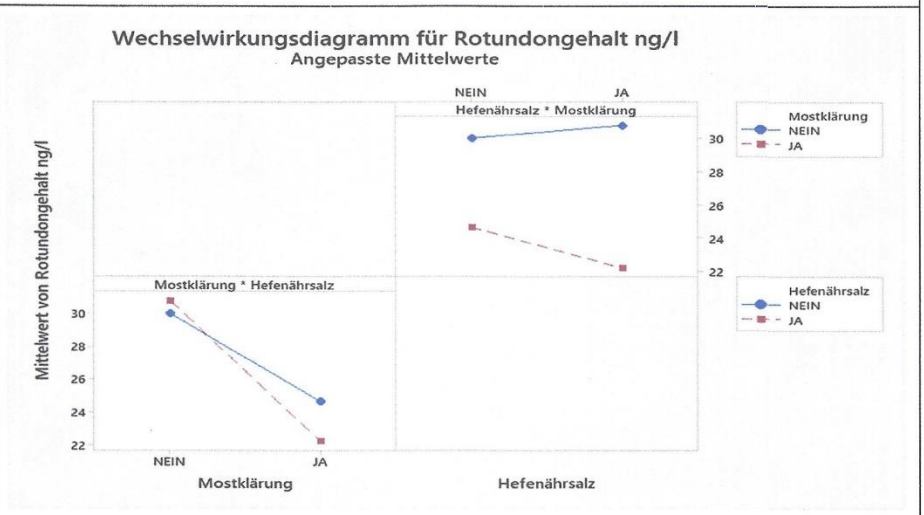
| JAHR | **Wechselwirkungsdiagramme** Versuchsplan C |
|---|---|
| 2011 |  |
| 2012 |  |



Abb. 6: Wechselwirkungsdiagramme für die Faktoren Mostklärung und Hefenährsalzzugabe des Versuchs C der Jahre 2011und 2012

## Schlussfolgerungen

Basierend auf den Resultaten der drei $2^2$ Versuchspläne aus zwei Versuchsjahren (2011, 2012) lässt sich feststellen, dass die Konzentration des schalenlokalisierten Rotundons auf önologische Maßnahmen wie Gärtemperatur, Standzeit, Schwefelung und Mostvorklärung reagiert. Sowohl Reynolds et al. (2001) als auch Masneuf-Pomarède et al. (2006) bestätigen indirekt den positiv linearen Zusammenhang von höherer Gärtemperatur und höheren Rotundongehalten, wonach eine Temperatursteigerung bei der Gärung einen Anstieg an 4-Mercapto-4-methylpentan-2-on (= 4MMP, schalenlokaliserter Inhaltsstoff, für tropische Aromen) bewirkt. Auch die bereits von Marais (1983) erwähnten gesteigerten Terpengehalte bei höheren Mazerationstemperaturen könnten bereits als indirektes Indiz interpretiert werden für den Einfluss der Temperatur auf Rotundon. In der vorliegenden Studie konnte dieser Zusammenhang für Rotundon sowohl im Jahr 2011 wie auch 2012 gefunden werden. Die Beobachtung, dass sich eine Maischestandzeit negativ auf den Rotundongehalt auswirkt, kann durch die Hydrophobizität des Moleküls erklärt werden. Demnach findet während der Maischestandzeit in wässrig-ethanolischer Umgebung nur ein geringer zusätzlicher Auslaugungseffekt statt, der durch Adsorption des schalenlokalisierten Rotundons an feste Bestandteile während längerer Standzeiten konterkariert wird. Die geringeren Gehalte infolge einer Maischestandzeit widersprechen vielen allgemeinen Beobachtungen, beispielsweise von Versini et al. (1981), Marais (1987 und 1988), Cabaroglu et al. (2002) und Selli et al. (2006), wonach eine Maischestandzeit zu höheren Terpengehalten führt.

Die Ergebnisse betreffend Maische- bzw. Jungweinschwefelung zeigten in den beiden Versuchsjahren ein gegenläufiges Bild, und die Unterschiede waren auch nur gering. Da die inhaltsstoffliche Zusammensetzung der Weine von Jahr zu Jahr variiert, kann es sein, dass die Gehalte an Carbonylen (nicht analysiert) unterschiedlich waren und daher die von De Azevedo et al. (2007) beschriebene Bildung der Hydroxyalkylsulfonsäuren verschieden war.

Da die Ergebnisse der Versuche betreffend Mostklärung in den beiden Jahren nicht einheitliche und nur im Jahr 2012 signifikante Unterschiede zeigten, ist eine Interpretation schwierig. Tendenziell wird aber durch eine Mostklärung das hydrophobe Rotundon, das an Schalenbestandteile bindet, dem gärenden Most entzogen, wodurch im Wein geringere Gehalte verursacht werden. Dies entspricht der Feststellung von Swiegers et al. (2005), wonach die Entfernung des Trubs durch Mostklärung zu einer Verringerung aromatischer Vorläufersubstanzen im Wein führt. Andererseits kann damit die Aussage von Moio et al. (2004) nicht bestätigt werden, wonach der Terpengehalt in Weinen aus Mosten mit höherem Trubgehalt höher ist.

Auch die Zugabe von Hefenährsalzen wirkte sich eher negativ als positiv auf die Rotundongehalte aus, sodass die Aussage von Carrau et al. (2005), wonach höhere Stickstoffgehalte in den Mosten zu höheren Terpenkonzentrationen in Weinen führen, nicht bestätigt werden konnte. Dies deckt sich auch mit der Aussage von Geffroy et al. (2017), dass Rotundon als schalenlokalisierter Inhaltsstoff ohne biochemische Aktivität extrahiert wird. Durch die Zugabe von Hefenährsalz kommt es zur vermehrten Biomasseproduktion. Rotundon könnte sich aufgrund seines hydrophoben Charakters an die Biomasse binden, was erklären würde, warum sich der Gehalt an Rotundon durch die Hefenährsalzzugabe reduziert hat.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch kellertechnische Maßnahmen, wie eine etwas höhere Gärtemperatur, das Vermeiden von Standzeit und Mostklärung, die saisonal bedingten Rotundongehalte in Weinen geringfügig erhöht werden können. Dadurch kann die pfeffrige Note auch in Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' trotz fortschreitenden Klimawandels zukünftig besser erhalten werden.

## Literatur

**Cabaroglu, T. and Canbas, A. 2002 :** The effect of skin contact on the aromatic composition of the white wine ofvitis viniferal. Cv. Muscat of Alexandria grown in southern Anatolia. Acta Alimentaria 31(1): 45–55.

**Cabaroglu, T., Canbas, A., Baumes, R., Bayonove, C., Lepoutre, J. P. and Gunata, Z.** 1997 : Aroma Composition of a White Wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir as Affected by Skin Contact. Journal of Food Science 62(4): 680–683.

**Caputi, L., Carlin, S., Ghiglieno, I., Stefanini, M., Valenti, L., Vrhovsek, U. and Mattivi, F. 2011:** Relationship of changes in rotundone content during grape ripening and winemaking to manipulation of the „peppery"character of wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(10): 5565–5571.

**Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E. and Henschke, P. A. 2005:** De novo synthesis of monoterpenes by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts. FEMS Microbiology Letters 243(1) : 107–115.

**de Azevedo, L. C., Reis, M. M., Motta, L. F., da Rocha, G. O., Silva, L. A. and de Andrade, J. B. 2007:** Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(21): 8670–8680.oy

**Geffroy, O., Siebert, T., Silvano, A. and Herderich, M. 2017:** Impact of winemaking techniques on classical enological parameters
and rotundone in Red Wine at the laboratory scale. American Journal of Enology and Viticulture 68(1): 141–146.

**Geffroy, O., Dufourcq, T., Carcenac, D., Siebert, T., Herderich, M. and Serrano, E. 2014:** Effect of ripeness and viticultural techniques on the rotundone concentration in red wine made from *Vitis vinifera* L. cv. D uras. Australian Journal of Grape and Wine Research 20(3): 401-408.

**Granato, D., de Araújo Calado, V. M. and Jarvis, B. 2014:** Observations on the use of statistical methods in food science and technology. Food Research International 55: 137-149.

**Marais, J.** (1983). Terpenes in the aroma of grapes and wines: a review. South African Journal of Enology and Viticulture, 4(2), 49-58.

**MARAIS, J. 1987:** Terpene concentrations and wine quality of *Vitis vinifera* L. cv. Gewurztraminer as affected by grape maturity and cellar practices. Vitis. 26: 231–245.

**Marais, J. 1988:** Terpenes in grape juice and wine: effect of heat treatment and skin contact. In Proceedings of the 5th. Internetional Flavor Conference.

**Marais, J. and Rapp, A. 1988:** Effect of skin-contact time and temperature on juice and wine composition and wine quality. South African Journal of Enology and Viticulture 9(1): 22–30.

**Masneuf-Pomarède, I., Mansour, C., Murat, M. L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D.** (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. International journal of food microbiology, 108(3), 385-390.

**Mattivi, F., Caputi, L., Carlin, S., Nanni, D., Valenti, L., Eder, R. and Vrhovsek, U. 2011:** The sesquiterpene rotundone is an impact aroma in Gruener Veltliner and other peppery wines. 16th International Enology Symposium, 63–66. DE.

**Moio, L., Ugliano, M., Gambuti, A., Genovese, A. and Piombino, P. 2004:**Influence of clarification treatment on concentrations of selected free varietal aroma compounds and glycoconjugates in Falanghina (*Vitis vinifera* L.) must and wine. American Journal of Enology and Viticulture 55(1): 7–12.

**Nauer, S., Brandes, W., Patzl-Fischerleitner, E., Hann, S. and Eder, R. 2018:** Analysis of (-)-rotundone by means of SPE-SPME-GC-MS in Austrian quality wines of the „Grüner Veltliner" variety. Mitteilungen Klosterneuburg 68: 107–119.

**Palomo, E. S., Pérez-Coello, M. S., Díaz-Maroto, M. C., González Viñas, M. A. and Cabezudo, M. D. 2006:** Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat "a petit grains" wines and effect of skin contact. Food Chemistry 95(2): 279–289.

**Ramey, D., Bertrand, A., Ough, C. S., Singleton, V. L. and Sanders, E. 1986:** Effects of skin contact temperature on chardonnay must and wine composition. American Journal of Enology and Viticulture 37(2): 99–106.

**Reynolds, A., Cliff, M., Girard, B., and Kopp, T. G.** (2001). Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines. American Journal of Enology and Viticulture, 52(3), 235-240.

**Rodriguez-Bencomo, J. J., Méndez-Siverio, J. J., Pérez-Trujillo, J. P. and Cacho, J. 2008:** Effect of skin contact on bound aroma and free volatiles of Listán blanco wine. Food Chemistry 110(1): 214–225.

**Selli, S., Cabaroglu, T., Canbas, A., Erten, H. and Nurgel, C. 2003:** Effect of skin contact on the aroma composition of the musts of *Vitis vinifera* L. cv. Muscat of Bornova and Narince grown in Turkey. Food Chemistry 81(3): 341–347.

**Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T., Erten, H. and Günata, Z. 2006:** Aroma components of cv. Muscat of Bornova wines and influence of skin contact treatment. Food Chemistry 94(3): 319–326.

**Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T., Erten, H., Lepoutre, J.-P. and Gunata, Z. 2006:** Effect of skin contact on the free and bound aroma compounds of the white wine of *Vitis vinifera* L. cv Narince. Food Control 17(1): 75–82.

**Siebert, T. E. and Solomon, M. 2011:** Rotundone: Development in the grape and extraction during fermentation. Proceedings of the 14th Australian Wine Industry Technical Conference.

**Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A. and Pretorius, I. S. 2005:** Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Australian Journal of Grape and Wine Research 11(2): 139–173.

**Swiegers, Jan H. and Pretorius, I. S. 2005:** Yeast modulation of wine flavor. Advances in Applied Microbiology, 57: 131–175.

**Versini, G., Inama, S. and Sartori, G. 1981:** Indagine gascromatografica in colonna capillare dei costituenti terpenici del Riesling renano del Trentino Alto Adige: distribuzione dell'acino, passaggio del mosto e presenza nel vino a seconda di diverse tecniche di vinificazione. Considerazioni organolettiche=A capillary column gaschromatographic research into the terpenes constituents of Riesling Renano (Rhine Riesling) wine from Trentino Alto Adige: their distribution within berries, their passage into must and their presence in the wine according to different wine-making procedures. Organoleptic considerations. 23(133): 189–211.

**Vilanova, M., Siebert, T. E., Varela, C., Pretorius, I. S. and Henschke, P. A.** 2012: Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. Food Chemistry 133(1): 124–131.

**Williams, J. T., Ough, C. S. and Berg, H. W.** 1978: White wine composition and quality as influenced by method of must clarification. American Journal of Enology and Viticulture 29(2): 92–96.

Eingelangt am 16. Dezember 2020

# 4 Zusätzliche Beiträge

## 4.1 Tagungsbeiträge

### 4.1.1 Analyse von Rotundon mittels SPE-SPME-GC-MS in österreichischen Qualitätswein der Rebsorte Grüner Veltliner

Im Rahmen der 72 ALVA – Tagung Seminarhotel Wesenufer (2017).

**Autoren und Autorinnen**: Nauer, S., Brandes, W., Patzl-Fischerleitner, E., Stephan Hann, S., Eder, R. (2019).

# Analyse von Rotundon mittels SPE-SPME-GC-MS in österreichischen Qualitätswein der Rebsorte Grüner Veltliner

## *Analysis of rotundone by SPE-SPME-GC-MS in Austrian quality wine of the grape variety Grüner Veltliner*

Stefan Nauer[1*], Walter Brandes[1], Elsa Patzl-Fischerleitner[1],
Stephan Hann[2] und Reinhard Eder[1]

### *Einleitung*

Impact odours, also Verbindungen die eindeutig mit einem Stoff assoziiert werden bzw. als Leitsubstanz gelten, gewinnen, genau wie die Authentizität von Produkten, für Konsumenten immer mehr an Bedeutung. Von der Hauptweinsorte Österreichs, dem Grünen Veltliner, erwarten Konsumenten eine typische Note von Pfeffer (das „Pfefferl"). Bis zum Jahr 2008 existierte keine direkte Verbindung zwischen der Aromatik von Pfeffer und Wein. Dann entdeckten australische Wissenschaftler um Wood et al. (2008) ein Sequiterpenketon namens Rotundon im Shiraz. Das Ziel dieser Arbeit war es, Rotundon mittels einer hausintern modifizierten SPE-SPME-GC-MS Methode in Grünem Veltliner verschiedener Jahrgänge und unterschiedlicher Gebiete zu detektieren, zu quantifizieren und anhand der Resultate eine statistische Gehaltsverteilung zu erstellen.

### *Material und Methoden*

Für die Detektion und Quantifizierung des Leitaromas für Pfeffer wurden 105 österreichische Handelsproben der Rebsorte Grüner Veltliner verschiedener Jahrgänge (2009-2015) und Weinbaubaugebiete (Bergland, Carnuntum, Kamptal, Kremstal, Neusiedlersee, Neusiederlersse-Hügelland, Thermenregion, Traisental, Wachau, Wagram, Weinviertel und Wien) herangezogen.
Um die Konzentration der Verbindung Rotundon im Wein zu ermitteln wurde eine SPE-SPME-GC-MS Methode (Siebert (2008)) bezüglich der hausinternen Anforderungen modifiziert und zur Analyse der österreichischen Handelsproben verwendet.
Für die Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion wurden 100 ml Weinprobe unter Verwendung der Chemikalien Pentan, Methanol, Ethanol, Dichlormethan, 5,7-Dimethyl-1-tetralone und SPE Säulchen (LiChrolut EN)aufgearbeitet. . Im Rahmen der Probenaufarbeitung wurden auf die LiChrolut EN-Säulchen (Fa. Merck, 500 mg) nacheinander10 ml Methanol, 20 ml Modellwein(12%EtOh gepuffert auf pH 3,2), 100ml Weinprobe (versetzt und homogenisiert mit 100 µl internen Standard (1mg/l)) mittels Schwerkraft aufgegeben. Abschließend wurde das Säulchen mit 10 ml entionisiertem Wasser gewaschen und mit 10 ml N-Pentan/Dichlormethan (Verhältnis 4:1) eluiert. Das organische Lösungsmittel wurde unter Vakuum unter Verwendung eines Rotovapors entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde in 1 ml Ethanol (50%) aufgenommen. Und zu 14 ml $dH_2O$ in ein 20 ml Headspace Vial überführt. Diese Lösung wurde mit einer Immersions SPME-GC-MS-Methode analysiert. Dabei wurde ein Agilent Technologies 7890A Gaschromatograph, gekoppelt an ein 5975C Massenspektrometer, verwendet, welcher mit einem Autosampler von der Firma CTC ausgestattet war. In die Probe wurde eine Polydimethylsiloxan/Divinylbenzol-65µm-Faser (Fa. Supelco, Bellefonte, PA) für 60 min bei 35 °C unter Rühren eingetaucht und dann im Injektor bei 250 °C für 5min im splitless -Modus desorbiert. Die GC-Trennung erfolgte auf einer 60 m ZB-5MS Kapillarsäule mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 µm (Zebron ZB-5MS Phenomenex, USA). Als Trägergas wurde ultrareines Helium mit einer konstanten Flussrate von 1,1 ml/min verwendet.
Die Ofentemperatur wurde anfänglich für 3 min bei 50 °C gehalten und dann mit einer Geschwindigkeit von 20 °C/min auf 150 °C erhöht, anschließend mit einer Rate von 2,7 °C/min auf 210 °C gesteigert, bevor sie mit einer Geschwindigkeit von 50 °C/min auf 26 0°C gesteigert und dann als Endtemperatur für 8,5min gehalten. In Summe ergab dies eine Gesamtlaufzeit von 39,722min.

Das Massenspektrometer wurde im Elektronenstoß-(EI)-Ionisierungsmodus bei 70 eV betrieben. Die Überleitungstemperatur/Transferlinie des Massenspektrometers wurde bei 250°C gehalten.

Im selektierten Ionenüberwachungsmodus (SIM) wurden die charakteristischen Massenfragmente bei m/z 203 und 218 als die ausgewählten Ionen zur Quantifizierung von Rotundon und die Ionen bei m/z 146 und 174 für den internen Standard 5,7-Dimethyl-1-tetralone verwendet.
Die Retentionszeiten für Rotundon bzw. den internen Standard 5,7-Dimethyl-1-tetralone betrugen 24,88 min bzw. 22,42 min.

Die Evaluierung der Linearität der Methode wurde sowohl in synthetischem Modellwein bzw. mit einem realen Grüner Veltliner bis zu 500 ng/l mittels folgender Kalibrationspunkte (im synthetischen Modelwein – 0 ng/l 10 ng/l 25 ng/l 50 ng/l 100 ng/l 250 ng/l 500 ng/l; im realen Wein mit einem Ausgangswert von 20,3 ng/l durch Zugabe von 0ng/l, +50ng/l +125ng/l +250ng/l +500ng/l über Standardaddition) durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient im synthetischen Modelwein betrug 0,9998. Der Korrelationskoeffizient der Kalibration über die Standardaddition in realer Weinmatrix betrug 0,9978. Die resultierende Kalibrierfunktion war daher im Kalibrierbereich von 10-500ng/l durchgehend linear. Die Kalibration über die Standardaddition in realer Weinmatrix wurde für die Quantifizierung der analysierten Handelsproben herangezogen, da diese exakt der zu analysierenden Matrix entsprach. Die Wiederholbarkeit des Analysenverfahrens wurde durch Quantifizierung des Rotundongehaltes von Aliquoten der gleichen Weinprobe bewertet (Methodenpräzision). Dabei wurde für die Bestimmung der Wiederholbarkeit die gesamten Analyse incl. Probenvorbereitung, Probenaufgabe etc. am selben Probenmaterial (GV) innerhalb einer Serie (9 bzw.14mal) durchgeführt. Die RSD der Methodenpräzision betrug 6,0% (bei Kalibration mit Standardaddition in realer GV-Probe) bzw. 10,5 % (Modellweinkalibration). Die Wiederfindung bei verschiedenen, mit 100 ng/l gespikten Weinproben bewegte sich zwischen 102-124% (bei Auswertung mit der Kalibration mit Standardaddition in realer GV-Probe). Für die Methode wurden als Grenze der Erkennung (LOD) und als Begrenzung der Quantifizierung (LOQ) die Konzentrationen definiert, die Signal-Rausch -Verhältnisse von 3: 1 → 3 ng/l bzw. 10: 1 → 10 ng/l ergaben. Für die Berechnung wurden die S/ N-Verhältnisse von Weinen mit geringen Mengen (<15ng/l) dieser Verbindung als Ausgangspunkt herangezogenen und mit der Agilent Software Data Analysis ein Signal to Noise Check durchgeführt.

## *Ergebnisse und Diskussion*

Die Analyse der 105 österreichischen Handelsproben der Sorte Grüner Veltliner ergab Rotundongehalte zwischen 9,5 ng/l und 87,5 ng/l. Der durchschnittliche Rotundongehalt lag bei 31,7 ng/l. Der sensorische Schwellenwert der Literatur von 16 ng/l wurde also um den Faktor 2 überschritten. Dies lässt den Rückschluss zu, dass Rotundon zur Aromatik des Grünen Veltliners beiträgt. Dabei wäre auch erwähnenswert, dass 20% der Konsumenten eine Anosmie für diese Verbindung aufweisen.

Im Detail lassen sich für jedes Jahr folgende Kennwerte festhalten. Das Maximum lag im Jahr 2009 bei 37ng/l , 2010 bei 43ng/l, 2011bei 21ng/l, 2012 bei 19ng/l, 2013 bei 58ng/l, 2014 bei 67ng/l und 2015 bei 23ng/l. Das Minimum betrug im Jahr 2009: 16ng/l, 2010: 22ng/l, 2011: 18ng/l, 2012: 14ng/l, 2013: 18ng/l, 2014: 9,5ng/l und 2015: 11ng/l. Der Median wies 2009 einen Wert von 24ng/l, 2010 von 32ng/l, 2011 von 19ng/l, 2012 von 16ng/, 2013 von 37ng/l, 2014 von 38ng/l und 2015 von 17ng/l auf.

In Bezug auf die Weinbauregionen bzw. Weinbaugebiete gab es eine Konzentrationspanne von rund 10 bis 42ng/l. Der Median des Weinbaugebietes Bergland betrug 9,95 ng/l, vom Kamptal 37,0ng/l, vom Kremstal 28,1ng/l, vom Neusiedlersee 21,3ng/l, vom Neusiederlersse-Hügelland 15,45ng/l, von der Thermenregion 12,0ng/l, vom Traisental 24,76ng/l, von der Wachau 42,74ng/l, vom Wagram 30,2ng/l, vom Weinviertel 26,16ng/l und von Wien 17,7ng/l. Da eine einzelne Erklärung der Unterschiede zwischen Gebieten nicht auszumachen ist, ist es wahrscheinlicher, dass viele Einflussfaktoren (Klima, Boden, Klon, Erntetermin, Weingartenmanagement) an den Resultaten beteiligt sind. Die Ergebnisse belegen allerdings, dass die Einflussfaktoren Jahrgang und Anbaugebiet eine nicht zu unterschätzende Rolle in Bezug auf den Rotundongehalt spielen.

## *Zusammenfassung*

Der Grüne Veltliner ist mit einem Anteilvon ca. 29,4% an der Gesamt-Anbaufläche die Hauptrebsorte Österreichs und damit ein unverwechselbares Aushängeschild des kleinen Weinbaulandes im Herzen

Europas. Diese Rebsorte wird neben Mitteleuropa, Norditalien, mittlerweile auch in Übersee (wie USA, Neuseeland, Australien, Südafrika) kultiviert. Die sensorische Erwartung an typische Grüne Veltliner Weine ist, dass der Grüne Veltliner neben Steinfruchtaromen vor allem eine markante pfeffrige Note (das „Pfefferl") aufweisen sollte. Die nachweisliche Aromaverbindung zwischen Wein und Pfeffer ist laut Literatur das bicyclische Sequiterpen-Keton namens „(-)Rotundon". Im Zuge dieser Arbeit wurde mittels einer SPE-SPME-GC-MS Methode das Vorkommen der Leitsubstanz der pfeffrigen Note, Rotundon, anhand 105 analysierter Proben verifiziert und eine statistische Gehalts-Verteilung von Rotundon im österreichischen Grünen Veltliner, abhängig vom Jahrgang bzw. Anbaugebiet, anhand dieser Proben erstellt. Die Gehalte für Rotundon bewegten sich zwischen 9,5ng/l bis 85ng/l. Die durchschnittlich ermittelte Konzentration liegt lag zwischen bei 31,7ng/l und damit um das Doppelte höher als die sensorische Wahrnehmungsschwelle aus Literaturangaben. Die Bandbreite der Verteilung der Analysenresultate demonstriert den Einfluss von Jahrgang und Gebiet. So beinhalten kühlere und feuchtere Jahrgänge höhere Rotundonkonzentrationen als trockene und heiße Jahrgänge. Zusätzlich erklären sich die Unterschiede auch durch die regionale Verteilung zwischen den verschiedenen Weinbaugebieten. Zusammenfassend weisen unsere Daten darauf hin, dass die Leitsubstanz des Pfeffers, Rotundon, den österreichischen Grünen Veltliner in Abhängigkeit von Klima und Region prägt.


### *Abstract*

With a cultivation area of approximately 29.4% of the total cultivated area, Grüner Veltliner is Austria's main grape variety and the unmistakable poster child of this small wine-producing country in the heart of Europe: in addition to Central Europe and Northern Italy, it is nowadays also cultivated overseas (in countries such as the USA, New Zealand, Australia and South Africa). In addition to their characteristic stone fruit aroma, the sensory expectation of typical Grüner Veltliner wines is the taste of a distinctive peppery note (called "Pfefferl"). According to literature, the connection between wine and pepper concerning aroma compounds is due to the bicyclic sesquiterpenoid ketone "rotundone". In course of this work, the presence of rotundone, which lends the wine its typical peppery note, was verified using SPE-SPME-GC-MS methodology. 105 samples were used to create a statistical distribution profile of rotundone in Austrian Grüner Veltliner wines according to vintage and wine-growing region. The rotundone content ranged from 9.5ng/l to 85ng/l. The average concentration was 31,7ng/l, which is double the sensory perception threshold established in literature. The wide range of rotundone levels found in the samples, demonstrates the influence of vintage and region. Thus, cooler and damper vintages (with high levels of rainfall) contain higher concentrations of rotundone than dry, hot vintages. In addition, differences can also be explained through the regional spread between the various wine-growing regions. In summary, our results indicate that the prevalent peppery note of the substance rotundone characterises Austrian Grüner Veltliner wines, depending on climate and region.


### *Literatur*


SIEBERT T., E., WOOD C, ELSEY G. M., POLLNITZ A. P., 2008: Determination of rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine. Journal of agricultural and food chemistry 56, No. 10, 3745-3748.

WOOD C., SIEBERT T. E., PARKER M., CAPONE D. L., ELSEY G. M., POLLNITZ A. P., EGGERS, M. MEIER M., Vössing T., WIDDER S., KRAMMER G., SEFTON M. A., HERDERICH M. J., 2008: From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. J Agric Food Chem 56 (10), 3738-3744.


### *Adressen der Autoren*


[1] Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau, Wiener Straße 74, 3400 Klosterneuburg

[2] Universität für Bodenkultur Wien, Abteilung Analytische Chemie, Muthgasse 18, 1190 Wien

[*] Ansprechpartner: DI Stefan Nauer, stefan.nauer@weinobst.at



**Wir danken der Österreich Weinmarketing GmbH für die finanzielle Unterstützung dieser Studie.**

### 4.1.2 Auswirkungen von önologischen Maßnahmen auf die Rotundon Konzentration der österreichischen Sorte Grüner Veltliner – Eine Bestandsaufnahme und Vergleich von zwei Versuchsjahren

Im Rahmen der 74. ALVA – Tagung in Klosterneuburg (2019).

**Autoren und Autorinnen**: Nauer, S; Patzl-Fischerleitner, E; Philipp, C; Eder, R (2019).

# Auswirkungen von önologischen Maßnahmen auf die Rotundon Konzentration der österreichischen Sorte Grüner Veltliner – Bestandsaufnahme und Vergleich von zwei Versuchsjahren

Stefan Nauer[1*], Elsa Patzl-Fischerleitner[1], Christian Philipp[1],
Stephan Hann[2] und Reinhard Eder[1]

## *Einleitung:*

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von klassischen oenologischen Maßnahmen wie Gärtemperatur, Maischestandzeit, Schwefelung (Maische/Jungwein), Mostklärung und Hefenährsalzzugabe auf die Rotundonkonzentration von Weinen der Sorte Grüner Veltliner Jahrgang 2011 und 2012 untersucht. Ziel der Arbeit war es, positive bzw. negative Einflüsse seitens kellerwirtschaftlicher Schritte auf den Gehalt der Leitsubstanz der pfeffrigen Note, Rotundon, im Grünen Veltliner festzustellen.

## *Material und Methoden:*

Als Ausgangmaterial für die Weine der 3 unabhängigen Versuchspläne mit $2^2$ vollfaktoriellen Design (14 Versuchsvarianten (5 Varianten A, 5 Varianten B, 4 Varianten C)) in 2facherWiederholung in 2 Jahren (2011/2012) dienten ca. 900 kg Trauben der Sorte Grüner Veltliner, die in der HBLA und BA Klosterneuburg mikrovinifiziert wurden. Dabei unterschieden sich die Versuchspläne folgendermaßen: bei Versuchsplan A wurde die Gärtemperatur (15°C;19°C;23°C) und die Maischestandzeit (0h;3h;6h) variiert, bei Versuchsplan B wurden die Folgen unterschiedlicher Schwefeldosierung zu Maische (0mg/l; 30mg/l; 60mg/l) und Jungwein (40mg/l; 60mg/l; 80mg/l) überprüft. Der Versuchsplan C ermittelte den Einfluss von Mostklärung und Hefenährsalzzugabe. Von allen Weinen wurde eine Rotundonanalyse mittels SPE-SPME-GC-MS nach NAUER et.al (2018) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Statistikprogrammen Minitab 18 und DesignExpert 11, Es wurden neben einer Varianzanalyse auch die Darstellung im Paretodiagramm, Wahrscheinlichkeitsnetz, Haupteffektdiagramm und Wechselwirkungsdiagramm durchgeführt. Zusätzlich wurde auch das Wahrscheinlichkeitsnetz (Normal) für Effekte verwendet, um Größe, Richtung und Bedeutung der Effekte zu ermitteln. Aus der Visualisierung mit Faktordiagrammen (Haupteffekt- und Wechselwirkungsdiagramm), können die Zusammenhänge zwischen Rotundongehalt und den Faktoren (=z. B: Gärtemperatur; Standzeit) grafisch darstellt werden.

## *Ergebnisse und Diskussion:*

Die Varianzanalyse des Versuchsplan A zeigt 2011 für den Faktor Gärtemperatur ($p=0,024$) bzw. für den Faktor Standzeit ($p=0,014$), dass diese Effekte für den Rotundongehalt statistisch signifikant ($\alpha=0,05$) sind. Die Wechselwirkung beider Faktoren ($p=0,143$) ist nicht signifikant. Für 2012 sind diese Effekte statistisch nicht signifikant (Gärtemperatur $p=0,876$; Standzeit $p=0,393$; Gärtemperatur/Standzeit $p=0,889$).
Für 2011 lässt sich aus dem Pareto-Diagramm folgende Bedeutung der Einflussfaktoren feststellen: Die Standzeit, gefolgt von Gärtemperatur, zum Schluss die Wechselwirkung aus Gärtemperatur und Standzeit. Die Referenzlinie für die statische Signifikanz überschreiten nur Standzeit und Gärtemperatur. Die Wechselwirkung aus beiden erreicht diese Referenzlinie nicht. Für das Versuchsjahr 2012 liefert das Pareto-Diagramm folgende Effektreihenfolge: Standzeit, Wechselwirkung Gärtemperatur/Standzeit und zum Schluss Gärtemperatur. Keiner der Einflussfaktoren übertrifft die Referenzlinie. Mittels Wahrscheinlichkeitsnetz (Normal) für Effekte kann abgeleitet werden, dass Standzeit und Gärtemperatur im Versuchsjahr 2011 signifikant, hingegen 2012 nicht signifikant sind. Zusätzlich ergibt sich, dass sich die Gärtemperatur offenbar positiv, die Standzeit hingegen negativ auf den Rotundongehalt auswirkt. Dieser Trend ist sowohl 2011 als 2012 erkennbar. Aus dem Haupteffektdiagramm wird folgendes für 2011 bzw. 2012 ersichtlich. Bei einer Gärtemperatur von 23°C sind die Rotundongehalte am höchsten (MW=11,75ng/l) bei einer Gärtemperatur von 15°C am niedrigsten (MW= 9,4ng/L). Eine kurze Standzeit (0h) bewirkt höhere Rotundongehalte (11,95ng/l) als eine lange Maischestandzeit (6h; 9,23ng/l). Sowohl 2011 als auch 2012 zeigte sich dieser Zusammenhang. Durch die Hydrophobizität des Moleküls

wird vermutlich in leicht wässrig ethanolischer Umgebung kein Auslaugungs-Effekt auftreten bzw. kann ein Abbinden des schalenlokalisierten Rotundons an feste Bestandteile stattfinden. Auch aus dem Wechselwirkungsdiagrammen zeigt sich, dass hohe Gärtemperaturen und kurze Standzeiten förderlich für höhere Rotundongehalte sind. Ein Abgleich mit der Literatur (MARAIS, 1983) bestätigte, dass eine Temperatursteigerung während der Gärung einen Anstieg an Terpenen bewirkt.

Die Varianzanalyse des Versuchsplans B zeigt 2011, dass der Parameter Maischeschwefelung ($p=0,045$) für den Rotundongehalt statistisch signifikant ist ($\alpha=0,05$). Auf die Jungweinschwefelung ($p=0,282$) trifft dies hingegen nicht zu. Die Wechselwirkung beider Faktoren ($p=0,556$) ist nicht signifikant. Für das Versuchsjahr 2012 sind diese Effekte nicht signifikant. Bei Variante B im Versuchsjahr 2011 lässt sich aus dem Pareto-Diagramm folgende Bedeutung der Einflussfaktoren feststellen: Die Maischeschwefelung, gefolgt von Jungweinschwefelung, zum Schluss die Wechselwirkung aus Maische- und Jungweinschwefelung. Die Referenzlinie für die statische Signifikanz erreicht nur der Parameter Maischeschwefelung. Die Jungweinschwefelung und die Wechselwirkung aus Maische- und Jungweinschwefelung erreicht die Referenzlinie für statische Signifikanz nicht. Für das Versuchsjahr 2012 liefert das Pareto-Diagramm folgende Effektreihenfolge: Maischeschwefelung, Wechselwirkung Maische- und Jungweinschwefelung und zum Schluss Jungweinschwefelung. Hinsichtlich statistischer Signifikanz muss hier festgehalten werden, dass keiner der Einflussfaktoren die Referenzlinie übertrifft. Mittels Wahrscheinlichkeitsnetz (Normal) für Effekte kann für Variante B abgeleitet werden, dass Maische- und Jungweinschwefelung in den Versuchsjahren 2011 und 2012 nicht signifikant waren. Zusätzlich lässt sich für 2011 ableiten, dass sich Maische- und Jungweinschwefelung bzw. eine Kombination der beiden negativ auf den Rotundongehalt auswirken. Für den Jahrgang 2012 lässt sich ableiten, dass sich diese Parameter offenbar positiv auf den Rotundongehalt auswirken. Aus dem Haupteffektdiagramm wird für 2011 ersichtlich, dass nicht geschwefelte Maische bzw. niedrige Jungweinschwefelung (40mg/l) offenbar zu höheren Rotundongehalten (9,36ng/l bzw. 8,78ng/l) führt als Maischeschwefelung bei 60mg/l bzw. Jungweinschwefelung bei 80mg/l (6,9ng/l bzw. 7,4ng/l). Das generierte Haupteffektdiagramm für Versuchsplan B von 2012 hingegen zeigt den gegenteiligen Effekt. Auch die Wechselwirkungsdiagramme für 2011 bzw. 2012 untermauern dieses Phänomen für die beiden Versuchsjahre. Die teilweise geringen Rotundongehaltsunterschiede zwischen einigen Varianten 2012 könnten Ursache für dieses Ergebnis sein.

Der aus der Literatur (de AZEVEDO et.al, 2007) bekannte Zusammenhang zwischen Bisulfit und Carbonylverbindungen besagt, dass stabile Addukte (Hydroxyalkylsulfonsäuren) entstehen können. Aliphatische Aldehyde werden im Unterschied zu Ketonen bevorzugt. Mit dieser These des Abbindens lassen sich die höheren Rotundongehalte von 2011 ohne Maische- bzw. bei niedriger Jungweinschwefelung erklären. Diese These kann nicht für die Ergebnisse des Jahrgangs 2012 herangezogen gelten, weil die Rotundongehaltsunterschiede zwischen einigen Varianten teilweise zu gering sind.

Die Varianzanalyse des Versuchsplans C zeigt 2011, dass die Mostklärung ($p=0,769$) und die Hefenährsalzzugabe ($p=0,799$) für den Rotundongehalt statistisch nicht signifikant sind ($\alpha=0,05$). Auch die Wechselwirkung beider Faktoren ist nicht signifikant ($p=0,808$). Für das Jahr 2012 wirkt sich die Mostklärung signifikant auf den Rotundongehalt aus ($p=0,028$), die Hefenährsalzzugabe jedoch nicht ($p=0,713$). Aus dem Pareto-Diagramm lässt sich folgende Bedeutung der Einflussfaktoren feststellen: Die Mostklärung, gefolgt von Hefenährsalzzugabe, zum Schluss die Wechselwirkung aus Mostklärung und Hefenährsalzzugabe. Die Referenzlinie für die statistische Signifikanz erreicht keiner dieser Effekte. Für 2012 liefert das Pareto-Diagramm folgende Effektreihenfolge: Mostklärung, Wechselwirkung Mostklärung/Hefenährsalzzugabe und zum Schluss Hefenährsalzzugabe. Nur der Einflussfaktor Mostklärung erreicht knapp die Referenzlinie. Mittels Wahrscheinlichkeitsnetz (Normal) für Effekte kann abgeleitet werden, dass keiner der Parameter im Versuchsjahr 2011 signifikant ist. Hingegen ist in 2012 nur die Auswirkung der Mostklärung signifikant. Zusätzlich lässt sich aus dem Normal Plot für 2011 ableiten, dass sich die Mostklärung und die Wechselwirkung aus beiden positiv, das Hefenährsalz hingegen negativ auf den Rotundongehalt auswirkt. Aus dem Normal-Plot von 2012 lässt sich ableiten, dass sich sowohl Mostklärung, Hefenährsalz und die Wechselwirkung negativ auf Rotundon auswirken. Aus dem Haupteffektdiagramm für 2011 ist ersichtlich, dass Mostklärung bzw. fehlende Hefenährsalzzugabe zu höheren Rotundongehalten (11,5ng/l;11,5ng/l) führt, als bei Mosten ohne Klärung bzw. Hefenährsalzzugabe(11,2ng/l; 11,2ng/l). Die teilweise geringen Rotundongehaltsunterschiede zwischen diesen Varianten könnten für dieses Ergebnis verantwortlich sein. Das Haupteffektdiagramm von 2012 zeigt hingegen das Gegenteil. Auch die Wechselwirkungsdiagramme verdeutlichen diesen Zusammen-

hang für beide Jahre. Als Ursache kommt in Betracht, dass das hydrophobe Rotundon an Schalenbestandteile bindet und so, abhängig von der Mostvorklärung, im gärenden Most verbleibt. Andererseits können hierfür auch die teilweise geringen Rotundongehaltsunterschiede verantwortlich sein.


### *Zusammenfassung*

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von klassischen önologischen Maßnahmen wie Gärtemperatur, Maischestandzeit, Schwefelung (Maische/Jungwein), Mostklärung und Hefenährsalzzugabe auf die Rotundonkonzentration von Weinen der Sorte Grüner Veltliner Jahrgang 2011 und 2012 untersucht. Von allen Versuchsweinen wurde eine Rotundonanalyse mittels SPE-SPME-GC-MS durchgeführt. Von den Versuchsjahren 2011 und 2012 lässt sich festhalten, dass sich eine hohe Gärtemperatur bzw. niedrige Standzeit förderlich den auf den Rotundongehalt auswirkten. Mit den Resultaten der Parameter Maische/Jungwein-Schwefelung zeigte sich ein sehr gegenläufiges Bild. Jahrgang 2011 belegt, dass niedrige Schwefelungen förderlich waren, während 2012 genau der umgekehrte Effekt eintrat. Auch die Parameter Mostklärung und Hefenährsalzzugabe zeigten ein sehr differenziertes Bild. Einerseits führten 2011 Mostklärung bzw. fehlende Hefenährsalzzugabe zu höheren Rotundongehalten, 2012 hingegen zeigte den umgekehrten Effekt. Geringe Unterschiede im Rotundongehalt des Jahres 2011 könnten die Ursache für diese gegenteiligen Ergebnisse sein.



### *Abstract*

In this study, effects of classical oenological practice, such as fermentation temperature, maceration time, sulfurization (mash/young wine), must clarification and addition of yeast nutrients on Rotundone concentration of Grüner Veltliner vintage 2011 and 2012 was investigated. Rotundone analysis was carried out by SPE-SPME-GC-MS. From the experimental years 2011 and 2012, it could be stated that a high fermentation temperature or a short maceration time led to positive effects on Rotundon contents. The results of sulfurization showed an opposite picture. Vintage 2011 showed that low levels of sulfur were beneficial, while in 2012 the opposite effect occurred. The parameters must clarification and addition of yeast nutrients showed a differentiated picture. On the one hand, must clarification or lack of supplementation with yeast nutrients led to higher Rotundone levels in 2011, while 2012 showed the opposite effect. Minor differences in the content of Rotundone in 2011 could be the cause of these contrary results.


### *Literatur*


De AZEVEDO L ,REIS M, MOTTA L, ROCHA G, SILVA L und de ANDRADE J 2007: Evaluation of the Formation and Stability of Hydroxyalkylsulfonic Acids in Wines J. Agric. Food Chem. 55 (21), pp 8670–8680

MARAIS ,J (1987) Terpenes in the aroma on grape and wine. A review, South Afric.j.Enol.Vitic.4, 49-58. NAUER,S, BRANDES,W, PATZL-EISCHERLEITNER E., HANN S und EDER R. 2018: Analysis of (-)-Rotundone by means of SPE-SPME-GC-MS in Austrian quality wines of the 'Gruner Veltliner' variety. Mitt. Klosterneuburg 68(2): 107-119


### *Adresse der Autoren*


[1]HBLA und BA für Wein- und Obstbau, Abteilung Chemie und Qualitätskontrolle, Klosterneuburg

[2]Universität für Bodenkultur Wien, Abteilung Analytische Chemie, Muthgasse 18, 1190 Wien

*Ansprechpartner: DI Stefan NAUER, stefan.nauer@weinobst.at

# Tabellenverzeichnis

*Tabelle 1*: Überblick ausgewählter Schlüsselverbindungen (impact odours) bestimmteter Rebsorten. ..... 4

*Tabelle 2*: Vergleich der Rotundon Gehalte von Kräutern, Wein, Trauben in µg/kg. ..... 11

*Tabelle 3*: Vorkommen bzw. Vergleich von Rotundongehalten bisher analysierter Rebsorten (Handelsproben). ..... 14

*Tabelle 4*: Übersicht Methoden zur Quantifizierung des Sequiterpenketons Rotundon ..... 33

*Tabelle 5*: Übersicht und Beschreibung derzeit genutzter Probenvorbereitungsmethoden für den Spuren-Analyt Rotundon ..... 35

*Tabelle 6*: Allgemeine Gegenüberstellung der Analysentechniken GC-MS, GC-MS/MS, MDGC-MS, GCxGC – Vorteile und Nachteile ..... 39

*Tabelle 7*: Jahrgangsmäßige Verteilung der Proben unter Berücksichtigung des Klimas 2009 bis 2015 ..... 43

*Tabelle 8*: Überblick statistischer Werkzeuge zur Auswertung der drei durchgeführten statistischen 2x2-Versuchspläne ..... 55

# Abbildungsverzeichnis

*Abbildung 1*: (-)-Rotundon Struktur ..... 6
*Abbildung 2*: Überblick/Auszug Trauben bzw. weinrelevante Terpene ..... 10
*Abbildung 3*: Visueller Vergleich der Rotundongehalte von Kräutern, Wein, Trauben in µg/kg ..... 13
*Abbildung 4*: Überblick der chemischen Umwandlung in der Terpenbiosynthesebildung der Ausgangsprodukte ..... 16
*Abbildung 5*: Biosyntheseweg für (−)-Rotundon ..... 19
*Abbildung 6*: Vorgeschlagene biosynthetische Bildung von Rotundon: α-Guaien-bildende Carbokationskaskade gefolgt von radikalisch initiierter Oxidation ..... 19
*Abbildung 7*: Zusammenfassender Überblick – Positive und negative Einflüsse auf den Rotundongehalt von Trauben und Wein; ..... 29
*Abbildung 8*: Allgemeine Übersicht genutzter Methoden und Vorgangsweise in den Publikationen ..... 32
*Abbildung 9*: Grafische Darstellung Rebflächenverteilung – Grüner Veltliner bzgl. Weinbaugebiete. ..... 41
*Abbildung 10*: Geografische Verteilung der 108 analysierten Handelsproben der Sorte Grüner Veltliner ..... 42
*Abbildung 11*: Überblick des Ablaufs der Probenaufarbeitung für die Rotundonanalyse ..... 44
*Abbildung 12*: Zusammenfassung Überblick von Chromatogrammen bzw. Auswertung der umgesetzten SPE-SPME-GC-MS Analysemethode ..... 45
*Abbildung 13*: Chromatogramm von Rotundon (c= ca 36ng/l) im Regelwein ..... 46
*Abbildung 14*: Chromatogramm des Internen Standards 5,7-Dimethyltetralon (c=1000ng/l) im Regelwein ..... 47
*Abbildung 15*: Kalibrationskurve Rotundon in einer Weinmatrix mittels Standardaddition ..... 48
*Abbildung 16*: Kalibrationskurve von Rotundon in einem Modelwein (sogenannter „Kunstwein“) ..... 49
*Abbildung 17*: Veranschaulichung der drei durchgeführten $2^2$-Pläne inkl. Faktoren und Levels dargestellt als Designmatrix ..... 50
*Abbildung 18*: Veranschaulichung der drei durchgeführten 2x2-Pläne, Darstellung der Faktoren + Levels aus geometrischer Sicht bzw. als Designmatrix ..... 51

*Abbildung 19*: Überblick technologische Rahmenbedingungen der drei unabhängigen Versuchspläne mit $2^2$ faktoriellem Design ..... 52
*Abbildung 20*: Übersicht des Praktischen Ablaufschemas der drei durchgeführten faktoriellen Versuchspläne sowohl von 2011 bzw. 2012 ..... 53
*Abbildung 21*: Impressionen praktische Realisierung –Technologieversuch/faktorielle Versuchspläne ..... 54
*Abbildung 22*: Einfluss des Jahrgangs auf den Rotundongehalt ..... 57
*Abbildung 23*: Einfluss Weinbauregion bzw. Weinbaugebiet auf den Rotundongehalt ..... 58
*Abbildung 24*: Kombinierter Einfluss von Jahrgang und Region ..... 59